

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390241

研究課題名(和文)造血器腫瘍におけるTET2遺伝子異常とエピジェネティック制御の解析

研究課題名(英文)TET2 gene abnormality and epigenetic dysregulation in hematologic malignancies

研究代表者

千葉 滋 (Chiba, Shigeru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：60212049

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：メチル化シトシンをヒドロキシメチル化シトシンに変換する酵素をコードするTET2遺伝子は、様々な造血器腫瘍で高頻度に変異している。本研究では、T細胞リンパ腫の一つである血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)において、新規に高頻度のRHOA遺伝子変異を発見し、TET2変異とRHOA変異との関連を明らかにしてNature Genetics誌に報告した。さらに、TET2の機能不全モデルマウスを用いてT細胞リンパ腫の発症を証明し、またその際にどのようなエピゲノム制御破綻が生じているのかも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the TET2 gene, which encodes an enzyme converting methylcytosine to hydroxymethylcytosine in the genome, are frequently found in a wide variety of hematologic malignancies. In this research, we demonstrated frequent novel RHOA gene mutations and the relationship between the mutations of TET2 and RHOA in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. These findings were published in Nature Genetics in 2014. Furthermore, using model mice in which TET2 is knocked down, we demonstrated development of T-cell lymphoma and epigenetic dysregulation by the defect of TET2 function.

研究分野：血液内科学

キーワード：TET2 T細胞リンパ腫 エピゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん研究におけるエピゲノム研究の重要性:がんのゲノム解析が飛躍的に進む中で、エピゲノム制御に関わる多数の重要な分子が遺伝子変異によって障害されていることが明らかになってきた。造血器腫瘍でも、従来から細胞周期を抑制する CNKN2B など、様々ながん抑制遺伝子の制御領域のメチル化が高頻度に報告されてきた。骨髄異形成症候群(MDS)では、メチル化阻害剤の有効性が臨床的に確立されている。近年、ゲノムワイドな変異の探索によって、エピゲノム制御に関わる多数の遺伝子 (*DNMT3A*, *EZH2*, *TET2* など) の変異が高頻度に観察されることから、造血器腫瘍でエピゲノム異常が病態に深く関与していることが窺われる。

(2) *TET2* と脱メチル化仮説:骨髄系の造血器腫瘍においてもっとも高頻度に変異が認められる *TET2* は、DNA の脱メチル化を介して、エピゲノム制御の根幹に関わる重要な分子である可能性が高まっている。*TET2* はメチル化シトシン(5mC)の 5'メチル基を酸化し 5'ヒドロキシメチル化シトシン(5hmC)に変化させる酵素である。5hmC は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)、5mC に次ぐ 6 番目の塩基としてヒトゲノム中に存在することが示されており、5mC の脱メチル化が進む際に重要な中間産物とも考えられている。

### 2. 研究の目的

(1) *TET2* 変異と、DNA メチル化およびヒドロキシメチル化の関連を、症例の DNA を用いて明らかにする。

(2) *TET2* 変異をもつ造血幹細胞のクローン性造血と、それに引き続いて血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(angioimmunoblastic T-cell lymphoma; AITL)を発症するメカニズムを、症例のゲノム解析、および *TET2* 遺伝子変異マウスを用いたモデル動物構築を通じて明らかにする。

(3) プロテオミクスの手法で新たに見いだした *TET2* 結合蛋白を足がかりに、*TET2* による DNA 脱メチル化制御を分子レベルで明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒドロキシメチル化シトシンのゲノムワイドな同定方法の確立:ヒドロキシメチル化シトシン (5hmC) をゲノムシーケンス中に同定するため、2 種類の方法で 5hmC 濃縮

を行い比較する。すなわち、(i) 抗ヒドロキシメチル化抗体 (EPIGENTEK) を用いた免疫沈降による方法 (J Nucleic Acids 2011:870726, 2011)、(ii) beta-glucosyl-transferase を用いて 5hmC に UDP-6-N<sub>3</sub>-Glu を転換 (グリコシルメチル化シトシン) し、その後 UDP をビオチン化してアビジンビーズで沈降する方法 (Nature Biotech 29:68-72, 2010) である。

これらのうち、より効率や再現性の高い濃縮法を選択し、筑波大学共同研究室に設置されている SOLiD (Applied Biosystems) を用いて高速シーケンスを行う。これにより、施設内で 5hmC をゲノム中に同定する方法を確立する。

(2) 患者検体のエクソーム解析による、AITL 発症関連遺伝子の同定: *TET2* 遺伝子変異によるクローン性造血に由来する可能性が示唆される 10 名の AITL について、正常 (骨髄または口腔粘膜スワブ) および病理学的に診断されたリンパ種組織の両者から DNA を調整した。全エクソンシーケンスにより、AITL で変異が集積する遺伝子を同定する。複数の遺伝子が同定されると期待されるため、これらについて多数例の悪性リンパ種サンプルでシーケンス解析を行い、変異頻度の高い遺伝子を同定する。

### 4. 研究成果

(1) AITL 患者サンプルのゲノム解析により、高頻度の *TET2* 遺伝子変異の同定、新規 AITL 特異的遺伝子異常として *RHOA* 遺伝子変異の同定、そしてその両者の相互関連について知見といった成果が得られ、世界的に高い評価を得た (Nature Genetic 誌に報告した。また 2013 年米国血液学会 (ASH) 年次総会において、Best of ASH に選ばれ最終日に紹介された)。

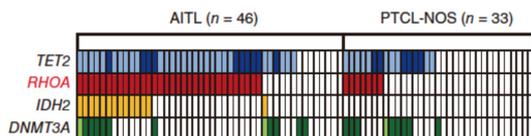
高頻度 *TET2* 遺伝子変異の同定: 多数例の AITL を解析し *TET2* 遺伝子変異が高頻度であることを確認したが、頻度は 80% を越えており、これまでの報告よりはるかに高頻度であった。

新規に AITL 特異的な遺伝子異常として、高頻度の *RHOA* 遺伝子変異を同定: AITL 患者サンプルの全エクソン解析により、新規に *RHOA* 遺伝子の G17V 変異を同定し、多数例の標的シーケンスによって *RHOA* 遺伝子変異は AITL の約 70% に認められること、そのほとんどが G17V 変異であることを明らかにした。

*RHOA* 遺伝子変異と *TET2* 遺伝子変異の関係: *RHOA* 遺伝子変異をもつサンプルは全

て *TET2* 遺伝子変異をもつことを明らかにし、両者が AITL 発症において協調することを示唆した。

(図1) AITL および類縁疾患における主要遺伝子変異とその関係。(それぞれのケースにおける遺伝子変異の有無を示す)



(2) *TET2* 機能不全マウスを解析し、濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞の増生、及び Tfh 細胞の形質をもつ T 細胞腫瘍の発症を見出した。さらに *TET2* 機能不全の直接の影響と考えられるメチル化異常が *Bcl6* 遺伝子内のサイレンサーで生じていることを見出し、これによる *Bcl6* の発現亢進が Tfh 細胞の増生に関わる可能性を示した。腫瘍発症における *TET2* 機能不全の具体的な標的を初めて見出した重要な研究成果である。

*TET2* ノックダウンマウスにおける濾胞性ヘルパーT細胞の増生：Gene trap ベクターの挿入によって作製された Ayu マウス<sup>1</sup>は、造血細胞や T 細胞で *TET2* の発現が 20% まで低下しているノックダウンマウスであることを明らかにし、このマウスの脾臓で濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)が増生することを見出した。

加齢 *TET2* ノックダウンマウスにおける T 細胞リンパ腫の発症： Ayu マウスは生後 60 週を過ぎると次々に腫瘍を発症した(8 匹中 6 匹)。腫瘍細胞は CD4(+)PD1(+)CD44(+)Cxcr5(+)で、*Bcl6* や *c-Maf* を発現しており、Tfh 細胞の形質を示した。ヒト AITL の腫瘍細胞は Tfh 細胞の形質を示すが、Ayu マウスで発症した T 細胞リンパ腫の病理像は、ヒト AITL 様の病理像とは異なっており、AITL を部分的に模倣する腫瘍であると結論付けた。

*Bcl6* の発現は腫瘍細胞で明らかに亢進しており、Tfh 細胞増生との関連が推察された。*Bcl6* は Tfh 分化のマスター転写因子とされている。一方、B 細胞腫瘍の細胞株を用いた研究で、*Bcl6* はイントロン 1 にサイレンサーが存在し(*Bcl6-int1*)、そのメチル化の程度と *Bcl6* の発現が正に相関していることが示されている<sup>2</sup>。そこで、Ayu マウスで発症した腫瘍組織から分離した CD4(+)細胞と野生型マウス脾臓から分離した CD4(+)細胞とで、*Bcl6-int1* のメチル化状態を解析し比較した。その結果、腫瘍組織から分離した CD4(+)細胞では著明にメチル化が亢進していた。*TET2* 機能不全 - *Bcl6* サイレンサーのメチル化亢進 - *Bcl6* の発現亢進 - Tfh 増生とい

う機序の後、二次的ゲノム異常を来して Tfh 細胞が腫瘍化した、という分子基盤が推察された。

#### < 引用文献 >

1. Tang H, Araki K, Li Z, Yamamura K. Characterization of Ayu17-449 gene expression and resultant kindey pathology in a knockout mouse model. *Transgenic Res* 2008; 17:399-608
2. Lai AY, Fatemi M, Dhasarathy A, et al. *J Exp Med* 2010; 207:1939-50

#### 5 . 主な発表論文等

##### [ 雑誌論文 ] ( 計 41 件 )

- Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Nakamoto-Matsubara R, Enami T, Ito Y, Kobayashi T, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S. Double somatic mosaic mutations in *TET2* and *DNMT3A*-origin of peripheral T cell lymphoma in a case. *Ann Hematol* Epub ahead of print. 査読有(DOI: 10.1007/s00277-015-2332-0)
- Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, Shiozawa Y, Miyake Y, Enami T, Kamada Y, Kato T, Yoshida K, Uchiba K, Nanmoku T, Sanada M, Obara N, Suzukawa K, Nakamura N, Aburatani H, Ogawa S, Chiba S. Reduced *TET2* Function Leads to T-cell Lymphoma with Follicular Helper T cell-like Features in mice. *Blood Cancer J* 4:e264, 2014 (doi: 10.1038/bcj.2014.83)
- Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic *RHOA* mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet* 46(2):171-5, 2014 (doi:10.1038/ng.2872)
- Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H,

Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet* 45(10):1232-7, 2013 (doi: 10.1038/ng.2731)

〔学会発表〕(計 171 件)

千葉 滋 . 骨髄異形成症候群のゲノム異常と病態 . 第 75 回日本血液学会学術集会 . 2013 年 10 月 11-13 日 . 札幌市教育文化会館 . 札幌 .

〔図書〕(計 2 件)

Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch2 signaling in mast cell development and distribution in the intestine. *Methods Mol Biol* pp.1220:79-89, 2015. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology (Eds: Hughes MR, McNagny KM), Springer Science+ Business Media New York

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : T 細胞リンパ腫の検出方法  
発明者 : 千葉滋、柳元麻実子、小川誠司  
権利者 : 筑波大学、東京大学  
種類 : 特許願  
番号 : 特願 2013-096582  
( International application No. PCT/JP2014/062112 )  
出願年月日 : 平成 25 年 5 月 1 日  
国内外の別 : 国内および国外

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ  
[www.ketsunai.com](http://www.ketsunai.com)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

千葉 滋 ( CHIBA, SHIGERU )  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号 : 60212049

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

小川誠司 (OGAWA, SEISHI)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号 : 60292900