

奨励金No.1589

PRDM1 機能変化に伴う T リンパ球の 抗腫瘍免疫能に関する基礎的研究

サイ テンゲツ
北海道大学 特任助教

Fundamental Research on anti-tumor immunocompetence of T lymphocytes associated with altered PRDM1 function

Zhai Tianyue
Hokkaido University, Specially Appointed Assistant Professor



生殖細胞系列 *PRDM1* 遺伝子の1塩基多型 rs2185379（以下 rs2185379）を保有する進行卵巣癌の無再発長期生存患者3人と、rs2185379を保有せず治療開始当初より治療抵抗性あるいは早期に再発した患者3人のTリンパ球遺伝子発現をRNA-seq法により網羅的に解析したところ、rs2185379リンパ球では、非rs2185379 Tリンパ球と比較して、ヘム代謝に関わる遺伝子発現を切り捨て、T細胞受容体のうち α および β 可変領域を構成する特定の遺伝子発現が上昇していることがわかった。

We comprehensively analyzed gene expression in T lymphocytes from three long-term relapse-free patients with advanced ovarian cancer who carried the single-nucleotide polymorphism rs2185379 (hereafter referred to as rs2185379) in the germline *PRDM1* gene, and three patients who did not carry rs2185379 and experienced treatment resistance or early relapse from the start of treatment, using RNA sequencing. We found that rs2185379 lymphocytes exhibited reduced expression of genes involved in heme metabolism and increased expression of specific genes that constitute α and β variable regions of the T cell receptor compared to non-rs2185379 T lymphocytes.

1. 研究内容

1.1 卵巣癌患者の血液検体収集

北海道大学病院に通院中の卵巣癌患者のうち、rs2185379を保有する無再発長期生存者4人、生殖細胞系列 rs2185379を保有しない早期再発患者3人、および健常者1人、合計8人より文書による同意を得て、血液検体を採取した。これらの血液検体から密度勾配遠心法により末梢血単核細胞を分離し、続いてFACS法により細胞障害性腫瘍免疫においてもっとも重要な役割を果たす細胞であるCD8陽性T細胞を分離した。これらの8人のRNA検体を使用して次世代シーケンサーに

よるRNA-seq（RNA シークエンス）を実施し、17,058 遺伝子の発現情報を網羅的に解析した。このうち rs2185379 保有無再発長期生存者3人（無再発期間はそれぞれ12年、12年、26年、以下 rs218537 群）と rs2185379 非保有早期再発患者3人（無再発期間はそれぞれ0ヶ月、3ヶ月、7ヶ月、以下対照群）の結果を用いて、次の比較解析に進んだ。

1.2 RNA-seq 結果

最初に、各群3人の患者の遺伝子発現の分散を2次元で示すPCA plot（図1）を作成すると、対照

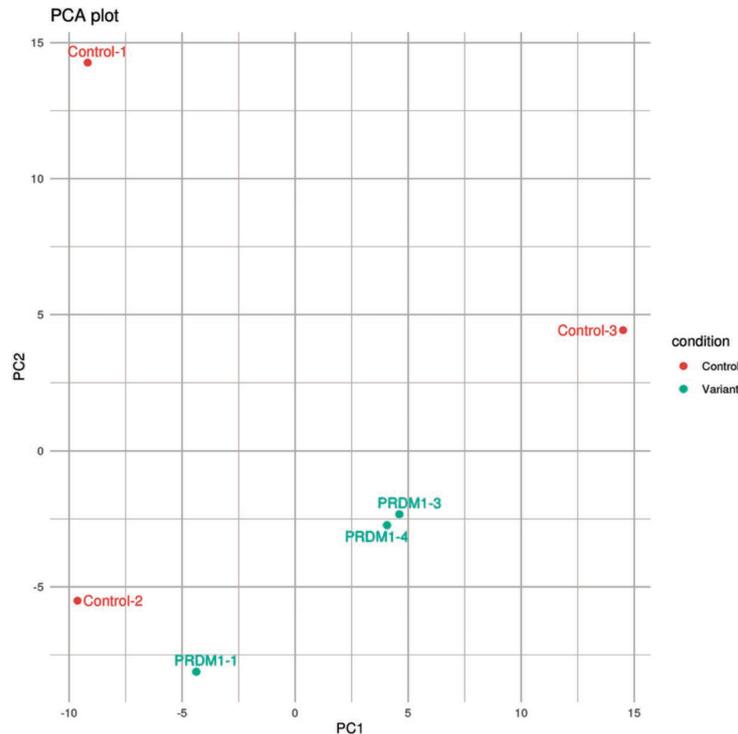


図1. 6人の患者の遺伝子発現分散
rs218537 群はPRDM1-1、-3、-4、対照群はControl-1、-2、-3と示されている。

群の3人は広い範囲に分布しており特定の遺伝子発現傾向を示さなかったのに対して、rs2185379群の3人は互いに近傍に位置しており、一定の遺伝子発現傾向の存在が示唆された。

次に、2群間の遺伝子発現の相違の中で、特定の細胞機能に紐づく変化があるかどうか推測するために遺伝子セットエンリッチメント解析を実施したところ、図2に示すように、ヘム（Heme）代謝に関する複数遺伝子の発現がrs218537群で低下していることが示された（ $P < 0.0001$ ）。

発現変化の大きな遺伝子を具体的に確認するために、MA plotを作成した（図3）。各点は、1つの遺伝子に対する両群合計6人の平均発現値を示しており、X軸で右側に位置（正の数値）するほど当該遺伝子の発現が高く、Tリンパ球の重要な機能に関わっていることが示唆される。逆にX軸で左側に位置（特に0以下）していると発現が低いことを示し、Tリンパ球の機能においては重要性が低い遺伝子であると考えられる。Y軸方向は、

rs2185379群と対照群の遺伝子発現の相違を示しており、上側に位置（正の値）するほどrs2185379群のTリンパ球で対照群より発現が高く、下側に位置（負の値）するほどrs2185379群のTリンパ球で対照群より発現が低いことを示す。そのため、グラフの右上あるいは右下に位置する遺伝子が、Tリンパ球機能に密接に関わり、かつrs2185379群と対照群の間で発現の差が大きかったことを示す。図3右下に、緑色の台形で囲んだ遺伝子の一群があるが、すべて前述のヘム代謝関連遺伝子であり、rs2185379群で発現が大きく低下していたことを示す。また、右上赤色の四角で囲んだ遺伝子群と右下青色の三角で囲んだ遺伝子群は全て、Tリンパ球の抗原認識性を決定するTリンパ球受容体のうち可変領域（遺伝子名の末尾のVはvariableを示す）を構成する蛋白をコードしている。これらのT細胞受容体遺伝子の発現の変化は、卵巣癌細胞に発現する抗原を認識して破壊するための重要な情報である可能性がある。

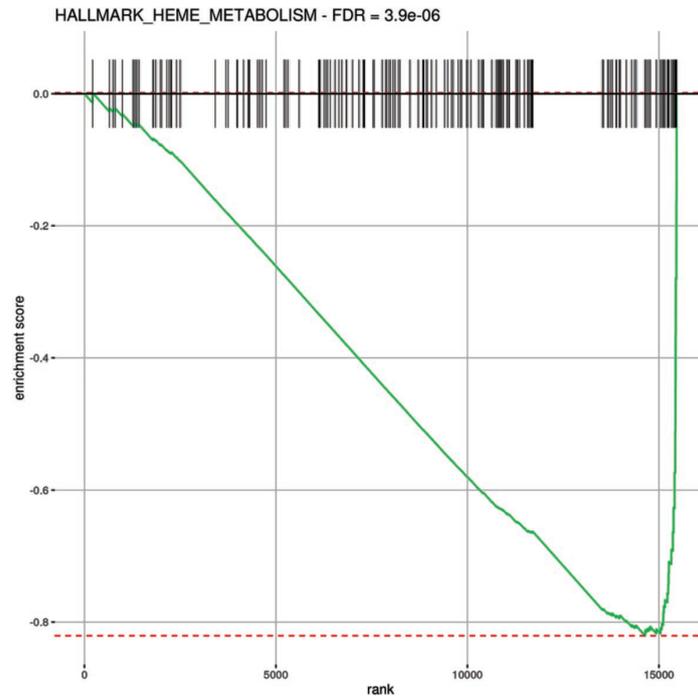


図2. ヘム代謝に関連する遺伝子セットエンリッチメント解析

上部では、1本のバーコードが1つの遺伝子を示している。下部グラフでは、各遺伝子の発現がrs218537群で対照群より低下している場合に縦軸方向のEnrichment Scoreが低下するように描かれており、緑色の線でscoreが連続的に繋がられている。左から右へ向かうに連れて緑線のEnrichment Scoreが徐々に低下していくのは、ヘム代謝に関わる複数の遺伝子の発現がrs218537群で対照群よりも低下していることを示している。右端でscoreが急上昇しているのは、ヘム代謝に関わる少数の遺伝子については発現に差がない、あるいはrs218537群の方が上昇していることを示す。ヘムは、ポルフィリン環に鉄イオンが結合した構造を持つ化合物であり、特にヘモグロビンやミオグロビンなどのタンパク質に結合して酸素の運搬や貯蔵に関与する重要な役割を果たしている。

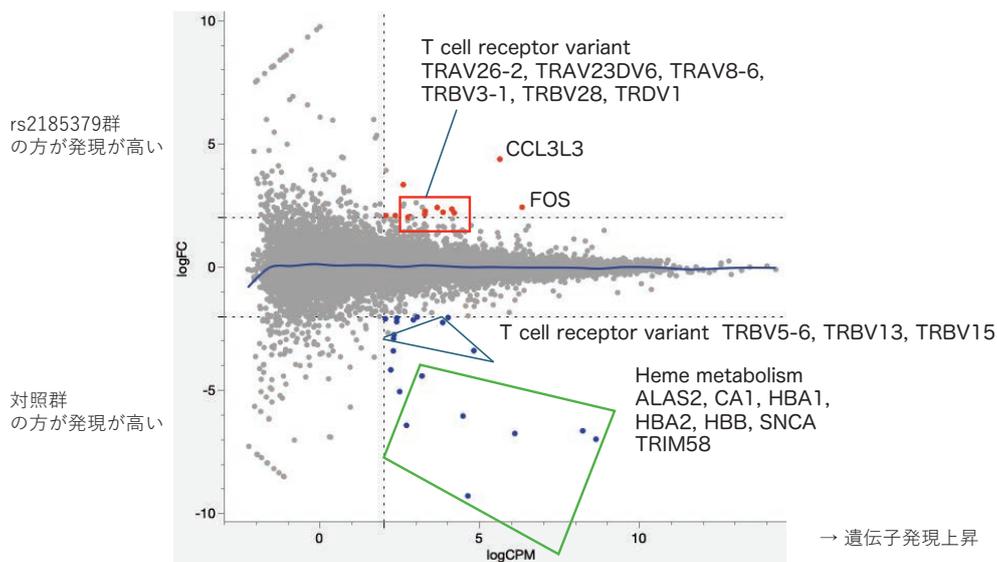


図3. 17,058 遺伝子の発現変化を示す MA plot

その他に、抗腫瘍免疫において重要な役割を果たすことが知られている CCL3L3 と FOS（グラフ右上）の発現は rs2185379 群で有意に上昇しており、これら2つの遺伝子発現も患者の長期生存に有利な条件となっていた可能性がある。

これらの結果から、rs2185379 Tリンパ球は、癌細胞に対する細胞性免疫において直接的な貢献度が低いと予測されるヘム代謝機能を切り捨てて、卵巣癌細胞特異的な抗原を確実に認識するための受容体可変領域の構造を工夫すること等を優先して強力な抗腫瘍免疫を獲得している、と仮説を立てた。

* 1.2 までの結果が得られた段階で研究助成金の使用期間延長を申請し、以下の追加実験を実施した。

1.3 確認実験の準備

上記の仮説を必要十分な情報に基づき実証する方法は、野生型 *prdm1* 遺伝子を持つ生物に対して遺伝子編集技術を用いて人為的に rs2185379 を導入した場合に、前述の rs2185379 卵巣癌患者と同様に Tリンパ球の遺伝子発現がヘム代謝機能を切り捨て、かつ卵巣癌特異的な抗原認識を目的とした受容体変化を起こしている傾向を示すことである。この検討はヒトでは実施不可であるため、マウスを用いる実験系での証明を計画した。追加検討に関する研究計画は北海道大学総長により承認されている。

遺伝子編集技術である CRISPR 法を用いて、免疫不全のないマウスの精子にヒト *PRDM1* 遺伝子の相同遺伝子である *prdm1* に rs2185379 を導入する。体外受精と胚移植により誕生した子マウスの *prdm1* は、野生型、rs2185379 ヘテロ接合型、rs2185379 ホモ接合型の3種類となる。それぞれのマウスにマウス卵巣癌細胞である ID8 を移植し、形成された腫瘍を摘出する。これらの腫瘍に浸潤する個々の Tリンパ球の遺伝子発現を、次世代シーケンサーを用いる single cell 遺伝子解析により

解明する予定である。今回助成していただいた研究費は、次世代シーケンサーによる遺伝子解析の条件検討まで使用した。

2. 発表（研究成果の発表）

現時点では未発表である。