32　リンパ腫関連遺伝子の *in vivo* における網羅的な探索	片岡　圭亮

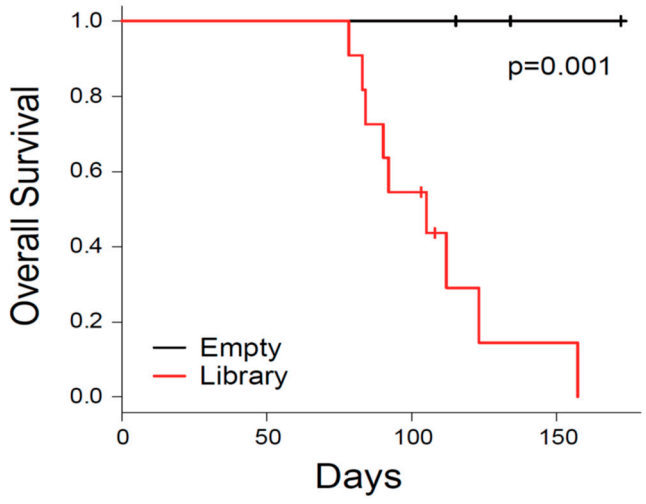
【目的】近年、次世代シーケンス技術の発達により、数多くの悪性腫瘍の遺伝子異常の全体像が解明され、遺伝子変異・コピー数異常・融合遺伝子などの多数の新規異常が同定されてきた。しかし、このように同定された新規異常の生物学的な役割や機能の検証は従来の方法では非常に時間を要するため、その多くについては未だ不明なままである。成人T細胞白血病リンパ腫（adult T-cell leukemia/lymphoma：ATL）はHTLV-1ウイルス感染を原因とする造血器腫瘍である。我々は世界に先駆けて400例を超えるATL患者で包括的な遺伝子解析を行い、ATLにおける遺伝子異常の全体像を明らかにしてきた。その結果、50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により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クエンスすることで、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、次世代シークエ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配列領域のシークエ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。

sgRNAライブラリー導入マウスの生存曲線



32. リンパ腫関連遺伝子の *in vivo* における網羅的な探索

片岡　圭亮

国立がん研究センター研究所 分子腫瘍学

Key words：悪性リンパ腫，遺伝子異常，ゲノム編集，スクリーニング，*in vivo*

緒　言

近年、次世代シーケンスやマイクロアレイ技術の発達により、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［1］。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非常に時間を要するものであり、その多くについては未だ不明なままである。さらに、コピー数異常では、該当領域に複数の遺伝子が含まれるために、遺伝子解析のみでドライバー遺伝子を同定することは困難である。そのため、遺伝子解析により同定された新規の異常の腫瘍化における役割をハイスループットに解析する方法が望まれている。

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リンパ系腫瘍のひとつであり、日本では約 120 万人の HTLV-1 キャリアが存在し、毎年 1,000 人以上が ATL により死亡している。そのため、本疾患の病態の解明および治療方法の改善はわが国で取り組むべき重要な課題である。我々は世界に先駆けて 400 例を超える ATL 患者で、全エクソン解析・全ゲノム解析による変異解析、RNA シーケンスによる融合遺伝子解析、SNP アレイによるコピー数解析を含む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［2，3］。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役割はほとんど解明されておらず、革新的治療へのボトルネックとなっている。

近年、遺伝子の機能異常を調べる方法として、ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーが注目されている。この方法は、従来の shRNA の場合と比較して、ゲノム自体に挿入・欠失を導入して、遺伝子機能を永久的にノックアウトできる点や、発現カセットに内在されているバーコードのみでなく、ゲノム自体をシークエンスすることにより対象の遺伝子が実際にノックアウトされているかを検証可能な点で非常に優れている。これまでの CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いたがん研究の多くは、数千から数万の遺伝子を標的とするライブラリーを用いて、*in vitro* における細胞株の増殖などを評価して行われてきた。しかし、この方法では遺伝子あたりの sgRNA 数の少なさに起因する実験精度の低さや、*in vivo* における重要性を評価不能という問題点があった。そこで我々は、ATL を中心にリンパ腫症例で新規に同定した遺伝子異常で、機能が不明なものに限定し、さらに Cas9 を恒常的に発現するマウスの造血細胞を用いた骨髄移植の系を用いることにより、リンパ腫に関連する多数の遺伝子異常の機能的役割を個体レベルでハイスループットに解析可能な方法を開発し、検証することを目的とした。

我々はまずリンパ腫症例で実際に認められる遺伝子異常のうち、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。さらにこのライブラリーをレンチウイルスによって Cas9 を恒常的に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、致死量の放射線を照射した同系マウスに骨髄移植を行うことで、造血細胞のみに遺伝子異常を導入する系を確立した。この手法によって、マウス個体で造血器腫瘍が高確率に発症し、腫瘍細胞のゲノム解析を行うことで発症に寄与した sgRNA を抽出することが可能であり、実際の症例で認められる遺伝子異常のうち、特に個体レベルで造血器腫瘍の発症・維持に重要な役割を果たしている異常を抽出するための基盤を構築することができた。

方法および結果

1. リンパ腫関連 CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーの作製

まず、我々が ATL をはじめとするさまざまなリンパ腫で新規に同定した遺伝子異常の中から *in vivo* における腫瘍化への役割が不明で、かつ機能喪失を引き起こすと予想される 80 遺伝子について、標的とする sgRNA を 12 個ずつ設計し、これらを 2 プールに分割したレンチウイルスライブラリーを Gibson Assembly 法を用いて構築した。作製した sgRNA ライブラリーについて、sgRNA 配列部位を PCR 増幅し、次世代シークエンサーを用いて各 sgRNA の含まれている割合を解析したところ、90/10 パーセンタイル比が 2.12 という結果であり、それぞれの sgRNA が偏りなく含まれていることが確認できた。

2. リンパ腫関連 sgRNA ライブラリーによる造血器腫瘍の発症

1. で作製した sgRNA ライブラリーを tagRFP 蛍光タンパクでラベルしたレンチウイルスにより Cas9-GFP 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に導入し、5,000 個の感染細胞を 1×10^5 個の正常骨髄細胞とともに致死量放射線を照射した同系マウスに骨髄移植を行い、造血細胞のみに遺伝子異常を導入する系を確立した。1 カ月後の末梢血解析により感染細胞の生着を確認し、以後は末梢血のキメリズム解析および超音波検査による脾腫の評価にて経過観察を行った。すると 3 カ月後頃より、末梢血中の白血球増加を示す個体や、著明な脾腫を認める個体（図 1）などが出現しはじめ、最終的に図 2 に示す通り、リンパ腫関連 sgRNA ライブラリーを導入した細胞の移植を受けたマウスがほぼ全匹死亡した。一方でコントロールとしての sgRNA を含まない空のウイルスベクターを導入したマウスでは同時期における死亡は全く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マウス個体に何らかの疾患を引き起こしているものと考えられた。

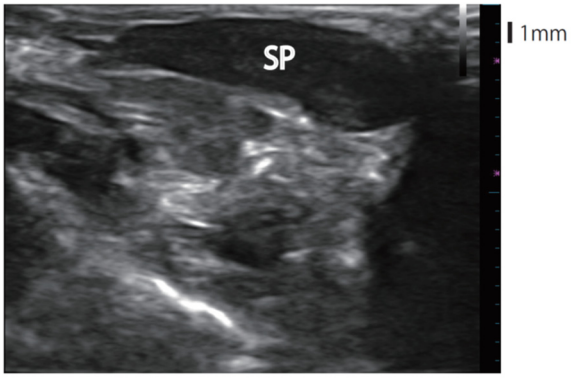


図 1. 造血器腫瘍を発症したマウスの脾臓
悪性リンパ腫関連 sgRNA ライブラリーを導入した細胞を骨髄移植したマウスの 16 週間後の腹部超音波解析。著明に腫大した脾臓が認められた。

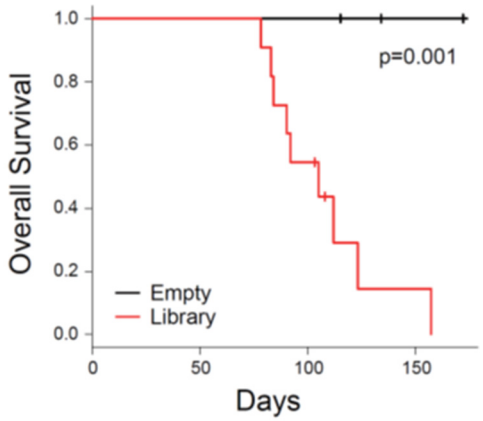


図 2. sgRNA ライブラリーによるマウスの生存期間の短縮

sgRNA ライブラリー（Library）もしくは空ベクター（Empty）を導入した細胞を骨髄移植したマウスの生存解析。sgRNA ライブラリーによる有意な生存期間の短縮が認められた。

この生存解析の結果をもとに、明らかに末梢血における血算値の異常や、脾腫を呈した衰弱したマウスについて、形態学的、免疫学的表現型解析を行ったところ、白血病や悪性リンパ腫など、さまざまな種類の造血器腫瘍を発症しており、これが生存期間の短縮に寄与していると考えられた。図 3 に腫瘍細胞を用いたフローサイトメトリー解析の結果を示す。

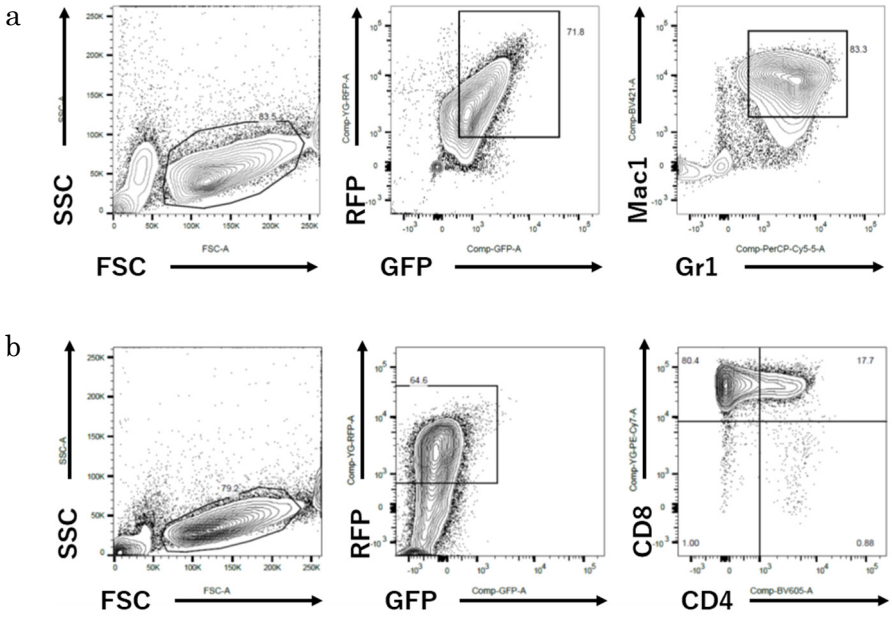


図 3. sgRNA ライブラリーによって発症したマウス造血器腫瘍のフローサイトメトリー解析

a）移植後 83 日目に急性骨髄性白血病で死亡したマウスの骨髄細胞解析。骨髄球系マーカーを発現している。

b）移植後 105 日目に悪性リンパ腫で死亡したマウスの胸腺細胞解析。T 細胞マーカーである CD8 を発現している。

さらに、これらの造血器腫瘍を発症したマウス 5 匹の腫瘍細胞からゲノム DNA を抽出し、1.で示した方法で腫瘍細胞中に濃縮されている sgRNA の同定を試みた。その結果、図 4 に示す通り、それぞれの腫瘍に複数（2～8 種類）の sgRNA が導入されたクローンが拡大していることが明らかとなった。最も多く検出された対象遺伝子は *Trp53* であり、その他にも *Cebpa* や *Kmt2d*、*Socs1*、*Btg1*、*Lmcd1* に対する sgRNA が複数のマウスで認められた。

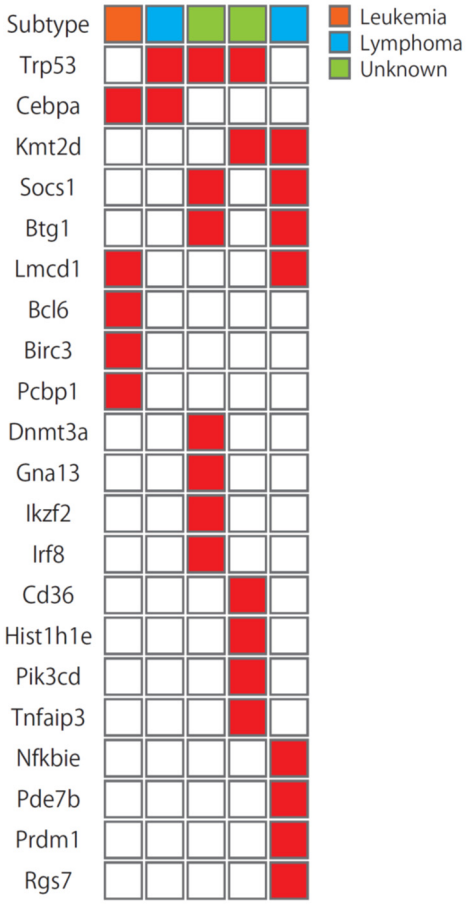


図 4. 腫瘍細胞で濃縮されていた sgRNA の同定

造血器腫瘍を発症したマウスから腫瘍細胞からゲノム DNA を抽出し、sgRNA 配列部位を PCR 増幅しシークエンスすることによって、濃縮されている sgRNA を同定した。最も高頻度に含まれていた対象遺伝子は Trp53 であった。

考　察

遺伝子異常の個体における生物学的な役割の解明にはこれまで個々の遺伝子を対象としたノックアウトマウスやノックインマウスを作製し、解析することに依存してきたが、この方法では非常に多くの費用面、時間面のコストを要し、次世代シークエンサーの普及に伴って急速に理解が進んでいる疾患ゲノム情報にまったく追いついていないのが現状である。そこで我々はゲノム編集技術を個体にもスクリーニングの方法として用いることで、実際に造血器腫瘍症例で認められる遺伝子異常について、一度に多数の遺伝子を対象とする機能喪失スクリーニングを*in vivo*で行うことを可能とした。特に、個体レベルで造血器腫瘍が非常に高確率で発症したことからも、全ゲノムを対象としたスクリーニング法よりも臨床的、生物学的に重要性の高い遺伝子について、より重点的に解析することが可能な実験系であると考えられる。さらに本手法ではウイルス量の調整によって導入するsgRNA数もコントロールできるため、腫瘍発症における遺伝子異常の機能的な組み合わせについても検討することが可能である。

この研究によって遺伝子解析で明らかとなった遺伝子異常のドライバーとしての役割が明らかとなることで、遺伝子異常に基づいた造血器腫瘍発症の分子病態の理解が可能となる。さらに、このようなドライバー遺伝子自体やその経路を標的とした創薬への展開や、これらの遺伝子異常の診断や予後予測への応用などが期待される。さらに、本方法により作製されるマウスは、患者で認められる遺伝子異常を再現したリンパ腫モデルであるため、特定のドライバー遺伝子を標的とした研究やその応用のみならず、未知の薬剤のスクリーニングや治療効果予測などにも利用できると期待され、さらに研究を進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター研究所分子腫瘍学の古屋淳史、木暮泰寛である。

文　献

1） Vogelstein B1, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. Science. 2013 Mar 29;339(6127):1546-58. doi: 10.1126/science.1235122.

2） Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S. Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers. Nature. 2016 Jun 16;534(7607):402-6. doi: 10.1038/nature18294. Epub 2016 May 23.

3） Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. Nat Genet. 2015 Nov;47(11):1304-15. doi: 10.1038/ng.3415. Epub 2015 Oct 5.