



|                     |   |
|---------------------|---|
| 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                             |
| 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  |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15238">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15238</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/91137">https://hdl.handle.net/2115/91137</a>               |
| Type                | doctoral thesis   |
| File Information    | CHIBA_Masahiro.pdf  |



# 学位論文

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)

2022 年 12 月

北 海 道 大 学

千 葉 雅 尋



# 学位論文

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)

2022 年 12 月

北 海 道 大 学

千 葉 雅 尋

## 目次

|                 |      |
|-----------------|------|
| 発表論文目録および学会発表目録 | 1 頁  |
| 要旨              | 3 頁  |
| 略語表             | 6 頁  |
| 緒言              | 8 頁  |
| 方法              | 11 頁 |
| 結果              | 24 頁 |
| 考察              | 46 頁 |
| 総括と結論           | 48 頁 |
| 謝辞              | 50 頁 |
| 利益相反            | 52 頁 |
| 引用文献            | 53 頁 |

## 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は Blood に受理され、掲載予定である。

著者 : Masahiro Chiba, Joji Shimono, Takashi Ishio, Norio Takei, Kohei Kasahara, Reiki Ogasawara, Takahide Ara, Hideki Goto, Koh Izumiyama, Satoko Otsuguro, Liyanage P. Perera, Hiroo Hasegawa, Michiyuki Maeda, Satoshi Hashino, Katsumi Maenaka, Takanori Teshima, Thomas A. Waldmann, Yibin Yang and Masao Nakagawa

タイトル : Genome-wide CRISPR screens identify CD48 defining susceptibility to NK cytotoxicity in peripheral T-cell lymphomas

学術雑誌名 : Blood

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. Masahiro Chiba, Joji Shimono, Takashi Ishio, Hideki Goto, Satoshi Hashino, Takanori Teshima, Masao Nakagawa

Whole-genome CRISPR library screens identify CD48 as an essential molecule in adult T-cell leukemia/lymphoma for defining susceptibility to natural killer cell-mediated cytotoxicity

25th EHA Annual Congress, 2021年6月9日, Web開催

2. 千葉雅尋, 下埜城嗣, 石尾 崇, 須藤啓斗, 後藤秀樹, 橋野 聡, 豊嶋崇徳, 中川雅夫

CRISPR screen identifies CD48 as a key molecule for evasion from NK cell surveillance in PTCL

第83回日本血液学会学術集会, 2021年9月24日, Web開催

3. 千葉雅尋, 下埜城嗣, 石尾崇, 後藤秀樹, 長谷川寛雄, 前田道之, 橋野聡,  
前仲勝実, 豊嶋崇徳, 中川雅夫

全ゲノム CRISPR screening による ATLL における NK 細胞免疫に関わる重要  
分子の探索

第 7 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2021 年 11 月 7 日, 熊本県熊本市

## 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ケンス解析により 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、 $\beta 2$  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を見出した。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、次世代シーケンス解析を行った。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  $\log_2$  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、log<sub>2</sub> 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つ

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。

## 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。

|                 |  |
|-----------------|--|
| AAVS1           | associated virus integration site 1                      |
| ACACA           | acetyl-CoA carboxylase alpha                             |
| ADCC            | antibody dependent cellular cytotoxicity                 |
| ALCL            | anaplastic large cell lymphoma                           |
| ALK             | anaplastic lymphoma kinase                               |
| ATLL            | adult T-cell leukemia/ lymphoma                          |
| BSA             | bovine serum albumin                                     |
| CAR             | chimeric antigen receptor                                |
| Cas9            | CRISPR associated protein 9                              |
| CCND            | cyclin D   |
| CCR4            | C-C chemokine receptor type 4                            |
| CD              | cluster of differentiation                               |
| CDK             | cyclin-dependent kinase                                  |
| cDNA            | complementary deoxyribonucleic acid                      |
| CO <sub>2</sub> | carbon dioxide   |
| CRISPR          | clustered regularly interspaced short palindromic repeat |
| EDTA            | ethylenediaminetetraacetic acid                          |
| FSC             | forward scatter  |
| GFP             | green fluorescent protein                                |
| HLA             | human leukocyte antigen                                  |
| HTLV-1          | human T-cell lymphotropic virus type 1                   |
| IL              | interleukin  |
| IFN             | interferon   |
| JAK             | janus kinase   |
| LY6E            | lymphocyte antigen 6 family member E                     |
| MHC             | major histocompatibility complex                         |
| mRNA            | messenger ribonucleic acid                               |
| NK              | natural killer   |
| NOG             | non-obese diabetic mouse.Cg-rkdcscidIl2rgtm1Sug/ShiJic   |
| NOS             | not otherwise specified                                  |
| NR2C2           | nuclear receptor subfamily 2 group C member 2            |
| PAGE            | polyacrylamide gel electrophoresis                       |
| adeno-          | PBS  |

|          |   |
|----------|---|
| PCR      | phosphate buffered saline                           |
| PD1      | polymerase chain reaction                           |
| PD-L1    | programmed cell death 1                             |
| PTCL-NOS | programmed death-ligand 1                           |
| SDS      | peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified |
| sgRNA    | sodium dodecyl sulphate                             |
| STAT     | single guide ribonucleic acid                       |
|          | signal transducers and activator of transcription   |

## 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)が cluster of differentiation (CD)4 陽性 T 細胞に感染し、キャリアとして長い潜伏期間を経過した後に、キャリアの 5%程度に発症する長期生存が 2 割を下回る予後不良の疾患である (Ishitsuka and Tamura, 2014; Katsuya et al., 2015; Matsuoka and Jeang, 2007; Utsunomiya et al., 2015)。近年の技術の進歩による全エクソン解析や全ゲノム解析により、ゲノム異常が網羅的に解析され、ATLL の病態に関係する様々な遺伝子変異やシグナル伝達経路が同定されている。特に免疫に関連する遺伝子異常として human leukocyte antigen(HLA)-A、HLA-B 及び  $\beta 2$  microglobulin の遺伝子異常、又は programmed death-ligand 1(PD-L1)の 3'非翻訳領域の構造異常を ATLL は高頻度に認める (Kataoka et al., 2015; Kataoka et al., 2016; Kogure et al., 2021)。免疫に関わるこれらの遺伝子異常は ATLL の予後に関連する (Asano et al., 2018; Miyoshi et al., 2016)。これらの報告は免疫監視機構からの逃避が ATLL の腫瘍形成の一因であることを示唆している。この機序に着目して、現在 ATLL において免疫チェックポイント阻害薬の治験が行われている (NCT02631746, UMIN000020601)。腫瘍免疫は様々な免疫細胞が関与しており、免疫療法を効果的に活用するために個々の免疫細胞について詳細に検討することが重要である (Fridman et al., 2017; Hiam-Galvez et al., 2021)。

Natural Killer(NK)細胞はウイルス感染細胞や腫瘍細胞を排除する免疫細胞である。NK 細胞は自身が直接腫瘍細胞を排除するが、一方で Interferon(IFN) $\gamma$  などのサイトカインやケモカインの産生により他の免疫細胞の活性化に関与していることが示されており、腫瘍免疫に関わる重要な細胞の 1 つである (Bald et al., 2020; Huntington et al., 2020)。しかし、ATLL において NK 細胞免疫について詳細な検討が行われてこなかった。これは NK 細胞の活性化には様々な活性化受容体や抑制性受容体が複雑に関係しているためである (Huntington et al., 2020)。腫瘍細胞がいかにして NK 細胞免疫から逃避しているかを解明するためには機能的かつ網羅的な解析を行うことが必要である。

clustered regularly interspaced short palindromic repeat(CRISPR)/CRISPR associated protein 9(Cas9)システムは標的遺伝子の特異的にノックアウトでき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網羅的かつ機能的なスクリーニングが可能となり、様々な固形腫瘍や造血器

腫瘍で網羅的なスクリーニングが施行されている(Behan et al., 2019; Chen et al., 2015; Munoz et al., 2016; Parnas et al., 2015; Shi et al., 2015)。我々のグループはこの CRISPR/Cas9 システムと約 20000 遺伝子の sgRNA library を用いて、ATLL 細胞の生存と増殖に寄与する遺伝子の網羅的なスクリーニングを施行し、Cyclin Dependent Kinase 6(CDK6)、Cyclin D2(CCND2)、JUNB、Signal transducer and activator of transcription(STAT) 3 及び Interleukin(IL) 10RB が ATLL の増殖及び生存に重要な遺伝子であることを報告した(Ishio et al., 2022)。今回の研究では CRISPR/Cas9 システムと上記の library を用いて、約 20000 遺伝子がノックアウトされた ATLL 細胞に NK 細胞株の YT1 を共培養することで、ATLL 細胞の NK 細胞免疫に関わる分子の網羅的なスクリーニングを施行した。このスクリーニングで NK 細胞の活性化に関与する ATLL 細胞の分子として CD48 が重要であることを同定した。

スクリーニングの結果を検討するために、CD48 をノックアウトさせた ATLL 細胞株と NK 細胞株の YT1 を共培養したところ、コントロールと比べて CD48 ノックアウト ATLL 細胞は NK 細胞からの腫瘍排除に抵抗性を示した。更に ATLL xenograft マウスモデルに NK 細胞株の YT1 を投与すると、コントロールと比較して CD48 ノックアウト ATLL 細胞を移植したマウスの腫瘍径は有意に増大していた。この現象が CD48 ノックアウトによる特異的な現象であるかを検討するために、多数の silent mutation を含む CD48 の complementary deoxyribonucleic acid(cDNA)を ATLL 細胞に発現させた後に、sgCD48 を用いて CD48 をノックアウトさせた ATLL 細胞を作成した。この ATLL 細胞と NK 細胞株の YT1 の共培養を行うと、この ATLL 細胞は NK 細胞免疫への抵抗性を示さなかった。この実験の結果から、ATLL 細胞の sgCD48 導入による NK 細胞免疫から逃避は CD48 ノックアウトによる特異的な効果であったことが判明した。

NK 細胞株ではなく健常人、更には ATLL 患者の末梢血から分離した NK 細胞を ATLL 細胞株と共培養させる実験を施行した。CD48 ノックアウト ATLL 細胞はコントロールと比べて NK 細胞免疫に抵抗性を示し、CD48 ノックアウト ATLL 細胞と共培養した NK 細胞は活性化しないことが明らかになった。上記の実験から、ATLL 細胞の CD48 は NK 細胞株の YT1 のみならず健常人及び ATLL 患者の NK 細胞の細胞傷害能力に影響を与えることを明らかにした。

次に ATLL 細胞の CD48 発現調節機構について検討を行った。この検討のために、157 種類の化合物を ATLL 細胞に加えた時の CD48 発現の変化について調べた。この実験で CD48 発現を低下させる化合物として 3 種類の JAK 阻害薬(ルキシソリチニブ、トファシチニブ、バリシチニブ)を同定した。ルキシソリチニブを 6 種類の IL2 依存性 ATLL 細胞株と 3 種類の IL2 非依存性 ATLL 細胞株に

加えると、5種類のIL2依存性ATLL細胞株においてCD48発現が低下した。CRISPR/Cas9システムを用いた詳細な検討の結果、Janus kinase(JAK)1、JAK3、STAT5BをノックアウトさせたIL2依存性ATLL細胞株のKK1のCD48発現が低下することを見出した。ATLL細胞において、IL2/STAT5B軸がCD48発現を調整していることを今回の検討で明らかにした。

マイクロアレイとフローサイトメトリーのデータを用いて、ATLL患者検体のCD48発現の解析を行った。健常人のT細胞と比較してATLL細胞のCD48発現は低下しており、更にはATLL症例のATLL細胞はATLL症例の正常CD4陽性T細胞と比較してCD48発現が低下していた。加えて、ATLLの病勢進行に伴いATLL細胞のCD48発現が低下することも明らかにした。この結果は健常人T細胞と比較してATLL細胞のCD48が低下しているという既報とも矛盾しない結果だった(Ezinne et al., 2014)。更に高悪性度peripheral T-cell lymphoma(PTCL)細胞のCD48発現が低下していることを見だし、anaplastic lymphoma kinase(ALK)陽性anaplastic large cell lymphoma(ALCL)細胞とATLL細胞のCD48発現が特に低下していることを同定した。ALK陰性ALCLに関しては、CD48低値で予後不良となることを示した。これまでの検討の結果から、この予後不良の一因はNK細胞免疫から逃避によるものではないかと推察した。実際に、ALK陰性ALCL細胞株のTLBR2と健常人の末梢血から分離したNK細胞を共培養させると、CD48ノックアウトTLBR2はコントロールと比較してNK細胞免疫に抵抗性を示した。これらの結果からCD48はATLLのみならず高悪性度PTCLにおいてもNK細胞免疫に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

本研究は先進技術のCRISPR/Cas9システムを用いた機能的かつ網羅的なスクリーニングを施行して、ATLL細胞のCD48がNK細胞免疫に深く寄与することを示した独創的な研究である。更にATLL細胞のみならず高悪性度PTCL細胞においてもCD48がNK細胞免疫に重要である可能性も示唆された。ATLLは難治性の疾患であることから、様々な治療方法が検討されており、現在免疫チェックポイント阻害薬の治験がATLLで進行している(NCT02631746, UMIN000020601)。免疫チェックポイント阻害薬は有効な症例が限られており、事前に効果を予測できるバイオマーカーの探索が行われている(Gibney et al., 2016)。本研究では高悪性度PTCL細胞のCD48が免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーになる可能性が示唆された。

## 実験方法

### 1. 倫理・コンプライアンス

健常人及び成人 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の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、「北海道大学動物実験に関する規定」および「北海道大学遺伝子組み換え実験等安全管理規定」に従って、動物実験（承認番号：21-0095）と遺伝子組み換え実験（承認番号：2017-036, 2022-009）の承認を得て施行した。

### 2. 細胞培養

ATLL 細胞株の ED40515(-)、ED40515(+)、ATL43T(+)、ATL55T(+)<sup>1</sup>は京都大学ウイルス研究所の前田道之先生に、ST1、KOB、KK1<sup>2</sup>は長崎大学大学院の山田恭暉先生に、Su9T01<sup>3</sup>は鹿児島大学大学院の有馬直道先生に、TL-Om1<sup>4</sup>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。ALK 陰性 ALCL 細胞株の TLBR2<sup>5</sup>は南カリフォルニア大学ケック医学校 Alan L. Epstein 先生に提供いただいた。NK 細胞株の YT1<sup>6</sup>はアメリカ国立癌研究所の L. Perera 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°C、5% carbon dioxide (CO<sub>2</sub>)下で培養した。IL-2 依存性の細胞株である ED40515(+)、ATL43T(+)、ATL55T(+)、KOB、KK1、TL-Om1、YT1 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。

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を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。

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(-)、TLBR2 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。

### 3. 試薬および抗体

抗 C-C chemokine receptor type 4(CCR4)抗体のモガムリズマブは協和発酵キリンより購入した。ルキソリチニブ(S1378)は Selleck Biotech 株式会社から購入した。フローサイトメトリー、ウェスタンブロットに使用した抗体は Table 1、Table 2 に各々記載した。

Table 1: フローサイトメトリーで使用した抗体

| 抗原                   | クローン     | 標識              | 販売元             | カタログ番号 |
|----------------------|----------|-----------------|-----------------|--------|
| CD48                 | BJ40     | APC             | BioLegend       | 336714 |
| CD58                 | AICD58   | APC             | Beckman Coulter | IM3701 |
| CD3                  | UCHT1    | Pacific Blue    | BD Pharmingen   | 558117 |
| CD25                 | M-A251   | PE              | BioLegend       | 356104 |
| CD4                  | PRA-T4   | PerCP-Cy5.5     | BioLegend       | 300530 |
| CD7                  | CD7-6B7  | APC             | BioLegend       | 343104 |
| Lyt2                 | 53-6.7   | Alexa Fluor 647 | BD Pharmingen   | 557682 |
| CD107a               | H4A3     | Alexa Fluor 647 | BioLegend       | 328612 |
| CD56                 | NCAM16.2 | PE              | BD Pharmingen   | 340363 |
| IFN $\gamma$         | 4S.B3    | PerCP-Cy5.5     | BioLegend       | 502526 |
| human IgG            | HP6017   | APC             | BioLegend       | 409306 |
| Mouse IgG1, $\kappa$ | MOPC-21  | APC             | BioLegend       | 400120 |

Table 2: ウェスタンブロットで使用した抗体

| 抗原                    | クローン  | 販売元                               | カタログ番号 |
|-----------------------|-------|-----------------------------------|--------|
| CD48                  | D7L8I | Cell Signaling Technology         | 29499  |
| Jak1                  | 6G4   | Cell Signaling Technology         | 3344   |
| Jak2                  | D2E12 | Cell Signaling Technology         | 3229   |
| Jak3                  | 不明    | Cell Signaling Technology         | 3775   |
| Tyk2                  | D4I5T | Cell Signaling Technology         | 14193  |
| Stat3                 | 79D7  | Cell Signaling Technology         | 4904   |
| Phospho-Stat3(Tyr705) | D3A7  | Cell Signaling Technology         | 9415   |
| Stat5                 | C-17  | Santa Cruz Biotechnology          | sc-835 |
| Phospho-Stat5(Tyr694) | C11C5 | Cell Signaling Technology         | 9359   |
| GAPDH                 | 3H12  | MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES | M171-7 |

#### 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)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、3 日間ピューロマイシン(2 $\mu$ g/ml)を投与してセレクションした。sgRNA による標的遺伝子のノックアウトを行うために 2-3 週間 ST1 と KK1 を継代培養した。この ST1 及び KK1 に NK 細胞株の YT1 を effector target ratio(ET ratio)が 1:2 になるように加えて、更に抗 CCR4 抗体のモガムリズマブ(1mg/ml)を加えて、培養した。また YT1 とモガムリズマブを加えずに ST1 と KK1 のみの継代も行った。YT1 を加えた検体については ST1 及び KK1 は共培養開始から各々 24 時間及び 48 時間後にピューロマイシンを加え、YT1 を除去した。生存 ATLL 細胞のゲノム DNA を QIAamp DNA blood Maxi kit (QIAGEN)を用いて抽出した。抽出されたゲノム DNA は次世代シーケンサー(Illumina's NEXTSeq500)で検出できるように indexed polymerase chain reaction(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)でシーケンス解析を施行した。シーケンスされた 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、YT1 を加えた ATLL 細胞の検体と YT1 を加えていない ATLL 細胞の検体の比を log2 換算して計算を行った。

i5 indexed PCR primer:

D501,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTT  
CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTATGCATGCTCTTGTGGAAAGGACGA  
AACACCG

D502,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTT  
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCATGCAGTCTTGTGGAAAGGAC  
GAAACACCG

D503,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCTACACTCTTT  
CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGCATGCATCGTCTTGTGGAAAGGAC  
GAAACACCG

D504,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTT  
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCATGCATGACGTCTTGTGGAAAGG  
ACGAAACACCG

D505,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACACTCTT  
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTACGTATAACATCTTGTGGAAAG  
GACGAAACACCG

D506,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTAACACTCTTT  
CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGTACGTGTATATCTTGTGGAAAG  
GACGAAACACCG

D507,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACACTCTT  
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGTACGCGTGTATCTTGTGGAA  
AGGACGAAACACCG

D508,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAAGTACACTCTT  
TCCCTACACGACGCTCTTCCGATCTGTACGTACACCCGTATCTTGTGGAA  
AAGGACGAAACACCG

i7 indexed PCR primer:

D701,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt

D702,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D703,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D704,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D705,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAATGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D706,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D707,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D708,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTAGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D709,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGCCGGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D710,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCGCGGAGTGACTGGAGTT  
CAGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D711,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGAGTGACTGGAGTT  
CAGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt  
D712,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCGCTGTGACTGGAGTTC  
AGACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgactgt

## 5. sgRNA を用いたノックアウト実験

12 well plate の各 well に  $300 \times 10^4$  個の 293T 細胞を培養した。24 時間後に  
メディアウムを optimem で置換し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、30 分以上で培養した。PAX2  
packaging plasmid (addgene #12260)  $0.75\mu\text{g}$  と MD2.G packaging plasmid  
(addgene #12259)  $0.25\mu\text{g}$  を添加した optimem  $100\mu\text{l}$  に特定の sgRNA  
plasmid  $200\text{ng}$  を加えた。vortex した後、lipofectamin2000 (invitrogen  
#11668-019)  $1.7\mu\text{l}$  を添加した optimem  $100\mu\text{l}$  を追加し、室温で 30 分間培養し  
た。作成した溶液を optimem で置換された 293T 細胞に各  $200\mu\text{l}$  ずつ添加  
し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$ 、overnight で培養した。翌日にメディアウムを 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、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{CO}_2$  で 24 時間培養した後、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 (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) に polybrane (最終濃

度 5 $\mu$ g/ml)とともに添加した。2500rpm、16 $^{\circ}$ C、90 分で遠心した後、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、overnight で培養した。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、72 時間以上経過後にフローサイトメトリーで測定した。本実験で用いた sgRNA 標的配列を以下に記載した。

sgAAVS1: GGGGCCACTAGGGACAGG (control として使用した)

sgCD48#2: ATGTACAGTGCGCCACTCTG

sgCD48#3: CTGGTCGAAAGTATAAAACC

sgCD58#3: GCAGCAGGCAGACCACGCTG

sgCD58#4: GTCAATGCACAAGTTAGTGT

sgJAK1#1: GAAGACTGAGGTGAACCTGG

sgJAK1#2: GCCTAGACAGCACCGTAATG

sgJAK2#1: GAGGTGCTACTTCTTTACAG

sgJAK2#2: CAACCTCACCAACATTACAG

sgJAK2#3: GAAGAGTAAAAGTCCACCAG

sgJAK3#1: ACTTCCTCCAGCAGCCTCGG

sgJAK3#2: GCTGAGGCCAACCAGAAGGA

sgTYK2#1: GAGGGACTGCGGCTCTGCAG

sgTYK2#2: GAGTGTGGCCAGCTGTGGGC

sgSTAT3#1: GAGACCGAGGTGTATCACCA

sgSTAT3#2: TCGGCCGGTGCTGTACAATG

sgSTAT5B#1: TAAGGCCACCCAGCTCCTGG

sgSTAT5B#2: GACCCTGTCCCTGCCAGTGG

sgSTAT5B#3: TCACCGACTCTGCCCCACGA

## 6. 健常人または ATLL 患者の末梢血単核球分離と NK 細胞分離

健常人と ATLL 患者の末梢血から Ficoll-Hypaque を用いて単核細胞を分離した。分離した単核球を NK Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec #130-092-657)を用いて NK 細胞の negative selection を行った。具体的な手順としては、分離した単核球を FACS buffer(phosphate buffered saline (PBS)/0.5% bovine serum albumin(BSA)/2mM ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)) (40 $\mu$ l/10<sup>7</sup> cell) で溶解し、NK Cell Biotin-Antibody Cocktail(10 $\mu$ l/10<sup>7</sup> cell)を加えて 4 $^{\circ}$ C、5 分静置した。その後 FACS buffer(30 $\mu$ l/10<sup>7</sup> cell)と NK Cell MicroBead Cocktail(20 $\mu$ l/10<sup>7</sup> cell)を加えて、4 $^{\circ}$ C、10 分静置した。MACS MULTI STAND((Miltenyi Biotec #130-042-303)

に MidiMACS Separator (Miltenyi Biotec #130-042-302)を取り付けて、Separator に LS Columns((Miltenyi Biotec #130-042-401)を取り付けて、FACS buffer で Column 内を洗浄した。先ほどの抗体カクテルとビーズを加えた単核球を Column に滴下して、NK 細胞の分離を行った。この方法で 80%以上の NK 細胞に分離できた。

#### 7. フローサイトメトリーによる細胞表面タンパク質発現の解析

96 well plate の各 well に細胞を加えて、200 $\mu$ g/ml のヒト ガンマグロブリン (ICN Biomedicals Inc.) を含んだ PBS で細胞を洗浄した。その後 FACS buffer で 1 回洗浄し、抗体を加えて、4 $^{\circ}$ C、30 分静置させた。抗体反応後に FACS buffer で 2 回洗浄して FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。CCR4 タンパク質の解析の際には 1 次抗体としてモガムリズマブを使用し、FACS buffer で 2 回洗浄した後に 2 次抗体として APC anti-human IgG を加え、4 $^{\circ}$ C、30 分静置させた。その後 FACS buffer で 2 回洗浄した後に FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。

#### 8. NK 細胞傷害アッセイと antibody dependent cellular cytotoxicity(ADCC)アッセイ

sgRNA-green fluorescent protein(GFP)が導入された ATLL の細胞株(ST1, Su9T01, ED40515(-), KK1)及び ALK 陰性 ALCL の細胞株 (TLBR2) を標的細胞として用いた。エフェクター細胞として NK 細胞株の YT1、健康人末梢血から分離した NK 細胞、ATLL 患者末梢血から分離した NK 細胞を用いた。標的細胞は  $10 \times 10^4$  ml に調整して、エフェクター細胞は特定の ET ratio になるように細胞濃度を調整して、各々 70 $\mu$ l ずつ 96 well plate の各 well に加え、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。ADCC 解析の際にはモガムリズマブの最終濃度が 1 $\mu$ g/ml になるように加えて培養を行った。一定の培養時間経過後に各 well に PBS/propidium Iodide (PI)/micromer (micro medpartikeltechnologie gmbhb #01-00-703)の mix(mix の PI 濃度は 0.06mg/ml)70 $\mu$ l を加えて、FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。標的細胞の Live cell は PI によって標識される死細胞を除去して、GFP 陽性細胞である生存 ATLL 細胞数を計測して、ビーズの数で正規化を行った(Figure1)。

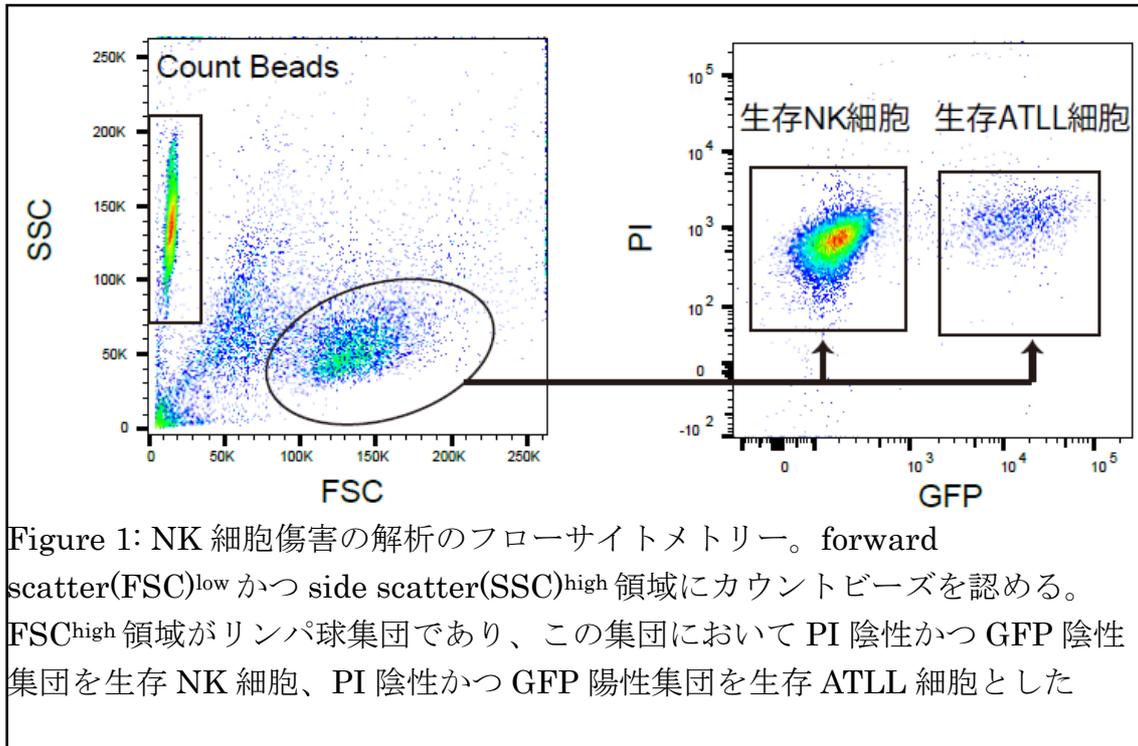


Figure 1: NK 細胞傷害の解析のフローサイトメトリー。forward scatter(FSC)<sup>low</sup>かつ side scatter(SSC)<sup>high</sup>領域にカウントビーズを認める。FSC<sup>high</sup>領域がリンパ球集団であり、この集団においてPI陰性かつGFP陰性集団を生存NK細胞、PI陰性かつGFP陽性集団を生存ATLL細胞とした

## 9. レスキューアッセイ

6 well plate の各 well に  $350 \times 10^4$  cell の 293T 細胞を培養した。24 時間後にメディアウムを optimem で置換し、37°C、30 分以上で培養した。pHIT60 packaging plasmid 2.5 $\mu$ g と EA6 x3\* packaging plasmid 2.5 $\mu$ g を添加した optimem 750 $\mu$ l に特定の sgRNA plasmid 10 $\mu$ g を加えた。vortex した後、lipofectamin2000 (invitrogen #11668-019) 12.5 $\mu$ l を添加した optimem 750 $\mu$ l を追加し、室温で 30 分培養した。optimem で置換された 293T 細胞に作成した溶液を各 500 $\mu$ l ずつ添加し、37°C、5%CO<sub>2</sub>、overnight で培養した。翌日にメディアウムを 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°C、5%CO<sub>2</sub>、24 時間で培養した。その後、上清を回収し、上清の 1/3 量の retro-X concentrator を上清に加えて 4°C、overnight で静置した。翌日も 293T の上清を回収して、前日と同様に retro-X concentrator を加えて、4°C、overnight で静置した。その後、1500g、45 分、4°C で遠心し、メディアウムを少量の 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 5 $\mu$ g/ml)とともに添加した。2500rpm、16°C、90 分で遠心した後、37°C、5%CO<sub>2</sub>、overnight で培養した。このようにして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 sgCD48 抵抗性の CD48 を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 cDNA は標的配列に silent mutation 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、この細胞に 4 日間ピューロマイシン(2 $\mu$ g/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)を感染させた。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、72 時間以上経過後にフローサイトメトリーで CD48 の発現を計測した。さらに、96 well plate の各 well に標的細胞としてこの ST1(10 $\times$ 10<sup>4</sup>/ml) 70 $\mu$ l を加え、エフェクター細胞として NK 細胞株の YT1 70 $\mu$ l を複数の ET ratio で加えて 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。一定の時間経過後に各 well に PBS/PI/micromer の mix 70 $\mu$ l を加えて、FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。標的細胞の生存は PI によって標識される死細胞を除去して、GFP 陽性細胞の数を計測して、ビーズの数で正規化を行った。

## 10. 健常人 NK 細胞の脱顆粒アッセイと細胞質内サイトカインの解析

5 $\times$ 10<sup>4</sup> 個の健常人の末梢血から分離した NK 細胞と 10 $\times$ 10<sup>4</sup> 個の ATLL 細胞株の ST1 を、140 $\mu$ l 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 に加え、CD107a 抗体を添加し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。1 時間後にブレフェルディン A(BioLegend #420601)を培養細胞に加えて、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> で培養を続けた。ブレフェルディン A を加えてから 5 時間後に CD3、CD56 抗体 mix を細胞に添加して 4 $^{\circ}$ C、30 分間静置させた。抗体反応後は FACS buffer で 2 回洗浄し、Fix/Perm(BD Cytotfix/Cytoperm kit, BD #554714) 200 $\mu$ l を加え、4 $^{\circ}$ C、20 分以上静置させ、細胞の固定と透過処理を行い、interferon(IFN) $\gamma$ 抗体を加えて 4 $^{\circ}$ C、60 分静置させた。Perm buffer で 2 回洗浄した後に FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析した。

## 11. ウェスタンブロット

細胞は sodium dodecyl sulphate(SDS)溶解バッファー(1.7% SDS, 60 mM Tris-hydrochloride pH6.8, 0.85% 2-mercaptoethanol in PBS)を加え、98 $^{\circ}$ C で 5 分煮沸した。検体は 4-15%アクリルアミドゲル(Bio-Rad #4561086)を用いた SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE)により分画を行った。SDS-PAGE は電圧を 120V に固定して行った。Trans-Blot Turbo(Bio-Rad)を用いて

25V、15 分間電圧をかけ、Trans-Blot Turbo Transfer Pack(Bio-Rad #1704156)の PVDF メンブレンに転写した。転写したメンブレンは分子量マーカー 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のち、Blocking buffer(milli Q 水を用いて SuperBlock® Dry Blend (TBS) Blocking Buffer (ThermoFisher scientific #37545)を溶解したもの)に浸し、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、Sunflower Mini-Shaker 3D (biosan Medical-Biological Research & Technologies) を用いて 0.05% Tween-PBS で希釈した一次抗体と 4°C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、Sunflower Mini-Shaker 3D (biosan Medical-Biological Research & Technologies) を用いて 0.05% Tween-PBS で希釈した二次抗体と 4°C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、ImageQuant LAS4000mini (GE Healthcare Life Sciences) で検出した。

一次抗体の希釈比率は 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。バンドの定量に関しては imageJ を使用した(Schneider et al., 2012)。

## 12. 健常人及び ATLL 患者の末梢血の NK 細胞を用いた competitive 共培養アッセイ

sgAdeno-associated virus integration site 1(AAVS1)と sgCD48#3 を pLenti-sgRNA-pgk-PG と pLKO.1\_Lyt2 vector にそれぞれクローニングを行い、それぞれのプラスミドを Cas9 導入済みの KK1 細胞に感染させた。pLenti vector を感染させた KK1 は puromycin selection を行い、pLKO.1 vector を感染させた KK1 に対しては Lyt2-microbeads(Miltenyi #120-000-298)を用いて positive selection を行い、感染した KK1 細胞のみに純化した。12 well plate の well に GFP 又は Lyt2 が発現している KK1 を同数加えて培養した。GFP 又は Lyt2 が発現している KK1 を  $30 \times 10^4/\mu\text{l}$  となるように継代し、健常人もしくは ATLL 患者の末梢血から分離した NK 細胞を  $10 \times 10^4/\text{ml}$  となるように加えて 37°C、5%CO<sub>2</sub> で共培養を行った。2 日毎に KK1 を  $30 \times$

10<sup>4</sup>/ml となるように継代し、NK 細胞を 10×10<sup>4</sup>/ml となるように加えた。2 日毎に Lyt2 抗体で染色して FACSCANTOII (BD Biosciences)で解析して、GFP と Lyt2 の比率を計測した。

### 13. 化合物ライブラリースクリーニング

96 well plate の 1 well に 5×10<sup>4</sup> 個の KK1 細胞を撒き、様々なシグナル経路を標的とした 157 種類の化合物(下記参照)を 2500nM になるように KK1 細胞に加えて、37°C、5%CO<sub>2</sub> で培養した。24 時間後に、FACS buffer で洗浄し、CD48 抗体で染色を行い、FACSCANTOII (BD Biosciences)で CD48 の Mean Fluorescence Intensity(MFI)を計測した。

以下に使用した化合物を記載した。

Amlexanox, Tofacitinib, Dasatinib (hydrochloride), Ruxolitinib, Lenalidomide (hemihydrate), Nifuroxazide, Regorafenib (Hydrochloride), Valproic acid, Pomalidomide, 6-Thioguanine, Ethoxyquin, Fludarabine, Belinostat (PXD101), Abexinostat (PCI-24781), Tivantinib (ARQ 197), Resminostat, Tepotinib (EMD 1214063), Ulixertinib (BVD-523, VRT752271), Molidustat (BAY 85-3934), AICAR (Acadesine), Tofacitinib (citrate), Cabozantinib, Ponatinib, Ezetimibe, Homoharringtonine, Sodium Butyrate, Ruxolitinib (phosphate), Palbociclib (hydrochloride), Trametinib (DMSO solvate), Belinostat, Linsitinib (OSI-906), Doramapimod (BIRB 796), Everolimus (RAD001), Onalespib (AT13387), Tideglusib, Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid, Tazemetostat (EPZ-6438), Bardoxolone Methyl, Saracatinib (AZD0530), Alvelestat (AZD9668), AICAR, Teprenone, Zoledronic acid (monohydrate), Lenalidomide, Sorafenib (Tosylate), Vorinostat, Crizotinib (hydrochloride), CAL-101, Enasidenib, Panobinostat, Entinostat (MS-275), Masitinib (AB1010), Flavopiridol (Alvocidib), Amuvatinib (MP-470), Fostamatinib (R788), Gandotinib (LY2784544), Selinexor (KPT-330), Cerdulatinib (PRT062070, PRT2070), Losmapimod (GW856553X), Entospletinib (GS-9973), Imatinib (Mesylate), Crizotinib, Pazopanib, Dimethyl fumarate, Tacrolimus, Pirfenidone, Zidovudine, Baricitinib (phosphate), Troglitazone, Elafibranor, Quisinostat (JNJ-26481585) 2HCl, Foretinib (GSK1363089), Resveratrol, Quizartinib (AC220), Omipalisib (GSK2126458, GSK458), Sotrastaurin, Dovitinib (TKI-258, CHIR-258), Linifanib (ABT-869), Afuresertib

(GSK2110183), Pexidartinib (PLX3397), Sunitinib (Malate), Sorafenib, Sunitinib, Retinoic acid, Nimodipine, Rosiglitazone, Sodium Salicylate, Trametinib, Acriflavine, Glucosamine (hydrochloride), Tanespimycin (17-AAG), Pictilisib (GDC-0941), Orantinib (TSU-68, SU6668), Fedratinib (SAR302503, TG101348), Taladegib (LY2940680), R788 (Fostamatinib) Disodium, Filgotinib (GLPG0634), Pilaralisib (XL147), Defactinib (VS-6063, PF-04554878), Ricolinostat (ACY-1215), Dasatinib, Thalidomide, Pazopanib (Hydrochloride), Valproic acid (sodium salt), Axitinib, Decitabine, Dexamethasone, Choline Fenofibrate, Citric acid, Hydroxyfasudil, Enzastaurin (LY317615), Triciribine, Azathioprine, Alpelisib (BYL719), Silmitasertib (CX-4945), Crenolanib (CP-868596), Salirasib, Epacadostat (INCB024360), Napabucasin, Prednisolone, Sitagliptin (phosphate monohydrate), Imatinib, Amodiaquin (dihydrochloride dihydrate), Vismodegib, Fasudil (Hydrochloride), Tauroursodeoxycholate (Sodium), Tilorone (dihydrochloride), Trepidil, Dovitinib (lactate), Vatalanib (PTK787) 2HCl, Pracinostat (SB939), Mocetinostat (MGCD0103), Erismodegib (NVP-LDE225), Dinaciclib (SCH727965), Duvelisib (IPI-145, INK1197), Pacritinib (SB1518), Uprosertib (GSK2141795), Oclacitinib, Chloroquine (diphosphate), Cyclosporin A, Ellagic acid, Bendamustine (hydrochloride), Nafamostat (mesylate), Everolimus, Selumetinib, Tacrolimus (monohydrate), Baricitinib, Tranlycypromine (hemisulfate), Tivozanib (AV-951), Divalproex Sodium, Ganetespib (STA-9090), Galunisertib (LY2157299), S-Ruxolitinib (INCB018424), Sodium Phenylbutyrate, Temsirolimus (CCI-779, NSC 683864), Voxtalisib (XL765, SAR245409), Roxadustat (FG-4592)

#### 14. Xenograft

5 週齢の雌の NOG マウス(non-obese diabetic mouse.Cg-PrkdcscidIl2rgtm1Sug/ShiJic)をインビボサイエンス株式会社から購入して、本学の動物実験施設にて1週間の安静期間を経た後実験に使用した。2×10<sup>6</sup>個の ATLL 細胞株(ED40515(-))を NOG マウスの右側腹部に皮下注射し、平均腫瘍径が 100mm<sup>3</sup>に到達した日を Day0 とした。Day0 と Day4 に 2Gy の放射線を照射した NK 細胞株の YT1 1×10<sup>7</sup> 個を腫瘍の近傍に皮下注射した。腫瘍径はノギスを持ちいて測定して、腫瘍面積は右記の公式で計算した (腫瘍面積=((短径)×(長径)<sup>2</sup>)/2) (Tomayko and Reynolds, 1989)。

## 15. Data Availability

PTCL 患者検体のマイクロアレイのデータは GSE1466、GSE6338、GSE14879、GSE19067、GSE19069、GSE33615、GSE58445、GSE65823、ETAMB702 および ETABM783 を用いた (de Leval et al., 2007; Eckerle et al., 2009; Huang et al., 2010; Iqbal et al., 2011; Iqbal et al., 2010; Iqbal et al., 2014; Maura et al., 2019; Piccaluga et al., 2007; Scarfò et al., 2016)。

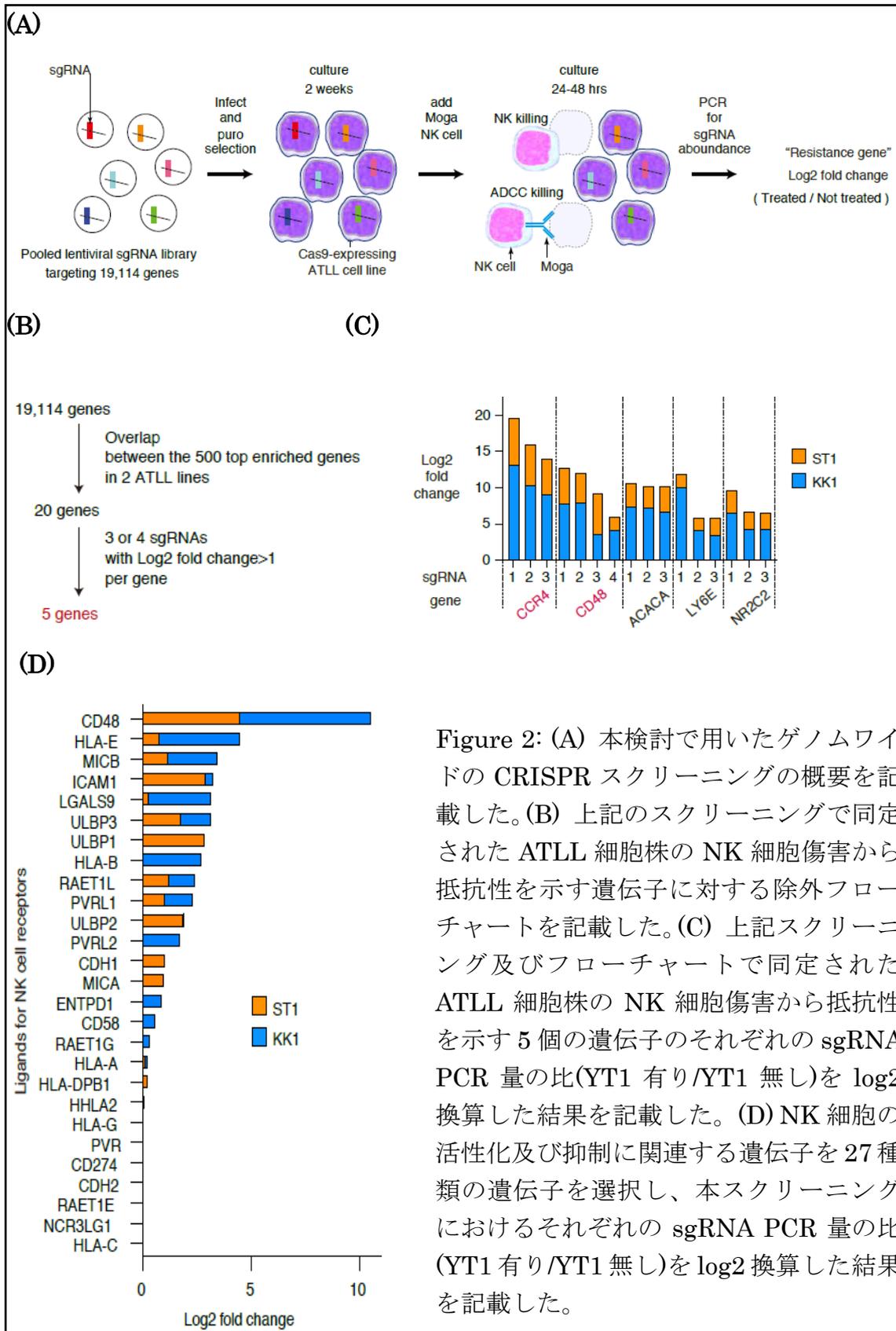
## 16. 統計解析

2 群の値の比較には、Welch t-test、全生存率の比較には Logrank 検定を用いて統計学的に解析し、 $p < 0.05$  を有意とした。これらの統計学的解析は GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA) 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 NK 細胞免疫に抵抗性を示す ATLL の遺伝子の同定

Cas9 を予め導入した ATLL 細胞株の ST1 及び KK1 に 19,114 種類の遺伝子を標的とした sgRNA ライブラリーを感染させた。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、ピューロマイシンを投与してセレクションをした。この ST1 及び KK1 に NK 細胞株の YT1 を加えて、更に抗 CCR4 抗体のモガムリズマブを加えて、培養した。また YT1 とモガムリズマブを加えずに ST1 と KK1 のみを継代するものも作成した。YT1 を加えた検体については共培養開始から各々 24 時間(ST1)及び 48 時間(KK1)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 sgRNA を PCR で定量し、YT1 の有無での sgRNA 量の比 (YT1 有り/YT1 無し) を log<sub>2</sub> 換算した。sgRNA のノックアウトにより YT1 からの細胞傷害を免れて細胞数が上昇する上位 500 遺伝子の中で、ST1 及び KK1 において重複する遺伝子を調べたところ、20 遺伝子に絞られた。この 20 遺伝子の中で 3 個又は 4 個の sgRNA で log<sub>2</sub> fold change>1 となる条件を満たす遺伝子は CCR4、CD48、acetyl-CoA carboxylase alpha(ACACA)、lymphocyte antigen 6 family member E(LY6E)、nuclear receptor subfamily 2 group C member 2(NR2C2)の 5 個の遺伝子であった。モガムリズマブは CCR4 依存性に ADCC 活性を発揮することから、CCR4 が上記の条件を満たす遺伝子として認められることはこのスクリーニングが適切なものであることを示していた。一方でこのスクリーニングの結果を NK 細胞の活性化や抑制に関わる分子でリストアップすると、CD48 の log<sub>2</sub> fold change が一番高値であった。そこで我々は CD48 に着目して実験を進めた。



## 2. sgRNA を用いた CD48、CD58 及び CCR4 のノックアウト

予め Cas9 を導入した ATLL 細胞株(ST1)に sgRNA を用いて CD48、CD58、CCR4 をノックアウトした。フローサイトメトリーで sgRNA によって CD48、CD58 及び CCR4 がそれぞれノックアウトされている事を確認できた。CD48 に関してはウェスタンブロットも行い、フローサイトメトリーと同様にノックアウトを確認できた。

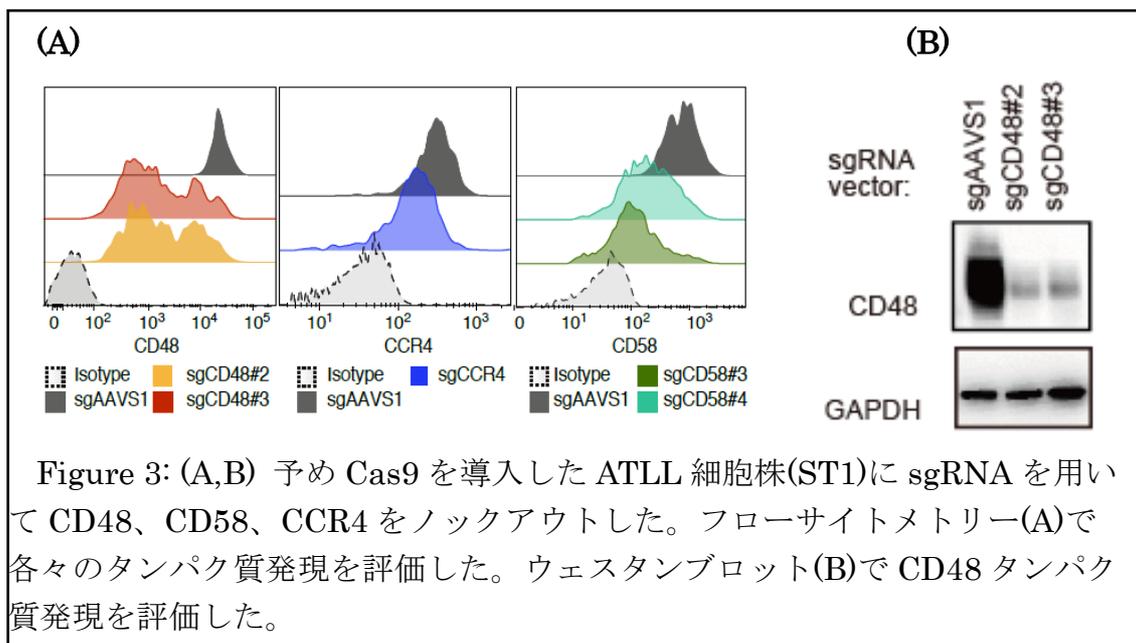
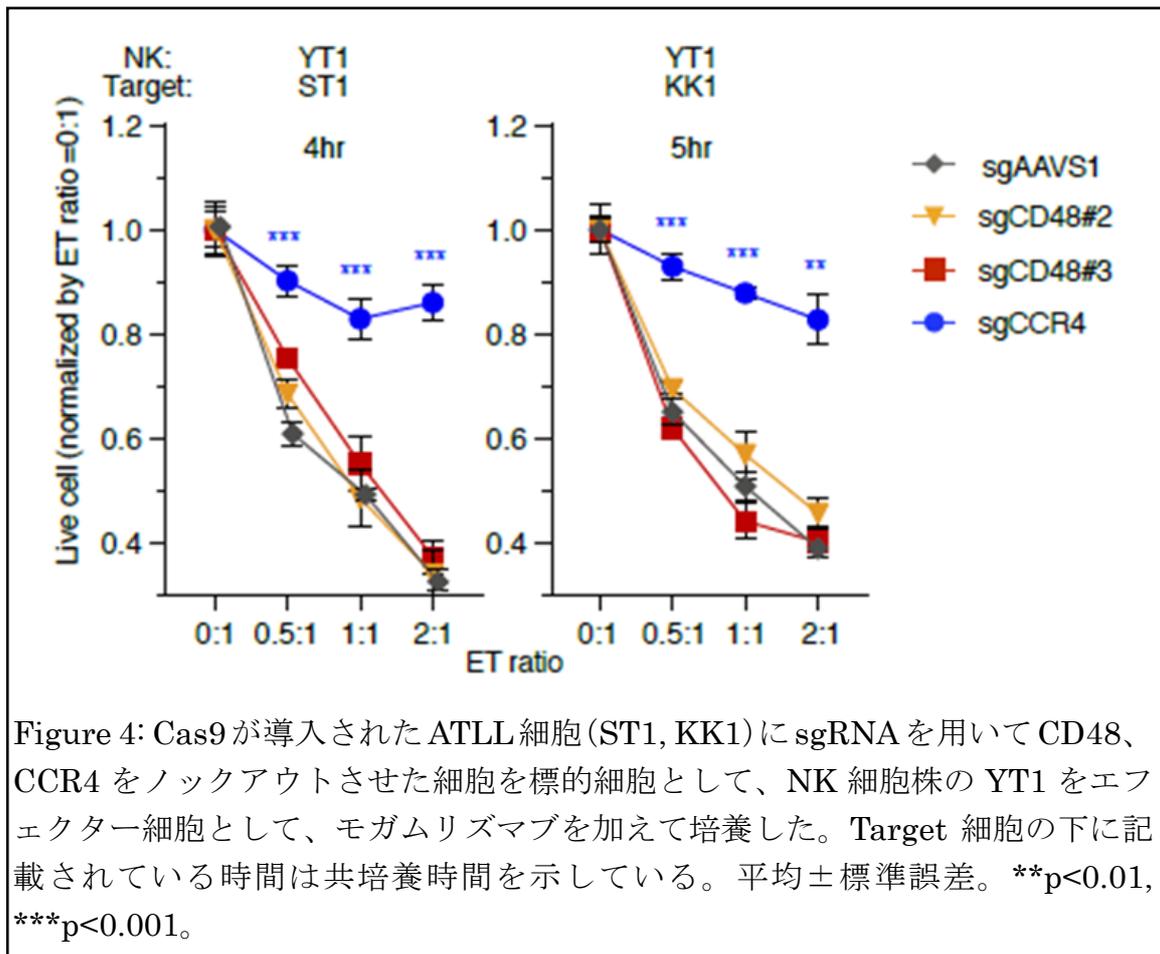


Figure 3: (A,B) 予め Cas9 を導入した ATLL 細胞株(ST1)に sgRNA を用いて CD48、CD58、CCR4 をノックアウトした。フローサイトメトリー(A)で各々のタンパク質発現を評価した。ウェスタンブロット(B)で CD48 タンパク質発現を評価した。

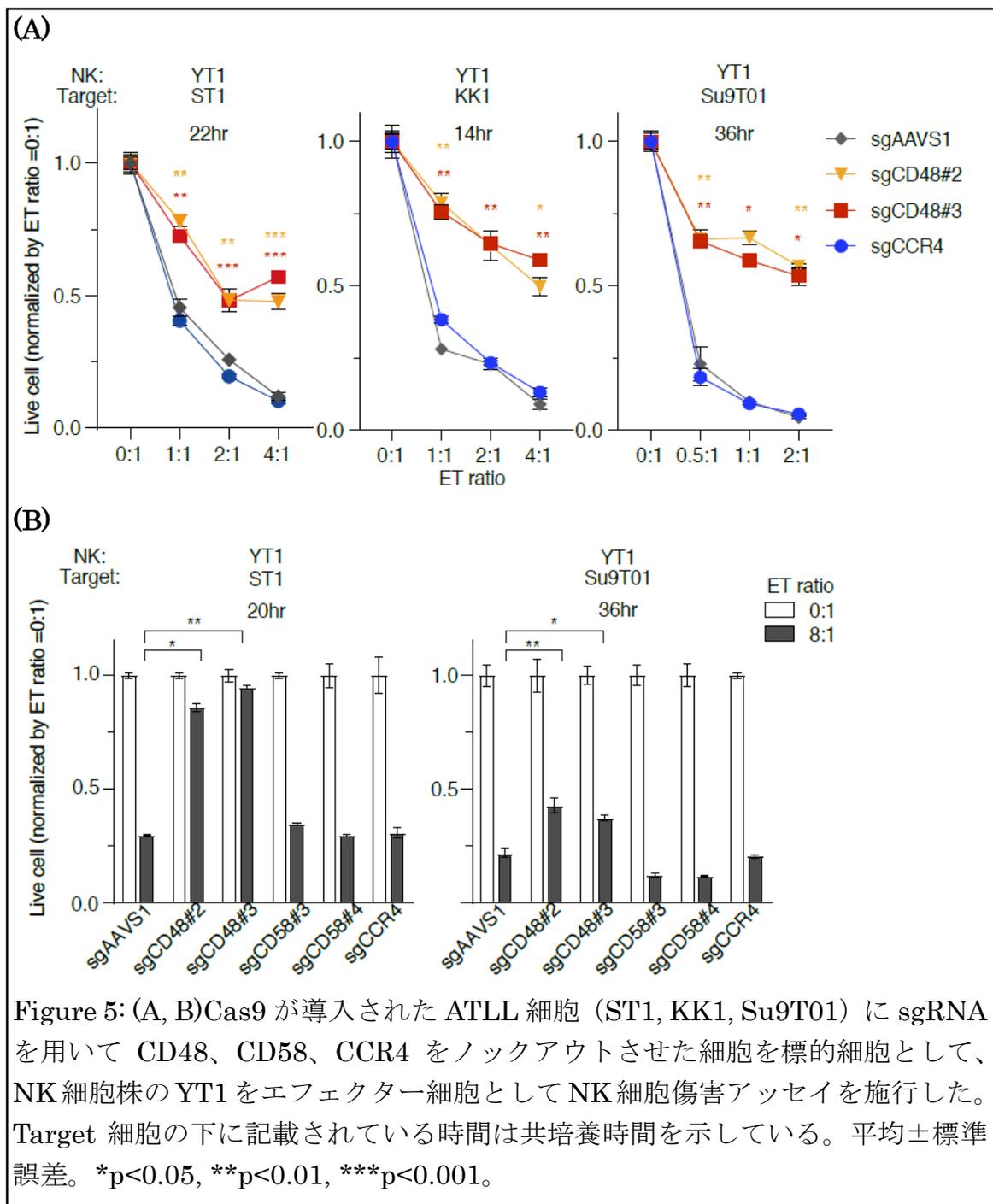
## 3. ATLL 細胞株を標的細胞とした NK 細胞株の YT1 を用いた ADCC アッセイ

CD48 及び CCR4 をノックアウトした ATLL 細胞株(ST1, KK1)を標的細胞として用いて、NK 細胞株の YT1 をエフェクター細胞として用いて、モガムリズマブを加えた ADCC アッセイを施行した。CCR4 をノックアウトした ATLL 細胞は ADCC に抵抗性を示したが、CD48 をノックアウトした ATLL 細胞は ADCC に抵抗性を示さなかった。モガムリズマブによる ADCC 活性が強力なために純粋な NK 細胞傷害能が評価できていない可能性を考えて、モガムリズマブを加えない NK 細胞傷害アッセイを次に行った。



#### 4. ATLL細胞株を標的細胞としたNK細胞株のYT1を用いたNK細胞傷害アッセイ

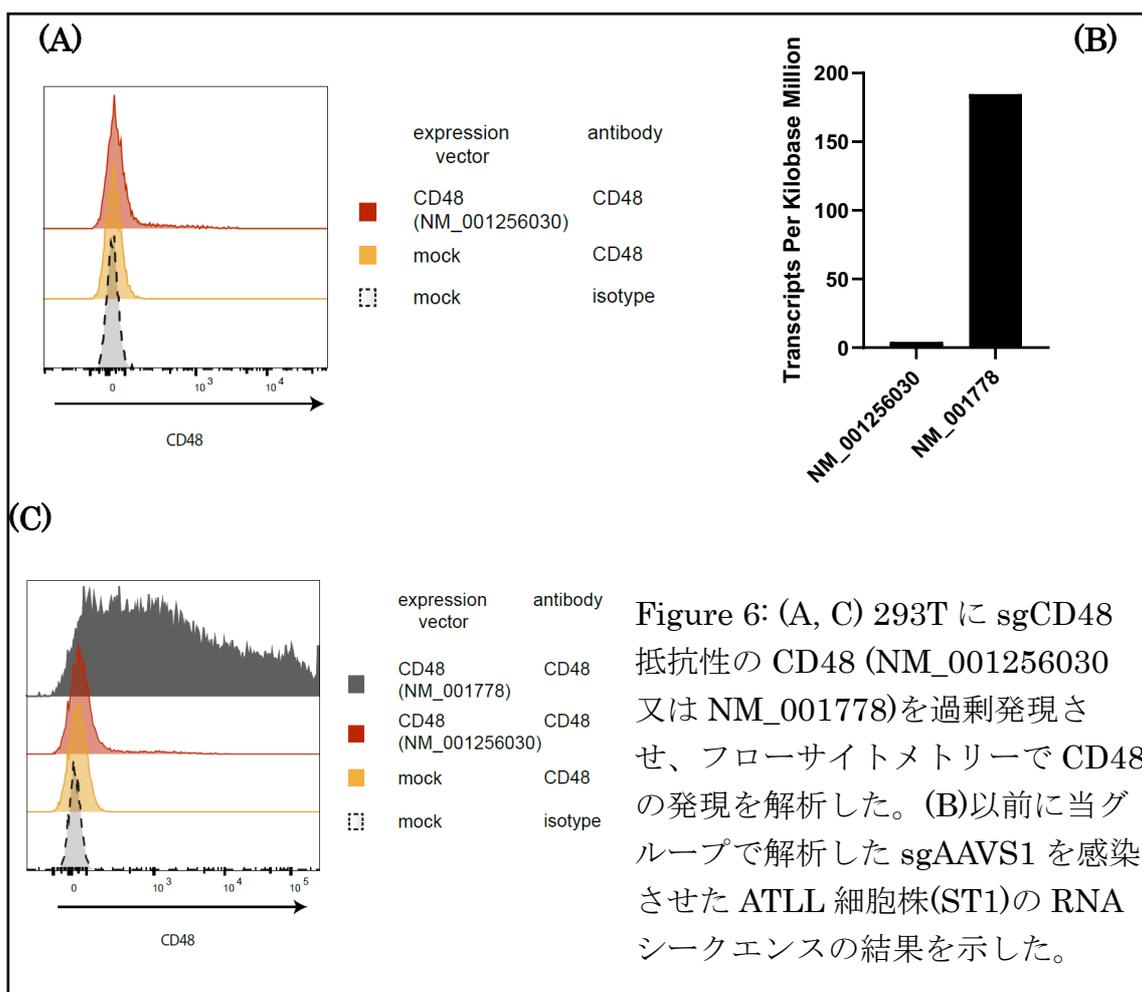
CD48、CD58及びCCR4をノックアウトしたATLL細胞株(ST1, KK1, Su9T01)を標的細胞として用いて、NK細胞株のYT1をエフェクター細胞として用いて、NK細胞傷害アッセイを施行した。AAVS1、CCR4、CD58をノックアウトしたATLL細胞と比較してCD48をノックアウトしたATLL細胞の生存率が高かった。このことから、CD48ノックアウトATLL細胞はYT1の細胞傷害から逃避していることを示した。



## 5. CD48 のレスキュー実験のための CD48 cDNA の検討

CD48 ノックアウト ATLL 細胞の YT1 細胞傷害からの逃避が CD48 ノックアウトにより生じた特異的な現象であることを示すために、多数の silent mutation を含む CD48 の cDNA を感染させて、sgCD48 抵抗性の CD48 を過剰発現させた後に、sgCD48 で CD48 をノックアウトさせた ATLL 細胞を用い

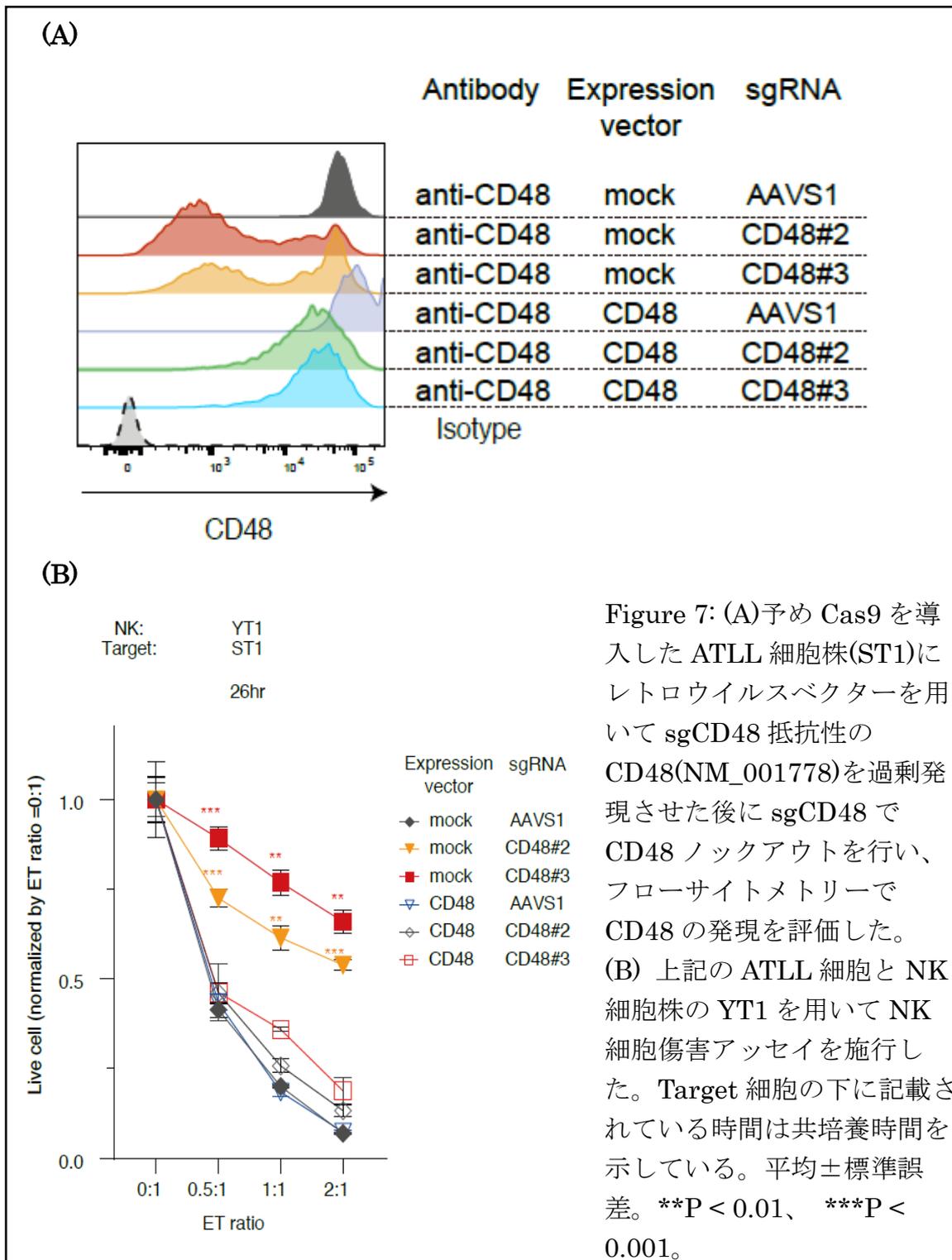
てNK細胞傷害アッセイを行う方針にした。多数の **silent mutation** を含む CD48(NM\_001256030)をレトロウイルスベクターにクローニングして、このプラスミドを 293T にトランスフェクションを行いフローサイトメトリーで細胞表面の CD48 の発現を解析したが、CD48 の発現を認めなかった。以前に当グループで解析した sgAAVS1 を感染させた ATLL 細胞株(ST1)の RNA シークエンスのデータを Trimomatic でトリミングを行い、Kallisto で解析を行ったところ、ATLL 細胞株では NM\_001256030 の発現はほぼ認めなかった一方で、別の CD48 のトランスクリプトである NM\_001778 は発現していた。この結果から多数の **silent mutation** を含む CD48 (NM\_001778)をレトロウイルスベクターにクローニングを行い、このプラスミドを 293T にトランスフェクションを行い、フローサイトメトリーで CD48 の発現の解析を行ったところ、NM\_001778 の CD48 の発現は良好だった。レスキュー実験ではこの NM\_001778 の cDNA を使用することにした。



**Figure 6:** (A, C) 293T に sgCD48 抵抗性の CD48 (NM\_001256030 又は NM\_001778)を過剰発現させ、フローサイトメトリーで CD48 の発現を解析した。(B)以前に当グループで解析した sgAAVS1 を感染させた ATLL 細胞株(ST1)の RNA シークエンスの結果を示した。

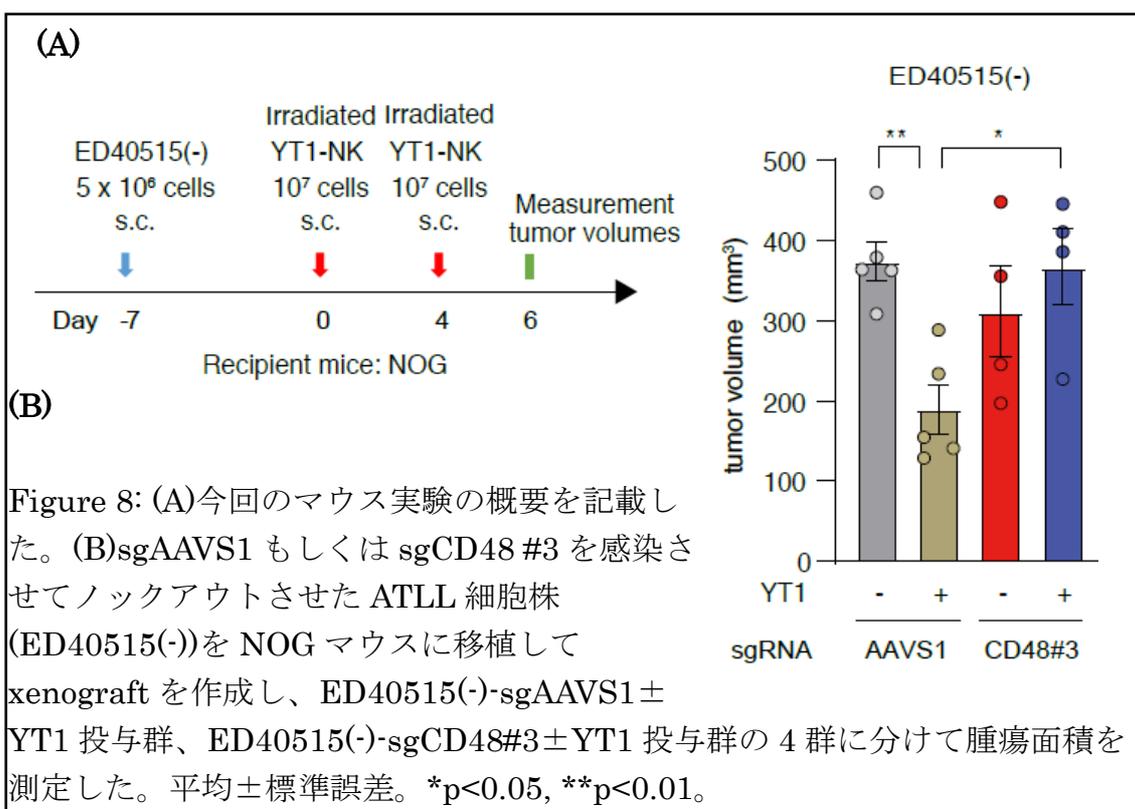
## 6. CD48 cDNA(NM\_001778)を用いたレスキュー実験

多数の silent mutation を含む CD48 cDNA(NM\_001778)を過剰発現させた後に sgCD48#3 で CD48 をノックアウトさせた ATLL 細胞株(ST1)と NK 細胞株の YT1 を培養して NK 細胞傷害アッセイを施行した。sgCD48 抵抗性の CD48 を過剰発現させた ST1 に sgCD48 を用いて CD48 のノックアウトを行い、CD48 の発現低下が乏しいことをフローサイトメトリーで確認した。この ST1 を用いて NK 細胞傷害アッセイを施行した。sgCD48 抵抗性の CD48 を過剰発現させた後に CD48 をノックアウトさせた ST1 は NK 細胞傷害に対する抵抗性を獲得していなかった。この結果は CD48 ノックアウト ATLL 細胞が NK 細胞から逃避を示す現象がノックアウトによる非特異的な現象でないことを示した。



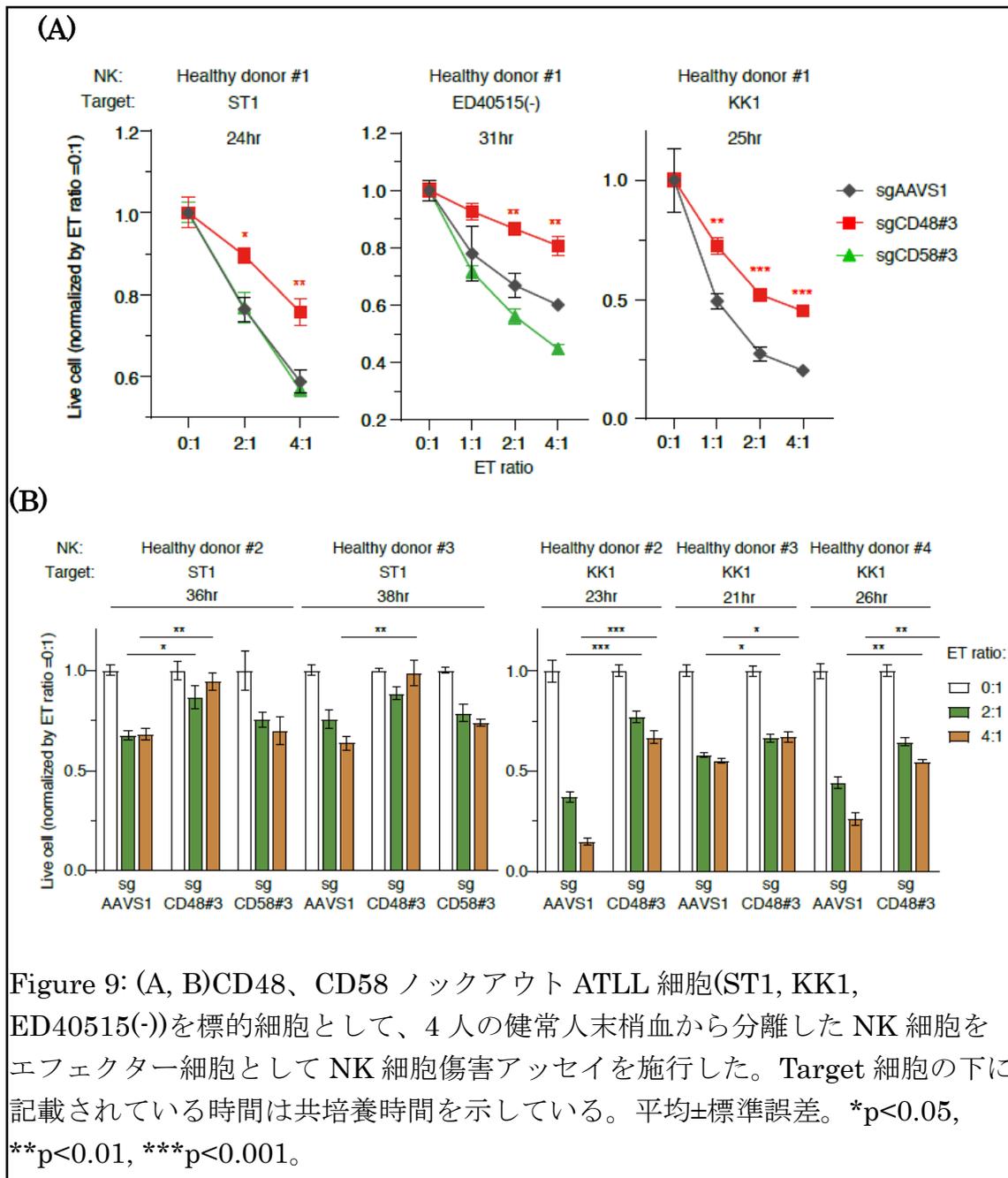
## 7. ATLL Xenograft マウスモデルによる CD48 の NK 細胞傷害の検討

ATLL 細胞の CD48 の NK 細胞傷害の影響を生体内で調べるために、ATLL 細胞株(ED40515(-))を NOG マウスに移植して xenograft を作成し、NK 細胞株の YT1 の腫瘍近傍へ皮下注射した。コントロールである ED40515(-)-sgAAVS1 の腫瘍は YT1 投与群で非投与群と比べて有意に縮小し、ED40515(-)-sgCD48#3 ではコントロールと比較して YT1 投与群で腫瘍の縮小が有意に乏しかった。CD48 ノックアウトによる ATLL 細胞の NK 細胞傷害からの逃避については *in vitro* だけではなく、*in vivo* においても確認できた。



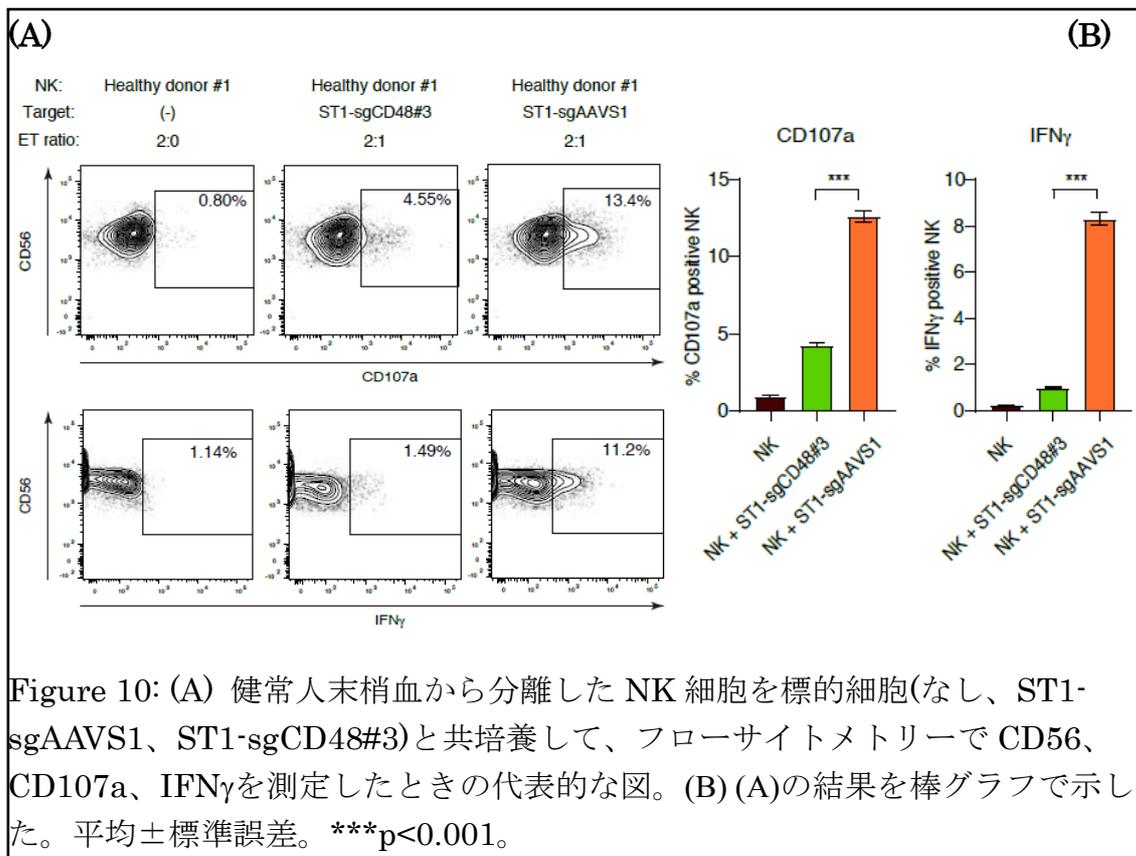
## 8. 健常人末梢血から分離した NK 細胞を用いた NK 細胞傷害アッセイ

エフェクター細胞として NK 細胞株の YT1 ではなく、4 人の健常人末梢血から分離した NK 細胞を使用して、NK 細胞傷害アッセイを行った。CD48 及び CD58 をノックアウトさせた 3 種類の ATLL 細胞株(ST1, ED40515(-), KK1)を標的細胞として使用した。AAVA1 と CD58 をノックアウトさせた ATLL 細胞と比較して CD48 をノックアウトさせた ATLL 細胞は NK 細胞からの逃避を示した。CD48 ノックアウトによる ATLL 細胞の NK 細胞免疫からの逃避は NK 細胞株の YT1 のみならず、健常人の NK 細胞においても生じることが判明した。



### 9. CD48 ノックアウト ATLL 細胞と共培養したときのNK細胞活性の評価

次にCD48ノックアウトATLL細胞(ST1)を健康人末梢血から分離したNK細胞と共培養したときのNK細胞の活性化を評価した。NK細胞活性化の指標として $IFN\gamma$ と脱顆粒マーカーのCD107aを使用した。コントロールであるST1-sgAAVS1と培養した時と比べてST1-sgCD48#3と培養した健康人のNK細胞のCD107aと $IFN\gamma$ の陽性率は有意に減少していた。このことからCD48ノックアウトATLL細胞はNK細胞を活性化させないということが判明した。



## 10. 健康人及び ATLL 患者の末梢血の NK 細胞を用いた competitive 共培養アッセイ

次に、ATLL 細胞と NK 細胞をより長時間培養したときの CD48 ノックアウトによる ATLL の NK 細胞傷害からの逃避について検討した。これまで行っていた NK 細胞傷害アッセイでは長時間の培養を行うことは困難であることから competitive 共培養アッセイを行った。標的細胞として Cas9 導入済みの ATLL 細胞株(KK1)を用いて、エフェクター細胞として 2 人の健康人、1 人の未治療急性型 ATLL 患者及び 1 人の慢性型 ATLL 患者の末梢血から分離した NK 細胞を使用した。実験に使用した全ての NK 細胞で CD48 ノックアウト KK1 の細胞数はコントロールである AAVS1 ノックアウト KK1 の細胞数と比べて増加した。この結果から CD48 ノックアウト KK1 は長時間 NK 細胞と培養を行っても、NK 細胞免疫から逃避を継続することが明らかになった。がん患者の NK 細胞では NK 細胞傷害能が減少していることが報告されており (Espí et al., 1996; Oka et al., 1993; Schantz et al., 1986)、健康人の NK 細胞とは違った機序で標的細胞を排除する可能性が考えられたが、CD48 をノックアウトした

KK1 は ATLL 患者の NK 細胞を使用した時においても健常人の NK 細胞と同様に逃避を示すことを示した。

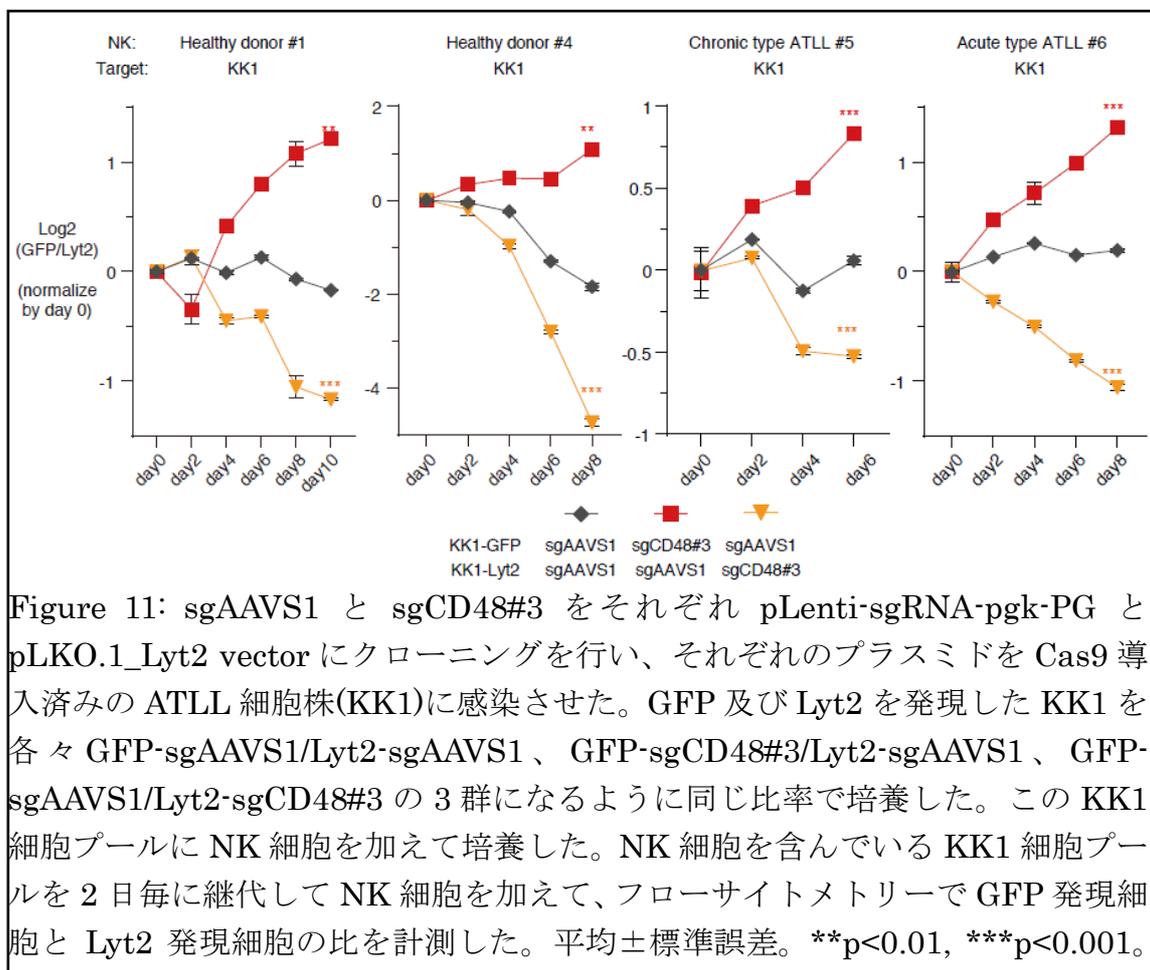
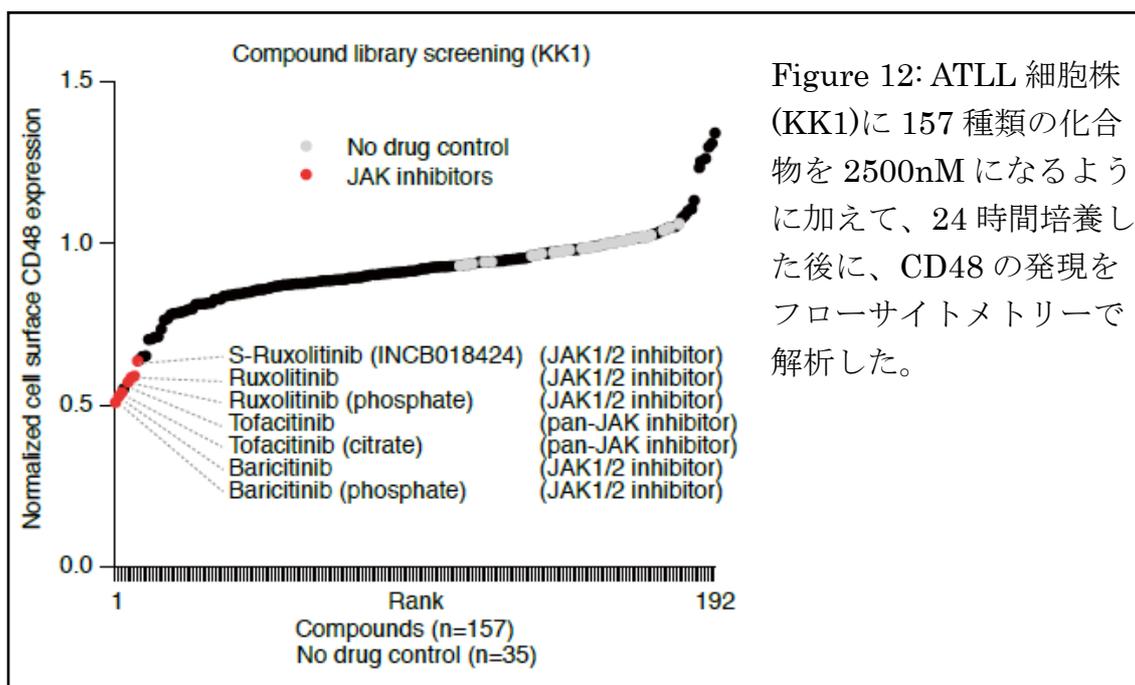


Figure 11: sgAAVS1 と sgCD48#3 をそれぞれ pLenti-sgRNA-pgk-PG と pLKO.1\_Lyt2 vector にクローニングを行い、それぞれのプラスミドを Cas9 導入済みの ATLL 細胞株(KK1)に感染させた。GFP 及び Lyt2 を発現した KK1 を各々 GFP-sgAAVS1/Lyt2-sgAAVS1、GFP-sgCD48#3/Lyt2-sgAAVS1、GFP-sgAAVS1/Lyt2-sgCD48#3 の 3 群になるように同じ比率で培養した。この KK1 細胞プールに NK 細胞を加えて培養した。NK 細胞を含んでいる KK1 細胞プールを 2 日毎に継代して NK 細胞を加えて、フローサイトメトリーで GFP 発現細胞と Lyt2 発現細胞の比を計測した。平均±標準誤差。\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001。

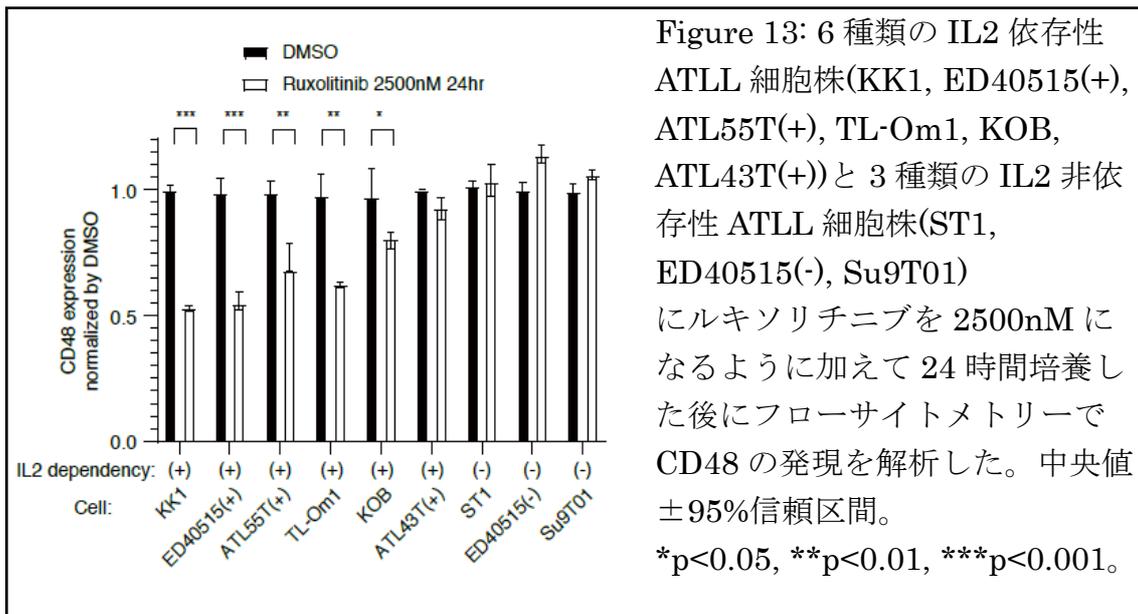
## 11. 化合物ライブラリーによる KK1 の CD48 発現の検討

ATLL の CD48 発現調節機序を検討するために化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを施行した。ATLL 細胞株の KK1 に、様々なシグナル経路を対象とした 157 種類の化合物を各々 2500nM になるように加えて 24 時間培養した後に、フローサイトメトリーで CD48 発現を調べた。このスクリーニングで CD48 の発現を低下させる薬剤として 3 種類の JAK 阻害薬(ルキシソリチニブ、トファシチニブ、バリシチニブ)を同定した。



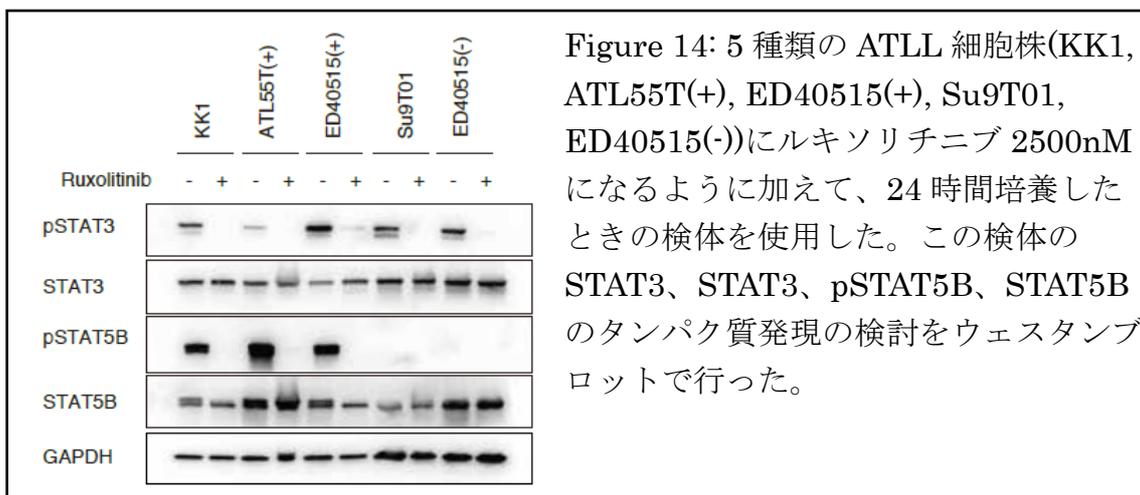
## 12. ルキシソリチニブ使用による 9 種類の ATLL 細胞株の CD48 発現変化

6 種類の IL2 依存性 ATLL 細胞株 (KK1, ED40515(+), ATL55T(+), TL-Om1, KOB, ATL43T(+)) と 3 種類の IL2 非依存性 ATLL 細胞株(ST1, ED40515(-), Su9T01)にルキシソリチニブ を加えた時の CD48 発現変化をフローサイトメトリーで検討した。ルキシソリチニブ使用により IL2 依存性の 6 種類の ATLL 細胞株の中で 5 種類の細胞株(KK1, ED40515(+), ATL55T(+), TL-Om1, KOB)の CD48 発現が低下して、残りの ATLL 細胞株では CD48 発現変化を認めなかった。この結果から IL2/JAK の経路が ATLL 細胞の CD48 発現調節に関与していると考えられた。



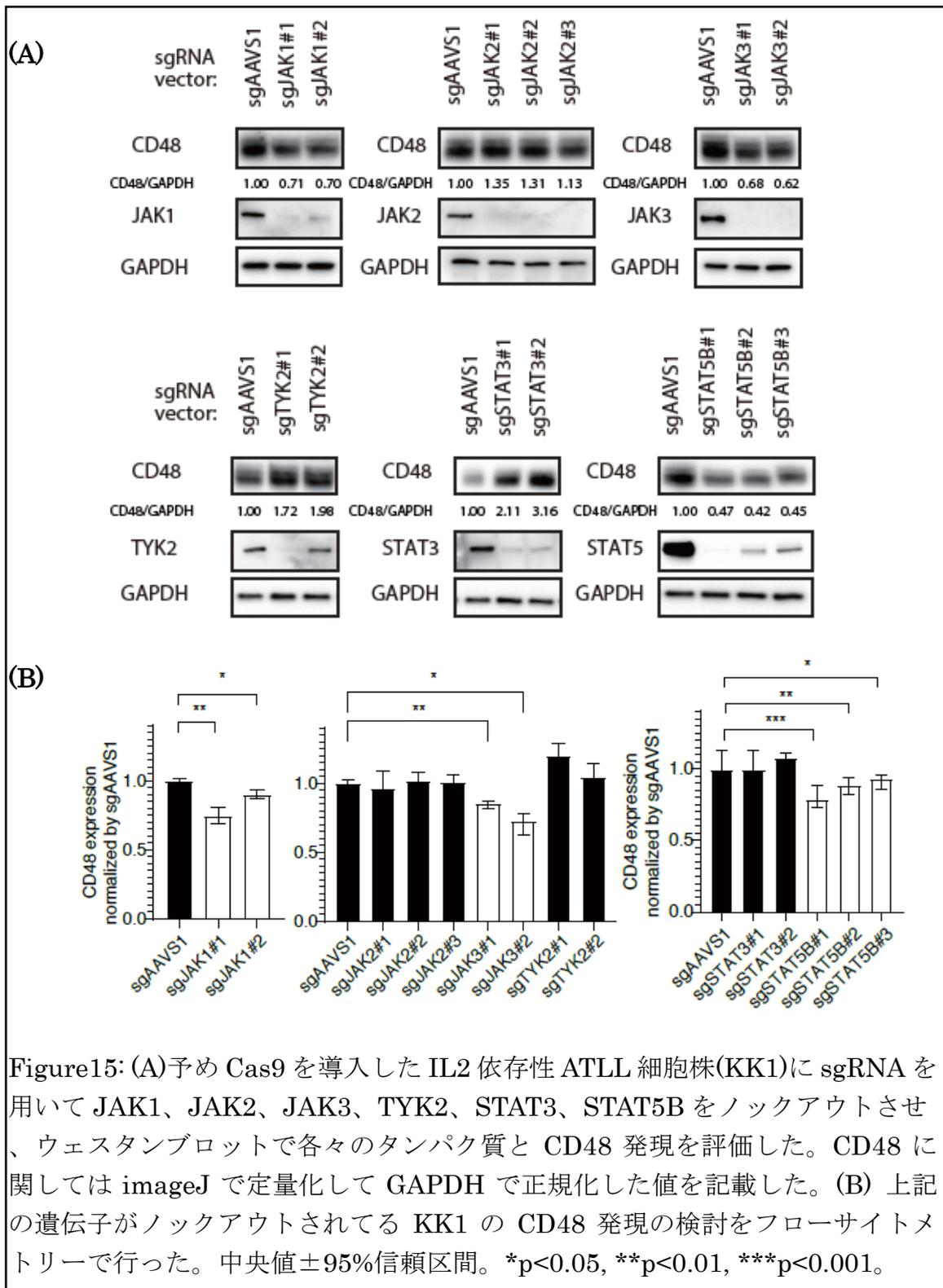
### 13. ルキソリチニブによる pSTAT3 及び pSTAT5B 発現低下の確認

5 種類の ATLL 細胞株(KK1, ATL55T(+), ED40515(+), Su9T01, ED40515(-)) にルキソリチニブを使用した時の STAT3 と STAT5B の発現変化の検討をウェスタンブロットで行った。ルキソリチニブは 5 種類の全ての ATLL 細胞株で STAT3 と STAT5B の発現を変化させないが、pSTAT3 と pSTAT5B の発現を低下させることを確認した。



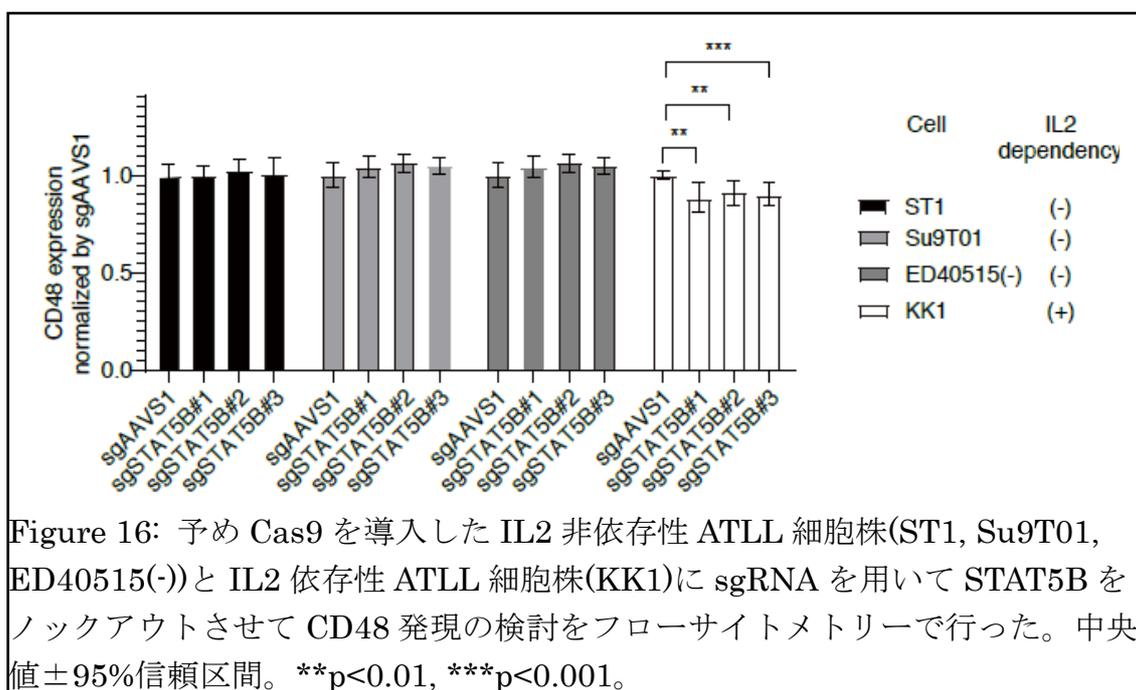
#### 14. JAK1、JAK2、JAK3、Tyrosine kinase(TYK)2、STAT3 及び STAT5B ノックアウトした KK1 の CD48 発現の検討

上記までの検討で IL2/JAK/STAT 経路が CD48 の発現調整に関連していることが判明したので、Cas9 導入済みの ATLL 細胞株(KK1)に sgRNA を用いて JAK1、JAK2、JAK3、TYK2、STAT3 及び STAT5B をノックアウトさせて更なる詳細な検討を行った。KK1 において、上記の遺伝子がそれぞれノックアウトされていることをウェスタンブロットで確認できた。上記の遺伝子をノックアウトさせた KK1 の CD48 発現をフローサイトメトリーとウェスタンブロットで解析したところ JAK1、JAK3 及び STAT5B をノックアウトさせた KK1 で CD48 発現が低下していた。



## 15. STAT5B をノックアウトさせた 4 種類の ATLL 細胞株における CD48 タンパク質発現の検討

予め Cas9 を導入した IL2 非依存性 ATLL 細胞株(ST1, Su9T01, ED40515(-))と IL2 依存性 ATLL 細胞株(KK1)に sgRNA を用いて STAT5B をノックアウトさせて、フローサイトメトリーで CD48 発現を調べた。IL2 依存性 ATLL 細胞株の KK1 のみで STAT5B ノックアウトにより CD48 タンパク質発現が低下した。従って、IL2/STAT5B 軸が ATLL 細胞の CD48 発現を調整していることが示唆された。



## 16. ATLL 患者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞の CD48 messenger ribonucleic acid(mRNA)発現の検討

患者検体の ATLL 細胞の CD48 発現の検討を行うために、マイクロアレイにより解析された末梢血 ATLL 細胞の mRNA の公開データ(GSE33615, GSE1466)を取得し、解析を行った。両者のデータにおいて健常人と比較して ATLL 患者では ATLL 細胞の CD48 の発現が低下しており、更に病勢の進行に伴い CD48 発現は低下した。

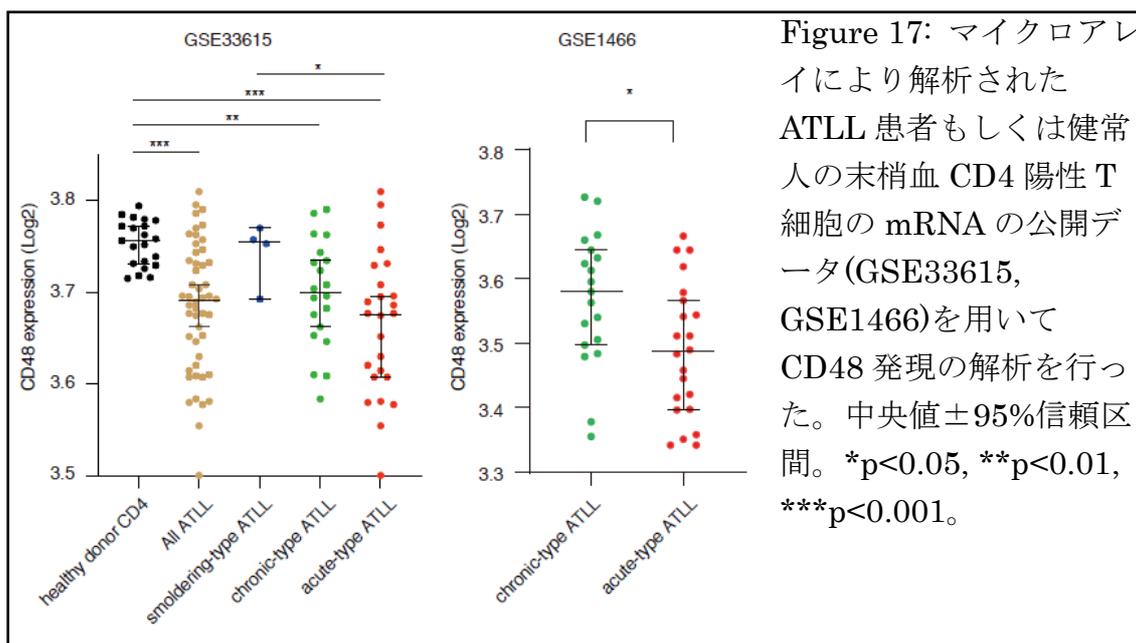
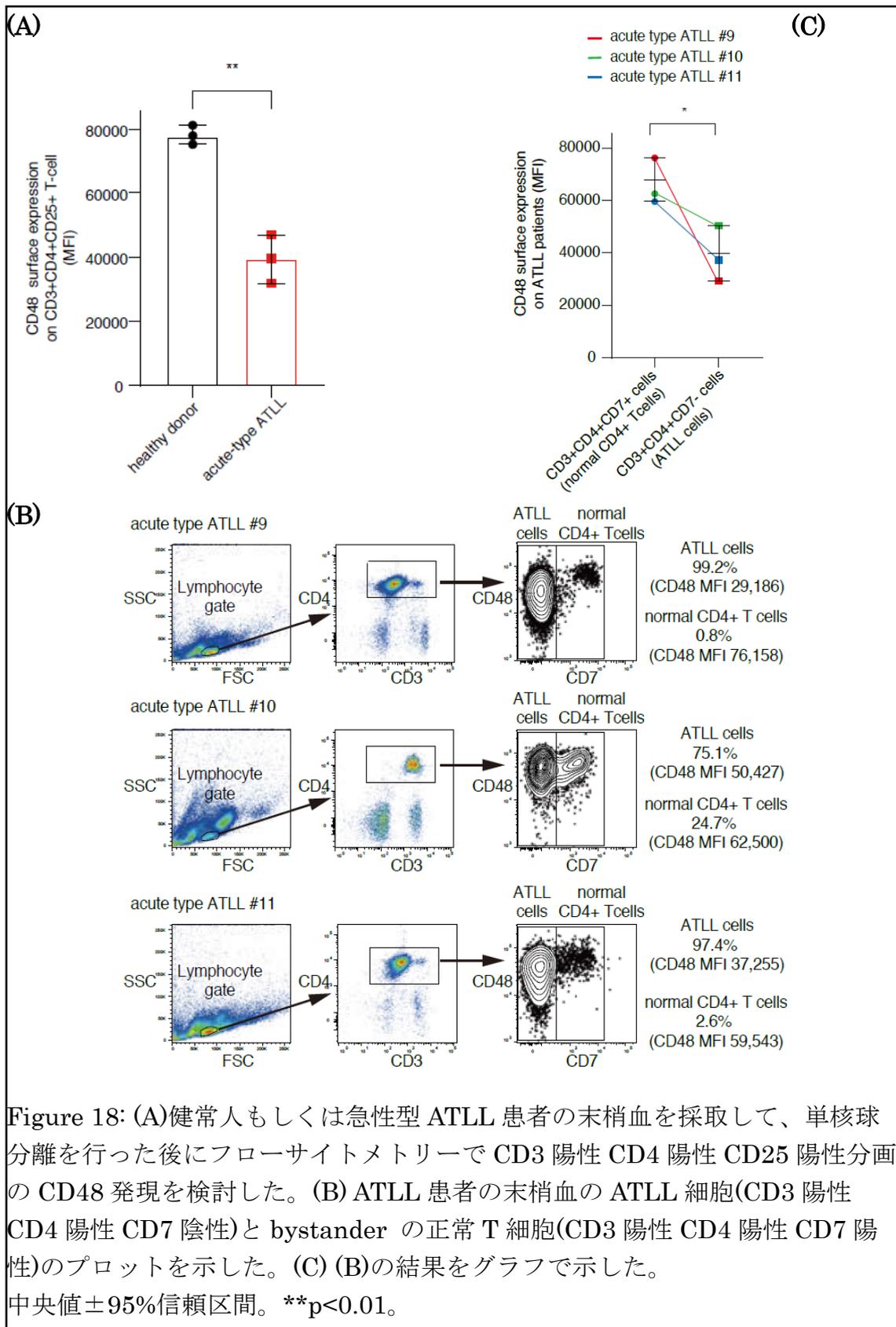


Figure 17: マイクロアレイにより解析された ATLL 患者もしくは健康人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞の mRNA の公開データ (GSE33615, GSE1466) を用いて CD48 発現の解析を行った。中央値±95%信頼区間。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ 。

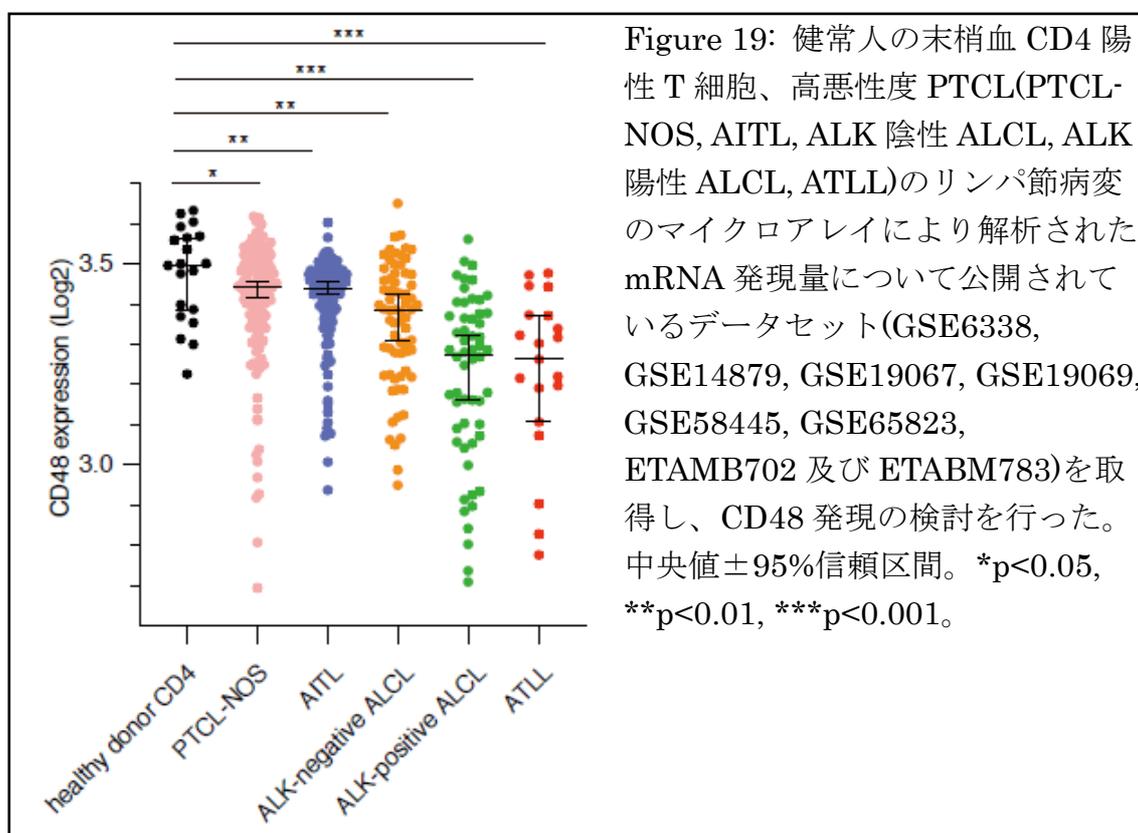
## 17. ATLL 細胞の CD48 タンパク質発現の検討

CD48 のタンパク質発現解析のために健康人もしくは急性型 ATLL 患者の末梢血をフローサイトメトリーで解析した。健康人と比較して ATLL 患者の CD3 陽性 CD4 陽性 CD25 陽性分画(ATLL における腫瘍分画)の CD48 タンパク質発現は低下していた。更に ATLL 患者の末梢血において ATLL 細胞(CD3 陽性 CD4 陽性 CD7 陰性)と bystander の正常 CD4 陽性 T 細胞(CD3 陽性 CD4 陽性 CD7 陽性)では ATLL 細胞の CD48 発現が有意に低下していた。ATLL 細胞の CD48 は mRNA、タンパク質のいずれにおいても低下していることを示した。



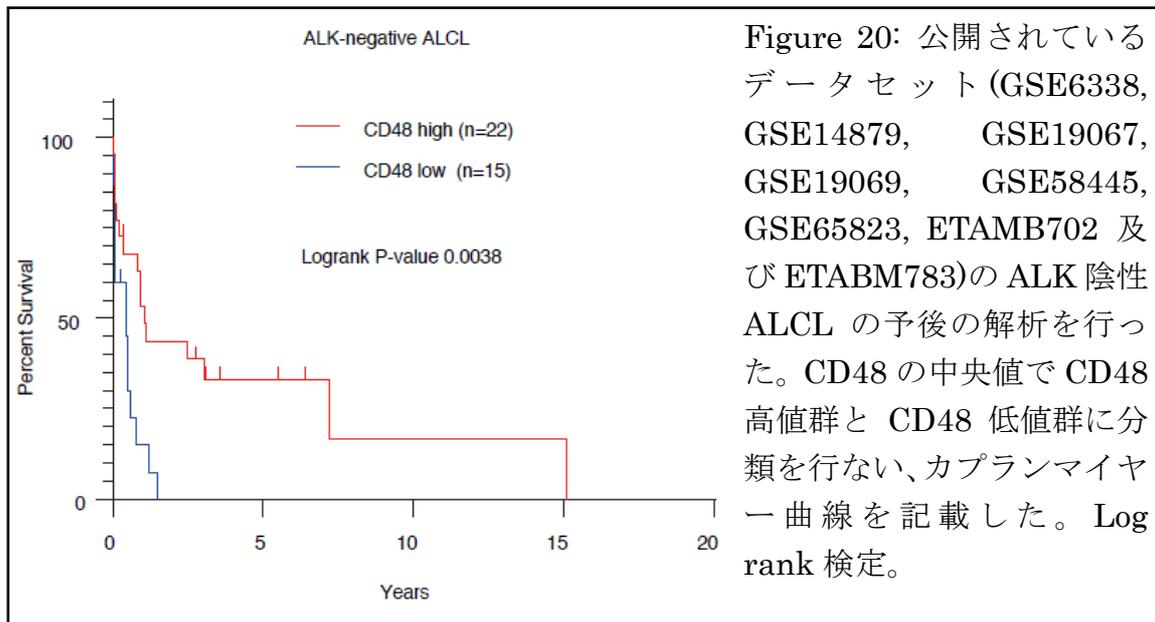
## 18. PTCL のリンパ節病変の CD48 mRNA 発現の検討

次に ATLL を含む高悪性度 PTCL の CD48 mRNA の発現について検討した。マイクロアレイにより解析された健常人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞、PTCL (PTCL-not otherwise specified (NOS)、angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL)、ALK 陰性 ALCL、ALK 陽性 ALCL、ATLL) のリンパ節病変の mRNA 発現量について公開されているデータセット (GSE6338, GSE14879, GSE19067, GSE19069, GSE58445, GSE65823, ETAMB702 及び ETABM783) を取得し解析した。健常人と比べて高悪性度 PTCL では CD48 発現が低下しており、ALK 陽性 ALCL と ATLL で特に CD48 発現が低下していた。



## 19. CD48 発現と予後の解析

上記で使用したデータセット (GSE6338, GSE14879, GSE19067, GSE19069, GSE58445, GSE65823, ETAMB702 及び ETABM783) に予後の情報があり、ALK 陰性 ALCL の予後の解析を行った。CD48 の中央値で 2 群に分類すると、CD48 低値群で ALK 陰性 ALCL の予後が有意に不良であった。



## 20. ALK 陰性 ALCL 細胞株を用いて NK 細胞傷害アッセイ

CD48 低値の ALK 陰性 ALCL が予後不良であることの一因が NK 細胞免疫からの逃避であることを示すために、Cas9 導入済みの ALK 陰性 ALCL 細胞株 (TLBR2) に sgCD48#3 を用いて CD48 をノックアウトさせたものを標的細胞として、エフェクター細胞には健常人の末梢血から分離した NK 細胞を用い、NK 細胞傷害アッセイを行った。コントロールである TLBR2-sgAAVS1 と比較して TLBR2-sgCD48 は生存細胞の減少が乏しく、CD48 ノックアウトによる NK 細胞免疫からの逃避を示すことができた。この結果から、CD48 低値の ALK 陰性 ALCL が予後不良であることの一因が NK 細胞免疫逃避であることを示し、CD48 が高悪性度 PTCL の予後にも関わる可能性を示した。

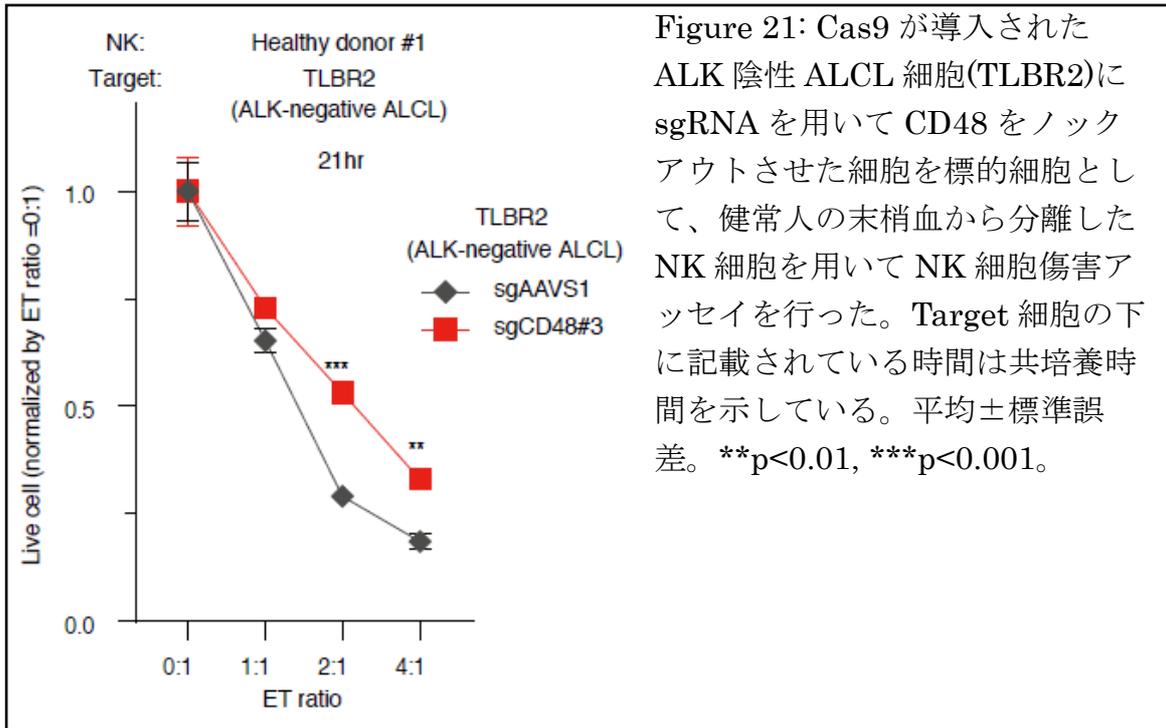


Figure 21: Cas9 が導入された ALK 陰性 ALCL 細胞(TLBR2)に sgRNA を用いて CD48 をノックアウトさせた細胞を標的細胞として、健常人の末梢血から分離した NK 細胞を用いて NK 細胞傷害アッセイを行った。Target 細胞の下に記載されている時間は共培養時間を示している。平均±標準誤差。 \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001。

## 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 NK 細胞免疫から逃避する ATLL の分子として CD48 を同定した。CD48 ノックアウト ATLL 細胞の NK 細胞免疫からの抵抗性については NK 細胞株の YT1、4 人の健常人の NK 細胞、2 人の ATLL 患者の NK 細胞で確認できた。ATLL 患者検体の mRNA の解析によって病勢の進行に一致して ATLL 細胞の CD48 mRNA が低下しており、CD48 が ATLL の病態形成に関わっている可能性を示した。また IL2/STAT5B 軸の不活性化が IL2 依存性 ATLL 細胞株の CD48 発現を低下させることを今回示した。このことは患者検体の ATLL 細胞は活性化 STAT5 の発現が乏しく (Morichika et al., 2019)、特に急性型 ATLL 症例の大多数が IL2 への反応性が乏しいことを反映している (Chen et al., 2010; Maeda et al., 2020)。ATLL 以外の高悪性度 PTCL のリンパ腫細胞の CD48 発現が低下していることも我々は今回示した。ALK 陽性 ALCL と ATLL の CD48 の発現が特に低値であり、CD48 発現低値の ALK 陰性 ALCL の予後が不良であることが今回の研究で明らかになった。この予後不良の一因は ALK 陰性 ALCL の細胞株の TLBR2 を用いた NK 細胞傷害アッセイの結果から CD48 が低値であると ALK 陰性 ALCL は NK 細胞免疫からの逃避が生じるからであると考えられた。これらの発見は高悪性度 PTCL の CD48 発現は NK 細胞免疫に重要であることを示唆している。

NK 細胞は固形癌やホジキンリンパ腫において、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果と関連することが近年示されている (Barry et al., 2018; Cader et al., 2020; Huntington et al., 2020)。特に直接的な NK 細胞傷害活性が抗 programmed cell death 1(PD1)/PD-L1 免疫チェックポイント阻害薬の抗腫瘍効果を高めることも報告されている (Dong et al., 2019; Hsu et al., 2018; Vari et al., 2018)。免疫チェックポイント阻害薬は高悪性度 PTCL で臨床試験が現在進行している (NCT02631746, UMIN000020601)。CD48 が高悪性度 PTCL の免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーとなる可能性が今回の研究で示唆された。

CD48 は血液細胞に恒常的に発現しており、急性骨髄性白血病は CD48 発現を低下させることで NK 細胞免疫から逃避することが報告されている (Elias et al., 2014)。我々が知る限りでは、今回の研究は NK 細胞免疫の逃避に関する CD48 の役割についてリンパ腫で検討した最初の報告である。NK 細胞の活性化は NK 細胞の活性化と抑制に関わる高度に多様な受容体のバランスによって複雑に制御されており (Huntington et al., 2020)、個々人の腫瘍細胞が各々独自の機序で NK 細胞免疫から逃避していることが示唆される。今回の研究で 5

種類の高悪性度 PTCL 細胞株全てで CD48 ノックアウトにより NK 細胞免疫抵抗性になることを示した。このことから高悪性度 PTCL は CD48 発現が低下することで高頻度に NK 細胞免疫から逃避することが考えられ、高悪性度 PTCL の腫瘍形成機序の一端を示すことができた。

CD48 の相同遺伝子である接着分子の CD58 は T 細胞及び NK 細胞の CD2 と結合して、T 細胞及び NK 細胞を活性化させる。高悪性度 PTCL と B 細胞性リンパ腫の腫瘍細胞で CD58 の遺伝子異常が高頻度に認められ、かつ B 細胞性リンパ腫の CD58 は NK 細胞からの免疫逃避に関わっていることが機能的に示されていることから、ATLL においても CD58 は NK 細胞免疫に重要な遺伝子と推察されていた(Challa-Malladi et al., 2011; Chapuy et al., 2018; Ennishi et al., 2019; Kataoka et al., 2015; Lacy et al., 2020; Schmitz et al., 2018; Watatani et al., 2019; Yoshida et al., 2014)。しかし、CD58 をノックアウトさせた ATLL 細胞は今回行ったクリスパースクリーニングとその次に行った NK 細胞傷害アッセイにおいても NK 細胞からの免疫逃避を示さなかった。これらのことから、CD58 は高悪性度 PTCL の病態においては NK 細胞免疫とは異なる役割を果たしている可能性が示唆される。

今回我々は NK 細胞免疫に関わる ATLL 細胞の遺伝子を機能的かつ網羅的に解析するために CRISPR-Cas9 スクリーニングを行い、ATLL において遺伝子異常を認めない CD48 を同定した。実際に CD48 ノックアウトさせた ATLL 細胞又は NK 細胞免疫から逃避を示した。更に ATLL 細胞のみならず高悪性度 PTCL 細胞の CD48 発現が低下していることも明らかにした。CD48 は ATLL 細胞のみならず高悪性度 PTCL においても NK 細胞免疫に関わる重要な遺伝子であり、今後の免疫チェックポイント阻害薬のバイオマーカーになりうる可能性が示唆され、今後の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

- 機能的かつ網羅的な CRISPR/Cas9 ノックアウトスクリーニングにより ATLL 細胞の NK 細胞免疫に関わる遺伝子として CD48 を同定し、CD48 が ATLL の NK 細胞免疫に重要であることを示した。
- ATLL において IL2/STAT5B 軸が CD48 発現調節していることを明らかにした。
- CD58 は ATLL において遺伝子異常が認められるが、これは NK 細胞免疫には影響を及ぼさないことを示した。
- ATLL のみならず高悪性度 PTCL においても CD48 発現が低下しており、特に ALK 陽性 ALCL と ATLL の CD48 が低値であることを示した
- ALK 陰性 ALCL においては CD48 発現が低い群で予後不良であり、この一因が NK 細胞免疫からの逃避で生じる可能性を示した。

### 2. 新知見の意義

ATLL は現在行われている化学療法に対する効果が乏しく、予後不良であるために新規の治療法の開発を行うことは必要不可欠である。現在高悪性度 PTCL に対して免疫チェックポイント阻害薬の臨床試験が進行している。免疫チェックポイント阻害薬は全症例に有効ではないことから、免疫チェックポイント阻害薬が有効と予想される症例を見出すことは重要である。NK 細胞が免疫チェックポイント阻害薬の奏功に関連する報告があることから、CD48 が高悪性度 PTCL に対する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ある。

### 3. 今後の研究展開

本検討では、ATLL において NK 細胞免疫に抵抗性を示す分子として CD48 を見出して検討を行った。一方、今回のスクリーニングではノックアウトにより NK 細胞免疫によって排除されやすい分子も同定している。この上位 10 個は DExD/H-Box Helicase 60、Ankyrin Repeat Domain 34A、Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 6、Zwilch Kinetochores Protein、cold shock domain containing C2、Latexin、

Interferon Alpha 10、Akirin 1、CATSPER2、Serp Family C Member 1 であった。これらの遺伝子を ATLL 細胞内でノックアウトした場合に NK 細胞免疫回避が減弱することが確認できれば、将来的に免疫細胞治療への応用研究に発展させることが可能性であり、検討を進める。

今回の検討では、ATLL において CD48 の発現での予後の解析を試行できなかった。ATLL は稀少疾患であり、症例数が少なく解析が困難である。日本では九州・沖縄地方は HTLV-1 高浸淫地域であり、ATLL 症例数が多い (Matsuoka and Jeang, 2007)。そのため、久留米大学医学部病理学と協力し、同研究室が有する豊富な ATLL 症例のデータを使用して CD48 の発現と予後の関連を検討する。

CD48 は T 細胞の活性化にも関与している。腫瘍免疫は NK 細胞のみならず T 細胞も重要であることから、T 細胞における検討を行いたい。しかし、T 細胞は major histocompatibility complex(MHC)拘束性があるために、今回使用した ATLL 細胞株と同一の MHC を持つ T 細胞検体を得ることは難しいと考えられる。近年 chimeric antigen receptor(CAR)-T 細胞療法が血液腫瘍で施行されており、治療効果を認めている。CAR-T 細胞は HLA 非拘束性に応答するために、ドナーから得られた T 細胞に CAR を導入して患者に投与する治験も現在行われている (Depil et al., 2020)。ATLL では CCR4 が高発現しており、実際にモガムリズマブによる治療標的になっている。そのため CCR4 を標的とした CAR-T 細胞を作成しこの細胞をエフェクター細胞として用いたときに CD48 が CAR-T 細胞から逃避に関与するかを検討している。

## 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、荒隆英先生、下  
埜城嗣先生、石尾崇先生（現 JA 北海道厚生連札幌厚生病院）、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

北海道大学大学院 医学研究院 附属動物実験施設 医歯学総合研究棟 実験生  
物部門

武井 則雄先生

北海道大学大学院薬学研究院 生体機能学研究室

前仲勝実先生、乙黒聡子先生

京都大学 ウイルス・再生医科学研究所

前田道之先生

長崎大学病院 検査部

長谷川寛雄先生

札幌愛育病院

泉山康先生、小笠原励起先生（現札幌北楡病院）

札幌北楡病院

笠原耕平先生（現恵庭第一病院）

Lymphoid Malignancies Branch, National Cancer Institute, NIH

Liyanage P. Perera 先生、Thomas A. Waldmann 先生

Blood Cell Development and Function Program, Fox Chase Cancer Center

Yibin Yang 先生

末梢血を提供していただいた健常人と ATLL の患者様

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。本研究は私の力だけでは実施できず、様々な方のご助力を得て実施できたものだと考えておりますので、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。

**This research will be originally published in Blood. Author(s). Genome-wide CRISPR screens identify CD48 defining susceptibility to NK cytotoxicity in peripheral T-cell lymphomas. Blood. in press. © by the American Society of Hematology.**

## 利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

## 引用文献

Asano, N., Miyoshi, H., Kato, T., Shimono, J., Yoshida, N., Kurita, D., Sasaki, Y., Kawamoto, K., Ohshima, K., and Seto, M. (2018). Expression pattern of immunosurveillance - related antigen in adult T cell leukaemia/lymphoma. *Histopathology* *72*, 945-954.

Bald, T., Krummel, M.F., Smyth, M.J., and Barry, K.C. (2020). The NK cell–cancer cycle: advances and new challenges in NK cell–based immunotherapies. *Nat Immunol* *21*, 835-847.

Barry, K.C., Hsu, J., Broz, M.L., Cueto, F.J., Binnewies, M., Combes, A.J., Nelson, A.E., Loo, K., Kumar, R., and Rosenblum, M.D. (2018). A natural killer–dendritic cell axis defines checkpoint therapy–responsive tumor microenvironments. *Nat Med* *24*, 1178-1191.

Behan, F.M., Iorio, F., Picco, G., Gonçalves, 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.

Cader, F.Z., Hu, X., Goh, W.L., Wienand, K., Ouyang, J., Mandato, E., Redd, R., Lawton, L.N., Chen, P.-H., and Weirather, J.L. (2020). A peripheral immune signature of responsiveness to PD-1 blockade in patients with classical Hodgkin lymphoma. *Nat Med* *26*, 1468-1479.

Challa-Malladi, M., Lieu, Y.K., Califano, O., Holmes, A.B., Bhagat, G., Murty, V.V., Dominguez-Sola, D., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2011). Combined genetic inactivation of  $\beta 2$ -Microglobulin and CD58 reveals frequent escape from immune recognition in diffuse large B cell lymphoma. *Cancer Cell* *20*, 728-740.

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

Chen, J., Petrus, M., Bryant, B.R., Phuc Nguyen, V., Goldman, C.K., Bamford, R., Morris, J.C., Janik, J.E., and Waldmann, T.A. (2010). Autocrine/paracrine cytokine stimulation of leukemic cell proliferation in smoldering and chronic adult T-cell leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* *116*, 5948-5956.

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.

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.

de Leval, L., Rickman, D.S., Thielen, C., Reynies, A., Huang, Y.L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Brière, J., Molina, T., *et al.* (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* *109*, 4952-4963.

Depil, S., Duchateau, P., Grupp, S.A., Mufti, G., and Poirot, L. (2020). 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nat Rev Drug Discov* *19*, 185-199.

Dong, W., Wu, X., Ma, S., Wang, Y., Nalin, A.P., Zhu, Z., Zhang, J., Benson, D.M., He, K., and Caligiuri, M.A. (2019). The mechanism of Anti-PD-L1 antibody efficacy against PD-L1-Negative tumors identifies NK cells expressing PD-L1 as a cytolytic effector. *Cancer Discov* *9*, 1422-1437.

Eckerle, S., Brune, V., Döring, C., Tiacci, E., Bohle, V., Sundström, C., Kodet, R., Paulli, M., Falini, B., and Klapper, W. (2009). Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma. *Leukemia* *23*, 2129-2138.

Elias, S., Yamin, R., Golomb, L., Tsukerman, P., Stanietsky-Kaynan, N., Ben-Yehuda, D., and Mandelboim, O. (2014). Immune evasion by oncogenic proteins of acute myeloid leukemia. *Blood* *123*, 1535-1543.

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.

Espí, A., Arenas, J., García-Granero, E., Martí, E., and Lledó, S. (1996). Relationship of curative surgery on natural killer cell activity in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* *39*, 429-434.

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

Ezinne, C.C., Yoshimitsu, M., White, Y., and Arima, N. (2014). HTLV-1 specific CD8+ T cell function augmented by blockade of 2B4/CD48 interaction in HTLV-1 infection. *PLoS One* *9*, e87631.

Fridman, W.H., Zitvogel, L., Sautès-Fridman, C., and Kroemer, G. (2017). The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol* *14*, 717-734.

Gibney, G.T., Weiner, L.M., and Atkins, M.B. (2016). Predictive biomarkers for checkpoint inhibitor-based immunotherapy. *Lancet Oncol* *17*, e542-e551.

Hiam-Galvez, K.J., Allen, B.M., and Spitzer, M.H. (2021). Systemic immunity in cancer. *Nat Rev Cancer* *21*, 345-359.

Hsu, J., Hodgins, J.J., Marathe, M., Nicolai, C.J., Bourgeois-Daigneault, M.-C., Trevino, T.N., Azimi, C.S., Scheer, A.K., Randolph, H.E., and Thompson, T.W. (2018). Contribution of NK cells to immunotherapy mediated by PD-1/PD-L1 blockade. *The Journal of clinical investigation* *128*, 4654-4668.

Huang, Y., De Reyniès, A., De Leval, L., Ghazi, B., Martin-Garcia, N., Travert, M., Bosq, J., Brière, J., Petit, B., and Thomas, E. (2010). Gene expression profiling identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* *115*, 1226-1237.

Huntington, N.D., Cursons, J., and Rautela, J. (2020). The cancer–natural killer cell immunity cycle. *Nature Reviews Cancer* *20*, 437-454.

Iqbal, J., Weisenburger, D., Chowdhury, A., Tsai, M., Srivastava, G., Greiner, T.C., Kucuk, C.,

Deffenbacher, K., Vose, J., and Smith, L. (2011). Natural killer cell lymphoma shares strikingly similar molecular features with a group of non-hepatosplenic  $\gamma \delta$  T-cell lymphoma and is highly sensitive to a novel aurora kinase A inhibitor in vitro. *Leukemia* *25*, 348-358.

Iqbal, J., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Vose, J.M., McKeithan, T., Kucuk, C., Geng, H., Deffenbacher, K., Smith, L., Dybkaer, K., *et al.* (2010). Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* *115*, 1026-1036.

Iqbal, J., Wright, G., Wang, C., Rosenwald, A., Gascoyne, R.D., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Smith, L., Guo, S., and Wilcox, R.A. (2014). Gene expression signatures delineate biological and prognostic subgroups in peripheral T-cell lymphoma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* *123*, 2915-2923.

Ishio, T., Kumar, S., Shimono, J., Daenthanasanmak, A., Dubois, S., Lin, Y., Bryant, B., Petrus, M.N., Bachy, E., Huang, D.W., *et al.* (2022). Genome-wide CRISPR screen identifies CDK6 as a therapeutic target in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* *139*, 1541-1556.

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

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.

Kataoka, K., Shiraishi, Y., Takeda, Y., Sakata, S., Matsumoto, M., Nagano, S., Maeda, T., Nagata, Y., Kitanaka, A., and Mizuno, S. (2016). Aberrant PD-L1 expression through 3' -UTR disruption in multiple cancers. *Nature* *534*, 402-406.

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.

Kogure, Y., Kameda, T., Koya, J., Yoshimitsu, M., Nosaka, K., Yasunaga, J.I., Imaizumi, Y., Watanabe, M., Saito, Y., Ito, Y., *et al.* (2021). Whole-genome landscape of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*.

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.

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.

Maeda, M., Tanabe-Shibuya, J., Miyazato, P., Masutani, H., Yasunaga, J.-i., Usami, K., Shimizu, A., and Matsuoka, M. (2020). IL-2/IL-2 receptor pathway plays a crucial role in the growth and malignant transformation of HTLV-1-infected T cells to develop adult T-cell leukemia. *Front Microbiol* *11*, 356.

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.

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.

Maura, F., Agnelli, L., Leongamornlert, D., Bolli, N., Chan, W.C., Doderio, A., Carniti, C., Heavican, T.B., Pellegrinelli, A., and Pruneri, G. (2019). Integration of transcriptional and mutational data simplifies the stratification of peripheral T - cell lymphoma. *Am J Hematol* *94*, 628-634.

Miyoshi, H., Kiyasu, J., Kato, T., Yoshida, N., Shimono, J., Yokoyama, S., Taniguchi, H., Sasaki, Y., Kurita, D., Kawamoto, K., *et al.* (2016). PD-L1 expression on neoplastic or stromal cells is respectively a poor or good prognostic factor for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* *128*, 1374-1381.

Morichika, K., Karube, K., Kayo, H., Uchino, S., Nishi, Y., Nakachi, S., Okamoto, S., Morishima, S., Ohshiro, K., and Nakazato, I. (2019). Phosphorylated STAT 3 expression predicts better

prognosis in smoldering type of adult T - cell leukemia/lymphoma. *Cancer Sci* 110, 2982-2991.

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.

Oka, M., Mitsunaga, H., Hazama, S., Yoshino, S., and Suzuki, T. (1993). Natural killer activity and serum immunosuppressive acidic protein levels in esophageal and gastric cancers. *Surg Today* 23, 669-674.

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.

Piccaluga, P.P., Agostinelli, C., Califano, A., Rossi, M., Basso, K., Zupo, S., Went, P., Klein, U., Zinzani, P.L., Baccarani, M., *et al.* (2007). Gene expression analysis of peripheral T cell lymphoma, unspecified, reveals distinct profiles and new potential therapeutic targets. *J Clin Invest* 117, 823-834.

Scarfò, I., Pellegrino, E., Mereu, E., Kwee, I., Agnelli, L., Bergaggio, E., Garaffo, G., Vitale, N., Caputo, M., Machiorlatti, R., *et al.* (2016). Identification of a new subclass of ALK-negative ALCL expressing aberrant levels of ERBB4 transcripts. *Blood* 127, 221-232.

Schantz, S.P., Shillitoe, E.J., Brown, B., and Campbell, B. (1986). Natural killer cell activity and head and neck cancer: a clinical assessment. *J Natl Cancer Inst* 77, 869-875.

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.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9, 671-675.

Shalem, O., Sanjana, N.E., Hartenian, E., Shi, X., Scott, D.A., Mikkelsen, 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.

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.

Tomayko, M.M., and Reynolds, C.P. (1989). Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice. *Cancer Chemother Pharmacol* *24*, 148-154.

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.

Vari, F., Arpon, D., Keane, C., Hertzberg, M.S., Talaulikar, D., Jain, S., Cui, Q., Han, E., Tobin, J., Bird, R., *et al.* (2018). Immune evasion via PD-1/PD-L1 on NK cells and monocyte/macrophages is more prominent in Hodgkin lymphoma than DLBCL. *Blood* *131*, 1809-1819.

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.

Yoshida, N., Karube, K., Utsunomiya, A., Tsukasaki, K., Imaizumi, Y., Taira, N., Uike, N., Umino, A., Arita, K., Suguro, M., *et al.* (2014). Molecular characterization of chronic-type adult T-cell leukemia/lymphoma. *Cancer Res* *74*, 6129-6138.

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.