

(様式 10)

(海外特別研究員事業)

平成 31 年 4 月 6 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 20

氏名 青木 智広

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： バンクーバー （国名： カナダ ）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
分子生物学的背景に基づく悪性リンパ腫細胞と微小環境の相互作用を標的とした治療開発
3. 派遣期間： 平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日
4. 受入機関
The BC Cancer Agency.

8. 所期の目的の遂行状況及び成果 **書式任意(A4判相当3ページ以上, 英語で記入のものも可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

1) 腫瘍細胞及び微小環境構成細胞の単細胞レベルでの網羅的解析

ホジキンリンパ腫は、若年女性、特に AYA 世代に多い悪性リンパ腫であるが、腫瘍細胞が腫瘍の生検検体の 1%未満しか存在しない特殊な腫瘍であることから、今まで他の悪性腫瘍のような大規模な遺伝子解析の報告はなされていない。申請者はこのホジキンリンパ腫に対して腫瘍細胞、微小環境構成細胞をそれぞれシングルセルレベルで遺伝子学的、機能的に解析し、どのような遺伝子変異やシグナルが腫瘍周囲の免疫担当細胞に影響を与え、腫瘍形成、治療抵抗性に関与しているのか明らかにし、新たな治療標的や治療抵抗性のバイオマーカーを同定することを目的とすることとして研究を行ってきた。

腫瘍細胞に対しては、ホジキンリンパ腫患者の凍結組織を用いて、レーザーマイクロダイセクション (LMD) を使ってホジキンリンパ腫の腫瘍細胞や微小環境構成細胞を切り出し、少量の腫瘍細胞から抽出した少量 (10ng 以下) の DNA を基に、Library を作成し、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析 (Whole Exome Sequence, WES) や Deep Targeted Sequence を行う手法を確立した。Deep Targeted Sequence の解析対象遺伝子に関しては、過去の文献や、派遣先施設で他の研究者が遂行している、ホジキンリンパ腫と病態が似ていることが報告されている縦隔原発大細胞型 B 細胞性リンパ腫に関する大規模な WES の結果などを参考に 217 の遺伝子からなる Gene panel を作成した。過去にはホジキンリンパ腫の遺伝子異常と臨床情報を結び付けた報告は存在しないため、100 例前後のホジキンリンパ腫患者で網羅的な遺伝子の解析を行い、臨床情報を結び付け、治療成績や患者背景と関連のある因子を同定する予定であるが、本報告書執筆時点では、解析途中である。さらに、申請者は凍結細胞浮遊液を用いて、マルチカラーフローサイトメトリーを応用した手法を用いて、ホジキンリンパ腫の腫瘍細胞及び微小環境構成細胞をそれぞれ単離することに成功した (Figure 1)。WES では、過去のホジキンリンパ腫における WES の報告を上回る Depth である 200x 以上の Depth を得ることに成功し、MuTect、Strelka、VarScan の解析手法を用いて、3 プライム UTR 領域を含む領域に NFKB1Z、NFKB1A、DUSP2 をはじめとする 190 の SNV (NON SYNONYMOUS, FLAME SHIFT など) を同定することに成功している。またコピーナンバーの異常に関しても FAS、P53 の Pathway に関連する領域を含む複数の領域で異常を確認することができた。今後、この技術を用いて、複数例の腫瘍細胞や微小環境構成細胞の単細胞レベルで RNA シーケンシス解析や WGS を施行する予定であるが、本報告書執筆時点では、一部の技術的な困難を克服できておらず、まだ解析の途上段階にある。しかし、Figure 1c に示すように単細胞からコピーナンバー異常を同定することには成功している。

次に、ホジキンリンパ腫の腫瘍微小環境 (tumor microenvironment, TME) 構成細胞を対象とした研究としては、TMEを単細胞レベルで解析し、HLの腫瘍細胞の免疫回機構や治療抵抗性に関わるTMEの詳細な表現系、機能を明らかにすることを目的に、シングルセルRNAシーケンシス (scRNA-seq) を用いて研究を行った。scRNA-seqを用いることで、1細胞当たり1000以上の遺伝子の発現情報を得ることが可能であり、過去にない詳細なレベルでTMEを評価することができる。ホジキンリンパ腫と反応性リンパ節 (RLN) の検体を用いてT細胞、B細胞、マクロファージなどの各細胞の遺伝子発現の発現を単細胞レベルで確認、解析することに成功した。本報告書執筆時点では、まだ学会発表や論文の

形での公表ができていないため、詳細を伏せた形の報告にさせていただくが、反応性リンパ節検体と比較して、ホジキンリンパ腫検体で、ある特定のT細胞が増えていることを確認し (Figure2)、その細胞の詳細なcharacterizationを行い、そのT細胞で遺伝子発現が顕著な遺伝子Xを同定するとともに、単細胞レベルでの遺伝子発現パターンを明らかにした。さらにIn Vitroで、ホジキンリンパ腫の細胞株の培養上清とナイーブT細胞の共培養を行うことで同様の細胞が誘導できることを確認するとともに (Figure3)、Luminex Assayを用いてホジキンリンパ腫の細胞株の細胞上清で増加しているサイトカイン・ケモカインのスクリーニングを行った。それにより、同細胞の誘導に重要な役割を果たしていると考えられるサイトカインYなどがホジキンリンパ腫の細胞株の培養上清に他の悪性リンパ腫細胞株の上清やMediumと比較して多く含まれていることがわかった。また、同細胞と腫瘍細胞の空間的な関係を明らかにするために、同じコホートを用いて、Deeley Research Centre (Victoria, Canada) のBrad H. Nelsonらのグループとの共同研究でMulticolor immunohistochemistry (IHC) を用いた解析を行い、さらに、Cedars-Sinai Medical Center (Los Angeles, USA) のAkil MerchantらのGroupとの共同研究でImaging Mass Cytometry (IMC) を用いた解析を行った (Figure4)。特にIMCは、40以上のタンパク質マーカーの発現を組織切片上で空間的情報とともに単細胞レベルで明らかにすることのできる技術であり、scRNAseqの結果のValidationや同定したHL特異的なTMEと腫瘍細胞との相互作用を明らかにするのに極めて有用である。その結果、同細胞と腫瘍の特殊な位置関係に加え、ある特定の因子を持っているホジキンリンパ腫患者で特に多く、同T細胞が増加していることがわかった。さらに、その特定の因子を持っているホジキンリンパ腫患者では、他の特徴的なT細胞サブセットが減少していることも明らかになった。さらに、独立したコホートを用いて、上記のFindingsのValidationを行うことに成功した。また、同T細胞の増加している患者では、患者のDisease specific survival (DSS) やOverall survival (OS) が悪い傾向にあることや、多変量解析で、同T細胞の増加がDSSに対する独立した予後不良因子になることも明らかになった。特筆すべきこととして、同T細胞はすでに免疫チェックポイント阻害薬のターゲットとして治験が開始されている遺伝子Xの発現が亢進しており、治療標的としての可能性や、同薬剤の奏効のバイオマーカーとして発展していくことのできる可能性がある。この点に関しては、実際に薬剤を用いた実験を予定しており、今後検討を重ねていく予定である。

上記と並行して In vivo における薬剤の評価を可能とするために、悪性リンパ腫の異種移植マウスモデルの作製を行っている。具体的には、申請者は、マウス由来のリンパ腫細胞 (A20、VavP/BCL2) を用いて、ホジキンリンパ腫において腫瘍の腫瘍免疫からの回避に重要であることが報告されている *B2M* (MHC Class I の発現に関与) や *CIITA* (MHC Class II の発現に関与) を CRISPR の技術を用いてノックアウトした細胞を作成することを行っている。ノックアウト細胞の作成に成功したものもあるが、*in vivo* における表現系が想定したものと異なっており、引き続き検討を重ねている。

このように、計画通り実験が進んでいるもの、想定より時間のかかっているものがあるが、本研究は、ホジキンリンパ腫の腫瘍、およびTMEを遺伝学的、機能的に総合的に単細胞レベルで解析する世界で初めての研究であり、引き続き計画を継続することによりホジキンリンパ腫の腫瘍形成、治療抵抗性、免疫回避気候と関連する腫瘍・TMEの相互作用の詳細なメカニズムが明らかにし、得られた知見が診断やバイオマーカー、

新たな免疫チェックポイント阻害剤などの治療標的となり、患者の治癒率の向上、副作用の少ない治療の開発につながると考えている。

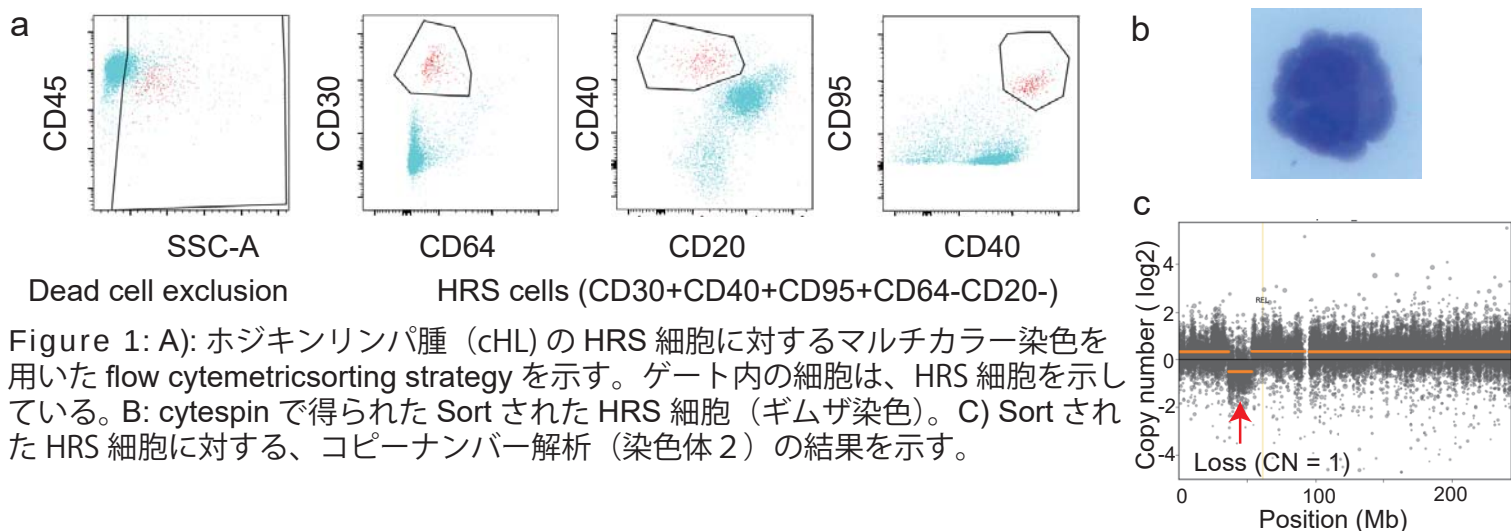


Figure 1: A): ホジキンリンパ腫 (cHL) の HRS 細胞に対するマルチカラー染色を用いた flow cytometric sorting strategy を示す。ゲート内の細胞は、HRS 細胞を示している。B): cytespin で得られた Sort された HRS 細胞 (ギムザ染色)。C) Sort された HRS 細胞に対する、コピーナンバー解析 (染色体 2) の結果を示す。

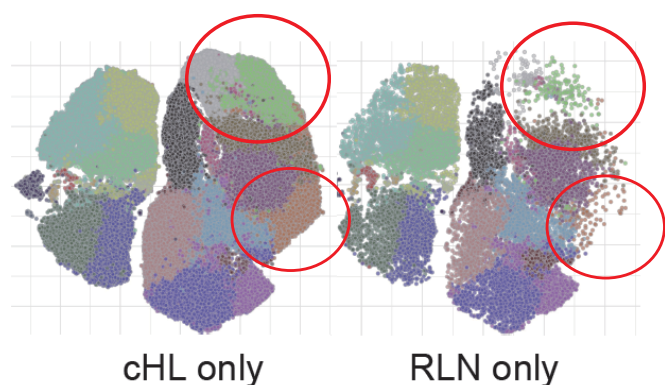


Figure 2: ホジキンリンパ腫、反応性リンパ節の single-cell RNAseq データを用いたクラスタリング解析の結果 (tSNE) を示す。それぞれのドットは一つの細胞を示している。円内のクラスタは、cHL 特有のクラスタである

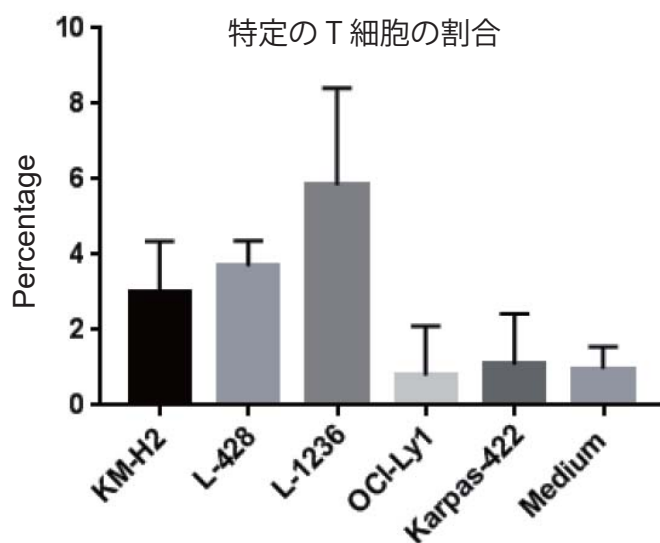


Figure 3. ナイーブ T 細胞を細胞株の培養上清と共培養した後の特定の T 細胞サブセットの割合を示す。cHL の培養上清との培養で有意に特定の T 細胞が増加している。

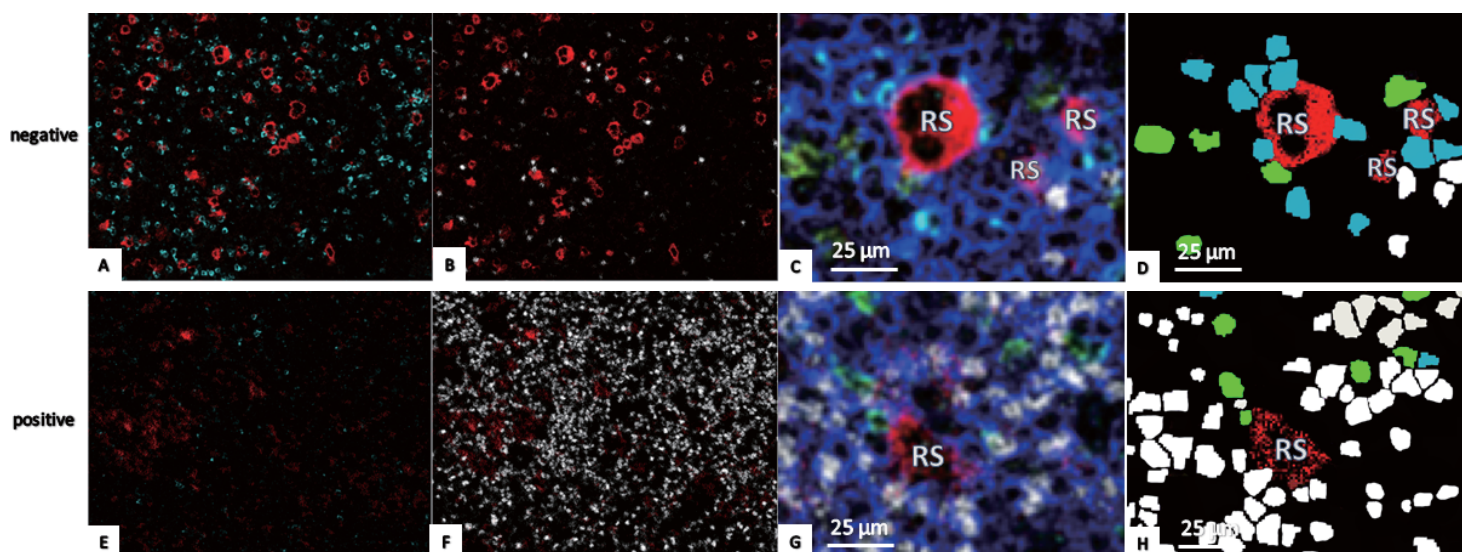


Figure 4: Imaging Mass cytometry を用いたホジキンリンパ腫の染色像を示す (上; ある因子が陰性の患者、下; ある因子が陽性の患者)。赤は腫瘍細胞を示す。A,B,E,F はそれぞれある 2 つのマーカーを示す 2 色の画像、C,G はある 5 つのマーカーを示す 5 色の画像、D,H は Multiplex Image を示す。陰性症例では水色で示す細胞が増加しているのに対し、陽性症例で白色の細胞が増加している。