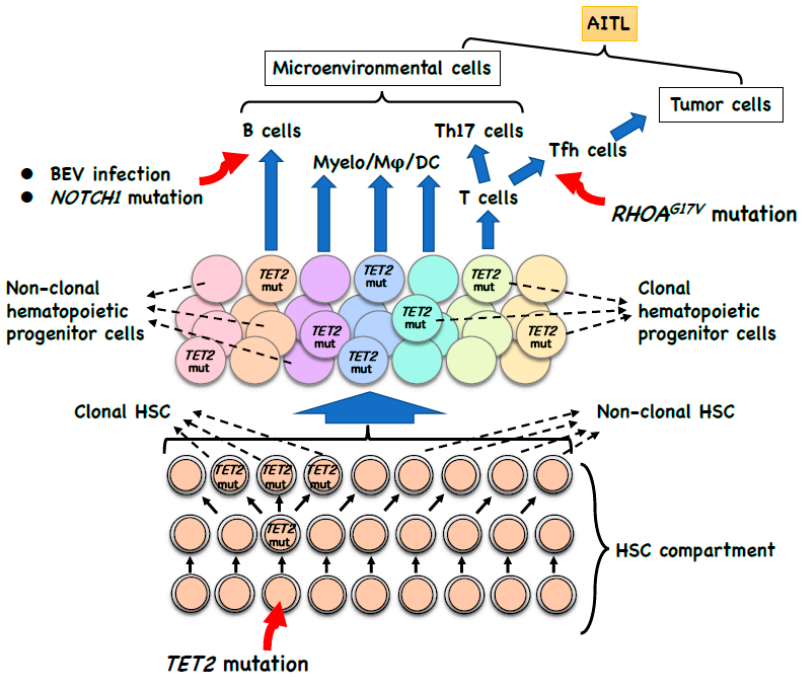
62　造血器腫瘍におけるゲノム異常と微小環境との相互作用	千葉　滋

【目的】造血器腫瘍で同定される遺伝子変異と同様の体細胞性遺伝子変異が，高齢者の正常血液細胞において高頻度に同定される（クローン性造血：clonal hematopoiesis、CH)。CH 細胞は造血器腫瘍をもつ患者の一部でも同定され、こうした患者の造血器腫瘍は CH 細胞を供給する造血幹細胞に由来する。CH 細胞で 2 番目に高頻度に同定される *TET2* は DNA メチル化修飾酵素をコードし、骨髄系腫瘍でもリンパ系腫瘍でも高頻度に同定される。血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫（AITL）は、*TET2* 変異が約 80%の患者で同定される。また、*TET2* 変異をもつ AITL の 60〜90%で $RHOA^{G17V}$ が同定される。本研究では、造血幹細胞における *TET2* 変異と、T 細胞における $RHOA^{G17V}$ 変異を模倣するマウスを作製することで、AITL における腫瘍微小環境の変化と発症メカニズムとの関連を解明することを目的とした。

【方法】造血幹細胞で *Tet2* がノックアウトされ、T 細胞で $RHOA^{G17V}$ を発現する $Tet2^{null/null}$・*Mx-Cre*・$CD2\text{-}RHOA^{G17V}$ マウス（Tet2RHOA マウス）を作製した。Tet2RHOA マウスの腫大リンパ節由来の細胞を解析し、またこの細胞を放射線照射したヌードマウスの腹腔内に移植して腫瘍形成過程と腫瘍の性状を詳細に解析した。

【結果】Tet2RHOA マウスは脾腫やリンパ節腫大を示し死亡した。脾臓や腫大リンパ節は濾胞が消失して多彩な細胞が充満し、また血管増生を伴うなど、AITL に類似した組織像を示した。AITL の腫瘍細胞は濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞の形質をもつことが明らかにされているが、本マウスの脾臓や腫大リンパ節でも $CD4^{+}PD1^{+}$ など Tfh 細胞の形質をもつ細胞が増加していた。一方、多数の B 細胞や骨髄系炎症細胞も混在しており、この点でもヒト AITL に類似していた。以上から Tet2RHOA マウスは AITL モデルと考えられた。腫瘍組織由来細胞をヌードマウスに腹腔内投与すると 2 週間で約半数のレシピエントが脾腫とリンパ節腫大をきたして死亡した。腫大脾臓では Tfh 様細胞が増加しておりその大部分はドナー由来であった。その他に多種類の炎症細胞で構成されており、これらにはドナー由来とレシピエント由来細胞が混在していた。AITL 発症には TET2 変異をもつ微小環境細胞が重要な役割を果たすことが示唆された。

AITL の分子病態と微小環境細胞



62. 造血器腫瘍におけるゲノム異常と微小環境との相互作用

千葉　滋

筑波大学 医学医療系 血液内科

Key words：クローン性造血，TET2，血管免疫芽球性T細胞リンパ腫，微小環境

緒　言

形態的に正常な末梢血白血球、様々な系統の骨髄細胞、あるいはコロニー形成能をもつ前駆細胞などに、造血器腫瘍で同定される遺伝子変異と同様の体細胞性遺伝子変異が同定されることが明らかになり、クローン性造血（clonal hematopoiesis、CH）と呼ばれている［1，2］。CH細胞は加齢に伴い健常者でも高頻度に検出されるようになる。一方、CH細胞は一部の造血器腫瘍をもつ患者でも検出され、これらの患者におけるCH細胞は通常、同一患者の腫瘍組織・細胞で同定される遺伝子異常と同一の異常をもつ。すなわち、こうした患者の造血器腫瘍は、CH細胞を供給する造血幹細胞（hematopoietic stem cell、HSC）に由来する。

CH 細胞で変異が同定される遺伝子としては *DNMT3A* がもっとも高頻度であり、次いで *TET2* の頻度が高い［1，2］。*DNMT3A* および *TET2* はいずれもDNAメチル化を修飾する酵素をコードし、これらの遺伝子には骨髄系腫瘍でもリンパ系腫瘍でも高頻度に変異が同定される。CH細胞や造血器腫瘍で同定される *TET2* 変異はいずれも機能喪失型変異である。

リンパ系造血器腫瘍である血管免疫芽球性T細胞リンパ腫（AITL）は、*TET2* 変異が約80%の患者で同定される［3］。さらにAITLの大多数は、*TET2* 変異をもつクローン性HSCに由来することが示唆されている。AITLは腫瘍組織中の腫瘍細胞割合が低く、様々なリンパ球など炎症細胞が腫瘍組織を構成する特徴を有し、こうした微小環境細胞もCH細胞の一部であると考えられる。一方、*TET2* 変異をもつAITL組織の60～90%で、*RHOA* 遺伝子の特定の変異（G17V）が同定される［3，4］が、この変異はT細胞特異的に検出される［5］。

本研究では、造血幹細胞における *TET2* 変異と、T細胞における $RHOA^{G17V}$ 変異を模倣するマウスを作製することで、AITL モデルを構築した［6］。このモデルマウスに生じている病態を解析することで、AITL における微小環境変化と、AITL発症メカニズムとの関連を考察する。

方　法

$Tet2^{flox/flox}$・*Mx-Cre*・*CD2-*$RHOA^{G17V}$マウスに3～4週齢でpIpCを投与し、$Tet2^{null/null}$・*Mx-Cre*・*CD2-*$RHOA^{G17V}$マウス（Tet2RHOAマウス）を作製した。本マウスは、HCS で *Tet2* がノックアウトされ、T 細胞で $RHOA^{G17V}$ を発現するように設計された。Tet2RHOA マウスの腫大リンパ節由来の細胞について、フローサイトメトリー、免疫染色、トランスクリプトーム解析を行った。またこの細胞を放射線照射したヌードマウスの腹腔内に移植して腫瘍形成を観察し、その腫瘍由来細胞についてフローサイトメトリー、免疫染色で解析した。

結　果

1. Tet2RHOA マウスにおける腫瘍発症とその解析

Tet2$^{null/null}$・*Mx-Cre* マウスは、既報通り慢性骨髄単球性白血病に類似した病態を呈し、18 ヶ月後までに約 20%のマウスが死亡した。*CD2-RHOA*^{G17V}マウスは明らかな異状を示さず、観察期間中 100%生存していた。一方、Tet2RHOA マウスは中央値 48 週齢で死亡した（図 1a）。死亡したマウスはいずれも脾腫とリンパ節腫大を呈していた（図 1b）。肺や肝臓にも腫瘍浸潤が認められた。組織学的には、脾臓、リンパ節とも濾胞構造が消失し、中型のリンパ球とともに、多彩な細胞浸潤が観察された（図 1c）。また血管の増生を認めていた。フローサイトメトリー解析では、濾胞性ヘルパーT（Tfh）細胞が増加しており、典型的には Tfh 細胞が全細胞の 10%以上（5～80%）を占めていた（図 2）。Tet2RHOA マウスおよび野生型マウスの脾臓由来 CD4 陽性細胞の transcriptome 解析では、Tet2RHOA マウスにおいて T 細胞受容体（TCR）経路遺伝子および Tfh 細胞関連遺伝子の発現が有意に増加していた。

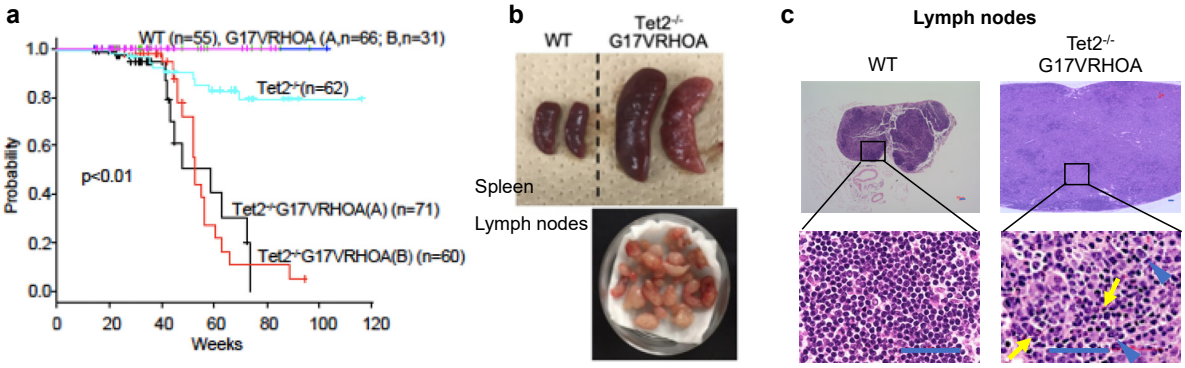


図 1. Tet2RHOA マウスは AITL 様リンパ腫を発症して死亡する

a) 生存曲線。Tet2$^{-/-}$G17GRHOA（A）、Tet2$^{-/-}$G17GRHOA（B）は、独立したラインの Tet2RHOA マウスを示す。

b) 腫大した脾臓およびリンパ節。Tet2RHOA マウスの腫大したリンパ節の組織像。

c) リンパ節組織像（上：×4；下：×100）。Tet2RHOA マウスの腫大したリンパ節では濾胞構造が消失しておりびまん性に種々の細胞が浸潤している。Arrow（黄色）：好酸球、Arrowhead（水色）：免疫芽球。Scale bar（水色）：50 μm。

［6］より再掲。

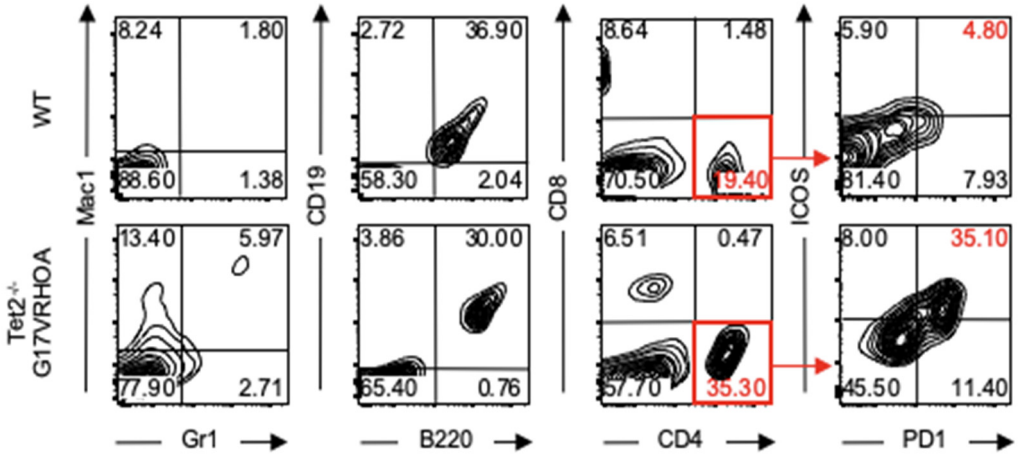


図 2. 野生型および Tet2RHOA マウス脾臓細胞

Tet2RHOA マウス脾臓では、CD4 陽性 T 細胞の割合が約 35%と多く、そのうち約 35%を PD1 陽性 ICOS 陽性の Tfh 様細胞が占めている。一方多数の B 細胞（CD19 陽性 B220 陽性）も含まれている。［6］より再掲。

2. 腫瘍移植マウスにおける腫瘍発症とその解析

Tet2RHOA マウスの腫大したリンパ節細胞浮遊液を、放射線照射したヌードマウスに腹腔内投与すると、末梢血中のドナー由来細胞が徐々に増加し、脾腫とリンパ節腫大を呈して多くのレシピエントマウスは死亡した（図 3）。腫大 した脾臓やリンパ節ではドナー由来の Tfh 様細胞がもっとも大きな割合を占めていたが、その他の T 細胞、あるいは骨髄系細胞、B 細胞も種々の割合で混在していた。

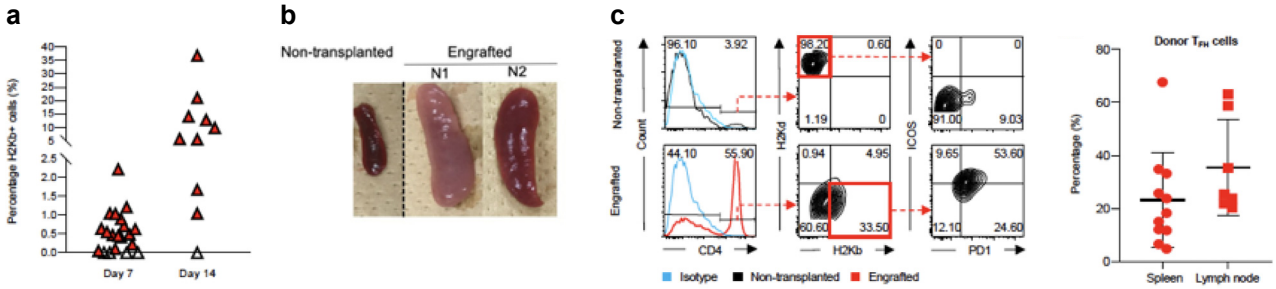


図 3. Tet2RHOA マウス腫瘍移植ヌードマウスにおける腫瘍

a) 移植 7 日および 14 日目の末梢血におけるドナー細胞の割合。

b) ドナー細胞生着後のレシピエントマウスにおける脾臓腫大。

c) ドナー細胞生着後のレシピエントマウス脾臓細胞の解析。CD4 陽性の割合が高く、その半数程度を ICOS 陽性 PD1 陽性の Tfh 様細胞が占める。

［6］より再掲。

3. 個別微小環境細胞の AITL 発症への関与

我々は過去に、AITL 患者検体からマイクロダイセクション法を用いて、免疫染色した PD1 陽性細胞（PD1 は Tfh 細胞マーカーで、腫瘍細胞が濃縮される）および CD19 陽性細胞（CD19 は B 細胞に特異的なマーカーで、非腫瘍細胞である B 細胞が濃縮される）分画を個別に収集し、当該患者の腫瘍組織由来 DNA で同定された遺伝子変異の解析を行なった。その結果、*TET2* 変異はいずれの分画でも同定され、*RHOA*^{G17V} 変異は PD1 陽性分画でのみ同定された。一方、CD19 分画のみで *NOTCH1* 変異が繰り返し同定された［5］。こうした発見から、微小環境に存在する B 細胞は *TET2* 変異やその他の遺伝子変異（たとえば *NOTCH1* 変異）を有しており、これらにより機能的にも異常をきたしていると推察される。

現在、個々の微小環境細胞の AITL 発症への関与について、シングルセル・シークエンスや個別細胞の移植実験等を通じて研究を進めている。こうした研究については論文化に至っていないため、論文発表後いずれかの機会に報告したい。

4. 腫瘍移植マウスを用いた、チロシンキナーゼ阻害剤ダサチニブの有効性の検討

AITL に特徴的な *RHOA*^{G17V} 変異による AITL 発症メカニズムの研究において、報告者らは以前に、野生型 RHOA タンパク質が本来もつ small GTPase としての機能を、RHOA^{G17V} 変異タンパク質は失っている［3］一方、特異的に VAV1 と結合して VAV1 のチロシンリン酸化を促進し、TCR シグナルを亢進することを見出した［7］。さらに培養細胞を用いた研究で、チロシンキナーゼ阻害剤であるダサチニブが VAV1 のチロシンリン酸化を抑制し、TCR シグナルを強力に阻止することも見出している。

こうした知見に基づいて、Tet2RHOA マウス由来腫瘍を移植したヌードマウスへのダサチニブ投与実験を行なった。その結果、ダサチニブがマウス腫瘍内の VAV1 リン酸化を抑制し、マウスの生存を延長することを見出した（図 4）。

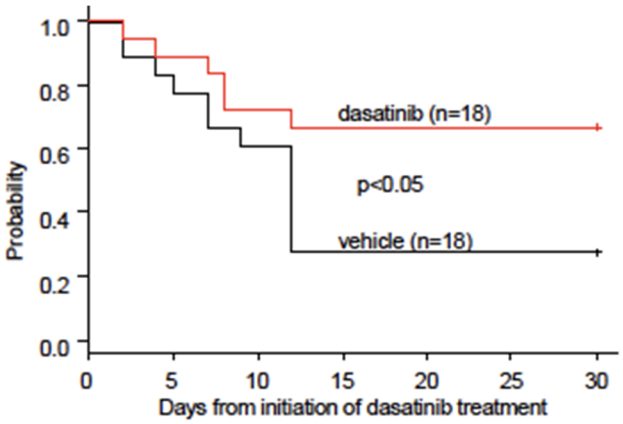


図 4. チロシンキナーゼ阻害剤ダサチニブによる AITL モデルマウスの生存延長
コントロール（vehicle）群では 78%のマウスが死亡したが、ダサチニブ治療群での死亡率は 33%であり、有意にダサチニブ群で生存が延長した。（Kaplan-Meier 法；p 値は log-rank 検定による）。

考　察

T 細胞リンパ腫の 1 病型である AITL は、*TET2* 遺伝子の機能喪失型変異および *RHOA* 遺伝子の G17V 変異によって特徴づけられる。AITL のモデル動物樹立をめざし、T 細胞で *Tet2* が不活化され、かつ $Rhoa^{G17V}$ を発現するマウス（T-Tet2Rhoa マウス）が樹立された［8］。しかし、患者 AITL では *TET2* 変異は HSC で生じ、*RHOA* 変異は T 細胞で生じると考えられている。このため、T-Tet2Rhoa マウスは AITL のゲノム異常を不完全にしかモデル化できていない。実際、T-Tet2Rhoa マウスそのものは T 細胞リンパ腫を発症していない。AITL 発症のためには、T-Tet2Rhoa マウスの骨髄細胞を同系マウスに経静脈的に移植し、かつレシピエントマウスに大量の羊赤血球を投与して免疫刺激を行う必要があった。これに対し、我々のマウスでは造血幹細胞で *Tet2* を不活化させており、より AITL 患者のゲノムに近い［6］。AITL 様リンパ腫が発症したのは、多系統の造血細胞で *Tet2* が不活化されることによって、腫瘍細胞以外の微小環境を構成するリンパ球や骨髄系炎症細胞に変化が生じることが重要であったと推察される。

ダサチニブによる治療効果は、腫瘍細胞内で生じている $RHOA^{G17V}$ – VAV1 リン酸化による TCR シグナル亢進を阻害することが重要であったと考えられる。なお本知見の結果を受けて、我々は単施設で小規模の第 I 相臨床試験を行い、有望な結果が得られたため多施設臨床試験を医師主導治験として開始している。

AITL は高齢者に多発する予後不良の疾患で、新規治療法の開発が待たれる。ダサチニブ治療などのように腫瘍細胞を標的にした治療の他、微小環境細胞を標的にした治療法開発も進められる必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、筑波大学医学医療系血液内科学研究室の坂田（柳元）麻実子博士である。本研究にご協力いただいた久留米大学病理学講座の大島孝一博士および三好寛明博士、Tet2flox マウスを提供いただいた Olivier A. Bernard 博士に深甚の謝意を表する。また、本研究を進めるにあたり協力いただいた筑波大学血液内科大学院生諸氏に心からの謝意を表する。

文 献

1) Jaiswal S、Fontanillas P、Flannick J、et al.、Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 2014 Dec 25;371(26):2488-98. doi: 10.1056/NEJMoa1408617. PMID: 25426837

2) Genovese G、Kähler AK、Handsaker RE、et al.、McCarroll SA. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med. 2014 Dec 25;371(26):2477-87. doi: 10.1056/NEJMoa1409405. PMID: 25426838

3) Sakata-Yanagimoto M、Enami T、Yoshida K、et al.、Chiba S. Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. Nat Genet. 2014 Feb;46(2):171-5. doi: 10.1038/ng.2872. PMID: 24413737

4) Palomero T、Couronné L、Khiabanian H、et al.、Ferrando AA. Recurrent mutations in epigenetic regulators、RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. Nat Genet. 2014 Feb;46(2):166-70. doi: 10.1038/ng.2873. PMID: 24413734

5) Nguyen TB、Sakata-Yanagimoto M、Asabe Y、et al.、Chiba S. Identification of cell-type-specific mutations in nodal T-cell lymphomas. Blood Cancer J. 2017 Jan 6;7(1):e516. doi: 10.1038/bcj.2016.122. PMID: 28157189

6) Nguyen TB、Sakata-Yanagimoto M、Fujisawa M、et al.、Chiba S. Dasatinib is an effective treatment for angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Cancer Res. 2020 May 1;80(9):1875-1884. doi: 10.1158/0008-5472. CAN-19-2787 PMID: 32107212

7) Fujisawa M、Sakata-Yanagimoto M、Nishizawa S、et al.、Chiba S. Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. Leukemia. 2018 Mar;32(3):694-702. doi: 10.1038/leu.2017.273. PMID: 28832024

8) Cortes JR、Ambesi-Impiombato A、Couronné L、et al.、Palomero T. RHOA G17V Induces T Follicular Helper Cell Specification and Promotes Lymphomagenesis. Cancer Cell. 2018 Feb 12;33(2):259-273.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.001. PMID: 29398449