

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名 山梨大学

職名・氏名 準教授・大石直輝

(印)

1 研究テーマ

節外性NK/T細胞リンパ腫におけるエピゲノム異常の解析

2 研究の目的

節外性NK/T細胞リンパ腫(extranodal NK/T-cell lymphoma: ENKTL)は、日本をはじめとする東アジアで比較的頻度が高い高悪性度リンパ腫で、上気道主体の節外発生・NK細胞ないし細胞障害性T細胞(CTL)の形質・腫瘍細胞へのEpstein-Barrウイルス(EBV)感染を特徴とする。進行期ENKTLは難治性で、L-asparaginaseを組み込んだ多剤併用化学療法が用いられている。一方、このような治療は毒性が高く、抗PD1抗体などの免疫チェックポイント阻害薬(ICI)やメチル化阻害薬を効果的に組み合わせた新規治療の開発が求められている[Tse et al., J Hematol Oncol, 2022].

ENKTLの分子病態には①腫瘍細胞のゲノム異常・②EBVのゲノム異常・③腫瘍細胞のエピゲノム異常・④腫瘍免疫微小環境が重要である。申請者らはこれまでに、①ENKTL腫瘍細胞のゲノム異常を主に解析し、予後因子としてBCORおよびTP53変異の意義を明らかにしてきた[Oishi et al., Blood Advances, 2023]。一方で、③腫瘍細胞のエピゲノム異常についてはこれまでに十分な解析がされておらず、腫瘍細胞のエピゲノム異常が①腫瘍細胞のゲノム異常、③腫瘍免疫微小環境、④免疫微小環境とどのように関連するかは明らかになっていない。

エピゲノムはゲノムの配列変化に依存しない遺伝子発現の制御機構であり、micro-RNA(miRNA)やヒストン修飾のほか、DNAシトシンのメチル化が重要な役割を果たしている。近年、広範囲のCpGアイランド、遺伝子、エンハンサーをカバーするメチル化プロファイ尔マイクロアレイが開発され、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)標本由来DNAでもゲノムワイドなメチル化解析が可能となった。

以上の背景をもとに、本研究ではメチル化プロファイリングアレイによるゲノムワイドなメチル化解析によりENKTLのエピゲノム異常を解析し、症例間の不均一性・多様性を明らかにするとともに、これまでの研究で得られたゲノム異常と関連づけることでENKTLの精細な分子サブタイプの解明を目指す。

3 研究の方法

留意事項

- ①3枚程度で作成してください。
- ②特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

1. 症例・サンプルとDNAの抽出

山梨大学および研究協力施設で採取されたENKTL (n=16)について、FFPE標本からDNAを抽出した。同時にENKTL症例の臨床病理学的情報（年齢・性別・予後など）を収集した。

2. メチル化アレイ解析

抽出したDNAのメチル化状態をInfinium MethylationEPIC v2.0により解析し、以下の解析をおこなった。

i. 次元削減手法による解析：

tSNE解析やUMAP解析などの次元削減手法により得られたメチル化データを解析し、ENKTLのメチロームの均一性・多様性を調べた。

ii. 階層的クラスタリング：

得られたメチル化データを階層的クラスタリングにより層別化し、ENKTL症例におけるメチル化サブタイプの同定を試みた。

iii. 臨床病理学的所見・ENKTLゲノム異常との関連づけ：

上記の各エピゲノム解析において、ヒトゲノムおよびEBVウイルスゲノムの異常との関連を解析し、多角的なデータ解析をおこなう。

4 研究の成果

得られたメチル化データのクオリティ・コントロールの結果、解析に供した16例のENKTLのうち13例が基準をクリアし、解析可能と判断した。

i. 次元削減手法による解析：

tSNE解析により、ENKTL (n=13) のなかにはメチル化サブタイプA (n=7) とメチル化サブタイプB (n=6) の2つのメチル化サブタイプが存在することが示唆された。

ii. 階層的クラスタリング：

階層的クラスタリングにおいても、メチル化サブタイプA (n=7) とメチル化サブタイプB (n=6) は別のクラスターに分類されることが確認された。

iii. 臨床病理学的所見・ENKTLゲノム異常との関連づけ：

これらのメチル化サブタイプは、性別・発生部位・JAK-STAT経路の遺伝子変異・リン酸化STAT3の発現・MYCの発現・CD30の発現とは明らかな関連を認めなかった。一方、クローン性造血に関連したDNMT3AおよびTET1/TET2/TET3のいずれかの遺伝子異常を有する症例 (n=2) は、すべてメチル化サブタイプAに含まれていた。

留意事項

- ①3枚程度で作成してください。
- ②特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

以上の結果から、ENKTL のなかにはメチル化状態が異なる少なくとも 2 つのメチル化サブタイプが存在することが示唆された。それぞれのメチル化サブタイプにおける臨床病理学的特徴やゲノム異常は今後の解析を必要とするが、DNA のメチル化に関連しクローニング造血において高頻度にみられる *DNMT3A* および *TET1/TET2/TET3* の変異がメチル化サブタイプに関与している可能性がある。

以上の解析結果を、第 7 回リンパ腫分子病態研究会（令和 7 年 1 月・川越）で発表した。

5 今後の展望

メチル化解析に供する DNKTL の症例数を更に増やすとともに、今回得られたメチル化データをもとに、ゲノムワイドなコピー数解析をおこなうとともに、メチル化サブタイプ間の変動メチル化領域 (differentially methylated region: DMR) の検出、変動メチル化領域 (DMR) の gene ontology (GO) 解析、エピジェネティック解析、deconvolution 解析による免疫微小環境プロファイルの推定をおこない、より包括的な ENKTL のメチル化異常を明らかにしたい。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

本研究の成果は、国際英文誌に投稿し研究者コミュニティに公開するとともに、本学および所属講座のウェブサイト・SNS などを通じてわかりやすく社会に発信する。

留意事項

- ① 3 枚程度で作成してください。
- ② 特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。