

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05051
研究課題名：悪性リンパ腫における遺伝子異常を基盤とした発症機構・分子病態の統合的解明
研究代表者氏名（ローマ字）：片岡 圭亮（KATAOKA Keisuke）
所属研究機関・部局・職：慶應義塾大学・医学部（信濃町）・教授
研究者番号：90631383

研究の概要：

これまでに代表者は難治性リンパ腫を中心に網羅的遺伝子解析を行い、多数の遺伝子異常を同定してきたが、その多くは詳細な分子機構・生体内における役割について未解明のままである。本研究では、CRISPRスクリーニングや単一細胞マルチオミクス解析技術等を応用することで、リンパ腫で認められる遺伝子異常の詳細な分子機構・生体内における役割・微小環境に与える変化を解明することを目指す。

研究分野：血液内科学、腫瘍生物学

キーワード：悪性リンパ腫、CRISPRスクリーニング、シングルセル解析

1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（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）などを含む不均一な疾患である。近年、リンパ腫においても遺伝子異常の全体像が解明され、様々な新規異常が同定されてきた。代表者らも、本邦に多いHTLV-1感染を原因とするT細胞性腫瘍であるATLの網羅的遺伝子解析を行い、PD-L1 3'-非翻訳領域（UTR）切断等の数十個を超える異常を同定してきた。また、最近、この延長として150ペアのATL検体を用いた高深度の全ゲノム解析を実施し、これまでの解析とは大きく異なる遺伝子異常の全体像が得られることを明らかにし、CICやRELなどの新規異常を同定している。しかし、多くの異常の生物学的意義、特に、その分子機構や生体内でリンパ腫発症に果たす役割、微小環境に与える変化は不明のままである。

2. 研究の目的

代表者が同定した異常を中心に、リンパ腫で認められる遺伝子異常の詳細な分子機構・生体内における役割・微小環境に与える変化を解明するために、A. 代表者の遺伝子解析研究で同定された異常の分子機能の解明・疾患動物モデルの解析、B. 生体内CRISPRスクリーニングによるリンパ腫発症に寄与する遺伝子異常の高効率な検証、C. CRISPR制御部位スクリーニングによるB細胞リンパ腫特異的PD-L2発現制御機構の解明、D. 単一細胞マルチオミクス解析のマウスリンパ腫モデルへの応用とリンパ腫微小環境の解明、E. ヒト検体由来の網羅的遺伝子解析データを用いた臨床応用の可能性の探索、を実施する。

3. 研究の方法

- 代表者の遺伝子解析研究で同定された異常の分子機能の解明・疾患動物モデルの解析：PD-L1 3'-UTR欠失やATLでアイソフォーム特異的に変異が認められるCICの動物モデルの構築・解析等を実施する。
- 生体内CRISPRスクリーニングによるリンパ腫発症に寄与する遺伝子異常の高効率な検証：これまでにATLやENKTLで同定された機能喪失型異常を示す遺伝子を標的とするsgRNAカスタムライブラリーを用いて、悪性リンパ腫が発症することを確認している。本研究では、ATLやENKTLにおける研究を拡大するだけでなく、DLBCL等の他のリンパ腫で認められる異常も対象として同様の生体内CRISPRスクリーニングを行う。腫瘍を発症した場合、表面マーカーや病理組織等の解析により表現型を明らかにし、バーコードシーケンスにより腫瘍で濃縮されるsgRNAを同定する。
- CRISPR制御部位スクリーニングによるB細胞リンパ腫特異的PD-L2発現制御機構の解明：PD-L2のB細胞リンパ腫に特異的な発現制御機構を解明するために、網羅的CRISPR制御部位スクリーニングによる解析、および、PD-L2発現制御に関わる転写因子をCRISPRスクリーニングにより探索する。
- 単一細胞マルチオミクス解析のマウスリンパ腫モデルへの応用とリンパ腫微小環境の解明：多数の表面マーカー解析とトランスクリプトーム解析・TCR/BCRレパトア解析を同一の単一細胞レベルで実現できる技術（単一細胞マルチオミクス解析）のマウスモデルへの応用を図る。
- ヒト検体由来の網羅的遺伝子解析データを用いた臨床応用の可能性の探索：項目BやCに関連して新規に見出された異常について、実際にヒト検体由来データを用いて検証する。

4. これまでの成果

A：ATL検体を用いた高深度の全ゲノム解析により見出された、CICの特定のアイソフォーム（long型）に集中する機能喪失型異常を再現するマウスを作成・解析し、同異常によりATLの起源細胞と考えられるCD4+CD25+Foxp3+制御性T細胞（Treg）の増加を認めることを明らかにした。また、RELのC末端切断型構造異常の機能解析により、野生型RELと比較して、この切断型RELは単独ではNF- κ B経路にドミナント・

ネガティブに作用するが、同じく NF- κ B 経路に属する RELA (p65) と共発現させると、NF- κ B 経路を活性化させることを明らかにした。これらの結果は、これまでの遺伝子解析研究で同定された異常が実際にリンパ腫発症に寄与することを示している (Y Kogure, Blood 2022)。

B: DLBCL において機能喪失型異常が高頻度に起こる 86 遺伝子を対象として、生体内 CRISPR スクリーニングを実施した。その結果、199 匹のレシピエントマウスの中で、180 匹が様々な造血器腫瘍の発症のために死亡した。132 匹において血液学的・病理学的解析を行った結果、B/T 細胞性リンパ腫および前駆 B/T 細胞性白血病が多くを占めていた。この中で、109 匹で sgRNA シーケンスを行い、*Trp53*, *Irf2bp2* などの 13 個の遺伝子が有意に高頻度に認められた。これらの遺伝子は細胞系列特異性を示し、*Pax5*, *Kmt2d*, *Atm*, *S1pr2* は B 細胞性腫瘍、*Zc3h12a*, *Socs1* は T 細胞性腫瘍に多く認められた。さらに、108 匹で全エクソン解析を行ったところ、B 細胞性腫瘍の 76%、T 細胞性腫瘍の 40% で二次的ドライバー異常を認めた。具体的には、B 細胞性腫瘍では、*Jak1*, *Jak3* の機能獲得型変異および *Flt3* の遺伝子内縦列重複、T 細胞性腫瘍では、*Notch1* の C 末端切断変異と *Ikzf1* の機能喪失型変異を反復して認めた (K Yamaguchi, ASH 2022)。

C: GM12878 ヒト B 細胞株において PD-L2 発現制御候補部位を対象として CRISPR スクリーニングを実施し、PD-L2 発現制御領域を遺伝子内に 16 カ所、下流に 2 カ所、上流に 2 カ所同定した。さらに、遺伝子内の発現制御領域の近傍に新規エクソン領域を見出し、CAGE 法により新規 PD-L2 転写開始部位を同定した。また、PD-L2 発現制御部位へ結合する転写因子・クロマチン制御因子が多数 (103 個) 同定されたため、これらの転写因子群を標的とした CRISPR スクリーニングを実施した。その結果、PD-L2 発現を負に制御する 7 遺伝子 (IRF4, EBF1 など) と正に制御する 2 遺伝子 (RBBP5, ASH2L) が同定された。これらの結果、B 細胞リンパ腫における PD-L2 発現制御機構が明らかになった (S Shingaki, Leukemia 2023)。

D: 単一細胞マルチオミクス解析のマウスリンパ腫モデルへの応用し、Pd-I1 欠損 A20 マウス B 細胞リンパ腫株において Pd-I1 または Pd-I2 を過剰発現させた場合の微小環境構成細胞の動態および遺伝子・表面マーカー発現の変化を明らかにした。具体的には、Pd-I1 または Pd-I2 発現により CD8 陽性 T 細胞、特にクローナルな疲弊 CD8 陽性 T 細胞の減少、単球・マクロファージや形質細胞様樹状細胞を含む骨髄系細胞の増加が引き起こされた (S Shingaki, Leukemia 2023)。

E: B 細胞リンパ腫特異的 PD-L2 発現制御機構に関して、ヒト DLBCL 522 例の RNA シーケンスデータを用いて同定された発現制御因子が実際に PD-L2 発現と相関するかを検討したところ、EBF1 と IRF4 発現と PD-L2 発現に負の相関があることが明らかになった。この結果は、実験的に同定された制御関係が、実際のヒト検体においても認められることを示唆している (S Shingaki, Leukemia 2023)。

5. 今後の計画

現在の方針を引き続き継続して研究計画を実施する。特に、項目 A や D については、ENKTL などの他のリンパ腫モデルの解析も実施する。また、項目 B については、生体内 CRISPR スクリーニングで同定された協調関係などに着目する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- 1) Tumor-promoting function and regulatory landscape of PD-L2 in B-cell lymphoma. Shingaki S, Koya J, Yuasa M, Saito Y, Tabata M, Marni B, McClure MB, Ogawa S, Katayama K, **Togashi Y**, Imoto S, **Kogure Y**, **Kataoka K**. *Leukemia*. 2023;37(2):492-496. 査読あり
- 2) Aberrant MYCN expression drives oncogenic hijacking of EZH2 as a transcriptional activator in peripheral T cell lymphoma. Vanden Bempt M, Debackere K, Demeyer S, Van Thillo Q, Meeuws N, Fernandez CP, Provost S, Mentens N, Jacobs K, Gielen O, Nittner D, Ogawa S, **Kataoka K**, Graux C, Tousseyn T, Cools J, Dierickx D. *Blood*. 2022;140(23):2463-2476. 査読あり
- 3) Whole-genome landscape of adult T-cell leukemia/lymphoma. **Kogure Y**, Kameda T, Koya J, Yoshimitsu M, Nosaka K, Yasunaga JI, Imaizumi Y, Watanabe M, Saito Y, Ito Y, McClure MB, Tabata M, Shingaki S, Yoshifuji K, Chiba K, Okada A, Kakiuchi N, Nannya Y, Kamiunten A, Tahira Y, Akizuki K, Sekine M, Shide K, Hidaka T, Kubuki Y, Kitanaka A, Hidaka M, Nakano N, Utsunomiya A, Sica RA, Acuna-Villaorduna A, Janakiram M, Shah UA, Ramos JC, Shibata T, Takeuchi K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Matsuoka M, Ishitsuka K, Shiraishi Y, Miyano S, Ogawa S, Ye BH, Shimoda K, **Kataoka K**. *Blood*. 2022;139(7):967-982. 査読あり

7. ホームページ等

<https://www.keio-hematology.jp/>

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular_oncology/index.html