

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16239

研究課題名(和文) 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫におけるエピゲノム異常を伴う炎症細胞の機能の解明

研究課題名(英文) Clarifying the function of inflammatory cells with epigenomic abnormalities in angioimmunoblastic T-cell lymphoma

研究代表者

藤澤 学 (FUJISAWA, Manabu)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：70897066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000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、クローン性造血を背景に持つ成熟T細胞リンパ腫である。TET2変異を持つ免疫細胞がAITLの発症を可能にする機序について、モデルマウスを用いて検討した。血液細胞全体でTet2を欠損したマウスは約1年でAITLを自然発症したが、T細胞のみでTet2を欠損したマウスでは発症は観察されなかった。Tet2欠損炎症細胞はAITLのニッチとして機能していることが示唆された。免疫細胞による共移植実験とオミクス解析から、微小環境では独自にクローン進化を遂げた異常GCB細胞が拡大し、CD40LG-CD40経路を通して腫瘍化を支持していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン性造血を背景にもつ血管免疫芽球性T細胞リンパ腫のマウスモデルを用いて単一細胞レベルでの遺伝子発現解析を行なった。インシリコ解析から、胚中心B細胞と「がん細胞」の相互作用分子として、CD40-CD40LG経路が明らかとなった。また、CD40-CD40LG経路を阻害する治療によって、「がん」そのものの増殖を抑えることができることを発見した。本研究結果は、がん微小環境細胞と「がん細胞」のネットワークを阻害するという新しい治療法を提案するものであり、このような治療アプローチは、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫のような希少がんのアンメットメディカルニーズに答えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is proposed to be initiated by age-related clonal hematopoiesis (ACH) with TET2 mutations, whereas G17V RHOA mutation in immature cells with TET2 mutations promotes the development of T follicular helper-like tumor cells. Here, we investigated the mechanism by which TET2-mutant immune cells enable AITL development. Among 2 mouse models, mice lacking Tet2 in all blood cells spontaneously developed AITL, while mice lacking Tet2 only in T cells did not. Therefore, Tet2-deficient immune cells function as a niche for AITL development. In silico analysis using scRNA-seq data identified Cd40-Cd40lg as a possible mediator of aberrant expanded GCB and tumor cell interactions. Treatment of AITL mice with anti-Cd40lg inhibitory antibody prolonged survival. Therefore, ACH-derived GCB cells could undergo independent clonal evolution and support the tumorigenesis in AITL via the CD40-CD40LG axis.

研究分野：血液内科学

キーワード：がん微小環境 クローン性造血 T細胞リンパ腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (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(Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AITL)は成熟 T 細胞リンパ腫の一亜型で難治性な希少がんである。がん細胞は T 濾胞ヘルパー細胞(TFH 細胞)の性質をもち、周囲にはさまざまな炎症細胞が増生しているという特徴がある。ゲノム異常の分布から、AITL は加齢に伴うクローン性造血 (ACH)を背景にもつと考えられるが、クローン性造血からがんに進展するメカニズムについては明らかでない。

2. 研究の目的

AITL は、骨髄中の未分化な造血幹細胞がエピゲノムに関わる *TET2* 変異などの体細胞変異を獲得して「前がん細胞」となり、さらに、がん細胞に運命づけられた T 細胞が G17V RHOA 変異を獲得することで、がん細胞となると考えられる(「AITL の多段階発がん説」, Fujisawa, J Clin Exp Hematop 2017)。興味深いことに、AITL 組織に浸潤する B 細胞においても、*TET2* 変異などの体細胞変異がみられることから (Nguyen et al., Blood Cancer J 2017)、こうしたがん細胞を取り囲む炎症細胞も「前がん細胞」から分化すると考えられる。そこで、AITL における「体細胞変異のある炎症細胞」は、がん細胞を支持する niche としてはたらくと考え、研究を行なった。

3. 研究の方法

ヒト AITL 生検検体およびマウス AITL 組織から細胞懸濁液を作製し、Chromium (10xGenomics)を用いて、シングルセル 3'RNA シーケンス用のライブラリ作製 (10xGenomics)を行った。HiSeqX によりシーケンスを行い、データ解析は、東京大学医科学研究所で運用されているスーパーコンピュータ-SHIROKANE を用いた。

マッピング、カウントなどの一次解析 (*CellRanger*)の後、R package を用いて二次解析を行った。これらにより、各クラスターのうち、AITL で増加しているクラスターを同定した。さらにはがん細胞クラスターと各細胞集団間でのネットワーク解析 (*CellPhoneDB*)を *in silico* に行い、相互作用に関わる分子を抽出した。スクリーニングされた相互作用分子について、フローサイトメトリーおよび多重組織染色法による検証を行った。

4. 研究成果

成果 1. ACH を再現する AITL モデルマウスの樹立

ACH を背景に持つ炎症細胞が AITL の発生を可能にするメカニズムについて検討するため、二つの *Tet2* 欠損マウスを樹立した (Fig.A)。ACH を模倣する全血液細胞で *Tet2* を欠損したマウス (*Mx-Cre x Tet2^{flox/flox} x G17V RHOAtg* マウス, MxTR)は約 1 年で AITL を自然発症したが、T 細胞のみで *Tet2* を欠損したマウス (*Cd4-Cre x Tet2^{flox/flox} x G17V RHOAtg* マウス, CD4TR)では発症しなかった。従って、*Tet2* 欠損炎症細胞は AITL のがん微小環境細胞として機能していることが示唆された。

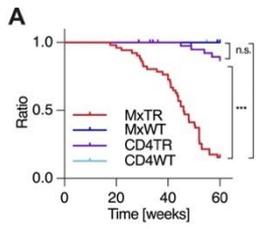
成果 2. AITL 微小環境におけるクローン性胚中心 B(GCB)細胞の拡大の発見

シングルセル発現解析 (Sc-seq)によって AITL は、15 のクラスターに分類され (Fig.B)、さらに、B 細胞のサブクラスターリングにおいて *Aicda* や *Mki67* などの増殖マーカーを発現する暗帯と *Cd40* や *Cd83* などの活性化マーカーを発現する明帯の両方の特徴を有する GCB 細胞が増加していた。さらに、全エクソン解析では、この異常 GCB 細胞は、独自に体細胞変異を獲得し、クローン進化していた。

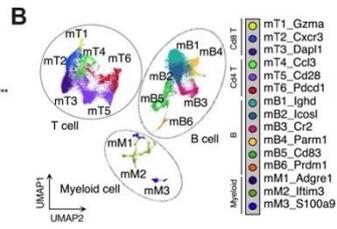
成果 3. AITL の治療標的としての GCB とがん細胞クラスター間の Cd40-Cd40lg 相互作用の同定

Tet2 欠損炎症細胞とがん細胞の間のクロストークを支えるメカニズムを解析するために、Sc-seq の配列データを利用して、*in silico* にリガンド・レセプター相互作用解析を行った。AITL の微小環境において GCB 細胞とがん細胞のクラスターにおける有意な 11 の相互作用分子が同定され、その中には、Cd40 (GCB 細胞)-Cd40lg (がん細胞)が含まれていた。

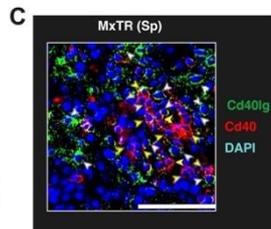
Cd40 は、AITL 組織内 GCB 細胞で有意に発現が亢進しており、破綻した濾胞構造の中には、多くの Cd40lg 陽性がん細胞と Cd40 陽性 GCB 細胞がびまん性に増加し、両細胞が互いに隣接して局在する niche を形成していることが明らかになった (Fig.C)。AITL を移植したヌードマウスに抗 Cd40lg 阻害抗体を投与すると、生存期間が延長した (Fig.D)。以上より、Cd40-Cd40lg 相互作用は、がん細胞と *Tet2* 欠損 GCB 細胞間のクロストークに必須であることが示唆された。



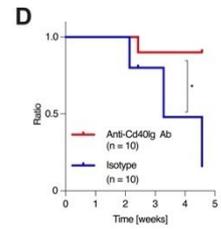
MxTRとCD4TR
の生存曲線



AITLにおけるSc-seq



Cd40lgとCd40の
蛍光免疫染色



抗Cd40lg阻害抗体
による治療実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujisawa M, Nguyen T, Abe Y, Suehara Y, Fukumoto K, Suma S, Makishima K, Kaneko C, Nguyen Y, 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
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 須摩栞子, 藤澤 学, 安部佳亮, 末原泰人, 日下部学, 梶 大介, 杉尾健志, 加藤光次, 赤司浩一, 末永孝生, 中村直哉, 鈴木絢子, 鈴木 穰, 千葉 滋, 坂田(柳元)麻実子
2. 発表標題 シングルセル解析によるT 濾胞ヘルパー細胞リンパ腫の免疫プロファイルおよび腫瘍細胞不均一性の解明
3. 学会等名 第26回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Manabu Fujisawa, Tran B. Nguyen, Yoshiaki Abe, Yasuhito Suehara, Kota Fukumoto, Sakurako Suma, Kensuke Usuki, Kentaro Narita, Kosei Matsue, Naoya Nakamura, Shumpei Ishikawa, Fumihito Miura, Takashi Ito, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki, Satoru Takahashi, Shigeru Chiba, Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 Germinal Center B Cells Derived from TET2-Mutated Clonal Hematopoiesis Provide a Microenvironmental Niche for Tumor Cells in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakurako Suma, Manabu Fujisawa, Yoshiaki Abe, Yasuhito Suehara, Manabu Kusakabe, Takeshi Sugio, Koichi Akashi, Kosei Matsue, Naoya Nakamura, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki, Shigeru Chiba, Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 シングルセル解析による血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫の免疫プロファイルおよび腫瘍細胞不均一性の解明
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mamiko Sakata-yanagimoto, Manabu Fujisawa, Nguyen Yen, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Tet2 欠失免疫細胞はがん発症を促進するニッチとして働く：T 細胞リンパ腫および肺がんモデルの解析
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Fujisawa, Tran Nguyen, Yoshiaki Abe, Yasuhito Suehara, Kota Fukumoto, Sakurako Suma, Kosei Matsue, Naoya Nakamura, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki, Fumihito Miura, Takashi Ito, Shigeru Chiba, Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 TET2 変異胚中心 B 細胞は CD40-CD40LG シグナルを介して AITLの腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sakurako Suma, Manabu Fujisawa, Yoshiaki Abe, Yasuhito Suehara, Manabu Kusakabe, Daisuke Kaji, Takeshi Sugio, Koji Kato, Koichi Akashi, Kosei Matsue, Naoya Nakamura, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki, Shigeru Chiba, Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫の末梢血免疫プロファイリングと腫瘍細胞シングルセル解析
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Fujisawa, Tran Nguyen, Yoshiaki Abe, Yasuhito Suehara, Kota Fukumoto, Sakurako Suma, Kensuke Usuki, Kentaro Narita, Kosei Matsue, Naoya Nakamura, Ayako Suzuki, Yutaka Suzuki, Shigeru Chiba, Mamiko Sakata-Yanagimoto
2. 発表標題 TET2 変異胚中心 B 細胞は CD40-CD40LG シグナルを介して AITL の腫瘍形成を促進する
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤澤 学
2. 発表標題 T濾胞ヘルパー細胞リンパ腫：診断の現状と課題
3. 学会等名 第62回日本リンパ網内系学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2022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

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