

ハイブリッド遺伝子を標的とする新規癌免疫治療の開発

岡山大学病院ゲノム医療総合推進センター
遠西 大輔

【研究の目的】

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。これまで申請者は、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 (*Ennishi D, Cancer Discovery 2019; Ennishi D, Nature Med 2020*)。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。最近、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、他の腫瘍でも散見されるようになっており (*Klughammer J, Nature Med 2018*)、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。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癌種・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。本研究では、世界最大規模の悪性リンパ腫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、単一細胞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単一細胞レベルで解析する。

【研究方法】

①マルチオミクス解析による新規ハイブリッド遺伝子変異の発見

B 細胞性リンパ腫の臨床検体から得られた核酸を使用し、トランスクリプトーム解析並びにゲノミクス解析を行う。トランスクリプトーム解析では、MHC など腫瘍表面抗原と腫瘍周囲免疫細胞の定量を行う。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実施し、これら 2 つのオミクスデータを統合解析して、ハイブリッド遺伝子変異の新規同定を行う。これまで中四国地方の主要 11 施設から B 細胞性リンパ腫 1,500 例の臨床・組織情報を収集し、既に核酸抽出を開始している。

②単一細胞解析によるハイブリッド遺伝子変異の生物学的意義の解明

臨床検体またマウス検体を用いて単一細胞からマルチオミクス解析データを取得する。具体的には 10X Genomics を用いたトランスクリプトーム・表面マーカー・TCR/BCR レパトア解析である CITEseq を行い、単一細胞レベルでの免疫細胞の多様性を解明し、ハイブリッド遺伝子変異との関連を検証する。申請者は、CITEseq を臨床検体に応用し、腫瘍微小環境の細胞集団を同定する事に成功している (未発表)。

③ハイブリッド遺伝子変異を標的とした新規免疫併用療法の検証

先行研究同様、CRISPR-Cas9などを用いてハイブリッド遺伝子変異を細胞株やマウスモデルに導入し、エピゲノム阻害剤などの腫瘍内シグナル阻害剤を投与する事で、腫瘍細胞死と腫瘍周囲免疫細胞が再動員される事を評価する。さらに、最近難治性B細胞性リンパ腫に対して高い抗腫瘍効果が注目されている (*Advani R, NEJM 2018*) 抗CD47抗体やSIRP α 阻害剤などのマクロファージの貪食機能を亢進させる次世代の免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を確認する。先行研究では、ハイブリッド遺伝子変異腫瘍において腫瘍関連マクロファージの微小環境への動員が認められており (*Ennishi D, Nature Med 2020*; 図3)、腫瘍自体の増殖抑制と、腫瘍に対する免疫抑制の相乗効果を検証する事で、非臨床 Proof of concept の取得を目指す。

【研究結果】

1) 遺伝子変異解析

申請者の研究グループで収集したDLBCLの初発時生検検体(約1,200症例)から核酸抽出を行った。その結果、約400例で十分なDNAもしくはRNAを抽出することが出来、これらの症例を対象に遺伝子変異解析と発現解析による、マルチオミクス解析を実施した。そのうちDNAが抽出できた症例について、DLBCLに高頻度に出現する200遺伝子のターゲット・キャプチャーシーケンスを行い、*KMT2D*, *TP53*, *CREBBP*, *PIM1*, *BCL2*, *EZH2*, *GNA13*などが頻度の高い遺伝子変異として同定された。この結果は、既報とほぼ同様であり、実験系が機能している事を示している。

2) 遺伝子発現解析

nCounterを用いたターゲット・トランスクリプトーム解析を実施した。その結果、本研究コホートでは、細胞起源 (cell-of-origin) サブタイプの比率が、ABC-DLBCL 52%, GCB-DLBCL 37%, Unclass 11%であることが明らかとなった。これまでの欧米人における報告では、ABC-DLBCL と GCB-DLBCL の比率が約30%、60%とGCB-DLBCLの比率が多い事が知られていたが、本研究によって、ABC-DLBCLの比率が高い事が示され、アジア人におけるDLBCLの分子学的特徴が明らかとなった。一方、GCB-DLBCLは、DHIT-like (35%) と non-DHIT-like (65%)に更に分類され、DHIT-like群は極めて予後不良であったことから、早期の治療開発が必要となる患者群である (5y-PFS, 43% vs 78%; $P < 0.001$)。

3) マルチオミクス解析—細胞内シグナル

予後不良であったABC-DLBCLとDHIT-like DLBCLについて集積しやすい遺伝子変異を解析した結果、ABC-DLBCL内に予後不良であるMCDグループ(*MYD88*と*CD79B*のいずれかが変異を起こしている群)が存在し、DHIT-likeグループには、*EZH2*や*CREBBP*などのエピゲノム遺伝子が高頻度に変異を起こしている事が明らかとなった。MCDグループとDHIT-likeグループは、それぞれ細胞質内のBCR+NF- κ Bシグナルの活性化と、核内エピゲノムの脱制御が腫瘍化に関わっており、細胞内シグナルの活性化に繋がっていることが示唆された。

4) マルチオミクス解析—細胞外シグナル

さらに、免疫チェックポイントの発現に関しても解析した結果、ABC-DLBCLとDHIT-likeグループでは、有意にMHC-IもしくはMHC-IIの発現が低下しており、加えてこれらの症例では、腫瘍組織内のT細胞の分布が明らかに低下していた。これらの結果から、免疫逃避機構がこれらのサブタイプの予後不良性に寄与し

ていることが示唆された。また、これらのグループでは、上記同様、*MYD88*、*CD79B* といった MCD グループのコンポーネントや、*EZH2*、*CREBBP* など DHIT-like グループのコンポーネント遺伝子変異が集積していることが明らかとなった。

5) 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クエンスを行った。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- κ B 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 T-cell: 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。

6) 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

肺がん細胞株を用いて、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 モデルを作成した。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。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 モデルを作成し、腫瘍増大とマクロファージの貪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。

【考察】

本研究により、悪性リンパ腫におけるハイブリッド遺伝子変異の臨床的・生物学的意義が解明された。特に予後不良群を特徴づける遺伝子変異であることが明らかとなったことで、ハイブリッド遺伝子変異を標的とした早期の治療開発が不可欠である。また、遺伝子導入モデルにて、*EZH2* や *TMEM30A* を標的とした新たな治療開発の基礎データ取得し、今後はマクロファージチェックポイント阻害剤との併用戦略や、*TMEM30A* 抗体と CD20 抗体の新たな二重特異性抗体の開発など、難治性 B 細胞性リンパ腫における革新的な治療開発を進める。

【謝辞】

本研究を行うにあたり、公益財団法人 アステラス病態代謝研究会に深謝致します。また、前田嘉信教授をはじめとした、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科血液・腫瘍・呼吸器内科学の教室員の先生方との共同研究の成果であり、ここに深く御礼申し上げます。