

# 成人 T 細胞性白血病/リンパ腫の免疫機序の解明

～PD-L1 を標的とした免疫療法に期待～

## ポイント

- ・ 難治性の悪性リンパ腫「成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL)」の PD-L1 発現機序を解明。
- ・ CRISPR-Cas9 スクリーニングによって ATLL の PD-L1 発現に関わる重要な遺伝子を同定。
- ・ ATLL に対する抗 PD-L1 抗体もしくは抗 PD-L1 CAR-T 細胞療法の開発に期待。

## 概要

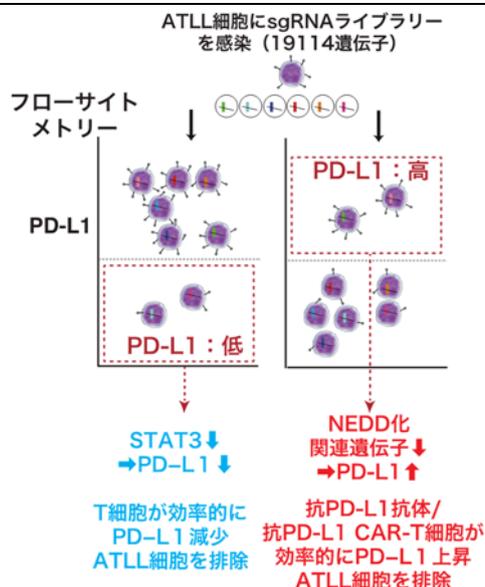
北海道大学大学院医学院の千葉雅尋氏と同大学大学院医学研究院の中川雅夫助教授の研究グループは、難治性 T 細胞性悪性リンパ腫「成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (ATLL)」の PD-L1 発現機序を解明しました。

ATLL は日本人での発症頻度が比較的高い T 細胞性の悪性リンパ腫です。悪性リンパ腫の中でも、ATLL は既存の治療に対する反応性が特に乏しい疾患で、新しい治療法の実現が求められています。他のがんと同様に ATLL においても、PD-1/PD-L1 を標的とした免疫療法の実現が進められていることから、ATLL 細胞の PD-L1 発現機序を深く理解することが新規治療法の実現につながります。

今回の研究では、新規ゲノム編集技術である CRISPR-Cas9<sup>\*1</sup> を用いて ATLL 細胞株内の約 20,000 種類の遺伝子を網羅的にノックアウトさせ、どの遺伝子が ATLL 細胞の PD-L1 の発現に重要な役割を担っているかをスクリーニングしました。その結果、NEDD 化<sup>\*2</sup> 関連遺伝子の発現低下により PD-L1 発現が上昇することを見出しました。この成果に基づいて NEDD 化関連分子の阻害薬である Pevonedistat を ATLL 細胞に使用したところ、PD-L1 発現が上昇することに加え、細胞傷害作用を併せ持つことも明らかにしました。これらの発見から Pevonedistat と PD-L1 を標的とした免疫療法の併用が有効である可能性が示唆され、実際に Pevonedistat と抗 PD-L1 抗体もしくは抗 PD-L1 CAR-T 細胞を組み合わせると、ATLL 細胞を効率的に排除できることを見出しました。

今回の結果から ATLL に対する PD-1/PD-L1 を軸とした新規免疫療法の実現が期待されます。

なお、本研究結果は、2023 年 12 月 24 日 (日) 公開の Blood 誌にオンライン掲載されました。



本研究成果の概要図

## 【背景】

成人 T 細胞性白血病/リンパ腫 (Adult T-cell leukemia/lymphoma; ATLL) は human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) 感染者の一部に発症する T 細胞性の悪性リンパ腫で、既存の化学療法に対する効果が乏しい難治性の疾患です。次世代シーケンス<sup>3</sup>を用いたゲノム異常の網羅的解析によって、ATLL 細胞は免疫逃避に関わる遺伝子変異の頻度が高いことが報告されています。また一部 ATLL 症例において、DNA 構造異常により免疫チェックポイント分子 PD-L1 の発現が上昇しており、腫瘍免疫からの回避が生じていることも明らかになっています。しかしながら、そのような細胞で PD-L1 発現がどのように維持されているのか、さらには治療的介入で PD-L1 発現を変化させることが可能なのかという点においては、これまで全く解析が進んでいませんでした。

## 【研究手法】

研究グループは、ATLLにおけるPD-L1発現を調節する遺伝子を同定するために、ゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9をATLL細胞株に用いることで、一度に約20,000種類の遺伝子を網羅的にノックアウトさせ、ゲノムワイドなスクリーニングを施行しました。具体的な方法として、19,114種類の遺伝子に対する単鎖ガイドRNA (sgRNA) をATLLの細胞株に導入し、遺伝子ノックアウトを行った後、PD-L1高発現と低発現のATLL細胞を分離しました。次に、これらのATLL細胞株のゲノムDNAを抽出し、ゲノムDNA上のsgRNA配列をPCRで増幅、次世代シーケンサーで検出しました。そして、計測されたsgRNA数から、どの遺伝子がATLL細胞のPD-L1発現に重要な役割を担っているかを検討しました。

## 【研究成果】

上記スクリーニングから、STAT3<sup>4</sup>が ATLL 細胞の PD-L1 発現維持に働いており、一方で NEDD 化に関連する遺伝子群は PD-L1 発現を抑制することを見出しました。実際に、JAK 阻害薬のルキソリチニブで STAT3 活性を低下させると、PD-L1 発現を減少させられることを確認しました。一方、NEDD 化関連分子の阻害薬である Pevonedistat を ATLL 細胞に使用すると STAT3 活性が亢進し、PD-L1 発現が上昇することが分かりました。Pevonedistat は ATLL 細胞の細胞周期停止とアポトーシス誘導を介して細胞傷害作用を有することを発見し、さらに検討を進めたところ、Pevonedistat により PD-L1 発現が亢進した ATLL 細胞は、抗 PD-L1 抗体や抗 PD-L1 CAR (Chimeric Antigen Receptor) -T 細胞療法による細胞障害が生じやすいことを示しました。

## 【今後への期待】

本研究では CRISPR-Cas9 ライブラリースクリーニングを用いて、ATLL 細胞の PD-L1 発現に関わる遺伝子を明らかにしました。今回のスクリーニングの結果から、ATLL に対する免疫学的治療開発として二つの方向性を示すことができました。一つは STAT3 発現を低下させることで、PD-L1 発現低下を目指す方針です。ATLL 細胞の PD-L1 発現が低下すると、腫瘍免疫を正常に維持でき、腫瘍排除に繋がる可能性があります。もう一つは Pevonedistat を使用することで ATLL 細胞の PD-L1 発現を上昇させ、抗 PD-L1 抗体や抗 PD-L1 CAR-T 細胞による治療を行うことです。本研究は PD-L1 を標的とした二つの免疫療法による治療方針の可能性を示し、ATLL に対する今後の免疫療法開発の進展が期待されます。

## 【謝辞】

本研究は JSPS 科学研究費 (基盤研究 C (18K08313)・基盤研究 B (21H02775)) 及び高松宮妃癌研究基金、先進医薬研究振興財団、武田科学振興財団の支援を受けて遂行されたものです。

## 論文情報

論文名	Whole genome CRISPR screening identifies molecular mechanisms of PD-L1 expression in Adult T-cell leukemia/lymphoma (全ゲノム CRISPR スクリーニングで成人 T 細胞性白血病/リンパ腫の PD-L1 発現機序を解明)
著者名	千葉雅尋 <sup>1</sup> 、下埜城嗣 <sup>1</sup> 、須藤啓斗 <sup>1</sup> 、石尾 崇 <sup>1</sup> 、遠藤知之 <sup>2</sup> 、後藤秀樹 <sup>2</sup> 、長谷川寛雄 <sup>3</sup> 、前田道之 <sup>4</sup> 、豊嶋崇徳 <sup>5</sup> 、Yibin Yang <sup>6</sup> 、中川雅夫 <sup>5</sup> ( <sup>1</sup> 北海道大学大学院医学院、 <sup>2</sup> 北海道大学病院、 <sup>3</sup> 長崎大学病院検査部、 <sup>4</sup> 京都大学ウイルス・再生医科学研究所、 <sup>5</sup> 北海道大学大学院医学研究院血液内科学教室、 <sup>6</sup> フォックスチェイス癌センター)
雑誌名	Blood (血液内科学の専門誌)
DOI	10.1182/blood.2023021423
公表日	2023 年 12 月 24 日 (日) (オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院医学研究院 助教 中川雅夫 (なかがわまさお)

T E L 011-706-7214 F A X 011-706-7823 メール nakagawam@med.hokudai.ac.jp

## 配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@jimu.hokudai.ac.jp

## 【参考図】

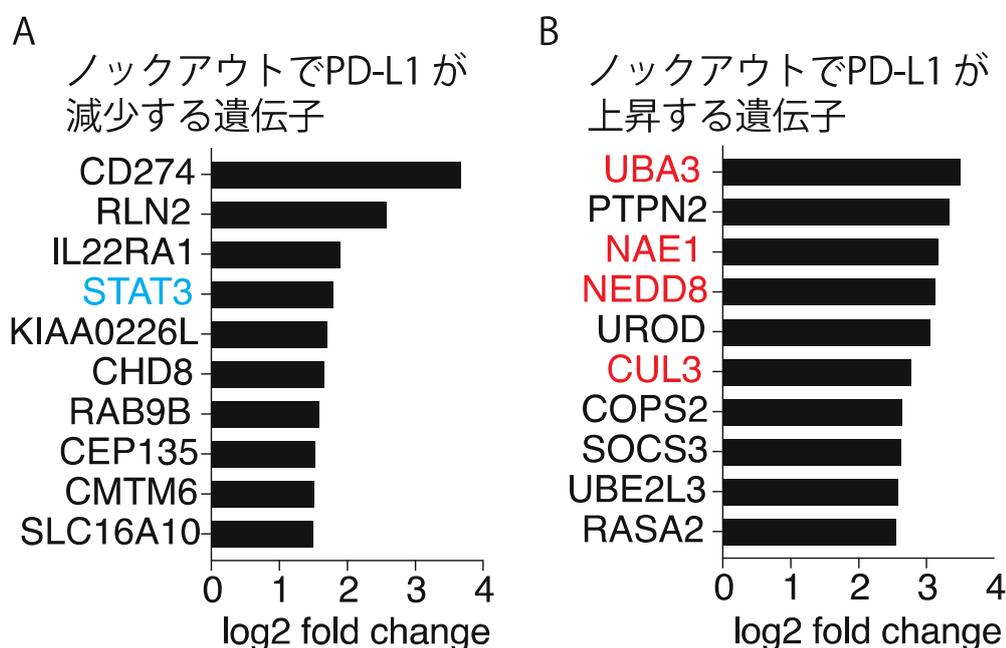
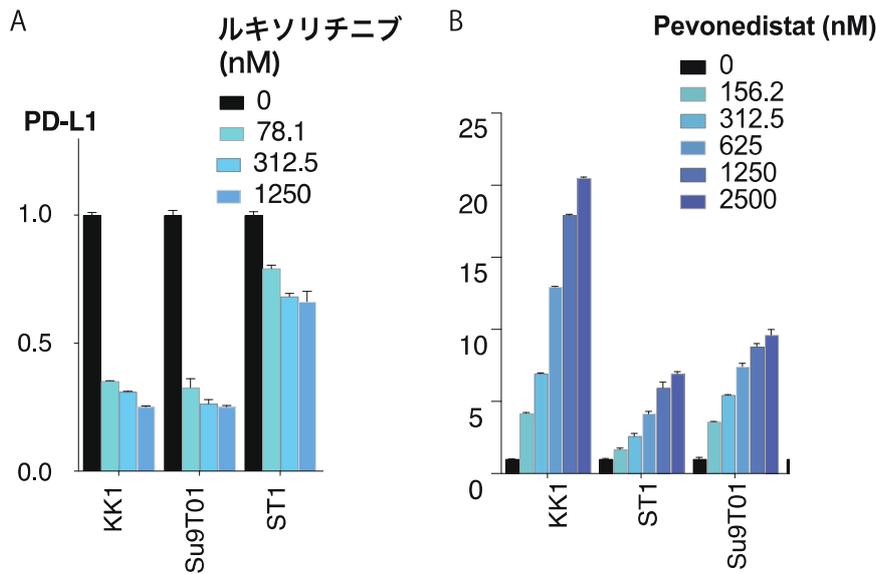
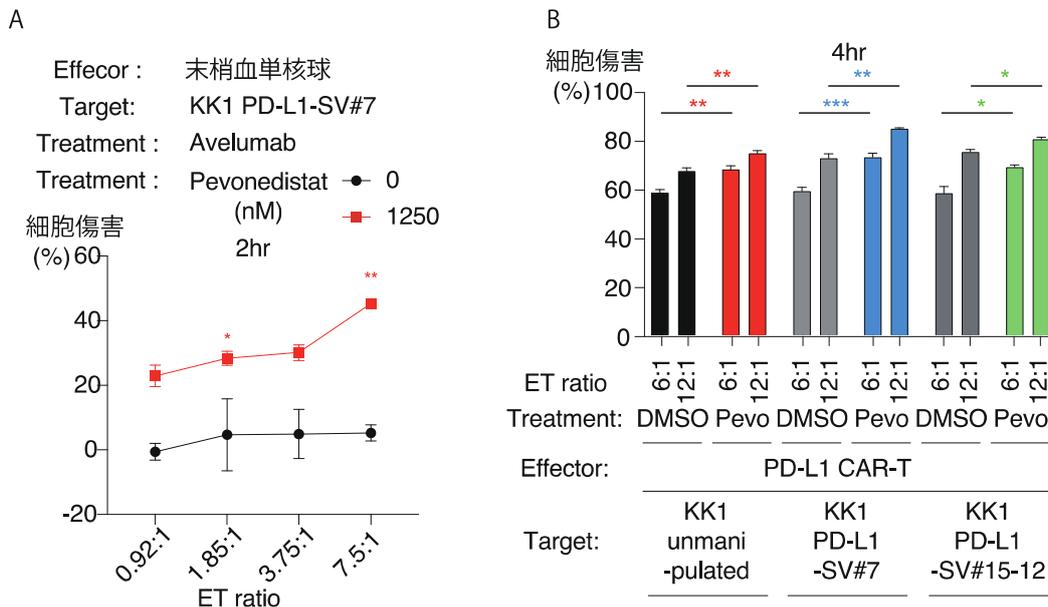


図 1. ATLL 細胞のクリスパーノックアウトスクリーニングの結果。(A) PD-L1 が減少する上位 10 個の遺伝子に CD274 (PD-L1) があり、このスクリーニングが適切に機能していることがわかる。この中に STAT3 がみられた。(B) PD-L1 が上昇する上位 10 個の遺伝子に NEDD 化に関連する遺伝子の UBA3、NAE1、NEDD8、CUL3 がみられた。



**図 2.** ATLL 細胞に薬剤を使用したときの PD-L1 変化をフローサイトメトリーで計測。  
 (A) JAK1/2 阻害薬のルキソリチニブ使用時は PD-L1 発現は減少した。ルキソリチニブが STAT3 活性化を阻害したために PD-L1 が減少したと考えられた。  
 (B) NEDD 化阻害薬の Pevonedistat 使用時は PD-L1 発現は上昇した。  
 (A)、(B) の結果はいずれもスクリーニング結果を裏付けている。



**図 3.** 細胞傷害アッセイ。KK1 (ATLL 細胞株) と KK1 の PD-L1 3'側非翻訳領域に変異を導入して PD-L1 発現を上昇させた細胞(KK1 PD-L1-SV#7, KK1 PD-L1-SV#15-12)を使用した。(A) Pevonedistat 使用もしくは未使用の KK1-PD-L1-SV#7 に抗 PD-L1 抗体の Avelumab と末梢血単核球を加えて 2 時間培養した後の細胞傷害を測定した。Pevonedistat 使用群では ATLL 細胞の PD-L1 発現が上昇することで高い細胞傷害がみられた。(B) Pevonedistat 使用もしくは未使用の KK1, KK1-PD-L1-SV#7, KK1-PD-L1-SV#15-12 に抗 PD-L1 CAR-T 細胞を加えて 4 時間培養した後の細胞傷害を測定した。Pevonedistat 使用群では ATLL 細胞の PD-L1 発現が上昇することで高い細胞傷害がみられた。

### 【用語解説】

- \* 1 CRISPR-Cas9 … DNA の二本鎖を切断することで、ゲノム配列の任意の遺伝子を欠損、挿入する遺伝子改変技術のこと。
- \* 2 NEDD 化 … NEDD8 (Neural precursor cell Expressed Developmentally Down-regulated protein 8) を標的タンパク質に結合させること。NEDD 化されたタンパク質は主に分解される。
- \* 3 次世代シーケンス … 大量の DNA 配列を解析する技術のこと。
- \* 4 STAT3 (Signal Transducers and Activator of Transcription3) … リン酸化されることで、核内に移行して、標的とする遺伝子を活性化する転写因子のこと。