

T 細胞性リンパ腫における T 細胞分化・機能関連遺伝子群の網羅的機能解析

中川雅夫

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

【研究の背景】

過去の網羅的遺伝子機能解析から、B 細胞リンパ腫細胞はその正常対応細胞である B リンパ球の分子メカニズムを悪用し、悪性腫瘍の特性を獲得・維持することが明らかになっている。一方、T 細胞リンパ腫においては、この解析が進んでいなかった。本研究者は T 細胞リンパ腫の一病型である成人 T 細胞性白血病リンパ腫(ATLL)細胞に対して、RNAi 法による機能的遺伝子スクリーニングを行っていたが、同法では約 1000 遺伝子程度をスクリーニングするのが限界であった。

近年、発見・報告された革新的ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 は RNAi 法に比べて成功率(60-80%)・特異性ともに格段に優れており、約 20000 遺伝子を標的とするスクリーニングが可能になった。本研究者は約 2 年間予備実験を行い、この革新的スクリーニング法を ATLL 細胞株に対して導入した。

【目 的】

Cas9 を導入した T 細胞リンパ腫細胞株に対して CRISPR/Cas9 遺伝子ノックアウトスクリーニングを行い、T 細胞分化・機能に関わる分子を網羅に解析する。これにより過去には見出されてこなかった T 細胞リンパ腫分子病態を明らかにし、分子治療標的を見出す。

【方 法】

(方法 1:スクリーニング用細胞株の作成)CRISPR/Cas9 が速やかに、効率よく、且つ均質に働く Cas9 導入 ATLL 細胞株の作成を試みる。(方法 2:スクリーニングの実行)CRISPR レンチウイルスライブラリーを CRISPR/Cas9 導入 ATLL 細胞株に感染させ、感染直後(Day0)のゲノム DNA と感染 28 日後のゲノム DNA を採取する。次世代シーケンサーで解析し、Day0 に比較して Day28 ではどの遺伝子がノックアウトされた細胞が減っていたかを同定する。可及的多数の ATLL 細胞株に施行し、すべての細胞株に共通して見出される T 細胞分化・機能に関わる遺伝子を抽出する。(方法 3:スクリーニングの結果確認、および治療標的遺伝子候補の機能実験)抽出された遺伝子の確認実験を行う。

【結 果】

本研究において、最終的に CRISPR/Cas9 が速やかに、効率よく、且つ均質に働く ATLL 細胞株を 5 種類樹立できた。このうち 3 種類の ATLL 細胞株に対して CRISPR/Cas9 遺伝子ノックアウトスクリーニングを行い、全ての細胞株において共通して細胞増殖・生存に関わる遺伝子を解析した。抽出された遺伝子の多くは、細胞種を問わず広く細胞増殖・生存に関わると考えられリボソーム関連遺伝子であり、スクリーニングが正しく機能していることを裏付けることができた。一方で T 細胞分化・機能に関わる遺伝子群のほとんどは細胞増殖・生存に影響を与えなかったが、少数ながら細胞増殖・生存に関わる重要遺伝子を同定できた。その一つは IRF4 で、Th2/Tfh/Th17/Treg の分化・機能に関わる転写因子であった。加えて、BATF3 という AP1 転写因子も同定することができた。本転写因子は過去にマウス実験において、IRF4 と複合体を形成し、T 細胞分化に関わる可能性が報告されている。確認実験として、これら IRF4 あるいは BATF3 を ATLL 細胞株でノックアウトしたところ、

樹立した 5 細胞株全てで細胞増殖の著明な低下を認めた。

【考 察】

ATLL においては、T 細胞における重要転写因子複合体 IRF4/BATF3 が細胞増殖・生存関わる遺伝子を制御していることが明らかになった。今後、この転写因子複合体の機能を抑制する化合物を探索することで、ATLL における新しい分子標的療法の開発を目指す。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

ATLL 患者細胞において IRF4/BATF3 転写因子複合体の発現あるいは機能を抑えることが、治療手段となりうることを証明できた。今後、どのようにして同複合体の機能を阻害するか、ATLL における新しい分子標的療法開発の基盤的知見を見いだしたという点で、臨床への貢献度は高い。