

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： RNA 絶対定量による微小環境解析に基づくびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫の層別化および新規治療法の開発
2. 研究開発代表者：九州大学大学院医学研究院 教授 赤司 浩一
3. 研究開発の成果

びまん性大細胞性 B 細胞性リンパ腫（以降 DLBCL）の治療選択において、予後に関連する層別化技術が検討されてきたが、未だ、確立されたものはなくブレイクスルーが求められている状況である。我々は先行研究において、RNA が断片化しているホルマリン固定標本からさえも RNA 絶対定量が可能な RNA 解析技術 (nCounter system: NCS) を導入し、DLBCL における網羅的 RNA 絶対定量を試みた。本技術を用いることで、DLBCL の予後に関連する因子の多くは、B リンパ腫細胞自体に発現している癌関連遺伝子やキナーゼ分子の発現変化ではなく、リンパ腫細胞周囲の T リンパ球や骨髄系細胞などの微小環境形成に関係する細胞群関連遺伝子の発現変化にあることを見いだした。この事実は、B リンパ腫細胞の微小環境を構成するこれらの細胞が、サイトカインや T-B 相互作用等の免疫機構を介して DLBCL の進展や抗がん剤抵抗性を制御しており、それが DLBCL の悪性度と相関することを示している。このような微小環境因子の解析により予後不良群を明らかにできれば、早期に種々の新規治療薬や造血幹細胞移植に移行することで、DLBCL の飛躍的な予後の改善が期待できると考え、本研究課題を平成 27 年 9 月より開始した。

NCS を用いた先行研究では、予後層別化因子の候補を網羅しきれていない可能性があった。そこで、NCS の欠点を補完する目的で、RNA シークエンスを用いた網羅的トランスクリプトーム解析を行った。本解析から、NCS で抽出された微小環境関連遺伝子に加えて、さらに、約 200 種類の予後を規定しうる可能性がある遺伝子が抽出された。特にその中でも、long non-coding RNA (lncRNA) が、新たな予後規定候補対象として挙っている。これらの候補遺伝子を追加し、バリデーション用の約 400 遺伝子のプローブセットを作成した。初年度は、先行研究の研究規模を大きく拡大し、臨床情報との紐付けがなされている初診時 DLBCL リンパ節生検ホルマリン保存検体 (中央病理診断された約 200 検体) において、がんや免疫、微小環境など、先行研究で得られた上記約 400 遺伝子のプローブセットを用い、NCS による RNA 絶対定量を行った。現在、予後と NCS から得られた遺伝子発現の関係について、統計学的解析をすすめている。さらに、得られた予後規定遺伝子について、蛋白発現解析のための組織アレイなどの準備をすすめている。本研究から得られる治療標的になりうる可能性のある遺伝子について、次年度以降引き続き、それらの機能解析や、予後層別化のための遺伝子パネル作成の礎となる研究を継続していく。

4. その他

以下、本研究課題の成果目標であり、次年度以降での達成を目指す。

- ① 集積された DLBCL 検体を用いて、RNA 絶対定量技術 NCS によるプロファイリングを行う。
- ② これらの検体の臨床情報（治療・予後）を照会しながらプロファイリングデータをスクリーニングし、微小環境に関連する遺伝子など予後を規定する遺伝子群を同定する。
- ③ 得られたデータに基づき、微小環境を形成する細胞群を生検体からソーティングし、表面抗原解析・機能解析・シングルセルレベルでの RNA プロファイリングなどにより、微小環境がどのようにして DLBCL の予後に最も影響を与えているか、その Rationale を確立する。
- ④ 以上に基づき、予後に関連する微小環境の状態を正確に反映する遺伝子群を選択し、正確で簡便な DLBCL 予後層別化キットを作製、適正な治療選択を可能にすることにより、DLBCL 治療のブレイクスルーを起こす。

⑤ 浸潤 T 細胞を含む DLBCL 微小環境の全貌を明らかにすることにより、新たな微小環境関連分子同定し、それを標的とした新規治療法開発の基盤を作る。