

【目的】近年、次世代シーケンス技術の発達により、数多くの悪性腫瘍の遺伝子異常の全体像が解明され、遺伝子変異・コピー数異常・融合遺伝子などの多数の新規異常が同定されてきた。しかし、このように同定された新規異常の生物学的な役割や機能の検証は従来の方法では非常に時間を要するため、その多くについては未だ不明なままである。成人 T 細胞白血病リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma : ATL) は HTLV-1 ウイルス感染を原因とする造血器腫瘍である。我々は世界に先駆けて 400 例を超える ATL 患者で包括的な遺伝子解析を行い、ATL における遺伝子異常の全体像を明らかにしてきた。その結果、50 個の遺伝子変異、26 個のコピー数増加領域、50 個のコピー数減少領域が有意に認められることが明らかとなった。しかし、これらの変異を認める遺伝子やコピー数異常領域に含まれる遺伝子の造血器腫瘍発症における機能的な役割はほとんど明らかとなっていない。本研究では近年発展を続けているゲノム編集技術を用いて、これまでに見出した遺伝子異常の機能的役割を *in vivo* でハイスループットに検証することを目的とした。

【方法】我々が ATL を中心にリンパ腫症例で新規に同定した遺伝子異常のうち造血器腫瘍における機能が不明で、かつ異常が機能喪失を引き起こすと予想される 80 遺伝子について、12 個ずつの sgRNA を含んだ sgRNA ライブラリーを作製した。このライブラリーをレンチウイルスにより、Cas9 を発現するマウスから純化した造血幹前駆細胞分画に導入し、同系マウスに移植を行うことで、造血細胞のみに遺伝子異常を導入する系を確立した。造血器腫瘍が発症した際には、表面マーカーや病理組織などを調べることで表現型を明らかにするとともに、ゲノム DNA を用いて sgRNA 配列領域を増幅しシーケンスすることで、発症した造血器腫瘍で濃縮されている sgRNA の同定を行った。

【結果】まず作製した sgRNA ライブラリーベクターの sgRNA 配列部位を PCR 増幅し、次世代シーケンサーを用いて解析を行い、各 sgRNA が偏りなく含まれていることを確認した。この sgRNA ライブラリーをレンチウイルスにより Cas9 を恒常的に発現しているマウスから純化した造血幹前駆細胞分画に導入し、致死量の放射線量を照射した同系マウスに骨髄移植を行った。すると下図に示す通り、骨髄移植後 3 カ月後頃より sgRNA ライブラリーを導入したマウスの死亡が確認され、一方で空ベクターを導入したマウスでは死亡は認められなかったことから、sgRNA ライブラリー由来の遺伝子異常が何らかの疾患を引き起こしているものと考えられ、実際に衰弱したマウスの形態学的、免疫学的解析を行ったところ、白血病やリンパ腫など、さまざまな種類の造血器腫瘍を発症していることが明らかとなった。

さらに、造血器腫瘍を発症したマウスの腫瘍細胞から採取したゲノム DNA を用いて、sgRNA 配列領域のシーケンスを行ったところ、腫瘍細胞で濃縮されている sgRNA を同定することが可能であった。これらの結果により、本手法が造血器腫瘍の発症に重要な遺伝子異常を *in vivo* でハイスループットに解析するための強力なツールであることが示され、現在さらに詳細な解析を進めている。

