

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860717

研究課題名(和文) Tet2機能低下によるエピゲノム制御異常を介したリンパ腫発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of lymphoma development through epigenetic dysregulation associated with reduced Tet2 function

## 研究代表者

武藤 秀治 (Muto, Hideharu)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：50709194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：TET2遺伝子は、メチルシトシンをヒドロキシメチルシトシンに変換する酵素をコードしており、エピゲノム制御に重要な役割を果たしている。TET2遺伝子変異は骨髄球系造血器腫瘍および一部のT細胞性リンパ腫で高頻度に認められることが知られている。我々の解析したTet2 knockdownマウスは濾胞性ヘルパーT細胞の特徴を有したT細胞性リンパ腫を発症した。そのメカニズムにはエピゲノム制御異常を介したBcl6の発現亢進が関与しており、ヒトにおける一部のT細胞性リンパ腫の発症において、同様の機序が存在する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TET2 gene, which encodes an enzyme that converts methylcytosine to hydroxymethylcytosine, plays an important role for epigenetic regulation. TET2 gene mutation has been frequently found in a part of T-cell lymphomas as well as myeloid malignancies. We analyzed Tet2 knockdown mice and revealed that they developed T-cell lymphomas with follicular helper T-cell like features. Upregulation of Bcl6 expression through epigenetic dysregulation was associated with mechanism for lymphoma development. We guess that the similar mechanism exists in human T-cell lymphoma.

研究分野：血液学

キーワード：TET2 T細胞性リンパ腫 濾胞性ヘルパーT細胞 BCL6 エピゲノム異常

## 1. 研究開始当初の背景

*TET*(Ten-Eleven Translocation)遺伝子群はヒト、マウスにおいてそれぞれ1-3までの遺伝子ファミリーが同定されている。2010年、*TET* 遺伝子群の生理機能は、5mCを5hmCに変換する酵素であることが明らかとなり (Ito, S. et al. *Nature* 466, 1129-33.2010)、最終的にはシトシンの脱メチル化を導く役割があることが判明した。一方で、2009年、ヒト造血器腫瘍における網羅的変異解析の結果から、骨髄異形成症候群(MDS)をはじめとする骨髄球系造血器腫瘍において *TET2* 変異が高頻度に認められることが明らかとなった (Delhommeau, F. et al. *N Engl J Med* 360, 2289-301.2009)。近年では、濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh)を起源に持つT細胞性リンパ腫においても高頻度に *TET2* 変異が認められたと報告され (Quivoron, C. et al. *Cancer Cell* 20, 25-38. 2011)、*TET2* 変異は広く造血器腫瘍に存在することが明らかとなった。臨床では5-AZA Cや5-AZA dCといった脱メチル化剤がすでに用いられており、MDSにおいて有効性を示している (Fenaux, P. et al. *Lancet Oncol* 10, 223-32. 2009)。これらのことから造血器腫瘍発症メカニズムにおいて、*TET2* 遺伝子が関連するメチル化異常が重要な役割を果たしていることが示唆されている。

*Tet2*のノックアウトマウスに関しては、現在まで6報の報告があるが、造血幹細胞の増加、競合的再構築能の亢進を示し、中には慢性骨髄単球性白血病の病態を発症した報告があったが、T細胞性リンパ腫をはじめとするリンパ性腫瘍の発症の報告は皆無であった。また、*Tet2*の機能低下に伴うメチル化異常により造血器腫瘍が発症するメカニズムについても依然明らかとなっていない。

申請者の所属するグループではAyu17-449マウスといわれるgene trap法にて作製された*Tet2*遺伝子改変マウス (Tang, H. et al.

*Transgenic Res* 17, 599-608. 2008)の解析を行っている。このマウスは、酵素活性部位における*Tet2* mRNAの発現が野生型の20%で、5hmC量は野生型の約半量まで低下しており、*Tet2*ノックダウンマウスであると判断した。

*Tet2<sup>gt/gt</sup>*マウスは野生型に比べ、脾臓におけるCD4+/PD1+/Cxcr5+であるいわゆる濾胞性ヘルパーT細胞(Tfh細胞)様の細胞が有意に増加しており、60週齢を超える高齢マウスでは、Tfh細胞様の特徴を有したT細胞性リンパ腫を発症した。リンパ腫細胞におけるマイクロアレイ解析を行ったところ、Tfh細胞の分化・増殖に關与する転写因子である、*Bcl6*や*cMaf*、共刺激分子である*Pdcd1*や*Icos*など、Tfh細胞で遺伝子発現が上昇する遺伝子群において、有意な発現上昇を認め、リンパ腫細胞は、Tfh細胞様の遺伝子発現パターンを有していると考えられた。このマウスは、エピゲノム異常に伴うT細胞性リンパ腫発症のモデルマウスと考えられた。

## 2. 研究の目的

*TET2*は最終的に脱メチル化を導く機能を有していることから、*TET2*の機能不全がどのような遺伝子にメチル化異常を引き起こし、T細胞性リンパ腫の発症に關連するかを明らかにすることを目的とする。具体的には、リンパ腫細胞における網羅的な遺伝子発現解析を基にし、野生型と比べて変化の大きな遺伝子に注目し、遺伝子発現とメチル化異常について、MeDIPシーケンスやバイサルファイトシーケンスを用いてその違いを明らかにする。また、一方でT細胞性リンパ腫発症までの期間が中央値で67週齢と長期間にわたることから、*Tet2*の機能低下のみではなく、何らかのadditional hitの存在を推測している。これを明らかにするために、野生型とリンパ腫細胞を用いてwhole exon sequenceを行い、關連する遺伝子変異を同定する。

## 3. 研究の方法

血管免疫芽球性T細胞性リンパ腫はマイクロアレイの解析から，normal counterpartと想定される細胞がTfh細胞であることが明らかになっている(de Leval, L. et al. *Blood* 109, 4952-63, 2007)．Tfh細胞では*Bcl6*や*cMaf*が master transcription factorとして知られており，当リンパ腫におけるマイクロアレイの解析でも発現レベルが上昇しており，real-time PCR法でも有意な発現上昇を確認した．中でも*Bcl6*はTfh細胞の分化・増殖に必須であり，そのintron 1におけるCpGのメチル化の亢進によりmRNAの発現が正に制御されることがB細胞性リンパ腫細胞株においてすでに報告されている(Lai, A. et al. *J Exp Med*, 1935-1950, 2010)．網羅的なエピゲノムから得られる情報とこれまでに報告された情報を吟味し，Tet2機能低下とTfh細胞様の特徴を有したT細胞性リンパ腫の発症関連と明らかにする．

### (1) *Tet2<sup>gt/gt</sup>* マウスに生じたリンパ腫細胞におけるエピゲノム解析

野生型およびリンパ腫細胞から CD4<sup>+</sup>細胞を磁気ビーズを用いて純化し，そこからDNAを抽出して解析に用いた．ゲノムワイドでの解析には，次世代シーケンサーを用いる必要があり，(h)MeDIP sequenceに関しては，東京大学先端科学技術センターゲノムサイエンス分野の油谷浩幸教授のグループと共同研究を行った．一方，(h)MeDIP，パイサルファイトシーケンスに関しては，候補と考えられる遺伝子領域にプライマーを設計し，局所におけるメチル化，ヒドロキシメチル化の差を検出を行った．

### (2) 網羅的解析から得られた結果に関する検証

遺伝子発現解析，(h)MeDIP シーケンスなどの網羅的解析から得られたデータの解析を行い，候補となる遺伝子の抽出を行った．

EL4 マウス T 細胞性リンパ腫細胞株を用いて脱メチル化剤であるデシタピンを添加し，脱メチル化された際の遺伝子発現の変化を検証した．

### (3) *Tet2<sup>gt/gt</sup>* マウスに生じたリンパ腫細胞における additional hit の解析

当マウスモデルでは，リンパ腫発症まで中央値 67 週齢と長期間を要することから，Tet2 の機能低下が Tfh 様細胞の分化・増殖を促進するいわゆる前がん状態の形成に寄与し，そこに更なる遺伝子異常が加わることによって腫瘍化する機序を想定している．野生型とリンパ腫細胞における網羅的な変異解析を行うために whole exon sequence を行った．候補遺伝子は deep sequencing, Sanger 法による validation を行った．

## 4. 研究成果

### (1) *Tet2<sup>gt/gt</sup>* マウスに生じたリンパ腫細胞におけるエピゲノム解析

TET2は最終的にDNAの脱メチル化を導く機能を有していることから，TET2の機能不全が引き起こすエピゲノム異常とT細胞性リンパ腫の発症との関連を明らかにするため (h)MeDIP sequenceを行った．ゲノムワイドでの解析では，メチルシトシンの有意な増加および転写開始点付近でのヒドロキシメチルシトシンの有意な低下を認め(図1)，個別の遺伝子解析では濾胞性ヘルパーT(Tfh)細胞の主要転写因子である*Bcl6*のintron 1に高メチル化部位を認めた(図2)．パイサルファイトシーケンス法でも検証を行った．この部位のメチル化はB細胞性リンパ腫において*BCL6*の転写を促進することが知られており，*Bcl6*の転写が促進されることによりTfh様細胞の増加をきたしている可能性が考えられた．

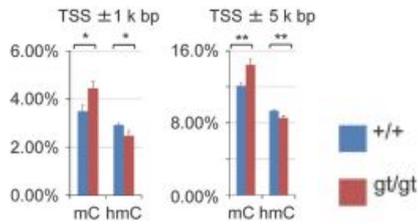


図1 mC/hmCの網羅的解析

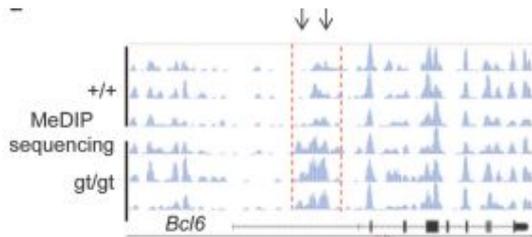


図2 *Bcl6* intron 1のメチル化解析

## (2) 網羅的解析から得られた結果に関する検証

*Bcl6* intron 1 のメチル化と発現制御の関連を調べるために、EL4 マウス T 細胞性リンパ腫細胞株を用いて脱メチル化剤であるデシタピンを添加し、脱メチル化された際の遺伝子発現の変化を検証した。EL4 の *Bcl6* intron1 はほぼ完全にメチル化された状態にあり、デシタピンを加えることにより脱メチル化を引き起こせることをパイサルファイトシーケンス法にて確認した。脱メチル化に伴い、*Bcl6* の mRNA 発現量が低下することを real time PCR 法にて確認した(図 3)。

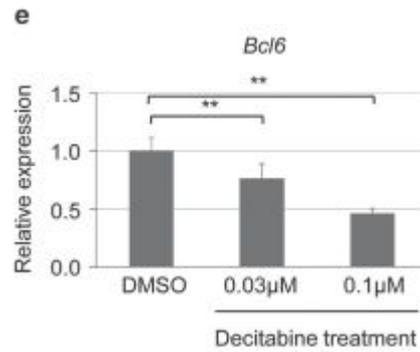
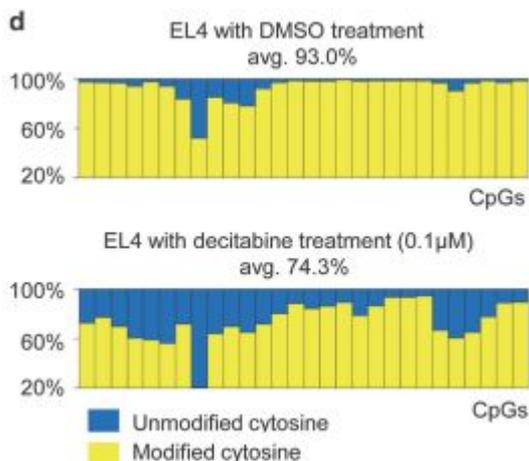
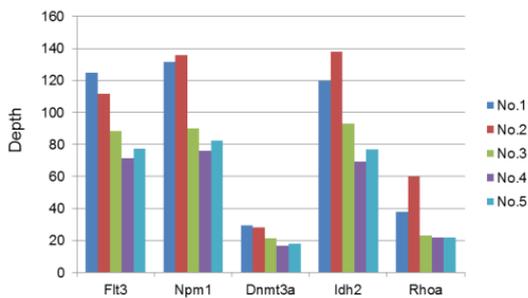


図 3 脱メチル化と *Bcl6* の発現変化

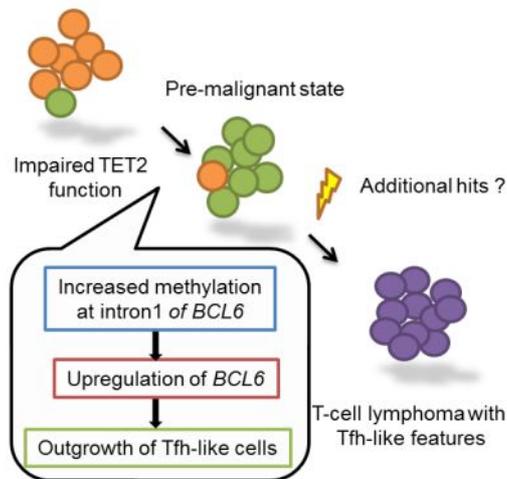
## (3) *Tet2<sup>gt/gt</sup>* マウスに生じたリンパ腫細胞における additional hit の解析

正常対照とリンパ腫細胞のゲノムを得ることができた 1 個体において次世代シーケンサーを用いて網羅的変異解析を行った。13 個の候補遺伝子が抽出され、Sanger 法による validation を行った結果、*Cadm2*, *Angel2*, *Skint10*, *Taar5*, *Bcl6* の 5 遺伝子の変異を特定した。腫瘍のゲノムのみ得る事が出来た別の 4 個体を用いて、上記 5 遺伝子の変異を確認したが、recurrent mutation は認められなかった。また、ヒトでは *TET2* と共存して見られる変異として、骨髄系腫瘍では *Flt3*, *Npm1*, T 細胞性リンパ腫では *Dnmt3a*, *Rhoa*, *IDH2* の変異が知られている。これらの遺伝子変異が存在するかどうか、前述の 5 個体においてそれぞれの遺伝子について deep sequencing を行った(図 4)。結果、上述の遺伝子変異は認められなかった。*Tet2<sup>gt/gt</sup>* マウスに生じた T 細胞性リンパ腫は既に知られている特定の遺伝子変異の関与の可能性は低く、腫瘍発症までの中央値が 67 週齢と長期間を要したことから、複数の遺伝子変異が蓄積することにより発症している可能性が高いものと推測した。



**図 4 deep sequencing による各遺伝子の depth**

以上の解析結果を通じ, *Tet2* knockdown マウスでは, Tfh 様細胞の特徴を持った T 細胞性リンパ腫を発症する際に, Tfh 細胞の主要転写因子である *Bcl6* の intron 1 の高メチル化を来すことにより, Tfh 様細胞が増殖する前がん状態となり, 時間の経過とともに不特定の additional hit が蓄積して腫瘍化に至るというメカニズムが推定された(図 5)。



**図 5 summary**

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. TET2 as a gatekeeper for hematologic malignancies. *Rinsho Ketsueki*. 2015;56:651-656. 査読あり
2. Muto H, Sakata-Yanagimoto M, Nagae G, et al. Reduced TET2 function leads

to T-cell lymphoma with follicular helper T-cell-like features in mice. *Blood Cancer J*. 2014;4:e264. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 西澤翔子, 坂田(柳元)麻実子, 武藤秀治, 榎並輝和, 松原(中本)理恵, 野口雅之, 中村直哉, 千葉滋. ヒト末梢性 T 細胞リンパ腫において BCL6 領域が抗メチル化されている. 第 74 回日本癌学会学術総会. 名古屋国際会議場(名古屋市). 2015 年 10 月 17 日.
2. 西澤翔子, 坂田(柳元)麻実子, 武藤秀治, 榎並輝和, 松原(中本)理恵, Tran Nguyen, 野口雅之, 中村直哉, 千葉滋. BCL6 locus is hypermethylated in human peripheral T-cell lymphomas. 第 77 回日本血液学会学術総会. 石川県立音楽堂, 他(金沢市). 2015 年 10 月 17 日.
3. Hideharu Muto, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yusuke Shiozawa, Terukazu Enami, Naoshi Obara, Seishi Ogawa, and Shigeru Chiba. Genetic Analysis of T-cell Lymphoma Developed in TET2 Knockdown Mice. 第 76 回日本血液学会総会. 大阪国際会議場(大阪市). 2014 年 11 月 2 日.
4. Hideharu Muto, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Yusuke Shiozawa, Terukazu Enami, Naoshi Obara, Seishi Ogawa, and Shigeru Chiba. Genetic Analysis of T-cell Lymphoma Developed in TET2 Knockdown Mice. 第 73 回日本癌学会総会. パシフィコ横浜(横浜市). 2014 年 9 月 26 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 秀治 (Mutou Hideharu)

筑波大学医学医療系血液内科講師

研究者番号：50709194