

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08324

研究課題名(和文) マウスB細胞腫瘍モデルを用いたNotchシグナル活性化の意義の解明

研究課題名(英文) Clarifying the significance of Notch signal activation in B-cell lymphomas

研究代表者

錦織 桃子(Nishikori, Momoko)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：60378635

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞リンパ腫の様々な病型においてNotchシグナルの活性化を生じる遺伝子異常が認められる。我々はその意義を明らかにするために、成熟B細胞において活性化型Notch1が高発現するマウスを作り出し解析を行い、IL-33の分泌を介し2型ヘルパーT細胞や制御性T細胞優位の反応を惹起し、抗腫瘍免疫の作用しにくい免疫微小環境を生じることを明らかにした。また、エピゲノム修飾薬のスクリーニングを用いて、遺伝子発現修飾機構(エピゲノム修飾)により低下したリンパ腫のCD58の発現をEZH2阻害薬が回復させることで、リンパ腫に対する免疫を活性化することができることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではB細胞リンパ腫における免疫逃避機構を明らかにし、その治療応用を行うことを目指した。我々はB細胞リンパ腫にしばしば認められるNotchシグナルの活性化異常が抗腫瘍免疫の作用しにくいT細胞反応をもたらすことを明らかにした。また、遺伝子発現修飾機構(エピゲノム修飾)により低下したリンパ腫のCD58の発現をEZH2阻害薬が回復させることにより、リンパ腫に対する免疫を活性化することができることを示した。

研究成果の概要(英文)：Activating mutations of Notch 1 and 2 are often found in B-cell lymphomas. We found that B cells with constitutive Notch1 activation preferentially induce T-cell responses that does not involve in the anti-lymphoma immune reaction (type2 helper T-cell and regulatory T-cells) via IL33 production. On the other hand, loss of CD58 is a common mechanism for tumor immune evasion in lymphoid malignancies. We performed epigenetic library screening and found that EZH2 inhibitors specifically enhanced CD58 expression of lymphoma cells. Restoring the expression of CD58 in lymphoma cells using an EZH2 inhibitor was shown to enhance immune reaction of T and NK cells against lymphoma cells. These findings provide a molecular basis for immunotherapy for lymphoma treatment.

研究分野：血液内科学

キーワード：悪性リンパ腫 免疫微小環境 免疫逃避機構

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫のうち、成熟 B 細胞を起源とする B 細胞リンパ腫は国内外で頻度が高く、抗がん剤とリツキシマブとの併用療法で治療成績の改善が得られているものの、依然難治性症例が一定割合存在し、新規治療薬導入による治療成績の向上が望まれている。現在、悪性リンパ腫の様々な病型で網羅的遺伝子解析のデータが蓄積され、悪性リンパ腫の各病型における特徴的な遺伝子異常が明らかにされつつあるが、それらをいかに病態理解につなげ、治療へ応用するかが課題となっている。近年の遺伝子解析研究により Notch シグナルの活性化を生じる遺伝子異常は、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫などの様々な B 細胞リンパ腫において明らかにされつつある。しかし、その意義については詳細が明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

活性化型 Notch1 を成熟 B 細胞で恒常的に高発現する遺伝子改変マウスを作出し解析を行うことにより、B 細胞リンパ腫において Notch シグナルの活性化をもたらす遺伝子異常が持つ意義を明らかにする。また、公開されているヒトの悪性リンパ腫のデータベースを用いてその妥当性につき検証を行う。さらに、悪性リンパ腫の代表的な免疫逃避機構の一つである CD58 分子に着目してエピゲノム修飾薬のスクリーニングを行い、悪性リンパ腫の新たな治療標的を明らかにする。

3. 研究の方法

Notch1 の細胞内ドメイン(Notch-IC)を AICDA promoter 下に Cre リコンビナーゼで発現誘導し、胚中心 B 細胞以降で恒常的に Notch-IC を発現誘導できる遺伝子改変マウスを作出し解析を行った。また、ヒトのびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) のデータベース解析において、Notch シグナルの活性化を反映する遺伝子プロファイルを持つ腫瘍の特徴について解析を行った。その一方、悪性リンパ腫における代表的な免疫逃避機構である CD58 発現低下に着目し、CD58 の遺伝子異常によらない発現低下の機序について解析を行い、その治療応用の可能性について検討を行った。

4. 研究成果

Notch1 の細胞内ドメイン(Notch-IC)を AICDA promoter 下に Cre リコンビナーゼで発現誘導し、胚中心 B 細胞以降で恒常的に Notch-IC を発現誘導できる遺伝子改変マウスを作出し解析を行った。Notch1 が活性化した B 細胞では明らかな分化異常や増殖能の変化を認めなかったが、IL33 が高発現することにより 2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) や制御性 T 細胞 (Treg) 優位の T 細胞反応を惹起し、抗腫瘍免疫の作用しにくい免疫微小環境を形成することが判明した。また、ヒトのびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) のデータベース解析において、Notch シグナルの活性化を反映する遺伝子プロファイルを持つ腫瘍は CD8 陽性 T 細胞/Treg 細胞比と逆相関することが示され、ヒトの DLBCL においても Notch シグナル活性化は免疫抑制性の腫瘍微小環境と関連が深いことが示唆された (Blood Advances 2018;2(18):2282-2295)。また遺伝子発現比較により、Notch1 が活性化した B 細胞では血管新生に関わる遺伝子の発現も特徴的に上昇することが判明した。Notch シグナルの活性化を生じる異常は DLBCL の約 2 割に認められるが、その脱制御の機序からは、Notch シグナルそのものを阻害する治療は難しいと考えた。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

以上より、B 細胞リンパ腫において他に治療標的となりうる免疫逃避機構について新たに検討を行った。悪性リンパ腫に発現する CD58 分子は T 細胞や NK 細胞に発現する CD2 と結合し、これらの免疫細胞がリンパ腫細胞を攻撃する際の足掛かりとなる蛋白であるが、免疫逃避機構としてしばしば発現が欠失することが知られる。CD58 の発現低下は遺伝子異常が存在する場合と存在しない場合とがあることが報告されており、遺伝子異常が存在しない場合は薬物的に発現回復できるのではないかと考えた。そこで、CD58 遺伝子は正常であるが CD58 の発現が低下している細胞株をピックアップし、80 種類のエピゲノム修飾薬のスクリーニングを行うことにより、2 種類の EZH2 阻害薬が CD58 蛋白の発現を特異的に回復させることを見出した。クロマチン沈降シーケンスにより、EZH2 阻害薬は CD58 プロモータにおける H3K27 トリメチル化を減少させることにより本遺伝子の発現を高めることが判明した。EZH2 阻害薬はリンパ腫細胞の CD58 発現を高めることにより、共培養した T 細胞や NK 細胞のリンパ腫細胞に対する IFN- γ 産生能を著明に上昇させることが示された。このことから、EZH2 阻害薬はエピゲノム修飾により CD58 が発現低下しているリンパ腫において、CD58 発現を回復させることにより、リンパ腫に対する抗腫瘍免疫を高める作用を持つことが示唆された (Mol Immunol 2020;119:35-45)。さらに網羅的遺伝子発現解析により、EZH2 阻害薬には他にも多くの免疫微小環境の改変作用があることが示唆され、現在引き続き詳細の解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Otsuka Yasuyuki, Nishikori Momoko, Arima Hiroshi, Izumi Kiyotaka, Kitawaki Toshio, Hishizawa Masakatsu, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 119
2. 論文標題 EZH2 inhibitors restore epigenetically silenced CD58 expression in B-cell lymphomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molimm.2020.01.006	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 Naoki Tamura, Hirona Maeda, Momoko Nishikori, Haruyuki Fujita, Masakatsu Hishizawa, Hironori Haga, Akifumi Takaori-Kondo	4. 巻 -
2. 論文標題 Histologic transformation of t(11;18)-positive MALT lymphoma presented with aberrant T-cell marker expression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal 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/s12185-019-02810-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 Arima Hiroshi, Nishikori Momoko, Otsuka Yasuyuki, Kishimoto Wataru, Izumi Kiyotaka, Yasuda Koubun, Yoshimoto Tomohiro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 2
2. 論文標題 B cells with aberrant activation of Notch1 signaling promote Treg and Th2 cell?dominant T-cell responses via IL-33	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Blood Advances	6. 最初と最後の頁 2282 ~ 2295
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/bloodadvances.2018019919	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 Moribe Fumiya, Nishikori Momoko, Takashima Tsuyoshi, Taniyama Daiki, Onishi Nobuyuki, Arima Hiroshi, Sasanuma Hiroyuki, Akagawa Remi, Elloumi Fathi, Takeda Shunichi, Pommier Yves, Morii Eiichi, Takaori-Kondo Akifumi, Murai Junko	4. 巻 16
2. 論文標題 Epigenetic suppression of SLFN11 in germinal center B-cells during B-cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 237554 ~ 237554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237554	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 該当する

1. 著者名 Otsuka Yasuyuki, Nishikori Momoko, Fujimoto Masakazu, Nakao Kensuke, Hishizawa Masakatsu, Haga Hironori, Takaori Kondo Akifumi	4. 巻 1
2. 論文標題 Relapse of follicular lymphoma arising from a non t(14;18) clone	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 323 ~ 327
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jha2.28	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 Wada Fumiya, Nishikori Momoko, Hishizawa Masakatsu, Watanabe Mitsumasa, Aiba Akiko, Kitano Toshiyuki, Shimazu Yayoi, Shindo Takero, Kondo Tadakazu, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 112
2. 論文標題 Secondary failure of platelet recovery in patients treated with high-dose thiotepa and busulfan followed by autologous stem cell transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 609 ~ 613
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03007-4	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 Izumi Kiyotaka, Nishikori Momoko, Yuan Hepei, Otsuka Yasuyuki, Nakao Kensuke, Takaori Kondo Akifumi	4. 巻 59
2. 論文標題 Establishment and characterization of a MALT lymphoma cell line carrying an API2 MALT1 translocation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes, Chromosomes and Cancer	6. 最初と最後の頁 517 ~ 524
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/gcc.22855	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 Jo Tomoyasu, Nishikori Momoko, Kogure Yasunori, Arima Hiroshi, Sasaki Katsuhiko, Sasaki Yoshiteru, Nakagawa Tomoko, Iwai Fumie, Momose Shuji, Shiraishi Aki, Kiyonari Hiroshi, Kagaya Noritaka, Onuki Tetsuo, Shin-ya Kazuo, Yoshida Minoru, Kataoka Keisuke, Ogawa Seishi, Iwai Kazuhiro, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 136
2. 論文標題 LUBAC accelerates B-cell lymphomagenesis by conferring resistance to genotoxic stress on B cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 684 ~ 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019002654	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10件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大塚泰幸、錦織桃子、有馬浩史、袁和培、高折晃史
2. 発表標題 EZH2 inhibitors restore epigenetically silenced CD58 expression of B-cell lymphomas
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 袁和培、錦織桃子、大塚泰幸、有馬浩史、北脇年雄、高折晃史
2. 発表標題 EZH2 inhibitor enhances T-cell migration to B-cell lymphoma by upregulating CCL17 expression .
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和泉清隆、大塚泰幸、藤田晴之、有馬浩史、錦織桃子、高折晃史
2. 発表標題 API2-MALT1融合遺伝子を有するMALTリンパ腫由来細胞株の樹立
3. 学会等名 第59回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 *有馬浩史、錦織桃子、大塚泰幸、和泉清隆、岸本渉、高折晃史 .
2. 発表標題 B Cells with Aberrant Activation of Notch1 Signaling Promote Treg and Th2 Cell-Dominant T Cell Responses via IL-33 .
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚泰幸、錦織桃子、高折晃史。
2. 発表標題 後天性血管性浮腫を合併した難治性脾辺縁帯リンパ腫に対しベンダムスチン・リツキシマブ(BR)療法が奏効した一例。
3. 学会等名 第58回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 錦織桃子、大塚泰幸、高折晃史。
2. 発表標題 免疫逃避機構を標的とした悪性リンパ腫治療の可能性。
3. 学会等名 第58回日本リンパ網内系学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有馬浩史、錦織桃子、大塚泰幸、和泉清隆、岸本渉、高折晃史。
2. 発表標題 Notch signaling activation parallels IL33 expression and Treg cell-rich signatures in DLBCL.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoyasu Jo, Momoko Nishikori, Yoshiteru Sasaki, Yasunori Kogure, Keisuke Kataoka, Seishi Ogawa, Kazuhiro Iwai, and Akifumi Takaori-Kondo.
2. 発表標題 Mechanisms underlying augmented lymphomagenesis by LUBAC; Possible accumulation of AID-mediated somatic mutations.
3. 学会等名 The 60th ASH Annual Meeting, (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大塚泰幸、錦織桃子、和泉清隆、有馬浩史、北脇年雄、高折晃史
2. 発表標題 EZH2 inhibitors can restore epigenetically silences CD58 expression of B-cell lymphomas.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 城友泰、錦織桃子、佐々木義輝、岩井一宏、高折晃史
2. 発表標題 Mechanisms underlying augmented lymphomagenesis by LUBAC: Possible accumulation of AID-mediated somatic mutations.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------