

2019年度シニア・リサーチフェロー  
研究成果報告書

令和2年4月27日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名：新垣 清登



研究課題：B細胞リンパ腫におけるPD-L2の生物学的役割と発現制御機構の解明  
(テーマ)

研究期間： 自 平成31年 4月 1日  
至 令和 2年 3月31日

研究指導者：氏名 片岡 圭亮



公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

### 1) 要旨

我々は網羅的遺伝子解析により *PD-L2* ゲノム異常は B 細胞リンパ腫においてのみ認めることを新たに見出した。この結果は、*PD-L2* が B 細胞リンパ腫の重要なドライバーであり、細胞系列特異的な発現制御機構の存在を示唆すると考え、B 細胞リンパ腫における *PD-L2* 発現制御に焦点を当てた研究を開始した。

CRISPR システムにより非コード領域を介した *PD-L2* 発現制御実験系を確立した。更に、この実験系を発展させることにより、CRISPR スクリーニングの手法を確立し、B 細胞における *PD-L2* 発現制御領域を網羅的に同定することに成功した。本研究の更なる推進により、B 細胞リンパ腫における *PD-L2* 生物学的役割の解明が期待される。

## 2) 序

近年、免疫チェックポイント阻害薬はがん治療に大きな変革をもたらしている。これらの抗体はPD-1、PD-1 リガンド、CTLA4 などの免疫チェックポイント分子を標的とし、抗腫瘍免疫を活性化させると考えられている。一方で、多くの腫瘍で20~30%に留まっている奏効率の改善や、免疫療法特有で、かつ致命的となり得る免疫関連副作用の予防・治療など、がん免疫療法に関して克服すべき課題は多く残されている。

がん免疫療法の抱える、これらの課題克服のアプローチとして、ゲノム異常と免疫チェックポイント阻害薬との関連について精力的な研究が行われている<sup>1)</sup>。我々の研究グループが、様々な悪性リンパ腫におけるPD-1 リガンドに関する遺伝子解析を行ったところ、PD-L1ゲノム異常はB細胞、および、T細胞のいずれのリンパ腫でも認められたのに対し、PD-L2ゲノム異常はB細胞リンパ腫においてのみ認められた<sup>2)</sup>。この結果は、PD-L2がB細胞リンパ腫における特異的ドライバー異常としての機能、および、細胞系列特異的なPD-L2発現制御機構が存在を示唆していると考えた。B細胞リンパ腫に特異的なPD-L2発現制御機構と腫瘍化に果たす役割を解明することを目的に本研究を開始した。

### **3) 実験方法**

#### **細胞株**

293T 細胞は RIKEN BRC より入手した。B 細胞は Coriell Institute より入手した。Lenti-X 293T 細胞は Takara より購入した。292T 細胞と Lenti-X 293T 細胞は、DMEM 培地(Nacalai Tesque)に 15%ウシ胎児血清(Gibco)と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(Nacalai Tesque)を添加した培地で培養した。B 細胞は、RPMI 1640 培地(Nacalai Tesque)に 15%ウシ胎児血清(Gibco)と 1% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液(Nacalai Tesque)を添加した培地で培養した。細胞株は、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。細胞株は、定期的にマイコプラズマ汚染がないことを、MycoAlert (Lonza)により確認した。

#### **リアルタイム PCR**

RNA を RNeasy Mini Kit (Qiagen)で抽出した。cDNA を ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (Toyobo)で作成した。LightCycler 96 (Roche)でリアルタイム PCR を行なった。PCR 酵素は KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (Kapa)を使用した。

#### **ウェスタンブロッティング解析**

細胞溶解液を回収し、Any kD ミニプロティアン TGX プレキャストゲル(Bio-Rad)で電気泳動し、PVDF メンブレン(Millipore)に転写した。更に、メンブレンに一次抗体、その後、二次抗体を反応させた。一次抗体は Cas9 抗体と  $\beta$ -actin 抗体を使用し、二次抗体は抗マウス IgG 抗体と抗ウサギ IgG 抗体を使用した。更に、ECL Prime Western Blotting Reagent(GE ヘルスケア)と ImageQuant LAS 4000 (GE ヘルスケア)を用いて化学蛍光シグナルを検出した。

#### **レンチウイルス**

Lenti-X 293T 細胞をレンチウイルスベクター、psPAX2 (Addgene #12260)、および、pMD2.G (Addgene #12259)により形質転換した。その 72 時間後にウイルス上清を回収し、293T 細胞および B 細胞に感染させて、形質導入株を樹立した。

### ゲノム DNA シーケンス

ゲノム DNA を QIAamp DNA mini kit (Qiagen) で抽出した。抽出したゲノム DNA を PCR 反応により増幅した。PCR 酵素は Kapa HiFi HotStart ReadyMix (Kapa) を使用した。NextSeq を使用して PCR 産物のシーケンスを行った。

#### 4) 結果

##### CRISPR システムによる標的遺伝子発現制御実験系の確立

CRISPR システムにより非コード領域を介した *PD-L2* 発現制御実験系の確立に取り組んだ。まず、先行研究を参考にコントロール実験として、293T 細胞における *ERBB2* 遺伝子発現制御実験を実施した<sup>3)</sup>。具体的にはレンチウイルスベクターにより 293T 細胞に Cas9 誘導体を導入し、この 293T-Cas9 誘導体導入細胞に *ERBB2* の非コード領域を標的とした sgRNA (*ERBB2\_1549.12*) を導入した。その結果、*ERBB2* 発現量の変化が表面蛋白レベルおよび mRNA レベルで認められた(図 1)。

更に、この実験系を CRISPR スクリーニング対象 B 細胞における *PD-L2* 発現制御に適応した。B 細胞-Cas9 誘導体導入細胞に *PD-L2* の非コード領域を標的とした sgRNA を導入することにより、*PD-L2* 発現変化を誘導することに成功した。

##### CRISPR スクリーニングによる B 細胞系列における *PD-L2* 発現制御部位の同定

まず、*PD-L2* 発現制御候補部位を対象に網羅的に sgRNA を設計した。CRISPR ライブラリーを PCR 反応で増幅し、ギブソンアセンブリ反応を実施することにより、レンチウイルスベクターにクローニングした。更に、コンピテントセルにエレクトロポレーションすることによりレンチウイルスベクターを増幅した。増幅したレンチウイルスベクターのバーコードシーケンスを実施し、それぞれの sgRNA が均等に導入されていることを確認した。

B 細胞に CRISPR ライブラリーを導入し、*PD-L2* 低発現領域および高発現領域をフローサイトメトリーでソートした(図 2)。ソートした細胞のゲノム DNA を抽出し、PCR 反応により増幅した。更に、PCR 産物の次世代シーケンスを実施することにより、それぞれの細胞分画に含まれる sgRNA に対するリード数を算出した。シーケンスデータの解析により、*PD-L2* 発現制御領域の推定を行い、8 箇所の *PD-L2* 発現制御領域を同定した。

CRISPR スクリーニングにより推定された *PD-L2* 発現制御領域を検証するために、それぞれの領域に含まれる sgRNA を複数個選択した。これ

らの sgRNA をレンチウイルスベクターにクローニングし、個別に B 細胞に導入することにより、CRISPR スクリーニング結果の妥当性を確認するとともに、PD-L2 発現制御領域の検証を行った。

図 1. CRISPR システムによる標的遺伝子の発現制御

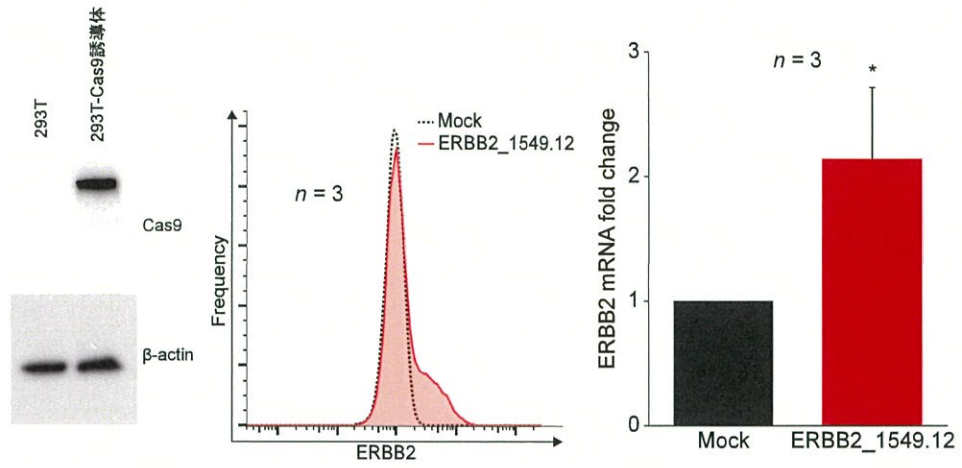
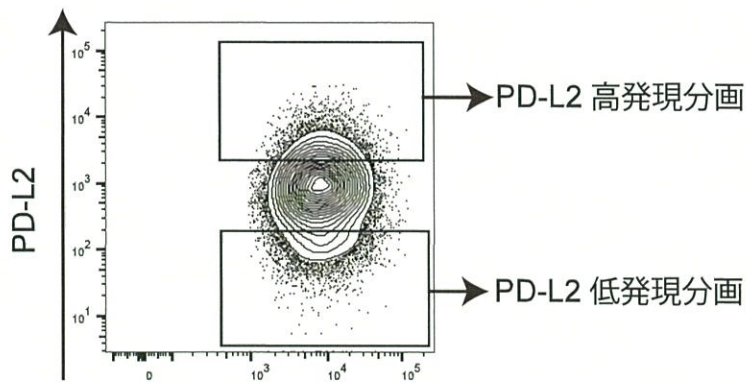


図 2. CRISPR スクリーニングにおけるゲーティング





## 6) 考察

本研究では、まず CRISPR システムにより非コード領域を介した *PD-L2* 発現制御実験系を確立した。その後、CRISPR スクリーニングにより B 細胞における *PD-L2* 発現制御部位を同定した。更に、同定された発現制御領域を標的とした個別 sgRNA の検証により、実施した CRISPR スクリーニング実験結果の妥当性を確認するとともに、B 細胞における *PD-L2* 発現制御領域を網羅的に明らかにすることができた。

8箇所もの発現制御領域の存在は、*PD-L2* の発現が、いくつかの発現制御領域により複雑に調整されていることを示唆している。これらの発現制御領域に関連する、B 細胞特異的 *PD-L2* 発現制御分子基盤を明らかにすることにより、*PD-L2* の B 細胞リンパ腫における生物学的役割の更なる解明が強く期待される。

**【参考文献】**

1. Keenan TE, *et al.* Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade. *Nat Med.* 2019;25(3):389–402. doi:10.1038/s41591-019-0382-x
2. Kataoka K, *et al.* Frequent structural variations involving programmed death ligands in Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Leukemia.* 2019;33(7):1687–1699. doi:10.1038/s41375-019-0380-5
3. Klann TS, *et al.* CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome. *Nat Biotechnol.* 2017;35(6):561–568. doi:10.1038/nbt.3853

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本年度の取り組みにおいて、最先端の分子生物学的手法である CRISPR スクリーニングに関連する一連の実験を自ら行い、新たな技術を習得することができた。シニア・リサーチフェローに登用されていたため、研究活動に専念できる環境において CRISPR スクリーニングのコントロール実験、ライブラリーデザイン、スクリーニング条件検討、および、スクリーニング結果検証を着実に実施することができた。

今後は、B 細胞特異的 *PD-L2* 発現制御機構についての取り組みをより深めることにより、B 細胞リンパ腫における *PD-L2* の生物学的役割の解明に努めていきたい。更に、今年度の活動により得られた研究成果を、これまでの臨床医としての知識・経験と統合させることにより、将来的には免疫チェックポイント阻害剤の有効なバイオマーカー開発へと発展させたい。