

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：成人T細胞白血病リンパ腫に対するレナリドミド作用機序の解明を目指した研究

Elucidation of molecular mechanism of lenalidomide activity against adult T-cell leukemia/lymphoma

研究開発実施期間：平成29年5月1日～令和2年3月31日

研究開発代表者 氏名：片岡 圭亮

Keisuke Kataoka

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 分子腫瘍学 分野長

Division of Molecular Oncology, National Cancer Center Research Institute, Chief

## II 研究開発の概要

### 1) ATLのドライバー遺伝子異常とレナリドミド感受性の関係の解明

まず、様々なATL細胞株においてレナリドミド感受性の評価を行った。具体的には、ATL由来である16細胞株、HTLV-1陽性細胞由来である7細胞株の計23細胞株を0 $\mu$ M (DMSOのみ)、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M、100 $\mu$ Mのレナリドミドを投与し、感受性を評価した。感受性は、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assayを用いて、Nivoマルチモードマイクロプレートリーダーにより計測を行った。その結果、ATL細胞株AとATL細胞株Bの2細胞株はレナリドミド濃度が高くなるほど増殖の抑制が認められ、感受性があると考えられた。また、これらの2細胞株ほどではないが、ATL細胞株Cも中等度の感受性を示した。逆に、一部のATL細胞株はレナリドミド濃度が高くなるほど増殖の亢進を示した。この結果は予想外の結果であり、一部のATL細胞においてレナリドミドが腫瘍促進に寄与する可能性が示された。

次にATL細胞株における遺伝子異常の検索を行ったが、その前に、ATL患者検体の全ゲノム解析(50例)を追加することにより、候補ドライバー異常の網羅性を高めた。具体的には、宮崎大学下田が収集した約50例のATL患者検体を対象として十分な深度の全ゲノムシーケンスを行った。全ゲノムシーケンスは、腫瘍・正常DNAを用いて、TruSeq Nano DNA Library Preparation kitキットによりライブラリ調製を行い、NovaSeqを用いて大量並列シーケンスを実施した。データ取得後、これまでにシーケンス済みであった22例を加えた72例において、次世代シーケンスデータ専用の解析パイプライン(Genomon 2)を用いて、マッピング、変異コール、アノテーション情報の付加などを実施した。遺伝子変異に加えて、コピー数変化や構造異常などの異常も対象とした。その結果、1サンプルあたり6.8個/Mbの遺伝子変異、および、89個の構造異常を認めることが明らかとなった。これらの遺伝子変異の頻度は、エクソン領域において遺伝子間領域よりも低く、

Transcription-coupled repair メカニズムが作用していると考えられた。逆に、構造異常はイントロン領域で多く、遺伝子間領域では少なく存在し、変異と構造異常は異なるメカニズムで生じることが示唆された。

研究代表者らは、これまでにコーディング領域のドライバー異常として、全エクソン解析により *PLCG1* や *PRKCB*、*CCR4*、*CARD11* などの遺伝子変異を報告していたが、全ゲノム解析の結果を加えることにより、大きく遺伝子異常の全体像が変わることを明らかにした。具体的には、①全ゲノム解析を行うことにより、新規異常が見出されること、②これまで変異が認められていた遺伝子の一部で、構造異常を考慮することで異常が存在する頻度が大きく増加すること、が明らかとなった。さらに、③全ゲノム解析で構造異常の評価を行うことにより、*IKZF2* や *TP73* などほとんどの異常が構造異常を占める遺伝子の異常が存在する相対的な頻度が判明した。

上記の全ゲノム解析の結果、ATL の遺伝子異常の全貌が明らかとなったと考えられたため、この結果を基盤として、標的シーケンスのための RNA ベイトを作成し、ATL 16 細胞株、および、HTLV-1 陽性 7 細胞株の計 23 細胞株の遺伝子異常の解析を行った。その結果、ATL 細胞株では、ATL 患者で認められたのと同程度の頻度でドライバー異常が認められたが、HTLV-1 細胞株では、ほとんど異常を認めなかったため、ATL 細胞株に焦点を当てる方針とした。ATL 細胞株の中で、レナリドミド感受性を認めていたのは、ATL 細胞株 A、ATL 細胞株 B、ATL 細胞株 C の 3 細胞株であるため、これらの細胞株で異常が認められる遺伝子に焦点を当てて、レナリドミド効果に与える影響を調べた。具体的には、これら遺伝子を CRISPR/Cas9 を用いてノックアウトし、それぞれ 3~5 種類の安定細胞株を作成した。その後、RealTime-Glo™ MT Cell Viability Assay による細胞増殖、Annexin V 抗体を用いたフローサイトメトリーによるアポトーシス状態を行ったが、control sgRNA 導入株と比較して統計学的に有意な違いを認めなかった。また、細胞増殖アッセイを用いて、レナリドミドに対する感受性を評価したところ、統計学的に有意な違いを認めなかった。以上から、細胞株の遺伝子解析により複数のレナリドミド感受性と関わる候補遺伝子が挙げられ、機能解析により検証したが、これまでにレナリドミド感受性に与える影響について確認することは出来ていない。

## 2) SILAC プロテオミクスを用いた ATL におけるレナリドミドの標的の網羅的な探索

ATL においてレナリドミドにより制御される CRL4CRBN の基質を同定するために、レナリドミド処理を行った ATL 細胞株を用いて、SILAC 法による定量プロテオミクス法により、発現量が変化する蛋白を網羅的に同定することを試みた。まず、SILAC プロテオミクス解析に最適な条件を決定するために、レナリドミド感受性であった ATL 細胞株 A と ATL 細胞株 B、および、レナリドミド抵抗性であった ATL 細胞株 D を用いて条件検討を行った。具体的には、既知の標的である *IKZF1*、*IKZF3*、*CK1α* に対する分解を指標として、レナリドミド濃度 (1μM、10μM など)、投与時間 (6 時間後、12 時間後、24 時間後、48 時間後など) が与える影響を検討した結果、いずれの細胞株においても、1μM または 10μM の濃度で 24 時間から十分な効果が認められたため、その条件を用いて ATL 細胞株 A と ATL 細胞株 B において SILAC プロテオミクス解析を行った。具体的には、各細胞株において Light アミノ酸培地 (Lys + Arg)、Medium 培地アミノ酸 (Lys-D4 + Arg-<sup>13</sup>C6)、Heavy 培地アミノ酸 (Lys-<sup>13</sup>C6<sup>15</sup>N2 + Arg-<sup>13</sup>C6<sup>15</sup>N4) を含む培地で 6 継代以上培養し、それぞれを、DMSO のみ、レナリドミド 1μM、レナリドミド 10μM で 24 時間処理し、得られた細胞溶解液を LC-MS/MS で解析した。

LC-MS/MS 解析では、サンプル前処理として、タンパク質の抽出、トリプシンによるペプチド断片への消化の後、陽イオン交換 Hilic の混合分離モードでの分画を行った後に、Orbitrap Fusion™ Tribrid™ mass spectrometer と Easy n-LC 1000 HPLC system (Thermo Fisher Scientific) からなる LC/MS 装置で分析した。分離されたペプチドは陽イオンモードでイオン化され、データ依存的スキャンにより質量スペクトルが取得した。前駆体イオ

ンスキャンはオービトラップ分析器により、200m/z で 60,000 FWHM の分解能で実施した。生成イオンスキャンはイオントラップで higher energy collisional dissociation モードで取得した。取得された各ペプチドの前駆体イオンおよび生成イオンスペクトルデータは Proteome discoverer 1.4. (Thermo Fisher Scientific)で処理し、質量スペクトルは、Swiss Prot に登録されている全ヒト由来タンパク質アミノ酸配列に対して、Mascot search engine により、ペプチドおよびタンパク質の推定を行った。

その結果、ATL 細胞株 A では、全サンプルから共通して 35,036 種の特異的ペプチドが検出され、計 3,689 種のタンパク質が同定され、IKZF1、IKZF3 など 9 種類の蛋白がレナリドミド処理により、その発現量に減少傾向が観察された。ATL 細胞株 B では、全サンプルから共通して 36,639 種の特異的ペプチドが検出され、計 4,097 種のタンパク質が同定され、IKZF1、IKZF3 など 15 種類の蛋白 がレナリドミド処理により、その発現量に減少傾向が観察された。これらの結果を合わせると、両方の細胞株でコントロールとして用いた IKZF1、IKZF3 の顕著な蛋白発現の低下が認められており、実験の質には問題がないと考えられた。しかし、両方の細胞株で、1 $\mu$ M、10 $\mu$ M の複数の濃度で蛋白発現の低下が認められたのは、IKZF1、IKZF3 のみであり、ATL においても IKZF1/3 は標的となり得るが、新規標的は今回の網羅的解析からは見出せなかった。

### 3) 今後の課題と方向性

SILAC プロテオミクス解析では、新規候補分子を見出せなかったが、遺伝子異常とレナリドミド感受性の関係の検索からは複数の候補異常が見出せている。現状では、候補異常の導入によりレナリドミド感受性が変化することを確認できていないが、選択した細胞株に問題がある可能性が否定できない。そのため、これらの遺伝子異常を対象とした遺伝子導入による細胞の表現型の検証や生化学的な解析を繰り返す予定である。

Adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL) is a distinct subtype of T-cell neoplasms associated with human T-cell leukemia virus type-1 retrovirus. A recent clinical trial of lenalidomide monotherapy has shown its meaningful antitumor activity in patients with relapsed or recurrent ATL. Although lenalidomide was reported to kill B-cell lymphoma cells through downregulation of IRF4, the molecular mechanism of lenalidomide activity against ATL has not been elucidated. Recently, through an integrated genetic analysis of > 400 ATL patients, we demonstrated the landscape of ATL somatic alterations, and identified many novel driver mutations, especially in T-cell receptor and NF- $\kappa$ B pathways (K Kataoka, *Nat Genet*, 2015; K Kataoka, *Nature*, 2016).

*Therefore, in this study, we propose to investigate the relationship between genetic alterations and lenalidomide sensitivity, and the mechanism of action of lenalidomide in ATL, using integrated genomic and proteomic analysis.*

### **1. Association between somatic mutations and lenalidomide sensitivity in ATL cell lines.**

We determined the association between somatic mutations and lenalidomide sensitivity. We first assessed lenalidomide sensitivity of 23 ATL cell lines, and found that three of them were sensitive to this agent. Next, we investigated somatic mutations of driver genes using targeting sequencing in these ATL cell lines. Before this analysis, to thoroughly identify driver alterations in ATL, we performed whole-genome sequencing for 50 patient samples. This analysis presented a substantially different overview of driver alterations compared with whole-exome sequencing: most driver genes were affected by more than one classes of somatic alterations, including structural variations and non-coding mutations. On the basis of these findings, we designed a capture bait and performed targeted sequencing for 23 ATL cell lines. As a result, we revealed that several gene alterations were present only in lenalidomide-sensitive cell lines.

Next, we created ATL cell lines overexpressing or lacking the identified genes, and assessed cell proliferation and/or apoptosis. But, none of these interventions altered the phenotype of these cell lines. Then, we investigated the effect of overexpression or knockout of these genes on lenalidomide sensitivity, but found that these interventions did not affect its sensitivity.

### **2. Proteomic analysis of the mechanism of action of lenalidomide in ATL.**

We investigated the mechanism of action of lenalidomide in ATL using a proteomic approach. Lenalidomide is known to bind CRBN, the substrate adaptor for the CRL4<sup>CRBN</sup> E3 ubiquitin ligase, and modulate its substrate specificity. To identify lenalidomide-regulated CRL4<sup>CRBN</sup> substrates in ATL cells, we applied stable isotope labelling of amino acids in cell culture (SILAC)-based quantitative mass spectrometry to assess global changes in protein levels in two lenalidomide-sensitive ATL cell lines. We detected nine and seven proteins downregulated by lenalidomide treatment in these two cell lines, respectively. Both of them included IKZF1 and IKZF3, confirming the validity of our experiment. But, except of IKZF1 and IKZF3, none of the proteins were shared between these two cell lines.