

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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 ウィルス (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・② EBV 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 (図 1)。申請者らはこれまでに、① ENKTL 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。

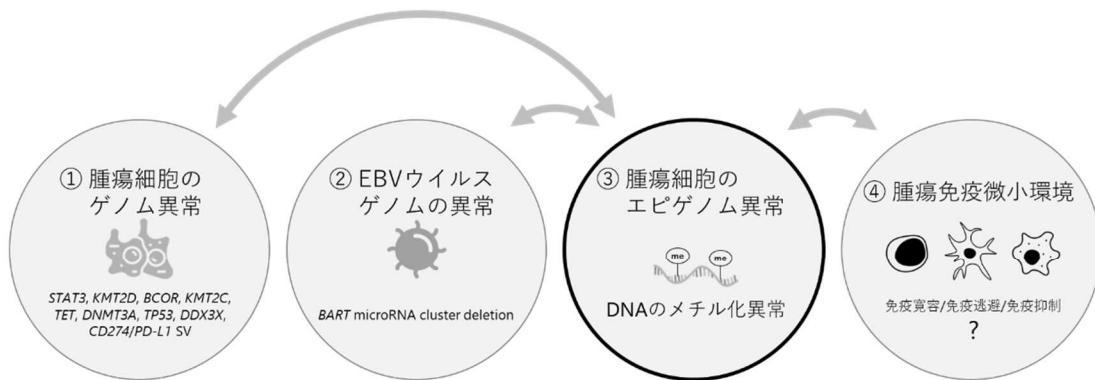


図 1 : ENKTL の病態を構成する各要素

本研究では腫瘍細胞におけるエピゲノム異常を明らかにするとともに、腫瘍細胞ゲノム・EBV ウィルスゲノムの異常、腫瘍免疫微小環境との関連づけて解析する。

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

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 により解析した。得られたデータについて、まずバックグラウンドのシグナルが強い ($p\text{-value} \geq 0.05$ である) ENKTL (n=3) を除外した。また、約 930,000 個のメチル化部位をターゲットとするプローブのうち、以下に該当するものを除外した。

- $p \geq 0.05$ のプローブ
- 既知の単一塩基多型 single nucleotide polymorphism (SNP) の近傍 ($\leq 5\text{bp}$) をターゲットとするプローブ
- ターゲットのなかに既知の SNP を含むプローブ
- X 染色体・Y 染色体に対するプローブ（性差の除外）

以上の処理を行ったうえで、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 ウィ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（図2）。

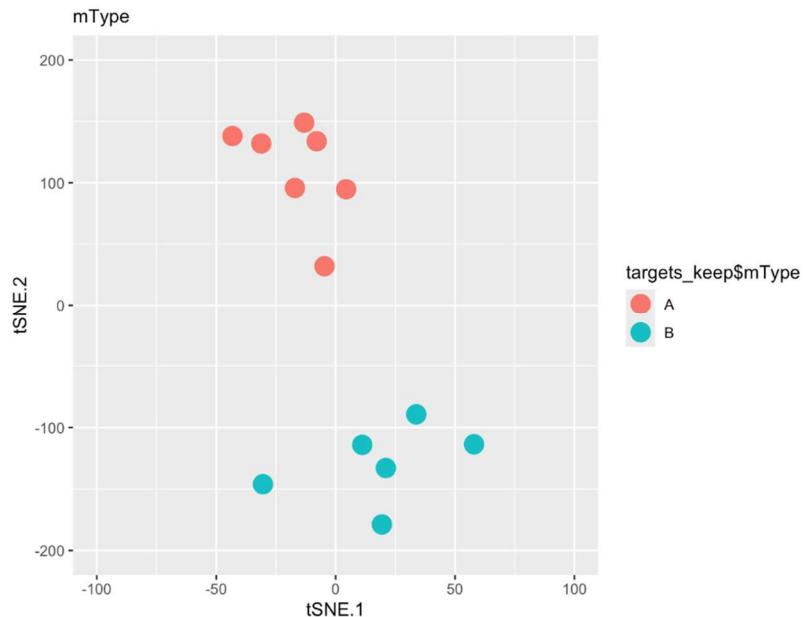


図2. ENKTL (n=13) の tSNE 解析

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（図3）。

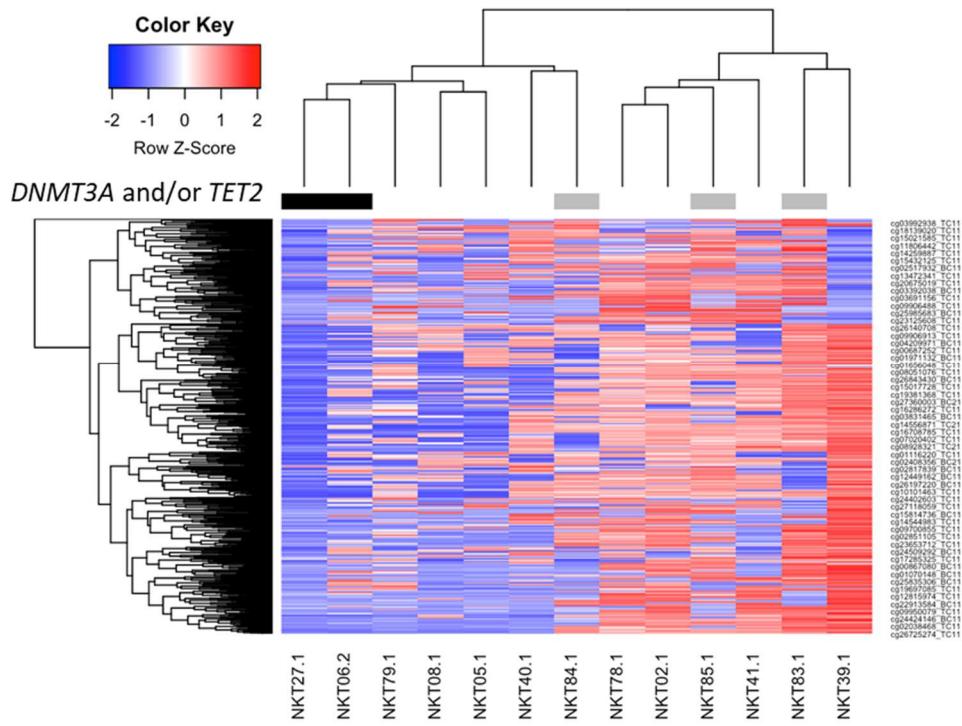


図3. ENKTL (n=13) の階層的クラスタリング解析

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（図4）。一方、クローニ性造血に関連した *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（図3および図4）。

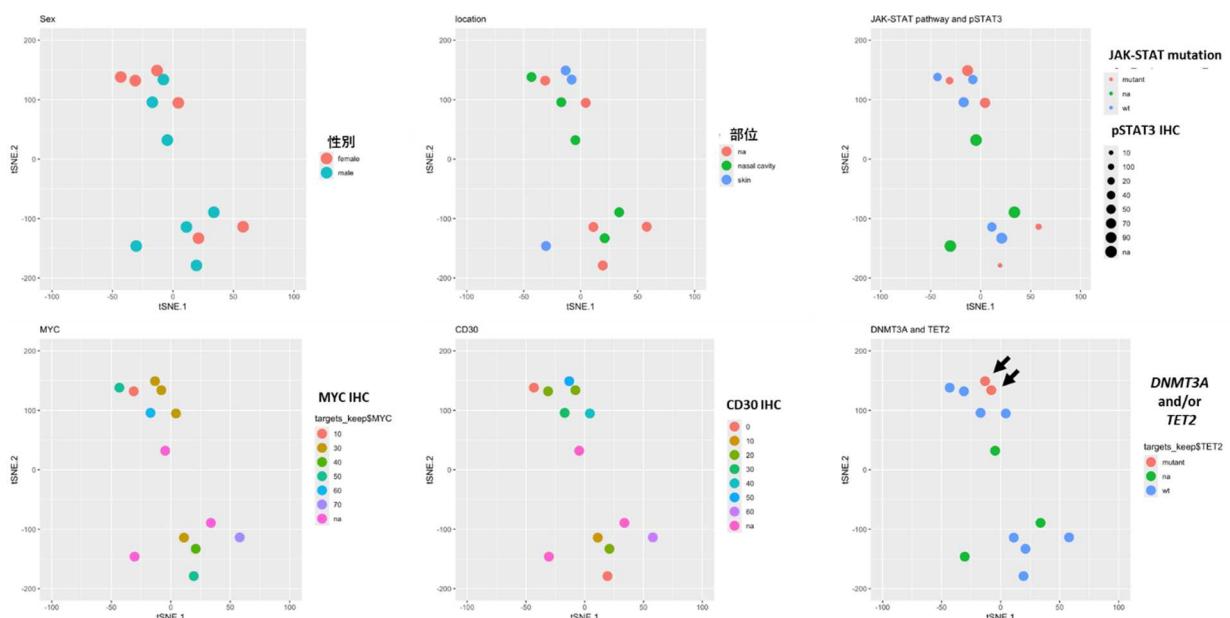


図4. ENKTL のメチル化サブタイプと臨床病理学的因子・遺伝子異常の関係

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。