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［全文の要約］
Author(s)	石尾, 崇
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2643 他
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/2115/83102
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Ishio_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文（要約）

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）

2021 年 9 月

北　海　道　大　学

石　尾　崇

学位論文

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)

2021 年 9 月

北　海　道　大　学

石　尾　崇

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・ 1 頁

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 頁

方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10 頁

結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・19 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁

総括と結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・42 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・44 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・45 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

著者：Takashi Ishio, Sarvesh Kumar, Joji Shimono, Yuquan Lin, Michael N. Petrus, Emmanuel Bachy, Da Wei Huang, Yandan Yang, Patrick L. Green, Hiroo Hasegawa, Michiyuki Maeda, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Takashi Yokota, Yibin Yang, Satoshi Hashino, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Louis M. Staudt, Masao Nakagawa

タイトル：Genome-wide CRISPR screen identifies CDK6 as a therapeutic target in Adult T-cell leukemia/lymphoma

学術雑誌名：blood

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. Takashi Ishio, Sarvesh Kumar, Joji Shimono, Yuquan Lin, Michael N. Petrus, Emmanuel Bachy, Yandan Yang, Michiyuki Maeda, Hideki Goto, Yibin Yang, Satoshi Hashino, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Louis M. Staudt, Masao Nakagawa

Genome-wide CRISPR Library Screening Identifies CDK6 As Genetic Vulnerability in Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma

61st ASH Annual Meeting, 2019 年 12 月 9 日, 米国・オーランド

2. Takashi Ishio, Sarvesh Kumar, Joji Shimono, Yuquan Lin, Michael N. Petrus, Emmanuel Bachy, Yandan Yang, Michiyuki Maeda, Hideki Goto, Yibin Yang, Satoshi Hashino, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Louis M. Staudt, Masao Nakagawa

GENOME-WIDE CRISPR LIBRARY SCREENING IDENTIFIES GENETIC VULNERABILITIES AND THERAPEUTIC TARGETS IN ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA

25th Congress of EHA, 2020 年 6 月 11 日，ドイツ・フランクフルト

3. Takashi Ishio, Sarvesh Kumar, Joji Shimono, Yuquan Lin, Michael N. Petrus, Emmanuel Bachy, Yandan Yang, Michiyuki Maeda, Hideki Goto, Yibin Yang, Satoshi Hashino, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Louis M. Staudt, Masao Nakagawa

Genome-wide CRISPR screen identifies CDK6 and mTORC1 as a combinational therapeutic target in ATLL

The 82nd Annual Meeting of JSH, 2020 年 10 月 10 日，日本・京都

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

ALCL	anaplastic large cell lymphoma
ALK	anaplastic lymphoma kinase
AP-1	activator protein 1
ASO	antisense oligonucleotide
ATLL	adult T-cell leukemia/ lymphoma
bZIP	basic leucine zipper domain
Cas9	CRISPR associated protein 9
CCND	cyclin D
CDK	cyclin-dependent kinase
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
GFP	Green Fluorescent Protein
HBZ	HTLV-1 bZIP factor
HTLV-1	human T-cell lymphotropic virus type 1
IC50	50 percent inhibitory concentration
JAK	janus kinase
NFkB	nuclear factor-kappa B
MCL	mantle cell lymphoma
mTORC1	mammallian target of rapamycin complex 1
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl) -2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NSG	NOD scid gamma
OCR	oxygen consumption rate
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PROTAC	proteolysis targeting chimera
PTCL-NOS	peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
Rb	Retinoblastoma
sgRNA	single guide ribonucleic acid
shRNA	short hairpin ribonucleic acid
STAT	signal transducers and activator of transcription
TCR	T cell receptor
TSC2	tuberous sclerosis complex 2

緒言

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く長期生存が 2 割を下回る極めて予後不良の疾患である(Ishitsuka and Tamura, 2014; Katsuya et al., 2015; Matsuoka and Jeang, 2007; Tsukasaki and Tobinai, 2014; Utsunomiya et al., 2015)。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解析によりゲノム異常が網羅的に解析され、CCR4 遺伝子の機能亢進型変異など 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(Kataoka et al., 2015; Nakagawa et al., 2014)。これらの報告により ATLL が遺伝子またはエピジェネティックにヘテロな集団であることが分かり、今後は個別の治療が提供される可能性がある。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。HTLV-1 の Tax 遺伝子のように、ATLL の形成に重要ではあるが維持には不要となる遺伝子の可能性がある。さらに、遺伝子に変異は持たないが、発現量の変化などにより腫瘍の維持に極めて重要な役割を担うタンパク質も存在する。すなわち、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。

上述の通り、治療標的となりうる機能的に重要な遺伝子は十分に解明されていない。この問題を解決するためには、機能的な遺伝子スクリーニングを行う必要がある。我々のグループでは ATLL に対して免疫細胞に関連する 1051 の遺伝子を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(Nakagawa et al., 2018)。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、ノックダウンが不十分な場合や shRNA 自体による off-target 効果が生じることがあり、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った(Boutros and Ahringer, 2008; Gu et al., 2012; Luo et al., 2009; Ngo et al., 2006; Moffat et al., 2006; Schlabach et al., 2008; Silva et al., 2008; Zuber et al., 2011)。この課題に取り組むため、我々は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。CRISPR/Cas9 システムは高効率かつ高い特異性で標的遺伝子をノックアウトするゲノム編集技術である(Cho et al., 2013; Cong et al., 2013; Evers et al., 2016; Koike-Yusa et al., 2014; Korkmaz et al., 2016; Mali et al., 2013; Shalem et al., 2014; Wang et al., 2014; Zhou et al., 2014)。このシステムによりゲノムワイドな機能的スクリーニングが可能となり、これまでに様々な悪性腫瘍で必須遺伝子が同定されている(Behan et al., 2019; Chen et al., 2015; Munoz et al., 2016; Parnas et al., 2015; Shi et al., 2015)。この技術を応用した本スクリーニングでは、一度に約 20000 遺伝子を網羅的に機能解析することが可能であった。我々はマントル細胞リンパ腫と比較した結果から BATF3 の他に新たに 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同定した。このうち現時点で臨床応用が可能な薬剤の標的遺伝子は細胞周期機構に関わる CDK6 (Cyclin dependent kinase 6)のみであり、この遺伝子に着目して研究を進めた。

CDK6 は Cyclin D と複合体を形成するセリン/スレオニンキナーゼである(Asghar et al., 2015; Malumbres and Barbacid, 2009; Meyerson and Harlow, 1994; Musgrove et al., 2011; Otto and Sicinski, 2017; Sherr et al., 2016)。我々はこのゲノムワイド CRISPR/Cas9 スクリーニングから、細胞周期の G1-S 期移行に関わるチェックポイント分子複合体である CDK6 と Cyclin D2 を阻害することで ATLL 細胞増殖を極めて効率的に抑制できることを発見した。その後の解析から ATLL では他のリンパ系腫瘍と比較して mRNA およびタンパク質レベルで CDK6 を高発現することも明らかにし、CDK6/Cyclin D2 複合体が ATLL の有望な治療標的であることを裏付けていると考えた。

我々は再発難治性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)を ATLL 細胞株に用いた結果(Turner et al., 2015)、ATLL 細胞株では細胞周期の進行が抑制され、アポトーシスを伴う細胞毒性が生じることを示した。多くの細胞株でパルボシクリブの有効性を確認できたが、TP53 異常を伴う細胞株では CDK4/6 阻害薬パルボシクリブに対して抵抗性を有していることが判明した。この反応性の違いを機能ゲノミクスの観点から解析するため、我々は TP53 野生型の ATLL 細胞株に対して CRISPR/Cas9 を用いて TP53 をノックアウトした。その結果、TP53 ノックアウトによりパルボシクリブ抵抗性が獲得されることを証明し、TP53 異常が ATLL 細胞のパルボシクリブ抵抗性獲得の主要因であることを証明した。約 30%の ATLL 患者に TP53 異常を認めるため(Kataoka et al., 2015; Kataoka et al., 2018)、TP53 異常によるパルボシクリブ抵抗性は臨床的に重要な問題となると考えている。さらなる分子生物学的解析から、TP53 異常を伴う ATLL 細胞株ではパルボシクリブを用いて CDK6 を阻害しても CDK2 の代償作用により G1/S 期細胞周期移行阻害からエスケープし

てしまうことも明らかにした。CDK2 を特異的に阻害する薬剤は現状では存在しないため、パルボシクリブ抵抗性の TP53 異常を有する ATLL 症例には別の薬剤によるアプローチが必要である。TP53 異常を有する ATLL 細胞株に対するパルボシクリブ抵抗性を克服するために、我々は変異型 p53 タンパクを再活性化させる APR-246 に着目した(Bykov et al., 2002; Lambert et al., 2009; Lehmann et al., 2012)。パルボシクリブと APR-246 を併用投与した結果、TP53 変異型細胞株ではパルボシクリブ抵抗性を克服することが出来たが、TP53 欠失型細胞株では抵抗性を克服することが出来なかった。従って、パルボシクリブと APR-246 の併用投与は TP53 変異を伴う ATLL のみに有用であることが示唆された。

TP53 異常によるパルボシクリブへの抵抗性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 ATLL における G1/S 期移行阻害に対して有効な薬剤の組合せを検索し、これらがどのような分子メカニズムを基盤にして細胞周期制御に関わるのかをゲノムワイド 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(Blomen et al., 2015; Hart et al., 2015; Wang et al., 2015)。その結果、ATLL では mTORC1 経路が必須であることが判明した。そこで、我々は臨床応用を目的として 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。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。また、ATLL 患者検体からの細胞においてもパルボシクリブ単独投与によって濃度依存的に細胞毒性を認め、エベロリムスを併用投与することで細胞毒性が増強されることが示された。さらに、ATLL xenograft マウスモデルに対してパルボシクリブとエベロリムスを併用投与することで単独投与と比較して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。以上より、我々は CDK6 が ATLL に特異的な治療標的であり、TP53 野生型ではパルボシクリブ単独投与が、TP53 異常型ではパルボシクリブとエベロリムスの併用投与が臨床応用となりうることを証明した。

機能ゲノミクスは大規模な遺伝子変異・発現解析、さらには遺伝子機能解析を加えた網羅的な情報を統合的に解析し、重要な治療分子標的を同定する研究分野である。本研究はゲノムワイド CRISPR/Cas9 機能的ノックアウトスクリーニング法という先進技術から見出した CDK6 に基づく独創的研究である。我々は機能スクリーニングにより遺伝子に変異の見られない CDK6 を同定し、これが ATLL の増殖および生存において極めて重要な役割を担っており、かつ、治療標的となりうることを見出した。また、CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブと 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を突き止めた。パルボシクリブは臨床での安全性情報は豊富であり、本研究は飛躍的に発展する可能性を秘めている。また、本研究の結果は ATLL のみならず、乳癌を含めた他の悪性腫瘍にも波及効果が期待でき、臨床応用への展開に直結すると思われる。

実験方法

1. 倫理・コンプライアンス

成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATLL)患者検体を用いた検討においては、ヘルシンキ宣言に準じた同意のもとで採取された検体を使用した。この検討は、北海道大学大学院医学研究院およびアメリカ国立衛生研究所の機関審査委員会の承認を得ている。マウスを用いた検討においては、国立がん研究所の動物管理使用委員会の承認を得ており、同委員会のガイドラインに従って施行した。

2. 細胞培養

ATLL 細胞株の ED40515(-)、ED41214C(-)、 ATL43Tb(-)、ATL55T(+)は京都大学ウイルス研究所の前田道之先生に、ST1、 KOB、 KK1 は長崎大学大学院の山田恭暉先生に、Su9T01 と S1T は鹿児島大学大学院の有馬直道先生に、TL-Om1 は東北大学大学院の菅村和夫先生にそれぞれ提供いただいた。マントル細胞リンパ腫(MCL)細胞株の Jeko1、UPN1 はアメリカ国立衛生研究所の Louis. M. Staudt 先生に提供いただいた。

これらの造血器悪性腫瘍細胞株は 10%ウシ胎児血清(NICHIREI BIOSCIENCES, Tokyo, Japan)と 1%ペニシリン・ストレプトマイシン(nacalai tesque, Kyoto, Japan)を添加したロズウェルパーク記念研究所培地 1640（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を用い、37℃、5%CO_2 下で培養した。IL-2 依存の細胞株である ATL55T(+)、KOB、KK1、TL-Om1 にはヒトリコンビナント IL-2(100IU/ml, Hoffmann-La Roche)を追加して培養した。マイコプラズマの混入に対しては Mycoplasma Removal Agent を用いて除去した。すべての細胞株で DNA コピー数多型(copy number variant; CNV)が異なることを L.Bergsagel による CNV fingerprint(未報告)を用いて確認した。さらに、これらの造血器悪性腫瘍細胞株に単鎖ガイド RNA(single guide RNA; sgRNA)ベクターとレトロウイルス発現ベクターを導入するために同種指向性レトロウイルスレセプター遺伝子、TET 抑制遺伝子、ブラストサイジン抵抗性遺伝子を導入した。また、Cas9 介在の遺伝子を不活化するために、KK1、ST1、Su9T01、ED40515(-)、TL-Om1 に対して lenti-Cas9-Blast ベクターまたは pTO-Cas9-hygro ベクターを用いてヒトのコドンに適した S.pyogenes Cas9 を発現するよう改変した。lenti-Cas9-Blast ベクターはマサチューセッツ工科大学の張鋒先生が作成したもので、Addgene から購入した(# 52962)。pTO-Cas9-hygro ベクターは Louis. M. Staudt 研究室で lentiCRISPR v2（Addgene # 52961）から制限酵素で S.pyogenes Cas を切り出し、pRCMV/TO-hygro vector にクローニングされたものを用いた。トランスフェクションに用いた

Human embryonic kidney 293 T (293T) 細胞は 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）を用い、37℃、5%CO_2 下で培養した。

3. 試薬および抗体

CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブは AdooQ BioScience より購入した。p53 活性剤の APR-246 と mTORC1 阻害薬のエベロリムスはセレックバイオテック株式会社から購入した。各々の薬剤はジメチルスルオキシドにて溶解し-20℃で保存した。

リン酸化 Rb 抗体(D59B7, 8180)、Rb 抗体(4H1, 9309)、Cyclin D1 抗体(92G2, 2978)、Cyclin D2 抗体(D52F9, 3741)、Cyclin D3 抗体(DCS22, 2936)、CDK4 抗体(DCS35, 1917)、CDK6 抗体(D4S8S, 13331)、リン酸化 S6 抗体(2211)、S6 抗体(54D2, 2317)、リン酸化 4EBP1 抗体(9451)、4EBP1 抗体(53H11, 9644)、mTOR 抗体(2972)は Cell Signaling Technology から購入した。Actin 抗体(AC-15, sc69879)、GAPDH 抗体(V-18, sc20357)は Santa Cruz Biotechnology から購入した。p53 抗体(DO-7)は BioLegend から購入した。CDK2 抗体(A18000)は ABclonal から購入した。

4. ゲノムワイド CRISPR ライブラリースクリーニング

ATLL の細胞株(ST1、KK1、Su9T01)と対照群の MCL の細胞株(Jeko1、UPN1)を Brunello CRISPR knockout pooled library (David Root 先生、John Doench 先生からご提供; Addgene #73178)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、4 日間ピューロマイシン(2μg/ml)を投与してセレクションをした後に一部の検体を day0 用として凍結保存した。残りの検体は 4 週間継代培養した後に(day28 用)、解凍した day0 用の検体とともに QIAamp DNA blood Maxi kit (QIAGEN)を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出されたゲノム DNA は次世代シークエンサー(Illumina's NEXTSeq500)で検出できるように indexed PCR プライマーと NEBNext High-Fidelity 2x PCR Master Mix (NEB)を用いてゲノム DNA 上の sgRNA 配列を増幅した(プライマーの配列は以下に記載)。PCR 後の検体は E-Gel(Invitrogen)を用いてサイズセレクションを行い Qubit(Thermo Fisher Scientific)で定量した後に、NEXTSeq500 (Illumina)でシークエンス解析を施行した。シークエンスされた DNA ライブラリーのクラスターは Illumina TrueSeq HT kit を用いて各々に振り分けた(de-multiplex)。各々の sgRNA 数を計測し、MAGeCK algorithm (https://sourceforge.net/p/mageck/wiki/Home/)に従い day28 の検体と day0 の

検体との比を log2 換算した(Li et al., 2014)。

i5 indexed PCR primer:
D501,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTT
CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGCATGCTCTTGTGGAAAGGACGA
AACACCG
D502,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTT
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCATGCAGTCTTGTGGAAAGGAC
GAAACACCG
D503,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCTACACTCTTT
CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCATGCATCGTCTTGTGGAAAGGAC
GAAACACCG
D504,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTT
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCATGCATGACGTCTTGTGGAAAGG
ACGAAACACCG
D505,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACACTCTT
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTACGTATACATCTTGTGGAAAG
GACGAAACACCG
D506,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTAACACTCTTT
CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGTACGTGTATATCTTGTGGAAAG
GACGAAACACCG
D507,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACACTCTT
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGTACGCGTGTATCTTGTGGAA
AGGACGAAACACCG
D508,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTACTGACACACTCTT
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTACGTACACCCGTATCTTGTGGA
AAGGACGAAACACCG
i7 indexed PCR primer:
D701,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D702,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D703,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D704,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGGAATCTCGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt

D705,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCTGAATGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D706,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D707,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D708,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGCATTAGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D709,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCATAGCCGGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D710,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTTCGCGGAGTGACTGGAGTT
CAGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D711,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGCGCGAGAGTGACTGGAGTT
CAGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt
D712,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCTATCGCTGTGACTGGAGTTC
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt

5. sgRNA を用いたノックアウト実験

10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地で 12 well plate の各 well に 300x10^4 個の 293T 細胞を培養した。24 時間後にメディウムを optimem で置換し、37℃、30min 以上で incubate した。PAX2 packaging plasmid (addgene #12260) 0.75μg と MD2.G packaging plasmid (addgene #12259) 0.25μg を添加した optimem(100μl)に特定の sgRNA plasmid を 200ng 加えた。vortex した後、lipofectamin2000 (1.7μl)を添加した optimem (100μl)を追加し、RT、30 分間 incubate した。作成した溶液を optimem で置換された 293T 細胞に各 200μl ずつ添加し、37℃、5%CO_2、overnight で incubate した。翌日にメディウムを 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地に置換し、37℃、5%CO_2、24 時間で incubate した後、上清(virus)を採取した。virus は vortex した後に 96 well plate に撒いた細胞株に polybrane(最終濃度 5μg/ml)とともに添加した。2500rpm, 16℃, 90min で遠心した後、37℃、5%CO_2、overnight で incubate した後、予めドキシサイクリン依存性に発現する Cas9 を導入した ATLL 細胞株(ST1, KK1, Su9T01, ED40515(-), TL-Om1)と MCL 細胞株(Jeko1, UPN1)に GFP と特定の sgRNA を共発現させたピューロマイシン耐性のレンチウイルスベクター(pLenti-sgRNA-pgk-PG)を感染させた(day0)。この sgRNA が感染した細胞にドキシサ

イクリン(最終濃度 40ng/ml)を添加して Cas9 を発現させ、48 時間後(day3)を基点として GFP レポータータンパク発現をフローサイトメトリーで経時的に測定した。本実験で用いた sgRNA 標的配列を以下に記載した。

sgAAVS1	GGGGCCACTAGGGACAGGAT
sgCCND2_1	CATGACTTCATTGAGCACAT
sgCCND2_2	CAAGCATGCTCAGACCTTCA
sgCDK6_1	GCCCGCGACTTGAAGAACGG
sgCDK6_2	TGGCTCACCTGACCACGTTG
sgTP53	CCATTGTTCAATATCGTCCG
sgCDK2	AAGCAGAGAGATCTCTCGGA
sgMTOR_1	GGTGATGGCCTGGACAACCA
sgMTOR_2	TCAGGAAATGATCCGCACAG

6. レスキューアッセイ

10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地で 6 well plate の各 well に $350x10^4$ 個の 293T 細胞を培養した。24 時間後にメディウムを optimem で置換し、37℃、30min 以上で incubate した。pHIT60 packaging plasmid (2.5μg)と EA6 x3* packaging plasmid (2.5μg)を添加した optimem(750μl)に特定の sgRNA plasmid を 10μg 加えた。vortex した後、lipofectamin2000 (12.5μl)を添加した optimem (750μl)を追加し、RT、30 分間 incubate した。作成した溶液を optimem で置換された 293T 細胞に各 500μl ずつ添加し、37℃、5%CO_2、overnight で incubate した。翌日にメディウムを 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したダルベッコ変法イーグル培地に置換し、37℃、5%CO_2、24 時間で incubate した。その後、上清を回収し、retro-X concentrator を回収した上清で 3 倍希釈して 4℃、overnight で incubate した。293T からの上清は翌日も同様に concentrator を用いて回収し、4℃、overnight で incubate した。その後、1500g, 45min, 4℃で遠心し、メディウムを少量の 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したロズウェルパーク記念研究所培地 1640 に置換して virus を 40 倍程度に濃縮した。濃縮した virus は vortex した後に 96 well plate に撒いた細胞株に polybrane(最終濃度 5μg/ml)とともに添加した。2500rpm, 16℃, 90min で遠心した後、37℃、5%CO_2、overnight で incubate した後、予めドキシサイクリン依存性に発現する Cas9 を導入した ATLL の細胞株(ST1)に Cyclin D1、sgCDK2 抵抗性の Cyclin D2、Cyclin D3、Cyclin-dependent kinase(CDK)

4、sgCDK6 抵抗性の CDK6 をそれぞれコードしたピューロマイシン耐性のレトロウイルスベクター(pRCMV/TO-puro vector)を導入した。sgRNA 抵抗性の相補 DNA は標的配列にサイレント変異を持たせており、タンパク合成を改変せずに sgRNA の標的とならないように改変している。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、4 日間ピューロマイシン(2μg/ml)を投与してセレクションをした後に、GFP/ピューロマイシン耐性遺伝子のキメラ遺伝子と特定の sgRNA を共発現させることのできるレンチウイルスベクター(pLenti-sgRNA-pgk-PG)に感染させた(day0)。この sgRNA が感染した細胞にドキシサイクリン(最終濃度 40ng/ml)を添加して Cas9 を発現させ、48 時間後(day3)を基点として GFP レポータータンパク発現をフローサイトメトリーで経時的に測定した。

7. 細胞周期解析

ATLL の細胞株(ST1、Su9T01)に特定の sgRNA を導入または CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブ(1 μM)を投与した。sgRNA を導入した細胞は 37℃、5%CO_2 下で 96 時間培養した。また、パルボシクリブを投与した細胞は 37℃、5%CO_2 下で 24 時間培養した。1.0x10^6 個の細胞を 1700rpm, 5min, 4℃で遠心し、 4℃の PBS を用いて 2 回 wash した後に、PBS で希釈した 2%のパラホルムアルデヒド(Electron Microscopy Sciences)を添加し 10 分間、RT で incubate して固定した。固定された細胞は 1700rpm, 5min, 4℃で遠心し、4℃の PBS を用いて 2 回 wash した後に、 FACS buffer(4℃)で希釈した 0.0078125%のサポニン(Sigma) を添加し vortex した。4℃、12 分間 incubate して細胞膜に穴を開けた。7000rpm, 3min, 4℃で遠心し FACS buffer(4℃)で wash した後に、PBS で希釈した RAase A(500 μg/ml)を含むヨウ化プロピジウム(50 μg/ml)で染色した。DNA 成分は sub G1 期を除いて FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。

8. アポトーシス解析

ATLL の細胞株(ST1、Su9T01)に特定の sgRNA を導入または CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブ(1 μM)を投与した。5x10^5 の細胞を採取し、5000rpm, 4℃, 3min で遠心後、AnnexinＶ binding buffer を用いて 2 回 wash した後に、AnnexinＶ binding buffer で 25 倍希釈した APC Annexin V(BD Pharmingen)を添加し vortex した。室温で 15 分間 incubate した後、AnnexinＶ binding buffer で希釈したヨウ化プロピジウム(5 μg/ml)を用いて染色し、FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。

9. ウエスタンブロット

細胞は SDS 溶解バッファー（1.7% SDS、60 mM Tris-HCl, pH6.8、0.85% 2-mercaptoethanol、タンパク質分解酵素阻害薬）を加え、1ml シリンジ（SS-01T2613S, TERUMO, Tokyo, Japan）にてシアリングを行ったのち 98℃で 5 分ボイルした。検体は 4-15%アクリルアミドゲル(BIO-RAD)と 4-12%トリスグリシンゲル(Invitrogen)を用いた SDS-PAGE により分画を行った。SDS-PAGE は 150 V で電圧を固定して行った。タンク式ブロッター(BIO-RAD)にて 30V、3 時間電圧をかけ、PVDF メンブレン(Millipore, Immobilon-P)に転写した。転写した膜は分子量マーカーSee Blue®Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, LC5925)をボールペンにてマーキングして不要部分をカットした上で、Blocking buffer として milli Q 水を用いて SuperBlock® Dry Blend (TBS) Blockin Buffer (ThermoFisher scientific)を使用し、室温にて 1 時間ベリーダンサー・シェーカー（IBI Scientific, Peosta, IA）を用いて緩徐に振盪しながらインキュベートした。Blocking 後、膜を Hybri-bag (COSMO BIO, Tokyo, Japan）に入れ、旋回培養器（ROTARY CULTURE RCC-100, IWAKI, Chiba, Japan）を用いて 0.05% Tween-PBS で希釈した一次抗体と 4℃で一晩反応させた。反応後の膜を、0.05% Tween-PBS で 3 回 15 分間洗浄し、旋回培養器 (ROTARY CULTURE RCC-100, IWAKI, Chiba, Japan）を用いて 0.05% Tween-PBS で希釈した二次抗体と 4℃で 2 時間反応させた。再度 0.05% Tween-TBS で 3 回 15 分間洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England)で化学発光を行い、LAS4000mini (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England）で検出した。

一次抗体の希釈比率は、p53 抗体(DO-7)の 1:500 を除いて 1:1000 で施行した。二次抗体は Horse Radish Peroxidase 標識ウサギ抗マウス抗体（Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England）、Horse Radish Peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ抗体（Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England）を用い、それぞれ 1:2000 の希釈比率で施行した。

10. In vitro における細胞増殖の検討

96 well plate を用いて 1 well あたり 5,000 個の細胞を撒き、1 well あたりの総量が 100μl となるようパルボシクリブとエベロリムスを単独または併用で投与した。2 日後に最終濃度が同等となるようそれぞれの薬剤を 100μl 追加し、総量を 200μl とした。さらに 2 日後(初回投薬時から 4 日後)に CellTiter 96®AQueous One Solution Cell Proliferation(MTS)(Promega)を 1 well あたり 30 μl 用いて代謝活性を検討した。吸光度は Spectra Max Paradigm 96-well

plate reader (Molecular Devices)を用いて 490nm で測定した。Background は 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加したロズウェルパーク記念研究所培地 1640 を 200μl 添加した well の吸光度値とし、各検体と Background の吸光度値の差を測定した。この吸光度値と無治療の well の吸光度値との比を GraphPad Prism 7.0 を用いて非線形回帰で IC50 値を測定した。

11. Combination Index の検討

パルボシクリブとエベロリムスとの相互作用を検討するために、Combination Index(CI)を用いた(Chou, 2010; Chou and Talalay, 1984)。CI は Chou-Talalay 先生のアルゴリズムに従い Compusyn(Combosyn Inc, Paramus, NJ)を用いて計算した。以下にそのアルゴリズムを記載する。

$CI = [D]_1/[Dx]_1 + [D]_2/[Dx]_2$

$[D]_1$ と $[D]_2$ はそれぞれの薬剤を併用で投与した際に特定の阻害効果(fractional affect)を得る各薬剤(薬剤 1 と薬剤 2)の濃度を示す。一方、$[Dx]_1$ と $[Dx]_2$ はそれぞれの薬剤を単独で投与した際に特定の fractional affect を得る各薬剤(薬剤 1 と薬剤 2)の濃度を示す。

CI が 1 未満の場合に相乗効果、1 に等しい場合に相加効果、1 より大きい場合に拮抗効果と判定する。

12. ミトコンドリアの酸素消費速度(oxygen consumption rate; OCR)評価

成人 T 細胞白血病/リンパ腫の細胞株(ST1、Su9T01)にパルボシクリブ(1 μM)を投与した。37℃、5%CO_2 下で 48 時間培養した後に、メディウムをフェノールが除かれ 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic 酸(最終濃度 1mM)が添加されたロズウェルパーク記念研究所培地(Seahorse Bioscience)にブドウ糖(最終濃度 11mM)をさらに加えたメディウムに置換した。予め Cell Tak(Corning)でコーティングした XFp polystyrene cell culture plate (Seahorse Bioscience)に 1 well あたり 50,000 個の細胞を撒き、well の下面に細胞を付着させた。検体は 37℃、0.04%CO_2 下で 15 分培養した後に、XFp Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience)を用いて OCR を測定した。測定中にミトコンドリア複合体 V 阻害薬のオリゴマイシン(最終濃度 4.5 μM)、脱共役剤の Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone(ST1 は最終濃度 1.0 μM、Su9T01 は最終濃度 0.5 μM)、ミトコンドリア複合体 I 阻害薬のロテノンおよびミトコンドリア複合体 III 阻害薬のアンチマイシン A(いずれも最終濃度 0.5 μM)を添加し、

ATP 依存呼吸能、予備呼吸能、基礎呼吸能をそれぞれ測定した。

13. Primary ATLL cell

慢性型 ATLL 患者(Lymphoid Malignancies Branch, National Cancer Institute)の末梢血から Ficoll-Hypaque を用いて単核細胞を分離した。96 well plate を用いて 1 well あたり 10^5 個の単核細胞を撒き、パルボシクリブとエベロリムスを単独または併用で投与した。投与した細胞は 37℃、5%CO_2 下で 6 日間培養した後に 1 mCi の 3H-thymidine を 6 時間暴露させ、MicroBeta2 plate counter (Perkin Elmer)を用いて細胞数を測定した。

14. Xenograft

雌の NSG マウス(NOD scid gamma, NOD.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Wjl/SzJ)は Jackson 研究所から購入した。10^7 個の成人 T 細胞白血病/リンパ腫の細胞株(ATL43Tb(-))を NSG マウスの右側腹部に皮下注射し、腫瘍径が 50mm^3 に到達した段階で各 6 匹のマウスをコントロール群、パルボシクリブ(12.5mg/kg)単独投与群、エベロリムス(2.5mg/kg)単独投与群、パルボシクリブ(12.5mg/kg)・エベロリムス(2.5mg/kg)併用群の 4 群に分けた。各薬剤は腹腔内に週 3 日の間隔で投与した。腫瘍径はキャリパーを用いて測定し、各群の平均腫瘍径±標準誤差を計算した。発光イメージングによる腫瘍量の定量は 3mg の D-ルシフェリンをマウスの腹腔内に投与した後に Xenogen IVIS imaging system (Caliper Life Science)を用いて測定し、発光シグナルを Living Image version 4.1 で解析した。

15. Data Availability

T 細胞性リンパ腫患者検体のマイクロアレイのデータは GSE94732. GSE6338, GSE14879, GSE19069 を用いた。

16. 統計解析

2 群の値の比較には、Mann-Whiteny U 検定を用いて統計学的に解析し、P 値 < 0.05 を有意とした。これらの統計学的解析は EZR(Kanda, 2013)を用いて行った。

実験結果

1. CRISPR ライブラリースクリーニングによる ATLL 必須遺伝子の同定

Cas9 を予め導入した成人 T 細胞白血病/リンパ腫細胞株(ATLL: adult T-cell leukemia/lymphoma)の ST1、KK1 および Su9T01 とマントル細胞リンパ腫細胞株(MCL: Mantle cell lymphoma)の Jeko1 と UPN1 に 19,114 種類の遺伝子を標的とした sgRNA ライブラリースクリーニングを施行した。導入された細胞はピューロマイシン耐性を獲得しており、ピューロマイシン(2μg/ml)を投与してセレクションをした。28 日継代培養した後に sgRNA を PCR で定量し、day0 との sgRNA 量との比を log2 換算した。その結果、ATLL 細胞株で 1278 種類の必須遺伝子が同定され、このうち細胞全般に必須の遺伝子である core fitness gene(964 種類)を除外した。残りの 314 種類の遺伝子の中で MCL 細胞株に必須の遺伝子(305 種類)を除外した結果、9 種類の必須遺伝子が ATLL 細胞株に特異的であることを見出した。細胞周期の G1/S 期チェックポイント機構(Cyclin dependent kinase 6 (CDK6), Cyclin D2(CCND2))、AP-1 転写因子(BATF3, JUNB)、JAK/STAT 経路(STAT3, IL10RB)、RNA 結合タンパク(SYNCRIP, ZFP36L2)が同定されたが、現時点で臨床応用されている阻害薬があるのは CDK6 のみであった。そこで、我々は CDK6 および CDK6 と複合体を形成する CCND2 に着目して実験を進めた。

2. sgRNA を用いた CDK6 および CCND2 のノックアウト

予め Cas9 を導入した ATLL 細胞株(ST1, KK1, Su9T01, ED40515(-), TL-Om1)と MCL 細胞株(Jeko1, UPN1)に sgRNA を用いて CDK6 と CCND2 をそれぞれノックアウトした。ウエスタンブロットで sgRNA によって CDK6 と CCND2 がそれぞれノックアウトされている事を確認できた。総ての ATLL 細胞株で CDK6 または CCND2 をノックアウトすることにより細胞毒性を認め、CDK6 と CCND2 がそれぞれ ATLL 細胞株に必須の遺伝子であることを示した。一方、MCL 細胞株では CDK6 と CCND2 をノックアウトしても細胞毒性は認めなかった。ウエスタンブロットの結果から、ATLL 細胞株(ST1)では CDK6 をノックアウトすることで Rb タンパクのリン酸化が減少した。

3. CDK6 および CCND2 のレスキューアッセイ

sgRNA の細胞毒性が CDK6 ノックアウトあるいは CCND2 ノックアウトに特異的であることを示すために、それぞれのタンパクを sgRNA 導入下で過剰

発現させた ATLL 細胞株(ST1)を用いて rescue assay を施行した。ウエスタンブロットで CDK6 と CDK4、CCND2 と CCND1 および CCND3 がそれぞれ過剰発現されている事を確認できた。 CDK6 および CCND2 を過剰発現させる事でノックアウトによる細胞毒性を回避し、それぞれの sgRNA が標的特異的に細胞毒性をもたらしていることを示すことができた。CDK6 をノックアウトした場合、CDK4 過剰発現による細胞毒性の回避は限定的であった。一方、CCND2 をノックアウトした場合においては CCND1 または CCND3 過剰発現により細胞毒性を回避することが判明した。これは Cyclin D がそれぞれ構造的かつ機能的に類似している既報と一致した結果である(Ciemerych et al., 2002; Cooper et al., 2006; Lam et al., 2000)。以上より、ATLL 細胞株は CDK6 に強く依存していることを示すことができた。

4. CDK6 と CCND2 の mRNA およびタンパク発現

ATLL 細胞株(ST1, KK1, Su9T01, ED40515(-), TL-Om1, ED41214C(-), KOB, ATL43Tb(-))と MCL 細胞株(Jeko1, UPN1, JVM2)にウエスタンブロットを施行した結果、ATLL 細胞株では CDK6 および CCND2 タンパクが高発現していた。また、患者検体によるマイクロアレイ解析データから ATLL と他の T 細胞性リンパ腫(ALK 陽性未分化大細胞リンパ腫(ALK+ALCL)、末梢性 T 細胞リンパ腫非特異的群(PTCL-NOS))を比較した結果、ATLL 患者の CDK6 および CCND2 は mRNA 発現量が有意に高値であった。

5. 細胞周期解析とアポトーシスの評価

予め Cas9 を導入した ATLL 細胞株(Su9T01)に対して CDK6 および CCND2 をそれぞれ sgRNA でノックアウトした結果、細胞周期が G1/S 期に入る前に停止し、アポトーシス割合が有意に上昇した。従って、CDK6 と CCND2 は ATLL 細胞株において細胞周期の G1/S 期進行を担っており、各々がアポトーシスにも関与している事が判明した。

6. パルボシクリブによる細胞毒性

ATLL 細胞株(ST1, KK1, Su9T01, ED40515(-), TL-Om1, ED41214C(-), KOB, ATL43Tb(-), MT1, ATL55T(+), S1T) 、ALK+ALCL 細胞株 (Karpass299, SR786, SUDHL1, DEL, L-82)、MCL 細胞株(Jeko1, UPN1, JVM2)に対して CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブを投与した結果、いずれの細

胞株においても濃度依存的に細胞毒性を認めた。また、ATLL 細胞株(ST1, Su9T01)ではパルボシクリブ投与により濃度依存的に Rb タンパクのリン酸化が減少した。

7. パルボシクリブによる細胞周期解析とアポトーシス評価

ATLL 細胞株(ST1)に対してパルボシクリブを投与した結果、細胞周期が G1 期で停止し、アポトーシス割合が有意に上昇した。従って、ATLL 細胞株における CDK6 の役割(細胞周期の G1/S 期進行およびアポトーシスへの関与)がパルボシクリブにより発揮されることが判明した。

8. TP53 異常によるパルボシクリブ抵抗性の獲得

パルボシクリブの投与により ATLL 細胞株で濃度依存的に細胞毒性を認めたが、一部の細胞株は相対的にパルボシクリブ抵抗性であった。ATLL 患者検体に次世代シークエンサーを用いて遺伝子変異を調べた既報では、3 割程度に TP53 異常(機能喪失型)を認めていた(Kataoka et al., 2015; Kataoka et al., 2018)。本実験で ATLL 細胞株のパルボシクリブの IC50 を解析した結果、TP53 異常型の細胞株(KK1, Su9T01, ED40515(-), TL-Om1, ATL43Tb(-), MT1, ATL55T(+))の IC50 は TP53 野生型の細胞株(ST1, ED41214C(-), KOB, S1T)と比較して高い傾向にあった(p=0.058)。

9. APR-246 によるパルボシクリブ抵抗性の克服

TP53 異常を有する ATLL 細胞株に対するパルボシクリブの感受性を高めるために、我々は APR-246(PRIMA-1 MET)を併用投与した。APR-246 は変異型 p53 タンパクを再活性化してアポトーシスを誘導する化合物で、変異型 p53 タンパクのシステイン残基に結合しその野生型コンフォメーションを回復させる活性化合物メチレンキヌクリジノンに変換されるプロドラックである(Bykov et al., 2002; Lambert et al., 2009; Lehmann et al., 2012)。様々な悪性腫瘍で臨床応用されており、造血器腫瘍の骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病では DNA メチル化阻害薬のアザシチジンと併用投与する臨床試験が行われている(Cluzeau et al., 2021; Sallman et al., 2021)。p53 タンパクを発現する TP53 変異型 ATLL 細胞株(KK1, MT1)では、パルボシクリブと APR-246 を併用投与することでパルボシクリブの感受性が回復された。一方、p53 タンパクを発現しない TP53 欠失型 ATLL 細胞株(Su9T01, ED40515(-))では、パルボシクリブ

と APR-246 の併用投与によるパルボシクリブ感受性の回復は認められなかった。従って、パルボシクリブと APR-246 の併用投与は TP53 変異型の ATLL のみに有効であることが示された。

10. TP53 ノックアウトによるパルボシクリブ抵抗性の獲得

予め Cas9 を導入した TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)に sgRNA を用いて TP53 をノックアウトした。ウエスタンブロットで sgRNA によって TP53 がノックアウトされている事を確認できた。TP53 野生型 ATLL 細胞株は TP53 をノックアウトすることでパルボシクリブ投与後の割合がノックアウトされていない細胞株と比較して相対的に上昇した。従って、ATLL は TP53 の機能を喪失することでパルボシクリブに抵抗性となることが示された。

11. TP53 ノックアウトによるパルボシクリブの細胞周期解析とアポトーシス

予め Cas9 を導入した TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)に対して sgRNA を用いて TP53 をノックアウトした上でパルボシクリブを投与した結果、TP53 がノックアウトされていない TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)と比較して細胞周期は G1/S 期に進行し、アポトーシス割合が有意に減少した。従って、TP53 は ATLL 細胞株においても細胞周期の G1/S 期進行に抑制的な役割を担っており、アポトーシスにも関与している事が判明した。

12. CDK2 ノックアウトによるパルボシクリブ抵抗性の克服(TP53 異常)

予め Cas9 を導入した TP53 異常型 ATLL 細胞株(KK1)に sgRNA を用いて CDK2 をノックアウトした。ウエスタンブロットで sgRNA によって CDK2 がノックアウトされている事を確認できた。TP53 異常型 ATLL 細胞株は CDK2 をノックアウトすることでパルボシクリブ投与後の割合がノックアウトしていない細胞株と比較して相対的に低下した。

13. CDK2 ノックアウトによるパルボシクリブ抵抗性の克服(sgTP53)

続いて、予め Cas9 を導入して sgRNA を用いて TP53 をノックアウトした TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)にさらに sgRNA を用いて CDK2 をノックアウトした。TP53 をノックアウトした TP53 野生型 ATLL 細胞株は CDK2 をノックアウトすることでパルボシクリブ投与後の割合が CDK2 をノックアウトし

ていない細胞株と比較して相対的に低下した。以上より、TP53 の機能を喪失した ATLL は CDK2 をノックアウトすることでパルボシクリブに感受性を回復させることが示された。パルボシクリブと CDK2 阻害薬を併用することで ATLL のパルボシクリブ感受性を回復させることが期待されるが、現時点では CDK2 に特異的に作用する薬剤は存在しない。

14. TP53 機能喪失による mTORC1 経路の活性化

予め Cas9 を導入した TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)に sgRNA を用いて TP53 をノックアウトした。ウエスタンブロットの結果から、ATLL では TP53 をノックアウトすることで mRNA からの翻訳やミトコンドリア活性などに関わる mTORC1 の下流に位置する S6 タンパクと 4EBP1 タンパクのリン酸化が増加していた。従って、ATLL では TP53 の機能が喪失することで mTORC1 が活性化され、異常な細胞増殖や代謝が引き起こされ腫瘍進行の一因となることが示唆された。

15. CRISPR ライブラリースクリーニングによる mTORC1 経路の同定

スクリーニングで同定された ATLL の必須遺伝子(1278 種類)の中で T 細胞性リンパ腫のシグナル経路に関わる遺伝子を解析した結果、転写因子(IRF4, BATF3, JUNB, MYC)、JAK/STAT 経路(STAT3, Tyk2, JAK1)および G1/S 期チェックポイント機構(CDK6, CCND2)に加えて、mTORC1 経路に関わる遺伝子(RPS6, EIF4E, mTOR, RPTOR, mLST8)の集積が認められた(Fiore et al., 2020)。これらの遺伝子は細胞全般に必須の遺伝子である core fitness gene であるが、TP53 機能喪失による mTORC1 経路亢進を鑑みると、ATLL ではパルボシクリブと mTORC1 阻害薬を併用することで相乗効果を生む可能性が推測された(Blomen et al., 2015; Hart et al., 2015; Wang et al., 2015)。他の悪性腫瘍で in vivo で CDK4/6 阻害薬と mTOR 阻害薬の併用による相乗効果が報告されていることもこの推測を支持する根拠となった。

16. sgRNA を用いた mTOR のノックアウト

予め Cas9 を導入した ATLL 細胞株(ST1, KK1, Su9T01, ED40515(-), TL-Om1)に sgRNA を用いて mTORC1 の中心を担う mTOR をノックアウトした。ウエスタンブロットで sgRNA によって mTOR がノックアウトされている事を確認できた。総ての ATLL 細胞株で mTOR ノックアウトにより細胞毒性

を認め、mTOR が ATLL 細胞株に必須の遺伝子であることを確認した。

17. パルボシクリブとエベロリムスの併用投与

TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)と TP53 異常型 ATLL 細胞株(KK1)に対してパルボシクリブと mTORC1 阻害薬のエベロリムスを併用した結果、各濃度で combination index が 1 未満となり相乗効果を認めた(Chou, 2010; Chou and Talalay, 1984)。さらに、予め Cas9 を導入して sgRNA を用いて TP53 をノックアウトした TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)に対してパルボシクリブとエベロリムスを併用した結果、各濃度で combination index が 1 未満となり相乗効果を認めた。以上から、ATLL 細胞株は TP53 異常の有無に関わらずパルボシクリブとエベロリムスの併用投与により相乗効果を認めることが判明した。

18. パルボシクリブとエベロリムスの併用投与による相乗効果の機序

続いて、ATLL 細胞株でパルボシクリブとエベロリムスの併用投与により相乗効果となる機序を検討した。ウエスタンブロットの結果から、TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)と TP53 異常型 ATLL 細胞株(KK1)はともにパルボシクリブとエベロリムスを併用投与することでパルボシクリブの単独投与による Rb タンパクの脱リン酸化が亢進されることが判明した。従って、パルボシクリブとエベロリムスの併用投与により TP53 異常の有無に関わらず細胞周期の進行が停止することが示された。一方、mTORC1 の下流に位置する S6 と 4EBP1 のリン酸化はエベロリムス単独投与で十分に抑制され、パルボシクリブとの併用投与においても抑制されたままであった。

19. パルボシクリブによるミトコンドリア代謝の亢進

膵癌では CDK4/6 を阻害することで mTORC1 が活性化されミトコンドリア代謝の亢進を起こすと報告されている(Franco et al., 2016)。我々は TP53 野生型 ATLL 細胞株(ST1)と TP53 異常型 ATLL 細胞株(Su9T01)に対してパルボシクリブを単独投与した結果、上記の既報と同様にミトコンドリア代謝の亢進を認めた。mTORC1 がミトコンドリアの機能を亢進するため mTORC1 阻害薬によってパルボシクリブによるミトコンドリア代謝の亢進が抑制されると考えたが(Morita et al., 2013; Morita et al., 2017)、mTORC1/2 阻害薬の AZD8055 の併用投与によるミトコンドリアの代謝亢進に対する抑制は軽度であった。

20. ATLL 患者検体を用いたパルボシクリブとエベロリムスの併用投与

ATLL に対するパルボシクリブとエベロリムスの併用投与を臨床応用に結びつけるために、我々は慢性型 ATLL 患者の末梢血から分離した単核細胞を用いて実験を施行した。細胞株の結果と同様に、患者検体からの細胞においてもパルボシクリブ単独投与で濃度依存的に細胞毒性を認め、さらにエベロリムスを併用投与することで細胞毒性が増強されることが示された。

21. ATLL xenograft マウスによるパルボシクリブとエベロリムスの併用投与

パルボシクリブとエベロリムスの併用投与による生体内の効果および安全性を調べるために、ATLL 細胞株(ATL43Tb(-))を NSG マウスに移植して xenograft を作成した。パルボシクリブまたはエベロリムスの単独投与によりコントロールと比較して腫瘍量は有意に縮小し、さらに両者の併用投与により単独投与と比較して有意に縮小を認めた。経過中にいずれの群のマウスも体重減少を含めた合併症は認められず、パルボシクリブとエベロリムスの併用投与が安全かつ有効であることが示された。

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。BATF3 と JUNB は AP-1 ファミリーに属する bZIP 転写因子でダイマーを形成して機能する。BATF3 と IRF4 は既報の通り ATLL で必須の転写因子複合体である。JUNB は成人 T 細胞白血病/リンパ腫の病態に関わる HTLV-1 bZIP factor (HBZ)とダイマーを形成し、BATF3 の発現を促進する(Basbous et al., 2003; Murphy et al., 2013)。また、STAT3 と IL10RB は IL10、IL22 および IL26 のシグナル経路に関与しており、一部の ATLL では他の悪性リンパ腫と同様に STAT3 の変異を認めると報告されている(Chapuy et al., 2018; Ennishi et al., 2019; Kataoka et al., 2015; Kucuk et al., 2015; Lacy et al., 2020; Sabat et al., 2014; Schmitz et al., 2018; Song et al., 2018; Watatani et al., 2019)。最近の報告では、HBZ が STAT3 に相互作用し、IL10/JAK/STAT3 シグナル経路を調節して HTLV-1 に感染した T 細胞の増殖を促進すると言われている。上記の既報から IRF4、BATF3、JUNB、HBZ、STAT3 および IL10 は ATLL の生存・増殖に対して協調的に機能していると推察される。現時点ではこれらの遺伝子に対して特異的に阻害する薬剤は存在せず、ATLL 患者に今後臨床応用されるよう開発が期待される。

ATLL 患者検体に次世代シークエンサーを用いて遺伝子変異を調べた既報では、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(Kataoka et al., 2015; Yamada et al., 1997)。本検討は CDK6 が ATLL の必須遺伝子であることを初めて証明した報告である。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。これまでの論文では、CDK4/6 を阻害することで代謝、オートファジー、抗腫瘍免疫反応に影響すると報告されている(Anders et al., 2011; Cretella et al., 2018; Deng et al., 2018; Goel et al., 2017; Liu et al., 2017; Vijayaraghavan et al., 2017; Wang et al., 2017; Zhang et al., 2018)。本検討ではパルボシクリブにより ATLL のミトコンドリア代謝が亢進することを証明しており、ミトコンドリア代謝が細胞毒性に寄与していると考えられる。パルボシクリブ投与により Rb タンパクがミトコンドリアに直接作用する報告があるが、今後の検討が必要である(Franco et al., 2016)。

一方、一部の ATLL 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。これまでに TP53 変異、RB1 変異、CCNE の amplification、CDK6

の amplification、生体内の CDK2 を阻害する p27KIP1 および p21CIP1 の抑制が CDK4/6 阻害薬への抵抗性に関与していると報告されている(Abbas and Dutta, 2009; Alvarez-Fernandez and Malumbres, 2020; Gong et al., 2017)。我々は ATLL がパルボシクリブに抵抗性となる原因の 1 つが他の悪性腫瘍と同様に TP53 異常によるものであることを示した。TP53 異常により細胞周期の移行が促進し、腫瘍増殖に寄与すると言われている(Polager and Ginsberg, 2009; Sherr and McCormick, 2002)。また、ATLL においても TP53 異常が予後不良の一因であると考えられる(Tawara et al., 2006)。CDK6 が TP53 の機能を抑制している報告もあり、パルボシクリブが TP53 依存的に抗腫瘍効果をもたらす可能性がある(Bellutti et al., 2018)。ATLL 患者検体に次世代シークエンサーを用いて遺伝子変異を調べた既報では、TP53 の変異と欠失(17p13.1)はそれぞれ 17.8%と 26%に認めていた(Kataoka et al., 2015)。従って、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である可能性があり、今後臨床的な検討が必要と考えられる。

TP53 変異を有する ATLL に対してパルボシクリブと変異型 p53 タンパクを再活性化させる APR-246 の併用投与は有望な選択肢であるが、TP53 欠失を伴う ATLL に対して APR-246 を投与しても TP53 タンパク発現がなく無効である。また、パルボシクリブと CDK2 阻害薬の併用投与は TP53 異常を有する ATLL に対して有望な選択肢であるが、現時点では CDK2 に特異的に作用する薬剤がなく、今後の開発が期待される。既報では、CDK2 の不活化により Rb 経路依存性にパルボシクリブや他の CDK4/6 阻害薬のアベマシクリブに対する感受性を高めると述べられている(Walter et al., 2019)。Rb 経路と p53 経路は細胞周期の根幹を担っており、Rb の上流に CDK6 が、TP53 の下流に CDK2 が位置する(Fischer, 2017; Hafner et al., 2019)。従って、CDK6 と CDK2 を両方とも阻害することで TP53 異常の有無に関わらず細胞毒性をもたらすと推察される。

本実験のゲノムワイドの CRISPR-Cas9 ライブラリースクリーニングから我々は mTORC1 経路の遺伝子が ATLL に必須であることを見出した。mTORC1 経路の亢進は腫瘍化に繋がることが知られている(Ma and Blenis, 2009; Mossmann et al., 2018; Saxton and Sabatini, 2017)。さらに、上記で示したように、ATLL では TP53 異常により mTORC1 経路の活性化が起こることが判明した。他の悪性腫瘍では TP53 は TSC2 タンパクのリン酸化を介して mTORC1 経路を抑制し、TP27 を活性化させることで CDK2 を抑制すると報告されている(Budanov and Karin, 2008; Feng and Levine, 2010; Kawada et al., 2014; Song et al., 2007)。上述から TP53 異常を有する ATLL ではパルボシクリブを用いて CDK6 を阻害しても CDK2 の代償作用により G1/S 期細胞周

期移行阻害からエスケープしてしまうことが判明しており、mTORC1 経路の亢進によるパルボシクリブ抵抗性への関与が示唆された。

そこで、我々は TP53 異常を有する ATLL がパルボシクリブ抵抗性となる機序を克服するための薬剤候補として mTORC1 阻害薬のエベロリムスに注目した。パルボシクリブと mTOR 阻害薬の併用投与では他の悪性腫瘍でも有効性が示唆されている(Olmez et al., 2017; Pikman et al., 2017; Song et al., 2019; Teh et al., 2018; Yoshida et al., 2019)。上記で示したように、ATLL においてパルボシクリブとエベロリムスの併用投与により 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。この結果から、TP53 異常を有する他の悪性腫瘍に対してもパルボシクリブとエベロリムスの併用投与によって相乗効果が得られる可能性があると考えられた。

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 CDK6 が ATLL に特異的な必須遺伝子であることを同定した。CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブは TP53 野生型 ATLL に対して奏功し、パルボシクリブとエベロリムスの併用投与により TP53 異常型 ATLL に対しても奏功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、臨床応用が期待される。

総括および結論

1. 本研究全体から得られた新知見

- ATLL に対してゲノムワイド CRISPR/Cas9 機能的ノックアウトスクリーニングにより遺伝子に変異の見られない CDK6 を同定し、これが ATLL に特異的な必須遺伝子で治療標的となりうることを見出した。

- ATLL に対して CDK6 のノックアウトまたは CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブを用いることで、細胞周期が G1/S 期に入る前に停止し、アポトーシスを誘導することを示した。

- TP53 異常を伴う ATLL ではパルボシクリブに抵抗性となり、CDK2 の代償作用により G1/S 期細胞周期移行阻害からエスケープしてしまうことを明らかにした。

- 上記スクリーニングにより ATLL では mTORC1 経路に関わる遺伝子が増殖および生存に必須であり、TP53 異常を伴うことで mTORC1 が活性化されることを示した。

- ATLL に対してパルボシクリブと mTORC1 阻害薬のエベロリムスの併用投与することで Rb タンパクのリン酸化が著明に抑制され、相乗効果により TP53 異常の有無に関わらず増殖生存を抑制できることを示した。

2. 新知見の意義

ATLL は既存の化学療法に対する奏功が乏しく、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を開発することが喫緊の課題である。今回、我々が同定した CDK6 は ATLL の治療標的として極めて有望であると考えている。CDK4/6 阻害薬のパルボシクリブは臨床での安全性情報は豊富であり、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、臨床応用への展開に直結すると思われる。また、パルボシクリブ抵抗性となり得る TP53 異常を有する場合に対しても、既に臨床で用いられているエベロリムスと併用投与することでその抵抗性を克服できる可能性があり、今後の臨床研究が期待される。

3. 今後の研究展開

本検討では、ATLL で CDK6 の mRNA およびタンパク発現が高値となる機序は解明できなかった。HTLV-1 感染から ATLL 進展への機序に関わる HBZ の RNA が標的遺伝子のプロモーターを活性化すると報告されており(Mitobe et al., 2015)、HBZ RNA により CDK6 のプロモーターが活性化するかどうかを検証する。

細胞内の標的 RNA に対して相補的な配列を持ち標的遺伝子発現を特異的に抑制する一本鎖のアンチセンス核酸(antisense oligonucleotide; ASO)と細胞内の標的タンパクとユビキチン E3 リガーゼの近接化を促進してユビキチン-プロテアソーム系により標的タンパクを分解するキメラ分子(proteolysis targeting chimera; PROTAC)は、それぞれ臨床応用が期待される分野である(Ferry et al., 2017; Nalawansha and Crews, 2020)。今回我々が検討した CDK6 以外の ATLL に特異的な必須遺伝子(JUNB、STAT3 および IL10RB など)は現時点で特異的な阻害薬は存在しないが、これらの遺伝子が臨床応用となり得るか ASO や PROTAC を用いて評価することを検討している。

謝辞

北海道大学大学院 医学研究院 内科系部門 内科系分野 血液内科学教室
北海道大学病院 血液内科
豊嶋崇徳先生，中川雅夫先生，遠藤知之先生，後藤秀樹先生
下埜城嗣先生，千葉雅尋先生，須藤啓斗先生，他、教室員の皆様

北海道大学保健センター
橋野聡先生

北海道大学病院 医療・ヘルスサイエンス研究開発機構
横田卓先生

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所
前田道之先生

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 豊嶋崇徳先生に深く感謝いたします。また、直接の御指導を賜りました北海道大学大学院医学研究院内科系部門内科学分野血液内科学教室 中川雅夫先生に心より感謝申し上げます。最後に様々な面においてご協力いただいた皆様に心よりお礼申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Abbas, T., and Dutta, A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. Nat. Rev. Cancer. 9, 400-414.

Alvarez-Fernandez, M., and Malumbres, M. (2020). Mechanisms of Sensitivity and Resistance to CDK4/6 Inhibition. Cancer Cell. 37, 514-529.

Anders, L., Ke, N., Hydbring, P., Choi, Y.J., Widlund, H.R., Chick, J.M., Zhai, H., Vidal, M., Gygi, S.P., Braun, P., et al. (2011). A systematic screen for CDK4/6 substrates links FOXM1 phosphorylation to senescence suppression in cancer cells. Cancer Cell. 20, 620-634.

Asghar, U., Witkiewicz, A.K., Turner, N.C., and Knudsen, E.S. (2015). The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. Nat. Rev. Drug Discov. 14, 130-146.

Basbous, J., Arpin, C., Gaudray, G., Piechaczyk, M., Devaux, C., and Mesnard, J.M. (2003). The HBZ factor of human T-cell leukemia virus type I dimerizes with transcription factors JunB and c-Jun and modulates their transcriptional activity. J. Biol. Chem. 278, 43620-43627.

Behan, F.M., Iorio, F., Picco, G., Goncalves, E., Beaver, C.M., Migliardi, G., Santos, R., Rao, Y., Sassi, F., Pinnelli, M., et al. (2019). Prioritization of cancer therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screens. Nature. 568, 511-516.

Bellutti, F., Tigan, A.S., Nebenfuehr, S., Dolezal, M., Zojer, M., Grausenburger, R., Hartenberger, S., Kollmann, S., Doma, E., Prchal-Murphy, M., et al. (2018). CDK6 Antagonizes p53-Induced Responses during Tumorigenesis. Cancer Discov. 8, 884-897.

Blomen, V.A., Majek, P., Jae, L.T., Bigenzahn, J.W., Nieuwenhuis, J., Staring, J., Sacco, R., van Diemen, F.R., Olk, N., Stukalov, A., et al. (2015). Gene essentiality and synthetic lethality in haploid human cells. Science. 350, 1092-1096.

Boutros, M., and Ahringer, J. (2008). The art and design of genetic screens: RNA interference. Nat. Rev. Genet. 9, 554-566.

Budanov, A.V., and Karin, M. (2008). p53 target genes sestrin1 and sestrin2 connect genotoxic stress and mTOR signaling. Cell. 134, 451-460.

Bykov, V.J., Issaeva, N., Shilov, A., Hultcrantz, M., Pugacheva, E., Chumakov, P., Bergman, J., Wiman, K.G., and Selivanova, G. (2002). Restoration of the tumor suppressor function to mutant p53 by a low-molecular-weight compound. Nat. Med. 8, 282-288.

Chapuy, B., Stewart, C., Dunford, A.J., Kim, J., Kamburov, A., Redd, R.A., Lawrence, M.S., Roemer, M.G.M., Li, A.J., Ziepert, M., et al. (2018). Molecular subtypes of diffuse large B cell lymphoma are associated with distinct pathogenic mechanisms and outcomes. Nat. Med. 24, 679-690.

Chen, S., Sanjana, N.E., Zheng, K., Shalem, O., Lee, K., Shi, X., Scott, D.A., Song, J., Pan, J.Q., Weissleder, R., et al. (2015). Genome-wide CRISPR screen in a mouse model of tumor growth and metastasis. Cell. 160, 1246-1260.

Cho, S.W., Kim, S., Kim, J.M., and Kim, J.S. (2013). Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. Nat. Biotechnol. 31, 230-232.

Chou, T.C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method. Cancer Res. 70, 440-446.

Chou, T.C., and Talalay, P. (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. Adv. Enzyme Regul. 22, 27-55.

Ciemerych, M.A., Kenney, A.M., Sicinska, E., Kalaszczynska, I., Bronson, R.T., Rowitch, D.H., Gardner, H., and Sicinski, P. (2002). Development of mice expressing a single D-type cyclin. Genes Dev. 16, 3277-3289.

Cluzeau, T., Sebert, M., Rahme, R., Cuzzubbo, S., Lehmann-Che, J., Madelaine, I., Peterlin, P., Beve, B., Attalah, H., Chermat, F., et al. (2021). Eprenetapopt Plus Azacitidine in TP53-Mutated Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia: A Phase II Study by the Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). J. Clin. Oncol. 39, 1575-1583.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 339, 819-823.

Cooper, A.B., Sawai, C.M., Sicinska, E., Powers, S.E., Sicinski, P., Clark, M.R., and Aifantis, I. (2006). A unique function for cyclin D3 in early B cell development. Nat. Immunol. 7, 489-497.

Cretella, D., Ravelli, A., Fumarola, C., La Monica, S., Digiacomo, G., Cavazzoni, A., Alfieri, R., Biondi, A., Generali, D., Bonelli, M., et al. (2018). The anti-tumor efficacy of CDK4/6 inhibition is enhanced by the combination with PI3K/AKT/mTOR inhibitors through impairment of glucose metabolism in TNBC cells. J. Exp. Clin. Cancer Res. 37, 72.

Deng, J., Wang, E.S., Jenkins, R.W., Li, S., Dries, R., Yates, K., Chhabra, S., Huang, W., Liu, H., Aref, A.R., et al. (2018). CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-cell Activation. Cancer Discov. 8, 216-233.

Ennishi, D., Jiang, A., Boyle, M., Collinge, B., Grande, B.M., Ben-Neriah, S., Rushton, C., Tang, J., Thomas, N., Slack, G.W., et al. (2019). Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. J. Clin. Oncol. 37, 190-201.

Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J.P., Grernrum, W., Beijersbergen, R.L., and Bernards, R. (2016). CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes. Nat. Biotechnol. 34, 631-633.

Feng, Z., and Levine, A.J. (2010). The regulation of energy metabolism and the IGF-1/mTOR pathways by the p53 protein. Trends Cell Biol. 20, 427-434.

Ferry, Q.R., Lyutova, R., and Fulga, T.A. (2017). Rational design of inducible CRISPR guide RNAs for de novo assembly of transcriptional programs. Nat. Commun. 8, 14633.

Fiore, D., Cappelli, L.V., Broccoli, A., Zinzani, P.L., Chan, W.C., and Inghirami, G. (2020). Peripheral T cell lymphomas: from the bench to the clinic. Nat. Rev. Cancer. 20, 323-342.

Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. Oncogene. 36, 3943-3956.

Franco, J., Balaji, U., Freinkman, E., Witkiewicz, A.K., and Knudsen, E.S. (2016). Metabolic Reprogramming of Pancreatic Cancer Mediated by CDK4/6 Inhibition Elicits Unique Vulnerabilities. Cell Rep. 14, 979-990.

Goel, S., DeCristo, M.J., Watt, A.C., BrinJones, H., Sceneay, J., Li, B.B., Khan, N., Ubellacker, J.M., Xie, S., Metzger-Filho, O., et al. (2017). CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. Nature. 548, 471-475.

Gong, X., Litchfield, L.M., Webster, Y., Chio, L.C., Wong, S.S., Stewart, T.R., Dowless, M., Dempsey, J., Zeng, Y., Torres, R., et al. (2017). Genomic Aberrations that Activate D-type Cyclins Are Associated with Enhanced Sensitivity to the CDK4 and CDK6 Inhibitor Abemaciclib. Cancer Cell. 32, 761-776 e766.

Gu, S., Jin, L., Zhang, Y., Huang, Y., Zhang, F., Valdmanis, P.N., and Kay, M.A. (2012). The loop position of shRNAs and pre-miRNAs is critical for the accuracy of dicer processing in vivo. Cell. 151, 900-911.

Hafner, A., Bulyk, M.L., Jambhekar, A., and Lahav, G. (2019). The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 20, 199-210.

Hart, T., Chandrashekhar, M., Aregger, M., Steinhart, Z., Brown, K.R., MacLeod, G., Mis, M., Zimmermann, M., Fradet-Turcotte, A., Sun, S., et al. (2015). High-Resolution CRISPR Screens Reveal Fitness Genes and Genotype-Specific Cancer Liabilities. Cell. 163, 1515-1526.

Ishitsuka, K., and Tamura, K. (2014). Human T-cell leukaemia virus type I and adult T-cell leukaemia-lymphoma. Lancet Oncol. 15, e517-526.

Kanda, Y. (2013). Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. Bone Marrow Transplant. 48, 452-458.

Kataoka, K., Iwanaga, M., Yasunaga, J.I., Nagata, Y., Kitanaka, A., Kameda, T., Yoshimitsu, M., Shiraishi, Y., Sato-Otsubo, A., Sanada, M., et al. (2018). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood. 131, 215-225.

Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., et al. (2015). Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. Nat. Genet. 47, 1304-1315.

Katsuya, H., Ishitsuka, K., Utsunomiya, A., Hanada, S., Eto, T., Moriuchi, Y., Saburi, Y., Miyahara, M., Sueoka, E., Uike, N., et al. (2015). Treatment and survival among 1594 patients with ATL. Blood. 126, 2570-2577.

Kawada, J., Ito, Y., Iwata, S., Suzuki, M., Kawano, Y., Kanazawa, T., Siddiquey, M.N., and Kimura, H. (2014). mTOR inhibitors induce cell-cycle arrest and inhibit tumor growth in Epstein-Barr virus-associated T and natural killer cell lymphoma cells. Clin. Cancer Res. 20, 5412-5422.

Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.P., Velasco-Herrera Mdel, C., and Yusa, K. (2014). Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. Nat. Biotechnol. 32, 267-273.

Korkmaz, G., Lopes, R., Ugalde, A.P., Nevedomskaya, E., Han, R.,

Myacheva, K., Zwart, W., Elkon, R., and Agami, R. (2016). Functional genetic screens for enhancer elements in the human genome using CRISPR-Cas9. Nat. Biotechnol. 34, 192-198.

Kucuk, C., Jiang, B., Hu, X., Zhang, W., Chan, J.K., Xiao, W., Lack, N., Alkan, C., Williams, J.C., Avery, K.N., et al. (2015). Activating mutations of STAT5B and STAT3 in lymphomas derived from gammadelta-T or NK cells. Nat. Commun. 6, 6025.

Lacy, S.E., Barrans, S.L., Beer, P.A., Painter, D., Smith, A.G., Roman, E., Cooke, S.L., Ruiz, C., Glover, P., Van Hoppe, S.J.L., et al. (2020). Targeted sequencing in DLBCL, molecular subtypes, and outcomes: a Haematological Malignancy Research Network report. Blood. 135, 1759-1771.

Lam, E.W., Glassford, J., Banerji, L., Thomas, N.S., Sicinski, P., and Klaus, G.G. (2000). Cyclin D3 compensates for loss of cyclin D2 in mouse B-lymphocytes activated via the antigen receptor and CD40. J. Biol. Chem. 275, 3479-3484.

Lambert, J.M., Gorzov, P., Veprintsev, D.B., Soderqvist, M., Segerback, D., Bergman, J., Fersht, A.R., Hainaut, P., Wiman, K.G., and Bykov, V.J. (2009). PRIMA-1 reactivates mutant p53 by covalent binding to the core domain. Cancer Cell. 15, 376-388.

Lehmann, S., Bykov, V.J., Ali, D., Andren, O., Cherif, H., Tidefelt, U., Uggla, B., Yachnin, J., Juliusson, G., Moshfegh, A., et al. (2012). Targeting p53 in vivo: a first-in-human study with p53-targeting compound APR-246 in refractory hematologic malignancies and prostate cancer. J. Clin. Oncol. 30, 3633-3639.

Li, W., Xu, H., Xiao, T., Cong, L., Love, M.I., Zhang, F., Irizarry, R.A., Liu, J.S., Brown, M., and Liu, X.S. (2014). MAGeCK enables robust identification of essential genes from genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screens. Genome Biol. 15, 554.

Liu, T., Yu, J., Deng, M., Yin, Y., Zhang, H., Luo, K., Qin, B., Li, Y., Wu, C.,

Ren, T., et al. (2017). CDK4/6-dependent activation of DUB3 regulates cancer metastasis through SNAIL1. Nat. Commun. 8, 13923.

Luo, J., Emanuele, M.J., Li, D., Creighton, C.J., Schlabach, M.R., Westbrook, T.F., Wong, K.K., and Elledge, S.J. (2009). A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. Cell. 137, 835-848.

Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 10, 307-318.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 339, 823-826.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2009). Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. Nat. Rev. Cancer. 9, 153-166.

Matsuoka, M., and Jeang, K.T. (2007). Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1) infectivity and cellular transformation. Nat. Rev. Cancer. 7, 270-280.

Meyerson, M., and Harlow, E. (1994). Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. Mol. Cell Biol. 14, 2077-2086.

Mitobe, Y., Yasunaga, J., Furuta, R., and Matsuoka, M. (2015). HTLV-1 bZIP Factor RNA and Protein Impart Distinct Functions on T-cell Proliferation and Survival. Cancer Res. 75, 4143-4152.

Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloepfer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K., et al. (2006). A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. Cell. 124, 1283-1298.

Morita, M., Gravel, S.P., Chenard, V., Sikstrom, K., Zheng, L., Alain, T., Gandin, V., Avizonis, D., Arguello, M., Zakaria, C., et al. (2013). mTORC1

controls mitochondrial activity and biogenesis through 4E-BP-dependent translational regulation. Cell Metab. 18, 698-711.

Morita, M., Prudent, J., Basu, K., Goyon, V., Katsumura, S., Hulea, L., Pearl, D., Siddiqui, N., Strack, S., McGuirk, S., et al. (2017). mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. Mol. Cell. 67, 922-935 e925.

Mossmann, D., Park, S., and Hall, M.N. (2018). mTOR signalling and cellular metabolism are mutual determinants in cancer. Nat. Rev. Cancer. 18, 744-757.

Munoz, D.M., Cassiani, P.J., Li, L., Billy, E., Korn, J.M., Jones, M.D., Golji, J., Ruddy, D.A., Yu, K., McAllister, G., et al. (2016). CRISPR Screens Provide a Comprehensive Assessment of Cancer Vulnerabilities but Generate False-Positive Hits for Highly Amplified Genomic Regions. Cancer Discov. 6, 900-913.

Murphy, T.L., Tussiwand, R., and Murphy, K.M. (2013). Specificity through cooperation: BATF-IRF interactions control immune-regulatory networks. Nat. Rev. Immunol. 13, 499-509.

Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., and Sutherland, R.L. (2011). Cyclin D as a therapeutic target in cancer. Nat. Rev. Cancer. 11, 558-572.

Nakagawa, M., Schmitz, R., Xiao, W., Goldman, C.K., Xu, W., Yang, Y., Yu, X., Waldmann, T.A., and Staudt, L.M. (2014). Gain-of-function CCR4 mutations in adult T cell leukemia/lymphoma. J. Exp. Med. 211, 2497-2505.

Nakagawa, M., Shaffer, A.L., 3rd, Ceribelli, M., Zhang, M., Wright, G., Huang, D.W., Xiao, W., Powell, J., Petrus, M.N., Yang, Y., et al. (2018). Targeting the HTLV-I-Regulated BATF3/IRF4 Transcriptional Network in Adult T Cell Leukemia/Lymphoma. Cancer Cell. 34, 286-297 e210.

Nalawansha, D.A., and Crews, C.M. (2020). PROTACs: An Emerging

Therapeutic Modality in Precision Medicine. Cell Chem. Biol. 27, 998-1014.

Ngo, V.N., Davis, R.E., Lamy, L., Yu, X., Zhao, H., Lenz, G., Lam, L.T., Dave, S., Yang, L., Powell, J., et al. (2006). A loss-of-function RNA interference screen for molecular targets in cancer. Nature. 441, 106-110.

Olmez, I., Brenneman, B., Xiao, A., Serbulea, V., Benamar, M., Zhang, Y., Manigat, L., Abbas, T., Lee, J., Nakano, I., et al. (2017). Combined CDK4/6 and mTOR Inhibition Is Synergistic against Glioblastoma via Multiple Mechanisms. Clin. Cancer Res. 23, 6958-6968.

Otto, T., and Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer. 17, 93-115.

Parnas, O., Jovanovic, M., Eisenhaure, T.M., Herbst, R.H., Dixit, A., Ye, C.J., Przybylski, D., Platt, R.J., Tirosh, I., Sanjana, N.E., et al. (2015). A Genome-wide CRISPR Screen in Primary Immune Cells to Dissect Regulatory Networks. Cell. 162, 675-686.

Pikman, Y., Alexe, G., Roti, G., Conway, A.S., Furman, A., Lee, E.S., Place, A.E., Kim, S., Saran, C., Modiste, R., et al. (2017). Synergistic Drug Combinations with a CDK4/6 Inhibitor in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. Clin. Cancer Res. 23, 1012-1024.

Polager, S., and Ginsberg, D. (2009). p53 and E2f: partners in life and death. Nat. Rev. Cancer. 9, 738-748.

Sabat, R., Ouyang, W., and Wolk, K. (2014). Therapeutic opportunities of the IL-22-IL-22R1 system. Nat. Rev. Drug Discov. 13, 21-38.

Sallman, D.A., DeZern, A.E., Garcia-Manero, G., Steensma, D.P., Roboz, G.J., Sekeres, M.A., Cluzeau, T., Sweet, K.L., McLemore, A., McGraw, K.L., et al. (2021). Eprenetapopt (APR-246) and Azacitidine in TP53-Mutant Myelodysplastic Syndromes. J. Clin. Oncol. 39, 1584-1594.

Saxton, R.A., and Sabatini, D.M. (2017). mTOR Signaling in Growth,

Metabolism, and Disease. Cell. 168, 960-976.

Schlabach, M.R., Luo, J., Solimini, N.L., Hu, G., Xu, Q., Li, M.Z., Zhao, Z., Smogorzewska, A., Sowa, M.E., Ang, X.L., et al. (2008). Cancer proliferation gene discovery through functional genomics. Science. 319, 620-624.

Schmitz, R., Wright, G.W., Huang, D.W., Johnson, C.A., Phelan, J.D., Wang, J.Q., Roulland, S., Kasbekar, M., Young, R.M., Shaffer, A.L., et al. (2018). Genetics and Pathogenesis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. N. Engl. J. Med. 378, 1396-1407.

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelson, T., Heckl, D., Ebert, B.L., Root, D.E., Doench, J.G., et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 343, 84-87.

Sherr, C.J., Beach, D., and Shapiro, G.I. (2016). Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. Cancer Discov. 6, 353-367.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell. 2, 103-112.

Shi, J., Wang, E., Milazzo, J.P., Wang, Z., Kinney, J.B., and Vakoc, C.R. (2015). Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. Nat. Biotechnol. 33, 661-667.

Silva, J.M., Marran, K., Parker, J.S., Silva, J., Golding, M., Schlabach, M.R., Elledge, S.J., Hannon, G.J., and Chang, K. (2008). Profiling essential genes in human mammary cells by multiplex RNAi screening. Science. 319, 617-620.

Song, J., Salek-Ardakani, S., So, T., and Croft, M. (2007). The kinases aurora B and mTOR regulate the G1-S cell cycle progression of T lymphocytes. Nat. Immunol. 8, 64-73.

Song, T.L., Nairismagi, M.L., Laurensia, Y., Lim, J.Q., Tan, J., Li, Z.M., Pang, W.L., Kizhakeyil, A., Wijaya, G.C., Huang, D.C., et al. (2018).

Oncogenic activation of the STAT3 pathway drives PD-L1 expression in natural killer/T-cell lymphoma. Blood. 132, 1146-1158.

Song, X., Liu, X., Wang, H., Wang, J., Qiao, Y., Cigliano, A., Utpatel, K., Ribback, S., Pilo, M.G., Serra, M., et al. (2019). Combined CDK4/6 and Pan-mTOR Inhibition Is Synergistic Against Intrahepatic Cholangiocarcinoma. Clin. Cancer Res. 25, 403-413.

Tawara, M., Hogerzeil, S.J., Yamada, Y., Takasaki, Y., Soda, H., Hasegawa, H., Murata, K., Ikeda, S., Imaizumi, Y., Sugahara, K., et al. (2006). Impact of p53 aberration on the progression of Adult T-cell Leukemia/Lymphoma. Cancer Lett. 234, 249-255.

Teh, J.L.F., Cheng, P.F., Purwin, T.J., Nikbakht, N., Patel, P., Chervoneva, I., Ertel, A., Fortina, P.M., Kleiber, I., HooKim, K., et al. (2018). In Vivo E2F Reporting Reveals Efficacious Schedules of MEK1/2-CDK4/6 Targeting and mTOR-S6 Resistance Mechanisms. Cancer Discov. 8, 568-581.

Tsukasaki, K., and Tobinai, K. (2014). Human T-cell lymphotropic virus type I-associated adult T-cell leukemia-lymphoma: new directions in clinical research. Clin. Cancer Res. 20, 5217-5225.

Turner, N.C., Huang Bartlett, C., and Cristofanilli, M. (2015). Palbociclib in Hormone-Receptor-Positive Advanced Breast Cancer. N. Engl. J. Med. 373, 1672-1673.

Utsunomiya, A., Choi, I., Chihara, D., and Seto, M. (2015). Recent advances in the treatment of adult T-cell leukemia-lymphomas. Cancer Sci. 106, 344-351.

Vijayaraghavan, S., Karakas, C., Doostan, I., Chen, X., Bui, T., Yi, M., Raghavendra, A.S., Zhao, Y., Bashour, S.I., Ibrahim, N.K., et al. (2017). CDK4/6 and autophagy inhibitors synergistically induce senescence in Rb positive cytoplasmic cyclin E negative cancers. Nat. Commun. 8, 15916.

Walter, D.M., Yates, T.J., Ruiz-Torres, M., Kim-Kiselak, C., Gudiel, A.A.,

Deshpande, C., Wang, W.Z., Cicchini, M., Stokes, K.L., Tobias, J.W., et al. (2019). RB constrains lineage fidelity and multiple stages of tumour progression and metastasis. Nature. 569, 423-427.

Wang, H., Nicolay, B.N., Chick, J.M., Gao, X., Geng, Y., Ren, H., Gao, H., Yang, G., Williams, J.A., Suski, J.M., et al. (2017). The metabolic function of cyclin D3-CDK6 kinase in cancer cell survival. Nature. 546, 426-430.

Wang, T., Birsoy, K., Hughes, N.W., Krupczak, K.M., Post, Y., Wei, J.J., Lander, E.S., and Sabatini, D.M. (2015). Identification and characterization of essential genes in the human genome. Science. 350, 1096-1101.

Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science. 343, 80-84.

Watatani, Y., Sato, Y., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Nishida, K., Gion, Y., Nagata, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., et al. (2019). Molecular heterogeneity in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified revealed by comprehensive genetic profiling. Leukemia. 33, 2867-2883.

Yamada, Y., Hatta, Y., Murata, K., Sugawara, K., Ikeda, S., Mine, M., Maeda, T., Hirakata, Y., Kamihira, S., Tsukasaki, K., et al. (1997). Deletions of p15 and/or p16 genes as a poor-prognosis factor in adult T-cell leukemia. J. Clin. Oncol. 15, 1778-1785.

Yoshida, A., Bu, Y., Qie, S., Wrangle, J., Camp, E.R., Hazard, E.S., Hardiman, G., de Leeuw, R., Knudsen, K.E., and Diehl, J.A. (2019). SLC36A1-mTORC1 signaling drives acquired resistance to CDK4/6 inhibitors. Sci. Adv. 5, eaax6352.

Zhang, J., Bu, X., Wang, H., Zhu, Y., Geng, Y., Nihira, N.T., Tan, Y., Ci, Y., Wu, F., Dai, X., et al. (2018). Cyclin D-CDK4 kinase destabilizes PD-L1 via cullin 3-SPOP to control cancer immune surveillance. Nature. 553, 91-95.

Zhou, Y., Zhu, S., Cai, C., Yuan, P., Li, C., Huang, Y., and Wei, W. (2014). High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional

genomics in human cells. Nature. 509, 487-491.

Zuber, J., Shi, J., Wang, E., Rappaport, A.R., Herrmann, H., Sison, E.A., Magoon, D., Qi, J., Blatt, K., Wunderlich, M., et al. (2011). RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. Nature. 478, 524-528.