

**【目的】** これまで我々は、難治性悪性リンパ腫において、BCR や NF- $\kappa$ B など腫瘍内シグナルの活性化を引き起こす遺伝子の変異が、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てきた。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。このような細胞内外シグナルを同時に制御する遺伝子変異（ハイブリッド遺伝子変異）を標的として、腫瘍の内と外から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。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、これらの検証に必要な解析技術として、シングルセルマルチオミクス解析を実施し、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】** まず、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 1,500 例の核酸を抽出し、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で 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い、ゲノミクス解析では 300 遺伝子の変異情報を得た。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の同定を行った。次に、既知あるいは新規に発見されたハイブリッド遺伝子変異を、先行研究同様 CRISPR-Cas9 などを用いて細胞株に導入し、細胞外シグナルに与える影響を評価した。その際、シングルセル RNAseq を用いて、単一細胞レベルでの免疫細胞の多様性と腫瘍微小環境内での空間位置関連性を解明し、ハイブリッド遺伝子変異との相関を検証した。

**【結果】** 大規模臨床検体を用いたマルチオミクス解析により、腫瘍微小環境にも影響を与えるハイブリッド遺伝子変異として *EZH2*, *CREBBP*, *TMEM30A* に加え、*GNA13* や *TNFRSF14* などが新たに同定された。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た。これらの結果は、シングルセル解析で詳細に検証され、さらに CRISPR-Cas9 にて作製した *TMEM30A*-KO *in vitro* モデルにて、マクロファージチェックポイントである Phosphatidylserine (PS) (eat me signal) の露出が増加するなど、次世代の免疫併用療法の基盤となるデータが得られた。

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

