

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：24303
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2022
課題番号：21K16274
研究課題名(和文) 普遍的成熟B細胞腫瘍モデル細胞の網羅的遺伝子編集による高悪性度病態形成機序の解明
研究課題名(英文) Elucidation of the high-grade pathogenesis of universal mature B cell tumor model by using comprehensive gene editing
研究代表者
水谷 信介 (Mizutani, Shinsuke)
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：40883088
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：B細胞性リンパ腫(B cell lymphoma; BCL)、多発性骨髄腫(Multiple myeloma; MM)は、高頻度造血器腫瘍であるが、難治症例の克服が、いまだ重要課題として残されている。本研究ではヒト正常B細胞由来不死化細胞株にPDPK1-RSK2シグナル恒常的活性化を誘導した「BCL疾患横断的・普遍的モデル細胞」を作成し、これに対してヒト全ゲノムCRISPR/Cas9遺伝子ノックアウト網羅的スクリーニングを行い、高度造腫瘍性、細胞死刺激抵抗性獲得、染色体・遺伝子不安定性、抗腫瘍細胞免疫回避機構を誘導する分子異常の同定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でBCL、MMにおけるPDPK1-RSK2シグナルの恒常的活性化の病型横断的・普遍的な病態形成する「がん抑制遺伝子、がん遺伝子」が同定できれば、染色体・遺伝子不安定性獲得によるクローン性進化、骨髄由来抑制系細胞誘導機序等の解明に繋がり、一部の症例に認める高度治療抵抗性獲得病態を司る付加的分子異常の解明と克服に大きな一歩となるだけでなく、他のがん種に関する応用研究も期待できる。

研究成果の概要(英文)：B cell lymphoma (BCL) and multiple myeloma (MM) are highly prevalent hematopoietic tumors, and overcoming refractory cases remains an important challenge. In this study, we generated "BCL disease-cross-sectional and universal model cells" by inducing PDPK1-RSK2 signaling homeostatic activation in an immortalized human normal B cell-derived cell line, and performed a comprehensive screening of human whole genome CRISPR/Cas9 gene knockout against these cells to identify cells with high tumorigenicity, resistance to cell death stimulation, chromosomal and genetic instability. We are in the process of identifying molecular abnormalities that induce high tumorigenicity, resistance to cell death stimulation, chromosomal and genetic instability, and anti-tumor cell immune evasion mechanisms.

研究分野：血液内科学

キーワード：B細胞性リンパ腫 多発性骨髄腫 PDPK1 RSK2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B細胞性リンパ腫 (B cell lymphoma; BCL)、多発性骨髄腫 (Multiple myeloma; MM) は、高頻度造血器腫瘍であるが、難治症例の克服が、いまだ重要課題として残されている。BCL、MMの疾患克服には、症例間の分子生物学的異常の多様性・不均一性、染色体・遺伝子不安定性に基づくクローン性進化に伴う治療抵抗性獲得、腫瘍免疫監視機構の破綻、の3因子の克服戦略の開発が求められる。研究代表者らはBCL、MMにおけるPDPK1-RSK2シグナルの恒常的活性化の病型横断的・普遍的な病態形成への関与、activation-induced cytidine deaminase (AID)、BUB1過剰発現などによる染色体・遺伝子不安定性獲得によるクローン性進化、骨髄由来抑制系細胞誘導機序、等を明らかにしてきた。しかし、一部の症例に認める高度治療抵抗性獲得病態を司る付加的分子異常の解明と克服には、上記 - を基盤とした更なる研究が必要である。

2. 研究の目的

本研究ではヒト正常B細胞由来不死化細胞株にPDPK1-RSK2シグナル恒常的活性化を誘導した「BCL疾患横断的・普遍的モデル細胞」を作成し、これに対してヒト全ゲノムCRISPR/Cas9遺伝子ノックアウト・ヒト全ゲノムCRISPR/dCas9遺伝子発現活性化による網羅的スクリーニングを行い、高度造腫瘍性、細胞死刺激抵抗性獲得、染色体・遺伝子不安定性、抗腫瘍細胞免疫回避機構を誘導する分子異常の同定を目指す。さらに患者細胞の解析によって、その臨床的意義について明らかにする。これら基礎・臨床両面からのアプローチにより、高度難治BCL、MMの克服戦略開発のための基盤知見を確立することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では本研究課題を以下の4フェーズに分割し、研究を進める。

1. ヒト正常B細胞由来の不死化細胞株に恒常的PDPK1-RSK2情動的活性化を誘導した「BCLの病型横断的・普遍的モデル細胞」の樹立
複数の不死化ヒト正常B細胞株に野生型PDPK1遺伝子、もしくはN末端キナーゼ恒常的活性化RSK2遺伝子をレンチウイルスシステムを用いて遺伝子導入し、PDPK1/RSK2シグナルが恒常的に活性化したBCLの病型横断的・普遍的モデル細胞を樹立する。
2. 新規がん抑制遺伝子並びに新規がん遺伝子候補の同定
 - 2- Cas9、dCas9-Synergistic Activation Mediator (SAM)複合体恒常的発現細胞株の樹立 Cas9、dCas9-SAM複合体プラスミド、パッケージングプラスミドを293T細胞に導入・非増殖性レンチウイルスを得て、BCL普遍的モデル細胞株に感染させ、恒常的発現細胞株を樹立。
 - 2- ヒト全ゲノムCRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトスクリーニング、ヒト全ゲノムCRISPR/dCas9遺伝子発現活性化スクリーニングによる高度病態悪化責任分子の同定
 - 2- で樹立した細胞株を用い、約19,000個のヒト遺伝子あるいは転写開始点近接領域を標的とするgRNAライブラリーを同様に導入。DNA障害性抗がん剤、NK細胞共存、T細胞共存による選択圧を与えた後、生存細胞を回収し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により、それぞれの形質獲得における責任遺伝子を同定する。
3. BCL病型横断的・普遍的モデル細胞を用いた獲得分子のValidation
 - 2.で同定した有力な病態悪化促進遺伝子候補を選択し、個別のgRNAベクターを作成し導入し、細胞周期や細胞増殖、治療薬抵抗性、免疫学的攻撃への効果を評価する。さらに申請者所属研究

室で、その過剰活性や欠失が腫瘍化形成に寄与することがこれまでに明らかにされた前述の遺伝子 (AID, BUB1, RSK2, PDPK1, CDKN2A/2B) と、申請者が先行研究にて明らかにした Gene A (未発表) との相互機能関与を *in silico*、ならびに細胞ベースで検討する。

4. 疾患モデル動物の作成

3. で樹立した遺伝子改変細胞株と親株を用い、免疫不全マウス移植モデル(経静脈的移植もしくは皮下移植)を作成し、その形質変化を *in vivo* で明らかにする。形成された腫瘍細胞における染色体、遺伝子不安定性についても当研究室で確立済みの手法で解析する。

5. 臨床検体を用いた、個々の生存優位性獲得分子異常の臨床的意義の検討

申請者所属施設における、患者由来 BCL、MM 臨床検体を用いた同定遺伝子変異の有無を検討し、治療反応性や生存予後などの臨床プロファイルとの相関を検討する。

4. 研究成果

ヒト正常B細胞由来の不死化細胞株に恒常的PDPK1-RSK2情報の活性化を誘導した「BCLの病型横断的・普遍的モデル細胞」の樹立するために、複数の不死化ヒト正常B細胞株に野生型PDPK1遺伝子、もしくはN末端キナーゼ恒常的活性化RSK2遺伝子を、まずは電気穿孔法を用いて遺伝子導入し、PDPK1/RSK2シグナルが恒常的に活性化したBCLの病型横断的・普遍的モデル細胞を樹立することを試み、複数の細胞を得ることができた。次に計画していたCRISPR/Cas9、もしくはCRISPR/dCas9スクリーニングを行うためのCas9、dCas9の恒常的発現細胞株の樹立に関してはまずはCas9恒常的発現細胞株の樹立を行い、引き続きヒト全ゲノムCRISPR/Cas9遺伝子ノックアウトスクリーニングによる高度病態悪化責任分子の同定が現在進行中である。これにより同定された有力な病態悪化促進遺伝子候補を選択し、個別のgRNAベクターを作成し導入し、細胞周期や細胞増殖、治療薬抵抗性、免疫学的攻撃への効果を評価する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Potts Margaret A., Mizutani Shinsuke, Garnham Alexandra L., Li Wai Suen Connie S. N., Kueh Andrew J., Tai Lin, Pal Martin, Strasser Andreas, Herold Marco J.	4. 巻 30
2. 論文標題 Deletion of the transcriptional regulator TFAP4 accelerates c-MYC-driven lymphomagenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1447 ~ 1456
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-023-01145-w	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
1. 著者名 Tsukamoto Taku, Kinoshita Masaki, Yamada Kazuhiro, Ito Hodaka, Yamaguchi Toshikazu, Chinen Yoshiaki, Mizutani Shinsuke, Fujino Takahiro, Kobayashi Tsutomu, Shimura Yuji, Inazawa Johji, Kuroda Junya	4. 巻 -
2. 論文標題 Imaging flow cytometry-based multiplex FISH for three IGH translocations in multiple myeloma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	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) 10.1038/s10038-023-01136-2	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 Onishi Akio, Matsumura-Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Tsukamoto Taku, Fujino Takahiro, Miyashita Akihiro, Nishiyama Daichi, Shimura Kazuho, Kaneko Hiroto, Kawata Eri, Takahashi Ryoichi, Kobayashi Tsutomu, Uchiyama Hitoji, Uoshima Nobuhiko, Nukui Yoko, Shimura Yuji, Inaba Tohru, Kuroda Junya	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Impact of Treatment with Anti-CD20 Monoclonal Antibody on the Production of Neutralizing Antibody Against Anti-SARS-CoV-2 Vaccination in Mature B-Cell Neoplasms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 509 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S396271	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 Inoue Yu, Hirakawa Koichi, Hayata Hiroki, Nishiyama Daichi, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Kuroda Junya	4. 巻 102
2. 論文標題 Neurolymphomatosis of cranial nerves as the responsible lesions for the vocal cord paralysis and facial nerve palsy in a patient with diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-022-05038-9	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 Mizuhara Kentaro, Kobayashi Tsutomu, Nakao Mitsushige, Takahashi Ryoichi, Kaneko Hiroto, Shimura Kazuho, Hirakawa Koichi, Uoshima Nobuhiko, Wada Katsuya, Kawata Eri, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Yoneda Akiko, Watanabe Akihide, Sotozono Chie, Kuroda Junya	4. 巻 12
2. 論文標題 Watchful waiting is an acceptable treatment option for asymptomatic primary ocular adnexal mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: A retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3134 ~ 3144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5237	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 Maekura Chika, Muramatsu Ayako, Nagata Hiroaki, Okamoto Haruya, Onishi Akio, Kato Daishi, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Kobayashi Tsutomu, Okumura Keita, Inaba Tohru, Nukui Yoko, Kuroda Junya	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Clinical Implication of the Effect of the Production of Neutralizing Antibodies Against SARS-Cov-2 for Chronic Immune Thrombocytopenia Flare-Up Associated with COVID-19 Infection: A Case Report and the Review of Literature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 2723 ~ 2728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S360238	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 Isa Reiko, Horinaka Mano, Tsukamoto Taku, Mizuhara Kentaro, Fujibayashi Yuto, Taminishi-Katsuragawa Yoko, Okamoto Haruya, Yasuda Shusuke, Kawaji-Kanayama Yuka, Matsumura-Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Taniwaki Masafumi, Sakai Toshiyuki, Kuroda Junya	4. 巻 23
2. 論文標題 The Rationale for the Dual-Targeting Therapy for RSK2 and AKT in Multiple Myeloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2919 ~ 2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23062919	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 Potts Margaret A., Mizutani Shinsuke, Garnham Alexandra L., Li Wai Suen Connie S. N., Kueh Andrew J., Tai Lin, Pal Martin, Strasser Andreas, Herold Marco J.	4. 巻 -
2. 論文標題 Deletion of the transcriptional regulator TFAP4 accelerates c-MYC-driven lymphomagenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	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) 10.1038/s41418-023-01145-w	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

1. 著者名 Tsukamoto Taku, Kinoshita Masaki, Yamada Kazuhiro, Ito Hodaka, Yamaguchi Toshikazu, Chinen Yoshiaki, Mizutani Shinsuke, Fujino Takahiro, Kobayashi Tsutomu, Shimura Yuji, Inazawa Johji, Kuroda Junya	4. 巻 -
2. 論文標題 Imaging flow cytometry-based multiplex FISH for three IGH translocations in multiple myeloma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	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) 10.1038/s10038-023-01136-2	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 Onishi Akio, Matsumura-Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Tsukamoto Taku, Fujino Takahiro, Miyashita Akihiro, Nishiyama Daichi, Shimura Kazuho, Kaneko Hiroto, Kawata Eri, Takahashi Ryoichi, Kobayashi Tsutomu, Uchiyama Hitoji, Uoshima Nobuhiko, Nukui Yoko, Shimura Yuji, Inaba Tohru, Kuroda Junya	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Impact of Treatment with Anti-CD20 Monoclonal Antibody on the Production of Neutralizing Antibody Against Anti-SARS-CoV-2 Vaccination in Mature B-Cell Neoplasms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 509 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S396271	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 Inoue Yu, Hirakawa Koichi, Hayata Hiroki, Nishiyama Daichi, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Kuroda Junya	4. 巻 102
2. 論文標題 Neurolymphomatosis of cranial nerves as the responsible lesions for the vocal cord paralysis and facial nerve palsy in a patient with diffuse large B-cell lymphoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 481 ~ 482
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-022-05038-9	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 Mizuhara Kentaro, Kobayashi Tsutomu, Nakao Mitsushige, Takahashi Ryoichi, Kaneko Hiroto, Shimura Kazuho, Hirakawa Koichi, Uoshima Nobuhiko, Wada Katsuya, Kawata Eri, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Yoneda Akiko, Watanabe Akihito, Sotozono Chie, Kuroda Junya	4. 巻 12
2. 論文標題 Watchful waiting is an acceptable treatment option for asymptomatic primary ocular adnexal mucosa associated lymphoid tissue lymphoma: A retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3134 ~ 3144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5237	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 Maekura Chika, Muramatsu Ayako, Nagata Hiroaki, Okamoto Haruya, Onishi Akio, Kato Daishi, Isa Reiko, Fujino Takahiro, Tsukamoto Taku, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Kobayashi Tsutomu, Okumura Keita, Inaba Tohru, Nukui Yoko, Kuroda Junya	4. 巻 Volume 15
2. 論文標題 Clinical Implication of the Effect of the Production of Neutralizing Antibodies Against SARS-Cov-2 for Chronic Immune Thrombocytopenia Flare-Up Associated with COVID-19 Infection: A Case Report and the Review of Literature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 2723 ~ 2728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IDR.S360238	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 Isa Reiko, Horinaka Mano, Tsukamoto Taku, Mizuhara Kentaro, Fujibayashi Yuto, Taminishi-Katsuragawa Yoko, Okamoto Haruya, Yasuda Shusuke, Kawaji-Kanayama Yuka, Matsumura-Kimoto Yayoi, Mizutani Shinsuke, Shimura Yuji, Taniwaki Masafumi, Sakai Toshiyuki, Kuroda Junya	4. 巻 23
2. 論文標題 The Rationale for the Dual-Targeting Therapy for RSK2 and AKT in Multiple Myeloma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2919 ~ 2919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23062919	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 -

[学会発表] 計2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 水谷 信介, 太田 沙絵子, 金山 悠加, 服部 雄, 井上 祐, 村松 彩子, 岡本 明也, 大西 朗生, 水原 健太郎, 民西 葉子, 伊佐 怜子, 山口 順子, 藤野 貴大, 西山 大地, 木元 弥生, 塚本拓, 志村 勇司, 古林 勉, 堀池 重夫, 志村 和穂, 高橋 良一, 兼子 裕人, 黒田 純也
2. 発表標題 Efficacy of salvage therapy with carfilzomib followed by 2nd aPBSCT in relapse myeloma patients
3. 学会等名 第46回日本骨髄腫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷信介, Margaret A Potts, Lin Tai, Andrew J Kueh, Stephen Wilcox, 黒田 純也, Andreas Strasser, Marco J Herold.
2. 発表標題 Identification of novel tumour suppressor genes by using genome-wide in vivo CRISPR screening.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------