



Title	CRISPR/Cas9 screeningによって同定されたMAD2L1BPとANAPC15はPTCLにおけるブレンツキシマブベッドチンへの感受性に関与する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	須藤, 啓斗
Description	配架番号 : 2910
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16418号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95550
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SUT0_Keito_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 須藤 啓斗

学 位 論 文 題 名

CRISPR/Cas9 screening によって同定された MAD2L1BP と ANAPC15 は PTCL における
ブレンツキシマブベドチンへの感受性に関与する

(Genome-wide CRISPR screen identifies MAD2L1BP and ANAPC15 as targets for
brentuximab vedotin sensitivity in CD30+ PTCL)

【背景と目的】末梢性 T 細胞性リンパ腫 (peripheral T-cell lymphoma; PTCL)は成熟 T 細胞に由来する悪性リンパ腫で、PTCL 非特定型、ALK 陽性未分化大細胞型リンパ腫 (ALK-positive anaplastic large cell lymphoma; ALK+ ALCL)、ALK 陰性 ALCL、成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL)などの多様な病型を含む疾患群である。PTCL は細胞表面マーカーの CD30 を高率に発現しており、同分子を標的としたブレンツキシマブベドチン (brentuximab vedotin; BV)は広く実臨床で用いられている。BV は高い有効性を示す一方で、奏功期間中央値が 7~12 ヶ月と報告されており、抵抗性の克服は重要な課題である。しかし、CD30 陽性 PTCL における BV への感受性規定因子については十分な検討がされてこなかった。これまでに我々のグループでは、CRISPR/Cas9 システムを導入した ATLL 細胞株を用いて、19,114 種類の遺伝子を網羅的にノックアウトさせ機能解析を行うことで、ATLL 細胞の生存と増殖に必須の遺伝子や、ATLL 細胞における NK 細胞からの免疫逃避に重要な分子を報告してきた。本研究ではこの技術を生かし、CD30 陽性 PTCL 細胞における BV の感受性亢進に関わる遺伝子、ならびに抵抗性に関与する遺伝子の機能的かつ網羅的スクリーニングを実施した。

【材料と方法】CD30 陽性 ALK+ ALCL 細胞株の DEL に対して Brunello CRISPR knockout library を用いて 19,114 種類の遺伝子群の sgRNA を導入した。sgRNA が導入された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することによりセクションを行った。2 週間継代培養した後、BV を加えて 6 日間培養した。コントロール群にはジメチルスルオキシドを加えた。生存した DEL 細胞のゲノム DNA を抽出し sgRNA 配列を PCR で増幅した後、検体をサイズセクションしシーケンス解析を施行した。各々の sgRNA 数を測定し、MAGeCK algorithm に従い、BV を加えた DEL 細胞の検体とジメチルスルオキシドを加えた DEL 細胞の検体の比を log2 換算して計算を行った。

【結果】上記のスクリーニングの結果、BV への感受性亢進に関わる分子として MAD2L1BP (MAD2L1 binding protein)と ANAPC15 (anaphase promoting complex subunit 15)を、BV への抵抗性に関わる分子として SLC39A7 (solute carrier family 39 member 7)を同定した。MAD2L1BP および ANAPC15 をノックアウトさせた ALK+ ALCL 細胞株と ATLL 細胞株を作成したところ、両細胞株ともに BV への感受性化を認めた。また、ALK+ ALCL xenograft マウスモデルの検証においても、MAD2L1BP ノックアウト群では BV の投与後、長期的に腫瘍の縮小効果が維持され有意に生存期間の延長が認められた。MAD2L1BP と ANAPC15 は後期促進複合体/サイクロソーム (anaphase-promoting complex enzyme/cyclosome; APC/C)の

活性化に関わることが報告されている。現在、MAD2L1BP や ANAPC15 を特異的に阻害する薬剤は開発されておらず、APC/C 阻害薬である proTAME と BV を併用したところ、複数の PTCL 細胞株で相乗作用を示し、さらに、急性型 ATLL 患者から分離した末梢血単核球についても有意に細胞毒性が増強した。このことから、MCC-APC/C 軸は BV の感受性化に関わる有望な治療標的であることが明らかとなった。次に、BV 抵抗性に関わる分子として同定した SLC39A7 についても検討を行った。SLC39A7 をノックアウトさせた ALK+ ALCL 細胞株と ATLL 細胞株を作成したところ、両細胞株ともに BV 抵抗性を示した。ノックアウト細胞株では細胞表面の CD30 発現量が低下しており、このことが BV 抵抗性の一因と推察された。さらに、ノックアウト細胞株では成熟体の CD30 タンパク質発現量の減少に付随して、前駆体の CD30 タンパク質の発現量上昇を認めた。また、ALK+ ALCL 細胞株に SLC39A7 阻害薬の NVS-ZP7-4 を投与したところ、コントロール群と比較して細胞表面の CD30 発現量低下に加えて小胞体に局在する CD30 の発現が有意に高かった。この結果から、SLC39A7 を阻害することで小胞体での前駆体 CD30 の翻訳後修飾が障害され、CD30 の成熟障害ならびに細胞表面への輸送が阻害されていることを明らかにした。さらに、ALK+ ALCL 患者検体を用いたマイクロアレイデータ解析で、CD30 と SLC39A7 の発現量が正の相関を示すことを見出し、SLC39A7 が CD30 の発現量調節に深く関与する分子である可能性を示した。

【考察】BV は抗 CD30 抗体に微小管阻害薬のモノメチルアウリスタチン E を結合させた抗体薬物複合体である。これまで、PTCL やホジキンリンパ腫における BV への耐性機序として、CD30 発現量の低下や多剤耐性遺伝子 (multi-drug-resistant genes) の発現量上昇などが示されてきたが、ゲノムワイドの機能的かつ網羅的な解析は本研究が初めてである。今回、BV の感受性化に関与する遺伝子として同定した MAD2L1BP と ANAPC15 は、その働きを抑制することで APC/C 活性が上昇し、細胞周期中期を延長・停止させることが知られている。しかし、残存する APC/C 活性によって細胞周期が進行し、M 期を脱出する現象 (mitotic slippage) が報告されており、微小管阻害薬の耐性機序の一つと考えられている。本研究では MCC-APC/C 軸を標的とすることで BV の効果が増強することを複数の PTCL 細胞株、ATLL 患者検体、xenograft マウスモデルで示し、CD30 陽性 PTCL 患者への臨床応用が期待される。BV への耐性化に関わる遺伝子については SLC39A7 を同定した。これまで、PTCL における CD30 の発現調節機構として IRF4 や STAT3 といった転写因子との関連性が指摘されてきたが、本研究では SLC39A7 が CD30 の発現量調節に関わる重要な分子の一つである可能性を初めて示した。SLC39A7 が BV への治療反応性を予測するバイオマーカーとなる可能性もあり、患者検体も用いたさらなる検討が望まれる。

【結論】我々は CRISPR/Cas9 システムを用いた機能的かつ網羅的なノックアウトスクリーニングを行い、CD30 陽性 PTCL において BV の感受性化に関わる重要な遺伝子として MAD2L1BP と ANAPC15 を同定した。さらに、MCC-APC/C 軸を治療標的とすることで BV の治療効果の増強や耐性の克服に結び付く可能性を示した。また、BV への耐性化に関わる遺伝子として SLC39A7 を同定し、同分子が CD30 発現量の調節に重要な役割を担っている可能性を示した。