

氏名	藤澤 学		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第 9569 号		
学位授与年月	令和2年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	血管免疫芽球性 T 細胞性リンパ腫における 特異的ゲノム異常を介した発症機序		
主査	筑波大学教授	博士（医学）	柳沢 裕美
副査	筑波大学教授	博士（医学）	野口 恵美子
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	松本 功
副査	筑波大学講師	博士（医学）	田原 聡子

論文の内容の要旨

藤澤学氏の博士学位論文は、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫の発症機序をゲノム異常の観点から検討したものである。その要旨は以下のとおりである。

背景と目的

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫（angioimmunoblastic T cell lymphoma, AITL）は末梢型 T 細胞リンパ腫（peripheral T-cell lymphoma, PTCL）の一亜型である。本邦における AITL の年間罹患者数は約 300 例と推定されている。しかし症例数の少なさから AITL の病態メカニズムは明らかにされていない。著者の所属する研究室は、疾患特異的 ras homologue family member A (RHOA) の変異、p.Gly17Val を同定している。しかしこの変異が AITL の発症にどのように関わるかは不明であった。G17VRHOA 変異体と特異的に複合体を形成するタンパク質として同定された VAV1 は、T cell Receptor (TCR) に必須のメディエーターである。従って VAV1 との複合体の形成が TCR シグナル経路の活性化につながる事が予想された。これらの背景を踏まえ、本研究では AITL における G17VRHOA の下流シグナルを明らかにし、AITL の発症機序の解明を行ったものである。

方法

ドキシサイクリン投与で発現が誘導される Tet-on システムとレンチウイルスを用いて、Jurkat 細胞に、野生型 RHOA、G17VRHOA 変異体、RHOA の機能亢進をきたし成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) で変異の集積として認められる C16RRHOA 変異体をそれぞれ過剰発現させて、Jurkat^{WT}、Jurkat^{G17V}、Jurkat^{C16R} を作製した。また、リポフェクション法を用いて、NFAT レポーターアッセイのための標的遺伝子を過剰発現させた。Jurkat 細胞株の解析には、ウエスタンブロット、NFAT レポーターアッセイ、RNA シークエンス解析、ダサチニブ投与実験を行った。さらに、ヒト PTCL サンプルにおいて VAV1 抗体、PDCD1 抗体を用いて多重蛍光免疫染色を行った。

結果

Jurkat^{WT}、Jurkat^{G17V}、Jurkat^{C16R} を用いて抗ヒト CD3 抗体による刺激実験を行い、VAV1 のリン酸化をウェスタンブロットで解析した。Jurkat^{G17V} は定常状態では野生型と比べて VAV1 の Y174 部位のリン酸化の亢進を認め、CD3 刺激化でさらに顕著となった。しかし Jurkat^{C16R} ではリン酸化の亢進が認められなかったことから、著者はこのリン酸化の亢進が AITL による特異的な現象であると考えた。

TCR シグナル経路において免疫制御因子の発現誘導に重要な役割を果たす NFAT 転写因子のレポーターを用いて、G17V*RHOA* 変異が NFAT 転写活性に及ぼす影響を検討した。G17V*RHOA* 変異体の過剰発現により、野生型と比較して CD3/CD28 刺激後にレポーター活性が上昇した。さらに、PTCL の新規融合遺伝子である VAV1-STAP2、VAV1-MYO1F、VAV1-S100A7 過剰発現 Jurkat 細胞を用いて、NFAT 転写活性を検討したところ、これらの融合遺伝子は野生型と比べて NFAT が亢進していることを認めた。この結果の裏付けとして、著者は G17V*RHOA* 変異体で、CD3/CD28 刺激後の IL-2 の発現上昇を認めた。

Jurkat^{G17V} を用いて、VAV1 の Y174 部位のリン酸化をマルチチロシンキナーゼ阻害剤であるダサチニブで抑制し、TCR シグナルの阻害ができるかどうかを検討した。ダサチニブの用量依存的に NFAT 活性の阻害と IL-2 の発現低下を認めた。また著者は、野生型 Jurkat^{WT} と Jurkat^{G17V} を用いて CD3/CD28 刺激後 3 時間の mRNA 発現解析を行った。Gene set enrichment analysis により、Jurkat^{G17V} では TCR シグナル経路に加え、サイトカイン- サイトカイン受容体相互作用、ケモカインシグナル経路の有意なエンリッチメントを認めた。

最後に著者は、VAV1 の活性化が AITL 腫瘍細胞で認められる現象かどうかを検証するため、26 例のヒト PTCL サンプルを用いて VAV1 リン酸化と PDCD1 の発現解析を行った。AITL12 例において、*RHOA* 変異もしくは *VAV1* 変異をもつ 8 例すべてでリン酸化 VAV1 は陽性であった。また、*RHOA* 変異もしくは *VAV1* 変異をもつ 11 例の PTCL サンプルのうち、9 例で PDCD1 とリン酸化 VAV1 が共陽性であることを見出した。

考察

本研究によって、G17V*RHOA* 変異体が VAV1 と複合体を形成することによって TCR シグナルの活性化が示され、そのことが AITL の発症に寄与していると考えられた。

審査の結果の要旨

(批評)

本研究で、著者は AITL において G17V*RHOA* 変異体が VAV1 のアダプター分子として VAV1 の機能を正に調節することを示した。VAV1 を介した TCR の活性化は、*RHOA* 変異陽性の AITL にとって重要であることを支持するものである。さらに、本研究から、ダサチニブが AITL 患者における個別化医療の治療標的になることが期待される。

令和元年 12 月 24 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。