

腫瘍内シグナルと腫瘍外免疫環境を同時に標的とする難治性悪性リンパ腫の新規治療戦略

遠西大輔

岡山大学病院 ゲノム医療総合推進センター

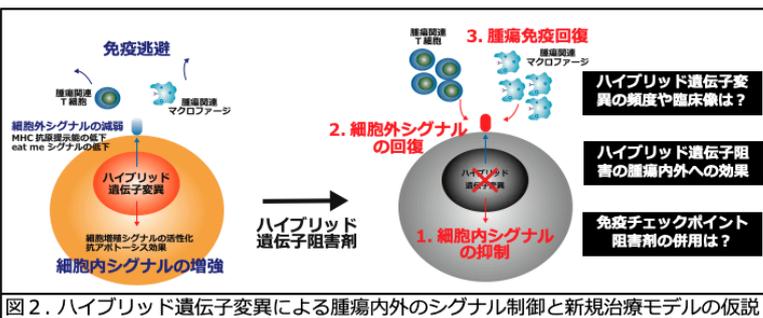
【研究の背景】

難治性悪性リンパ腫は1年生存率が10%以下と予後不良であり、また免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法の治療効果が乏しいことが知られており、その免疫療法抵抗性のメカニズムの解明とその打破は、悪性リンパ腫の個別化医療を進める上で喫緊の課題である。これまで申請者はカナダ・ブリティッシュコロンビア大学(UBC)にて、血液腫瘍のトランスクリプトーム分類と免疫療法抵抗性メカニズムの解明を焦点に、多くの国際研究を主導して来た。特に悪性リンパ腫の正確な患者層別化と新規薬剤開発に関わることで(特許出願番号: PCT/IB2019/058784)、血液腫瘍の個別化医療の推進に貢献してきた(図1: *Ennishi D et al. Cancer Discovery 2020*)。

| 3年生存率 | 20-30% | 80-90% | 70-80% | 40-50% |
|-----------------|--|---|--|---|
| トランスクリプトームによる分類 | DHIT-like | GCB-DLBCL | UNC | ABC-DLBCL |
| ゲノミクスによる分類 | EZB/C3 BCL2, KMT2D, CREBBP, MYD88, EZH2, TNFRSF14, CD44, IRF4 | C4 HIST1H1E, HIST1H1C, HIST1H1D, CD28, CD28A | BN2/C1 BCL6, TNFRSF3, SPEN, NOTCH1, BCL10, TNFRSF25 | N1, MCD/C5 MYD88, TET2, STK11, CD79B, PRDM14, CD200A, SPIB |

図1. B細胞性リンパ腫における新規マルチオミクス分類: トランスクリプトーム解析 (*Ennishi D, J Clin Oncol 2019*) とゲノミクス解析 (*Schmitz, NEJM 2018*)により、新規分類が確立された (*Ennishi et al, Cancer Discovery in press*)。

その過程で、難治性悪性リンパ腫では、BCR や NF-κB など腫瘍内シグナルの活性化を引き起こす遺伝子 (*EZH2*, *TMEM30A*) の変異が、同時に細胞外シグナルを抑制し、免疫原性を低下させる事で腫瘍の免疫逃避を引き起こす事を発見した。さらに、これらの遺伝子の阻害剤は、腫瘍細胞自体の増殖抑制効果だけでなく、強力な腫瘍免疫を動員する事で高い抗腫瘍効果をもたらす事を突き止めた (*Ennishi D, Cancer Discovery 2019; Ennishi D, Nature Med 2020*)。最近、このような腫瘍細胞内外シグナルの両者を制御するハイブリッド遺伝子変異の存在は、他の血液がんでも散見されるようになっており (*Klughammer J, Nature Med 2018*)、ハイブリッド遺伝子変異を標的として腫瘍細胞内外シグナルを同時に攻撃する治療戦略は、次世代の血液腫瘍・治療戦略として非常に注目されている。



しかし、これまでハイブリッド遺伝子変異の同定は限られた症例のみで行われており、大規模な検索がなされていない。また、ハイブリッド遺伝子変異の生物学的意義の解明には、腫瘍と免疫環境の複雑なクロストークの解析が必須であるが、従来のゲノミクス技術ではそれらの十分な解析が困難であり、最新のマルチオミクス技術による網羅的解析が必要である(図2)。

【目的】

免疫療法抵抗性の機序の解明とその打破は、血液腫瘍患者の個別化医療を進める上で喫緊の課題である。これまで申請者が見出してきた、腫瘍内シグナルと細胞外シグナルを同時に制御するハイブリッド遺伝子変異を標的として、腫瘍内外シグナルを同時に攻撃する治療戦略の開発を目指す。

【方 法】

本研究では、世界最大規模の悪性リンパ腫コホートをを用いたマルチオミクス解析により新規ハイブリッド遺伝子変異を同定し、新たな治療戦略、特にエピゲノム阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の新規併用療法の開発を目的として、細胞株、動物モデルを使用した生物学的検証を行う(図3)。

①マルチオミクス解析による新規ハイブリッド遺伝子異常の発見

悪性リンパ腫の臨床検体を使用し、トランスクリプトーム並びにゲノミクス解析を行う。トランスクリプトーム解析では、MHC など腫瘍表面抗原と免疫細胞の定量を行い、ゲノミクス解析と統合解析して、ハイブリッド遺伝子変異の新規同定を行う。これまで B 細胞性リンパ腫 1,500 例の臨床・組織情報を収集し、既に核酸抽出を開始している。

②シングルセルオミクス技術を用いたハイブリッド遺伝子変異の機能解析と新規免疫併用療法の開発

CRISPR-Cas9 などを用いてハイブリッド遺伝子変異を細胞株やマウスモデルに導入し、エピゲノム阻害剤を投与する事で、腫瘍細胞死と腫瘍周囲免疫細胞が再動員される事を評価する。さらに、抗 CD47 抗体や抗 SIRPα 抗体など、マクロファージの食食機能を亢進させる次世代の免疫チェックポイント阻害剤との併用効果を確認する。この際、シングルセルオミクス解析を行い、ハイブリッド遺伝子変異と腫瘍関連免疫細胞のクロストークを詳細に解析する。このように腫瘍自体の増殖抑制効果と、腫瘍免疫の賦活化による腫瘍免疫効果を検証する事で、非臨床 proof of concept の取得を目指す。

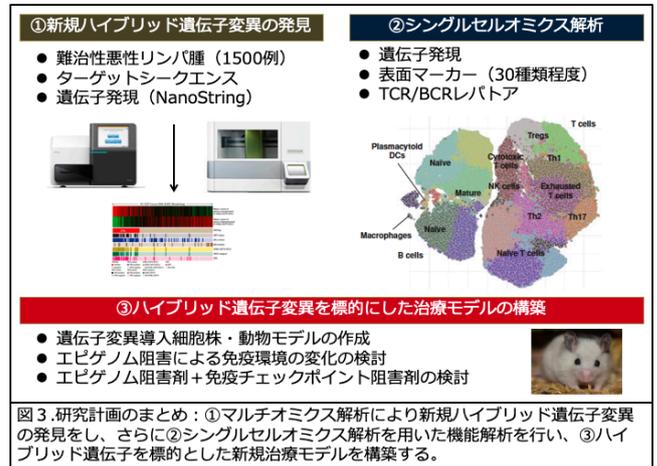


図3. 研究計画のまとめ: ①マルチオミクス解析により新規ハイブリッド遺伝子変異の発見をし、さらに②シングルセルオミクス解析を用いた機能解析を行い、③ハイブリッド遺伝子を標的とした新規治療モデルを構築する。

【結 果】

①まずRCHOP療法を実施したDLBCL 1,200例に関して、トランスクリプトーム分類を完了した。MHC-I/II 抗原が欠如し免疫微小環境がcoldであるDHITsig-positive/indが全症例の約30%に見られ、その予後は5年生存率50%と不良であった(図4)。現在、遺伝子変異解析を実施しており、DHITsig-positive/ind群に有意に集積が見られる遺伝子変異を同定し、新規ハイブリッド遺伝子変異としての機能解析に進めていく。

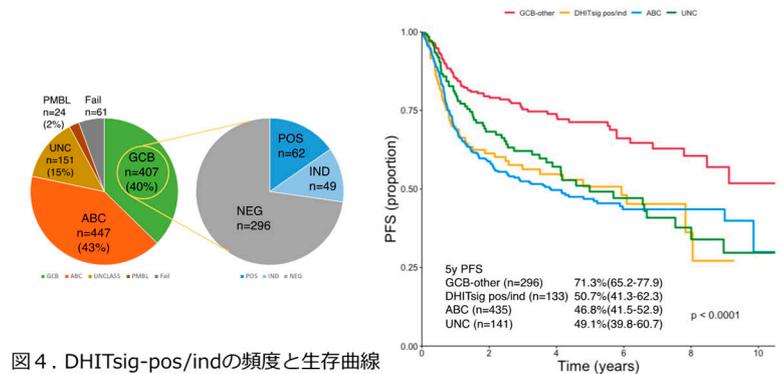


図4. DHITsig-pos/indの頻度と生存曲線

②TMEM30Aのノックアウトモデルを作成した。これまで高悪性度リンパ腫細胞株を用いて、ハイブリッド遺伝子変異であるTMEM30AをCRISPR/Cas9にてノックアウトしたところ、”eat me signal”であるPhosphatidylserine (PS)の露出が確認され、マクロファージ食食実験に進んでいる(図5)。同時に、このノックアウト細胞株からRNAを抽出し、シングルセルRNAseqを実施中であり、TMEM30Aが細胞内外シグナルに与える影響を一細胞レベルで評価している。また、動物モデルとしてノックアウト細胞株を導入したxenograftモデルを作成し、腫瘍増大とマクロファージの食食機能との関連性を現在評価中であり、マクロファージチェックポイント阻害剤(抗CD47抗体)の投与を計画している。

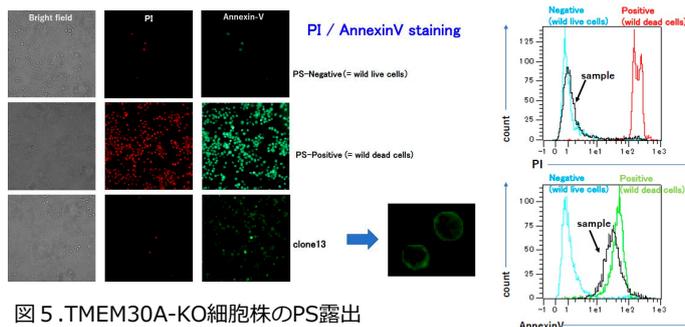


図5. TMEM30A-KO細胞株のPS露出

【考 察】

これまでの研究結果は概ね既報を再現するものであり、実験系としては機能していると思われる。MHC-I/II 発現が低下する DHITsig-pos/ind グループが、本研究の大規模コホートにおいても予後不良であることが明らかとなり、今後の治療介入を積極的に進めていくべき患者群であることが示唆される。また、これらの症例に対して、ハイブリッド阻害剤＋免疫併用療法のストラテジーとして、マクロファージチェックポイント阻害剤による食食効果の増強を目指して、実験を進めていく。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

まず本研究における日本人コホートにおいて、予後不良である DHITsig-pos/ind が 30%存在することが明らかとなり、欧米人のデータを元にした既報とほぼ同様の結果であった。このことから、日本人においても免疫逃避状態にある悪性リンパ腫は予後不良であり、ハイブリッド遺伝子変異の重要性が改めて示されたことになる。また、TMEM30A の遺伝子改変実験では、ハイブリッド遺伝子変異がマクロファージの活性化を制御していることが解明されつつあることから、現在臨床開発が進んでいるマクロファージの食食機能を増強するマクロファージチェックポイント阻害剤(抗 CD47 抗体)のバイオマーカー、さらには食食効果をさらに高める免疫併用療法の開発に繋げる。

【参考・引用文献】

- 1 **Ennishi D**, Hsi ED, Steidl C, Scott DW. Toward a New Molecular Taxonomy of Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Cancer Discovery*, 2020.
- 2 **Ennishi D**, Healy S, Bashashati A, Saberi SA, Hother C, Mottok A, Chan FC, Chong L, Kridel R, Boyle M, Meissner B, Aoki T, Takata K, Woolcock BW, Viganò E, Abraham L, Gold M, Molday LL, Molday RS, Telenius A, Li MY, Wretham N, Santos ND, Wong M, Viller NN, Uger RA, Duns G, Baticados A, Madero A, Farinha P, Slack GW, Shulha HP, Chiu DS, Mostafavi S, Gerrie AS, Huang DW, Rushton C, Villa D, Sehn LH, Savage KJ, Mungall AJ, Weng AP, Bally MB, Morin RD, Staudt LM, Connors JM, Marra MA, Shah SP, Gascoyne RD, Scott DW and Steidl C. *TMEM30A* loss-of-function mutations drive lymphomagenesis and confer therapeutically exploitable vulnerability in B-cell lymphoma. *Nature Medicine*. Apr;26(4):577-588, 2020.
- 3 **Ennishi D**, Takata K, Béguelin W, Duns G, Mottok A, Farinha P, Bashashati A, Saberi S, Boyle M, Meissner B, Ben-Neriah S, Telenius A, Lai D, Teater M, Kridel R, Savage KJ, Sehn LH, Morin RD, Marra MA, Shah SP, Connors JM, Gascoyne RD, Scott DW, Melnick AM, Steidl C. Molecular and Genetic Characterization of MHC Deficiency Identifies EZH2 as Therapeutic Target for Enhancing Immune Recognition. *Cancer Discovery*. Apr;9(4):546-563, 2019.
- 4 **Ennishi D**, Jiang A, Boyle M, Collinge B, Grande BM, Ben-Neriah S, Rushton C, Tang J, Thomas N, Slack GW, Farinha P, Takata K, Miyata-Takata T, Craig J, Mottok A, Meissner B, Saberi S, Bashashati A, Villa D, Savage KJ, Sehn LH, Kridel R, Mungall AJ, Marra MA, Shah SP, Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD, Morin RD, Scott DW. Double-Hit Gene Expression Signature Defines a Distinct Subgroup of Germinal Center B-Cell-Like Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *J Clin Oncol*. Jan 20;37(3):190-201, 2019
- 5 **Ennishi D**, Mottok A, Ben-Neriah S, Shulha HP, Farinha P, Chan FC, Meissner B, Boyle M, Hother C, Kridel R, Lai D, Saberi S, Bashashati A, Shah SP, Morin RD, Marra MA, Savage KJ, Sehn LH, Steidl C, Connors JM, Gascoyne RD, Scott DW. Genetic profiling of MYC and BCL2 in diffuse large B-cell lymphoma determines cell-of-origin-specific clinical impact. *Blood*. May 18;129(20):2760-2770, 2017.
- 6 Boice M, Salloum D, Mourcin F, Sanghvi V, Amin R, Oricchio E, Jiang M, Mottok A, Denis-Lagache N, Ciriello G, Tam W, Teruya-Feldstein J, de Stanchina E, Chan WC, Malek SN, **Ennishi D**, Brentjens RJ, Gascoyne RD, Cogné M, Tarte K, Wendel HG. Tumor suppression and therapeutic restoration of HVEM (TNFSRF14) in lymphoma. *Cell*. Oct 6;167(2):405-418, 2016