

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22854

研究課題名(和文) 網羅的ゲノム編集生体内スクリーニング法による難治性B細胞リンパ腫治療標的の探索

研究課題名(英文) Elucidation for novel target of aggressive B cell lymphoma by whole genome in vivo CRISPR/Cas9 screening

研究代表者

水谷 信介 (Mizutani, Shinsuke)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40883088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では高悪性度B細胞リンパ腫(B cell lymphoma: BCL)の病態形成過程の一部を担うことが既知である遺伝子、MYC誘導性のBCL発症マウスモデルを活用した網羅的ゲノム編集生体内ノックアウトスクリーニングを行い、MYC過剰発現との協調作用により、その欠失が超高リスクBCLを形成する新規がん抑制遺伝子の同定を目指すこととした。検討の結果、新規がん抑制遺伝子として同一のパスウェイ上に存在2つの遺伝子を同定し(研究遂行上の秘密保持の観点から遺伝子X, Yとする)、生体内検証実験で確認できた。臨床検体においてもその予後に与える影響を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性リンパ腫は造血器腫瘍において最も高頻度な疾患群であり、高齢化社会において増加の一途にある。なかでもBCLはその大部分を占めるが、近年の免疫化学療法的发展により、BCLの長期治療成績は著明に改善した。しかしながら、超高リスク病態の形成を機能的観点において司る真の責任分子異常は未だに不明である。本研究で同定した新規がん抑制遺伝子は、高度難治BCL治療における新たな標的分子候補となり、新規治療戦略の開発への発展が期待できる。また、臨床プロファイルとの相関を検討することにより、診断と治療における新たなバイオマーカー確立への応用も期待でき、高度難治BCL治療戦略の大きな発展につながる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed a comprehensive genome-editing in vivo knockout screening using Eμ-MYC mouse model known to induce highly aggressive B cell lymphoma (BCL). We aimed to identify novel tumor suppressor genes whose deletion forms ultra-high-risk BCLs in concert with MYC overexpression. As a result, two genes on the same pathway were identified as novel tumor suppressor genes (designated genes X and Y for the sake of confidentiality), which were confirmed by in vivo validation experiments. We were also able to confirm their prognostic impact in clinical samples.

研究分野：血液内科

キーワード：CRISPR/Cas9 MYC 悪性リンパ腫 がん抑制遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は造血器腫瘍において最も高頻度な疾患群であり、高齢化社会において増加の一途にある。なかでもBCLはその大部分を占めるが、今世紀以後の抗CD20モノクローナル抗体Rituximabを含む免疫化学療法の発展により、BCLの長期治療成績は著明に改善した。例えば最大病型であるびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(Diffuse large BCL; DLBCL)では、70%程度が完治するようになっている。一方、未だに高度難治性で1年以内に致命的転機をたどる超高リスク症例が10-20%存在し(Kobayashi. Blood Cancer J 2016)、近年の詳細なゲノム解析などによって、予後不良群における様々な遺伝子異常パターンも明らかになりつつある(Chapuy. Nat. Med 2018, Schmitz. NEJM 2018)。しかしながら、超高リスク病態の形成を機能的観点において司る真の責任分子異常は未だに不明である。したがって、その解明に基く直達的な治療戦略の開発は、真の疾患克服に向けて求められる重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究では高悪性度BCLの病態形成過程の一部を担うことが既知である、MYC誘導性のBCL発症マウスモデルにおいて全ゲノムCRISPR/Cas9生体内ノックアウトスクリーニングを行い、MYC過剰発現との協調作用によりその欠失が超高リスクBCLを形成する新規がん抑制遺伝子の同定を目指す。同時にBCLの臨床検体を解析し、その変異の有無の臨床プロファイルに及ぼす影響についての検討を行う。MYC過剰発現は高悪性度病態にしばしば観察されるが、重要なことに共存する分子異常の種類によって疾患形質が大きく異なることから、本研究戦略はMYC関連超高リスク病態形成の分子メカニズムの解析には最適のモデルと言える。本研究で使用するマウスモデルはBCLを早期発症し、TP53等のがん抑制遺伝子の欠損が加わることで腫瘍発症が促進されるなど(Martins. Cell 2006)、新規がん抑制遺伝子の探索において高い実績がある。また、ゲノムワイドスクリーニングは一般的にin vitroで行われることが多いが、本研究ではin vivoでマウス全ゲノムを網羅的に解析可能である点も特徴的である。本研究で新規がん抑制遺伝子が同定できれば、高度難治BCL治療における新たな標的分子候補となり、新規治療戦略の開発への発展が期待できる。また、臨床プロファイルとの相関を検討することにより、診断と治療における新たなバイオマーカー確立への応用も期待でき、高度難治BCL治療戦略の大きな発展につながる。また、本研究の成果は他の様々な造血器悪性腫瘍、がん種にも応用が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では上記の背景や研究成果をもとに、研究期間内に大きく以下の2つの点を明らかにする。また研究計画の概要を下図に示す。

I BCL 発症マウスモデルを用いた新規がん抑制遺伝子の同定

マウス全ゲノムsgRNA ライブラリーを使用した新規がん抑制遺伝子候補探索のための生体内一次スクリーニング(一部予備実験済み)と生体内検証実験(バリデーション)

II 臨床検体を用いた、同定された新規がん抑制遺伝子候補の変異有無の検討

申請者所属施設における、BCL 腫瘍検体を用いた同定遺伝子変異の有無の検討。

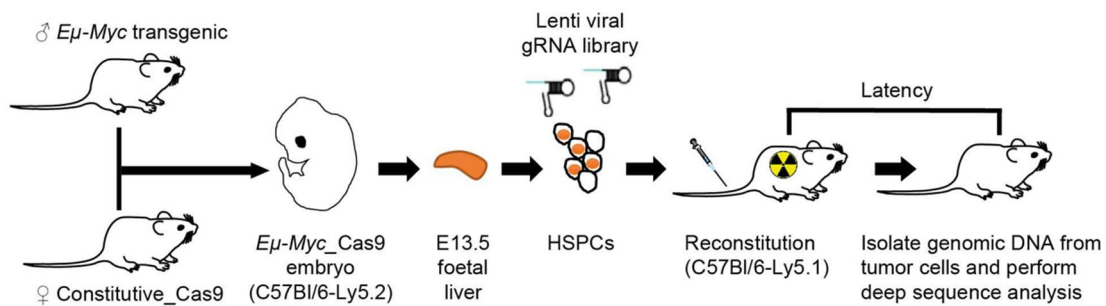
【2020 年度の研究計画】

Cas9 恒常的発現マウスと、BCL 発症マウスモデルとの交配により両形質を有する胎仔肝由来造血幹前駆細胞を得る。これにレンチウイルスを用いて構築済みのマウス全ゲノムsgRNA ライブ

ラー (19,150 蛋白質コード遺伝子を標的とする 87,897 sgRNA) を導入し、致死放射線照射を行った野生型マウスに移植することで造血システムを再構築し、移植マウスの腫瘍発症時期を観察する生体内遺伝子ノックアウトスクリーニングを行う。得られた腫瘍よりゲノムDNAを採取し、sgRNA 配列領域を次世代シーケンサーで解析を行い、腫瘍細胞内で濃縮されたsgRNA から新規がん抑制遺伝子候補を同定する。移植後100 日前後が生存中央値であり、より早期での発症群に有力候補が存在すると予想される。

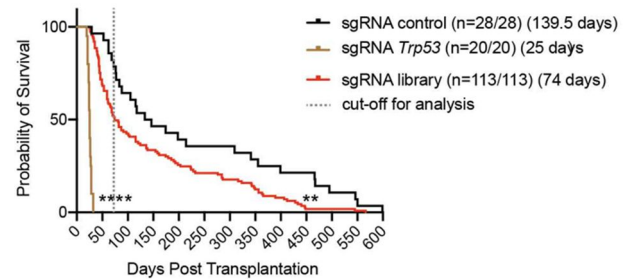
【2021 年度の研究計画】

次にこのスクリーニングにより得られた上位数種類のがん抑制遺伝子候補を標的とするsgRNAを導入したレンチウイルスベクターを作成し、同様の造血幹前駆細胞移植実験を行い、個別にその腫瘍抑制能を検証する。同時にBCL 臨床検体よりゲノムDNA を抽出し、同定された新規がん抑制遺伝子候補の変異の有無を検討し、臨床プロファイルとの相関を検討する。同定された新規がん抑制遺伝子はB 細胞リンパ腫治療における新たな標的分子、バイオマーカーの候補となる。



4. 研究成果

新規の腫瘍抑制遺伝子を同定するために、MYC 誘導性の BCL 発症マウスモデルを用いて、in vivo で初代細胞を用いたマウス全ゲノム sgRNA ライブラリーによる CRISPR スクリーニングを行った。これらのスクリーニングは、TRP53 を介した腫瘍の重要なエフェクターを同定する可能性が高い。



MYC 誘導性の BCL 発症マウスモデルで発生するリンパ腫の 20%は *Trp53* の変異で選択され、*Trp53* またはそのプロアポトーシス標的遺伝子 *Puma* の単一のアレルでも欠損すると、MYC 誘導性の BCL 発症マウスのリンパ腫発生が大幅に促進されるため、TRP53 による腫瘍抑制の重要なエフェクターを特定できると考えられる。E13.5 *Eμ-Myc_Cas9* ダブルトランスジェニックマウス胚 (C57BL/6-Ly5.2 バックグラウンド) の胎児肝臓から造血幹/前駆細胞 (HSPC) に、マウスのタンパク質コーディング遺伝子 19,150 個 (遺伝子あたり 4-5 個の sgRNA) を標的とする sgRNA 87,987 本を含むプールした全ゲノム sgRNA ライブラリーをトランスフェクションさせた。ポジティブコントロールとして、c-MYC によるリンパ腫の発生を促進することが知られているマウス *Trp53* を標的とする sgRNA を用いた。ネガティブコントロールとして、ヒト BIM 遺伝子を標的とした sgRNA を用いた(以下、コントロール sgRNA と呼ぶ)。sgRNA を導入した *Eμ-Myc_Cas9* トランスジェニック HSPC を致死量の放射線照射を行った C57BL/6-Ly5.1 マウスに移植したところ、陰性コントロール sgRNA を導入した *Eμ-Myc_Cas9* HSPC で再構成したマウスは、移植後~140 日の中央潜伏期間でリンパ腫を発生させた。またこれまでの観察と同様に、マウス *Trp53*

sgRNA はリンパ腫の発生を大幅に早めた（潜伏期間中央値～25 日）。注目すべきは、マウス全ゲノム sgRNA ライブラリーを導入した E μ -Myc_Cas9 HSPC を移植した一部のマウスが、陰性対照 sgRNA コホートと比較してより急速なリンパ腫発生（潜伏期間中央値～74 日）を示したことである。ドナーHSPC に導入した sgRNA にかかわらず、再構成マウスのすべてが、sIg-pre-B または sIg+B 細胞リンパ腫を発症した。全ゲノム sgRNA ライブラリーを導入したマウスに発生したリンパ腫のうち、移植後 75 日以前に発症したものはリンパ腫の発生を促進したとみなし、さらに詳細を検討した（n=60/113 sgRNA ライブラリーレシピエントマウス）。腫瘍細胞からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンシング（NGS）により標的とされた sgRNA を同定した。DNA 抽出に用いた組織サンプルのほとんどは悪性リンパ腫細胞であり、その中から少数の高濃度 sgRNA を同定することができた。一方で、低いリードカウントで、全遺伝子の 75%以上を標的とする多数の sgRNA も検出された。これらの sgRNA は、サンプルの正常造血細胞に存在すると推測された。これらの結果から、スクリーニングに使用した形質転換 E μ -Myc_Cas9 HSPC において、ごく少数が MYC 誘導性の BCL 発生を促進することが示唆された。このスクリーンから得られた標的遺伝子は、以下の基準で優先順位を付けられた。(1) sgRNA が上位 4 位以内に濃縮されていた、(2) 2 つ以上の独立したリンパ腫で sgRNA が上位 4 位以内に濃縮されていた、(3) 2 つ以上のリンパ腫で同じ遺伝子を標的とする複数の sgRNA が濃縮されていた。これらの基準より既知の腫瘍抑制遺伝子が複数同定された一方、新規がん抑制遺伝子としていくつかの候補遺伝子を同定したが、その中で同一のパスウェイ上に存在 2 つの遺伝子に注目し（研究遂行上の秘密保持の観点から遺伝子 X, Y とする）、生体内検証実験（パリテーション）で確認できた。臨床検体においてもその予後に与える影響を確認することができ、現在その成果に関する論文を執筆中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Okamoto H, Uoshima N, Kamitsuji Y, Kawata E, Komori Y, Sasaki N, Tsutsumi Y, Tsukamoto T, Mizutani S, Nannya Y, Kuroda J	4. 巻 -
2. 論文標題 Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria complicated with essential thrombocythemia harboring concomitant PIGA, CALR, and ASXL1 mutations.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-021-04425-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawaji-Kanayama Y, Nishimura A, Yasuda M, Sakiyama E, Shimura Y, Tsukamoto T, Kobayashi T, Mizutani S, Okamoto S, Ohmura G, Hirano S, Konishi E, Shibuya K, Kuroda J:	4. 巻 13
2. 論文標題 Chronic Invasive Fungal Rhinosinusitis with Atypical Clinical Presentation in an Immunocompromised Patient.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Infection and drug resistance	6. 最初と最後の頁 3225-3232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S273317	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kawaji-Kanayama Y, Kobayashi T, Muramatsu A, Uchiyama H, Sasaki N, Uoshima N, Nakao M, Takahashi R, Shimura K, Kaneko H, Kiyota M, Wada K, Chinen Y, Hirakawa K, Fuchida SI, Shimazaki C, Matsumura-Kimoto Y, Mizutani S, Tsukamoto T, Shimura Y, Horiike S, Taniwaki M, Kuroda J,	4. 巻 5
2. 論文標題 Prognostic impact of resistance to bortezomib and/or lenalidomide in carfilzomib-based therapies for relapsed/refractory multiple myeloma: The Kyoto Clinical Hematology Study Group, multicenter, pilot, prospective, observational study in Asian patients.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Rep (Hoboken)	6. 最初と最後の頁 e1476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cnr2.1476.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto H, Kamitsuji Y, Komori Y, Sasaki N, Tsutsumi Y, Miyashita A, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Kobayashi T, Uoshima N, Kuroda J	4. 巻 254
2. 論文標題 Durable Remission of Chemotherapy-Refractory Myeloid Sarcoma by Azacitidine.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 101-105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.254.101.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nagata H, Kuriyama K, Nishikawa R, Ohshiro M, Yamamoto-Sugitani M, Fujimoto-Hirakawa Y, Matsumoto Y, Iwai T, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Kobayashi T, Fukuda W, Uchiyama H, Kuroda J	4. 巻 100
2. 論文標題 Iguratimod triggers the relapse of methotrexate-associated lymphoproliferative disorder.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Hematol	6. 最初と最後の頁 2849-2850
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-021-04645-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto H, Uoshima N, Muramatsu A, Isa R, Fujino T, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Kobayashi T, Kawata E, Uchiyama H, Kuroda J, Kyoto Clinical Hematology Study Group Investigators.	4. 巻 11
2. 論文標題 Combination of Bone Marrow Biopsy and Flow Cytometric Analysis: The Prognostically Relevant Central Approach for Detecting Bone Marrow Invasion in Diffuse Large B-Cell Lymphoma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics (Basel).	6. 最初と最後の頁 1724
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11091724.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Taminishi-Katsuragawa Y, Shimura Y, Inoue Y, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Mizutani S, Kobayashi T, Takeda-Miyata N, Nishimura A, Takatsuka K, Kuroda J	4. 巻 62
2. 論文標題 Gastric Myeloid Sarcoma Mimicking a Scirrhus Gastric Cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 1231-1235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7986-21.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Muramatsu A, Kobayashi T, Kawaji-Kanayama Y, Uchiyama H, Sasaki N, Uoshima N, Nakao M, Takahashi R, Shimura K, Kaneko H, Kiyota M, Wada K, Chinen Y, Hirakawa K, Fuchida SI, Shimazaki C, Mizutani S, Tsukamoto T, Shimura Y, Taniwaki M, Teramukai S, Kuroda J; Kyoto Clinical Hematology Study Group (KOTOSG) Investigators.	4. 巻 -
2. 論文標題 Pretreatment serum level of interleukin-6 predicts carfilzomib-induced hypertension in relapsed/refractory multiple myeloma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2022.2038373.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawaji-Kanayama Y, Muramatsu A, Sasaki N, Shimura K, Kiyota M, Fuchida S, Isa R, Fujino T, Matsumura-Kimoto Y, Tsukamoto T, Chinen Y, Mizutani S, Nakao M, Kaneko H, Kawata E, Hirakawa K, Takahashi R, Shimazaki C, Uchiyama H, Uoshima N, Shimura Y, Kobayashi T, Taniwaki M, Kuroda J	4. 巻 115
2. 論文標題 Clinical impacts of frailty, poor performance status, and advanced age in carfilzomib-containing treatment for relapsed/refractory multiple myeloma: post hoc investigation of the KOTOSG multicenter pilot prospective observational study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Hematology	6. 最初と最後の頁 350-362
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-021-03262-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isa R, Horinaka M, Tsukamoto T, Mizuhara K, Fujibayashi Y, Taminishi-Katsuragawa Y, Okamoto H, Yasuda S, Kawaji-Kanayama Y, Matsumura-Kimoto Y, Mizutani S, Shimura Y, Taniwaki M, Sakai T, Kuroda J	4. 巻 23
2. 論文標題 The Rationale for the Dual-Targeting Therapy for RSK2 and AKT in Multiple Myeloma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci	6. 最初と最後の頁 2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23062919.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Maekura C, Muramatsu A, Nagata H, Okamoto H, Onishi A, Kato D, Isa R, Fujino T, Tsukamoto T, Mizutani S, Shimura Y, Kobayashi T, Okumura K, Inaba T, Nukui Y, Kuroda J	4. 巻 15
2. 論文標題 Clinical Implication of the Effect of the Production of Neutralizing Antibodies Against SARS-Cov-2 for Chronic Immune Thrombocytopenia Flare-Up Associated with COVID-19 Infection: A Case Report and the Review of Literature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infect Drug Resist	6. 最初と最後の頁 2723-2728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S360238. eCollection 2022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷 信介, 太田 沙絵子, 金山 悠加, 服部 雄, 井上 祐, 村松 彩子, 岡本 明也, 大西 朗生, 水原 健太郎, 民西 葉子, 伊佐 怜子, 山口 順子, 藤野 貴大, 西山 大地, 木元 弥生, 塚本 拓, 志村 勇司, 古林 勉, 堀池 重夫, 志村 和穂, 高橋 良一, 兼子 裕人, 黒田 純也
2. 発表標題 Carfilzomib含有救援療法後2回目の自家末梢血幹細胞移植を実施した再発多発性骨髄腫の検討
3. 学会等名 第43回日本造血細胞移植学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷信介, 太田沙絵子, 金山悠加, 服部雄, 井上祐, 村松彩子, 岡本明也, 大西朗生, 水原健太郎, 民西葉子, 伊佐怜子, 山口順子, 藤野貴大, 西山大地, 木元弥生, 塚本拓, 志村勇司, 古林勉, 堀池重夫, 志村和穂, 高橋良一, 兼子裕人, 黒田純也。
2. 発表標題 Efficacy of salvage therapy with carfilzomib followed by 2nd aPBSCT in relapse myeloma patients.
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷信介, 太田沙絵子, 金山悠加, 服部雄, 井上祐, 村松彩子, 岡本明也, 大西朗生, 水原健太郎, 民西葉子, 伊佐怜子, 山口順子, 藤野貴大, 西山大地, 木元弥生, 塚本拓, 志村勇司, 古林勉, 堀池重夫, 志村和穂, 高橋良一, 兼子裕人, 黒田純也。
2. 発表標題 Efficacy of salvage therapy with carfilzomib followed by 2nd aPBSCT in relapse myeloma patients.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷信介, 太田沙絵子, 金山悠加, 服部雄, 井上祐, 村松彩子, 岡本明也, 大西朗生, 水原健太郎, 民西葉子, 伊佐怜子, 山口順子, 藤野貴大, 西山大地, 木元弥生, 塚本拓, 志村勇司, 古林勉, 堀池重夫, 志村和穂, 高橋良一, 兼子裕人, 黒田純也。
2. 発表標題 Efficacy of Carfilzomib-containing rescue chemotherapy followed by HDT/2nd ASCT in relapsed multiple myeloma patients.
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
オーストラリア	The Walter and Eliza Hall Institute	of Medical Research	