

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08392

研究課題名（和文）新規エピゲノム修飾薬のB細胞リンパ腫に対する奏効予測モデルの確立とその治療応用

研究課題名（英文）Establishment of efficacy prediction model and clinical application of novel epigenetic modifiers

研究代表者

錦織 桃子（Nishikori, Momoko）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：60378635

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：B細胞リンパ腫株を用いて、EZH2阻害薬によって生じる遺伝子発現変化を網羅的に解析し、EZH2阻害薬はNK細胞やT細胞の反応性に関わる特徴的な液性因子の一群の発現を誘導し、B細胞リンパ腫の腫瘍微小環境をある特定のパターンに変化させる作用を持つことが示された。B細胞リンパ腫におけるEZH2阻害薬処理により誘導される遺伝子群とホジキンリンパ腫の腫瘍細胞であるH/RS細胞で高発現が報告されている遺伝子群には有意な相関が認められ、他のホジキンリンパ腫で特徴的にみられるエピゲノム関連因子で変動する遺伝子群とも照らし合わせ、エピゲノム修飾の違いが異なるリンパ腫病型の形成の一端を担っ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

EZH2阻害薬は一部の悪性リンパ腫で承認されている新規のエピゲノム修飾薬であるが、その作用機序には不明な部分も多い。そのため本研究では、EZH2阻害薬の作用機序を解明し、薬理作用に基づいた最適な使用方法を見出すことを目的とした。B細胞リンパ腫株を用いて、EZH2阻害薬によって生じる遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、EZH2阻害薬はNK細胞やT細胞の反応性を高める特徴的な液性因子の一群の発現を誘導し、リンパ腫の腫瘍微小環境を変化させる作用を持つことが示された。本研究より、本薬剤は免疫療法との併用により治療効果が高まる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Using B-cell lymphoma lines, we comprehensively analyzed the gene expression changes induced by EZH2 inhibitors and found that EZH2 inhibitors induce the expression of a group of characteristic humoral factors related to the reactivity of NK cells and T cells. They have also been shown to have the effect of altering the tumor microenvironment of B-cell lymphoma to a certain pattern similar to that of Hodgkin lymphoma. A significant correlation was observed between the genes induced by EZH2 inhibitor treatment in B-cell lymphoma and the genes reported to be highly expressed in H/RS cells of Hodgkin lymphoma. Comparison with the gene sets that are altered by epigenetic modifier genes expressed in H/RS cells have suggested that differences in epigenome modification play a role in the development of different lymphoma disease subtypes.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：悪性リンパ腫 EZH2

## 1. 研究開始当初の背景

悪性リンパ腫は血液内科領域で最多の悪性腫瘍であり、近年増加傾向にある。難治性の悪性リンパ腫症例に対しては様々な治療標的を持つ新規治療薬が開発され、従来の殺細胞性抗がん剤とは独立した治療効果を持つことから、いずれの薬剤も単剤では奏効率が低く奏効期間も限定的であり、有効性が予想される症例の選別方法や効果的な他剤との併用療法の開発が望まれている。

EZH2 阻害薬は、EZH2 によって生じる H3K27 のトリメチル化を阻害することにより、標的となっている遺伝子の発現を回復させる作用を持つ。タゼメトスタットは最も早く臨床開発が進められた EZH2 阻害薬であり、主な治療標的とされる EZH2 の活性化型変異陽性の再発・難治性濾胞性リンパ腫症例以外にも、EZH2 変異陰性の濾胞性リンパ腫やその他の B 細胞リンパ腫病型において有効な症例が存在することが海外の臨床試験において示されていた (Italiano, 2018)。

## 2. 研究の目的

B 細胞リンパ腫における免疫逃避機構の一つとして、CD58 発現低下が存在する。CD58 は腫瘍細胞に対し T 細胞や NK 細胞が免疫反応を生じる際の細胞間接着に関わる表面分子であるが、悪性リンパ腫における最多の病型である DLBCL ではその 6 割に欠失が認められ、そのうち半数以上で遺伝子異常は関与しないことが報告されている (Challa-Malladi, 2011)。我々はこうした遺伝子異常が関与しない CD58 発現低下にエピゲノム修飾が関与しており、EZH2 阻害薬が特異的に CD58 発現を回復させ、免疫細胞とリンパ腫細胞の免疫シナプス形成を促進させることにより、リンパ腫細胞に対する免疫反応を高める作用を持つことを報告した (Otsuka, Nishikori et al. 2020)。

本研究の過程で、EZH2 阻害薬はこのほかにも様々な生物学的作用を持つことが判明し、EZH2 変異を持たない B 細胞リンパ腫に対しても治療効果を発揮する可能性があることを見出した。そこで、EZH2 阻害薬の EZH2 遺伝子変異に依らない未知の作用機序を解明することで現在承認外の病型においても本薬剤の有用な群を見出し、最適な他剤との併用療法の開発を行うことは、悪性リンパ腫症例の予後の改善および医療経済の観点より重要であると考えた。以上より、EZH2 阻害薬の EZH2 遺伝子変異によらない B 細胞リンパ腫に対する作用を明らかにし、EZH2 阻害薬の有効な対象症例を選別し、かつ本薬剤の最適な治療アルゴリズムを確立することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

様々な病型の B 細胞リンパ腫細胞株 11 細胞株を用いて、EZH2 阻害薬によって生じる遺伝子発現変化をマイクロアレイ解析、RNA シークエンスにて絞り込み、特に治療効果に関与すると思われるサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子や免疫シグナル伝達に関わる遺伝子、遺伝子修復に関わる遺伝子を抽出し、定量 RT-PCR 法を用いて EZH2 阻害薬による遺伝子発現の変化、またフローサイトメトリーや ELISA を用いて蛋白発現や分泌量の変化を調べる。また、腫瘍細胞と T 細胞・NK 細胞との共培養によるサイトカイン産生能や細胞傷害能の変化、免疫細胞の遊走能への影響、他の薬剤との併用による細胞死割合の変化を評価する。また、EZH2 阻害薬の奏効を担うこれらの遺伝子変化と、各リンパ腫細胞株の遺伝子異常との関連性を明らかにし、クロマチン免疫沈降シークエンス (ChIP-seq) による標的遺伝子のエピゲノム修飾を解析することにより、EZH2 阻害薬による直接的な遺伝子制御が関与していることを確認する。また、相乗作用が予想される免疫修飾薬などの他の薬剤との併用による治療効果についても明らかにする。

## 4. 研究成果

B 細胞リンパ腫株 2 種類を用いて、EZH2 阻害薬によって生じる遺伝子発現変化を網羅的遺伝子解析で絞り込み、この中で特に治療効果に関与すると思われるサイトカイン・ケモカイン関連遺伝子や免疫シグナル伝達に関わる遺伝子を絞り込み、11 種類の B 細胞リンパ腫株において定量 RT-PCR 法で解析を行った。その結果、11 種類全ての細胞株で CCL17 の遺伝子発現が上昇することが判明した。ChIP-seq 解析により、EZH2 阻害薬は CCL17 のプロモータ領域の H3K27me3 を減少させることにより、遺伝子発現の誘導をもたらすことが示された。

また、EZH2 阻害薬で処理した B 細胞リンパ腫株の上清を用いた ELISA により、CCL17 は細胞外に分泌されることが判明した (図 1)。CCL17 の分泌促進作用は EZH2 変異の有無によらず、また

様々な B 細胞リンパ腫病型において普遍的に認められる作用であることが示唆された。

また、5 μm 孔のメンブレンにより分けられた上層に健康人末梢血由来の T 細胞を入れ、EZH2 阻害薬処理を行った B 細胞リンパ腫株の上清を下層に入れ、T 細胞の下層への遊走を調べたところ、高濃度の EZH2 阻害薬で処理した細胞由来の上清ほど多数の T 細胞の遊走を生じることが判明した(図 2)。この遊走は CCL17 のレセプターである CCR4 の阻害抗体により抑制されたことから、EZH2 阻害薬により B 細胞リンパ腫細胞株から分泌促進された CCL17 によって T 細胞遊走が惹起されたものと考えられた。これは、B 細胞リンパ腫由来の初代培養細胞を用いても同様の結果が得られた。

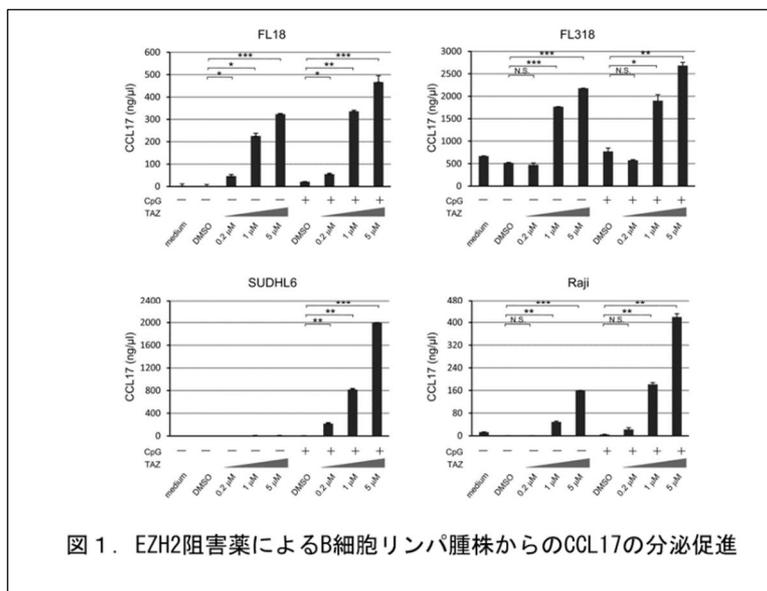


図 1. EZH2阻害薬によるB細胞リンパ腫株からのCCL17の分泌促進

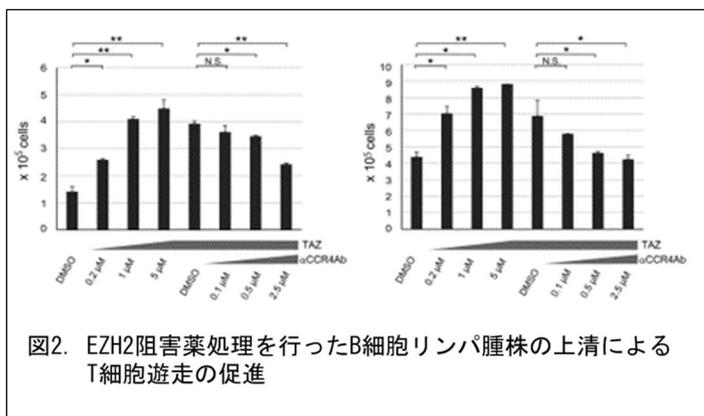


図2. EZH2阻害薬処理を行ったB細胞リンパ腫株の上清によるT細胞遊走の促進

また、遊走した T 細胞と B 細胞リンパ腫株との共培養により、遊走した T 細胞からの IFN- $\gamma$  の産生が認められ、さらに抗 PD-1 抗体を添加することにより、IFN- $\gamma$  の産生は増加した(図 3)。以上より、EZH2 阻害薬によって B 細胞リンパ腫より分泌した CCL17 へと動員された T 細胞は実際に抗腫瘍効果を担いことが示唆された。

EZH2 阻害薬はこれら以外にも NK 細胞や T 細胞の反応性に関わる特徴的な液性因子の一群の発

現を誘導し、B 細胞リンパ腫の腫瘍微小環境をある特定のパターンに変化させる作用を持つことが示された。

ホジキンリンパ腫は免疫細胞の豊富な微小環境を持つ腫瘍であるが、CCL17 はホジキンリンパ腫の腫瘍細胞である Hodgkin/Reed-Sternberg(H/RS) 細胞で特徴的に高発現が知られる。そこで B 細胞リンパ腫における EZH2 阻害薬処理により誘導される遺伝子群と、H/RS 細胞で高発現が報告されている遺伝子群の相関を比較したところ、有意な相関がみられることが Gene set enrichment analysis (GSEA) により示された。

濾胞性リンパ腫とホジキンリンパ腫はともに胚中心 B 細胞が起源の腫瘍であると考えられているが、従来これまで何がこれらの病型の分子病態の根本的な相異を生み出しているのかは不明であった。濾胞性リンパ腫細胞に対し EZH2 阻害薬を使用すると、免疫細胞の遊走や活性化をもたらす遺伝子の発現が上昇するが、その遺伝子群とホジキンリンパ腫で特徴的に高発現する遺伝子群との間に相関が認められたことから、エピゲノム修飾の違いが異なるリンパ腫病型の形成の一端を担っている可能性を推測した。

ホジキンリンパ腫のエピゲノム修飾状態に関与する因子として、ホジキンリンパ腫で頻度の高い 9p24.1 増幅の領域内に存在するヒストン脱メチル化酵素 KDM4C の高発現と、EB ウィルス感染による LMP1 蛋白による H3K27 脱メチル化作用を推測した。そこで、濾胞性リンパ腫細胞株への LMP1 蛋白導入、さらにホジキンリンパ腫細胞株において KDM4C の発現抑制により変化する遺

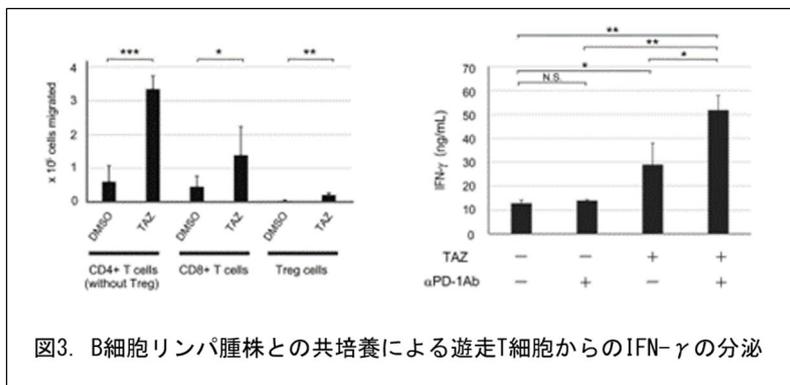


図3. B細胞リンパ腫株との共培養による遊走T細胞からのIFN- $\gamma$ の分泌

伝子群に関し、濾胞性リンパ腫における EZH2 処理によって変動する遺伝子群との比較を行ったところ、CCL17 以外にもこれらの中で連動して発現が変化する遺伝子の一群が存在することを見出した。これらのエピゲノム修飾が共通する遺伝子群の発現変化を担っていることを示すことで、これらのリンパ腫病型のエピゲノム修飾の違いの特徴を明らかにし、さらにエピゲノム修飾薬による治療効果を予測したり、異なる病型の治療薬も活用できるようになることができると考え、現在報告に向けてデータをまとめている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishikori Momoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Recent advances in understanding the biology of follicular lymphoma	5. 発行年 2024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/s12185-024-03764-6	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 錦織 桃子、高折 晃史	4. 巻 63
2. 論文標題 エピゲノム修飾を標的としたB細胞リンパ腫の治療	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 313 ~ 321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.63.313	査読の有無 無
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 Nakamura Naokazu, Nishikori Momoko, Tsujimura Marina, Kageyama Yuki, Akiyama Daisuke, Yoshizawa Akihiko, Takaori Kondo Akifumi	4. 巻 3
2. 論文標題 Intravascular clusters of T cells following chimeric antigen receptor T cell therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 576 ~ 577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jha2.395	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 Yuan Hepei, Nishikori Momoko, Ueda Chiyoko, Fujimoto Masakazu, Yasumi Takahiro, Otsuka Yasuyuki, Kitawaki Toshio, Hirata Masahiro, Haga Hironori, Kanegane Hirokazu, Takaori-Kondo Akifumi	4. 巻 62
2. 論文標題 A sporadic case of CTLA4 haploinsufficiency manifesting as Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 52 ~ 57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3960/jslirt.21026	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 Yuan Hepei, Nishikori Momoko, Otsuka Yasuyuki, Arima Hiroshi, Kitawaki Toshio, Takaori Kondo Akifumi	4. 巻 112
2. 論文標題 The EZH2 inhibitor tazemetostat upregulates the expression of CCL17/TARC in B cell lymphoma and enhances T cell recruitment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4604 ~ 4616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15122	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2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nakao K, Nishikori M, Jo T, Yuan H, Kitawaki T, Takaori-Kondo A.
2. 発表標題 Different impact of chemotherapeutic agents on NF- $\kappa$ B activity and the survival of lymphoma cells.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 錦織 桃子、高折 晃史
2. 発表標題 Epigenetic modification as a therapeutic approach for B-cell lymphoma
3. 学会等名 第83回日本血液学会総会、JSH-EHA Joint Symposium (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------