

令和 6 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02775

研究課題名（和文）T細胞性腫瘍におけるIRF4転写因子発現の統合的解析とCAR-T細胞療法への応用

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanisms for constitutive IRF4 expression in T-cell malignancies

研究代表者

中川 雅夫（Nakagawa, Masao）

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：80435859

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：化合物ライブラリースクリーニングから成人T細胞性白血病リンパ腫細胞株を含む複数のT細胞性リンパ腫細胞株でIRF4タンパク発現を減少させることが可能な化合物を見出した。IRF4恒常的発現のメカニズム解析としてATACseq解析を行ったが、複数症例間で共通するIRF4遺伝子座周囲のopen chromatin領域は見出されなかった。T細胞性腫瘍の組織マイクロアレイを作成しIRF4およびBATF3の病型別発現頻度を明らかにした。PD-L1高発現T細胞性リンパ腫細胞に対して優れた細胞障害作用を発揮できるPD-L1-CAR-T細胞を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

成人T細胞性白血病リンパ腫を含む一部のT細胞性リンパ腫細胞に必須の遺伝子であるIRF4の発現制御のメカニズムの一端および発現頻度を明らかにしたことで、今後の治療法開発へ基盤的知見となる。抗PD-1抗体で病勢増悪の可能性のある成人T細胞性白血病リンパ腫に対して、PD-L1-CAR-T開発への可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Compound library screening revealed a compound, which can reduce IRF4 protein expression in multiple T-cell lymphoma cell lines, including adult T-cell leukemia lymphoma cell lines. ATACseq analysis was performed to analyze the mechanism of constitutive IRF4 expression, but no common open chromatin region around the IRF4 locus was found among multiple cases. Tissue microarray analysis of T-cell lymphomas revealed the expression frequency of IRF4 and BATF3 by disease type. PD-L1-CAR-T generated in this project exhibited superior cytotoxic activity against PD-L1 high expressing T-cell lymphoma cells.

研究分野：悪性リンパ腫

キーワード：成人T細胞性白血病リンパ腫 T細胞性リンパ腫 IRF4 PD-L1 CAR-T

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞性白血病リンパ腫は HTLV-I retrovirus キャリアの約 5% に発症する T 細胞性腫瘍であり、5 年生存率は 20% を下回り予後不良である。成人 T 細胞性白血病リンパ腫の 30% に PD-L1 遺伝子座の 3' UTR 領域の構造異常が起こっており、PD-L1 が高発現することで腫瘍形成に重要な役割を担っていることが分かっている。このため抗 PD-1 抗体ニボルマブの治験が米国で行われたが、エントリーした 3 症例全てで投与直後より病勢増悪を認め試験中止になった (Ratner et al. N Engl J Med. 2018;378:1947-1948)。進行期胃がんの約 10% にも抗 PD-1 抗体治療直後に病勢が増悪し、腫瘍内制御性 T 細胞 (Treg) の T 細胞レセプターシグナル活性化が原因である可能性が報告されている (Kamada et al. PNAS. 2019;116:9999-10008.)。重要なことに成人 T 細胞性白血病リンパ腫は Treg 様の分子発現を持つ T 細胞腫瘍であることから、PD-1 抗体による腫瘍細胞の活性化が増悪要因であった可能性がある。申請者らは 2017 年に CCR4 を標的とするキメラ抗原受容体 T 細胞 (CCR4-CAR-T) を発表、2018 年に shRNA/CRI SPR ノックアウトによる細胞増殖生存責任遺伝子スクリーニングやトランスクリプトーム解析、ゲノムワイド転写因子結合および epigenome 解析を含めた包括的解析から、IRF4/BATF3 転写因子複合体が成人 T 細胞性白血病リンパ腫の細胞増殖・生存に必須の分子であることを世界に先駆けて明らかにした (Nakagawa et al. Cancer Cell, 2018;34:286-297.)。BATF3 の恒常的高発現の分子機序についても解析を行い、BATF3 遺伝子座のスーパーエンハンサー形成と成人 T 細胞性白血病リンパ腫の原因ウイルス HTLV-I にコードされる HBZ の関与を明らかにした。IRF4 は正常 T 細胞においては T 細胞レセプターシグナル活性化で発現誘導されるが、成人 T 細胞性白血病リンパ腫細胞においてどのような分子メカニズムで IRF4 の恒常的高発現が維持されているのかは未だ未解決である。近年 IRF4 の発現維持の臨床的重要性がキメラ抗原受容体 T 細胞 (CAR-T) にも及ぶことがわかってきた。GD2 に対する CAR-T などでは細胞内シグナルが強度に入りすぎることによって IRF4/BATF3 発現が誘導される。その結果、IRF4/BATF3 は細胞疲弊 (exhaustion) 関連遺伝子の発現を誘導し、CAR-T の抗腫瘍活性を弱める (Lynn et al. Nature. 2019;576:293-300.)。

2. 研究の目的

(1) 成人 T 細胞性白血病リンパ腫における IRF4 の恒常的高発現が維持される分子メカニズムの解明とその制御方法について検討する。IRF4 発現と T 細胞レセプターシグナルとの関連性から抗 PD-1 抗体の反応性を考察できるか検討する。

(2) T 細胞性腫瘍全体における IRF4 恒常的発現異常の分布と頻度を明らかにする。

(3) IRF4 発現制御に関わる知見を元に、新規 CAR-T 細胞の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1)

化合物ライブラリーによる IRF4 蛋白発現スクリーニング: IRF4 発現変化の検出系として、フローサイトメーターを用いた High throughput screening (HTS) の系を確立する。北大化合物ライブラリー (約 3000 個の既存薬を搭載) を用いて、成人 T 細胞性白血病リンパ腫患者由来細胞株の IRF4 発現低下をもたらす候補化合物をスクリーニングする。

機能的エンハンサー解析: 成人 T 細胞性白血病リンパ腫細胞株と臨床検体の ATACseq データを解析する。

(2) T 細胞性腫瘍全体における IRF4 恒常的発現異常の分布と頻度

組織マイクロアレイを作成し、IRF4 および、その関連遺伝子である BATF3 の免疫組織染色を行

い、T細胞性腫瘍全体における IRF4 恒常的発現異常の分布と頻度を明らかにする。

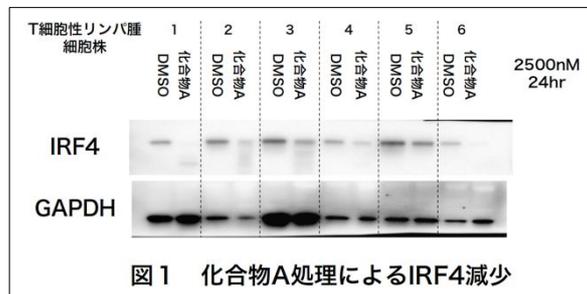
(3) IRF4 発現制御の疲弊 CAR-T 細胞への応用

IRF4 発現を低下させる化合物処理下で CCR4-CAR-T 細胞を標的細胞と in vitro 培養する。細胞疲弊を抑制し抗腫瘍活性を増強できるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) IRF4 発現変化の検出系として、フローサイトメーターを用いた High throughput screening (HTS)の系を確立した。成人T細胞性白血病リンパ腫細胞株2種類に対して北大化合物ライブラリー(約3000個の既存薬を搭載)を用いてHTSを行ったところ、最初のスクリーニングで159化合物のヒットが得られ、2ndスクリーニングおよびウェスタンブロット法などの追加検証を行った結果、最終的に候補化合物Aを抽出できた(図1)。本解析からはT細胞レセプターシグナルと関連性を有する化合物は得られなかった。成人T細胞性白血病リンパ腫細胞株においてはIRF4発現にT細胞レセプターシグナルが関与する可能性は低く、IRF4発現と抗PD-1抗体の反応性の関連性を示唆する所見は得られなかった。機能的エンハンサーを解析する

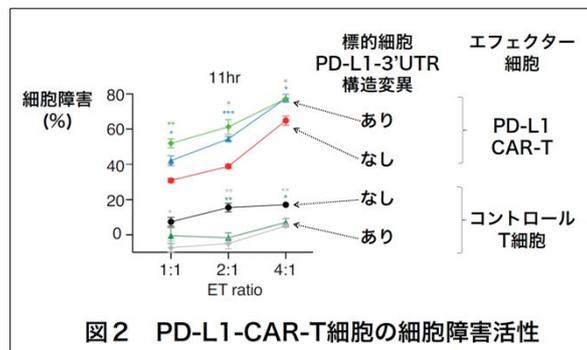
目的で、成人T細胞性白血病リンパ腫細胞株と臨床検体のATACseqデータを解析した。IRF4遺伝子座周囲のopen chromatin領域を解析したところ、症例間に共通する領域は見出されなかった。特定の機能的エンハンサー領域は存在せず、IRF4恒常的発現のメカニズムは症例間でheterogeneityが存在することを明らかにした。



(2) 北日本血液研究会(<http://www.njhsg.com>)と連携し、T細胞性腫瘍の組織マイクロアレイを作成した。IRF4および、その関連遺伝子であるBATF3の免疫組織染色を行ったところ、成人T細胞性白血病リンパ腫およびALK陽性未分化大細胞リンパ腫において他のT細胞性腫瘍病型と比較して陽性頻度が高いことを見出すことができた。

(3) IRF4 発現制御の疲弊 CAR-T 細胞への応用

化合物ライブラリーによるIRF4蛋白発現スクリーニングから見出した化合物Aは細胞障害性が強く、CAR-T細胞の細胞疲弊を抑制するには適さないと判断した。このため、IRF4とBATF3の結合を阻害できる変異導入分子をCARと同時にT細胞に導入した。このようなCAR-T細胞は疲弊を阻害する以前に、増殖が極めて悪くなることが明らかになった。当初予期していない結果であったが、これを踏まえてPD-L1分子を直接ターゲットにできるPD-L1-CAR-T細胞を作成する方針とした。DurvalumabをベースとしたscFVに41BBとCD3の細胞内シグナルドメインを組み合わせたPD-L1-CARを作成しT細胞に導入すると、PD-L1遺伝子座の3'構造異常によりPD-L1が高発現するATLL細胞に対して、同構造異常を有しない細胞と比較して、有意に細胞障害作用を発揮できることを確認した(図2)。この成果をBLOOD誌に論文発表した(Chiba et al. Blood. 2024;143:1379-1390.)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Chiba Masahiro, Shimono Joji, Suto Keito, Ishio Takashi, Endo Tomoyuki, Goto Hideki, Hasegawa Hiroo, Maeda Michiyuki, Teshima Takanori, Yang Yibin, Nakagawa Masao	4. 巻 143
2. 論文標題 Whole-genome CRISPR screening identifies molecular mechanisms of PD-L1 expression in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1379 ~ 1390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2023021423	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 Song Zhihui, Wu Wenjun, Wei Wei, Xiao Wenming, Lei Michelle, Cai Kathy Q., Huang Da Wei, Jeong Subin, Zhang Jing-Ping, Wang Hongbo, Kadin Marshall E., Waldmann Thomas A., Staudt Louis M., Nakagawa Masao, Yang Yibin	4. 巻 142
2. 論文標題 Analysis and therapeutic targeting of the IL-1R pathway in anaplastic large cell lymphoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1297 ~ 1311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022019166	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 Wei Wei, Song Zhihui, Chiba Masahiro, Wu Wenjun, Jeong Subin, Zhang Jing-Ping, Kadin Marshall E., Nakagawa Masao, Yang Yibin	4. 巻 37
2. 論文標題 Analysis and therapeutic targeting of the EP300 and CREBBP acetyltransferases in anaplastic large cell lymphoma and Hodgkin lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 396 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-022-01774-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 該当する
1. 著者名 Chiba Masahiro, Shimono Joji, Ishio Takashi, Takei Norio, Kasahara Kohei, Ogasawara Reiki, Ara Takahide, Goto Hideki, Izumiyama Koh, Otsuguro Satoko, Perera Liyanage P., Hasegawa Hiroo, Maeda Michiyuki, Hashino Satoshi, Maenaka Katsumi, Teshima Takanori, Waldmann Thomas A., Yang Yibin, Nakagawa Masao	4. 巻 140
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screens identify CD48 defining susceptibility to NK cytotoxicity in peripheral T-cell lymphomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1951 ~ 1963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022015646	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 Zhang Zixuan, Hasegawa Yuta, Hashimoto Daigo, Senjo Hajime, Kikuchi Ryo, Chen Xuanzhong, Yoneda Kazuki, Sekiguchi Tomoko, Kawase Tatsuya, Tsuzuki Hirofumi, Ishio Takashi, Ara Takahide, Ohigashi Hiroyuki, Nakagawa Masao, Teshima Takanori	4. 巻 57
2. 論文標題 Gilteritinib enhances graft-versus-leukemia effects against FLT3-ITD mutant leukemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bone Marrow Transplantation	6. 最初と最後の頁 775 ~ 780
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41409-022-01619-4	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 -

1. 著者名 Ishio T, Kumar S, Shimono J, Daenthanasanmak A, Dubois S, Lin Y, Bryant B, Petrus MN, Bachy E, Huang DW, Yang Y, Green PL, Hasegawa H, Maeda M, Goto H, Endo T, Yokota T, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsuno Y, Yang Y, Hashino S, Teshima T, Waldmann TA, Staudt LM, Nakagawa M.	4. 巻 139
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screen identifies CDK6 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1541 ~ 1556
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021012734	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

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Keito Suto, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Michiyuki Maeda, Takanori Teshima, Masao Nakagawa
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR Screen Identifies MAD2L1BP, ANAPC15 and SLC39A7 as Intrinsic Regulators for Brentuximab Vedotin Sensitivity in Peripheral T-cell Lymphoma Cells
3. 学会等名 The 65th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keito Suto, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Michiyuki Maeda, Takanori Teshima, Masao Nakagawa
2. 発表標題 Genome-wide CRISPR Screen Identifies ZNF451 Regulating Sensitivity to Topoisomerase 2 Inhibitors in Peripheral T-cell Lymphoma Cells
3. 学会等名 The 65th American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keito Suto, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Takanori Teshima, Masao Nakagawa
2. 発表標題 CRISPR screen identifies APC/C and SLC39A7 as intrinsic regulators for BV sensitivity in PTCL cells
3. 学会等名 第85回日本血液学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keito Suto, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Takanori Teshima, Masao Nakagawa
2. 発表標題 CRISPR screen identifies ZNF451 regulating sensitivity to topoisomerase 2 inhibitors in PTCL
3. 学会等名 第85回日本血液学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Chiba, Joji Shimono, Takashi Ishio, Norio Takei, Kohei Kasahara, Reiki Ogasawara, Takahide Ara, Hideki Goto, Koh Izumiyama, Satoko Otsuguro, Liyanage P. Perera, Hiroo Hasegawa, Michiyuki Maeda, Satoshi Hashino, Katsumi Maenaka, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Yibin Yang and Masao Nakagawa
2. 発表標題 CRISPR Screen Identifies CD48 As A Key Molecule For NK Cell Immunity In Peripheral T-cell Lymphomas
3. 学会等名 The 13th JSH International Symposium 2023 in Tsukuba (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Chiba, Joji Shimono, Takashi Ishio, Hideki Goto, Satoshi Hashino, Takanori Teshima, Masao Nakagawa
2. 発表標題 Whole-genome CRISPR library screens identify CD48 as an essential molecule in adult T-cell leukemia/lymphoma for defining susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity
3. 学会等名 The European Hematology Association (EHA) 2021 Virtual Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 千葉雅尋, 下埜城嗣, 石尾 崇, 須藤啓斗, 後藤秀樹, 橋野 聡, 豊嶋崇徳, 中川雅夫
2. 発表標題 CRISPR screen identifies CD48 as a key molecule for evasion from NK cell surveillance in PTCL
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 千葉 雅尋、中川 雅夫	4. 発行年 2023年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 血液内科 第87巻第3号 ATLLおよびPTCLsにおけるCD48発現低下とNK細胞の攻撃回避	

1. 著者名 石尾崇、中川雅夫	4. 発行年 2022年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 5
3. 書名 月刊血液内科 (Hematology)	

1. 著者名 中川 雅夫	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 6
3. 書名 血液内科 第84巻第3号 未分化大細胞リンパ腫の病態と治療の考え方	

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院 血液内科学教室 リンパ系腫瘍グループ
<https://www.hokudai-hematology.jp/research/basic/03/1>

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		
米国	National Cancer Institute, NIH	Fox Chase Cancer Center	