



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16418
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95952
Type	doctoral thesis
File Information	SUT0_Keito.pdf



学 位 論 文

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)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

須 藤 啓 斗

学 位 論 文

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)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

須 藤 啓 斗

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
方法	10 頁
結果	18 頁
考察	35 頁
総括と結論	38 頁
謝辞	40 頁
利益相反	41 頁
引用文献	42 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受理され掲載予定である（オンライン公開済みである）。

著者：Keito Suto, Norio Takei, Keito Yokoyama, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Michiyuki Maeda, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Takanori Teshima, Yibin Yang, Masao Nakagawa

タイトル：Genome-wide CRISPR screen identifies MAD2L1BP and ANAPC15 as targets for brentuximab vedotin sensitivity in CD30+ PTCL

学術雑誌名：Leukemia (2024), Online ahead of print

本研究の一部は以下の学会で発表した。

1. Keito Suto, Norio Takei, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Michiyuki Maeda, Takanori Teshima, Masao Nakagawa

Genome-wide CRISPR Screen Identifies MAD2L1BP, ANAPC15 and SLC39A7 as Intrinsic Regulators for Brentuximab Vedotin Sensitivity in Peripheral T-cell Lymphoma Cells

65th ASH Annual Meeting, 2023 年 12 月 9 日, 米国・サンディエゴ

2. Keito Suto, Masahiro Chiba, Takashi Ishio, Hideki Goto, Tomoyuki Endo, Takanori Teshima, Masao Nakagawa

CRISPR screen identifies APC/C and SLC39A7 as intrinsic regulators for BV sensitivity in PTCL cells

The 85th Annual Meeting of JSH, 2023 年 10 月 13 日, 日本・東京

要 旨

【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 への抵抗性に関わる分子として SLC39A7 (solute carrier family 39 member 7) を、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) を同定した。SLC39A7 をノックアウトした 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。次に、BV への感受性亢進に関わる分子として同定した MAD2L1BP と ANAPC15 についても検討を行った。MAD2L1BP および ANAPC15 をノックアウトした 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) の活性化に関与す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。

【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

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。

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	adeno-associated virus integration site 1
ADCC	antibody dependent cellular cytotoxicity
ALK	anaplastic lymphoma kinase
AITL	angioimmunoblastic T-cell lymphoma
ALCL	anaplastic large cell lymphoma
ANAPC15	anaphase promoting complex subunit 15
APC/C	anaphase-promoting complex enzyme/cyclosome
ATLL	adult T-cell leukemia/ lymphoma
BSA	bovine serum albumin
BV	brentuximab vedotin
Cas9	CRISPR associated protein 9
CCK-8	cell counting kit-8
CD	cluster of differentiation
CI	combination index
CNV	copy number variant
CO ₂	carbon dioxide
CRISPR	clustered regularly interspaced short palindromic repeat
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
FSC	forward scatter
GFP	green fluorescent protein
IL	interleukin
MAD2L1BP	MAD2L1 binding protein
MCC	mitotic checkpoint complex
MFI	median fluorescence intensity
MMAE	monomethyl auristatin E
mRNA	messenger ribonucleic acid
NOG	non-obese diabetic mouse.Cg-rkdcscIdII2rgtm1Sug/ShiJic
nTFHL	nodal T-follicular helper cell lymphoma

PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PROTAC	proteolysis targeting chimera
PTCL	peripheral T-cell lymphoma
PTCL-NOS	peripheral T-cell lymphoma-not otherwise specified
SDS	sodium dodecyl sulphate
sgRNA	single guide ribonucleic acid
SLC39A7	solute carrier family 39 member 7
TAME	tosyl-l-arginine methyl ester
TNFR1	tumor necrosis factor receptor 1
TNFRSF8	tumor necrosis factor receptor superfamily member 8

緒 言

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 (PTCL-not otherwise specified; PTCL-NOS)、リンパ節濾胞性ヘルパーT 細胞性リンパ腫 (nodal T-follicular helper cell lymphoma; nTFHL)、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 (ALK-negative ALCL; ALK-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 では CD30 が高率に陽性であり、特に ALK+および ALK- ALCL では強陽性を示す (Karube et al, 2021)。このことから、CD30 を標的とした薬剤としてブレンツキシマブベドチン (brentuximab vedotin; BV)の開発が進められた。BV は抗 CD30 抗体に微小管阻害薬であるモノメチルアウリスタチン E (monomethyl auristatin E; MMAE)を結合させた抗体薬物複合体であり、初発ならびに再発・難治性の CD30 陽性 PTCL に対し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、BV 抵抗性の克服は重要な課題である (Francisco et al, 2003; Horwitz et al, 2022; Horwitz et al, 2014; Pro et al, 2012)。

BV 抵抗性の ALCL 細胞株を用いた検討では CD30 発現量の低下、すなわち抗原逃避が BV 抵抗性の機序の一つとして示されているが、BV 抵抗性の患者検体を用いた解析では CD30 の発現が保たれていることも報告されている (Chen et al, 2015)。このことは CD30 発現量以外の要素も BV への感受性に関与していることを示唆するものであり、それらについて明らかにするためには機能的かつ網羅的な解析が必要である。近年、このようなゲノムワイドの解析を行う手法として、clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9)システムが広く応用されている。CRISPR/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り (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)、我々のグループはこのシステムと約 20,000 遺伝子を標的とした単鎖ガイド RNA (single guide ribonucleic acid; sgRNA)ライブラリーを用いることで、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これまでに報告してきた (Ishio et al, 2022; Chiba et al, 2023)。

今回の研究では、CD30 陽性 ALK+ ALCL 細胞株に対して CRISPR/Cas9 システムおよび約 20000 遺伝子を標的とする sgRNA ライブラリーを用い、そこに BV を投与することで、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行った。その結果、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 抵抗性に関わる分子として SLC39A7 (solute carrier family 39 member 7)を同定した。

今回のスクリーニング結果について検証するため、MAD2L1BP および ANAPC15 をノックアウトした 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 は有糸分裂チェックポイント複合体阻害因子 (mitotic checkpoint complex inhibitor; MCC inhibitor)として知られており、これらの分子が MCC を阻害することで後期促進複合体/サイクロソーム (anaphase-promoting complex enzyme/cyclosome; APC/C)が活性化され、有糸分裂の終了が促進される (McAnish et al, 2023)。今回の実験結果から、MCC inhibitors の機能を抑制し有糸分裂を延長させることが BV への感受性化に重要であることが示唆された。現在、MAD2L1BP や ANAPC15 を特異的に阻害する薬剤は開発されていない。そこで、APC/C 阻害薬である proTAME (Zeng et al, 2010)と BV を併用したところ、CD30 陽性 ALK+ ALCL 細胞株および ATLL 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 BV の効果が増強した。このことから、MCC-APC/C 軸は BV の感受性化を高めるための有望な治療標的であることが明らかとなった。

次に、今回のスクリーニングで 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 をノックアウトした 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、スクリーニング結果の再現性が確認された。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。また、ALK+ ALCL 細胞株に SLC39A7 阻害薬である NVS-ZP7-4 を投与したところ、NVS-ZP7-4 投与群では細胞表面の CD30 発現量低下に加えて小胞体に局在する CD30 の発現が有意に高く、CD30 の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は、CD30 と SLC39A7 の発現量が正の相関を示し、SLC39A7 が CD30 の発現量調節に深く関与することを支持する結果が得られた。

本研究はゲノム編集技術である 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 の BV 感受性規定因子について検証した独創的研究である。本研究により、MCC-APC/C 軸が

有望な新規治療標的であること、ならびに SLC39A7 が CD30 発現量の調節に重要な役割を担い BV 抵抗性に関わることが新たに発見された。

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換え実験等安全管理規定」に従って、動物実験（承認番号：21-0096）と遺伝子組換え実験（承認番号：2022-009）の承認を得て施行した。

2. 細胞培養

ALK 陽性 ALCL 細胞株の DEL、Karpas299、SUDHL1 は Thomas Waldmann 先生に、ATLL 細胞株の ED40515(-)は京都大学ウイルス研究所の前田道之先生に、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。

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(nacal 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%CO₂ 下で培養した。IL-2 依存の細胞株である TL-Om1 にはヒトリコンビナント IL-2 (100 IU/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、DEL、ED40515(-)に対してそれぞれ pTO-Cas9-hygro ベクター、lenti-Cas9-Blast 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。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、lenti-Cas9-Blast ベクターはマサチューセッツ工科大学の Feng Zhang が作成したもので、Addgene から購入した (# 52962)。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°C、5%CO₂ 下で培養した。

3. 試薬および抗体

ブレンツキシマブベドチンは武田薬品工業株式会社より提供を受けた。APC/C 阻害薬の proTAME (I-440-01M)は R&D systems 社、SLC39A7 阻害薬の NVS-ZP7-4 (HY-114395)は MedChemExpress 社、オーロラ A キナーゼ阻害薬の alisertib (S1133)と PLK 阻害薬の volasertib (S2235)は Selleck Biotech 株式会社、トポイソメラーゼ 2 阻害薬のエトポシド (055-08431)と微小管阻害薬のビンクリスチン (220-02301)は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。

CD30 抗体 (Ber-H2, 333910)、mouse IgG1- κ 抗体 (MOPC-21, 400120)は BioLegend から購入した。CD30 抗体 (Ber-H2, sc-19658)、MAD2L1BP 抗体 (4-RE23, sc-134381)、ANAPC15 抗体 (H-9, sc-398488)は Santa Cruz Biotechnology から購入した。SLC39A7 抗体 (HPA053999)は Sigma-Aldrich から購入した。 α -tubulin 抗体 (1E4C11, HRP-66031)は Proteintech から購入した。Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse IgG (H+L)抗体 (A11029)は Invitrogen から購入した。Alexa Fluor[®] 594 Anti-Calreticulin 抗体 (EPR3924, ab275343)は abcam から購入した。Hoechst 33258 抗体 (H341)は Dojindo 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

ALK 陽性 ALCL の細胞株 (DEL)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 (2 μ g/mL)を投与してセクションをした。続けて、sgRNA による標的遺伝子をノックアウトするために 2 週間継代培養した。この DEL にブレンツキシマブベドチン 0.125 pM 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ホキシドを同様に加えた。生存した DEL 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 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)を用いてサイズセクションを行い Qubit (Thermo Fisher Scientific)で定量した後、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、ブレンツキシマブベドチン

を加えた DEL 細胞の検体とジメチルスルホキシドを加えた DEL 細胞の検体の比を log2 換算して計算を行った。

i5 indexed PCR primer:

D501,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTATAGCCTACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTATGCATGCTCTTGTGGAAAGGACGAAACAC
CG

D502,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACATAGAGGCACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTTGCATGCAGTCTTGTGGAAAGGACGAAAC
ACCG

D503,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCCTATCCTACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTGCATGCATCGTCTTGTGGAAAGGACGAAAC
ACCG

D504,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGGCTCTGAACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTCATGCATGACGTCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCG

D505,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACAGGCGAAGACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTCGTACGTATACATCTTGTGGAAAGGACGAA
ACACCG

D506,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTAATCTTAACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTACGTACGTGTATATCTTGTGGAAAGGACGA
AACACCG

D507,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACCAGGACGTACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTTACGTACGCGTGTATCTTGTGGAAAGGACG
AAACACCG

D508,AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACGTAAGTACACTCTTTCC
CTACACGACGCTCTTCCGATCTGTACGTACACCCGTATCTTGTGGAAAGGAC
GAAACACCG

i7 indexed PCR primer:

D701,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGAGTAATGTGACTGGAGTTCAG
ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt

D702,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATTCTCCGGAGTGACTGGAGTTCAG
ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt

D703,CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATAATGAGCGGTGACTGGAGTTCAG
ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttcccctgcactgt

D704,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGGAATCTCGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D705,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTCTGAATGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D706,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATACGAATTCGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D707,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATAGCTTCAGGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D708,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCATTAGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D709,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCATAGCCGGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D710,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATTTTCGCGGAGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D711,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATGCGCGAGAGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt
 D712,CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGATCTATCGCTGTGACTGGAGTTCAG
 ACGTGTGCTCTTCCGATCtctactattctttccctgcactgt

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 300×10^4 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℃、30 分以上で incubate した。PAX2 packaging plasmid (addgene #12260) 0.75 μ g と MD2.G packaging plasmid (addgene #12259) 0.25 μ g を添加した optimem (100 μ L) に特定の sgRNA plasmid を 200 ng 加えた。Vortex した後、lipofectamin2000 (Invitrogen #11668-019) 1.7 μ L を添加した optimem (100 μ 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 μ L ずつ添加し、37℃、5%CO₂、overnight で培養した。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%CO₂ で 24 時間培養した後、上清 (virus) を採取した。virus は vortex した後に 24 well plate に撒いた細胞株に polybrane (最終濃度 5 μ g/mL) とともに添加した。2500 rpm, 32℃, 90 min で遠心した後、37℃、5%CO₂、overnight で培養した。今回の実験では予めドキシサイクリン依存性に発現する Cas9 を導入した ALK 陽性 ALCL 細胞株 (DEL) と ATLL 細胞株 (ED40515(-)) に対し、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; 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。この sgRNA が感染した細胞にドキシサイクリン (最終濃度 40 ng/mL)を添加して Cas9 を発現させ、標的遺伝子のノックアウト細胞株を作成した。本実験で用いた sgRNA の標的配列を以下に記載した。

sgAAVS1: GGGGCCACTAGGGACAGGAT (コントロールとして用いた)

sgTNFRSF8#1: ATCCAGAACGGGCTTCCCCG

sgTNFRSF8#2: GATGTGGCACAGATCATGCC

sgSLC39A7#1: GGGGAGAGTTCGACTCCACG

sgSLC39A7#2: CACGCTCACAGTCATACACG

sgSLC39A7#5: GTGGGACTGTGGGTTCTCAG

sgMAD2L1BP#1: CTCAAGTAGTTCTATCTGGG

sgMAD2L1BP#2: GAAACCTCGGGCCACCACTG

sgANAPC15#1: ACAGAGTCTCAGTCACACGA

sgANAPC15#2: CCCACAGCTCCAAAGCATCG

sgSCAPER#1: AAGCTGCTGAGCTAAGCAGT

sgSCAPER#2: AATTGCTAGATCAACGACGC

sgTADA2A#1: GGCGATTTGCAAGAATTGTG

sgTADA2A#2: TTCTAAGGTTGATTAATCCA

sgLIN54#1: TTGTTAATACAACCCAGTG

sgLIN54#2: AAGTAGTTACCATTGGAGGG

6. 急性型 ATLL 患者の末梢血単核球分離および細胞増殖の検討

急性型 ATLL 患者の末梢血を採取後、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、ブレンツキシマブベドチンと proTAME を単独または併用で投与した。この細胞を 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で 4 日間培養した後に、123count™ eBeads Counting Beads (Invitrogen #01-1234)を用いて細胞数を測定した。

7. 細胞周期解析

ALK 陽性 ALCL の細胞株 (DEL, Karpas299)に GFP と特定の sgRNA を共発現したウイルスを感染させた。この特定の sgRNA を導入した細胞株 (GFP 陽性)と、sgRNA 非導入の野生型細胞株を 10 日間共培養した。この細胞にブレンツキシマブベドチン (0.125 pM)を投与し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 下で 24 時間培養した。また、APC/C 阻害薬の proTAME を併用した実験では、野生型の Karpas299 に対してブレンツキシマブベドチン (0.0625 pM)、proTAME ($20\text{ }\mu\text{M}$)、および両者

の併用を行い、37℃、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。1.0×10⁶ 個の細胞を 1700 rpm, 5 min, 4℃で遠心し、4℃の PBS を用いて 2 回 wash した後に、氷冷した 70%エタノールを加え、-20℃、overnight で細胞を固定した。固定された細胞は 5000 rpm, 3 min, 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 RNase A (500 mg/mL)を含むヨウ化プロピジウム(50 mg/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. ウェスタンブロット

細胞は 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℃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 120 V に固定して行った。Trans-Blot Turbo (Bio-Rad)にて 25V、15 分間電圧をかけ、PVDF メンブレン (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad #1704156)に転写した。転写したメンブレンは分子量マーカーの See Blue[®]Plus2 Pre-Stained Standard (Invitrogen, LC5925)をボールペンでマーキングして不要部分をカットした上で、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℃で一晩反応させた。反応後の膜を、0.05% Tween-PBS で 15 分間ずつ、3 回洗浄し、Sunflower Mini-Shaker 3D を用いて 0.05% Tween-PBS で希釈した二次抗体と 4℃で 1 時間反応させた。再度 0.05% Tween-PBS で 15 分間ずつ、3 回洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England)で化学発光を行い、ChemiDoc Touch (Bio-Rad)で検出した。

一次抗体の希釈比率は、MAD2L1BP 抗体 (sc-134381)と ANAPC15 抗体 (sc-398488)が 1:250、CD30 抗体 (sc-19658)と SLC39A7 抗体 (HPA053999)が 1:1000、 α -tubulin 抗体 (HRP-66031)が 1:10000 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、ともに 1:2000 の希釈比率で施行した。バンドの定量については ImageJ を使用した (Schneider et al, 2012)。

9. 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 100 μ L となるよう薬剤を投与した。2 日後に最終濃度が同等となるよう薬剤を 100 μ L 追加し、総量を 200 μ L とした。さらに 2 日後 (初回投薬時から 4 日後)に Cell Counting Kit-8 (Dojindo #CK04)を 1 well あたり 30 μ L 用いて代謝活性を検討した。吸光度は GloMax-Multi Detection System (Promega)を用いて 450 nm で測定した。Background は 10%ウシ胎児血清と 1%ペニシリン・スト렙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 200 μ L 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計算することにより、相対的な細胞生存率を測定した。

10. Combination Index の検討

2 種類の薬剤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 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 effect)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 effect 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。

11. Xenograft

雌の NOG マウス (NOD/Shi-scid, IL-2R γ KO Jic)はインビボサイエンス株式会社から購入した。sgMAD2L1BP または sgAAVS1 (コントロール)を導入した ALK 陽性 ALCL 細胞株 (DEL)を作成し、1 匹当たり 10^6 個の細胞株をマウスの右側腹部に皮下注射した。腫瘍径が 300 mm³に到達した段階でコントロール群、ブレンツキシマブベドチン (3 mg/kg) 投与群に分け、薬剤は尾静脈から経静脈的に単回投与した。腫瘍径はキャリパーを用いて測定し、腫瘍体積は $1/2 \times (\text{長径}) \times (\text{短径})^2$ で算出した。腫瘍体積が 2000 mm³に達した段階で人道的エンドポイントとして測定を終了した。

12. 蛍光免疫染色

12 well plate を用いて 1 well あたり 1.5×10^6 個の ALK 陽性 ALCL 細胞株 (DEL) を撒いた後、SLC39A7 阻害薬の NVS-ZP7-4 (2.5 μ M) を投与し、37°C、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。PBS で 2 回細胞を wash した後、1 スライドあたり 10^5 個の細胞をセットし、Cytospin 3 (Shandon) を用いて 800 rpm, 3 min で遠心し固着させた。PBS で希釈した 4% のパラホルムアルデヒド (Electron Microscopy Sciences) を添加し 10 分間、室温で incubate して細胞を固定した後、氷冷した 100% エタノールを添加し 10 分間、4°C で透過処理を行った。PBS で 3 回 wash 後、1% ウシ血清アルブミンを添加し 30 分間、室温でブロッキング処理を行った。PBS で 3 回 wash 後、1% ウシ血清アルブミンで希釈した一次抗体で 1 時間、室温で反応させた。再び PBS で 3 回 wash し、1% ウシ血清アルブミンで希釈した二次抗体を添加し、暗所で 1 時間、室温で反応させた。PBS で 3 回 wash 後、核染色用の Hoechst3328 を添加して 1 分間 incubate し、封入剤を 1 滴滴下しカバーガラスで封入した。サンプルは BZ-X800 (KEYENCE) を用いて観察し、取得した画像の定量解析には ImageJ Fiji を使用した。

13. 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 GSE1466、GSE6338、GSE14879、GSE19067、GSE19069、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)。

14. 統計解析

2 群の値の比較には、Welch t-test、多群間の多重比較には Tukey's 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 値 < 0.05 を有意とした。各実験は最低 2 回以上の技術的反復を行い、エラーバーは標準誤差 (生物学的反復) を表す。これらの統計学的解析は GraphPad Prism 9 (La Jolla, CA) を用いて行った。

結 果

1. sgRNA を用いた TNFRSF8 のノックアウトおよび細胞増殖アッセイ

まず初めに、今回 ALK 陽性 ALCL (ALK-positive anaplastic large cell lymphoma; ALK+ ALCL)細胞株の DEL を用いた実験系において、ブレンツキシマブベドチン (brentuximab vedotin; BV)の感受性が CD30 の発現量に依存するかどうかを検証するため、Cas9 を予め導入した ALK+ ALCL 細胞株の DEL と、ATLL 細胞株の ED40515(-)に sgRNA を用いて CD30 をコードする tumor necrosis factor receptor superfamily member 8 (TNFRSF8)をノックアウトした。限界希釈法によりシングルセルクローニングを行い、フローサイトメトリー及びウエスタンブロットで CD30 がノックアウトされている事を確認した。この細胞株に BV を投与したところ細胞毒性をほとんど認めず、BV への感受性が CD30 発現量に依存することが示された。

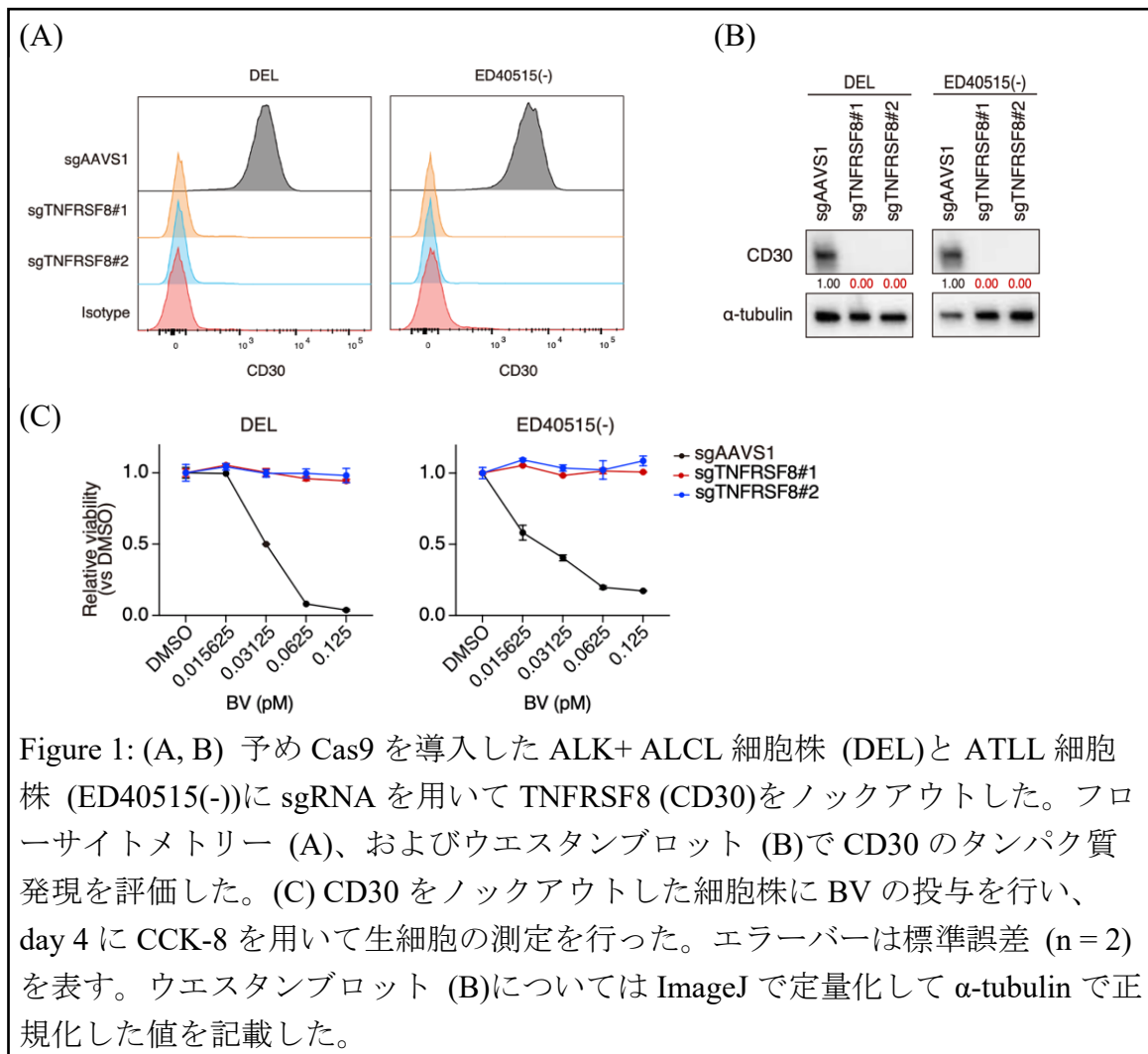
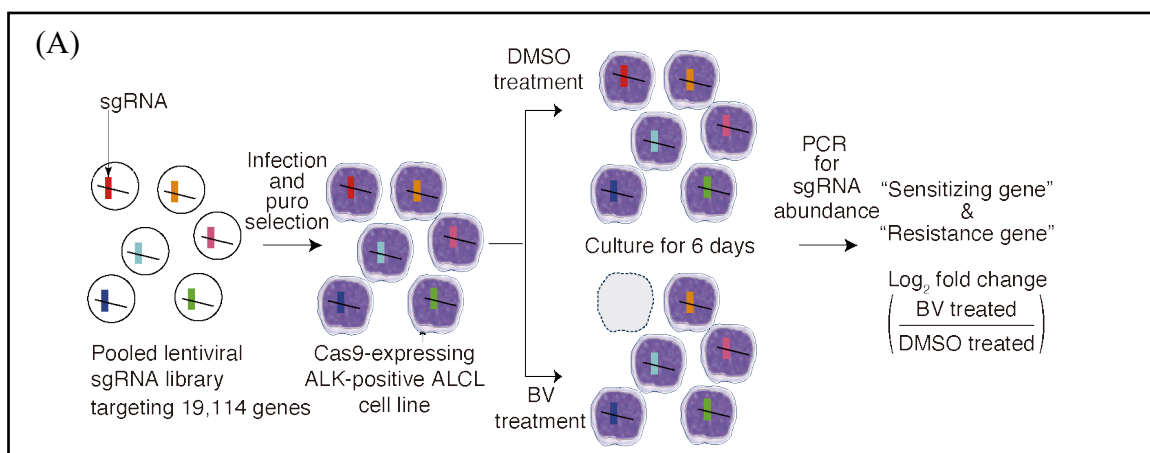
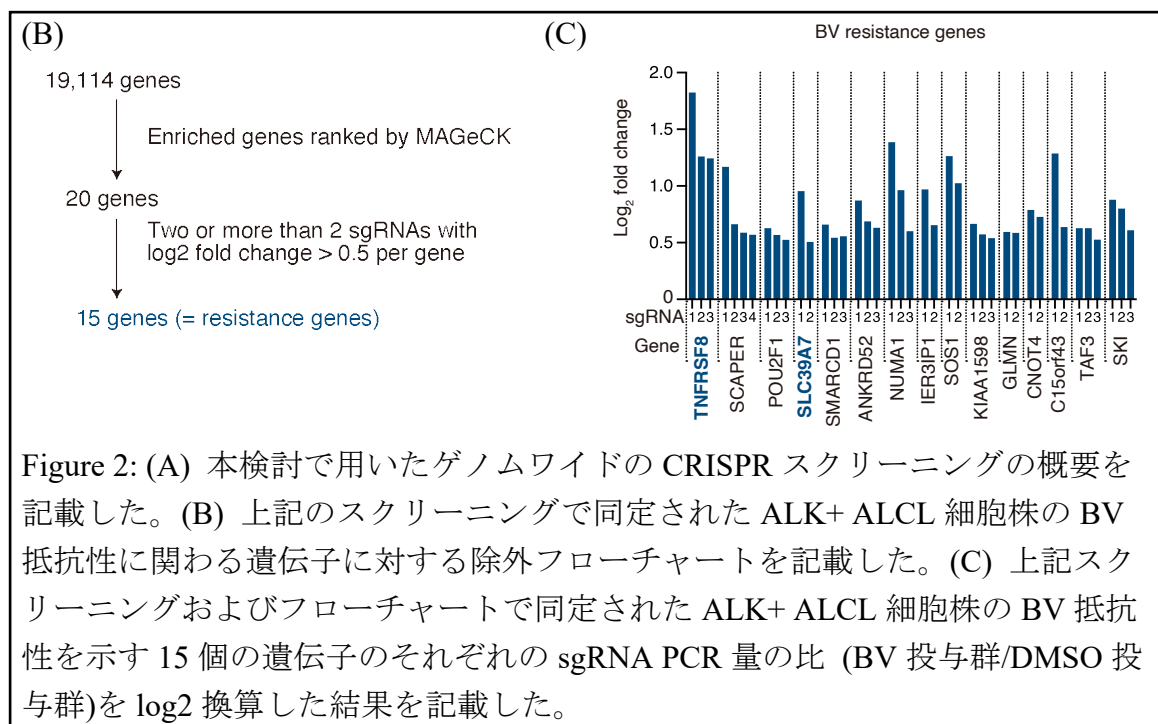


Figure 1: (A, B) 予め Cas9 を導入した ALK+ ALCL 細胞株 (DEL)と ATLL 細胞株 (ED40515(-))に sgRNA を用いて TNFRSF8 (CD30)をノックアウトした。フローサイトメトリー (A)、およびウエスタンブロット (B)で CD30 のタンパク質発現を評価した。(C) CD30 をノックアウトした細胞株に BV の投与を行い、day 4 に CCK-8 を用いて生細胞の測定を行った。エラーバーは標準誤差 (n = 2) を表す。ウエスタンブロット (B)については ImageJ で定量化して α -tubulin で正規化した値を記載した。

2. CRISPR ライブラリースクリーニングによるブレンツキシマブベドチンへの抵抗性に関わる ALK 陽性 ALCL の遺伝子の同定

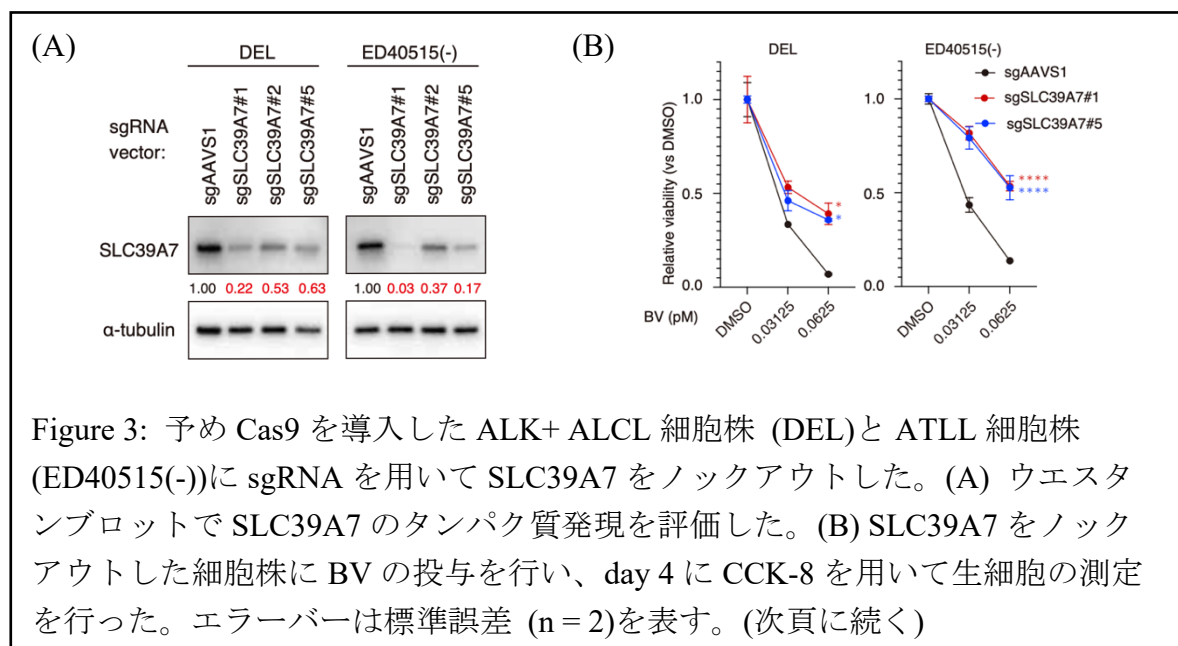
CD30 陽性 PTCL 細胞における BV の感受性亢進に関わる遺伝子、ならびに抵抗性に関与する遺伝子を同定することを目的として、Cas9 を予め導入した ALK+ ALCL 細胞株の DEL に 19,114 種類の遺伝子を標的とした sgRNA ライブラリーを感染させた。導入された細胞はピューロマイシン耐性を獲得しており、ピューロマイシンを投与してセレクションをした。この DEL に BV を加えて 6 日間培養した。また、コントロール群にはジメチルスルホキシド (DMSO) を加えて同様に培養した。生存細胞の sgRNA を PCR で定量し、BV 投与群とコントロール群の sgRNA 量の比 (BV 投与群/コントロール群) を $\log_2$ 換算した。sgRNA のノックアウトにより BV への耐性化を示し細胞数が上昇する上位 20 遺伝子の中で、2 個以上の sgRNA で $\log_2 \text{ fold change} > 0.5$ となるものを抽出したところ、15 個の遺伝子に絞られた。BV は CD30 依存性に抗体依存性細胞障害 (antibody dependent cellular cytotoxicity; ADCC) 活性を発揮することから、TNFRSF8 が抽出されたことはこのスクリーニングが適切であることを示すものと考えられた。今回抽出された遺伝子の中には、小胞体に存在する亜鉛トランスポーターである solute carrier family 39 member 7 (SLC39A7) が含まれていた。慢性骨髄性白血病細胞株の KBM7 を用いた検討で、SLC39A7 をノックアウトすると tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) の遊走が阻害され細胞表面の TNFR1 発現量が低下することが報告されている (Fauster et al, 2019)。この先行研究から、我々は SLC39A7 をノックアウトすると、TNFR1 と同様に TNF 受容体スーパーファミリーに属する CD30 も発現量が低下し、BV 抵抗性になるのではないかと仮説を立て、SLC39A7 に着目して実験を進めた。





3. sgRNA を用いた SLC39A7 のノックアウトおよび細胞増殖アッセイ

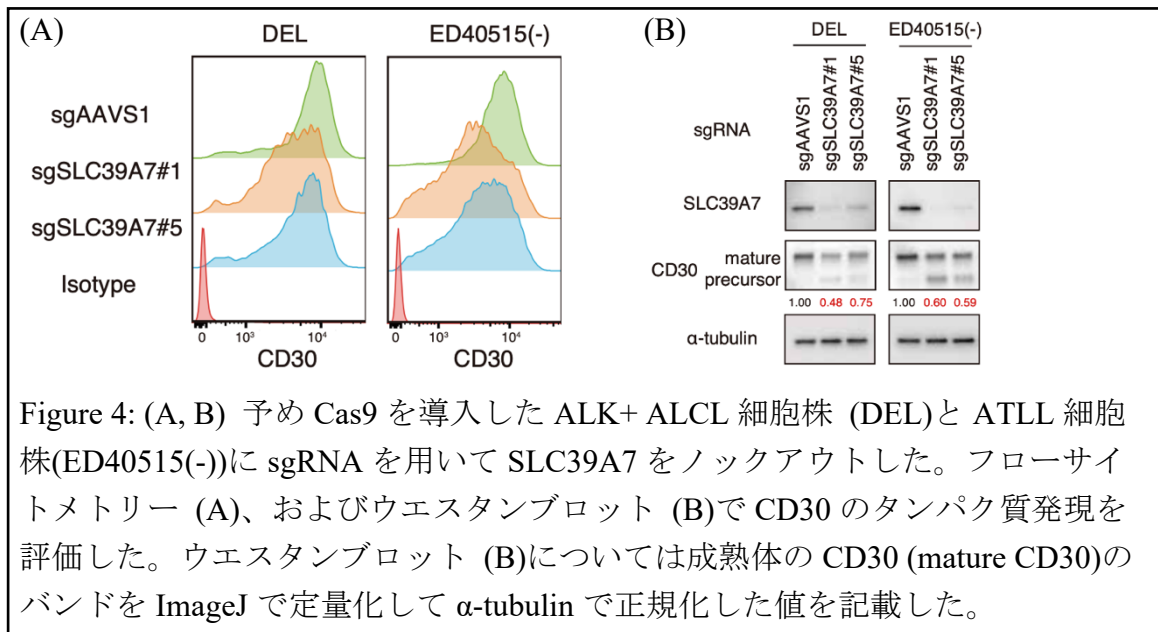
まず初めに、Cas9 を予め導入した ALK+ ALCL 細胞株の DEL と、ATLL 細胞株の ED40515(-)に sgRNA を用いて SLC39A7 をノックアウトし、ウエスタンブロットで標的遺伝子がノックアウトされている事を確認した。この細胞株に BV を投与したところ BV に抵抗性を示し、CRISPR スクリーニングの結果の再現性が確認された。



ウエスタンブロット (A)については ImageJ で定量化して α -tubulin で正規化した値を記載した。* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ 。

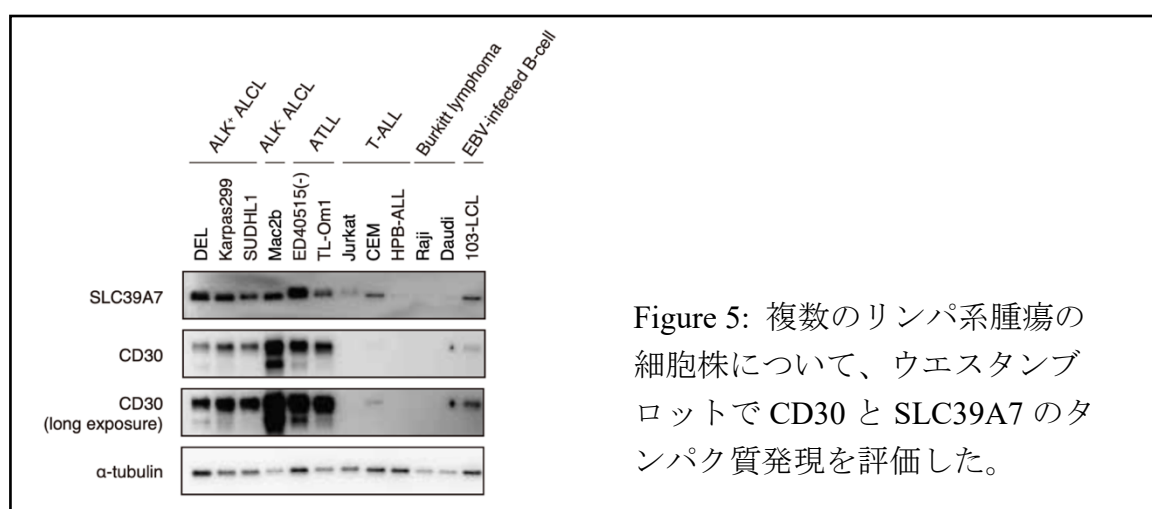
4. SLC39A7 ノックアウト細胞株における CD30 の細胞表面とタンパク質発現

SLC39A7 のノックアウトが ALK+ ALCL 細胞株 (DEL) と ATLL 細胞株 (ED40515(-)) の CD30 発現に与える影響を調べるため、SLC39A7 をノックアウトした細胞株の CD30 発現量をフローサイトメトリーで評価したところ、DEL、ED40515(-)ともに CD30 の MFI (median fluorescence intensity) の低下を認めた (DEL; sgAAVS1 (コントロール): 8221, sgSLC39A7#1: 4559, sgSLC39A7#5: 5855, ED40515(-); sgAAVS1 (コントロール): 7446, sgSLC39A7#1: 3158, sgSLC39A7#5: 4176)。続けて、ウエスタンブロットでタンパク質の発現量を評価した。CD30 は 90 kDa の前駆体 (precursor CD30) が翻訳後修飾を受けて 120 kDa の成熟タンパク質 (mature CD30) となることが報告されており (Horie et al, 1998; Nawrocki et al, 1988)、SLC39A7 ノックアウト細胞株では成熟体の CD30 発現低下に付随して、前駆体の CD30 発現の増加を認めた。これらの結果から、SLC39A7 のノックアウトによって CD30 の成熟が阻害され、細胞表面の CD30 発現量が低下することが BV 抵抗性の一因であると考えられた。CD30 陽性 PTCL 細胞において、SLC39A7 が CD30 の発現に深く関わる分子なのではないかと考え、さらに検討を行った。



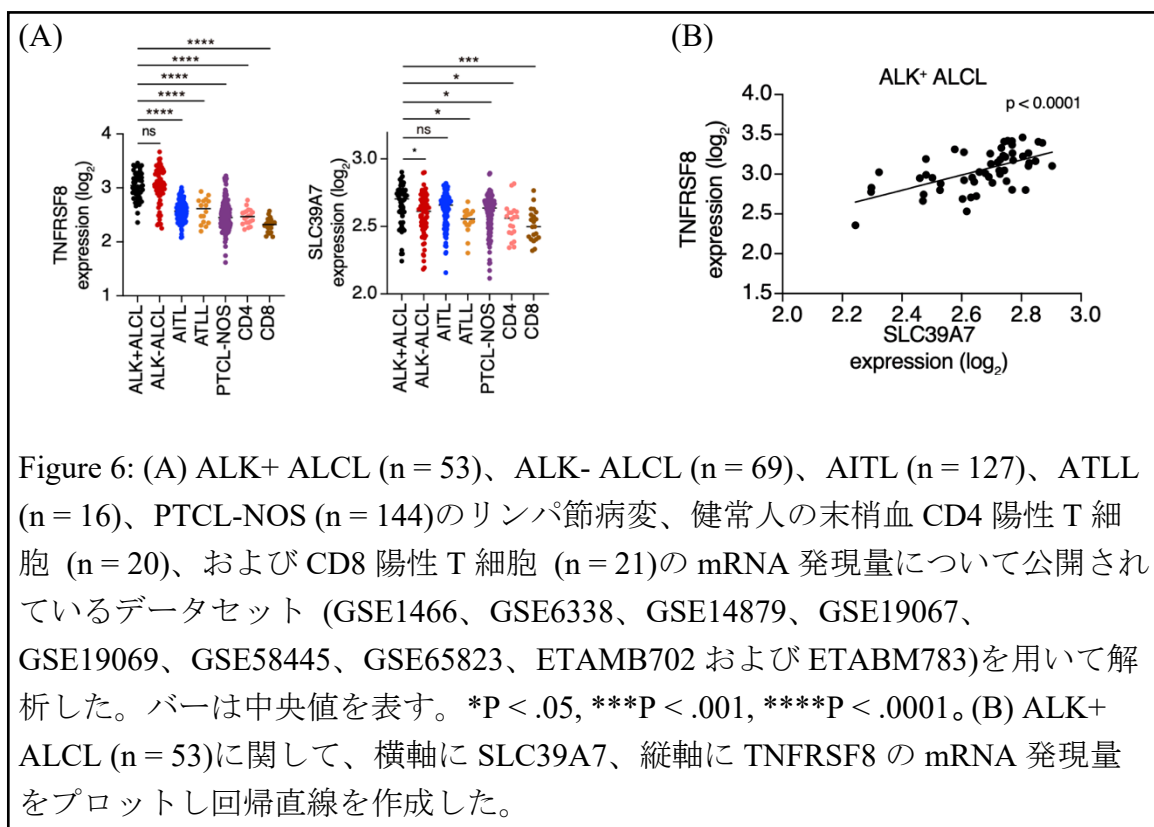
5. リンパ系腫瘍における CD30 および SLC39A7 のタンパク質発現

CD30 と SLC39A7 のタンパク質発現量の相関について検討することを目的として、ALK+ ALCL 細胞株 (DEL, Karpas299, SUDHL1)、ALK- ALCL 細胞株 (Mac2b)、ATLL 細胞株 (ED40515(-), TL-Om1)、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) 細胞株 (Jurkat, CEM, HPB-ALL)、Burkitt リンパ腫細胞株 (Raji, Daudi)、および EBV 感染 B 細胞細胞株 (103-LCL) について、ウエスタンブロットでタンパク質発現を評価した。その結果、CD30 のタンパク質発現を伴う細胞株では SLC39A7 の発現を認め、反対に CD30 発現の乏しい細胞株では SLC39A7 の発現もほとんど認めなかった。



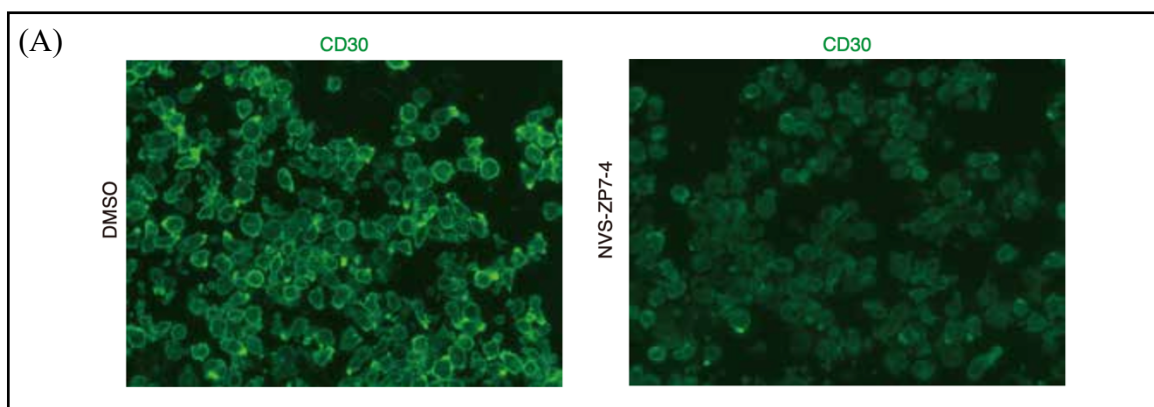
6. PTCL のリンパ節病変の TNFRSF8 および SLC39A7 の mRNA 発現の検討

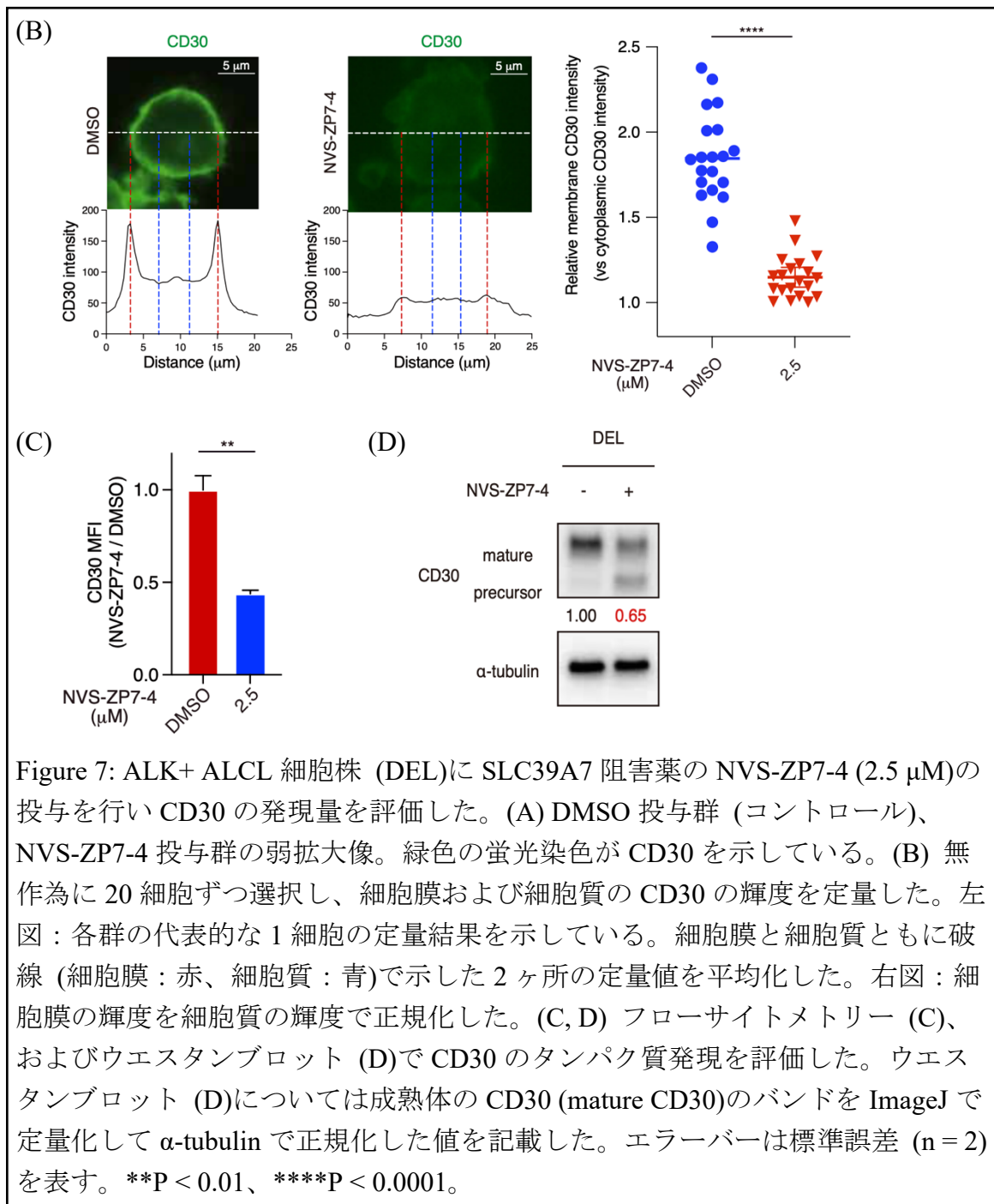
次に、PTCL および健常人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞について、TNFRSF8 (CD30) と SLC39A7 の messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現量を検討した。マイクロアレイにより解析された ALK+ ALCL、ALK- ALCL、血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫 (angioimmunoblastic T-cell lymphoma; AITL)、ATLL、PTCL-NOS のリンパ節病変、健常人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞の mRNA 発現量について公開されているデータセット (GSE1466、GSE6338、GSE14879、GSE19067、GSE19069、GSE58445、GSE65823、ETAMB702 および ETABM783) を用いて解析した。ALK+ ALCL は他の病型に比べて有意に TNFRSF8 (CD30) と SLC39A7 の発現量が高く、両者の発現量には正の相関が見られた。この結果は、CD30 陽性 PTCL 細胞において、SLC39A7 が CD30 の発現量調節に関わる分子の一つであることを支持するデータと考えられた。



7. NVS-ZP7-4 の投与による CD30 の発現量

次に、CD30 の細胞内分布を評価することを目的として、ALK+ ALCL 細胞株 (DEL)に SLC39A7 阻害薬の NVS-ZP7-4 の投与を行い、細胞膜および細胞質の CD30 発現量を蛍光免疫染色で評価した。その結果、NVS-ZP7-4 を投与された細胞株では有意に細胞膜の CD30 発現量が低下していた。また、細胞表面の CD30 発現量をフローサイトメトリーでも評価したところ、NVS-ZP7-4 投与群では 50%程発現が低下していた。さらに、タンパク質発現についてウェスタンブロットで評価したところ、成熟体の CD30 の低下ならびに前駆体の CD30 発現の増加を認めた。





8. NVS-ZP7-4 の投与による CD30 の細胞内局在

SLC39A7 は小胞体中存在する亜鉛トランスポーターであり、小胞体から細胞質に亜鉛を輸送することで細胞内亜鉛の恒常性維持に関与している (Kambe et al, 2015)。ここまでの実験結果から、SLC39A7 を阻害することで小胞体での CD30 の翻訳後修飾が適切に行われず、その結果として成熟体の CD30 が低下し、前駆体の CD30 が増加するのではないかと仮説を立てた。この仮説につい

て検証するため、ALK+ ALCL 細胞株 (DEL) に SLC39A7 阻害薬の NVS-ZP7-4 を投与し、CD30 ならびに小胞体マーカーであるカルレチクリンの共局在について蛍光免疫染色で評価した。その結果、NVS-ZP7-4 投与群では有意に細胞質内の CD30 と小胞体の共局在が増加しており、仮説を支持する結果が得られた。また、フローサイトメトリーで細胞内亜鉛量を評価したところ、NVS-ZP7-4 投与群で細胞内亜鉛濃度の上昇を認めた。これらの結果から、SLC39A7 を阻害することによる細胞内亜鉛分布の恒常性破綻が細胞表面 CD30 の発現量低下に影響を与えている可能性が示された。

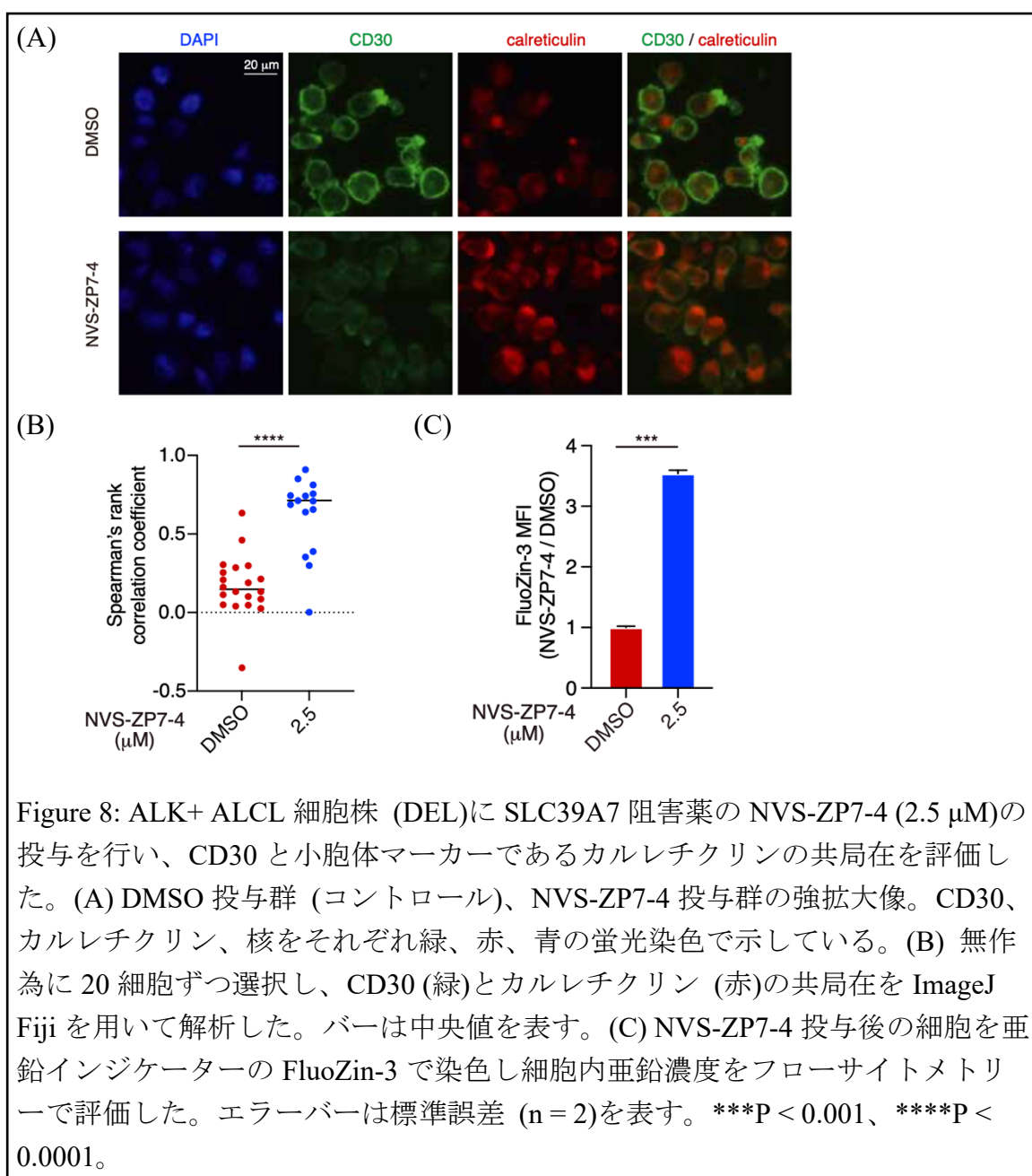
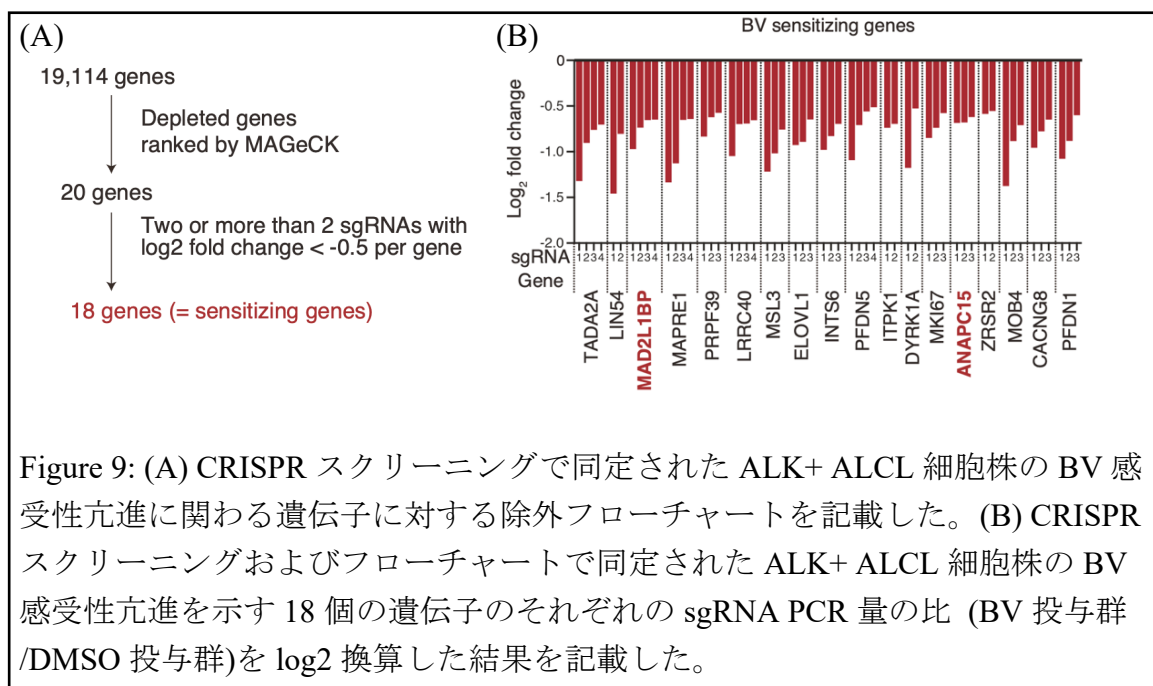


Figure 8: ALK+ ALCL 細胞株 (DEL) に SLC39A7 阻害薬の NVS-ZP7-4 (2.5 μ M) の投与を行い、CD30 と小胞体マーカーであるカルレチクリンの共局在を評価した。(A) DMSO 投与群 (コントロール)、NVS-ZP7-4 投与群の強拡大像。CD30、カルレチクリン、核をそれぞれ緑、赤、青の蛍光染色で示している。(B) 無作為に 20 細胞ずつ選択し、CD30 (緑) とカルレチクリン (赤) の共局在を ImageJ Fiji を用いて解析した。バーは中央値を表す。(C) NVS-ZP7-4 投与後の細胞を亜鉛インジケーターの FluoZin-3 で染色し細胞内亜鉛濃度をフローサイトメトリーで評価した。エラーバーは標準誤差 (n = 2) を表す。***P < 0.001、****P < 0.0001。

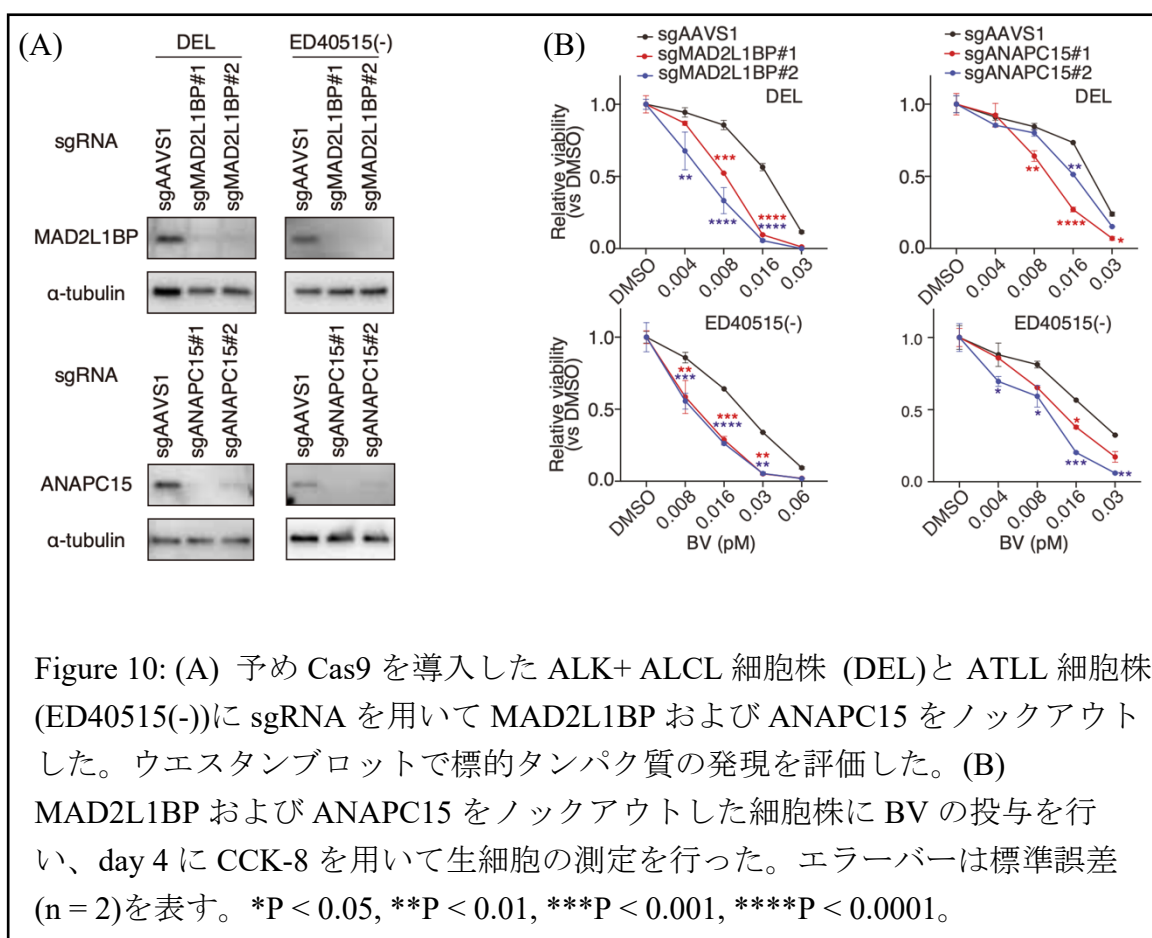
9. CRISPR ライブラリースクリーニングによるブレンツキシマブベドチンへの感受性亢進に関わる ALK 陽性 ALCL の遺伝子の同定

ここまではノックアウトにより BV 抵抗性を示す遺伝子に着目して解析を行ったが、続けて、ノックアウトにより BV への感受性亢進を示す遺伝子について検討した。Figure 2(A)で示した CRISPR スクリーニングにおいて、sgRNA のノックアウトにより BV への感受性化を示し細胞数が減少する下位 20 遺伝子の中で、2 個以上の sgRNA で $\log_2$ fold change < -0.5 となるものを抽出したところ、18 個の遺伝子に絞られた。この中で、我々は有糸分裂チェックポイント複合体阻害因子 (mitotic checkpoint complex inhibitor; MCC inhibitor)として知られる MAD2L1 binding protein (MAD2L1BP)と ANAPC15 (anaphase-promoting complex subunit 15)に着目した。細胞周期において、後期促進複合体/サイクロソーム (anaphase-promoting complex/cyclosome; APC/C)は有糸分裂中期の過程で動原体と微小管の結合を監視する役割を担っており、中期から後期への進行を促進している。一方、紡錘体への結合が終了していない動原体では MCC の形成が促進され、APC/C の働きを阻害することで中期から後期への進行が抑制される (McAinsh et al, 2023)。そのため、MCC inhibitor である MAD2L1BP や ANAPC15 を阻害すると MCC が活性化され、それによって APC/C が強力に抑制される。その結果として細胞周期中期が延長・停止状態となり、BV の微小管阻害作用が増強するのではないかと仮説を立てると同時に、MAD2L1BP や ANAPC15 が PTCL の新規治療標的になるのではないかと考え、両分子に着目してさらなる検証を行った。



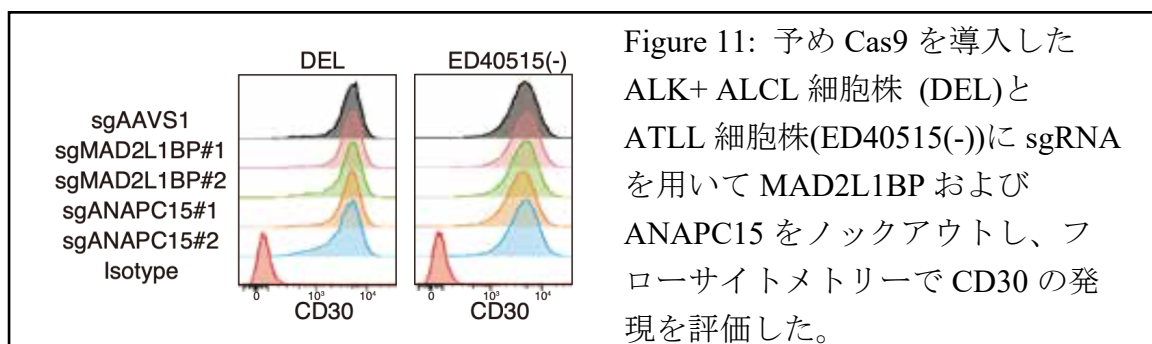
10. sgRNA を用いた MAD2L1BP および ANAPC15 のノックアウトおよび細胞増殖アッセイ

まず初めに、Cas9 を予め導入した ALK+ ALCL 細胞株の DEL と、ATLL 細胞株の ED40515(-) に sgRNA を用いて MAD2L1BP および ANAPC15 をノックアウトし、ウエスタンブロットで標的遺伝子がノックアウトされている事を確認した。この細胞株に BV を投与したところ BV への感受性亢進を認め、CRISPR スクリーニングの結果の再現性が確認された。



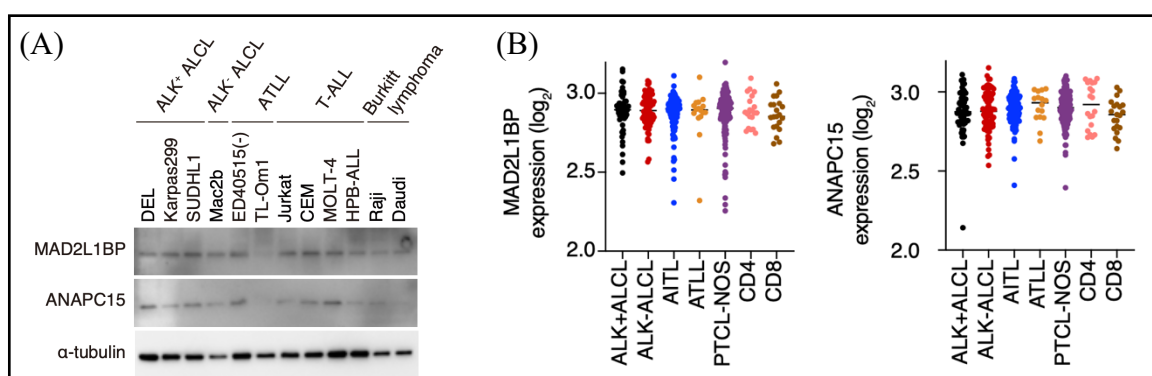
11. MAD2L1BP および ANAPC15 ノックアウト細胞株における CD30 の細胞表面発現量の検討

MAD2L1BP および ANAPC15 のノックアウトが ALK+ ALCL 細胞株 (DEL) と ATLL 細胞株 (ED40515(-)) の CD30 発現に与える影響を調べるため、ノックアウト細胞株の細胞表面 CD30 発現量をフローサイトメトリーで評価したところ、コントロールと比較し発現量に違いは認められなかった。このことから、MAD2L1BP および ANAPC15 のノックアウトによる BV への感受性化は CD30 発現量に非依存的であることが明らかとなった。



12. PTCL における MAD2L1BP と ANAPC15 のタンパク質および mRNA 発現の検討

MAD2L1BP および ANAPC15 の新規治療標的としての可能性を探るにあたり、PTCL を含む複数のリンパ系腫瘍細胞株 (ALK+ ALCL 細胞株 (DEL, Karpas299, SUDHL1)、ALK- ALCL 細胞株 (Mac2b)、ATLL 細胞株 (ED40515(-), TL-Om1)、T 細胞性急性リンパ性白血病 (T-ALL) 細胞株 (Jurkat, CEM, HPB-ALL)、Burkitt リンパ腫細胞株 (Raji, Daudi)) について、ウエスタンブロットで内因性のタンパク質発現を評価した。さらに、マイクロアレイにより解析された ALK+ ALCL、ALK- ALCL、AITL、ATLL、PTCL-NOS のリンパ節病変、健常人の末梢血 CD4 陽性 T 細胞および CD8 陽性 T 細胞について公開されているデータセット (GSE1466、GSE6338、GSE14879、GSE19067、GSE19069、GSE58445、GSE65823、ETAMB702 および ETABM783) を用いて mRNA 発現量も解析した。その結果、MAD2L1BP と ANAPC15 いずれも PTCL 細胞ではタンパク質、mRNA とともに一様に発現が認められた。



データセット (GSE1466、GSE6338、GSE14879、GSE19067、GSE19069、GSE58445、GSE65823、ETAMB702 および ETABM783)を用いて解析した。バーは中央値を表す。

13. MAD2L1BP および ANAPC15 ノックアウト細胞株におけるビンクリスチン、エトポシド、ドキソルビシンへの薬剤感受性の検討

MAD2L1BP および ANAPC15 のノックアウトによる BV への感受性亢進が、細胞周期中期の延長・停止による微小管障害作用の増強によるものであるという仮説について検討するため、微小管障害薬として PTCL の治療に用いられるビンクリスチン (vincristine; VCR)を用いて細胞増殖アッセイを実施した。その結果、MAD2L1BP、ANAPC15 のノックアウト細胞株いずれも VCR への感受性亢進を認めた。また、PTCL の治療に使われる他の薬剤として、トポイソメラーゼ II 障害薬のエトポシド (etoposide; ETP)、ドキソルビシン (doxorubicin; DOX)についても同様に検討したが、コントロールと比較し感受性に差は認められなかった。従って、MAD2L1BP と ANAPC15 のノックアウトによる PTCL 細胞の薬剤感受性亢進は、微小管障害薬の BV と VCR に特異的であることが示された。

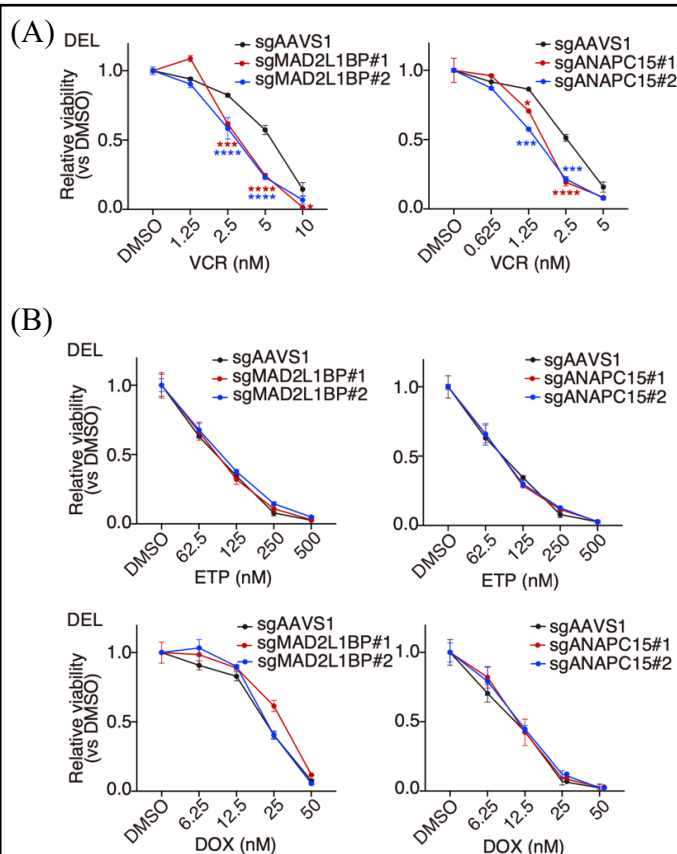
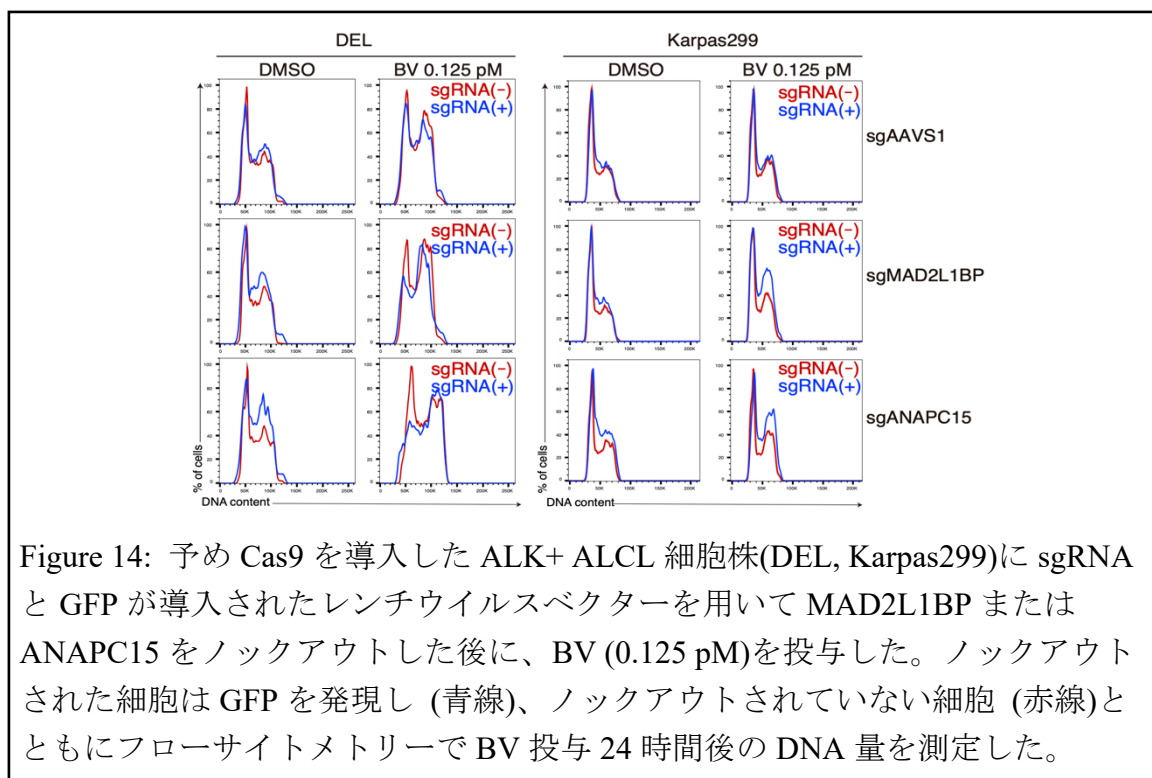


Figure 13: MAD2L1BP および ANAPC15 をノックアウトした細胞株にビンクリスチン (A)、エトポシドおよびドキソルビシン (B)の投与を行い、day 4 に CCK-8 を用いて生細胞の測定を行った。エラーバーは標準誤差 (n = 2)を表す。*P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001。

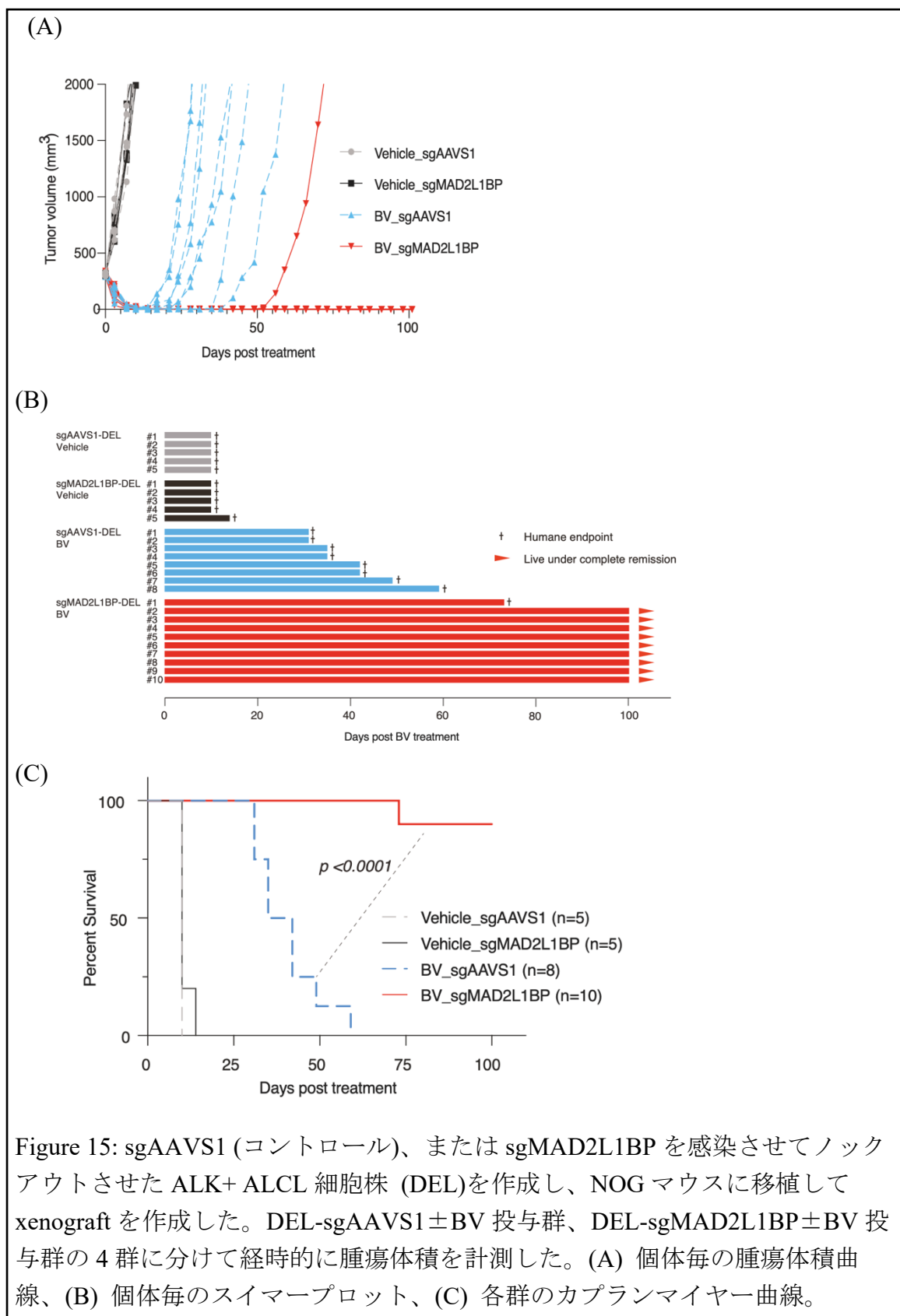
14. MAD2L1BP および ANAPC15 ノックアウト細胞株の細胞周期解析

MAD2L1BP および ANAPC15 のノックアウトによる BV への感受性亢進が細胞周期中期の延長・停止による影響であるという仮説について検証するため、予め Cas9 を導入した ALK+ ALCL 細胞株 (DEL, Karpas299) に対して sgRNA を用いて MAD2L1BP および ANAPC15 をノックアウトした上で BV を投与した結果、ノックアウトしていない細胞株に比べて DEL では G1 期の減少による相対的 G2/M 期の増加、Karpas299 では G2/M 期ピークの増加を認めた。従って、細胞周期の変化が BV への感受性亢進に関与していることが考えられた。



15. ALK+ ALCL xenograft マウスモデルによるブレンツキシマブベドチン感受性の検討

ALK+ ALCL 細胞の MAD2L1BP による BV 感受性への影響を生体内で調べるために、ALK+ ALCL 細胞株 (DEL)を NOG マウスに移植して xenograft を作成した。MAD2L1BP ノックアウト群では長期に腫瘍の寛解が維持され、有意に生存期間が延長した。これにより、MAD2L1BP ノックアウトによる BV への感受性亢進について、in vitro だけでなく in vivo でも確認することができた。



16. プレンツキシマブベドチンと proTAME の併用投与

これまでに MAD2L1BP や ANAPC15 を直接阻害する薬剤は開発されていない。MCC inhibitor (MAD2L1BP, ANAPC15)を阻害すると、MCC が活性化し APC/C 活性が低下する (McAinsh AD et al, 2023)。そこで、MAD2L1BP や ANAPC15 が治療標的となるかどうかを検討するため、APC/C 阻害薬の proTAME と BV の併用効果を検証した (Zeng X et al, 2010)。ALK+ ALCL 細胞株 (DEL, Karpas299, SUDHL1)と ATLL 細胞株 (ED40515(-), TL-Om1)に対して BV と proTAME を投与した結果、combination index が 1 未満となり相乗効果を認めた (Chou, 2010; Chou and Talalay, 1984)。一方、トポイソメラーゼ II 阻害薬の ETP や DOX については proTAME と併用した場合に相乗効果は見られなかった。

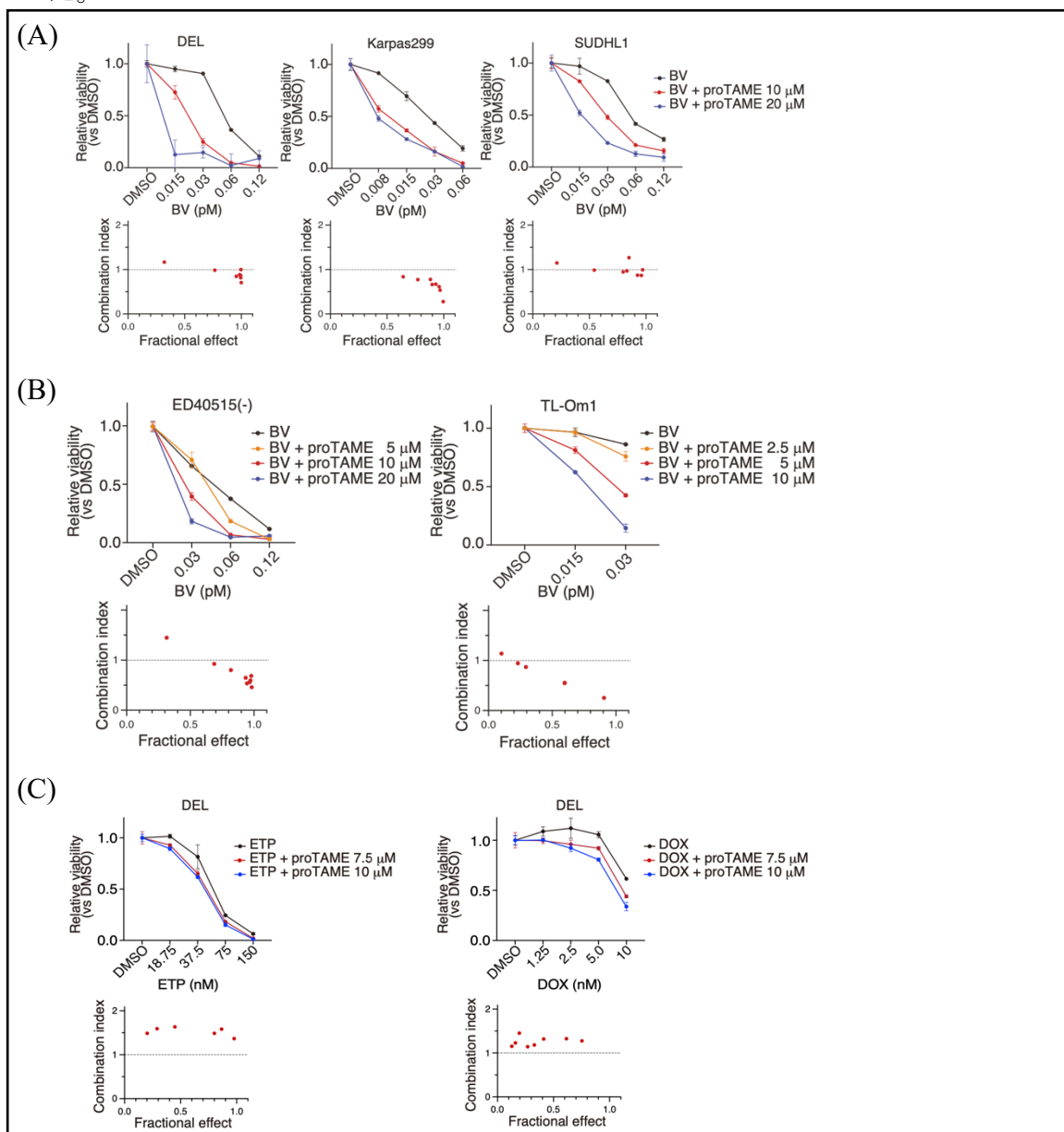


Figure 16: (A, B) ALK+ ALCL 細胞株 (DEL, Karpas299, SUDHL1) (A)と ATLL 細胞株 (ED40515(-), TL-Om1) (B)に BV と proTAME の併用投与を、ALK+ ALCL 細胞株 (DEL) (C)に BV と ETP または DOX の併用投与を実施した。いずれも day 4 に CCK-8 を用いて生細胞の測定を行い、上段に細胞増殖曲線を、下段に combination index を示している。エラーバーは標準誤差 (n = 2)を表す。

17. プレンツキシマブベドチンと proTAME の併用投与時の細胞周期解析

次に、ALK+ ALCL 細胞株 (Karpas299)に BV と proTAME の投与を行った際の細胞周期を評価したところ、各薬剤の単独投与時に比べて、併用投与時には有意に G1 期が減少し G2/M 期が大きく増加していた。この結果から、BV と proTAME の併用による G2/M 期における細胞周期停止の誘導が相乗効果を生み出す機序の一つと考えられた。

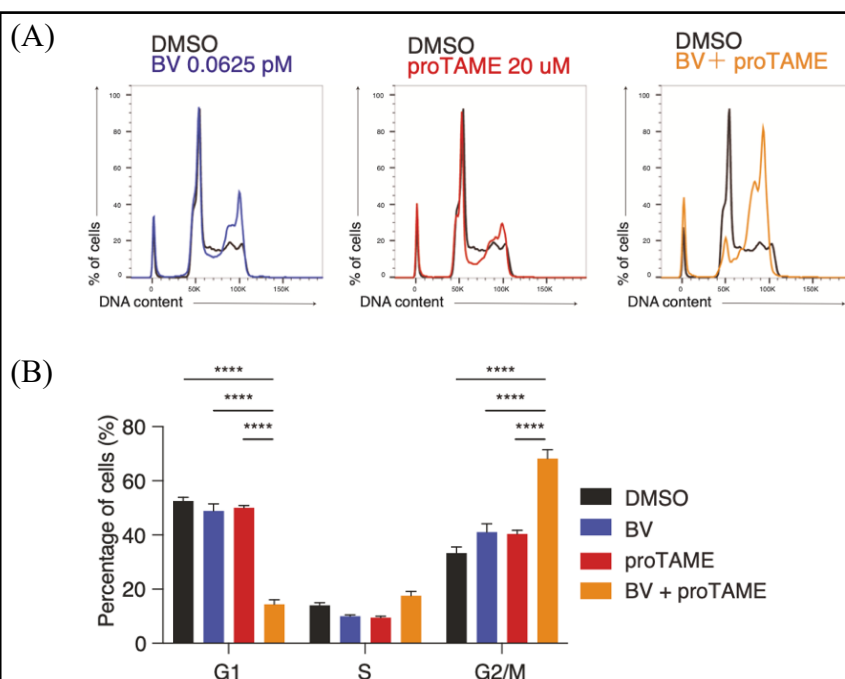


Figure 17: (A) ALK+ ALCL 細胞株 (Karpas299)に BV (0.0625 pM)および proTAME (20 μ M)をそれぞれ単独、または併用投与した。フローサイトメトリーで薬剤投与 24 時間後の DNA 量を測定した。(B) 条件毎の細胞周期割合。エラーバーは標準誤差 (n = 2)を表す。****P < 0.0001。

18. ATLL 患者検体を用いたブレンツキシマブベドチンと proTAME の併用

CD30 陽性 PTCL 細胞に対する BV と proTAME の併用投与を臨床応用に結びつけるため、CD30 陽性の急性型 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。Figure 16 の細胞株の結果と同様に、患者検体由来の細胞においても、BV と proTAME を併用することで細胞毒性が増強することが示された。

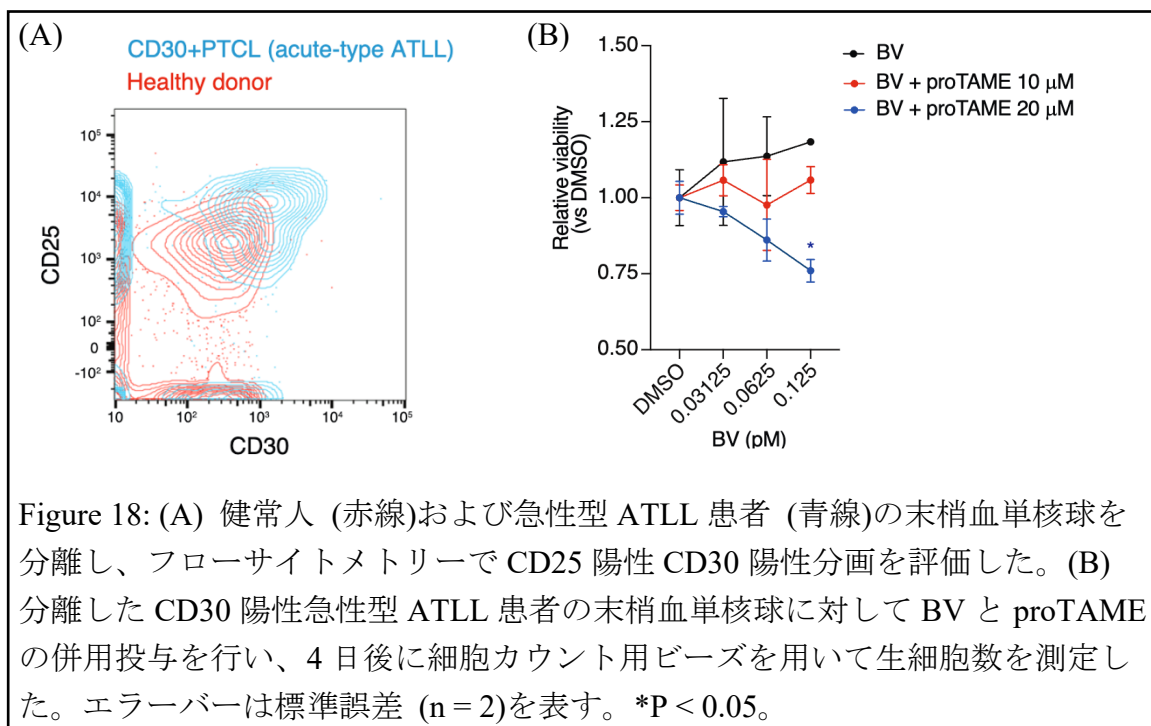


Figure 18: (A) 健常人 (赤線)および急性型 ATLL 患者 (青線)の末梢血単核球を分離し、フローサイトメトリーで CD25 陽性 CD30 陽性分画を評価した。(B) 分離した CD30 陽性急性型 ATLL 患者の末梢血単核球に対して BV と proTAME の併用投与を行い、4 日後に細胞カウント用ビーズを用いて生細胞数を測定した。エラーバーは標準誤差 (n = 2)を表す。*P < 0.05。

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 CD30 陽性 PTCL 細胞におけるブレンツキシマブベドチンへの感受性規定因子の同定を試みた。一般的に PTCL では CD30 が高率に陽性を示すことが知られているが、CD30 の陽性所見について明確な閾値は設定されておらず、病型毎の CD30 陽性率は報告により様々である (Karube et al, 2021)。

Table 1. Summary of reported CD30 expression rates in patients with PTCL and CTCL.

Reference	Method	CD30 antibody	CD30 ⁺ % cell cutoff	PTCL-NOS	AITL	ATLL	ENKTL	ALK ⁻ ALCL	ALK ⁺ ALCL
Karube et al. 2008 (N = 319) [45]	FCM	NR	>70%	5%	0	15%	0	58%*	
Savage et al. 2008 (N = 490) [33]	IHC	NR	20–70%	11%	32%	24%	64%	35%*	100%
Asano et al. 2011 (N = 47) [49]	IHC	Ber-H2	>0%	32%	–	–	–	100%	–
Duvic 2011 (N = 106) [50]	IHC	NR	≥80%	5%	–	–	–	–	–
Weisenburger et al. 2011 (N = 217) [51]	IHC	NR	>30%	51%†	–	–	–	–	–
Sabattini et al. 2013 (N = 192) [40]	IHC	Ber-H2	>10%	–	–	–	–	–	–
			>20%	32%	–	–	–	–	–
			0: no staining	36%	51%	–	20%	–	–
			1+: >0% to <25%	13%	21%	–	10%	–	–
			2+: 25–50%	21%	12%	–	30%	–	–
			3+: >50–75%	13%	10%	–	10%	–	–
			4+: >75%	18%	0	–	30%	–	–
Bossard et al. 2014 (N = 376) [44]	IHC	Ber-H2	0: <5%	42%	37%	44%	54%	0	0
			1+: 5–24%	26%	47%	11%	7%	0	0
			2+: 25–49%	9%	10%	33%	11%	0	5%
			3+: 50–75%	10%	5%	11%	14%	0	2%
			4+: >75%	13%	0	0	14%	100%	93%
Lamarque et al. 2016 (N = 46) [52] [§]	IHC	NR	<5%	10%	0%	100%	–	0	0
			5–24%	10%	100%	0%	–	0	0
			25–49%	30%	0%	0%	–	0	20%
			50–75%	30%	0%	0%	–	0	20%
			>75%	20%	0%	0%	–	100%	60%
Wang et al. 2017 (N = 122) [35]	IHC	NR	0: no staining	–	–	–	30%	–	–
			1+: >0% to <25%	–	–	–	38%	–	–
			2+: 25–50%	–	–	–	18%	–	–
			3+: >50–75%	–	–	–	10%	–	–
			4+: >75%	–	–	–	5%	–	–
Kawamoto et al. 2018 (N = 97) [37]	FCM and IHC	Ber-H2	≥1%	–	–	–	57%	–	–
			≥10%	–	–	–	55%	–	–
			≥20%	–	–	–	44%	–	–

Figure 19: PTCL の病型毎の CD30 陽性率。(Karube et al, 2021)より引用、一部改変。

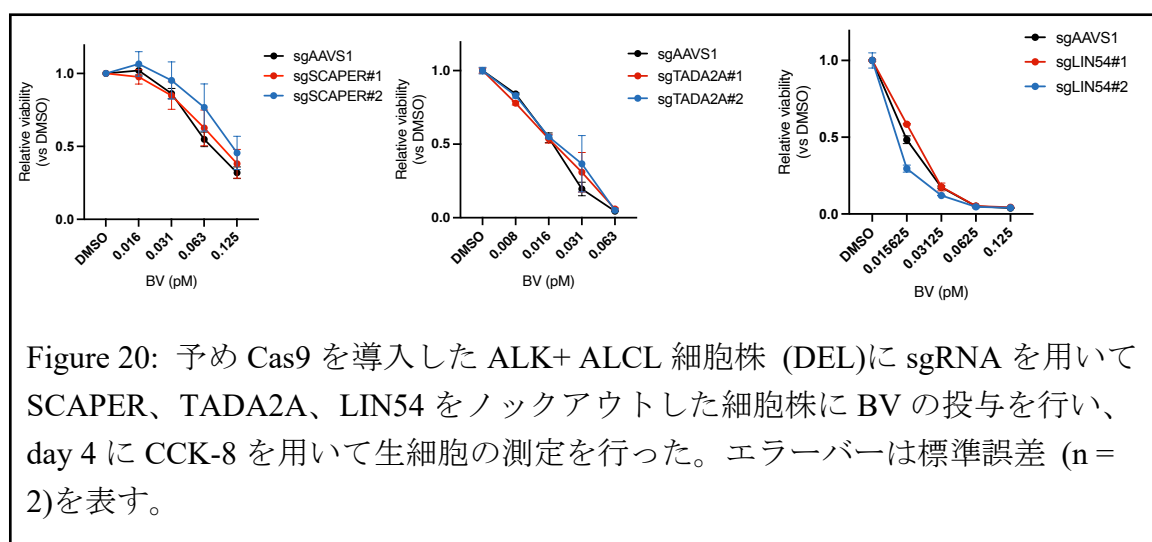
これまで、PTCL やホジキンリンパ腫におけるブレンツキシマブベドチンへの耐性機序として、CD30 発現量の低下や多剤耐性遺伝子 (multi-drug-resistant genes)の発現量上昇などが報告されてきたが (Chen et al, 2020; Wei et al, 2020; Chen et al, 2015)、我々の知る限り、ゲノムワイドの機能的かつ網羅的な解析は本研究が初めてである。本研究において、我々はノックアウトによりブレンツキシマブベドチンへの抵抗性を示す遺伝子として SLC39A7 を同定し、CD30 陽性 PTCL 細胞株の DEL (ALK+ ALCL 細胞株)と ED40515(-) (ATLL 細胞株)で SLC39A7 ノックアウトによりブレンツキシマブベドチンへ耐性となることを示

した。また、耐性化の機序として、SLC39A7 のノックアウトにより CD30 の成熟障害が生じ、細胞表面の CD30 発現量が低下することが一因であることも示した。これまで、PTCL の CD30 発現調節機構として、IRF4 や STAT3 といった転写因子が重要であることが報告されてきたが (Wang et al, 2021; Boddicker et al, 2015)、SLC39A7 については報告がなかった。さらに本研究では SLC39A7 阻害薬を用いた際に細胞内亜鉛濃度が上昇することを示したが、CD30 の発現量と亜鉛の関連性について論じた既報はない。細胞内亜鉛恒常性の変化による翻訳後修飾の障害が CD30 の発現低下の機序の一端である可能性が推察され、この点についてはさらなる検討が必要である。我々は ALK+ ALCL において TNFRSF8 と SLC39A7 の発現量が正の相関を示すことも明らかにし、SLC39A7 が CD30 の発現調整に関与する重要な分子の一つであることを支持するデータを示した。SLC39A7 の発現量がブレンツキシマブベドチンへの感受性を規定するバイオマーカーとなり得るかについては今後の検討課題と考えられる。

本研究では、ノックアウトによりブレンツキシマブベドチンへの感受性化を示す遺伝子として MAD2L1BP ならびに ANAPC15 を同定した。HeLa 細胞を用いた既報では、MAD2L1BP や ANAPC15 をノックダウンまたはノックアウトすることで、ビンクリスチン、ノコダゾール、タキソールといった微小管阻害薬の細胞毒性が増強することが報告されている (Lok et al, 2020; Ma et al, 2016; Mansfeld et al, 2011; Uzunova et al, 2012; Westhorpe et al, 2011; Ma et al, 2012)。MAD2L1BP や ANAPC15 の働きを抑制することにより APC/C 活性が低下し、その結果として細胞周期が中期で停止することがその機序と考えられている。しかし、一部の細胞はわずかに残存する 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) も認めており (Mansfeld et al, 2011)、微小管阻害薬への耐性の一因と推察される。本研究では、PTCL 細胞株および ATLL 患者検体で APC/C 阻害薬の proTAME とブレンツキシマブベドチンの相乗効果を認め、さらに MAD2L1BP ノックアウト細胞株を用いた xenograft モデルでもブレンツキシマブベドチンの抗腫瘍効果の増強を認めた。これらの結果から、MCC-APC/C 軸がブレンツキシマブベドチンの感受性を増強させる上での有望な新規治療標的となることを明らかとした。現時点で、MAD2L1BP や ANAPC15 に対する特異的な阻害薬は開発されておらず、CD30 陽性 PTCL 患者への臨床応用に向けた開発が期待される。

最後に本研究の限界について述べる。上述の通り、本研究では SLC39A7、MAD2L1BP、ANAPC15 の 3 つの遺伝子に着目して実験を進め新規知見を見出した。スクリーニング結果からこれらの遺伝子を抽出する過程では、初めに gene ontology 解析を実施したものの特定の傾向を認めなかった。そのため、MAGeCK アルゴリズムで上位に抽出された遺伝子については個別にノックアウト

ト細胞株を作成しスクリーニング結果の再現性を検証した。ノックアウトにより BV 抵抗性を示す遺伝子に関しては、TNFRSF8 に次いで 2 番目にランク付けされた SCAPER (S phase Cyclin A-associated protein in the endoplasmic)について (Figure 2(C))、ノックアウトにより BV 感受性化を示す遺伝子については 1 番目と 2 番目にランク付けされた TADA2A (transcriptional adapter 2-alpha)と LIN54 について (Figure 9(B))、それぞれノックアウト細胞株を作成し細胞増殖アッセイを実施したが、コントロールと比較し BV 感受性に有意差を認めなかった。スクリーニング結果の特異度は薬剤感受性 CRISPR スクリーニングの限界の一つであり、特に細胞障害活性を有する薬剤では、その結果について慎重な確認が必要になる。本研究で抽出された他の遺伝子の中に、より強く BV の感受性を規定する分子が存在していないかどうか追加検証が必要と考えている。



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 CD30 陽性 PTCL 細胞におけるブレンツキシマブベドチンの感受性規定因子に関して、感受性化・抵抗性の両面について重要な分子を同定することができた。MAD2L1BP と ANAPC15 はノックアウトによりブレンツキシマブベドチンへ感受性化し、SLC39A7 はノックアウトにより抵抗性を示した。これらの実験結果はスクリーニングに用いた ALK+ ALCL 細胞株のみならず、ATLL 細胞株でも同様の結果を確認することができた。このことから、これらの分子は ALK+ ALCL のみならず、他の CD30 陽性高悪性度 PTCL でもブレンツキシマブベドチンの感受性を決める重要な因子であると考えられ、今後の臨床応用が期待される。

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 CD30 陽性 PTCL 細胞のブレンツキシマブベドチンの抵抗性に関わる分子として SLC39A7 を同定した。
- ALK+ALCL において、SLC39A7 が CD30 の発現調節に関わる分子の一つである可能性を示した。
- 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 CD30 陽性 PTCL 細胞のブレンツキシマブベドチンの感受性亢進に関わる分子として MAD2L1BP と ANAPC15 を同定した。
- ALK+ALCL 細胞株、ATLL 細胞株、ATLL 患者検体でブレンツキシマブベドチンと proTAME の相乗効果を明らかにし、MCC-APC/C 軸が新規治療標的となる可能性を示した。

2. 新知見の意義

PTCL は未だに予後不良な疾患であり、化学療法に対する治療抵抗性の克服に向けた新規治療標的の開発が急務である。現在、ブレンツキシマブベドチンは PTCL に対するキードラッグとしてすでに広く使用されているが、再発率の高さや奏功期間が課題となっている。MCC-APC/C 軸を治療標的とすることでブレンツキシマブベドチンの治療効果の増強や、耐性の克服に結び付く可能性があり、PTCL の予後改善に向けた臨床研究への応用が期待される。

3. 今後の研究展開

本検討では、ブレンツキシマブベドチンと MCC-APC/C 軸を標的とした薬剤の併用効果について *in vivo* での検討ができなかった。その要因として、proTAME は細胞内で分解されて活性体の TAME となる必要があるが、TAME 自身に細胞膜透過性がないことや血中にもエステラーゼが存在することが挙げられる (Zeng et al, 2010; Maes et al, 2019)。しかし、最近新たな APC/C 阻害薬として開発された CP5V は、タンパク質分解誘導キメラタンパク質 (proteolysis targeting chimera; PROTAC) を応用することで、乳がんの xenograft モデルで有効

性を示している (Chi et al, 2019)。今後、この薬剤とブレンツキシマブベドチンを併用することで、xenograft マウスモデルでの併用効果を検討する。

また、本検討ではブレンツキシマブベドチンの感受性と SLC39A7 の発現量の相関について評価することができなかった。患者由来のリンパ節や末梢血検体を使用し、SLC39A7 がブレンツキシマブベドチンの感受性を規定するバイオマーカーとなるか検討する。

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

横山慶人先生, 森祐斗先生、他、教室員の皆様

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

JA 北海道厚生連札幌厚生病院 血液内科

石尾崇先生

市立旭川病院 血液内科

千葉雅尋先生

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。本研究は私ひとりの力で遂行できるものではございませんでした。様々な面において御協力・御助力いただいた全ての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

- Boddicker, R.L., Kip, N.S., Xing, X., Zeng, Y., Yang, Z.-Z., Lee, J.-H., Almada, L.L., Elsawa, S.F., Knudson, R.A., Law, M.E., et al. (2015). The oncogenic transcription factor IRF4 is regulated by a novel CD30/NF- κ B positive feedback loop in peripheral T-cell lymphoma. *Blood* 125, 3118–3127.
- Chen, R., Herrera, A.F., Hou, J., Chen, L., Wu, J., Guo, Y., Synold, T.W., Ngo, V.N., Puverel, S., Mei, M., et al. (2020). Inhibition of MDR1 Overcomes Resistance to Brentuximab Vedotin in Hodgkin Lymphoma. *Clin Cancer Res* 26, 1034–1044.
- Chen, R., Hou, J., Newman, E., Kim, Y., Donohue, C., Liu, X., Thomas, S.H., Forman, S.J., and Kane, S.E., (2015). CD30 Downregulation, MMAE Resistance, and MDR1 Upregulation Are All Associated with Resistance to Brentuximab Vedotin. *Mol Cancer Ther* 14, 1376–1384.
- Chi, J. (Jack), Li, H., Zhou, Z., Izquierdo-Ferrer, J., Xue, Y., Wavelet, C.M., Schiltz, G.E., Zhang, B., Cristofanilli, M., Lu, X., Bahar, I., et al. (2019). A novel strategy to block mitotic progression for targeted therapy. *EBioMedicine* 49, 40–54.
- Chiba, M., Shimono, J., Ishio, T., Takei, N., Kasahara, K., Ogasawara, R., Ara, T., Goto, H., Izumiyama, K., Otsuguro, S., et al. (2022). Genome-wide CRISPR screens identify CD48 defining susceptibility to NK cytotoxicity in peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 140, 1951-1963.
- 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. Enzym. Regul.* 22, 27–55.

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.

Eckerle, S., Brune, V., Döring, C., Tiacci, E., Bohle, V., Sundström, C., Kodet, R., Paulli, M., Falini, B., Klapper, W., et al. (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.

Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J.P.M., 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.

Fauster, A., Rebsamen, M., Willmann, K.L., César-Razquin, A., Girardi, E., Bigenzahn, J.W., Schischlik, F., Scorzoni, S., Bruckner, M., Konecka, J., et al. (2019). Systematic genetic mapping of necroptosis identifies SLC39A7 as modulator of death receptor trafficking. *Cell Death Differ* 26, 1138–1155.

Francisco, J.A., Cervený, C.G., Meyer, D.L., Mixan, B.J., Klussman, K., Chace, D.F., Rejniak, S.X., Gordon, K.A., DeBlanc, R., Toki, B.E., et al. (2003). cAC10-vcMMAE, an anti-CD30–monomethyl auristatin E conjugate with potent and selective antitumor activity. *Blood* 102, 1458–1465.

Horie, R., and Watanabe, T., (1998). CD30: expression and function in health and disease. *Semin Immunol* 10, 457–470.

Horwitz, S., O'Connor, O.A., Pro, B., Trümper, L., Iyer, S., Advani, R., Bartlett, N.L., Christensen, J.H., Morschhauser, F., Domingo-Domenech, E., et al. (2022). The ECHELON-2 Trial: 5-year results of a randomized, phase III study of brentuximab vedotin with chemotherapy for CD30-positive peripheral T-cell lymphoma. *Ann. Oncol.* 33, 288–298.

Horwitz, S.M., Advani, R.H., Bartlett, N.L., Jacobsen, E.D., Sharman, J.P., O'Connor, O.A., Siddiqi, T., Kennedy, D.A., and Oki, Y., (2014). Objective responses in relapsed T-cell lymphomas with single-agent brentuximab vedotin. *Blood* 123, 3095–3100.

Huang, Y., Reyniès, A. de, Leval, L. de, Ghazi, B., Martin-Garcia, N., Travert, M., Bosq, J., Brière, J., Petit, B., Thomas, E., et al. (2010). Gene expression profiling

identifies emerging oncogenic pathways operating in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type. *Blood* 115, 1226–1237.

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

Iqbal, J., Weisenburger, D.D., Chowdhury, A., Tsai, M.Y., Srivastava, G., Greiner, T.C., Kucuk, C., Deffenbacher, K., Vose, J., Smith, L., et al. (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.

Ishio, T., Kumar, S., Shimono, J., Daenthanasamak, A., Dubois, S., Lin, Y., Bryant, B.R., Petrus, M.N., Bachy, E., Huang, D.W., et al. (2021). Genome-wide CRISPR screen identifies CDK6 as a therapeutic target in Adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood*.

Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Isumura, N., (2015). The Physiological, Biochemical, and Molecular Roles of Zinc Transporters in Zinc Homeostasis and Metabolism. *Physiol Rev* 95, 749–784.

Karube, K., Kakimoto, Y., Tonoizuka, Y., and Ohshima, K., (2021). The expression of CD30 and its clinico-pathologic significance in peripheral T-cell lymphomas. *Expert Rev Hematol* 14, 777–787.

Koike-Yusa, H., Li, Y., Tan, E.-P., Velasco-Herrera, M.D.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.

Leval, L. de, Rickman, D.S., Thielen, C., Reynies, A. de, 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.

Lok, T.M., Wang, Y., Xu, W.K., Xie, S., Ma, H.T., and Poon, R.Y.C., (2020). Mitotic slippage is determined by p31^{comet} and the weakening of the spindle-assembly checkpoint. *Oncogene* 39, 2819–2834.

Ma, H.T., Chan, Y.Y., Chen, X., On, K.F., and Poon, R.Y.C., (2012). Depletion of p31^{comet} Protein Promotes Sensitivity to Antimitotic Drugs. *J. Biol. Chem.* 287, 21561–21569.

Ma, H.T., and Poon, R.Y.C., (2016). TRIP13 Regulates Both the Activation and Inactivation of the Spindle-Assembly Checkpoint. *Cell Rep.* 14, 1086–1099.

Maes, A., Maes, K., Raeve, H.D., Smedt, E.D., Vlummens, P., Szablewski, V., Devin, J., Faict, S., Veirman, K.D., Menu, E., et al. (2019). The anaphase-promoting complex/cyclosome: a new promising target in diffuse large B-cell lymphoma and mantle cell lymphoma. *Br. J. Cancer* 120, 1137–1146.

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.

Mansfeld, J., Collin, P., Collins, M.O., Choudhary, J.S., and Pines, J., (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol* 13, 1234–1243.

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

- McAinsh, A.D., and Kops, G.J.P.L., (2023). Principles and dynamics of spindle assembly checkpoint signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 543–559.
- Nawrocki, J.F., Kirsten, E.S., and Fisher, R.I., (1988). Biochemical and structural properties of a Hodgkin's disease-related membrane protein. *J Immunol* 141, 672–680.
- 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. Investig.* 117, 823–834.
- Pro, B., Advani, R., Brice, P., Bartlett, N.L., Rosenblatt, J.D., Illidge, T., Matous, J., Ramchandren, R., Fanale, M., Connors, J.M., et al. (2012). Brentuximab Vedotin (SGN-35) in Patients With Relapsed or Refractory Systemic Anaplastic Large-Cell Lymphoma: Results of a Phase II Study. *J Clin Oncol* 30, 2190–2196.
- 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.
- 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.S., 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.
- Uzunova, K., Dye, B.T., Schutz, H., Ladurner, R., Petzold, G., Toyoda, Y., Jarvis, M.A., Brown, N.G., Poser, I., Novatchkova, M., et al. (2012). APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/CMCC and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1116–1123.
- Wang, H., Wei, W., Zhang, J.-P., Song, Z., Li, Y., Xiao, W., Liu, Y., Zeng, M.-S., Petrus, M.N., Thomas, C.J., et al. (2021). A novel model of alternative NF- κ B pathway activation in anaplastic large cell lymphoma. *Leukemia* 35, 1976–1989.

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.

Wei, W., Lin, Y., Song, Z., Xiao, W., Chen, L., Yin, J., Zhou, Y., Barta, S.K., Petrus, M., Waldmann, T.A., et al. (2020). A20 and RBX1 Regulate Brentuximab Vedotin Sensitivity in Hodgkin Lymphoma Models. *Clin Cancer Res* 26, 4093–4106.

Westhorpe, F.G., Tighe, A., Lara-Gonzalez, P., and Taylor, S.S., (2011). p31^{comet}-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J. Cell Sci.* 124, 3905–3916.

Zeng, X., Sigoillot, F., Gaur, S., Choi, S., Pfaff, K.L., Oh, D.-C., Hathaway, N., Dimova, N., Cuny, G.D., and King, R.W., (2010). Pharmacologic Inhibition of the Anaphase-Promoting Complex Induces A Spindle Checkpoint-Dependent Mitotic Arrest in the Absence of Spindle Damage. *Cancer Cell* 18, 382–395.

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.