HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CRISPR/Cas9 screeningによって同定されたATLLの新規治療分子標的［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	石尾, 崇
Description	配架番号：2643
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14706号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83100
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Ishio_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　石尾　崇

学 位 論 文 題 名

CRISPR/Cas9 screening によって同定された ATLL の新規治療分子標的

(Genome-wide CRISPR/Cas9 screen identifies novel therapeutic targets in ATLL)

【背景と目的】成人 T 細胞性白血病/リンパ腫(Adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL)は human T-cell lymphotropic virus type I(HTLV-1)感染者の一部に発症する悪性リンパ腫で、既存の化学療法に対する奏功が乏しい予後不良の疾患である。それ故に、ATLL の増殖および生存に関与する必須遺伝子を標的とした新規治療方法の開発が喫緊の課題である。これまで次世代シークエンスによりゲノム異常を網羅的に解析した結果、ATLL の病態に寄与する様々な遺伝子変異やシグナル伝達経路が同定され、ATLL の発症機構の理解に極めて重要な情報が提供されている。しかしながら、変異を伴う遺伝子が治療標的になりうるかは別の問題として考えなければならない。治療標的を同定する観点において、腫瘍の増殖や生存に関わる機能的なタンパク質を遺伝子の変異の有無により取捨選択することなく網羅的に解析する必要がある。我々のグループでは以前 ATLL に対して免疫細胞に関連する 1051 の遺伝子を変異の有無に関わらず標的としてノックダウンする short hairpin RNA (shRNA)ライブラリーを用いた機能スクリーニングを施行し、ATLL の増殖および生存に必須の遺伝子を網羅的に検索した。その結果、免疫関連転写因子複合体の BATF3/IRF4 が ATLL の増殖と生存に必須であることを明らかにした。この shRNA スクリーニングにより様々な疾患に対して治療分子標的が同定されているが、より多くの遺伝子を対象とするには別のアプローチが必要である。この課題に取り組むため、我々は一度に約 20000 遺伝子を網羅的に機能解析することが可能な新規ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 を ATLL 細胞株に用いて遺伝子を網羅的にノックアウトさせ、細胞毒性に寄与する遺伝子を同定するためにゲノムワイドな機能的スクリーニングを施行した。

【材料と方法】ATLL の細胞株と対照群の MCL の細胞株を Brunello CRISPR knockout pooled library を用いて 19,114 種類の遺伝子群の sgRNA を導入した。導入された細胞はピューロマイシン耐性を獲得するため、ピューロマイシンを投与してセレクションをした。4 週間継代培養した後にゲノム DNA を抽出し、次世代シークエンサーで検出できるようにゲノム DNA 上の sgRNA 配列を増幅した。PCR 後の検体はサイズセレクションを行い、シークエンス解析を施行した。各々の sgRNA 数を計測し、MAGeCK algorithm に従い day28 の検体と day0 の検体との比を log2 換算した。

【結果】上記スクリーニングにより CDK6、CCND2、JUNB、STAT3 および IL10RB が ATLL の増

殖と生存に必須の遺伝子であることを明らかにした。このうち現時点で臨床応用されている薬剤の標的遺伝子は細胞周期機構に関わるCDK6 (Cyclin dependent kinase 6)のみであった。我々は乳癌に国内保険適応となっているCDK4/6阻害薬(パルボシクリブ)がATLL細胞株の細胞周期進行を抑制し、アポトーシスを伴う細胞毒性を有することを証明した。多くのATLL細胞株でパルボシクリブの有効性を認めたが、TP53異常を伴う細胞株では相対的に抵抗性であることが判明した。このメカニズムを克服する治療法を開発するために、我々はゲノムワイドCRISPRスクリーニングのデータをATLLのみに絞り、細胞全般に必須の遺伝子である core fitness geneを含めたATLLに必須の遺伝子シグナルを検索した。その結果、ATLLではmTORC1経路が必須であることが判明した。さらに、ATLLではTP53異常によるmTORC1経路の活性化が起こることが判明したため、我々はATLL細胞株に対してパルボシクリブとmTORC1阻害薬(エベロリムス)を併用投与した。その結果、Rbタンパクのリン酸化を著明に抑制することで TP53 異常の有無に関わらず相乗効果を認めることを証明した。我々はATLL患者検体からの細胞に対する併用投与の有用性を示し、さらにATLL xenograftマウスモデルに対しても併用投与で合併症の増加なく腫瘍量が有意に縮小することを確認した。

【考察】本実験ではゲノムワイドのCRISPR/Cas9ライブラリースクリーニングを用いてATLLに特異的な必須遺伝子を同定した。ATLL患者では生体内のCDK4/6を阻害するCDKN2Aの欠失を25%程度認めており、細胞周期のG1/S期チェックポイント機構の破綻がATLLの病態に関与していると考えられた。我々はCDK4/6阻害薬のパルボシクリブがATLLのRbタンパクのリン酸化を抑制してcell cycle arrestとアポトーシスを引き起こし、生存と増殖を抑制することを見出した。一方、TP53 異常を有する場合はパルボシクリブの単独投与では不十分であることも判明した。ATLL患者でTP53の変異と欠失はそれぞれ17.8%と26%に認めており、ATLLにおいてTP53はパルボシクリブ反応性の指標として有用と思われる。パルボシクリブ抵抗性の問題を克服するために、我々はmTORC1阻害薬のエベロリムスに着目した。ATLLにおいて両者の併用投与により Rb タンパクのリン酸化が著明に減少し、TP53 異常の有無に関わらず相乗効果を認めたことから、TP53 異常を有する他の悪性腫瘍に対しても併用投与による相乗効果が期待される。ATLLではTP53異常によるmTORC1経路の活性化が起こることが判明し、これがパルボシクリブに抵抗性をもたらす可能性が示唆された。

【結論】我々はゲノムワイドのCRISPR/Cas9ライブラリースクリーニングを用いて遺伝子に変異の見られないCDK6がATLLに特異的な必須遺伝子であることを同定し、かつ、CDK4/6阻害薬のパルボシクリブを用いることで治療標的となりうることを見出した。また、パルボシクリブとmTORC1阻害薬のエベロリムスの併用投与は有望な相乗的治療効果を示しており、TP53異常を有するATLL細胞に対しても極めて効率的にその増殖生存を阻害することが示された。本研究の結果はATLLのみならず他の悪性腫瘍にも波及効果が期待でき、臨床応用への展開が期待される。