

182. T 細胞リンパ腫の分子基盤解明と新規治療法開発研究

千葉 滋

筑波大学 医学医療系 血液内科

Key words : 悪性リンパ腫, 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫, TET2, エピゲノム, RHOA

緒 言

T 細胞リンパ腫は悪性リンパ腫の 10~20%と少ないが、一般に予後不良である¹⁾。B 細胞リンパ腫に比べ圧倒的に頻度が低い上、病態の異なる疾患の集合でもある^{1,2)}ことから、一つ一つの疾患コホートがいずれも小さい。このためもあり、概して分子病態の解析が遅れていた。著者らは、T 細胞リンパ腫の中では最も頻度の高い血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (AITL) の 70%において、small GTPase タンパク質の一つ RHOA の遺伝子に、単一アミノ酸置換変異 (G17V) が生じていることを見出し報告した³⁾。AITL の腫瘍細胞は、濾胞性ヘルパー T (Tfh) 細胞由来とされる⁴⁾。一方、末梢性 T 細胞リンパ腫 - 非特異型 (PTCL-NOS) の一部でも腫瘍細胞が Tfh 細胞様の形質を示し、これも含めると末梢性 T 細胞リンパ腫の 30~40%程度が Tfh 細胞由来と推定される^{3,5-7)}。著者らは合わせて、G17V RHOA 変異が Tfh 細胞由来リンパ腫に極めて特異的であることも報告しており³⁾、本変異の簡易診断法について特許申請している⁸⁾。一方同時に、G17V RHOA 遺伝子変異を有する T 細胞リンパ腫全例に、*Tet2* 遺伝子変異が併存していることを見出している²⁾。TET2 は DNA の脱メチル化に必須の酵素であり、変異により酵素機能が喪失すると予想される。したがって、Tfh 細胞由来 T 細胞リンパ腫の多くは、エピゲノム異常 (DNA の脱メチル化異常) と RHOA 変異に伴うシグナル異常が併存し、これが疾患の発症や特異性決定にかかわると推察される。本研究では、AITL を含む Tfh 細胞由来 T 細胞リンパ腫の分子基盤解明と、これに基づく新規治療法開発研究を目指した。

方 法

1. Tfh 細胞由来 T 細胞リンパ腫におけるゲノム異常

Tfh 細胞由来 T 細胞リンパ腫におけるゲノム異常の全体像を明らかにするため、87 例 (48 例の AITL および 39 例の PTCL-NOS) の T 細胞リンパ腫サンプルについて、情報にしたがって選択した 71 遺伝子の全エクソンを次世代シーケンサー Ion PGM を用いて解析した。さらに、得られた変異情報に基づいて、各変異がどの分化段階で生じているかを明らかにするため、標本が得られた 19 例について抗 PD1 抗体および抗 CD20 抗体で免疫染色し、それぞれの標本から陽性細胞を laser-captured microdissection (LCM) で切り出して DNA を調製し、Sanger 法および Ion PGM を用いてシーケンス解析を行った。

2. AITL モデルマウスの作製

Tfh 細胞由来 T 細胞リンパ腫、特に AITL のモデル動物作製を目的として、次のような手順でマウスを作製した。まず、CD2 プロモーター下でヒト G17V 変異 RHOA を発現するトランスジェニック・マウス (CD2-G17V/RHOA) を作製した。一方、TET2 をコンディショナルに欠失できる *Tet2^{flox/flox}* マウスを入手し、インターフェロン反応性に Cre を発現するトランスジェニック・マウス (Mx-Cre) や CD2-G17V/RHOA マウスと交配して、4 つの遺伝子型のマウスを用意した。すなわち、(i) Mx-Cre・*Tet2^{flox/flox}*・CD2-G17V/RHOA、(ii) Mx-Cre・*Tet2^{flox/flox}*、(iii) Mx-Cre・CD2-G17V/RHOA、(iv) Mx-Cre である。これらにインターフェロンを誘導する pIpC を投与して、経時的に観察した。

3. G17V 変異 RHOA 特異的結合タンパク質の同定

G17V 変異 RHOA が新規にタンパク質と結合し、これを介して細胞内にシグナル異常をもたらしている可能性を検証する目的で、次のような手法でプロテオミクス解析を行った。すなわち、ヒト T 細胞性急性リンパ性白血病細胞株である Jurkat 細胞に野生型 RHOA および G17V 変異 RHOA (いずれも FLAG タグ挿入) を発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。この免疫沈降物を TOF-MS によりスクリーニングした。

結 果

1. Tfh 細胞由来 T 細胞リンパ腫におけるゲノム異常

71 遺伝子のうち 15 遺伝子に計 39 種類の変異が見出された。AITL ですでに高頻度に変異が確認されている *Tet2*, *Rhoa*, *Idh2*, *Dnmt3A* の 4 遺伝子で変異が高頻度であった他、これら 4 遺伝子を含めて 15 遺伝子に繰り返し変異が同定された⁹⁾ (図 1)。

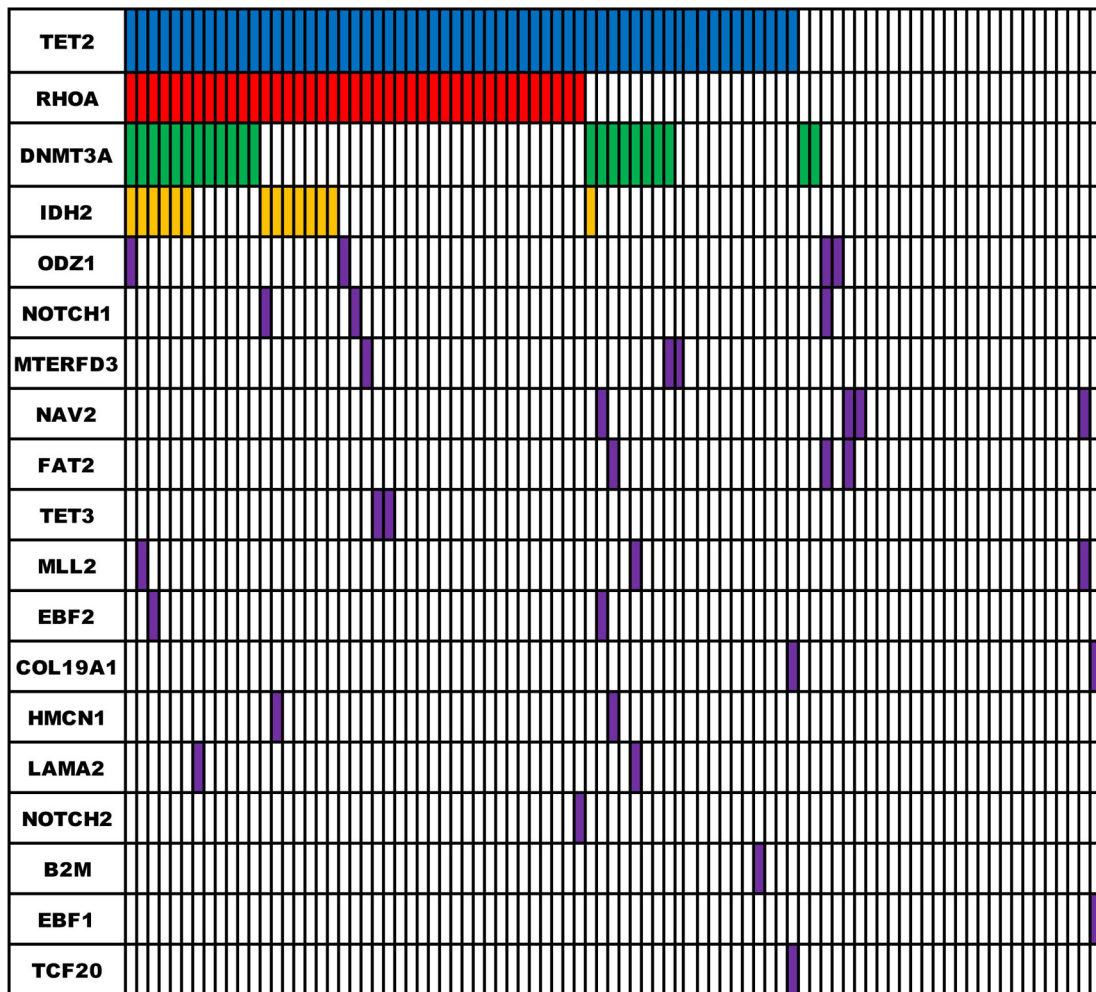


図 1. AITL/PTCL で繰り返し同定される遺伝子変異

87 例の TFH 由来 T 細胞腫瘍 (AITL および PTCL-NOS) 生検検体由来 DNA を用い、71 遺伝子の標的シーケンスを行った結果。塗りつぶされたボックスは変異があることを示す。文献 9 より一部改変。

一方、LCM を行った 19 例は、PD1 および CD20 のいずれも多数の細胞が染色された。PD1 は Tfh 細胞が特徴的に発現するタンパク質であることから、PD1 陽性細胞として切り出した画分には腫瘍細胞が濃縮されていると考えられる (図 2a)。

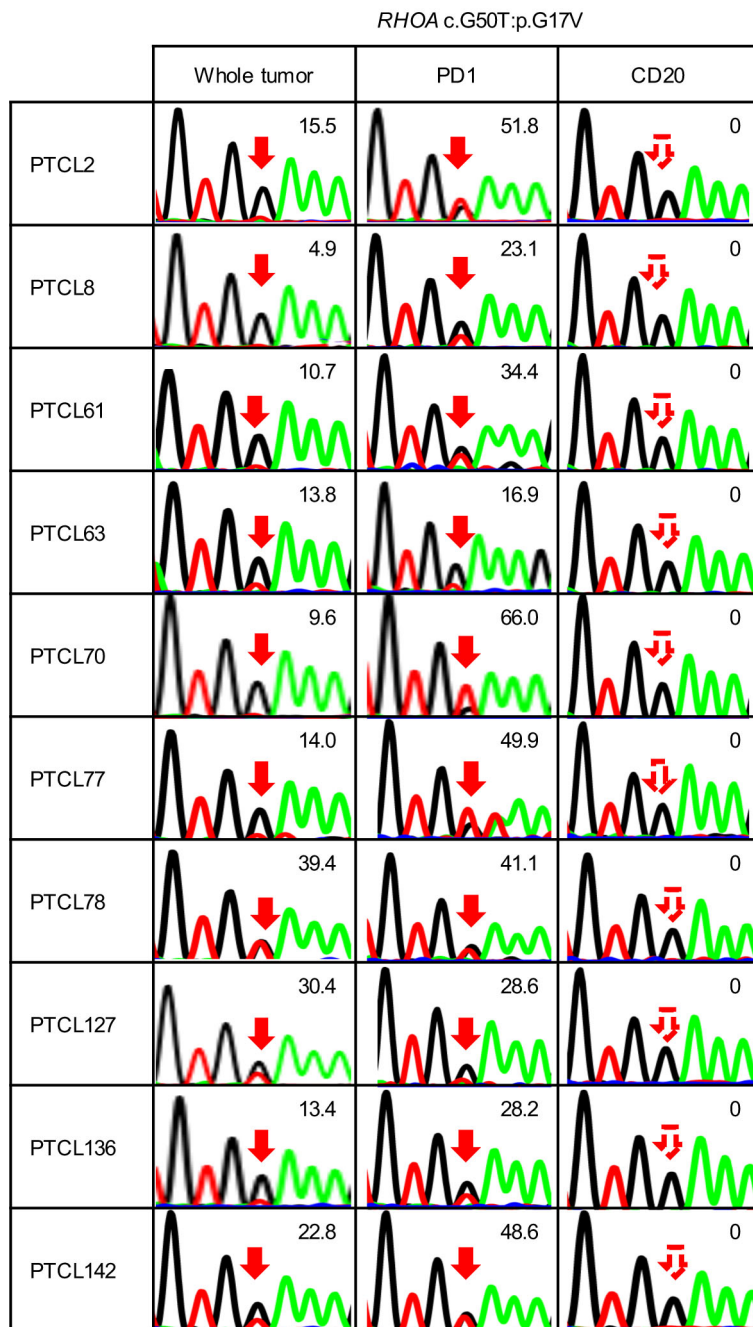


図 2a. LCM で分取した細胞集団における変異の同定

Rhoa G17V 変異。腫瘍組織由来 DNA の解析では、19 例中 10 例 4 例で同定された。これらはすべて、LCM で採取した PD1 陽性細胞由来 DNA では検出されたが、CD20 陽性細胞由来 DNA では検出されなかった。PD1 陽性細胞における変異 allele 頻度は、ほとんどのケースで腫瘍組織由来 DNA における allele 頻度より高かった。文献 9 より引用。

一方、CD20 陽性細胞として切り出した画分は B 細胞が高度に濃縮されていると考えられる。LCM シークエンスの結果、*Rhoa* 変異 (10 例) および *Idh2* (4 例) は、それぞれ全例で PD1 陽性画分だけで認められた (図 2b)。

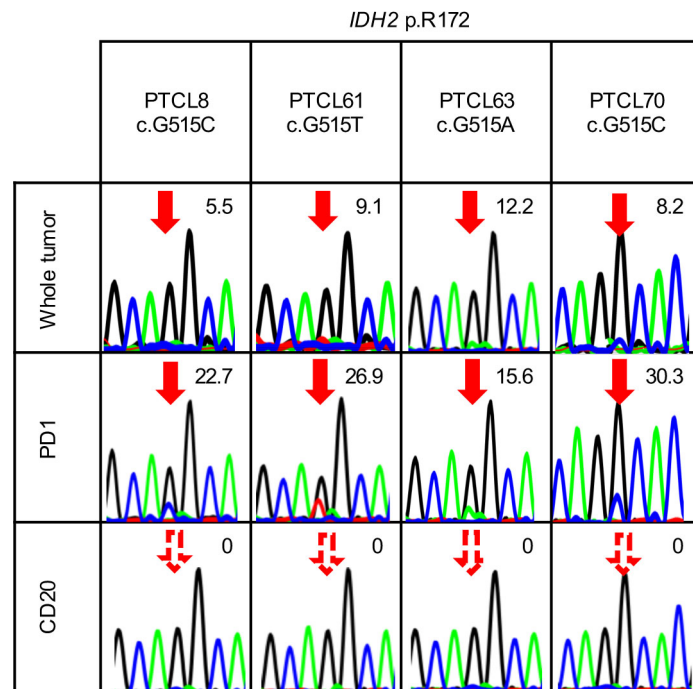


図 2b. LCM で分取した細胞集団における変異の同定

R172 *Idh2* 変異。腫瘍組織由来 DNA の解析では、19 例中 4 例で同定された。これらはいずれも LCM で採取した PD1 陽性細胞由来 DNA では検出されたが、CD20 陽性細胞由来 DNA では検出されなかった。PD1 陽性細胞における変異 allele 頻度は全例で、腫瘍組織由来 DNA における allele 頻度より高かった。

この他に 5 遺伝子の変異が、PD1 陽性画分だけで認められた⁹⁾。一方、*Tet2* 変異は 19 例中 16 例で認められ、その全例で PD1 陽性画分での変異が確認された。のみならず、16 例中 15 例では、PD1 陽性画分だけでなく CD20 陽性画分でも同じ変異が同定された。*Dnmt3A* 変異は 19 例中 7 例で認められ、うち 3 例では PD1 陽性画分だけで同定されたが、4 例では PD1 陽性画分および CD20 陽性画分の両方で同定された (図は省略)。この他 5 遺伝子の変異が、PD1 陽性および CD20 陽性のいずれの画分でも同定された (図 2c) ⁹⁾。

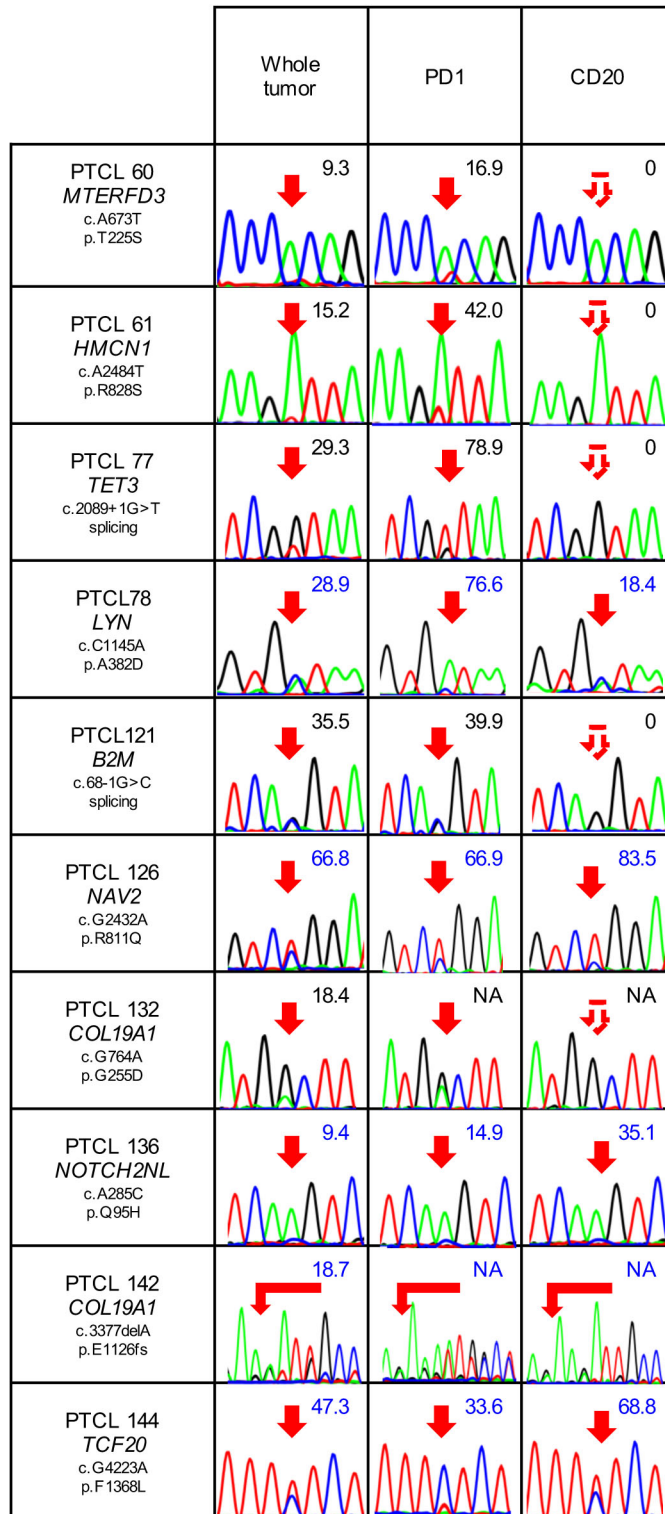


図 2c. LCM で分取した細胞集団における変異の同定

PD1 陽性細胞特異的変異、または PD1 陽性細胞/CD20 陽性細胞の両者で検出される変異。
文献 9 より引用。

興味深いことに、4 遺伝子の変異が、PD1 陽性画分では検出されず、CD20 陽性画分だけで同定された。変異 allele 頻度は、腫瘍組織由来 DNA よりも、CD20 陽性画分由来 DNA において高かった⁹⁾ことから、これらの変異は PD1 陽性の腫瘍細胞には存在せず、腫瘍組織内のクローン増殖した B 細胞に存在すると考えられた (図 2d)。

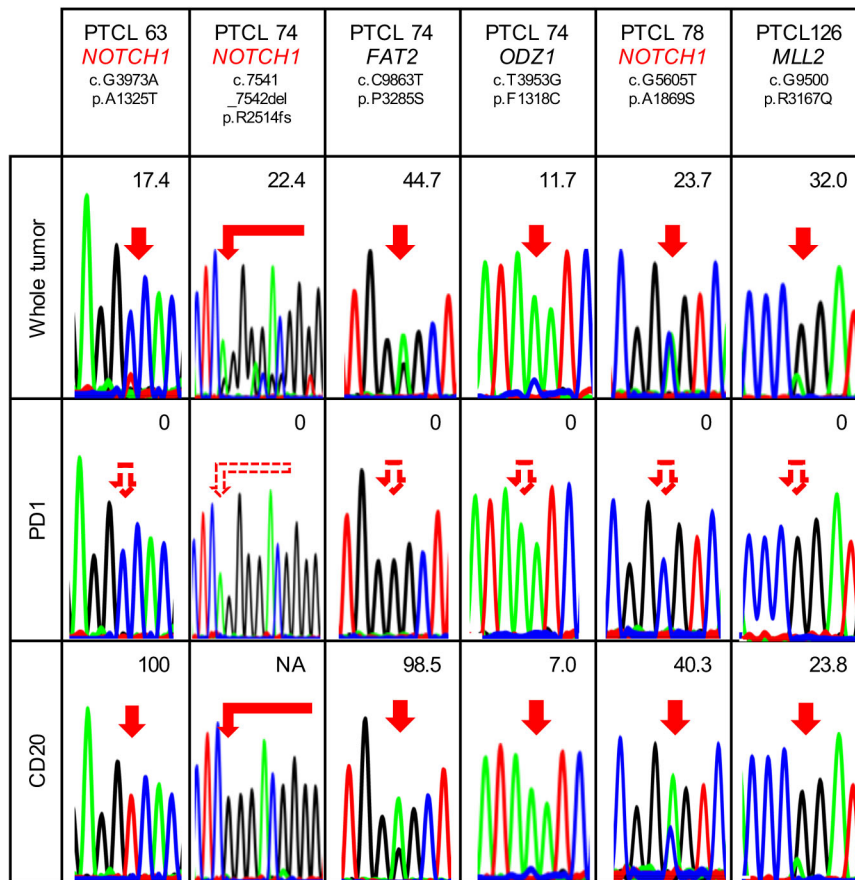


図 2d. LCM で分取した細胞集団における変異の同定

B 細胞特異的変異。4 例における 4 遺伝子について、腫瘍細胞由来 DNA で変異が認められたものの、PD1 陽性細胞由来 DNA では変異が検出されなかった。一方、CD20 陽性 B 細胞では変異が認められた。変異 allele 頻度は、3 遺伝子については 20%以上と高かった。文献 9 より引用。

2. AITL モデルマウスの作製と解析

Mx-Cre・*Tet2lox/lox*・CD2-G17V/RHOA は、pIpC 投与後約 8 ヶ月経た時点から死亡しはじめ、1 年を経た時点で約半数が死亡した。他のコントロールマウスでは 8 ヶ月時点でごく少数が死亡したに過ぎず、Mx-Cre・*Tet2lox/lox*・CD2-G17V/RHOA マウスは有意に早く死亡していた。pIpC 投与後 6 ヶ月時点で解析したところ、Mx-Cre・*Tet2lox/lox*・CD2-G17V/RHOA マウスは全例で著明なリンパ節腫大を認めた。このマウスが AITL モデルであるかどうか解析中である。

3. G17V 変異 RHOA 特異的結合タンパク質の同定

TOF-MS スクリーニングで、G17V 変異 RHOA への結合の方が、野生型 RHOA への結合より著明に強いという結果が得られたタンパク質について、western blot により validation を行った。その結果、6 タンパク質について G17V 変異 RHOA への特異的な結合が確認された。

考 察

AITL を含む T_{fh} 細胞由来 T 細胞リンパ腫の分子基盤の一端が解明された。特に、T 細胞リンパ腫においては、当然腫瘍細胞は T 細胞であるところ、腫瘍組織由来 DNA で同定された変異が、実は腫瘍細胞のみならず、概念上腫瘍細胞ではない B 細胞にも同定され得ることが明らかになった。さらに、T 細胞では同定されず、B 細胞でのみ変異が同定されるケースがあることが示された。これらは、腫瘍細胞と腫瘍組織に浸潤している炎症細胞、という古典的な概念に、新たな理解を付与する知見であると考えられる。すなわち、悪性リンパ腫が発症するにあたり、まず T 細胞や B 細胞に分化する前の前駆細胞段階で変異が生じてクローン化し、それが T 細胞や B 細胞に分化した段階の細胞が 1 つの組織を形成し、それぞれに異なるゲノム異常が生じて腫瘍病態が形成される、と考えられる。

一方、腫瘍細胞内の分子異常に基づく新規治療法開発研究を目指した。これについては、変異 RHOA 特異的に結合するタンパク質をスクリーニングすることを起点として発展可能であると考えており、実際、最初のマイルストーンである特異的結合タンパク質を同定し、解析を開始している。

共同研究者

本研究の共同研究者は、筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻の Nguyen Bich Tran と浅部幸嗣、医学医療系血液内科の坂田（柳元）麻実子、同診断病理学の野口雅之と加野准子、東京大学医科学研究所病理コアラボラトリーの松原大祐、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座の小川誠司と吉田健一、東京大学医科学研究所 DNA 情報解析分野の宮野悟、白石友一、千葉健一および田中洋子、虎の門病院血液内科（現国立がん研究センター中央病院血液腫瘍科）の伊豆津宏二、東海大学医学部病理診断学の中村直哉、がん研究会がん研究所標的分子病理プロジェクトの竹内賢吾、久留米大学医学部病理学講座の大島孝一と三好寛明、物質材料研究機構技術開発共用部門の箕輪貴司の各氏である。なお、本報告を行うにあたり資金提供を頂いた上原記念生命科学財団に、深甚の謝意を表す。

文 献

- 1) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Yardman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues 4th edn, 306–11 (IARC Press, Lyon, France, 2008).
- 2) Vose J, Armitage J, Weisenburger D; International T-Cell Lymphoma Project. *J Clin Oncol.* 2008;26(25):4124-30. doi: 10.1200/JCO.2008.16.4558. PMID: 18626005
- 3) Otsubo A, Okuno Y, Sakata S, Kamada Y, Nakamoto-Matsubara R, Tran NB, Izutsu K, Sato Y, Ohta Y, Furuta J, Shimizu S, Komeno T, Sato Y, Ito T, Noguchi M, Noguchi E, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Suzukawa K, Nanmoku T, Hasegawa Y, Nureki O, Miyano S, Nakamura N, Takeuchi K, Ogawa S, Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat Genet.* 2014;46(2):171-5. doi: 10.1038/ng.2872. PMID: 24413737
- 4) de Leval L, Rickman DS, Thielen C, Reynies Ad, Huang YL, Delsol G, Lamant L, Leroy K, Brière J, Molina T, Berger F, Gisselbrecht C, Xerri L, Gaulard P. The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood.* 2007;109(11):4952-63. PMID: 17284527
- 5) Lemonnier F, Couronné L, Parrens M, Jaïs JP, Travert M, Lamant L, Tournillac O, Rousset T, Fabiani B, Cairns RA, Mak T, Bastard C, Bernard OA, de Leval L, Gaulard P. Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood.* 2012;120(7):1466-9. doi: 10.1182/blood-2012-02-408542. PMID: 22760778
- 6) Rodríguez-Pinilla SM, Atienza L, Murillo C, Pérez-Rodríguez A, Montes-Moreno S, Roncador G, Pérez-Seoane C, Domínguez P, Camacho FI, Piris MA. Peripheral T-cell lymphoma with follicular T-cell markers. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(12):1787-99. doi: 10.1097/PAS.0b013e31817f123e. PMID: 18779728
- 7) Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, Advani R, Ghielmini M, Salles GA, Zelenetz AD, Jaffe ES. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood.* 2016;127(20):2375-90. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569. PMID: 26980727
- 8) Chiba S, Sakata-Yanagimoto M, Ogawa S. Method for detecting t-cell lymphoma. PCT/JP2014/62112.
- 9) Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M, Asabe Y, Matsubara D, Kano J, Yoshida K, Shiraiishi 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.* 2017;7(1):e516. doi: 10.1038/bcj.2016.122. PMID: 28157189