HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	CRISPR/Cas9 screeningによって同定されたCD48はPTCL細胞におけるNK細胞免疫監視からの逃避機構に深く関与する［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	千葉, 雅尋
Description	配架番号：2742
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15238号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87685
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	CHIBA_Masahiro_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　千葉　雅尋

学 位 論 文 題 名

CRISPR/Cas9 screening によって同定された CD48 は PTCL 細胞における NK 細胞免疫監視からの逃避機構に深く関与する

(CRISPR screen identifies CD48 as a key molecule for evasion from NK cell surveillance in peripheral T-cell lymphomas)

【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) が CD4 陽性 T 細胞へ感染しキャリアとして 50 年程度の長い潜伏期間を経過した後、キャリアの 5%程度に発症する制御性 T 細胞の形質をとる極めて予後不良な T 細胞性腫瘍である。これまで次世代シークエンス解析により ATLL の病態形成に重要な遺伝子変異やシグナル伝達経路が同定され、ATLL の病態の理解が進んでいる。ATLL の腫瘍形成にはゲノム・エピゲノム異常の蓄積が深く関与しており、特に HLA-A、HLA-B、β2 microglobulin の機能喪失異常を高頻度に認めることから、T 細胞性免疫からの逸脱が ATLL 腫瘍形成に重要であることが判明している。同時に、この"missing self"現象の存在下においては、NK 細胞による ATLL 細胞除去機構の圧力に晒される可能性が高まるが、その逃避メカニズムについてはこれまで十分な検討がなされてこなかった。我々のグループでは以前に CRISPR/Cas9 システムを導入した ATLL 細胞株を用いて、19,114 種類の遺伝子の網羅的にノックアウトさせることで機能解析を行い、CDK6、CCND2、JUNB、STAT3 及び IL10R が ATLL 細胞の生存と増殖に重要な分子であること見出した。本研究ではこの技術を用いて、ATLL 細胞の NK 細胞免疫の感受性に寄与する遺伝子を同定するために網羅的かつ機能的なスクリーニングを施行した。

【材料と方法】ATLL の細胞株の ST1 及び KK1 に対して 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。sgRNA 導入細胞はピューロマイシン耐性となるため、ピューロマイシンを投与してセレクションを行った。sgRNA による標的遺伝子のノックアウトを行うために 2 週間から 3 週間 ST1 及び KK1 を継代培養した。抗 CCR4 抗体のモガムリズマブ存在下でこの ST1 及び KK1 をそれぞれ NK 細胞株の YT1 と effector target ratio が 1:2 になるよう共培養を行った。ST1 では 24 時間、KK1 では 48 時間共培養を行った後に、ピューロマイシンを加えて YT1 を排除した。生存 ATLL 細胞のゲノム DNA を抽出して、sgRNA 配列を PCR で増幅した。この検体をサイズセレクションして、次世代シークエンス解析を行った。各々の sgRNA の数を測定して、MAGeCK algorithm に従い、YT1 を加えた ATLL 細胞の検体と YT1 を加えていない ATLL 細胞の検体との比を log2 換算して計算を行った。

【結果】上記スクリーニングにおいて、log2 fold change >1 の遺伝子の中で NK 細胞の活性化に関与することが唯一報告されている CD48 に焦点を当てた。複数の ATLL 細胞株と NK 細胞株の YT1 を共培養した実験において、コントロールと比べ CD48 をノックアウトした ATLL 細胞株は YT1 による細胞障害に抵抗性を示した。更に NK 細胞株ではなく健常人及び ATLL 患者の末梢血から分離した NK 細胞と ATLL 細胞株を共培養した実験においても、コントロールと比較して CD48 をノックアウトした ATLL 細胞は NK 細胞による細胞障害に抵抗性を示した。ATLL の xenograft マウスモデルにおいても NK 細胞株の YT1 を投

与した場合、コントロールの ATLL 細胞と比較して CD48 ノックアウトの ATLL 細胞を移植したマウスの腫瘍量が増大していた。これらの結果から ATLL 細胞の CD48 が NK 細胞の免疫監視機構に重要な役割を担っていることを明らかにした。一方 ATLL において遺伝子異常が報告され、かつ NK 細胞の活性化に関与することが示されている CD58 をノックアウトして上記のアッセイを行ったが、CD58 は ATLL の NK 細胞免疫との関連を示せなかった。次に ATLL 細胞の CD48 発現メカニズムを解析するために、ATLL 細胞株の KK1 に 157 種類の化合物を加えて、CD48 発現の解析を行った。大部分の化合物は CD48 発現を変化させなかったが、3 種類の JAK 阻害薬は CD48 発現を低下させた。更に詳細な実験を行い、ATLL 細胞株において JAK1、JAK3、STA5B をノックアウトさせると IL2 を介在して CD48 発現が低下することを明らかにした。次に ATLL 細胞における CD48 発現について検討を行った。健常人の T 細胞と比較して ATLL 患者の腫瘍細胞の CD48 mRNA 発現が低下しており、更に ATLL の病勢進行に伴い ATLL 細胞の CD48 発現が低下していることも明らかにした。また。ATLL 細胞の CD48 タンパク質発現が健常人の制御性 T 細胞と比較して低下していることを示した。更に ATLL (CD3+CD4+CD7-) 細胞は ATLL 症例の正常 CD4+T 細胞(CD3+CD4+CD7+)と比較して CD48 が低下していることも明らかにした。ATLL を含めた高悪性度 peripheral T-cell lymphoma(PTCL)の CD48 発現を比較すると、高悪性度 PTCL の CD48 発現は全般的に低下していることを見いだし、ALK 陽性 anaplastic large cell lymphoma(ALCL)及び ATLL の CD48 発現が特に低下していることを発見し、また CD48 低値の ALK 陰性 ALCL の予後が不良であることを明らかにした。更に CD48 低値の ALK 陰性 ALCL の予後不良の一因が NK 細胞からの免疫回避により生じる可能性を示した。

【考察】我々の機能的かつ網羅的な CRISPR/Cas9 ライブラリースクリーニング及びその後の実験において、ATLL で遺伝子異常が報告されていない CD48 が NK 細胞免疫に重要であることを明らかにした。加えて、正常 T 細胞と比較して ATLL 細胞の CD48 発現は低下しており、更に高悪性度 PTCL 細胞の CD48 発現は全般的に低下していることを示した。一方、既報では B 細胞性リンパ腫又は ATLL を含めた高悪性度 PTCL において CD58 の遺伝子異常が報告されている。更に B 細胞性リンパ腫の CD58 発現が NK 細胞の免疫監視機構に関与することが機能的に示されている。上記から ATLL においても CD58 発現が NK 細胞の免疫監視機構に関与すると考えられていたが、我々の CRISPR/Cas9 ライブラリースクリーニング及びその後の実験において、ATLL 細胞の CD58 発現と NK 細胞の細胞傷害能との関連を見出せなかった。上記の結果から、高悪性度 PTCL と B 細胞性リンパ腫における NK 細胞免疫に重要な遺伝子が異なる可能性が示唆された。ATLL は予後不良な疾患であり様々な治療法が検討されており、固形癌やホジキンリンパ腫において治療効果が示されている免疫チェックポイント阻害薬の治験が現在行われている。免疫チェックポイント阻害薬は有効な症例が限定されていることから、有効な症例を事前に見出すためのバイオマーカーの探索が行われており、そのバイオマーカーとして NK 細胞が重要であることが判明している。本実験の結果から、将来的には高悪性度 PTCL の CD48 発現が免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測のバイオマーカーになる可能性が示された。

【結論】我々は機能的かつ網羅的な CRISPR/Cas9 ライブラリースクリーニングを使用して、ATLL 細胞の NK 細胞免疫に関わる重要な遺伝子として CD48 を同定した。更に、ATLL のみならず他の高悪性度 PTCL においても CD48 発現が低下していることを示し、高悪性度 PTCL 細胞の CD48 発現が NK 細胞免疫に重要であることを示した。本研究では高悪性度 PTCL の腫瘍形成のメカニズムの一端を解明し、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果予測への応用の可能性を示した。