

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03518

研究課題名(和文) MYD88とCD79B変異によるB細胞リンパ腫発生機序の解明

研究課題名(英文) Investigating the mechanisms of B cell lymphomagenesis driven by MYD88 and CD79B mutations

研究代表者

堀川 啓介 (Horikawa, Keisuke)

熊本大学・国際先端医学研究機構・客員准教授

研究者番号：60313095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：様々なタイプのリンパ腫で、MYD88とCD79BというB細胞のシグナル伝達分子の変異を発見されている。これら2つの変異は、発症例が多く中高悪性度のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫で多く見つかかり、多くの症例で両者の変異が同時に認められる。本研究では、これらMYD88とCD79B変異がB細胞にどのような機能異常を引き起こしB細胞を悪性化させるのか、その機序をCD79B変異マウス由来の細胞を用いて解析した。シグナル伝達や遺伝子発現の解析により、MYD88変異がNFκB経路を、CD79B変異がPI3K経路を活性化し、これら両経路の異常な活性化がリンパ腫の発生・維持に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンパ腫を含むがんのゲノム解析により、多くの遺伝子変異が同定されてきている。その一方、個々の遺伝子変異の機能解析、また複数の遺伝子変異の相互作用の研究はあまり行われていない。本研究で、様々なタイプのリンパ腫で同定され、多くの症例で同時に認められるMYD88とCD79B変異の機能解析を行った。これら2つの変異は、発症例が多く中高悪性度のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫で多く見つかかり、多くの症例で両者の変異が同時に認められる。本研究で得られた知見は、これらの変異をもつリンパ腫の発生・維持のメカニズム、さらに新規治療法の発見に有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：MYD88 and CD79B play critical roles in normal B cell signalling. Mutations in these genes have been found in various types of lymphomas, particularly in high-incidence, intermediate- to high-grade diffuse large B-cell lymphoma. Interestingly, many cases show both mutations simultaneously. In this study, we investigated how these MYD88 and CD79B mutations cooperatively induce B cell dysfunction and B cell malignancy using CD79B mutant mice. CD79B mutants showed higher surface IgM and CD44 in B cells, and biochemical analyses found exaggerated and sustained PI3K activation after B cell antigen receptor stimulation. Gene expression analysis from B cells expressing MYD88 and CD79B mutations upon antigen stimulation identified genes uniquely regulated by these mutations and antigen stimulation. The findings obtained in this study may help discover the mechanisms of lymphoma development and maintenance, as well as novel therapeutic strategies.

研究分野：免疫学、血液学、分子生物学

キーワード：悪性リンパ腫 遺伝子変異 B細胞 シグナル伝達

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は年間約3万7000人の患者が新規発生しており近年増加傾向にある。悪性リンパ腫は、本来は外来物の認識・排除を司るリンパ球が無制限に増殖することによって生じる。特にびまん性大細胞型B細胞リンパ腫は遺伝学的に非常に不均一（同じタイプのリンパ腫の中でも個々の症例で変異遺伝子の種類と組み合わせが異なる）である。現在リンパ腫のゲノム解析が精力的に行われているが、個々の遺伝子変異の機能解析、特に複数の遺伝子変異の相互作用の研究はあまり行われていない。また、リンパ腫の発生・維持には自己反応性の抗原受容体が関与していると考えられているが、ヒト細胞株を用いた実験では抗原を同定することが難しい。申請者のグループは、確立された抗原特異的な免疫グロブリントランスジェニックマウスモデルを使用してリンパ腫の発生・維持のメカニズムを解明しようとしており、また現在までに報告した研究で世界をリードしている。B細胞の自然免疫と獲得免疫に必須のシグナル伝達分子であるMYD88とCD79Bのアミノ酸置換変異は、様々なリンパ腫で認められ、特にリンパ節外リンパ腫（そのほとんどは、病理学的にはびまん性大細胞型B細胞リンパ腫）に高頻度で共存する。本研究では申請者のこれまでの研究成果を推し進め、新規作製したCD79B変異マウスを利用して、MYD88L265P変異とCD79BY196H変異がどのように協調的に作用し、B細胞を癌化させるようなシグナルを伝達するのかを解明する。

2. 研究の目的

我々は、レトロウイルスを用いた遺伝子導入によってリンパ腫由来のMYD88^{L265P}変異とCD79B^{Y196H}変異を同時に発現させると、通常排除される自己反応性B細胞が増殖すること、また抗体産生細胞に分化することを報告した(Wang, Horikawa et al., J Exp Med 2017)。しかし上記の実験系では、MYD88^{L265P}変異と野生型CD79Bの共発現においてもB細胞の過剰反応が観察され、レトロウイルスによるCD79Bの過剰発現による影響であると考えられた。さらに、レトロウイルスを用いた遺伝子導入では、遺伝子変異が定常状態のB細胞にどのような影響を与えるかを調べることができない。以上のことから、ヒトリンパ腫で最も頻回に起こるアミノ酸置換をもつ新規CD79B遺伝子改変マウスを作製することを考え、CRISPR法によって樹立を試みた。本研究では、リンパ腫由来のCD79B変異をもつ新規遺伝子改変マウスを利用し、その変異がB細胞の機能にどのような影響を与えるか、またMYD88変異と協調してどのようにリンパ腫を発生させるのかを細胞・分子レベルで解明し、新規あるいは既存の分子・経路特異的な阻害剤によるリンパ腫の新規治療法を探索することである。

3. 研究の方法

野生型とCD79BY196H変異マウスにおけるB細胞の発達・分化を、フローサイトメトリーを用いた表面抗原染色で解析した。また増殖・活性化への影響を調べるために、抗IgM抗体やTLR9リガンド存在下で培養後、細胞分裂を測定する試薬や表面抗原染色を用いて解析した。B細胞抗原受容体刺激後の細胞を固定し、細胞内・表面染色後のフローサイトメトリー解析により単細胞レベルでの細胞内シグナル伝達解析を行った。また、B細胞を脾臓細胞より精製し、抗原受容体刺激後のタンパク質サンプルを調整し、ウェスタンブロットによりシグナル伝達経路の解析を行った。

CD79B-Y196H変異の自己反応性B細胞への影響を調べるために、トリ卵白リゾチーム(hen egg lysozyme, HEL)を特異的に認識する免疫グロブリントランスジェニックマウスと可溶性HELトランスジェニックマウスの実験系を使用する。HEL免疫グロブリンおよび可溶性HELを発現するマウス個体内では、全てのB細胞が恒常的に抗原で刺激され、アナジーと呼ばれる不応答状態になる。このトランスジェニックマウスの実験系をモデルとして用いた。

CD79BY196H変異によってMYD88L265P変異による遺伝子誘導がどのように変化するかを調べるために網羅的な遺伝子解析を行った。野生型およびCD79B変異をもつマウス活性化B細胞に、レトロウイルスを用い野生型MYD88、MYD88-L265P変異を発現させ、抗原刺激ありなしの条件の下でGFP陽性細胞からRNAを単離した。独立した2回の実験からサンプルを作製し、RNAシーケンシングによる遺伝子発現解析を行った。

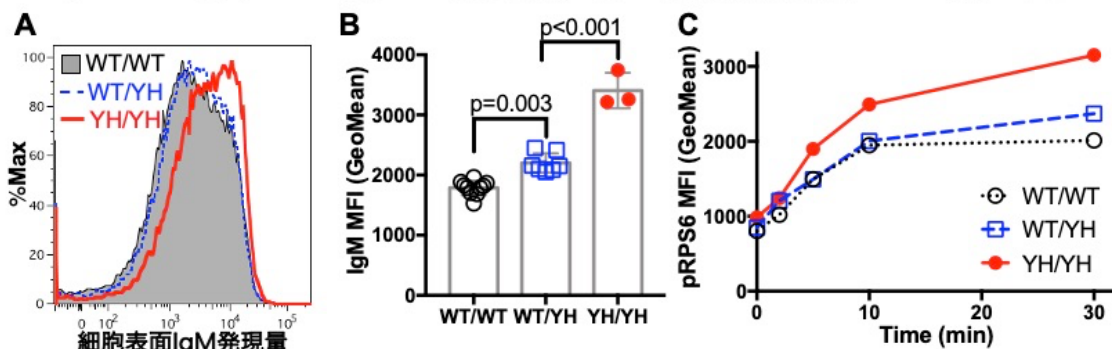
4. 研究成果

1. CD79B^{Y196H}変異のB細胞の機能に与える影響

フローサイトメトリー解析による脾臓や骨髄細胞の解析の結果、リンパ腫由来のCD79B-Y196H変異によってB細胞の数が増加する、あるいは異常な細胞集団が現れるようなことはなく、マウスの免疫系細胞の分化はほぼ影響を受けなかった。しかし、CD79B-Y196H変異マウスのB細胞では野生型マウスと比べて細胞表面に発現するIgM型抗原受容体(図1A)やCD44が増加していた。

また、細胞内染色をしたフローサイトメトリー解析で、抗原受容体刺激後の B 細胞内のリボソームタンパク質 S6 のリン酸化が増加・遷延していることが分かった (図 3C)。CD44 は PI3K-ATK 経路の活性化で上昇することがあり、S6 のリン酸化と併せて CD79B^{Y196H} 変異により PI3K-ATK-mTOR 経路の活性化が起こることが示唆された。ウェスタンブロット法により、ERK、NfκB、AKT など主要なシグナル経路の変化を解析した。野生型 B 細胞に比し、CD79B 変異 B 細胞では抗原受容体刺激後のリボソームタンパク S6 や AKT のリン酸化が亢進していたが、ERK、NfκB 経路への影響はほとんど認められなかった。したがって、CD79BY-196H 変異は主に PI3K-AKT 経路の異常を引き起こすと考えられた。

図1 CD79B変異マウスに観察された細胞表面IgM増加と抗原受容体刺激後のS6リン酸化の亢進



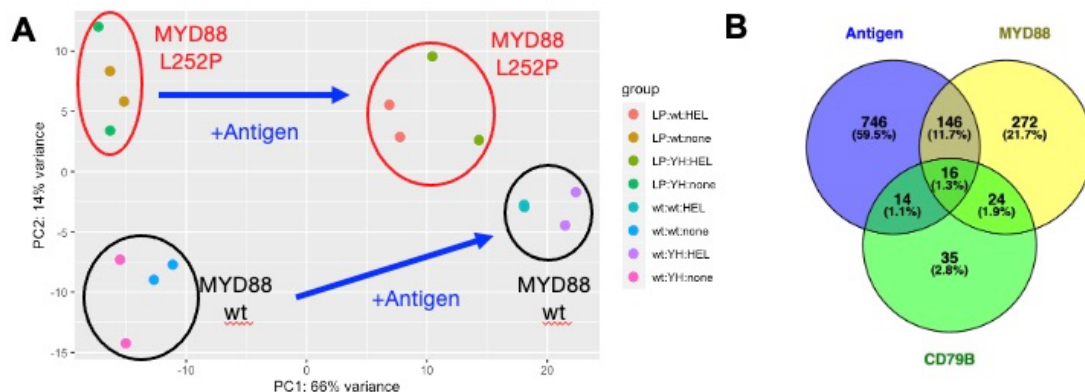
2. CD79B^{Y196H} 変異の自己反応性 B 細胞に与える影響

CD79B-Y196H 変異マウスを免疫グロブリントランスジェニックマウスと可溶性 HEL トランスジェニックマウスと交配し、ダブルトランスジェニックマウスのアナジー B 細胞を解析した。CD79B-Y196H 変異 B 細胞では抗原受容体刺激後に PI3K 経路がより活性化されることから、アナジー B 細胞の不応答状態を回復のではないかと考えられた。予想とは違い、CD79B-Y196H 変異マウスには、野生型マウスと同程度のアナジー B 細胞が存在し、野生型と同様の細胞表面 IgM の発現低下が認められた。したがって、CD79B-Y196H 変異によっても B 細胞のアナジーのメカニズムは保たれていることがわかった。

3. MYD88L265P と CD79BY196H 変異を標的とする候補遺伝子の絞り込みと検証

MYD88-L265P と CD79B-Y196H 変異による遺伝子発現変化を調べるために、両変異を発現する活性化 B 細胞を抗原刺激し RNA シークエンスによる遺伝子発現解析を行った。主成分分析により、遺伝子発現の変化は、抗原受容体刺激と MYD88-L265P 変異の発現により大きく変化し、CD79B-Y196H 変異による遺伝子発現の変化は少なかった (図 2A)。この結果と一致して、抗原受容体刺激、MYD88 変異、CD79B 変異によって制御される遺伝子として、各々 922、458、89 個の遺伝子群を同定した (図 2B、調整済み p 値 < 0.1 で、遺伝子発現が 2 倍あるいは半分に变化した遺伝子群)。この遺伝子群の中から、がん細胞が依存する遺伝子データベース (DepMap) や B 細胞リンパ腫細胞株特異的な依存遺伝子の公開データ (Reddy et al., Cell 2017; Phelan et al., Nature 2018) を利用し、リンパ腫の増殖・生存に重要だと想定される候補遺伝子の絞り込みを行った。これらの遺伝子の機能解析を行うための遺伝子発現ベクター、および CRISPR-CAS9 によるゲノム編集ベクターを作製し、細胞株をもちいて候補遺伝子の強制発現と機能欠損による影響を調べるための条件検討を行った。

図2 MYD88変異、CD79B変異、抗原刺激によって発現が制御される遺伝子群



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masle-Farquhar Etienne, Jeelall Yogesh, White Jacqueline, Bier Julia, Deenick Elissa K., Brink Robert, Horikawa Keisuke, Goodnow Christopher Carl	4. 巻 14
2. 論文標題 CARD11 gain-of-function mutation drives cell-autonomous accumulation of PD-1+ ICOShigh activated T cells, T-follicular, T-regulatory and T-follicular regulatory cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2023.1095257	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 Coombes Caitlin, Horikawa Keisuke, Jain Sanjiv, Jiang Simon, Lim Jun Hee, Saxena Kartik, Shadbolt Bruce, Smyth Lillian, Tobin Joshua, Talaulikar Dipti	4. 巻 55
2. 論文標題 Diffuse large B-cell lymphoma and red cell autoimmunity: clinical role and pathogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology	6. 最初と最後の頁 104~112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pathol.2022.07.017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔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	滝澤 仁 (Takizawa Hitoshi) (10630866)	熊本大学・国際先端医学研究機構・特別招聘教授 (17401)	

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	Garvan Institute	Australian National University		
---------	------------------	--------------------------------	--	--