

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02834

研究課題名（和文）血液がんにおける前がん細胞由来炎症細胞による腫瘍細胞の支持メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of tumor-supporting mechanisms in hematologic malignancies

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・准教授

研究者番号：80451805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000 円

研究成果の概要（和文）：T細胞リンパ腫は血液がんの一つである。腫瘍組織には多彩な炎症細胞が顕著に浸潤している。これらの炎症細胞は、腫瘍細胞の増殖や生存を支持する微小環境細胞として働くと思われていたが、具体的なメカニズムは明らかではなかった。研究代表者は、T細胞リンパ腫のゲノム解析を行い、エピゲノム修飾酵素をコードするTET2遺伝子の機能欠損型変異のある前がん細胞に由来すること、腫瘍細胞にはさらにG17V RHOA変異が加わって発症することを明らかにした（Nat Genet 2014）。本研究では、AITLの微小環境の多様性および変異と遺伝子発現の関連性について、シングルセル解析技術等の技術を用いて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、クローン造血に代表されるAITLという疾患について、炎症細胞プロファイルを明らかにする研究である。固形がん患者においても、クローン造血の頻度は25%と報告されており（Coombs, Cell Stem Cell 2018）、クローン造血のあるがん患者では、AITLと同様に、体細胞変異のある炎症細胞ががん細胞に浸潤し、微小環境細胞として働いている可能性がある。AITLにおける炎症細胞の異常プロファイルに関する研究成果は、がん微小環境の理解およびこれを標的とする治療に広く応用可能であると期待される。

研究成果の概要（英文）：T-cell lymphoma is a subtype of hematological malignancies. The tumor tissues are markedly infiltrated with a variety of inflammatory cells. These inflammatory cells have been supposed to act as microenvironmental cells that support growth and survival of tumor cells. However, the specific mechanism has not been clarified at all. The principal investigator conducted a genome analysis of T-cell lymphomas, and found that T-cell lymphomas are sometimes derived from premalignant cells with loss-of-function mutations in Tet2 gene that encodes an epigenome-modifying enzyme. Furthermore, tumor cells also have acquired the G17V RHOA mutation (Nat Genet 2014). In this study, we elucidated the variety of inflammatory cells using single cell RNA sequencing and the relationship between gene mutations and expression.

研究分野：がん微小環境

キーワード：がん微小環境 T細胞リンパ腫

1. 研究開始当初の背景

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AITL) は血液がんの一つである。腫瘍組織には炎症細胞や血管内皮細胞などの多彩な非腫瘍性細胞が顕著に浸潤している。AITL の腫瘍細胞は、遺伝子発現および蛋白発現プロファイルから濾胞性ヘルパー T 細胞に類似することが知られる。これらの非腫瘍性細胞は、腫瘍細胞の増殖や生存を支持する微小環境細胞として働くと想像されていたが、具体的なメカニズムは全く明らかにされていなかった。研究代表者は AITL のゲノム解析を行い、70%の症例でエピゲノム修飾酵素をコードする TET2 遺伝子の機能欠損型変異と G17V RHOA 変異が共存していることを明らかにした (Nat Genet 2014)。加えて、リンパ節病変の炎症細胞には腫瘍細胞と同じ TET2 変異がみられる一方、G17V RHOA 変異は腫瘍細胞に局限していることを明らかにした (Nat Genet 2014, Blood Cancer J 2017)。AITL 患者の造血前駆細胞にも TET2 変異がみられることから (Ann Hematol 2015, および未発表)、TET2 変異のある造血前駆細胞が前がん細胞としてはたらき、前がん細胞に G17V RHOA 変異が加わることで腫瘍細胞に「分化」と考えられる (「AITL の多段階発がん説」, Int J Hematol 2015)。一方、TET2 変異のある前がん細胞は多彩な炎症細胞へと分化して腫瘍組織に浸潤すると考えられるが、TET2 変異陽性炎症細胞が AITL 発症に果たす役割は明らかではなかった。

AITL の病態は明らかではなかったが、研究代表者と米国の Palomero らは AITL の約 70% に RHOA 遺伝子の 17 番目のアミノ酸がグリシンからバリンに置換された G17V 変異とエピゲノム調節因子をコードする TET2 変異がみられるとのゲノム解析結果を同時に報告し、AITL の病態研究を大きく進めるきっかけをつくった (Nat Genet 2014, Palomero, Nat Genet 2014)。さらに、研究代表者らは腫瘍細胞と腫瘍以外の血液細胞をセルソーターやレーザーマイクロダイセクションにより分離し、変異の分布を調べるという解析手法を用いて、G17V RHOA 変異は腫瘍細胞に特異的に生じている一方、TET2 変異は腫瘍細胞に加えて造血前駆細胞自身や、造血前駆細胞に由来するさまざまな血液細胞にも生じていることを示した (Nat Genet 2014; Ann Hematol 2015; Blood Cancer J 2017)。同時期に、健常人でも加齢とともに体細胞変異を獲得していることが報告された (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)。健常人でみられる体細胞変異では、血液がんで高頻度にみられる DNMT3A, TET2, ASXL1 変異のいずれかが約 70%を占めること、変異がある場合には血液がんを発症しやすいことが報告された (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)。変異を獲得した造血前駆細胞は前がん細胞としてはたらき、新たなゲノム異常が加わることで、ゲノム異常の種類に応じたさまざまな血液がんが発生すると考えられる。最近では TET2 変異陽性の炎症細胞は動脈硬化疾患を増悪させることが報告されたことから (Jaiswal, NEJM 2017)、TET2 変異陽性炎症細胞は血液がんにとどまらず、広く疾病に関わっていると考えられる。一方で、TET2 変異陽性炎症細胞が血液がんの病態に及ぼす影響については、これまで報告されていない。

研究代表者独自の AITL に関する研究成果と、健常人の加齢における国外の研究を総合することにより、AITL では加齢に伴って未分化な造血前駆細胞に TET2 変異が生じ、これに G17V RHOA 変異が加わるという多段階的ゲノム異常により発症するという「AITL の多段階発がん説」を提唱した (Int J Hematol 2015)。本研究は、TET2 変異陽性の非腫瘍性の炎症細胞が血液がんの病態に及ぼす役割に注目しており、「AITL の多段階発がん説」に関する研究成果を基盤としながら、新たな研究成果へと発展させるために研究を行った。

2. 研究の目的

AITL には、腫瘍組織に多彩な炎症細胞が顕著に浸潤している。かつ、これらの炎症細胞の一部は前がん細胞に由来しており、前がん細胞と同様の遺伝子異常を有している。本研究では、AITL における炎症細胞の多様性を明らかにし、変異プロファイルとの関連性を明らかにするために行った。

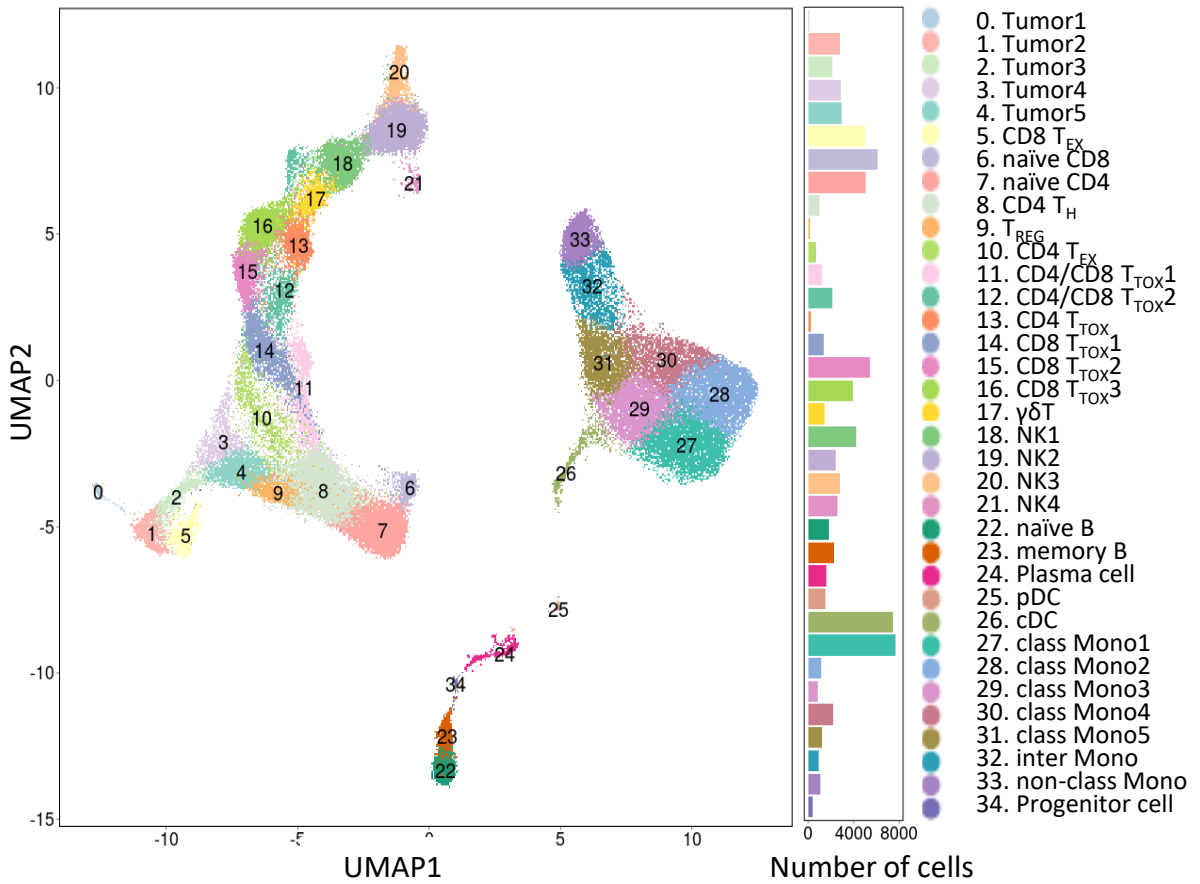
3. 研究の方法

AITL 患者の末梢血サンプルおよびパブリックデータをダウンロードし、解析を行った。シングルセル解析 (Sc-seq) データは、12 人の AITL 患者と 5 人の健康なドナーの末梢血 (PB) ($n > 80,000$) について分析した。シングルセル解析のライブラリ作製には Chromium Single Cell 5' Reagent Kit、Immunoprofiling kit を用い、5 サンプル (LN) からの腫瘍細胞 ($n > 6,000$) の Sc-seq データを統合した。データ分析は一次解析には CellRanger、二次解析には Seurat、Batchelor、および VarTrix パイプラインによって実行した。

4. 研究成果

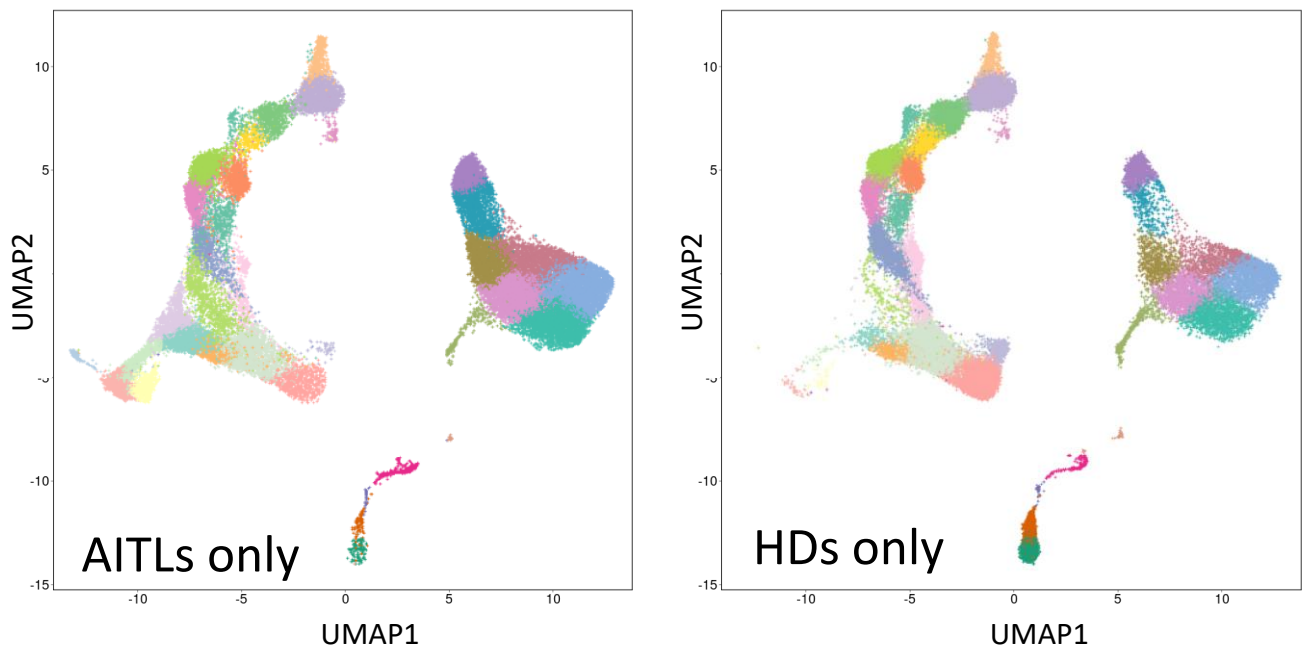
シングルセルレベルでヒト末梢血免疫細胞およびコントロールとしてパブリックデータを用いて比較することにより、免疫細胞の特徴的プロファイルを明らかにした (図 A-C)。AITL のリンパ節では特徴的 B 細胞分画が増加しているのとは対照的に、末梢血では B 細胞分画が減少し、疲弊 T 細胞の増加がみられた (図 D)。さらには、免疫細胞クローナリティー解析により、疾患ごとに特徴的な T 細胞受容体クローンが同定された。過去の報告では、AITL の腫瘍細胞はときにオリゴクローン (複数の T 細胞受容体クローンが同定されること) であることが報告されていたが、我々がシングルセルレベルで解析したところ、いずれも単クローンであった。さらには、同検体について、体細胞変異解析を同時に行い、これとシングルセル解析データの照らし合わせを行った。体細胞変異解析には Genomon2 パイプラインを用い、シングルセルデータの変異分布解析には VarTrix パイプラインを用いた。これにより、シングルセルレベルで特徴的な関係性が明らかとなった。

A UMAP visualization of integrated scRNA-seq data from all PB samples.



Unsupervised clustering identified 22 T/NK, 3 B, and 10 myeloid clusters. Cluster 0-4 were considered to be tumor cells due to their TFH-like phenotype, biased distribution to AITLs.

B UMAP visualization of integrated scRNA-seq data from PB samples from AITL versus healthy (HD) donors.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Kusakabe M, Nanmoku T, Sato T, Noguchi M, Chiba S	4. 巻 110(10)
2. 論文標題 Mutations found in cell-free DNAs of patients with malignant lymphoma at remission can derive from clonal hematopoiesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3375-3381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14176	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 TB, Sakata-Yanagimoto M, Fujisawa M, Tanzima Nuhath S, Miyoshi H, Nannya Y, Hashimoto K, Fukumoto K, Bernard Olivier A, Kiyoki Y, Ishitsuka K, Momose H, Sukegawa S, Shinagawa A, Suyama T, Sato Y, Nishikii H, Obara N, Kusakabe M, Yanagimoto S, Ogawa S, Ohshima K, Chiba S	4. 巻 -
2. 論文標題 Dasatinib Is an Effective Treatment for Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/008-5472.CAN-19-2787	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 該当する
1. 著者名 Shrestha R, Sakata-Yanagimoto M, Maie K, Oshima M, Ishihara M, Suehara Y, Fukumoto K, Nakajima-Takagi Y, Matsui H, Kato T, Muto H, Sakamoto T, Kusakabe M, Nannya Y, Makishima H, Ueno H, Saiki R, Ogawa S, Chiba K, Shiraishi Y, Miyano S, Enguerran Mouly, Bernard OA, Inaba T, Koseki H, Iwama A, Chiba S	4. 巻 4(5)
2. 論文標題 Molecular pathogenesis of progression to myeloid leukemia from TET-insufficient status	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Adv	6. 最初と最後の頁 845-854
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/bloodadvances.2019001324	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 該当する
1. 著者名 Maie Koichiro, Yokoyama Yasuhisa, Yano Yoko, Kato Takayasu, Nannya Yasuhito, Ogawa Seishi, Noguchi Masayuki, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Chiba Shigeru	4. 巻 97
2. 論文標題 Progression to polycythemia vera from familial thrombocytosis with germline JAK2 R867Q mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 737 ~ 739
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00277-017-3209-1	査読の有無 有
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 Suehara Yasuhito, Sakata-Yanagimoto Mamiko, et al	4. 巻 103
2. 論文標題 Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 e241 ~ e244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2017.178830	査読の有無 有
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 Suma Sakurako, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Nguyen Tran B., Hattori Keiichiro, Sato Taiki, Noguchi Masayuki, Nannya Yasuhito, Ogawa Seishi, Watanabe Rei, Fujimoto Manabu, Nakamura Naoya, Kusakabe Manabu, Nishikii Hidekazu, Kato Takayasu, Chiba Shigeru	4. 巻 108
2. 論文標題 Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm arising from clonal hematopoiesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 447 ~ 451
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-2461-z	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 Hattori Keiichiro, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Kusakabe Manabu, Nanmoku Toru, Suehara Yasuhito, Matsuoka Ryota, Noguchi Masayuki, Yokoyama Yasuhisa, Kato Takayasu, Kurita Naoki, Nishikii Hidekazu, Obara Naoshi, Takano Shingo, Ishikawa Eiichi, Matsumura Akira, Muratani Masafumi, Hasegawa Yuichi, Chiba Shigeru	4. 巻 110
2. 論文標題 Genetic evidence implies that primary and relapsed tumors arise from common precursor cells in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 401 ~ 407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13848	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 Tanzima Nuhath Sharna, Sakata-Yanagimoto Mamiko, Komori Daisuke, Hattori Keiichiro, Suehara Yasuhito, Fukumoto Kota, Fujisawa Manabu, Kusakabe Manabu, Matsue Kosei, Wakamatsu Hirotake, Shimadzu Mitsunobu, Chiba Shigeru	4. 巻 109
2. 論文標題 Droplet digital polymerase chain reaction assay and peptide nucleic acid-locked nucleic acid clamp method for RHOA mutation detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1682 ~ 1689
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13557	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23件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 坂田（柳元）麻実子
2. 発表標題 T細胞リンパ腫における病態に基づく臨床開発
3. 学会等名 第34回 悪性リンパ腫治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 Genome-based medicine in peripheral T-cell lymphomas.
3. 学会等名 The 10th JSH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2019 in Ise-Shima（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Raksha Shrestha, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Concurrent loss of Tet2 and Tet3 promotes leukemogenesis in mice
3. 学会等名 The 10th JSH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2019 in Ise-Shima（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manabu Kusakabe, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Hidekazu Nishikii, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Targeted sequencing and IgH rearrangement status revealed branching evolution pattern of SMZL and DLBCL
3. 学会等名 The 10th JSH INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2019 in Ise-Shima（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Allelic inactivation of Tets is responsible for leukemic transformation in mice already losing Tet functions in multiple alleles
3. 学会等名 The 17th Stem Cell Research Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Kiyoki, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Hidekazu Nishikii, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Targeting T-cell receptor signaling pathway by dasatinib in relapsed/refractory angioimmunoblastic T-cell lymphoma
3. 学会等名 The 24th Congress of EHA (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清木祐介, 坂田(柳元)麻実子, 錦井秀和, 千葉 滋
2. 発表標題 Targeting T-cell receptor signaling pathway by dasatinib in relapsed/refractory angioimmunoblastic T-cell lymphoma
3. 学会等名 第59回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 綿谷陽作, 坂田(柳元)麻実子, 千葉 滋, 片岡圭亮
2. 発表標題 Molecular heterogeneity in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified revealed by comprehensive genetic profiling
3. 学会等名 第59回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Targeted therapy for tumor cells and microenvironmental cells derived from clonal hematopoiesis
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末原泰人, 坂田 (柳元) 麻実子, 千葉 滋
2. 発表標題 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫および類縁疾患のゲノム解析
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tran B. Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Targeting T-Cell Receptor Signaling as Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Treatment
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田 (柳元) 麻実子
2. 発表標題 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫とその類縁疾患の診断と治療
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田（柳元）麻実子, 清木祐介, トラン ヌエン, 千葉 滋
2. 発表標題 再発難治性血管免疫芽球性T細胞リンパ腫を対象としたT細胞受容体シグナルに対する標的治療
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末原泰人, 坂田（柳元）麻実子, 千葉 滋
2. 発表標題 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫および類縁疾患のゲノム解析
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田（柳元）麻実子
2. 発表標題 T細胞リンパ腫のクローン進化：起源とゲノム異常
3. 学会等名 第65回 日本病理学会秋期特別総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 New genetic insights to peripheral t cell lymphoma with a focus on angioimmunoblastic T cell lymphoma
3. 学会等名 ESMO Asia2019（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kota Fukumoto, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 VAV1 Mutations Contributes to the Development of T-Cell Malignancies in Mice
3. 学会等名 61st ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daisuke Kaji, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Clinicopathological Analysis of “Other Iatrogenic Immunodeficiency-Associated Lymphoproliferative Disorders” Reveals a Favorable Outcome Independent of the Effectiveness of Methotrexate Discontinuation in Autoimmune Disease Patients
3. 学会等名 61st ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂田(柳元)麻実子
2. 発表標題 リンパ腫の分子生物学と新規治療
3. 学会等名 第22回 日本がん分子標的治療学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sharna Tanzima nuhat, 坂田(柳元)麻実子, 小森大輔, 服部圭一朗, 福本浩太, 藤澤 学, 末永孝生, 若松宏武, 島津光伸, 千葉 滋
2. 発表標題 DropIet digital PCR and PNA-LNA clamp method for RHOA mutation detection in peripheral T-cell lymphoma
3. 学会等名 第58回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tran B. Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Manabu Fujisawa, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Effectiveness of Dasatinib in an Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Mouse Model
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium 2018 in Kyoto (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tran B. Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Manabu Fujisawa, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Effective of Dasatinib in a T-cell lymphoma mouse model
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田(柳元)麻実子
2. 発表標題 T細胞リンパ腫におけるこれからの治療戦略
3. 学会等名 第56回 日本癌治療学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2018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	錦井 秀和 (Nishikii Hidekazu) (30512834)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	千葉 滋 (Chiba Shigeru) (60212049)	筑波大学・医学医療系・教授 (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