様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月 １７ 日現在

機関番号：１２１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６１４０７

研究課題名（和文）エピゲノム異常を発端とする濾胞性ヘルパーT細胞の腫瘍化機序の解明

研究課題名（英文）Epigenetic mechanisms of development of follicular helper-T like tumors

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）　　3,800,000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、濾胞性ヘルパーT細胞に類似した性質をもち、エピゲノム調節因子をコードするTET2変異が高頻度にみられる。本研究ではTet2遺伝子改変マウスとヒトAITLサンプルの解析を組み合わせることにより、AITLの発症メカニズムを明らかにした。Tet2遺伝子改変マウスは濾胞性ヘルパーT細胞の性質をもつリンパ腫を発症し、これにはBCL6領域の異常メチル化が関与していた。さらに、ヒトAITLサンプルには、TET2変異に加えてRHOA変異を高頻度に認めた。すなはち、TET2変異にはじまる多段階的ゲノム異常によりAITLを発症することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is a hematologic malignancy. AITL tumor cells have features of follicular helper T cells. Loss-of-function mutations in TET2, encoding an epigenetic regulator, are frequently found in AITL samples. We clarified mechanisms of AITL development using a lymphoma model in Tet2 gene-trap mice, and genomic analysis of human AITL. TET2 gene-trap mice developed lymphoma having features of follicular helper T cells, accompanying hypermehtylation of silencer of Bcl6. We also identified RHOA mutations as well as TET2 mutations in 70% of AITL samples.

研究分野：血液がんの発症メカニズム

キーワード：lymphoma　RHOA　TET2

１．研究開始当初の背景

(1) 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(AITL)における濾胞性ヘルパーT 細胞との関係

AITL は、進行期で発見されることが多く、リンパ節腫脹、免疫γグロブリン高値、免疫不全の合併、再発難治性の経過を特徴とする悪性リンパ腫の一型である。遺伝子発現プロファイルの研究から、濾胞性 T 細胞リンパ球を起源とすると考えられてきた。免疫染色では 60-100%の症例では腫瘍細胞は CD10 陽性・PD1 陽性・CXCR13 陽性であり、PD1 はヒト・マウス共通の濾胞性ヘルパーT 細胞のマーカーとされる。

(2) AITL における *TET2* 遺伝子変異

プロモーター領域のシトシンメチル化は重要なエピゲノム制御機構であり、主として遺伝子発現を抑制するメカニズムとして知られている。TET2 はメチル化シトシン(mC)をヒドロキシメチル化シトシン(hmC)に変換する酵素である。hmC がさらに受動的、あるいは能動的に取り去られてシトシンに置換されることによるシトシンの脱メチル化、あるいは hmC 自体の存在により、遺伝子発現が変化すると考えられているが、十分には明らかにされていない。2009 年以降 *TET2* 遺伝子には骨髄系腫瘍において高頻度に機能欠損型変異を認めることが報告され、さらにリンパ系腫瘍、中でも AITL においては極めて高頻度に変異を認めることが報告された。したがって、TET2 は骨髄系およびリンパ系（とりわけ AITL）の双方において、重要な腫瘍メカニズムであると考えられる。一方、*TET2* 遺伝子変異は多様な腫瘍でみられるということから、*TET2* 遺伝子変異のみではどのような腫瘍が発症するかを決めておらず、二次的なゲノム異常が想定されるが、これの違いは明らかではなかった。

２．研究の目的

濾胞性ヘルパーT 細胞が腫瘍化するメカニズムを以下の点から明らかにする。

(1) 濾胞性ヘルパーT 細胞の腫瘍化にかかわる TET2 欠損による エピゲノム異常の解析

非腫瘍マウスおよび腫瘍マウスにおいて、TET2 欠損マウスとコントロールマウスの CD4 陽性細胞をソートし、ゲノムを抗メチル化、抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体で免疫沈降後、シークエンス解析を行うことで、エピゲノム修飾パターンの変化を明らかにする。

(2) 濾胞性ヘルパーT 細胞の腫瘍化にかかわる TET2 欠損による ゲノム異常の解析

研究の背景に述べたように、*TET2* 変異は多様な造血器腫瘍でみられることから、TET2 機能異常のみで AITL 発症を説明することはできない。そこで、ヒト AITL サンプル、および *Tet2* 遺伝子改変マウスにおけるリンパ腫モデルを用いて、Tet2 異常に付加的に生じるゲノム異常の集積によるリンパ腫発症までの病態を明らかにする。

３．研究の方法

(1) Tet2 ジーントラップマウス(*Tet2*$^{gt/gt}$)を用いた T 細胞腫瘍発症の観察

(2) *Tet2*$^{gt/gt}$ マウスにおいて発症したリンパ腫における遺伝子発現およびエピゲノム修飾の網羅的解析

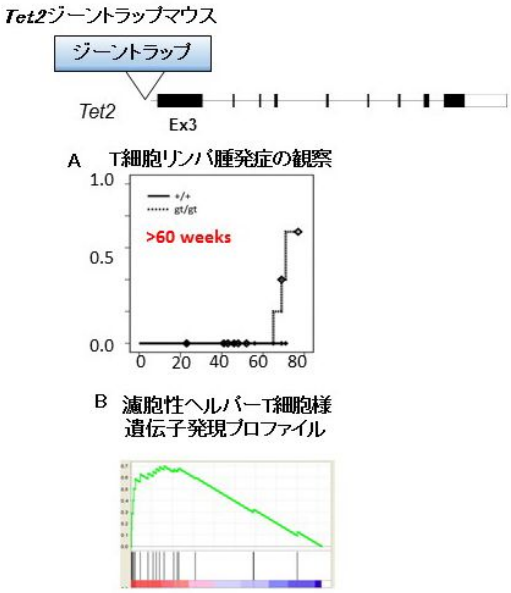
(2) *Tet2*$^{gt/gt}$ マウスにおいて、濾胞性ヘルパーT 細胞の性質をもつリンパ腫発症に至る際の段階的な全エクソーム解析、およびヒト AITL におけるエクソーム解析結果との比較

４．研究成果

(1) *Tet2*$^{gt/gt}$ マウスでは、高齢になって濾胞性ヘルパーT 細胞の性質をもったリンパ腫が発症する（図 1)。

Tet2$^{gt/gt}$ マウス成体における解析を行った。*Tet2* 遺伝子発現が 20%程度に低下しており、これに伴ってヒドロキシメチル化シトシンは 50%程度に低下している。このマウスでは、濾胞性ヘルパーT 細胞に類似した細胞が加齢とともに次第に増加し、超高齢になってからリンパ腫を発症するということを見いだした。

図1 T細胞リンパ腫のゲノム異常を再現するマウスの作製



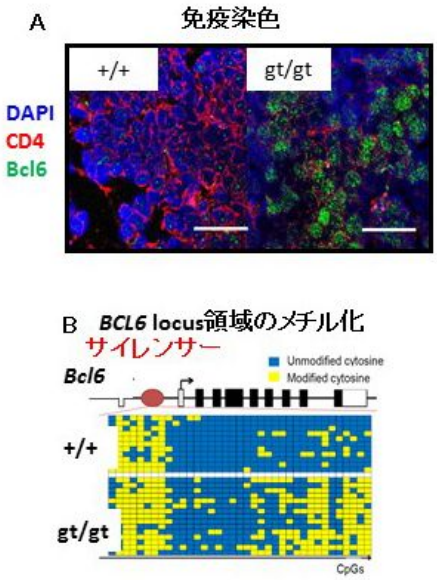
(2) *Tet2*$^{gt/gt}$マウスに発症するリンパ腫では、*BCL6* 遺伝子の発現調節領域のメチル化を伴った発現上昇がみられる(図 2)。

BCL6はB細胞の生存に重要な転写因子として以前より知られていたが、濾胞性ヘルパー細胞の分化運命決定因子としても働くことが近年報告された。*TET2*$^{gt/g}$マウスに発生するT細胞リンパ腫の網羅的遺伝子発現・メチル化解析の結果、*BCL6* の高発現および *BCL6* のサイレンサーとして働くことが知られる intron1 領域の高メチル化がみられることを見いだした。またマウスのT細胞リンパ腫細胞株であるEL4細胞では、*BCL6*の発現が高く、かつ *BCL6* 領域が高メチル化しており、メチル化阻害剤であるデシタビンの添加により *BCL6* 領域のメチル化が低下するのに伴って、*BCL6*の発現は低下することを明らかにした。

BCL6 の intron1 の配列はヒトとマウスで極めて保存されている。そこで、ヒト AITL あるいは AITL 関連リンパ腫、およびコントロールとして B 細胞リンパ腫においても、*BCL6* 領域のメチル化を調べた。ヒト AITL あるいはAITL関連リンパ腫では、B細胞リンパ腫に比較して有意に *BCL6* 領域の高メチル化がみられるサンプルが多かった。

これらの結果から、*TET2* 異常により *BCL6* 領域の高メチル化が生じ、これによる *BCL6* の高発現が生じる。その結果、濾胞性ヘルパーT 細胞への分化誘導、最終的には腫瘍化が生じると推測される。

図2 Tet2ジーントラップマウスのリンパ腫における BCL6の発現亢進とBCL6のサイレンサーのメチル化



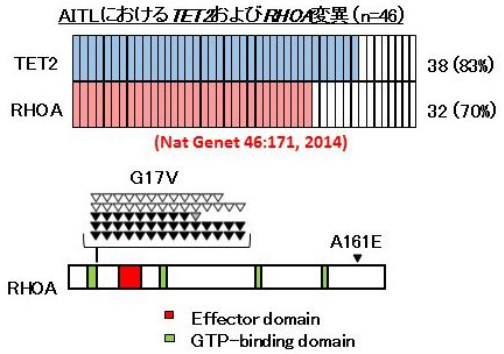
(3)ヒト AITL におけるゲノム解析により、*TET2* 遺伝子変異に加えて *RHOA* 遺伝子変異がみられることを明らかにした(図 3)。

ヒト末梢性T細胞リンパ腫159例の遺伝子変異解析により、AITL の 71%、および AITL の特徴を有する分類不能型末梢性T細胞リンパ腫(peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified: PTCL-NOS)の 62%に *RHOA* 遺伝子変異を認めた。*RHOA* 遺伝子変異は、ほとんどの症例で 17 番目のアミノ酸がグリシンからバリンに置換される変異(G17V*RHOA* 変異）であった。さらには、G17V *RHOA*変異を認める全例で *TET2*変異を認めた。また、腫瘍組織を腫瘍細胞と腫瘍ではない血液細胞に分画し、各々について遺伝子変異解析を行ったところ、*TET2*変異は腫瘍細胞と腫瘍ではない血液細胞の双方に認められ、G17V *RHOA*変異は腫瘍細胞にのみ認められた。この結果から、G17V *RHOA*変異が *TET2*遺伝子変異を有する前がん細胞を AITL 腫瘍細胞へと進化させるドライバーとなっていることが示

唆された。

TET2$^{gt/gt}$マウスに生じたT細胞リンパ腫についても発症までの潜伏期間が長いため、二次的な異常が段階的に積み重なっていることが予想される。*TET2*$^{gt/gt}$マウスに生じたリンパ腫では *RHOA* 変異はみられなかった。そこで、別のタイプの異常が積み重なって最終的にリンパ腫を発症すると考えられた。

図3 AITLにおけるゲノム異常



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14件）

1. Truong P, Sakata-Yanagimoto M (8人中2番目), Chiba S. Age-Dependent Decrease of DNA Hydroxymethylation in Human T Cells. ***J Clin Exp Hematopathol.*** 査読有, 55(1): 1-6, 2015.

2. Chiba S, Enami T, Ogawa S, Sakata-Yanagimoto M. G17V RHOA: Genetic evidence of GTP-unbound RHOA playing a role in tumorigenesis in T cells. ***Small GTPases.*** 査読無, 6(2):100-103, 2015.

3. Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M (9人中2番目), Chiba S. Double somatic mosaic mutations in TET2 and DNMT3A-origin of peripheral T cell lymphoma in a case. ***Ann Hematol.*** 査読有, 94(7):1221-1223, 2015.

4. Ogawa S, Sakata-Yanagimoto M (13人中10番目), Chiba S. Identification of a fusion gene composed of a Hippo pathway gene MST2 and a common translocation partner ETV6 in a recurrent translocation t(8;12)(q22;p13) in acute myeloid leukemia. ***Ann Hematol.*** 査読有, 94(8):1431-1433, 2015.

5. Sakata-Yanagimoto M. Multistep tumorigenesis in peripheral T cell lymphoma. ***Int J Hematol.*** 査読有, 102 (5): 523-7, 2015.

6. Muto H, Sakata-Yanagimoto M (18人中2番目), Chiba S. Reduced TET2 Function Leads to T-cell Lymphoma with Follicular Helper T cell-like Features in mice. ***Blood Cancer J.*** 査読有, 4:e264, 2014.

7. Nakamoto-Matsubara R, Sakata-Yanagimoto M (25人中2番目), Chiba S (25人中25番目). Detection of the G17V RHOA mutation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and related lymphomas using quantitative allele-specific PCR. ***PLoS One.*** 査読有, 9(10):e109714, 2014.

8. 坂田（柳元）麻実子. 造血器腫瘍における TET2 異常. ***臨床血液.*** 査読無, (55) 10：1893-1902, 2014.

9. Kato T, Sakata-Yanagimoto M (17人中2番目), Chiba S. Hes1 suppresses acute myeloid leukemia development through FLT3 repression. ***Leukemia.*** 査読有, 29(3):576-85, 2014.

10. Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yokoyama Y, Chiba S. Disease-specific mutations in mature lymphoid neoplasms: Recent advances. ***Cancer Sci.*** 査読有, 105 (6): 623-629, Jun, 2014.

11. Sakata-Yanagimoto M* (36人中1番目), Enami T*, Yoshida K*, Ogawa S, Chiba S (36人中36番目). Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. ***Nat Genet.*** 査読有, 46 (2): 171-175, 2014.*Equal contribution.

12. Sakamoto T, Obara N, Kurita N,

Sakata-Yanagimoto M (9人中4番目), Chiba S. Effectiveness and safety of rabbit anti-thymocyte globulin in Japanese patients with aplastic anemia. ***Int J Hematol.*** 査読有, 98(3):319-22, 2013.

13. Kon A, Sakata-Yanagimoto M (41人中27番目), Chiba S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. ***Nat Genet.*** 査読有, 45(10):1232-7, 2013.

14. 坂田（柳元）麻実子, 千葉　滋. 造血器腫瘍におけるシトシンのヒドロキシメチル化修飾異常. ***臨床血液.*** 査読無, 54（5）：423-430, 2013.

〔学会発表〕（計10件）

[招待講演]

1. 坂田（柳元）麻実子. 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫における RHOA 変異. 第 104 回日本病理学会総会"コンパニオンミーティングT細胞リンパ腫における最新の進歩", 名古屋国際会議場（名古屋市）, 2015/5/1.

2. Sakata-Yanagimoto M. Clonal evolution of T-cell lymphoma. 9thUS-JAPAN Meeting on Malignant Hematopoiesis and Stem Cells. Waikoloca, HI, USA, 2015/3/16-17.

3. Sakata-Yanagimoto M. Somatic RHOA Mutation in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma. The 30th Nagoya International Cancer Treatment Symposium, Nagoya, 2015/2/14-15.

4. Sakata-Yanagimoto M. Discrimination of mutations arising in premalignant cells and those in lymphoma cells in AITL. 7th Annual T-Cell Lymphoma Forum, San Francisco, CA, USA, 2015/1/29-31.

5. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Mutations in epigenetic and metabolic regulators in peripheral T-cell lymphoma. 第 76 回日本血液学会学術集会(JSH-JCA Joint Symposium) Metabolomics and therapeutic strategy in myeloid and other tumors, 大阪国際会議場（大阪市）, 2014/10/31-11/2.

6. 坂田（柳元）麻実子. 末梢性T細胞リンパ腫における多段階発がん, Multistep tumorigenesis in peripheral T-cell lymphoma. 第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会シンポジウム, 東京, 2014/8/30-31.

7. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. 末梢性T 細胞リンパ腫における多段階発がん. Multistep tumorigenesis in peripheral T-cell lymphoma. 第73回日本癌学会学術総会, Symposia on Specific Tumors, パシフィコ横浜（横浜市）, 2014/9/25-27

8. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫発症にいたる多段階的遺伝子異常の同定. Identification of multistep genetic abnormalities in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. 第73回日本癌学会学術総会, The Incitement Award Lectures, パシフィコ横浜(横浜市), 2014/9/25-27.

9. 坂田（柳元）麻実子. T細胞リンパ腫におけるエピゲノム経路異常. 第 2 回がんと代謝研究会シンポジウム, 東京, 2014/7/10-11.

10. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Multistep tumorigenesis in peripheral T-cell lymphoma. 6th T-cell Lymphoma Forum, San Francisco, CA, USA, 2014/1/23-25.

〔図書〕（計 2 件）

1. 高久史麿.中外医学社 ***Annual Review 血液 2015.*** P286 (p.179-185.)

2. Hughes McNagny. Humana Press. ***Mast Cells. Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology 1220.*** P540(p.79-89.)

〔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：国立大学法人筑波大学／東京大学
→ LSIP ファンド運営合同会社
種類：特許
番号：PCT/JP2014/062112
出願年月日：
2013/5/1（国内）
2014/5/1（国際）
国内外の別：国内および国際

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：80452805