

研究報告書  
令和3年度：A課題

2023年 5月 12日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 岡山大学病院

住 所 岡山県岡山市北区鹿田町2-5-1

研究者氏名 遠西 大輔

(研究課題)

悪性リンパ腫におけるハイブリッド遺伝子変異を標的とした免疫併用治療の開発研究

令和4年 3月 10日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しました  
のでご報告いたします。

## 【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- $\kappa$ 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を用いたマルチオミクス解析により免疫微小環境と関連性の高い分子学的サブタイプを同定し、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。

## 【研究結果】

### 1) 遺伝子発現解析

申請者の研究グループで収集した DLBCL の初発時生検検体 (1200 症例) から核酸抽出を行った。これらの症例から十分量の RNA が抽出できた 1,050 例で、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%;  $P < 0.001$ )。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他研究で明らかとなっている。

### 2) 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、 $1.2 \times 10^4$ /ml であり、十分な解析リード数を保持する形でシーケンシングを行った。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- $\kappa$ 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。

### 3) 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他腫瘍においても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マウスモデルを作成し、腫瘍増大とマクロファージの食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ストラテジーや、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、公益財団法人がん研究振興財団に深謝致します。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。