

京都大学	博士（医学）	氏 名	大塚 泰幸
論文題目	EZH2 inhibitors restore epigenetically silenced CD58 expression in B-cell lymphomas (EZH2 阻害薬は B 細胞リンパ腫においてエピゲノム修飾により抑制された CD58 発現を回復させる)		
(論文内容の要旨)			
<p>CD58 は T 細胞や NK 細胞が抗原提示細胞に対し免疫反応を生じる際の免疫シナプス形成に関わる接着分子であり、CD58 の発現低下は悪性リンパ腫における代表的な免疫逃避機構の一つである。びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) では約 3 分の 2 の症例で CD58 の発現低下が示されているが、そのうち CD58 の遺伝子異常が関与するものは半数以下であり、残りの症例ではエピゲノム修飾が CD58 の低発現に関わることが推測されている。そのため、遺伝子異常がなく CD58 低発現を生じている悪性リンパ腫において、CD58 の発現を回復させることのできる薬物を見出すことができれば、治療に応用できるのではないかと考えた。</p> <p>DLBCL 530 例の RNA-seq の公開データベースを用いた解析により、CD58 は T 細胞活性化に関わる遺伝子発現との正の相関を認め、腫瘍細胞における CD58 発現は活性化 T 細胞の豊富な腫瘍微小環境に関わることが示唆された。そこで、まず 11 種類の B 細胞リンパ腫株において CD58 のフローサイトメトリー解析を行い、CD58 の低発現を生じている 3 細胞株を選択し CD58 遺伝子の異常を調べたところ、2 細胞株 (DLBCL2, HBL1) では発現欠失型の異常を認めたが、残りの 1 細胞株 (FL218) では異常を認めなかった。FL218 は健常人末梢血 T 細胞との共培養において T 細胞の IFN-γ 産生をほとんど誘導できなかったが、FL218 に CD58 遺伝子をウィルスベクターで導入し強制発現させた状態で T 細胞と共培養を行うと、T 細胞の IFN-γ 産生を強く誘導することが判明した。そこで、80 種類のエピゲノム修飾薬のライブラリーを用いて、FL218 における CD58 発現変化のスクリーニングを行ったところ、2 種類の EZH2 阻害薬 (EPZ6438, GSK126) が特異的に CD58 の発現を上昇させることを見出した。FL218 を含む 5 種の濾胞性リンパ腫 (FL) 細胞株全てにおいて、異なる選択性を持つ 3 剤の EZH2 阻害薬 (EPZ6438, GSK126, UNC1999) による CD58 の発現上昇作用を認めたことから、この反応は EZH2 阻害による直接的作用であると推測された。EZH2 遺伝子の活性化型変異はしばしば DLBCL や FL に認められる遺伝子異常であるが、DLBCL 1001 例の公開データベースの解析により、CD58 遺伝子異常と EZH2 活性化型変異は相互排他的であったことから、それぞれ異なる機序により CD58 の発現低下を生じていると考えられた。</p> <p>EZH2 はヒストンメチル基転換酵素を構成する蛋白の一つであり、H3K27 のトリメチル化により様々な遺伝子の転写抑制に関わることが知られる。そこで、FL218 において H3K27me3 抗体によるクロマチン免疫沈降および CD58 プロモーター領域の定量 PCR を行ったところ、CD58 プロモーター領域では H3K27 の高度なトリメチル化が存在したが、EZH2 阻害薬はこの脱メチル化をもたらし、CD58 の転写を回復させることが示唆された。さらに、EZH2 阻害薬で CD58 発現を回復させた B 細胞リンパ腫株は、共培養を行った健常人末梢血 T 細胞および NK 細胞による IFN-γ 産生を増加させることが示された。以上の結果より、EZH2 阻害薬は B 細胞リンパ腫においてエピゲノム修飾により減弱した CD58 の発現を回復させることにより、B 細胞リンパ腫に対する T 細胞、NK 細胞の免疫反応を促す作用を持つことが示唆された。そのため、本薬剤により B 細胞リンパ腫に対する免疫療法の治療効果を高めることができる可能性が考えられる。</p>			

(論文審査の結果の要旨) CD58は、抗原提示細胞、腫瘍細胞に広く発現する接着分子でありCD2のリガンドとして働く。CD2-CD58結合は、TまたはNK細胞が免疫標的細胞を認識する際に重要である。CD58の発現低下は悪性リンパ腫における代表的な免疫逃避機構の一つであり、エピゲノム修飾が関わることを示唆されている。悪性リンパ腫において、CD58の発現を回復させることができる薬物を探索するため、本研究を行った。 B細胞リンパ腫株のうち、CD58を低発現する濾胞性リンパ腫株FL218にCD58遺伝子をウィルスベクターで導入すると、共培養したT細胞を強く活性化することが分かった。そこで、エピゲノム修飾薬のライブラリーを用いてFL218におけるCD58発現変化のスクリーニングを行ったところ、EZH2阻害薬がCD58発現を上昇させることを見出した。また、ChiP-qPCRアッセイでEZH2阻害薬は、FL218においてCD58プロモーター領域のH3K27脱メチル化をもたらすことが示された。さらに、EZH2阻害薬処理後のFL218は共培養T、NK細胞のIFN- γ 産生を増加させ、それはCD2阻害抗体により抑制された。 以上より、EZH2阻害薬はCD58発現回復を通じてB細胞リンパ腫に対するT細胞、NK細胞の免疫反応を促す作用を持つことが示唆された。 以上の研究はB細胞リンパ腫におけるCD58発現低下とEZH2阻害薬の作用機序の解明に貢献し、今後の治療開発に寄与するところが多い。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、令和2年7月31日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。
要旨公開可能日： 年 月 日以降