

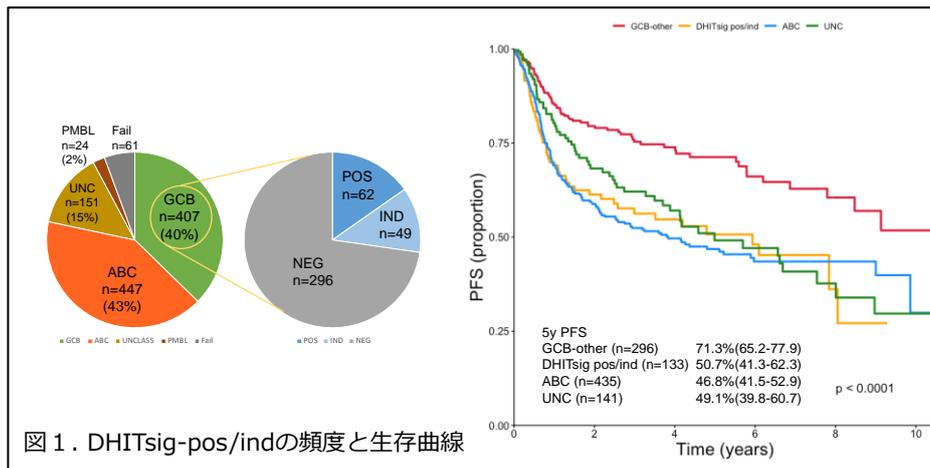
腫瘍内シグナルと腫瘍外免疫環境を同時に標的とする
難治性悪性リンパ腫の新規免疫療法の開発

岡山大学病院 ゲノム医療総合推進センター 研究教授
遠西 大輔

予後不良疾患である難治性悪性リンパ腫は免疫療法が奏功し難い腫瘍の一つであり、その抵抗性メカニズムの解明がこれらの患者の治療成績の向上に急務である。最近、悪性リンパ腫を含むいくつかの血液がんにおいて、腫瘍内シグナルの活性化を引き起こす遺伝子変異が、同時に細胞外シグナルを抑制し腫瘍の免疫逃避を引き起こす事が、申請者をはじめとした複数のグループから報告された (*Ennishi D et al, Nature Med 2020, Cancer Discovery 2019, 2020, JCO 2019, Blood 2017*)。このような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、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が考えられ、次世代のがん治療戦略として非常に注目されている。本研究では、血液がんにおける新規ハイブリッド遺伝子変異の同定とそれに対する新たな治療戦略を目指し、世界最大規模の悪性リンパ腫コホートと、最先端の遺伝子解析技術を駆使したマルチオミクス解析、機能解析を実施した。

1. 大規模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

十分量の核酸 (DNA, RNA) が得られた **DLBCL 1,247** 例を対象にマルチオミクス解析を実施した。まず、トランスクリプトーム解析を NanoString 社 nCounter を用いて実施したところ、腫瘍細胞表面の MHC-class I 並びに class-I 抗原発現が低下し腫瘍関連 T 細胞の含有率が低下した、「immune-cold」であるサブタイプ「**DHITsig-positive/ind**」が全症例の約 30%に確認され、その予後は 5 年生存率 37%と極めて不良であった (図 1)。



また、遺伝子変異解析を実施したところ、DHITsig-positive/ind 群に有意に集積が見られる遺伝子変異として、既知の *EZH2*, *CREBBP*, *TMEM30A* に加え、*GNA13* や *TNFRSF14* などが同定された。これらの遺伝子変異は、腫瘍表面の MHC だけでなく、HVEM-BTLA など B 細胞性リンパ腫と免疫微小環境のクロストークで中心的な役割をもつ免疫チェックポイントにも影響を与えていることから、ハイブリッド遺伝子変異の性質も持っていることが明らかとなった (新規ハイブリッド遺伝子変異の同定)。

このデータは日本・アジア圏だけでなく、世界的にも最大規模の悪性リンパ腫のマルチオミクス解析データ であり、様々な視点からさらに解析予定である。特に、本コホート内で再発検体が得られている症例が 100 症例存在し、極めて貴重な初発・再発ペア検体のマルチオミクス解析 が実施可能であり、再発に至る免疫微小環境の変化や腫瘍不均一性の変化、またハイブリッド遺伝子変異が果たす役割をさらに解明しうる。さらに、これらのデータに空間的位置情報を付加することで、リンパ腫免疫微小環境の不均一性を時空間的に解明し、予後不良造血器疾患の新たな治療戦略を開発する基盤となることが期待される。

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、 1.2×10^4 /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 は共に欠落しており、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。現在、シングルセル DNAseq のデータを新たに追加してパイロット研究を実施しており、さらに遺伝子変異を有する腫瘍細胞群を一細胞レベルで同定し得ることが確認できた。今後は、これら遺伝子変異のクローン性変化を含めて解析し、免疫微小環境とのクロストークが時間軸とともにどのように変化するかも併せての解析が必要になる。

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

高悪性度リンパ腫細胞株を用いて、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（図2）。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。特に、腫瘍形成が早くまた腫瘍 T 細胞やマクロファージの貪食作用の検証に適したゼブラフィッシュモデルと、遺伝子改変マウスモデルを組み合わせることで、作用機序の詳細な動物モデルを構築していく。

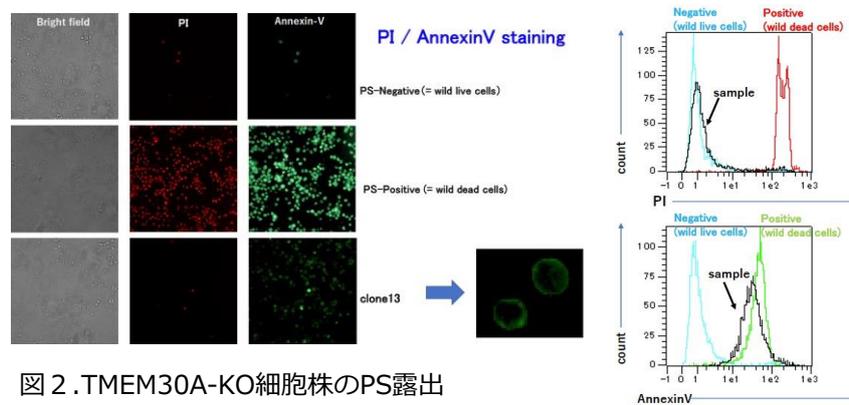


図2.TMEM30A-KO細胞株のPS露出