

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02945

研究課題名（和文）異常間質細胞を軸とする微小環境ネットワークによるリンパ腫の支持機構の解明

研究課題名（英文）Clarification of microenvironmental network focusing on abnormal stromal cells in malignant lymphomas

研究代表者

坂田 麻実子（柳元麻実子）（Sakata-Yanagimoto, Mamiko）

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：80451805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：血管免疫芽球性T細胞リンパ腫（AITL）は、難治性の血液がんであり、間質細胞や血管内皮細胞の増生が特徴である。本研究は最先端の解析技術を用いてAITLの微小環境を明らかにすることを目的とした。一細胞解析の結果、AITLの間質細胞は従来考えられていた濾胞樹状細胞（FDC）は増加せず、癌関連線維芽細胞（CAF）の性質を持つ新たなサブクラスターを認めることが明らかとなった。マーカー遺伝子の発現から、炎症性CAFのマーカーを高発現するなどの特徴がみられ、固形がんで見られる間質細胞に近い特徴をもつことが明らかとなった。さらに、細胞外マトリックスの集合やコラーゲン生成に関連する遺伝子群が高発現していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、AITLの微小環境の構造および機能的多様性について、より深く理解された。AITLは難治性の血液がんであり、治療が困難な患者が多い現状にある。そこで、本研究の成果は、AITLの病態メカニズムの理解を深めるのみならず、より効果的な治療法の開発に繋がると期待される。とりわけ、CAFや特定の血管内皮細胞サブクラスターをターゲットにした新しい治療戦略を提案できれば、患者の予後改善や治療成功率の向上が期待される。がん微小環境については未知の領域が多く、最新テクノロジーを利用した本研究の成果は、他の血液がんおよび癌腫の微小環境研究にも応用可能であり、広範な癌治療の革新に貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is a refractory hematologic malignancy characterized by the proliferation of stromal cells and endothelial cells. This study aimed to elucidate the microenvironments of AITL. Single-cell analysis revealed that the stromal cells in AITL include a novel subcluster with characteristics of cancer-associated fibroblasts (CAFs), rather than the previously assumed follicular dendritic cells (FDCs). The expression of marker genes of the CAF-like cluster of AITL revealed characteristics such as high expression of markers associated with inflammatory CAFs, indicating features similar to stromal cells observed in solid tumors. Furthermore, genes related to extracellular matrix assembly and collagen production were highly expressed in the CAF-like cluster of AITL.

研究分野：血液学

キーワード：がん微小環境 一細胞解析 CAF 悪性リンパ腫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)は、現在の治療法では5年生存は約30%と難治性のがんである。節性(=リンパ節)病変を主座とすることが多く、発熱、皮疹、自己免疫疾患様症状、高グロブリン血症などの免疫異常を伴いやすい。AITL組織では腫瘍細胞比率は低いことが多く、多様な炎症細胞の浸潤がみられる。なかでも間質細胞の一つである濾胞樹状細胞(follicular dendritic cell: FDC)の増生は、AITLの特徴の一つである(図1)。



[リンパ節の間質細胞の多様性についての最新の知見]

リンパ節の内部は領域毎に異なった免疫応答を担うことが知られ、間質細胞はリンパ球の各領域への適切なホーミングを促すことで免疫システムを調節する。さらに、間質細胞自身が多様なメディエーターの分泌等を介して、リンパ球の成熟や活性化を促すことが知られる。古典的には、間質細胞はリンパ節内での局在とその特性により、FDC、marginal reticular cell (MRC)、T-zone reticular cell (TRC)、perivascular reticular cell (PvRC)などに大別されてきた。近年マウスリンパ節の間質細胞のシングルセル解析により、新たに5つの細胞集団(クラスター)が同定され、リンパ球のホーミングや活性化、血管内皮のサポート等を担うことが報告された(Rodda, Immunity 2018)。しかしながら、ヒトリンパ節の間質細胞の多様性については報告されていない。一方、AITLの節性病変では、初期には濾胞が拡大して反応性変化に類似し(pattern1)、次第にびまん性に広がる(pattern2, 3)。この過程では濾胞および濾胞外の間質細胞についても、局在や性質の変化を伴うと予測される。そこで、申請者は、AITLでは間質細胞にもリモデリングが生じて腫瘍細胞の生存を促進する微小環境細胞として働くという仮説をたて、研究を行ってきた。申請者は、間質細胞の多様性を明らかにするため、正常リンパ節およびAITLを含むさまざまな悪性リンパ腫の節性病変から微量(<1%)に含まれる間質細胞を取り出し、シングルセル解析を行う系を樹立した(図2: 最右はヒト正常リンパ節3例 vs AITLを含むT細胞リンパ腫5例の間質細胞データ)。

ヒト正常リンパ節9例のシングルセルデータ解析により、間質細胞は14クラスターに分類され、
図2 ヒトリンパ節間質細胞のシングルセル解析



図3 正常リンパ節のクラスタリング

従来知られていなかったユニークな特徴をもつ分画が複数同定された(図3)。この系を用いて、本研究ではAITLにおける間質細胞の多様性と特性を明らかにしたい。

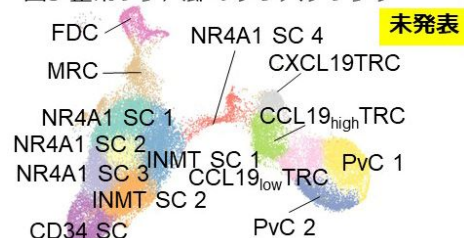
2. 研究の目的

AITLを対象として、間質細胞の“空間的な多様性”と“起源”を明らかにし、間質細胞と腫瘍細胞間のネットワークを標的とする新たな治療戦略コンセプトを提案する。

3. 研究の方法

AITL患者のリンパ節病変における非血液細胞一細胞解析

AITL患者のリンパ節検体からセルソーター(FACS Aria)等により非血液細胞が濃縮された



CD45 陰性細胞分画を分取した。シングルセル RNA 解析用ライブラリ作製 (10x Genomics) シーケンスを行う。一次解析は Cell Ranger (10x Genomics) 二次解析は Seurat 等を用いる。さらには、これまでの研究で取得した「正常」リンパ節 (注: 術前にがんと診断、あるいはがんが強く疑われる患者について手術時にリンパ節郭清が行われることから、各リンパ節のごく一部を採取したもの、がんの転移がないことを病理学的に確認済みである) について、同様に処理して取得した一細胞解析データと AITL 患者の一細胞解析データについて、バッチエフェクトを考慮しながら、統合する。AITL と正常リンパ節で対応するクラスタについても特徴を抽出する。これには、DESeq2、MAST などを用いた遺伝子発現差解析などを用いる。

ビッグデータであることから、解析にはスーパーコンピュータ SHIROKANE (東大医科研) を用いる。

4. 研究成果

4-1. 実験の結果

AITL 患者サンプルとコントロールサンプルについて、細胞懸濁液とした後、CD45 陰性非血液細胞分画をセルソーターで分取後、10xGenomics 社の Chromium システムを用いて、一細胞解析データを取得した。Cell Ranger を用いてマッピングした後、Seurat パイプラインを用いてサンプル毎にクオリティーコントロールを行った。次に、バッチエフェクトについて考慮した上で、AITL 患者サンプルとコントロールサンプルの統合を行った。クラスタリングを行い、UMAP plot として表示したものを図 5 左に示す。大まかには、非血液系間質細胞として 3 つのクラスタに分類された。各クラスタについて、マーカー遺伝子の発現を元にアノテーションを行ったところ、血管内皮 (BEC)、リンパ管内皮 (LEC)、間質細胞 (非内皮間質細胞, NESC) の 3 つのクラスタであった。さらに、血管内皮、リンパ管内皮、間質細胞クラスタにおける細胞比率を調べたところ、AITL では血管内皮クラスタが拡大していたが、一方で、間質細胞クラスタ、リンパ管内皮クラスタはいずれも減少していた (図 5)。

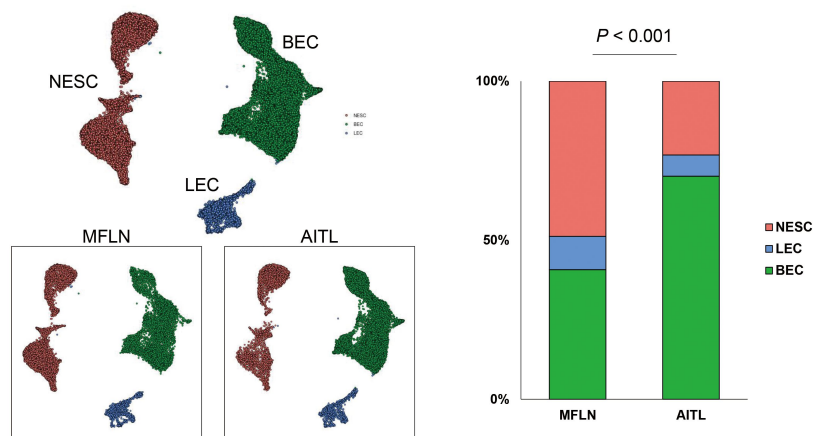


図 5 AITL 患者サンプルとコントロールサンプルにおける一細胞解析データ

左 クラスタリング (UMAP plot)

右 100%積み上げ棒グラフ

次に、本研究で着目する間質細胞分画を in silico に同定して抽出し、クラスタリングを行った。先行する正常リンパ節および濾胞性リンパ腫の間質細胞の解析では、12 種類のクラスタに分類される (Abe, Sakata-Yanagimoto Nature Cell Biology 2022)。一方、AITL とコントロールサンプルの統合解析では、13 種類のサブクラスタに分類された。UMAP plot として表示したものを図 6 に示す。各クラスタについて、以前の Nature Cell Biology の際のデータを元に、マーカー

一遺伝子を用いてアノテーションを行った。これと同様のクラスタについては、以下のである。

- SC at capsule adventitia (advSC)
- SFRP4+ SC (SFRP4-SC)
- SFRP2+ SC (SFRP2-SC)
- SC enriched for tumour necrosis factor (TNF) signalling (TNF-SC)
- C7+ SC (C7-SC)
- AGT+ SC (AGT-SC)
- TRC
- pericyte (PC)
- smooth muscle cell (SMC) with high expression (ATF3hi)
- SMS with low ATF3 expression (ATF3lo SMCs)
- MRC
- FDC

さらに、AITL を含む解析で特異的にみられたクラスタは

- Cancer associated fibroblast (CAF)

と annotation した。CAF クラスタは、マーカー遺伝子の発現から、*FAP*、*SDC1* (炎症性 CAF のマーカー) が高発現するなどの特徴がみられ、固形がんで見られる間質細胞に近い特徴をもつことが明らかとなった。さらに、*COMP* やコラーゲン遺伝子 (*COL8A1*、*COL11A1*、*COL10A1* など) などの固形がん CAF ではトップマーカーとして検出されてこなかった細胞外マトリックスの集合やコラーゲン生成に関連する遺伝子群が高発現していた。

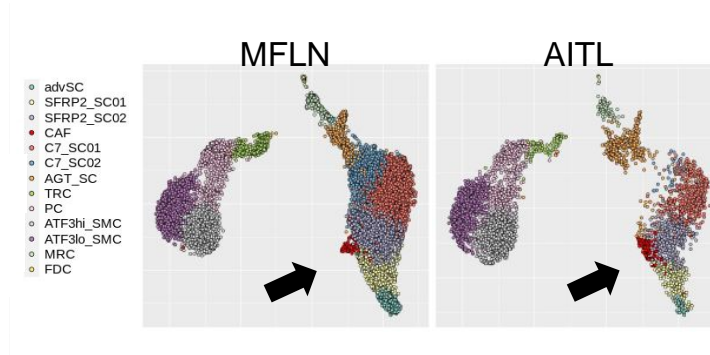


図 6 AITL 患者サンプルとコントロールサンプルにおける間質細胞分画の一細胞解析データ

左 統合したデータ 右 コントロール vs 患者サンプルクラスタリング

CAF を矢印で示す

次に、AITL とコントロールデータサンプルについて、定量的に比較を行ったところ、AITL では C7-SC は有意に減少していた。

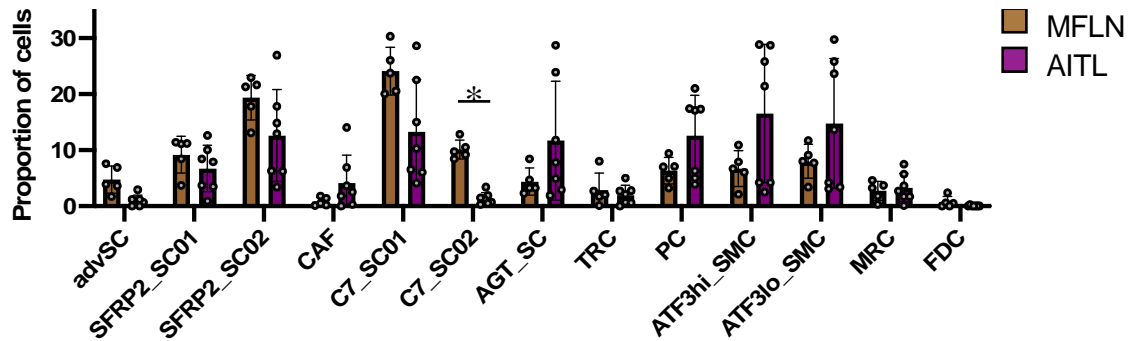


図7 AITL 患者サンプルとコントロールサンプルにおける間質細胞分画の一細胞解析データの比較

AITL では C7-SC が有意に減少している。

4-2. 考察

本研究から、AITL における間質細胞の特徴が一細胞解像度で明らかになった。AITL の間質細胞においては、FDC の増生は最も顕著にみられている特徴とされてきたが、本研究による一細胞解像度データを用いた定量的評価では、FDC の増生はみられていない。FDC は突起が長く、細胞懸濁液とする際に採取できていない可能性は残るものの、我々の先行研究では他のリンパ腫では同じ手法を用いて FDC の増加がみられたことから、FDC を一定程度は回収できているものと考えている。今後は、これらの間質細胞サブクラスターの形態および組織上の分布をみながら、再度評価を進める必要がある。

本研究では、特に、AITL に特徴的な間質細胞が明らかになり、固形がん CAF と類似していた。定量的な比較ではサンプルサイズの小ささと、サンプル間でのばらつきにより有意な増加は検出できていないが、先行研究での AITL 以外のデータではそもそもクラスターとして検出されておらず、AITL において増加しているクラスターであると評価している。これらは固形がん CAF とは一部異なる遺伝子群の高発現パターンを示しており、AITL に特異的な CAF であることが示唆された。今後、解析症例数を増やしてデータを強固にすると共に、AITL 特異的な CAF の機能を明らかにしてこれを標的とする治療を探索し、AITL の新たな治療戦略の提案に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Suma Sakurako, et. al. Sakata-Yanagimoto Mamiko	4. 巻 38
2. 論文標題 Tumor heterogeneity and immune-evasive T follicular cell lymphoma phenotypes at single-cell resolution	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 340 ~ 350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-023-02093-7	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujisawa M, Nguyen TB, Abe Y, Suehara Y, Fukumoto K, Suma S, Makishima K, Kaneko C, Nguyen YTM, Usuki K, Narita K, Matsue K, Nakamura N, Ishikawa S, Miura F, Ito T, Suzuki A, Suzuki Y, Mizuno S, Takahashi S, Chiba S, Sakata-Yanagimoto M.	4. 巻 140(18)
2. 論文標題 Clonal germinal center B cells function as a niche for T-cell lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 1937-1950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2022015451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Abe Y, Sakata-Yanagimoto M, Fujisawa M, Miyoshi H, Suehara Y, Hattori K, Kusakabe M, Sakamoto T, Nishikii H, Nguyen TB, Owada Y, Enomoto T, Sawa A, Bando H, Yoshida C, Tabata R, Terao T, Nakayama M, Ohshima K, Usuki K, Oda T, Matsue K, Chiba S.	4. 巻 24(4)
2. 論文標題 A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodelling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Cell Biol	6. 最初と最後の頁 565-578
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41556-022-00866-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Makishima Kenichi, Suehara Yasuhito, Abe Yoshiaki, Hattori Keiichiro, Kusakabe Manabu, Matsuoka Ryota, Chiba Shigeru, Sakata Yanagimoto Mamiko	4. 巻 113
2. 論文標題 Intratumor heterogeneity of lymphoma identified by multiregion sequencing of autopsy samples	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 362 ~ 364
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nguyen Yen T. M., Fujisawa Manabu, Nguyen Tran B., Suehara Yasuhito, Sakamoto Tatsuhiro, Matsuoka Ryota, Abe Yoshiaki, Fukumoto Kota, Hattori Keiichiro, Noguchi Masayuki, Matsubara Daisuke, Chiba Shigeru, Sakata Yanagimoto Mamiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Tet2 deficiency in immune cells exacerbates tumor progression by increasing angiogenesis in a lung cancer model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4931 ~ 4943
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 9件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 坂田 (柳元) 麻実子, 安部佳亮 .
2. 発表標題 一細胞解像度の解析による悪性リンパ腫の微小環境 .
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 坂田 (柳元) 麻実子, 安部佳亮 .
2. 発表標題 一細胞解析により明らかにした悪性リンパ腫の間質細胞の多様性 .
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 T cell lymphomas .
3. 学会等名 ESMO Asia 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto .
2. 発表標題 Unraveling Microenvironmental Diversity in Malignant Lymphoma through Single-Cell Analysis .
3. 学会等名 The 32nd Hot Spring Harbor International Symposium. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sakata-Yanagimoto M
2. 発表標題 Translational research targeting intractable lymphomas .
3. 学会等名 日本癌学会総会 (モベルネ受賞講演) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 坂田 (柳元) 麻実子
2. 発表標題 シングルセル解析が描く悪性リンパ腫における血管・非血管ストローマ細胞アトラス .
3. 学会等名 日本リンパ学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiaki Abe
2. 発表標題 A Comprehensive Single-Cell Atlas of Nonhematopoietic Cells in Human Lymph Node and Lymphoma Reveals Landscape of Stromal Remodeling
3. 学会等名 The 26th EHA 2021 Congress (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安部佳亮
2. 発表標題 A Comprehensive Single-Cell Atlas of Nonhematopoietic Cells in Human Lymph Node and Lymphoma for Dissecting Stromal Remodeling
3. 学会等名 第61回日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 Immune cell signatures derived from age-related clonal hematopoiesis facilitate the development of angioimmunoblastic T-cell lymphoma.
3. 学会等名 13th Annual T-Cell Lymphoma Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 Immune cell signatures derived from age-related clonal hematopoiesis facilitate the development of cancers.
3. 学会等名 Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂田(柳元)麻実子
2. 発表標題 Microenvironmental cells derived from clonal hematopoiesis provide a niche for tumor cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会(EHA-JSH joint シンポジウム) (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三好 寛明 (Miyoshi Hiroaki) (30647780)	久留米大学・医学部・准教授 (37104)	
研究分担者	山崎 聡 (Yamazaki Satoshi) (50625580)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	藤澤 学 (Fujisawa Manabu) (70897066)	筑波大学・医学医療系・学振特別研究員 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------