

61. T細胞リンパ腫における微小環境の多様性の解明

坂田 (柳元) 麻実子

筑波大学 医学医療系 血液内科

Key words : 血管免疫芽球性 T細胞リンパ腫, 微小環境, 間質細胞, 多様性, シングルセル解析

緒言

リンパ節は健常では 5 mm 以下の小さな臓器である。体内に侵入した細菌やウイルス等、あるいは体内に発生したがん細胞等の異物を捉えて排除する機能を担い、免疫において中心的な役割を果たしている。悪性リンパ腫とは、がん細胞の性質が成熟リンパ球に類似した血液がんの一つである。リンパ節などのリンパ組織から発生する場合は多いが、その他の全身の諸臓器のリンパ組織から発生する場合もある。悪性リンパ腫全体としては、血液がんの中では最も頻度が高く、高齢化などに伴って近年では増加傾向にある。悪性リンパ腫は、全体では約 100 種類に分類され、病理組織学的、さらには臨床的には極めて多様な疾患群である。主には B 細胞性と T/NK 細胞性に分類され、B 細胞性リンパ腫の頻度が約 9 割、T/NK 細胞性リンパ腫の頻度が約 1 割を占める。T/NK 細胞リンパ腫はさらに約 30 種類に分類される。本邦では、成人 T 細胞性白血病リンパ腫の頻度が高いが、諸外国では末梢性 T 細胞リンパ腫不能型、あるいは、がん細胞が T 濾胞ヘルパー細胞の性質をもつ血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫、あるいはこの類縁疾患の頻度が高い。血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫は臨床的な特徴として全身リンパ節腫脹がみられ、さらには、発熱、皮疹、免疫異常などの自己免疫疾患様の特徴をあわせもつ。我々のグループでは悪性リンパ腫の研究を行っており、なかでも血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫についてゲノムから病態研究、治療研究まで行ってきた [1~4]。悪性リンパ腫の治療としては、B 細胞性リンパ腫では、抗体療法、CAR-T 細胞療法などの革新的治療方法が開発されているが、引き続き根治が困難な場合もある。一方、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫をはじめとする T/NK 細胞リンパ腫においても、抗体療法や各種新薬が開発され、実用化されているものの、依然として B 細胞性リンパ腫に比較して、予後は十分とはいえない。そこで、新たな治療戦略を開発する必要がある。

リンパ節にはそもそもリンパ球をはじめとする主には血液系の免疫細胞に加えて、非血液系の血管内皮細胞、リンパ管細胞、間質細胞などと呼ばれる細胞群が含まれる。悪性リンパ腫の腫瘍組織には、他のがん組織と同様、前述のように成熟リンパ球に類似したがん細胞が浸潤しているのみならず、がん細胞以外の多様な細胞が浸潤している。これらの細胞浸潤は血液系の免疫細胞や炎症細胞と呼ばれる細胞群、さらには非血液系の血管内皮細胞、リンパ管細胞、間質細胞などと呼ばれる細胞群が含まれる。

昨今では、単一細胞レベルで遺伝子発現解析を行うシングルセル RNA シーケンス解析技術が進歩した。シングルセル RNA シーケンス解析によって、個々の細胞の特徴を捉えることができることから、様々な組織や分画に従来の想定を超えた多様性がみられることが明らかとなってきた。

本研究では、T 細胞リンパ腫を対象とし、非血液系の間質細胞群に焦点をあて、シングルセル RNA シーケンス解析技術を用いてその多様性を明らかにするために研究を行った。

方法

1. リンパ節および悪性リンパ腫のリンパ節病変=節性病変の収集

リンパ節と悪性リンパ腫のリンパ節病変=節性病変の非血液分画は、非常に希少なフラクションであるため十分な量を採取することが困難であった。そこで本研究では、当院の複数の診療科および協力病院との連携により、倫理委員会

の承認のもと、サンプルを集積することとした。悪性リンパ腫は、診断用に採取された検体の残余検体を用いた。真の「健常」リンパ節は倫理的には得られないことから、固形がんが疑われて診療のためにリンパ節郭清が行われた際の遠位のリンパ節のごく一部分を利用し、転移がないことをフローサイトメトリー法などで確認することにより、「健常」リンパ節の代替として用いた [5]。

2. リンパ節および悪性リンパ腫分画からの非血液系間質細胞群の抽出

リンパ節を酵素処理により細胞懸濁液にし、セルソーター (FACS Aria II) 等により CD45 陰性細胞を分取した。シングルセル RNA シーケンス解析には、ライブラリ作製キット (10x Genomics 社) によりライブラリを作製後、シーケンスを行った (ペアエンド、150 bp) [5]。

3. 非血液系間質細胞群のシングルセルデータ解析

得られたシングルセルデータについて、遺伝子発現領域へのマッピングなどの一次解析には CellRanger (10x Genomics 社) を用いた。二次解析には Seurat (Satija Lab) などを用いてデータのクオリティーコントロール、多検体のデータ統合、クラスタリングを行った。対応するクラスタ間でのデータ統合も同様に行い、DEseq2、MAST などのツクラスタ間の遺伝子発現の差異を解析した。データ解析にはスーパーコンピューターSHIROKANE (東京大学医科学研究所) を用いた [5]。

結果および考察

1. 健常リンパ腫の多様性 (血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、非内皮性間質細胞) (図 1)

非血液分画についてクラスタリングを行ったところ、大まかには3つの分画として、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、非内皮性間質細胞にクラスタ化された。次に、それらの集団をそれぞれ *in silico* (データ上) で取り出し、さらにクラスタリングを行った。血管内皮細胞は10種類のサブクラスタ、リンパ管内皮細胞は8種類のサブクラスタ、非内皮性間質細胞は12種類の異なったサブクラスタに分かれた。それぞれのサブクラスタとその他の細胞集団との比較によりそれぞれのサブクラスタの遺伝子発現の特徴を見だし、これを基にサブクラスタのアノテーション (すなわち、当該クラスタの遺伝子発現プロファイルを基に機能や分化段階を予測し、「名前をつける」過程をさす) をもとに行った。それぞれのサブクラスタについて、リンパ節内での局在について、免疫染色法を用いることにより確認した。これにより、単一細胞レベルでのアトラスを作製した。

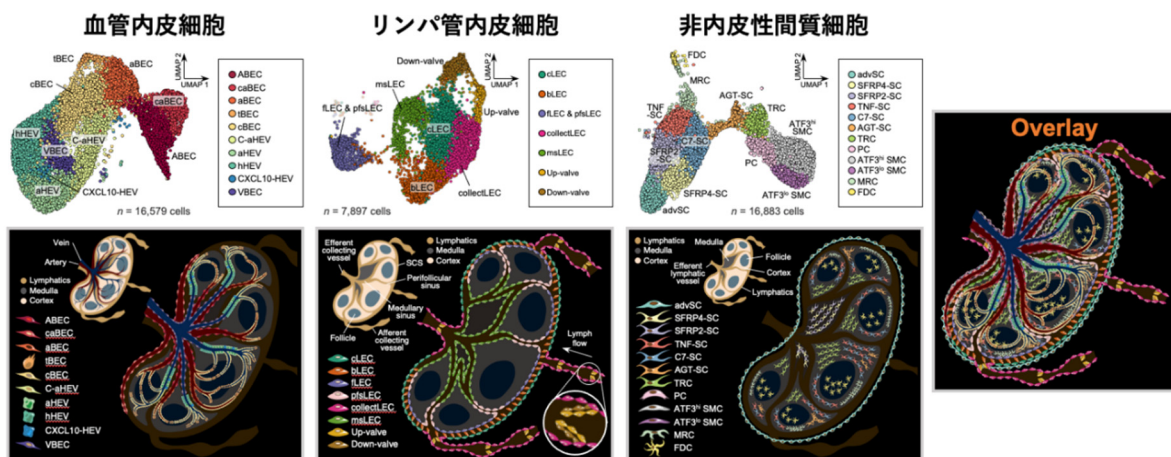


図 1. 健常のリンパ節におけるシングルセルアトラス ([5] から引用)

血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、および非内皮性間質細胞のサブクラスタおよびそれぞれに対するアノテーションの結果、さらにこれから推定されるリンパ節内での各サブクラスタの局在を示す。

2. 血管免疫芽球性T細胞リンパ腫の比較 (図2)

次に、「健常」リンパ節で作製した単一細胞レベルでのアトラスをもとに、血管免疫芽球性T細胞リンパ腫についても、非血管系間質細胞について解析を行った。クラスタリングの結果、全体の傾向としては、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、非内皮性間質細胞の大きめに3つに分かれた。特徴としては、血管内皮細胞が相対的に増加し、非内皮性間質細胞が顕著に減少していた。次にこれらの各クラスタについて、*in silico* に抽出した後、サブクラスタリングを行い、対応するサブクラスタについて比較を行った。解析については、今後も継続的に詳細に行う必要があるものの、顕著な変化としては、濾胞樹状細胞が相対的に減少していた。血管免疫芽球性T細胞リンパ腫においては、濾胞樹状細胞の増加は病理組織学的には診断根拠の一つともされてきたため、これが減少しているのは想定外の発見であった。そこで、病理組織学的に古典的にアノテーションされてきた細胞分画と我々の技術により新たに分画されてくるサブクラスタについて比較検討を行い、対応づけを行い、臨床診断に還元していく必要があると考えられた。

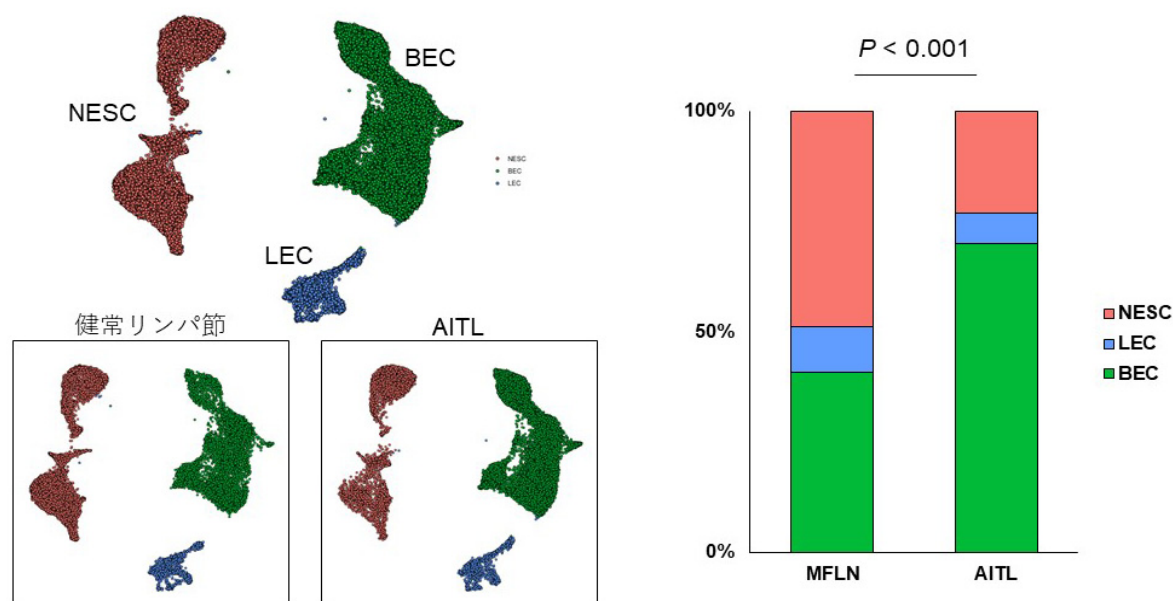


図2. 「健常」リンパ節と血管免疫芽球性T細胞リンパ腫非血液系間質細胞分画の比較
「健常」リンパ節および血管免疫芽球性T細胞リンパ腫の非血液系間質細胞のデータを示す。
血管免疫芽球性T細胞リンパ腫：AITL、血管内皮細胞：BEC、リンパ管内皮細胞：LEC、
非内皮性間質細胞：NESC。ピアソンのカイ二乗検定、 $P < 0.001$ 。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学血液内科の安部佳亮先生、藤澤学先生、末原泰人先生、服部圭一朗先生、日下部学先生、坂本竜弘先生、錦井秀和先生、Tran B. Nguyen 先生、千葉滋先生、消化器外科の大和田洋平先生、榎本剛史先生、小田竜也先生、乳腺甲状腺内分泌外科の上田文先生、坂東裕子先生、耳鼻咽喉科・頭頸部外科中山雅博先生、国立病院機構水戸医療センター血液内科の吉田近思先生、久留米大学医学部病理学講座の大島孝一先生、三好寛明先生、NTT 東日本関東病院血液内科の臼杵憲祐先生、医療法人鉄蕉会亀田総合病院血液・腫瘍内科の末永孝生先生、田畑里佳先生、寺尾俊紀先生である。

文 献

- 1) Sakata-Yanagimoto M, Enami T, Yoshida K, Shiraishi Y, Ishii R, Miyake Y, Muto H, Tsuyama N, Sato-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.* 46(2):171-5, 2014. *Nat Genet.* 2014 Feb;46(2):171-5. PMID: 24413737 DOI: 10.1038/ng.2872.
- 2) 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.* 2017 Jan 6;7(1):e516. PMID: 28157189 DOI: 10.1038/bcj.2016.122.
- 3) 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.* 2018 Mar;32(3):694-702. PMID: 28832024 DOI: 10.1038/leu.2017.273.
- 4) Nguyen TB, Sakata-Yanagimoto M*+, Fujisawa M, Nuhat ST, Miyoshi H, Nannya Y, Hashimoto K, Fukumoto K, Bernard OA, Kiyoki Y, Ishitsuka K, Momose H, Sukegawa S, Shinagawa A, Suyama T, Sato Y, Nishikii H, Obara N, Kusakabe M, Yanagimoto S, Ogawa S, Ohshima K, Chiba S. Dasatinib Is an Effective Treatment for Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma. *Cancer Res.* 2020 May 1;80(9):1875-1884. PMID: 32107212 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2787.
- 5) Abe Y, Sakata-Yanagimoto M+(Lead contact), Fujisawa M, Miyoshi H, Suehara Y, Hattori K, Kusakabe M, Sakamoto T, Nishikii H, Nguyen TB, Owada Y, Enomoto T, Sawa A, Bando H, Yoshida C, Tabata R, Terao T, Nakayama M, Ohshima K, Usuki K, Oda T, Matsue K, Chiba S. A single-cell atlas of non-haematopoietic cells in human lymph nodes and lymphoma reveals a landscape of stromal remodelling. *Nat Cell Biol.* 2022 Apr;24(4):565-578. PMID: 35332263 DOI: 10.1038/s41556-022-00866-3.