

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15497

研究課題名（和文）T細胞リンパ腫の支持環境細胞クローン進化の解析

研究課題名（英文）Clonal evolution of tumor-infiltrating cells in T-cell 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・准教授

研究者番号：80451805

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000 円

研究成果の概要（和文）：T細胞リンパ腫のゲノム異常解析の結果にもとづいて、T細胞リンパ腫は「多段階的発がん」により発症するという説を提唱した。すなわち、造血の未分化な細胞にエピゲノム調節を行うTET2遺伝子に機能欠損型変異が生じることによって「前がん細胞」となる。さらに、前がん細胞がRHOA遺伝子変異を獲得することによって、腫瘍を発症すると考えられる。本研究では、前がん細胞から発生した「支持環境細胞」が腫瘍発症に重要であることを示すマウスモデルを作製した。これにより、T細胞リンパ腫においてゲノム異常が多段階かつ多系統に生じることが腫瘍発症の鍵となるということが実験的にも示された。

研究成果の概要（英文）：We previously identified that multistep acquisition of mutations are the important mechanisms for T-cell lymphomas. Mutations in TET2 gene, encoding an epigenetic modifier are the key for evolution of premalignant cells. The RHOA mutations are the driver for development of T-lineage tumor cells from premalignant cells. In this study, we established a mouse model showing that the tumors are supported by tumor-infiltrating cells evolved from premalignant cells.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：T細胞リンパ腫 TET2

## 1. 研究開始当初の背景

T細胞リンパ腫は、成熟Tリンパ球を由来とする血液がんであると考えられてきた。しかしながら、申請者はT細胞リンパ腫のゲノム解析研究に基づいて、T細胞リンパ腫の発生の過程では、造血の未分化な細胞に遺伝子変異が生じることで「前がん細胞」となり、さらに前がん細胞が「腫瘍特異的な遺伝子変異」を獲得することによりT細胞リンパ腫に進化するという「多段階的発がん」により発症するという説を提唱した。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 (Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: AITL)では、前がん細胞の発生にはエピゲノム調節を行う *TET2* 遺伝子変異、腫瘍特異的変異としては *RHOA* 遺伝子変異を同定した ( Sakata-Yanagimoto, Nature Genetics 2014 )。

一方、T細胞リンパ腫の腫瘍組織では、腫瘍細胞に加えて、多彩な免疫細胞が浸潤している。これらの細胞は腫瘍細胞を支持する環境を形成し、腫瘍の増殖をサポートする「支持環境細胞」として機能すると考えられる。これらの細胞浸潤は、腫瘍細胞から出されるサイトカインやケモカインによる「反応性変化」と捉えられてきた。しかしながら、申請者らはレーザーマイクロダイセクション法により腫瘍組織に浸潤する免疫細胞を抽出し、遺伝子変異の有無を調べたところ、前がん変異である *TET2* 変異は腫瘍細胞に加えて浸潤するB細胞にも検出されるという結果を得た。さらには、*NOTCH1* 変異は浸潤するB細胞にのみ検出され、腫瘍細胞には検出されないという極めて興味深い所見を得た。

## 2. 研究の目的

これまでの結果から、「前がん細胞」から分化した多様な免疫細胞は、段階的に遺伝子変異を獲得して独自のクローン進化を遂げており、これらが腫瘍の「支持環境細胞」となって、腫瘍細胞の生存に有利な環境を作り

出している可能性がある。本研究では、「支持環境細胞」のクローン進化に焦点をあて、「クローン進化した「支持環境細胞」自体が腫瘍細胞を支持する仕組み」を明らかにする。

「前がん細胞」から「支持環境細胞」へのクローン進化には、*TET2* 変異によるエピゲノム異常が重要な働きをもつ可能性がある。そこで、*TET2* 変異によるエピゲノム異常および「支持環境細胞」特異的遺伝子変異を模倣した遺伝子改変マウスを用いることにより、「支持環境細胞」独自のクローン進化におけるT細胞リンパ腫形成への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

腫瘍細胞と支持環境細胞のそれぞれに生じるゲノム異常を再現するモデルマウスを作製した。

用いたマウスは以下のものである。

*Tet2<sup>flox/flox</sup>* マウス *Tet2*コンディショナルノックアウトマウス

Mx-Cre マウス

pl:pC 投与により血液細胞全般に CRE リコンビナーゼを発現するマウス。

CD4-Cre マウス

T細胞全般に CRE リコンビナーゼを発現するマウス。

CD2-G17V *RHOA* トランスジェニックマウス (Tg)

T細胞全般にヒトの腫瘍でみいだされた G17V *RHOA* 変異を発現するトランスジェニックマウス。

これらのマウスを交配し、組み合わせることにより、以下のようなモデルマウスを作成した。

(A) 「支持環境細胞および腫瘍細胞における多系統変異モデル」：支持環境細胞とT細胞の双方で *Tet2* を欠損し、T細胞で G17V *RHOA* 変異を発現するマウス (*Mx-Cre-Tet2<sup>flox/flox</sup> × CD2-G17V *RHOA* Tg*)

(B) 「腫瘍細胞特異的変異モデル」：支持環

境細胞では異常はなく、T細胞でのみに *Tet2* を欠損、かつ G17V RHOA 変異体を発現するマウス (*CD4-Cre-Tet2<sup>flox/flox</sup> × CD2-G17V RHOA Tg*) (C)「クローン性造血モデル」：血液細胞全般で *Tet2* を欠損するマウス (*Mx-Cre-Tet2<sup>flox/flox</sup>*)

#### 4. 研究成果

4-1. T細胞リンパ腫のゲノム異常のモデルにより、マウスにおけるT細胞リンパ腫発症およびこれによる生存は以下のように異なっていた(図1)

(A)「支持環境細胞および腫瘍細胞における多系統変異モデル」(*Mx-Cre-Tet2<sup>flox/flox</sup> × CD2-G17V RHOA Tg*)

多様な免疫細胞の浸潤を伴うT細胞リンパ腫様の腫瘍を生後40週頃から次第に発症して死亡するとともに、多様なサイトカインの顕著な増加がみられる(図2)。

(B)「腫瘍細胞特異的変異モデル」(*CD4-Cre-Tet2<sup>flox/flox</sup> × CD2-G17V RHOA Tg*)

T細胞リンパ腫を発症せず、(A)に比較して生存期間は有意に延長する。

(C)「クローン性造血モデル」(*Mx-Cre-Tet2<sup>flox/flox</sup>*)

観察期間には一部が骨髄系腫瘍を発症して死亡するものの、AITLの発症はみられない。

このことから、腫瘍細胞側のゲノム異常のみではT細胞リンパ腫は発症せず、支持環境細胞のゲノム異常に発端する機能異常はT細胞リンパ腫の発症に何らかの役割を果たしていると考えられる。

さらには、(A)マウスの結果から、T細胞におけるG17V RHOA変異体の発現は腫瘍化に重要であるとともに、サイトカインストームが *in vivo* で生じることを支持する。

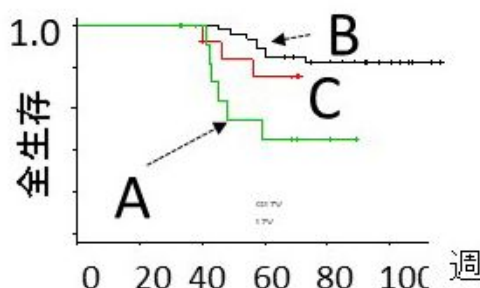


図1 T細胞リンパ腫のゲノム異常モデルマウスの生存率



図2「支持環境細胞および腫瘍細胞における多系統変異モデル」マウスにおけるサイトカインプロファイル

#### 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 15 件)

1. Tanzima Nuhath S, Sakata-Yanagimoto M, Komori D, Hattori K, Suehara Y, Fukumoto K, Fujisawa M, Kusakabe M, Matsue K, Wakamatsu H, Shimadzu M, Chiba S. Droplet digital polymerase chain reaction assay and peptide nucleic acid-locked nucleic acid clamp method for RHOA mutation detection in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 109(5):1682-1689, 2018. doi: 10.1111/cas.13557.

2. Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Nanmoku T, Itoh T, Kaji D, Yamamoto G, Abe Y, Narita K, Takeuchi M, Matsue K, Sato T, Noguchi M, Baba N, Sakamoto T, Kusakabe M, Kurita N, Kato T, Yokoyama Y, Nishikii H, Obara N, Hasegawa Y, Chiba S. Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma. *Haematologica.* 103(6):e241-e244, 2018. doi: 10.3324/haematol.2017.178830.

3. Hirasawa N, Sakata-Yanagimoto M, Nannya Y, Hattori K, Suehara Y, Kato T, Yokoyama Y, Kurita N, Obara N, Ogawa S, Hasegawa Y, Chiba S. Relationship between clinical features and somatic gene mutations in myelodysplastic syndrome. *Rinsho Ketsueki.* 59(1):80-83, 2018. doi: 10.11406/rinketsu.59.80.

4. Maie K, Yokoyama Y, Yano Y, Kato T, Nannya Y, Ogawa S, Noguchi M,

Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Progression to polythythemia vera from familial thrombocytosis with germline JAK2 R867Q mutation. *Ann Hematol.* 97(4):737-739, 2018. doi: 10.1007/s00277-017-3209-1.

5. Fujisawa M, Chiba S, Sakata-Yanagimoto M. Recent Progress in the Understanding of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *J Clin Exp Hematop.* 57(3):109-119, 2017. doi: 10.3960/jslirt.17019.

6. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Suehara Y, Yokoyama Y, Kato T, Kurita N, Nishikii H, Obara N, Takano S, Ishikawa E, Matsumura A, Hasegawa Y, Chiba S. Clinical significance of disease-specific MYD88 mutations in circulating DNA in primary central nervous system lymphoma. *Cancer Sci.* 109(1):225-230, 2018. doi: 10.1111/cas.13450.

7. Fukumoto K, Nguyen TB, Chiba S, Sakata-Yanagimoto M. Review of the biologic and clinical significance of genetic mutations in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Cancer Sci.* 109(3):490-496, 2018. doi: 10.1111/cas.13393.

8. Fujisawa M, Sakata-Yanagimoto M, Nishizawa S, Komori D, Gershon P, Kiryu M, Tanzima S, Fukumoto K, Enami T, Muratani M, Yoshida K, Ogawa S, Matsue K, Nakamura N, Takeuchi K, Izutsu K, Fujimoto K, Teshima T, Miyoshi H, Gaulard P, Ohshima K, Chiba S. Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leukemia.* 32(3):694-702, 2018. doi: 10.1038/leu.2017.273.11.

9. Sakata-Yanagimoto M, Nakamoto-Matsubara R, Komori D, Nguyen TB, Hattori K, Nanmoku T, Kato T, Kurita N, Yokoyama Y, Obara N, Hasegawa Y, Shinagawa A, Chiba S. Detection of the circulating tumor DNAs in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Ann Hematol.* 96(9):1471-1475, 2017. doi: 10.1007/s00277-017-3038-2.

10. Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Asabe Y, Matsubara D, Kano J, Yoshida K, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Izutsu K, Nakamura N, Takeuchi K, Miyoshi H, Ohshima K, Minowa T, Ogawa S, Noguchi M, Chiba S. Identification of cell-type-specific mutations in nodal T-cell lymphomas. *Blood Cancer J.* 7(1):e516, 2017. doi: 10.1038/bcj.2016.122.

11. Nishizawa S, Sakata-Yanagimoto M,

Hattori K, Muto H, Nguyen T, Izutsu K, Yoshida K, Ogawa S, Nakamura N, Chiba S. BCL6 locus is hypermethylated in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Int J Hematol.* 105(4):465-469, 2017. doi: 10.1007/s12185-016-2159-z.

12. Hattori K, Sakata-Yanagimoto M, Okoshi Y, Goshima Y, Yanagimoto S, Nakamoto-Matsubara R, Sato T, Noguchi M, Takano S, Ishikawa E, Yamamoto T, Matsumura A, Chiba S. MYD88 (L265P) mutation is associated with an unfavourable outcome of primary central nervous system lymphoma. *Br J Haematol.* 177(3):492-494, 2017. doi: 10.1111/bjh.14080.

13. Nagao R, Kikuti YY, Carreras J, Kikuchi T, Miyaoka M, Matsushita H, Kojima M, Ando K, Sakata-Yanagimoto M, Chiba S, Nakamura N. Clinicopathologic Analysis of Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma With or Without RHOA G17V Mutation Using Formalin-fixed Paraffin-embedded Sections. *Am J Surg Pathol.* 40(8):1041-50, 2016. doi: 10.1097/PAS.0000000000000651.

14. Sakata-Yanagimoto M, Yokoyama Y, Muto H, Obara N, Kurita N, Kato T, Hasegawa Y, Miyazaki Y, Kurokawa M, Chiba S. A nationwide survey of co-occurrence of malignant lymphomas and myelodysplastic syndromes/myeloproliferative neoplasms. *Ann Hematol.* 95(5):829-30, 2016. doi: 10.1007/s00277-016-2612-3.

15. Yoshida N, Miyoshi H, Kato T, Sakata-Yanagimoto M, Niino D, Taniguchi H, Moriuchi Y, Miyahara M, Kurita D, Sasaki Y, Shimono J, Kawamoto K, Utsunomiya A, Imaizumi Y, Seto M, Ohshima K. CCR4 frameshift mutation identifies a distinct group of adult T cell leukaemia/lymphoma with poor prognosis. *J Pathol.* 238(5):621-6, 2016. doi: 10.1002/path.4699.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. The role of RHOA mutations in T-cell lymphomas, 口頭(招待), Mamiko Sakata-Yanagimoto, 10th Annual T-cell Lymphoma Forum 2018, 2018/2/2, 国外
2. A new understanding of angioimmunoblastic T-cell lymphoma by integrating its genomics and biology, 口頭(招待), Mamiko Sakata-Yanagimoto, The 14th Japanese-Korean Lymphoreticular Workshop, 2018/1/27, 国内(国際シンポジウム)
3. 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫におけるトランスレーショナルリサーチ, 口頭,

藤澤 学, 坂田(柳元)麻実子, Tran B. Nguyen, 千葉 滋, 第22回 造血器腫瘍研究会, 2018/1/26, 国内

4. Targeting T-Cell Receptor Signaling Pathway in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma, 口頭, Tran B. Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Manabu Fujisawa, Shigeru Chiba, The American Society of Hematology 59th Annual Meeting and Exposition, 2017/12/11, 国外

5. Liquid Biopsy for the Identification of Intravascular Large B-Cell Lymphoma, 口頭, Yasuhito Suehara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Keiichiro Hattori, Yoshiaki Abe, Kentaro Narita, Masami Takeuchi, Kosei Matsue, Takayoshi Itoh, Daisuke Kaji, Go Yamamoto, Toru Nanmoku, Naoko Baba, Manabu Kusakabe, Tatsuhiko Sakamoto, Naoki Kurita, Yasuhisa Yokoyama, Hidekazu Nishikii, Yuichi Hasegawa, Naoshi Obara, Shigeru Chiba, The American Society of Hematology 59th Annual Meeting and Exposition, 2017/12/10, 国外

6. Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma, 口頭, 藤澤 学, 坂田(柳元)麻実子, 福本浩太, 小森大輔, 西澤翔子, 桐生真依子, 榎並輝和, 村谷匡史, 吉田健一, 小川誠司, 末永孝生, 中村直哉, 竹内賢吾, 伊豆津宏二, 藤本勝也, 豊嶋崇徳, 三好寛明, 大島孝一, 千葉 滋, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/20, 国内

7. Targeted sequencing of primary central nervous system lymphoma (PCNSL), 口頭, 服部圭一朗, 坂田(柳元)麻実子, 末原泰人, 横山泰久, 加藤貴康, 栗田尚樹, 小原 直, 長谷川 雄一, 千葉 滋, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/20, 国内

8. Combination of Tet2 loss-of-function and RHOAG17V expression leads to T-cell lymphoma in mice, 口頭, Tran B. Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Manabu Fujisawa, Shigeru Chiba, 第79回日本血液学会学術集会, 2017/10/20, 国内

9. A novel function of the G17V RHOA mutant in angioimmunoblastic T-cell lymphoma, 口頭(招待), 坂田(柳元)麻実子, 藤澤 学, B. Ngyuen Tran, 千葉 滋, 第76回日本癌学会学術総会, 2017/9/30, 国内

10. Genetic evidence implying the common precursor cells for primary and systemic relapsed tumors in PCNSL, 口頭, 服部圭一朗, 坂田(柳元)麻実子, 末原泰人, 横山泰久, 加藤貴康, 栗田尚樹, 小原 直, 長谷川雄一, 千葉 滋, 第76回日本癌学会学術

総会, 2017/9/30, 国内

11. Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma, 口頭, 藤澤 学, 坂田(柳元)麻実子, 福本浩太, 村谷匡史, 吉田健一, 小川誠司, 末永孝生, 中村直哉, 三好寛明, 大島孝一, 千葉 滋, 第76回日本癌学会学術総会, 2017/9/29, 国内

12. Role of Tet2 and RHOAG17V mutations in Angioimmunoblastic T-cell lymphoma, ポスター, Tran B. Nguyen, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Manabu Fujisawa, Shigeru Chiba, 第76回日本癌学会学術総会, 2017/9/28, 国内

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: VAV ファミリーに属する癌原遺伝子タンパク質のリン酸化で同定される腫瘍の治療剤

発明者: 千葉滋、柳元麻実子

権利者: 国立大学法人筑波大学

種類:

番号: 特願 2016-215521

出願年月日: 2016/11/2

国内外の別: 国内

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

坂田(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: 80451305

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

千葉 滋 (CHIBA, Shigeru)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号: 60212049

(4)研究協力者

該当なし