

59. ハイブリッド遺伝子を標的とする新規治療法探索

遠西 大輔

岡山大学病院 ゲノム医療総合推進センター

Key words : ドライバー遺伝子変異, 悪性リンパ腫, マルチオミクス解析, 免疫療法

緒言

予後不良性疾患である難治性悪性リンパ腫は、免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法の治療効果が乏しいことが知られており、その免疫療法抵抗性のメカニズムの解明とその打破は、悪性リンパ腫の個別化医療を進める上で喫緊の課題である。これまで著者は、難治性悪性リンパ腫を対象に網羅的な遺伝子解析を実施し、様々なドライバー遺伝子変異を同定すると同時に、その臨床的有用性を明らかにして来た [1~5]。その過程で、難治性悪性リンパ腫では、BCR やNF- κ B など腫瘍内シグナルの活性化を引き起こす遺伝子 (*EZH2*, *TMEM30A*) の変異が、同時に細胞外シグナルを抑制し、免疫原性を低下させる事で腫瘍の免疫逃避を引き起こす事を発見した。さらに、これらの遺伝子の阻害剤は、腫瘍細胞自体の増殖抑制効果だけでなく、強力な腫瘍免疫を動員する事で高い抗腫瘍効果をもたらす事を突き止めた。また、これらの遺伝子変異は臨床予後とも強く関連しており、このような腫瘍細胞内外シグナルの両者を制御するハイブリッド遺伝子変異は、難治性悪性リンパ腫の病態形成に重要な役割を果たしていることが示唆される。

最近、このようなハイブリッド遺伝子変異の存在は、他の腫瘍でも散見されるようになっており、ハイブリッド遺伝子変異を標的として腫瘍細胞内外シグナルを同時に攻撃する治療戦略は、次世代の癌治療戦略として非常に注目されている (図1)。しかし、これまでハイブリッド遺伝子変異の同定は限られた症例のみで行われており、大規模な検索がなされていない。また、ハイブリッド遺伝子変異の生物学的意義の解明には、腫瘍と免疫環境の複雑なクロストークの解析が必須であるが、従来のゲノミクス技術ではそれらの十分な解析が困難であり、最新のマルチオミクス技術による網羅的解析が必要である。

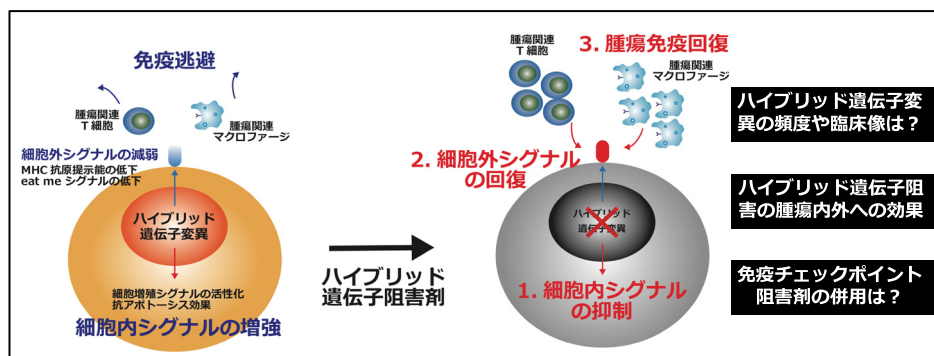


図1. ハイブリッド遺伝子変異による腫瘍内外シグナル制御と新規治療モデルの仮説

本研究では、B細胞性リンパ腫の大規模コホートを用いたマルチオミクス解析により新規ハイブリッド遺伝子変異を同定し、新たな治療戦略、特にエピゲノム阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の新規併用療法の開発を目的として、細胞株、動物モデルを使用した生物学的検証を行う。さらに、これらの検討に必要な解析技術として、シングルセル解析を実施し、ハイブリッド遺伝子変異が免疫微小環境に与える影響をシングルセルレベルで解析する。

方法

1. マルチオミクス解析による新規ハイブリッド遺伝子異常の発見

びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 1,500 例の RNA と DNA を抽出し、トランスクリプトーム解析並びにゲノミクス解析を行った。トランスクリプトーム解析にはパラフィン検体からの遺伝子発現解析が可能である NanoString 社の nCounter を使用し、MHC など腫瘍表面抗原と腫瘍周囲免疫担当細胞の定量を行った。一方、ゲノミクス解析は、300 遺伝子のターゲットシーケンスを行い、遺伝子変異を同定した。これら 2 つのオミクスデータを統合解析し、腫瘍内シグナルと腫瘍外微小免疫環境に影響を与えるハイブリッド遺伝子変異とこれらの変異が集積する新規マルチオミクス・サブタイプを同定した (図 2)。

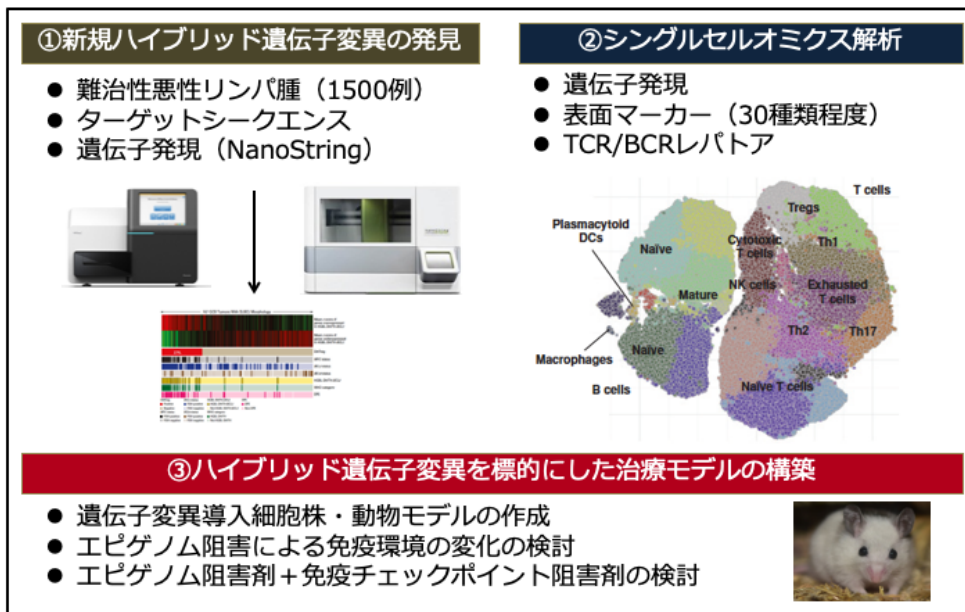


図 2. 研究計画のまとめ

本研究では、①~③の研究を実施した。

2. シングルセルオミクス解析によるハイブリッド遺伝子変異と免疫微小環境のクロストークの解析

ハイブリッド遺伝子変異を有する悪性リンパ腫の臨床検体を用いてシングルセル・トランスクリプトーム解析データを取得した。具体的には 10X Genomics 社のプラットフォームによるシングルセル RNAseq を行い、ハイブリッド遺伝子変異と免疫微小環境細胞のクロストークを一細胞レベルで解析した。

3. ハイブリッド遺伝子変異腫瘍の生物学的意義の解明と新規免疫併用療法の開発

ハイブリッド遺伝子変異、中でも TMEM30A の生物学的意義の検証を行った。具体的には、悪性リンパ腫の細胞株に、CRIPR-Cas9 を用いて TMEM30A 遺伝子変異を導入することで実験モデルを作製し、マクロファージチェックポイントである PS が細胞表面に強制的に露出するかを確認した。

結果および考察

1. 大規模マルチオミクス解析による新規ハイブリッド遺伝子変異の発見

RCHOP 療法を実施した DLBCL 1,500 例を対象に、マルチオミクス解析を実施した。まず、トランスクリプトーム解析を、NanoString 社 nCounter を用いて実施したところ、腫瘍細胞表面の MHC-class I 並びに class-I 抗原発現が低下し腫瘍関連 T 細胞の含有率が低下した「immune-cold」であるサブタイプ「DHITsig-positive/ind」が全症例の約

30%に確認され、その予後は5年生存率50%と不良であった(図3)。また、遺伝子変異解析を実施したところ、DHITsig-positive/ind群に有意に集積が見られる遺伝子変異として、既知の *EZH2*, *CREBBP*, *TMEM30A*に加え、*GNAI3*や *TNFRSF14*などが同定された。これらの遺伝子変異は、腫瘍表面のMHCだけでなく、HVEM-BTLAなどB細胞性リンパ腫と免疫微小環境のクロストークで中心的な役割をもつ免疫チェックポイントにも影響を与えていることから、ハイブリッド遺伝子変異の性質も持っていることが明らかとなった。

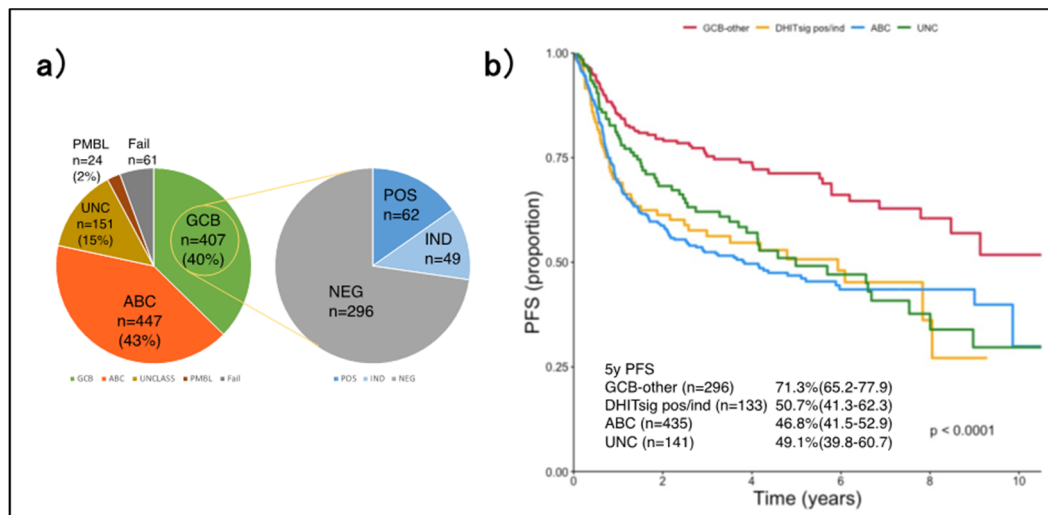


図3. DHITsig-positive グループの同定

a) DLBCLのマルチオミクス・サブタイプ分類

b) マルチオミクス・サブタイプ毎の予後曲線 (p-value : Log-rank-test)。

2. シングルセル解析によるハイブリッド遺伝子変異の細胞間ネットワークの解明

EZH2 変異を有するリンパ腫の臨床検体を用いて、シングルセル RNAseq を実施した。解析細胞数の中央値は、 1.2×10^4 /ml であり、十分な解析リード数を保持する形でシーケンスを行った。解析した結果、まず腫瘍細胞において、細胞表面のMHC-class I、class-IIを共に欠落しており、また *CDKN2A* や *NF-kB* など細胞増殖に関わるシグナルの活性も認められたことから、一細胞レベルでもハイブリッド遺伝子変異の細胞内外シグナルの制御が確認出来た。一方、免疫微小環境細胞では、腫瘍細胞と強いクロストークを有するものとして、濾胞ヘルパーT細胞 (follicular helper Tcell : TFH) や樹状細胞が挙げられ、これらの細胞からの正のシグナルを受けている可能性が示唆された。一方、細胞障害性T細胞や、メモリーT細胞の分画が、正常リンパ節よりも小さいことから、腫瘍細胞との相互関係が希薄であることが示唆された。さらに、マクロファージの中でも分化度の高い細胞が少なくなっており、腫瘍細胞表面の *TIM3* や *CD47* などのマクロファージチェックポイントの変容も考えられた。

3. 遺伝子導入モデルを用いたハイブリッド遺伝子変異の生物学的検証

高悪性度リンパ腫細胞株を用いて、ハイブリッド遺伝子変異である *TMEM30A* を CRISPR/Cas9 にてノックアウトした *TMEM30A* の KO モデルを作製した。KO 細胞株はコントロール (野生型) に比べ、“eat me signal” である Phosphatidylserine (PS) の露出が増強していることが確認され、先行研究で得られた結果が一般化されることを確認した(図4)。同時に、このノックアウト細胞株から RNA を抽出し、シングルセル RNAseq を実施中であり、*TMEM30A* が細胞内外シグナルに与える影響を一細胞レベルで評価している。また、動物モデルとしてノックアウト細胞株を導入した xenograft モデルを作製し、腫瘍増大とマクロファージの食食機能との関連性を現在評価中であり、マクロファージチェックポイント阻害剤 (抗 *CD47* 抗体) の投与を計画している。

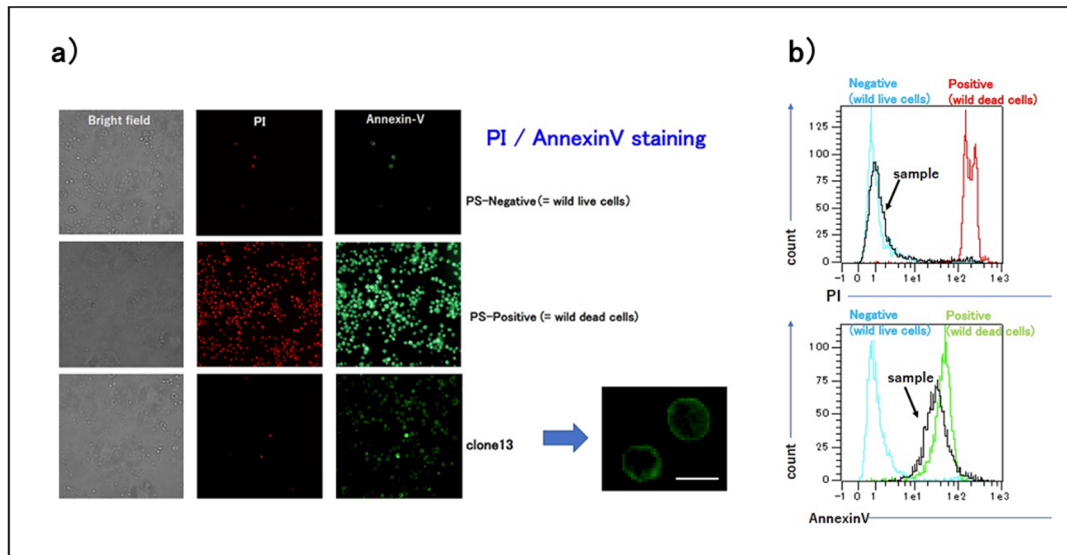


図4. *TMEMKO* モデルを用いたマクロファージチェックポイント露出の評価
TMEMKO モデル (clone13 : bottom) とコントロール (wild live cell : top, wild dead cell : middle) の細胞表面の Annexin-V 発現の評価。
 a) 蛍光顕微鏡による評価 (スケールバー : 100 μ m)。
 b) フローサイトメトリーによる評価。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科血液・腫瘍・呼吸器内科学の前田嘉信、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科呼吸器・乳腺内分泌外科学の豊岡伸一、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病理学の吉野正である。

文献

- 1) Ennishi D, Hsi ED, Steidl C, Scott DW. Toward a New Molecular Taxonomy of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Discovery*. 2020 Sep;10(9):1267-1281. doi: 10.1158/2159-8290.CD-20-0174. Epub 2020 Jul 2. PMID: 32616477.
- 2) Ennishi D, Healy S, Bashashati A, Saberi S, Hother C, Mottok A, Chan FC, Chong L, Abraham L, Kridel R, Boyle M, Meissner B, Aoki T, Takata K, Woolcock BW, Viganò E, Gold M, Molday LL, Molday RS, Telenius A, Li MY, Wretham N, Dos Santos N, Wong M, Viller NN, Uger RA, Duns G, Baticados A, Madero A, Bristow BN, Farinha P, Slack GW, Ben-Neriah S, Lai D, Zhang AW, Salehi S, Shulha HP, Chiu DS, Mostafavi S, Gerrie AS, Huang DW, Rushton C, Villa D, Sehn LH, Savage KJ, Mungall AJ, Weng AP, Bally MB, Morin RD, Cohen Freue GV, Staudt LM, Connors JM, Marra MA, Shah SP, Gascoyne RD, Scott DW, Steidl C. *TMEM30A* loss-of-function mutations drive lymphomagenesis and confer therapeutically exploitable vulnerability in B-cell lymphoma. *Nat Med*. 2020 Apr;26(4):577-588. doi: 10.1038/s41591-020-0757-z. Epub 2020 Feb 24. PMID: 32094924.

- 3) Ennishi D, Takata K, Béguelin W, Duns G, Mottok A, Farinha P, Bashashati A, Saberi S, Boyle M, Meissner B, Ben-Neriah S, Telenius A, Lai D, Teater M, Kridel R, Savage KJ, Sehn LH, Morin RD, Marra MA, Shah SP, Connors JM, Gascoyne RD, Scott DW, Melnick AM, Steidl C. Molecular and Genetic Characterization of MHC Deficiency Identifies EZH2 as Therapeutic Target for Enhancing Immune Recognition. *Cancer Discov.* 2019 Apr;9(4):546-563. doi: 10.1158/2159-8290.CD-18-1090. Epub 2019 Jan 31. PMID: 30705065.
- 4) Ennishi D, Jiang A, Boyle M, Collinge B, Grande BM, Ben-Neriah S, Rushton C, Tang J, Thomas N, Slack GW, Farinha P, Takata K, Miyata-Takata T, Craig J, Mottok A, Meissner B, Saberi S, Bashashati A, Villa D, Savage KJ, Sehn LH, Kridel R, Mungall AJ, Marra MA, Shah SP, Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD, Morin RD, Scott DW. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2019 Jan 20;37(3):190-201. doi: 10.1200/JCO.18.01583. Epub 2018 Dec 3. PMID: 30523716.
- 5) Ennishi D, Mottok A, Ben-Neriah S, Shulha HP, Farinha P, Chan FC, Meissner B, Boyle M, Hother C, Kridel R, Lai D, Saberi S, Bashashati A, Shah SP, Morin RD, Marra MA, Savage KJ, Sehn LH, Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD, Scott DW. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact. *Blood.* 2017 May 18;129(20):2760-2770. doi: 10.1182/blood-2016-11-747022. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28351934