

悪性リンパ腫細胞における抗がん剤耐性メカニズム

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

CHOP療法は初発T細胞性リンパ腫の標準化学療法であるが、約70%は治療抵抗性あるいは再発をきたし、予後不良である。治療成績を改善するためにCHOPにエトポシドを加える試みが行われているが、一定の評価を得られていない。新規標的療法を含めたサルベージ治療の効果は限定的で、同種幹細胞移植は一定の割合で治癒が期待できるものの、強い治療毒性によって現時点では標準治療とはされない。もし、CHOP療法やエトポシドへの反応性を予知できるバイオマーカーが存在すれば、早期に同種幹細胞移植を考慮すべき患者を選別でき、結果、待機的な良い条件下での移植治療が可能になる。これによりT細胞性リンパ腫全体の治療成績を大幅に改善できる可能性がある。他の癌種では、MGMT遺伝子発現がグリオブラストーマに対するTemozolomideなどアルキル化剤の強力なバイオマーカーとなり（Lancet Oncol 2009; 10:459-66.）、一方、SLFN11遺伝子発現は様々な癌種における抗がん剤の感受性因子であることが見出されている（J Transl Med. 2017;15:199.）。T細胞性リンパ腫におけるCHOP療法におけるkey drugはアドリマイシンであり、DNAポリメラーゼおよびトポイソメラーゼII阻害作用を有する。同じく、CHOPに追加されるエトポシドもトポイソメラーゼII阻害作用を有する薬剤であることから、本研究においてはトポイソメラーゼII阻害作用のバイオマーカーとなり得る遺伝子を見いだすことを目的とした。

本研究ではCRISPRノックアウトスクリーニングを導入し、全ゲノムレベルの19,114遺伝子の中からT細胞性リンパ腫におけるトポイソメラーゼII阻害作用を有するアドリマイシンおよびエトポシドに対する感受性規定遺伝子の同定を試みた。プラスミドレポジトリであるAddgeneからレンチウイルスsgRNAライブラリーを入手し、CRISPRスクリーニング用のT細胞リンパ腫細胞株2種類（ST1, KK1）にsgRNAを感染導入した。（ライブラリーには19,114遺伝子を標的としたsgRNAが含まれている。sgRNAをガイドとして、Cas9ヌクレアーゼが標的遺伝子ゲノム上の特異的配列を切断する。NHEJ-DNA修復の結果、フレームシフトが起こり、標的遺伝子ノックアウトが起こるのがCRISPRシステムの原理である。）sgRNAライブラリーが感染したT細胞リンパ腫細胞株を1-2週間程度継代培養し、CRISPRによる遺伝子ノックアウトを進行させた後、いくつかのフラスコに分注した。それぞれのフラスコに濃度を振ったエトポシドあるいはアドリマイシン、あるいはコントロールとしてDMSOを加えて8日間培養した。薬剤処理が終了した細胞から、それぞれゲノムDNAを採取したのち、レンチウイルスゲノム配列に特異的なPCRプライマーを用いてsgRNA配列をPCR増幅した。PCRプライマーにはアタッチメント配列（p5, p7）およびシークエンシングプライマー結合配列が組み込まれ、精製後にそのままイルミナ次世代シークエンサー解析ができるように設計されている。DMSOコントロールと比較して、エトポシドあるいはアドリマイシン投与によりどのようなsgRNA（遺伝子）が濃縮されているか、あるいはどのようなsgRNAが減少していたかをMAGeCK algorithmで解析した。

まずエトポシド処理で濃縮したsgRNAの標的遺伝子を検討した。これはノックアウトによってエトポシドに耐性が生じることを意味する。ST1、KK1でそれぞれに濃縮された標的遺伝子top500の中で、共通していたものは19遺伝子であった。この中から、標的遺伝子に対する4つのsgRNAの中で少なくとも2つのsgRNAがLog2 Fold Change 0.5以上であった遺伝子を抽出すると2遺伝子のみ絞られた。その中のひとつはTOP2Aであり、エトポシドの標的分子そのものであったことから、このスクリーニングが適切に働いていることを確認することができた。この結果を踏まえて、次にST1、KK1でそれぞれにエトポシド処理で減少したsgRNAの標的遺伝子を検討した。これはノックアウトによってエトポシドに対する感受性が亢進したことを意味する。標的遺伝子top500の中で共通していたものは19遺伝子であり、この中から、標的遺伝子に対する4つのsgRNAの中で少なくとも2つのsgRNAがLog2 Fold Change -0.5以下であった遺伝子を抽出すると3遺伝子のみ絞られた。そのなかでも、最も減少していた遺伝子はZNF451であった。

さらにアドリアマイシン処理でも同様のCRISPRスクリーニングを行い、ST1、KK1でそれぞれにアドリアマイシン処理で減少したsgRNAの標的遺伝子を検討した。ノックアウトによってアドリアマイシンに対する感受性が亢進したことを意味する。標的遺伝子top500の中で共通していたものは13遺伝子であり、この中から、標的遺伝子に対する4つのsgRNAの中で少なくとも2つのsgRNAがLog2 Fold Change -0.5以下であった遺伝子を抽出すると3遺伝子のみ絞られた。その中にはエトポシド処理でのCRISPRスクリーニング同様に、ZNF451が含まれていた。このことからT細胞性リンパ腫においてエトポシドおよびアドリアマイシンのトポイソメラーゼII阻害作用に関与する遺伝子候補としてZNF451を同定することに成功した。

DNAトポイソメラーゼIIは二本鎖DNAを一時的に切断し再結合させることでDNAの捻れ・絡まりを解消する生理的働きを有する酵素である。エトポシドはDNAトポイソメラーゼIIに結合し、DNA再結合を阻害することで抗腫瘍作用を発揮するが、2017年Schellenbergらは、ZNF451がSUMO2 E3 ligaseとして働き、DNAトポイソメラーゼIIAをSUMO化することで三次構造に変化が起これ、これによりDNAトポイソメラーゼIIAが二本鎖DNA切断部位から離れることでDNA修復作用を促進することを報告した。いわば、ZNF451はエトポシドの抗腫瘍作用を軽減する内在性因子ということになる。この知見を元にすれば、本研究によるスクリーニングでZNF451をノックアウトした場合にエトポシドおよびアドリアマイシンの細胞毒性が増強されたことは、理にかなっていると考えられた。

スクリーニングの結果を確認するために、ZNF451に対するsgRNAを発現するレンチウイルスベクターを4種類クローニングし、T細胞性リンパ腫細胞株ST1へ感染させたところ、全てのsgRNAがZNF451のタンパク発現を減少させることをウェスタンブロット法で確認できた。その後この4種類のsgRNAの中で特にZNF451のタンパク減少効率の高かった二つのsgRNAを選択し、これらのZNF451ノックアウト細胞株に対してエトポシドをいくつかのsub-lethalな濃度で処理し4日間in vitro培養を行ったところ、ZNF451をノックアウトした細胞ではコントロール細胞と比較してエトポシドへの感受性が増強され、細胞毒性が増強されていることが確認できた。さらに4種類のT細胞性リンパ腫細胞株に対しても同様にZNF451ノックアウト細胞を作成したが、これら全てにおいてZNF451をノックアウトした細胞ではコントロール細胞と比較してエトポシドへの感受性が増強され、細胞毒性が増強されていることが確認した。さらに、アドリアマイシンについても同様の検証実験を行なったが、5種類のT細胞性リンパ腫細胞株全てにおいてZNF451をノックアウトした細胞ではコントロール細胞と比較してアドリアマイシンへの感受性が増強され、細胞毒性が増強されていることを確認できた。

これらの結果から、T細胞性リンパ腫症例においては腫瘍細胞のZNF451の発現レベルによってアドリマイシン・エトポシドを含む化学療法の治療成績に差が見られるのではないかという仮説を立てた。この文献的報告を検索したが、これまでZNF451の発現レベルとT細胞性リンパ腫細胞の治療成績との関係性について検討された研究を見つけることはできなかった。そこで本研究では過去に行われた8つのmicroarrayを用いた遺伝子発現解析データを統合して得られたPTCL 503例のpublic data (Maura F et al. Am J Hematol. 94; 628-634 (2019))を使用し、解析を行うことにした。T細胞性リンパ腫の最多病型であるT細胞性リンパ腫・分類不能型において、122症例の予後情報が明らかになっているため、これらの症例に焦点を当てZNF451の発現と予後について解析を行なった。microarrayで計測されたZNF451 mRNA発現レベルをmedian値でZNF451高発現群(59症例)とZNF451低発現群(63症例)の2群に分類した場合、ZNF451高発現群は低発現群と比較して有意に生存率が低いことを明らかにできた (P=0.012)。

以上、本研究においては全ゲノムレベルのCRISPRノックアウトスクリーニングからT細胞性リンパ腫細胞におけるエトポシドおよびアドリマイシンに対する耐性メカニズムにZNF451の発現が深く関わっていることを見出した。この成果を基盤として、今後はT細胞性リンパ腫におけるCHOP療法あるいはエトポシドを含むレジメンに対するZNF451のバイオマーカーとしての機能について、前向きに症例を重ねながら検証していきたいと考えている。