

# 新規難治性リンパ腫モデルのゲノム解析に基づく

## 悪性形質分子機構の解明

藤田医科大学

オープンファシリティーセンター

(共同利用研究設備サポートセンターより名称変更)

ゲノム解析室

杉原 英志

### 1. 研究の目的・背景

悪性リンパ腫である非ホジキンリンパ腫は昨今の化学療法や分子標的薬の開発により、治療成績に改善が見られるものの、未だ一部の患者で再発や治療抵抗性が報告されている。2017年のWHO分類で「High grade B-cell lymphoma, with MYC and BCL2 and/or BCL6 rearrangements」という通称 double-hit lymphoma (DHL)と呼ばれるリンパ腫が追加された。DHL はがん遺伝子 MYC とアポトーシス抑制因子 BCL2 の転座の組み合わせが大きな割合を占め、また転座を伴わないが両者の高発現が見られる double-expressor lymphoma (DEL)と呼ばれる DHL に特徴が類似したリンパ腫も報告され、両者を合わせると非ホジキンリンパ腫である「びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫」において約 30%もの割合になると報告されている。DHL 及び DEL は高い治療抵抗性・再発性を示し、極めて予後不良であるため、両者に対する治療法の基盤構築は非常に重要な課題である。

我々は ex vivo 培養技術を基盤とした悪性リンパ腫などの造血器腫瘍、固形腫瘍のマウスモデルを独自に開発し研究を推進してきた (文献 1, 2)。本研究に先立ち、MYC 及び BCL2 を同時に高発現するベクターを開発し、DHL と DEL に代表される high grade B-cell lymphoma と酷似した新規リンパ腫モデルの構築に成功した。本研究ではこれらのマウスモデルやヒト細胞株から MYC 及び BCL2 発現の高難治性リンパ腫悪性形質を駆動する分子を同定することを目的として研究を実施した。

## 2. 研究の対象ならびに方法

本研究の対象としてゲノム解析では *Cdkn2a* (がん抑制遺伝子) ノックアウトマウス由来の胚中心様の B 細胞へ MYC 発現レトロウイルスベクターを導入した後、同種マウスへ移植して形成したリンパ腫細胞と MYC と BCL2 を同時に発現するレトロウイルスベクターを導入・移植して形成したリンパ腫細胞を用いた。また、細胞株としてびまん性大細胞 B リンパ腫細胞株 DB、MYC 高発現がん細胞である卵巣がん細胞株 Kuramochi 及び肺がん細胞株 PC9 を用いた。本研究の方法としてはまずリンパ腫モデルの全ゲノムシーケンス解析及び RNA シーケンス解析を実施し、データ解析は CLC Genomics Workbench (QIAGEN 社)により実施した。遺伝子群の相関解析として Gene Set Enrichment Analysis 及び Gene Ontology 解析を行った。次に培養実験において発現レトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターをリンパ腫細胞及びヒト細胞株へ導入し、細胞生存率を測定した。さらに細胞株に対して抗がん剤 (Carboplatin, Osimertinib) を 9 日~11 日間処理し、細胞生存率を測定した。

## 3. 研究結果

### (1) マウスリンパ腫モデルを用いた全ゲノム解析

悪性リンパ腫における発がん分子機序を明らかにするため、MYC 発現リンパ腫マウスモデル 8 クローンから採取したリンパ腫細胞の全ゲノムシーケンス解析を実施した。その結果、機能抑制型の変異を持つ遺伝子をいくつか同定することができた。つまり、これら遺伝子の機能低下が MYC 高発現によるリンパ腫発症に重要であることが推測された。中でも同定された *Hnrnpa3* 遺伝子と *Siva1* 遺伝子は全てのクローンで共通して変異が確認されたため、それぞれ野生型発現ベクターを構築し、リンパ腫細胞へ導入して生存率に影響を与えるのかどうか解析した。その結果、*Hnrnpa3* 導入細胞は生存率に若干の低下傾向が見られたが、*Siva1* に関しては変化が生じなかった。しかし、どちらにおいてもリンパ腫では生存率に大きく寄与しないことが分かった。従ってリンパ腫発生後の段階では両遺伝子の変異の影響は少なく、リンパ腫発症の初期段階で影響があることが示唆された。

### (2) マウスリンパ腫モデルのトランスクリプトーム解析

高難治性リンパ腫の悪性形質を規定する分子ネットワークを明らかにするため、2 種類の

マウスリンパ腫モデル (MYC 発現、MYC+BCL2 発現) とコントロールとして正常 B 細胞を用いて mRNA シーケンス解析を実施した。クラスタリング解析により両リンパ腫に共通して高発現の遺伝子群や MYC 発現リンパ腫、MYC+BCL2 発現リンパ腫それぞれで高発現する遺伝子群を同定した。さらに Gene Set Enrichment Analysis 及び Gene Ontology 解析を行ったところ、MYC+BCL2 発現リンパ腫において細胞接着に関わる遺伝子セットや神経系機能に関わる遺伝子セットとの相関性が有意に高いことを明らかにした。この結果から MYC に加え BCL2 の発現がこれらの機能との相関性に影響を与える可能性が示唆された。そこで BCL2 発現ベクターを構築し、MYC 発現リンパ腫へ導入を行い、RNA シーケンス解析を実施することで BCL2 が遺伝子発現に影響を及ぼすのか現在検討中である。

## (2) MYC 制御機構の解析

近年、DHL に対しては BCL2 阻害剤による治療法が開発されてきているが、抵抗性機構が存在することが報告されている。つまり単純に BCL2 を阻害する治療法では不十分であり、MYC を阻害する治療法も並行して開発を進めるべきと考えられる。しかし現状 MYC の直接的な阻害剤は臨床試験で良い効果を得られておらず、間接的に MYC を制御する方法が必要である。昨年、がん細胞が MYC の発現抑制により胚盤胞の休眠機構を誘導することで既存の化学療法を回避することが報告された (文献 3)。この休眠状態の細胞は persister 細胞と呼ばれ再発の原因となることが明らかになっている (文献 4)。この persister における MYC の抑制機構が DHL における治療法へと繋がるのではないかと考えた。そこで卵巣がん細胞株及び肺がん細胞株へ標準治療薬 (Carboplatin, Osimertinib) を長期に処理し、persister 細胞が発生するのか調べた。その結果、persister 細胞は予想通り確認され、MYC が抑制されることにより増殖や代謝が低下した状態であることが分かった。現在この persister 細胞と元の細胞とで RNA シーケンス解析を実施している段階であり、その後のデータ解析により MYC を抑制する分子機構を見出し、MYC 阻害剤開発へと展開する分子を絞り込む予定である。

## 4. 考察

マウスリンパ腫モデルのゲノム解析の結果からリンパ腫発症に関わると推測される遺伝子変異を同定することができた。その中で Hnrnpa3 は hnRNP A/B family に属しスプライシ

ングや mRNA の輸送などに関わる RNA 結合タンパク質であり、リンパ腫発症に RNA のスプライシングを始めとした機能が重要であることが示唆された。Siva1 はアポトーシスを調節する因子であり、TNF ファミリーの一つである CD27 によるアポトーシスで重要な役割を果たす分子である。従ってリンパ腫発症初期段階において Siva1 の変異はアポトーシス回避に重要である可能性が示唆された。次にリンパ腫モデルのトランスクリプトーム解析の結果から DHL に特徴的な遺伝子群を明らかにしたが、これらは細胞接着や神経系に関わる機能など予期しない遺伝子セットとの相関があったため、今後さらに遺伝子を絞り込むことで難治性リンパ腫の悪性形質に関わる分子を同定していく予定である。また、BCL2 自体が転写制御に関わるかどうかを明らかにしていきたい。さらに、がんの休眠機構の解析から MYC 発現抑制の新たな分子機構を明らかにすることで DHL や DEL を始めとした高難治性リンパ腫の治療法開発へと展開する予定である。

## 5. 文献

1. Sugihara E, Hashimoto N, Osuka S, Shimizu T, Ueno S, Okazaki S, Yaguchi T, Kawakami Y, Kosaki K, Sato TA, Okamoto S, Saya H†. The inhibitor of apoptosis protein Livin confers resistance to Fas-mediated immune cytotoxicity in refractory lymphoma. *Cancer Research*, 80: 4439-4450, 2020.
2. Adachi T, Kobayashi T, Sugihara E, Yamada T, Ikuta K, Pittaluga S, Saya H, Amagai M, Nagao K. Hair follicle-derived IL-7 and IL-15 mediate skin-resident memory T cell homeostasis and lymphoma. *Nature Medicine*, 21(11):1272-1279, 2015.
3. Dhimolea E, de Matos Simoes R, Kansara D, Al'Khafaji A, Bouyssou J, Weng X, Sharma S, Raja J, Awate P, Shirasaki R, Tang H, Glassner BJ, Liu Z, Gao D, Bryan J, Bender S, Roth J, Scheffer M, Jeselsohn R, Gray NS, Georgakoudi I, Vazquez F, Tsherniak A, Chen Y, Welm A, Duy C, Melnick A, Bartholdy B, Brown M, Culhane AC, Mitsiades CS. An Embryonic Diapause-like Adaptation with Suppressed Myc Activity Enables Tumor Treatment Persistence. *Cancer Cell*, 8;39(2):240-256, 2021.
4. Oren Y, Tsabar M, Cuoco MS, Amir-Zilberstein L, Cabanos HF, Hütter JC, Hu B, Thakore PI, Tabaka M, Fulco CP, Colgan W, Cuevas BM, Hurvitz SA, Slamon DJ, Deik A, Pierce KA, Clish C, Hata AN, Zaganjor E, Lahav G, Politi K, Brugge JS, Regev A. Cycling cancer

persister cells arise from lineages with distinct programs. Nature. 596(7873):576-582, 2021.

## 6. 論文発表

なし