

要 約

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	山 口 健 太 郎
主 論 文 題 名 In vivo CRISPR screening reveals cooperation of <i>KMT2D</i> and <i>TP53</i> deficiencies in B-cell lymphomagenesis (生体内CRISPRスクリーニングにより解明された、B細胞性リンパ腫発症における <i>KMT2D</i> と <i>TP53</i> 異常の協調作用)				
(内 容 の 要 旨) びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫 (Diffuse large B-cell lymphoma : DLBCL) は、悪性リンパ腫で最も高頻度に認められる病型である。標準的な化学療法が約70%の患者で奏功する一方、残りは再発難治性となり予後不良である。本疾患を対象とした遺伝子解析研究の結果、数百を超える遺伝子異常が報告されたが、それらのリンパ腫発症に対する生物学的意義や協調関係の多くは未解明である。 本研究では、複数の遺伝子解析研究で高頻度に異常が認められ、機能喪失型異常が想定される86遺伝子を対象に独自のsgRNAライブラリを構築した。Cas9を恒常的に発現するマウスから造血幹前駆細胞を採取し、本ライブラリ由来のレンチウイルスを感染させた後、同系移植を行い、B細胞性腫瘍を含む様々な造血器腫瘍を発症する生体内CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 機能喪失型スクリーニング法を開発した。発症個体から得られた腫瘍に対して病理診断やフローサイトメトリー解析を行い、さらにsgRNA標的領域に対するシーケンス (sgRNA sequencing : sgRNA-seq)、全エクソン解析 (Whole-exome sequencing : WES)、RNAシーケンス、オープンクロマチン領域に対するシーケンス (Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing : ATAC-seq) を実施し、各病型におけるドライバー遺伝子異常、sgRNA設計領域外の遺伝子異常 (second-hit異常) の有無、遺伝子異常の協調関係を解析するとともに新規治療標的分子の探索を行った。 sgRNA-seqとWESの統合解析の結果、B細胞性リンパ腫ではsgRNA設計領域の <i>Kmt2d</i> 異常とsecond-hit異常としての <i>Trp53</i> 異常が有意に強調することを解明した。DLBCL患者由来の大規模遺伝子データを再解析した結果でも、この協調関係は最も高頻度で認められ、特に再発難治例において顕著で予後不良因子であった。RNAシーケンスとATAC-seqを統合解析した結果、 <i>Kmt2d</i> 異常を有するB細胞性リンパ腫において <i>Trp53</i> 異常を伴う場合、 <i>Yap1</i> の過剰発現と、YAP1 (Yes-associated protein 1) の主たる共役因子であるTEAD1 (Transcriptional enhanced associate domain 1) の結合モチーフ配列のオープンクロマチン領域への有意な集積が認められた。さらに、両遺伝子異常を有するヒトDLBCL細胞株およびマウスの移植モデルを用いた検証により、YAP1を標的とした遺伝子介入および薬剤介入がいずれも腫瘍抑制効果を示すことを実証した。 本研究は、生体内CRISPRスクリーニングを経て再発難治性DLBCLを模倣するマウスモデルを樹立し、マルチオミクス解析を経て、新規治療標的となりうる分子を特定した。				