

創薬基盤推進研究事業 研究開発課題 事後評価報告書

研究開発課題名	Indolent ATL の分子標的特定と EZH1/2 阻害薬の適応拡大を目指した研究
代表機関名	国立大学法人東京大学
職名	特任講師
研究開発代表者名	山岸 誠
全研究開発期間	平成 30 年度 ~ 令和 2 年度

1. 研究開発成果

(1) iATL のゲノム解析と創薬ターゲット候補分子の検討

ATL 発症の鍵となる遺伝子変異の高感度検出、及び複雑なクローン構造解析を行うために、ATL の発症に関わる 50 遺伝子を含む 280 のがん関連遺伝子と HTLV-1 プロウイルス全長に対するプローブを搭載した ATL/HTLV-1 パネルを独自に作成し、高深度ターゲットシーケンスプラットフォームを構築した(PNAS 2020)。ATL65 症例、キャリア 18 例の Target-seq を実施し、ATL リスク遺伝子変異、プロウイルス構造、ウイルス挿入部位の全データを取得した。その結果、iATL は多彩なゲノム異常を持ち、機能的に重要な遺伝子異常を伴いクローン増殖していることを明らかにした。また、キャリアから iATL を経て急性型 ATL へと進展した 3 症例について、10 年近いフォローアップ期間の継続的なゲノム解析を行い、進展過程におけるゲノム異常の実態を検討した。その結果、進展に伴い様々な遺伝子異常を段階的に獲得し、サブクローン集団を形成しながら進展することがわかった。またその後の急性転化時には、さらに強力なドライバー変異が加わり、急激な増殖を起こすことがわかった。このように、貴重な臨床検体を用いた継時的な解析によって、ATL における多段階発癌過程を可視化し、遺伝子異常の重要性を示すことに成功した。また、iATL の段階で進展リスク遺伝子異常を検出し、早期治療介入することの重要性も示唆された。

検出された個々の遺伝子異常の機能を検討した結果、iATL においても TCR 経路の異常が高頻度に認められた。変異アレル頻度(VAF)に注目したところ、クローン増殖における重要な遺伝子の一つとして VAV1 変異を見出した。そこで VAV1 単独変異の機能を解析した結果、いくつかのアミノ酸置換が NFAT の活性化に働くことを明らかにした。また、TCR 経路に遺伝子変異を持つ症例と持たない症例について、RNA-seq 解析を実施し、比較解析を行ったところ、TCR 経路に遺伝子変異を持つ症例は、細胞増殖や細胞周期を促進する遺伝子の発現が極めて高く、悪性度が高いことがわかった。以上の結果から、TCR 経路の遺伝子変異が ATL のクローン進化において重要であることが明らかになった。

しかし、実際の遺伝子異常のパターンは症例ごとに複雑で、複数のドライバー遺伝子に異常が蓄積していることから、これらの複雑なメカニズムを明らかにすることで、新たな創薬ターゲットを特定できると考えた。そこで、ATL 症例の遺伝子異常間の相関を検討したところ、特に *PLCG1* と

VAV1 の遺伝子異常が共存しており、さらに変異アレル頻度とウイルス挿入部位によるクローン構造解析から、複数の症例において同じ感染クローンに二重に変異が蓄積していると推定された。そこで、変異型 VAV1 と変異型 PLC γ 1 を組みわせて、実臨床で認められた VAV1/PLCG1 二重変異遺伝子を導入した T 細胞株を新たに樹立し比較検討を行ったところ、単独変異と比較して NFAT 活性が著しく上昇することが明らかになった。また、二重変異型において一部の NFAT 標的遺伝子の発現が上昇していたこと、さらに、二重変異型において細胞増殖レベル及びアポトーシス抵抗性が上昇を示したことから、二重変異によって NFAT が活性化し、クローン増殖に影響していることが示唆された。さらに、RNA-seq を用いた網羅的な解析から、二重変異型では MYC の標的遺伝子、免疫応答に関連する遺伝子、NF- κ B によって制御される遺伝子が発現上昇していることを明らかにした。

さらに、これらの機能獲得型遺伝子異常による下流への影響に関する分子メカニズムの解明と、創薬ターゲットのスクリーニングを行うために、樹立した野生型及び二重変異型細胞株を対象に、VAV1/PLC γ 1 複合体のショットガン質量分析(LC-MS/MS)を実施した。2 回の独立した実験から、変異型 PLC γ 1 にのみ結合する新規タンパク質を多数同定することに成功した。この結果から、遺伝子変異によるシグナル伝達分子のアミノ酸置換が、シグナル伝達複合体を変化させることで、下流に様々な影響を及ぼすという新たなコンセプトが示された。同定されたタンパク質には、TCR 経路において機能的に重要な因子が多数含まれ、さらにこれまでに報告されていない多数の因子が検出された。

以上の結果から、VAV1 と PLCG1 の遺伝子変異は、協調的に TCR 経路の異常な活性化を引き起こし、特に Ca²⁺-NFAT 経路や MYC の標的遺伝子の発現が変化することを明らかにした。また VAV1/PLC γ 1 変異は TCR 下流の複合体形成を変化させ、様々な機能に影響を与えることで、腫瘍細胞のクローン性増殖に寄与している可能性を見出した。これらの結果は、HTLV-1 感染者体内において数十年の潜伏期間に形成されたサブクローン集団から、ドライバーとなる遺伝子異常を獲得してクローン性に進化する新たなメカニズムの一端を示している。

さらに、実際の遺伝子異常を持つサブクローンがどのような性質を獲得してクローン進化するか、シングルセル(sc)RNA-seq によって詳細に検討を行った。iATL から急性型 ATL に進展した症例の継時的な遺伝子異常を検出し、さらに 2 時点(T1, T2)の scRNA-seq によって全遺伝子の発現変化を検出した。各細胞の RNA リードから HTLV-1 アンチセンス RNA、変異 RNA、マーカー遺伝子発現パターンを詳細に解析することで、遺伝子変異を持ったサブクローンを同定できる新たなプラットフォームの構築に成功した。クローン増殖が見られた 3 症例の ATL を対象に解析を実施した結果、いずれに症例においても遺伝子変異の獲得によって形成された高悪性度のサブクローン集団は、MYC や E2F によって増殖能が極めて高い集団であることが明らかになった。以上の結果から、遺伝子の蓄積によって形成されたサブクローン構造が ATL の進展に重要であること、遺伝子異常によって活性化されたシグナル伝達経路が、創薬ターゲットとして有望であることが示された。

(2) iATL の遺伝子発現解析と創薬ターゲット候補の同定

上記の成果から、遺伝子異常によって引き起こされる発現異常が重要であり、創薬ターゲット候補となりうることを示した。一方で、症例間で共通する発現異常をこれまでに多数検出しており、遺伝子異常によるクローン進化以前に形成される遺伝子発現パターンが存在すると考えた。発症リスクの異なるキャリア計 23 症例、ATL23 症例の非感染細胞、HTLV-1 感染細胞、ATL 腫瘍細胞を純化し(継時的な解析も含め計 153 検体)、極微量 RNA サンプルから Expression array を行った。また計 62 検体分の高深度 RNA-seq も実施し、感染から ATL の発症に至る遺伝子発現変化の全データの取得を完了した。さらに、発現データを取得したキャリア 5 症例、iATL3 症例、急性型 ATL3 症例の腫瘍細胞と非感染細胞のペア検体、健常人休止期 T 細胞(2 検体)、活性化 CD4+T 細胞(2 検体)を対象に ATAC-seq によるオープンクロマチン領域の検出とエピゲノム解析を実施した。遺伝子発現データによる大規模クラスタリング解析及びエピゲノム構造データから、これまでに急性型 ATL に対する標的分子として同定してきた EZH1/2 (エピゲノム異常)や EVC1/2 (Hedgehog 経路)が iATL でも異常を示すことが統計学的に示された。さらに、局所的なクロマチン構造変化が ATL 特異的な構造異常分子や新規 RNA 分子群を発現させることを見出した。

iATL の遺伝子発現異常を明らかにするために、キャリア、iATL、急性型 ATL 毎の発現異常遺伝子を同定し、病型間の比較を行った。その結果、遺伝子発現異常の半数以上はキャリア時点で成立していること、iATL では 70%以上の遺伝子発現異常が形成されていることを見出した。また、ゲノム解析データと統合した結果、本解析に用いた症例はゲノム異常パターンが多彩であること、キャリアの多くはポリクローナルな感染細胞集団で形成されていることがわかった。以上の結果から、クローン進化以前に感染によって基本的なエピゲノムが形成され、共通する遺伝子発現異常パターンが形成されていると考えられた。実際に、ATAC-seq 解析の結果、キャリア、iATL、急性型 ATL に共通する感染細胞特異的なエピゲノムパターンにリプログラミングされていることを見いだした。

iATL に特徴的な遺伝子発現異常の機能的な意義について Gene ontology 解析で検討した結果、iATL の段階で非常に多くの細胞増殖促進因子が過剰に発現しているほか、アポトーシス制御、p53 経路、NOTCH1 経路に関わる因子などの過剰発現を同定した。これらのデータは、正常 T 細胞と大きく発現パターンが変化し、増殖形質の獲得に関わっていることを示しており、iATL が異常な細胞であり、早期介入の必要性を示唆している。

さらに、本研究で構築した遺伝子発現データベースから、カルシウムシグナルの脱制御を引き起こす新たな分子標的の同定に成功した。正常 T 細胞に発現しない分子 A は、ATL 細胞に異所性に発現することでカルシウムシグナルの慢性的な活性化を引き起こし、ATL 細胞のさまざまな特性に寄与することを見出した。

(3) iATL のエピゲノム解析と創薬ターゲット候補の同定

iATL 細胞における ATAC-seq によるクロマチン構造解析から、特異的なエンハンサーがゲノム領域に多数形成されていることを見いだした。さらに、RNA-seq データとの統合解析の結果、異常なエンハンサー形成は、局所的な遺伝子発現を引き起こす原因メカニズムであることが明らかになった。そこで、このエンハンサー形成に関わる転写因子を RNA-seq データベースからスクリーニングしたところ、ATL における MYCN の異所性発現を見いだした。MYCN は通常神経組織等にもみ発現する転写因子で、神経芽腫などのがんではがん遺伝子として機能し、マスター転写因子として遺伝子発現パターンを形成する。しかし、T 細胞リンパ腫との関わりは報告がなく、発現による機能的な意義もまったく検討されていない。そこで、MYCN、修飾ヒストン、NF- κ B 等の転写因子について新規に ChIP-seq 解析を行い、MYCN の標的遺伝子と、クロマチンへの結合による影響を検討した。その結果、MYCN が結合する領域は転写を促進する H3K27ac とクロマチンリモデリング因子である BRD4 が共存し、さらに RelA, RelB などの他の転写因子と共役して、ATL 特異的なスーパーエンハンサーを形成することがわかった。さらに、このスーパーエンハンサーの制御下にある遺伝子の発現は極めて高い発現を示すことも明らかになった。

この発見をさらに検証するために、HTLV-1 に感染していない CD4+T 細胞に MYCN を発現するレンチウイルスベクターを導入し、その後の遺伝子発現変化とクロマチン構造変化を RNA-seq, ATAC-seq で検討した。その結果、MYCN の異所性発現によって異常なエンハンサーが形成され、やはり先に同定した重要な遺伝子を含む、MYC/MYCN の標的遺伝子の発現が促進することが示された。これらの結果から、MYCN の発現が ATL における特徴的なエピゲノム形成の原因メカニズムであることが示された。RNA-seq データベース、及び scRNA-seq 解析の結果、iATL は MYCN を発現したクローンが出現し始めており、急性型へと進展する際には MYCN 陽性クローンが選択されることも判明したことから、MYCN の発現が増悪のバイオマーカーとなりうると考えられた。

(4) iATL に対する EZH1/2 阻害薬の有効性評価と作用メカニズムの検討

20 種以上の細胞株を用いた薬効評価、およびエピゲノムと遺伝子発現の網羅的解析の結果、EZH1/2 阻害薬(valemetostat)は 1~2 週間かけて HTLV-1 感染細胞のエピゲノムを正常化させ、細胞増殖を抑制することがわかった。さらに、iATL レジストリおよび JSPFAD から、予定を超える症例数の ATL 検体(急性型 21 症例、慢性型 25 症例、くすぶり型 33 症例)を入手し、表面抗原解析と感染細胞の定量による薬効と有効濃度を評価した結果、ほぼ全ての症例で有効性を確認した。またキャリア計 35 例の PBMC を対象に、投薬後の感染細胞除去効率を評価したところ、31 例(88.6%)において有意な除去効果を認めた。作用機序は上記治験症例と合わせて検討を行い、エピジェネティックな機構による直接的な抗腫瘍効果を明らかにした。以上より、HTLV-1 感染細胞に対する非臨床 POC を取得した。さらに、ATL だけでなく、ARID1A などのエピゲノム因子に遺伝子異常を持つ卵巣癌などの複数のがん腫において、EZH1/2 依存的なエピゲノムがあることを示し、EZH1/2 阻害薬が有効であることを示した。本研究の成果は、ATL だけでなく、多くのがんや前がん状態の症例において EZH1 及び EZH2 によるエピゲノム異常が重要であることを示した

(Cell Rep. 2019).

(5) iATL のエピゲノム異常のメカニズム解析

ATL の発症や治療標的として重要な H3K27me3 の蓄積は、PRC2 の活性化と分布の変化によって引き起こされるが、その原因メカニズムは不明な点が多い。そこで、ATL 細胞における PRC2 複合体を詳細に検討するために、EZH2 複合体のショットガン質量分析を実施し、複合体に含まれる分子を解析することで、クロマチン上の異常分布メカニズムの検討を行った。その結果、ATL 細胞の EZH2 は既報の PRC2 構成因子だけでなく、これまでに結合の報告がない新規タンパク質と相互作用していることがわかった。さらに、PRC2 のクロマチン上へのリクルートメカニズムを検討するために、リクルーター分子に注目して解析したところ、ポリコーム様タンパク質の PHF19 及び MTF2 の強い結合を認めた。ショットガンスクリーニングと検証実験から、ATL 細胞内における PRC2 には主要構成因子である EZH2 や SUZ12, EED のほかにポリコーム様タンパク質である MTF2 や PHF19 が含まれていることが明らかになった。MTF2, PHF19 はこの PRC2 のリクルーターとしてメチル化と発現制御に関わる重要な因子で、新たな分子標的になりうることも見出した。

(6) 本研究の意義と今後の方向性

本研究開発では、当初の計画を大幅に上回る症例数の解析を完了することで、充実したデータベースの構築に成功した。ATL は極めて予後不良な希少疾患であり、新たに大規模データベースを構築することで、iATL の分子異常を体系的に証明することができ、さらに、iATL は急性型 ATL と同様に、新たな分子標的治療法の開発が必要であることを明示した。特異的な分子標的療法がないために、現状の治療アルゴリズムでは、iATL は未治療経過観察とされている。しかし今回の結果から、iATL は改めて急性型 ATL 細胞と酷似した特性を保持しており、また高い確率で急性転化することが示されていることから、早期治療介入を目指した創薬の継続と発症/進展の予知を可能にするバイオマーカーを探索することが強く求められる。本研究で構築したデータベースはバイオマーカー探索の観点からも有用であり、より精度の高いマーカーを確立するために、今後もデータベースの拡大が必要であると考えられる。また本研究を進めるにあたり、ATL/HTLV-1 パネルの開発に成功した。この新しい遺伝子パネルは、発症リスク、進展リスクを評価する上で極めて有用であったことから、今後さらに解析症例数を増やし、発症高危険群の同定を行う予定である。

本研究では、iATL の生物学的特性の根幹を担う、特異性の高い複数の創薬ターゲット候補を同定することに成功した。また、EZH1/2 阻害薬については、iATL に対する非臨床 POC の取得に成功した。本研究を進めるにあたり、次世代シーケンサーによる多層オミックスデータに加え、シングルセル解析と LC-MS/MS を統合した次世代型プラットフォームの構築にも成功した。これにより遺伝子異常による機能獲得型の複合体変化などの発見にもつながり、さらに新たな創薬ターゲットの幅も広がった。今後この次世代型プラットフォームをさらに改良し、さらに新たな分子メカニズムの解明と治療標的分子の同定を行う予定である。

Human T-cell leukemia virus type I (HTLV-1) infection is associated with development of adult T-cell leukemia-lymphoma (ATL). Because of poor prognosis of this disease, we need to consider the molecular-targeting strategy for indolent-type ATL (iATL). The objectives of this study are to characterize iATL and to identify the druggable molecular targets. By collaborating with iATL registry and JSPFAD Japanese HTLV-1 cohort, we performed integrative molecular analyses of iATL clinical samples, which included transcriptome analyses (RNA-seq, scRNA-seq), epigenome analyses (ATAC-seq, ChIP-seq), and target gene mutation analysis (Target-seq). Data integration with high-quality clinical evidence from registries facilitated the drug discovery for iATL and identification of the precise biomarkers that enable us to classify the ATL patients who should be received optimal medical care, which may contribute to “precision medicine” for HTLV-1-associated diseases.

We focused on the significance of genetic mutations in ATL. To evaluate the functional roles of mutations during clonal evolution, we developed a novel sequencing panel designed to facilitate highly sensitive detection and quantification of somatic mutations in ATL cells and alterations in the HTLV-1 genome (Nagasaka *et al.*, *PNAS*, 2020). Using an integrative genome and single-cell transcriptome platform, we characterized clone-specific transcriptomic alterations during intratumoral clonal diversification and mutational evolution over time. We found that characteristic genomic and transcriptomic patterns are associated with subclonal expansion and switches during the clinical timeline. Multistep mutations in the T-cell receptor (TCR), STAT3, and NOTCH pathways establish clone-specific transcriptomic abnormalities and further accelerate their proliferative potential to develop highly malignant clones, leading to disease onset and progression.

Through the multimodal analyses, we identified several candidates of molecular targets, including abnormal enhancer formation by *MYCN*, constitutive activation of TCR/NFAT/Ca²⁺ pathway, and ATL-specific expression of several signaling molecules. TCR pathway is recurrently mutated in malignant lymphomas. *VAV1* and *PLCG1* are important upstream factors, whose mutations are frequently found in major malignant clones of ATL. Our genetic profiling in a prospective cohort showed that some hot-spot mutations of *VAV1* predominantly act in clonal evolution in ATL. We found that the *VAV1* variants affect downstream of TCR, but their activities are different depending on the mutation sites. In addition, analysis of the clonal composition revealed that mutations in *VAV1* and *PLCG1* are cooperative in clinical cases. Double mutation of *VAV1/PLCG1* significantly increases NFAT activity compared with single mutation. These results indicated that multiple mutations in TCR cascade promote clonal evolution by abnormally activating TCR signaling pathway. Early detection and characterization of newly expanded subclones will be valuable for the development of an in-depth understanding of this disease.

Although global H3K27me3 reprogramming is a hallmark of cancer, no effective therapeutic strategy for H3K27me3-high malignancies harboring *EZH2*^{WT/WT} has yet been established. We also explored epigenome and transcriptome in *EZH2*^{WT/WT} and *EZH2*^{WT/Mu} aggressive lymphomas and showed that mutual interference and compensatory function of co-expressed EZH1 and EZH2 rearrange their own genome-wide distribution, thereby establishing restricted chromatin and gene expression signatures. Direct comparison of leading compounds introduces potency and a mechanism-of-action of the EZH1/2 dual-inhibitor (valemestostat). The synthetic lethality was observed in all lymphoma models and primary ATL cells. Opposing actions of EZH1/2-polycomb and SWI/SNF complexes were required for facultative heterochromatin formation. Inactivation of chromatin-associated genes and oncovirus infection triggered EZH1/2 perturbation and H3K27me3 deposition. Our study provides the mechanism-based rationale for chemical dual-targeting of EZH1/2 in iATL therapy (Yamagishi *et al.*, *Cell Rep*, 2019).

2. 総合評価

優れている

【評価コメント】

これまで解析されてこなかった Indolent ATL について、希少疾患であるにもかかわらず予定を超える解析を行い、遺伝子発現、エピゲノム、遺伝子変異、表現型など、着実に基礎データの取得を行った。さらに、早期治療介入の重要性を明らかにし、創薬ターゲットを同定するなど、優れた成果を得たことは評価できる。

今後、見いだされた創薬ターゲットやバイオマーカーの実用化に向け製薬企業とも連携し、Indolent ATL の有用な治療薬開発研究が進展されることを期待する。

以上