

令和 3 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04035

研究課題名(和文) CRISPRライブラリースクリーニングによるリンパ腫発症の遺伝子基盤の統合的理解

研究課題名(英文) Elucidation of the genetic basis underlying lymphomagenesis by CRISPR library screening

研究代表者

片岡 圭亮 (Kataoka, Keisuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90631383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：難治性リンパ腫における網羅的な遺伝子解析により多数の新規遺伝子異常が同定されてきたが、その多くで生物学的な役割は不明なままである。本研究では、CRISPRスクリーニングを用いて、難治性リンパ腫で認められる異常がリンパ腫発症に果たす役割を高効率に解明することを目指した。具体的には、難治性リンパ腫で機能喪失型異常が生じる遺伝子を標的とするsgRNAライブラリーを作成し、造血幹前駆細胞に導入・移植することによって、多くのマウスにおいて様々な造血器腫瘍を発症することを明らかにした。さらに、sgRNAシーケンスにより、これらの造血器腫瘍においてドライバーとして作用する複数の新規遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、成人T細胞白血病リンパ腫や節外性NK/T細胞リンパ腫などの難治性リンパ腫における遺伝子異常のリンパ腫発症における役割が解明された。その結果、これらの腫瘍における診断・治療戦略の改善や患者予後の向上に繋がることが期待される。さらに、本研究で用いられた生体内CRISPRスクリーニング手法による遺伝子異常の生物学的な意義の高効率な探索は、他の腫瘍や他の異常に対しても応用可能であり、更なる発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Although several integrated genetic studies have identified many recurrent alterations in lymphomas, their biological relevance in lymphomagenesis remains undetermined. Here, we have performed in vivo CRISPR screening to investigate the role of these genetic alterations in a high-throughput manner. Specifically, we created CRISPR libraries targeting genes with loss-of-function mutations in lymphomas, and introduced them into hematopoietic stem/progenitor cells. The transplanted mice developed a variety of hematologic malignancies. In addition, sgRNA sequencing identified several novel drivers involved in the development of these neoplasms.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：悪性リンパ腫 CRISPR

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンスやマイクロアレイ技術の発達により、数多くの悪性腫瘍において遺伝子異常の全体像が解明され、遺伝子変異・コピー数異常・融合遺伝子などの多数の新規異常が同定されてきた (*B Vogelstein, Science, 2013*)。しかし、このように同定された新規異常の生物学的な役割の検証は大変時間を要するものであり、未だに機能が不明な異常が多く残されている。

悪性リンパ腫は多様な病型からなる腫瘍であるが、activated B-cell (ABC) 型びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (ABC DLBCL) や成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL)、節外性 NK/T 細胞リンパ腫 (ENKTL)、中枢神経原発リンパ腫 (PCNSL) などの長期生存率が 10~30%程度にとどまる予後不良な疾患群 (= 難治性リンパ腫) が多く存在する。

近年、次世代シーケンスを用いた遺伝子解析で、これらの難治性リンパ腫でも *CD79B*、*CARD11* 変異 (ABC DLBCL) や *DDX3X* 変異 (ENKTL)、*PRKCB* 変異、*PD-L1* 構造異常 (ATL) など様々な遺伝子異常が同定されてきた (*K Kataoka, Nat Genet 2015; K Kataoka, Nature 2016*)。実際に、新 WHO 分類においても悪性リンパ腫で約 180 個の遺伝子異常が挙げられている。しかし、固形がんでは多くの遺伝子異常が共通しているため、その役割や機能が検証されやすいのに対して、悪性リンパ腫の遺伝子異常は疾患特有の異常がほとんどであるため、多くの遺伝子異常の生物学的な役割、特に *in vivo* においてリンパ腫発症に果たす役割は不明なままである。そのため、遺伝子異常を基盤とした分子病態の理解や、それに基づく創薬開発が妨げられており、難治性リンパ腫の治療戦略を改善させるための最大の障害となっている。

2. 研究の目的

本研究では、CRISPR-Cas9 sgRNA カスタムライブラリーを用いて、難治性リンパ腫で認められる機能喪失型の遺伝子異常が *in vivo* でリンパ腫発症に果たす役割をハイスループットに解明することを目指す。同時に、リンパ腫発症に寄与することが判明した遺伝子異常を個別に導入することで、様々な遺伝子異常を持つリンパ腫モデルを得ることができる。さらに、同モデルを用いて、遺伝子異常に応じた分子病態や薬剤感受性の違いを明らかにすることを試みる。これらを通して、難治性リンパ腫における遺伝子異常に基づく分子病態の理解、および、患者層別化のための遺伝子異常マーカーの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) CRISPR-Cas9 mutagenesis を用いた、リンパ腫発症に関与する機能喪失型の遺伝子異常の網羅的な探索

難治性リンパ腫で新規に同定された異常の中で、機能喪失を引き起こすと予想されるものを標的とする sgRNA を発現するカスタムライブラリーを Gibson Assembly 法を用いて構築した。標的とする遺伝子異常としては、遺伝子変異、コピー数異常、構造異常などのあらゆる遺伝子異常を対象とし、計 80 個の遺伝子を対象とした。

これらの sgRNA ライブラリーをレンチウイルスにより Cas9 発現マウス (Jackson laboratory から購入) から純化した造血幹前駆細胞分画 ($Lin^{-}Sca-1^{+}c-kit^{+}$) に導入し、同系マウスに静注により移植した。その後、1~2 年間経過観察を行い、造血器腫瘍が発症した場合には、表面マーカーや病理組織などを調べることにより表現型を明らかにした。同時に、腫瘍 DNA を用いて、sgRNA 毎に挿入されたバーコードのアンプリコンシーケンス、および、sgRNA ライブラリーの標的である遺伝子自体の標的シーケンスを実施して、発症したリンパ腫で濃縮されている sgRNA (移植時と比較) を同定した。この結果、*in vivo* においてリンパ腫発症に寄与する遺伝子異常が明らかとなる。

(2) リンパ腫関連遺伝子異常を持つマウスモデルを用いた、リンパ腫発症の促進に関与する機能喪失型の遺伝子異常の網羅的な探索

通常、リンパ腫は単独の遺伝子異常で起きるわけではないため、リンパ系において表現型を示す遺伝子改変マウスを用いて、腫瘍化を促進する遺伝子異常の同定も試みた。我々は、ATLおよびENKTLで高頻度に異常が認められる *PD-L1* 構造異常を再現するマウス (*Pd-L1* 3' -UTR 条件的ノックアウトマウス) を作成している。同マウスでは、リンパ系に表現型を示すことが確認されているため (未発表)、Cas9 発現マウスを掛け合わせて、同様の sgRNA ライブラリー導入実験を行った。

(3) 様々な遺伝子異常を持つリンパ腫モデルマウスを用いた、遺伝子異常に応じた遺伝子発現パターンの違いの解析

上記の実験により、リンパ腫の発症や促進に寄与する遺伝子異常が明らかになり、その異常を持つリンパ腫モデルが複数作成できたため、それらのマウスモデルを用いて、遺伝子異常に応じた分子病態の違いを検証した。具体的には、各々の遺伝子異常を持つリンパ腫モデルから腫瘍細胞を採取し、RNA シーケンスによる遺伝子発現解析を行い、各々の遺伝子異常が引き起こす遺伝子発現パターンの特徴について明らかにした。同時に、それらを相互に比較することで、それぞれの共通点や相違点を明らかにした。また、表面マーカー解析により、リンパ腫の起源となった正常細胞を同定し、遺伝子発現パターンを比較した。

4. 研究成果

(1) CRISPR-Cas9 mutagenesis を用いた、リンパ腫発症に関与する機能喪失型の遺伝子異常の網羅的な探索

難治性リンパ腫で機能喪失型異常が生じる遺伝子を標的とする sgRNA ライブラリーを複数種類作成し、Cas9 発現マウスの造血幹前駆細胞分画に導入し、同系マウス 200 匹以上に移植した。その結果、移植後約 50~300 日程度で 80%以上のマウスにおいて、B 細胞性・T 細胞性のリンパ系腫瘍、および、骨髄系腫瘍など様々な造血器腫瘍の発症を認めた。また、アンプリコンシーケンスにより、発症した腫瘍で濃縮されている sgRNA を検索した結果、骨髄系腫瘍では *Cebpa* などの遺伝子、T 細胞系腫瘍では *Trp53* などの遺伝子、B 細胞系腫瘍では *Kmt2d* などが多く認められ、腫瘍の病型により濃縮される標的遺伝子が異なることが示された。これら以外に、in vivo で造血器腫瘍の発症に関与することが新規に検証可能であった遺伝子が複数認められ、現在個別に検証中である。これらの結果は、本 in vivo スクリーニング法により、リンパ腫発症に関与する遺伝子が同定可能であることを示している。

(2) リンパ腫関連遺伝子異常を持つマウスモデルを用いた、リンパ腫発症の促進に関与する機能喪失型の遺伝子異常の網羅的な探索

Pd-L1 3' -UTR 条件的ノックアウトマウスを用いた場合に、腫瘍化が促進されるだけでなく、B 細胞性腫瘍が増えることが明らかとなった。しかし、アンプリコンシーケンスにより、発症した腫瘍で濃縮されている sgRNA を検索した結果、同系統の腫瘍においては、*Pd-L1* 3' -UTR 条件的欠失の有無により、濃縮される sgRNA に違いを認めなかった。この結果は、*Pd-L1* 遺伝子異常による腫瘍化能を示すだけでなく、協調分子が明らかでない場合でも、生体内における腫瘍化能の評価が可能であることを示している。

(3) 様々な遺伝子異常を持つリンパ腫モデルマウスを用いた、遺伝子異常に応じた遺伝子発現パターンの違いの解析

上記の実験により、発症したマウス造血器腫瘍検体を用いて RNA シーケンスによる遺伝子発現パターンの解析を行い、細胞起源の同定を試みた。その結果、表面マーカーや病理解析のみでは腫瘍の表現型を十分に解明できなかった個体においても、腫瘍起源を同定することが可能であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	白石 友一 (Shiraishi Yuichi) (70516880)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長 (82606)	

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