

末梢性 T 細胞リンパ腫発症に関与する遺伝子を発見

血液のがんである悪性リンパ腫は、病理学的特徴や分子病態などにより多くの種類に分類されますが、近年のゲノム解析の進展に伴ってさらに細分化され、それぞれに特有の遺伝子変異が明らかにされつつあります。本研究グループは、悪性リンパ腫のうち末梢性 T 細胞リンパ腫のゲノム異常を解明し、これまでに、*VAV1* 遺伝子から作られるタンパク質の一部が欠損 (V-Del) したり、末端の特定部位が別の遺伝子に置き換わる変異 (V-Fus) が生じていることを明らかにしています。

本研究では、このゲノム異常情報 (V-Del および V-Fus) を持つマウス (末梢性 T 細胞リンパ腫の亜型) に対して、腫瘍抑制因子 (タンパク質) をコードする遺伝子を欠損したモデルマウスを作製したところ、成熟していない T 細胞の腫瘍である T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫と、成熟した T 細胞の腫瘍である末梢性 T 細胞リンパ腫の 2 種類が発症しました。またこのとき、ヒトにおける末梢性 T 細胞リンパ腫と同様に、*CCR4* 遺伝子や *MYC* 遺伝子が高発現していました。このことから、*VAV1* 遺伝子の変異が *MYC* 遺伝子や *CCR4* タンパク質などの発現に影響を及ぼし、T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫と末梢性 T 細胞リンパ腫の亜型の発症に関与していることがわかりました。

これらの腫瘍を発症したマウスには、*MYC* の発現を抑制する薬剤が治療に有効であり、さらに、成人 T 細胞白血病や、*CCR4* タンパク質を発現している再発・難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫の治療ですでに使用されている薬剤モガムリズマブ (抗 *CCR4* 抗体) が、*VAV1* 変異を生じた腫瘍細胞の治療薬として有望であることも示されました。

研究代表者

筑波大学医学医療系

千葉 滋 教授

研究の背景

リンパ球系の悪性腫瘍は、白血病などの、成熟していないリンパ球により生じる前駆リンパ系腫瘍と、悪性リンパ腫などの、成熟したリンパ球により生じる成熟リンパ系腫瘍に大別されます。リンパ球には B 細胞や T 細胞、NK 細胞などがあり、日本においては、リンパ系腫瘍全体のうち、T 細胞系腫瘍の発症頻度は約 10%です。T 細胞系リンパ腫は、病理学的あるいは遺伝学的な性質に基づいてさらに細分化されますが、近年のゲノム解析の進展により、様々な亜型の存在も明らかになってきました。これらは予後が悪い疾患群でもあることが分かっています。

2017 年に本研究グループでは、T 細胞系リンパ腫のうち、複数の成熟リンパ系腫瘍（末梢性 T 細胞リンパ腫）において、*VAV1* 遺伝子に変異のある症例を見つけました。また、末梢性 T 細胞リンパ腫の亜型では、*VAV1* 遺伝子変異に加え、腫瘍抑制因子をコードする遺伝子 *TP53* の変異が共在している傾向があることも分かりました。

しかしながら、末梢性 T 細胞リンパ腫における *VAV1* 遺伝子の変異は様々なパターンが報告されているものの、生体内での腫瘍形成における *VAV1* 変異体の機能は未だに不明です。そこで本研究では、その機能を解明することを目指しました。

研究内容と成果

1. *VAV1* 遺伝子改変マウスの作製

まず、末梢性 T 細胞リンパ腫で生じる *VAV1* 遺伝子の変異（欠失変異 V-Del および融合変異 V-Fus）を導入した遺伝子改変マウスを作製し、これと、腫瘍抑制因子をコードする *TP53* 遺伝子が欠損したマウス (*p53*^{-/-}マウス) を交配させたモデルマウス (*p53*^{-/-} *VAV1-Tg*) を作製し、解析しました。

その結果、この *p53*^{-/-} *VAV1-Tg* マウスは、*p53*^{-/-}マウスと比べて生存期間が短く、また胸腺腫（前駆リンパ系腫瘍である T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫）を発症するマウスと、肝脾腫およびリンパ節腫脹（成熟リンパ系腫瘍）を発症するマウスを確認しました（図 1 A）。一方で *p53*^{-/-}マウスでは、胸腺腫を発症するマウスのみが確認されました。また、T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫のうち、T リンパ球の特徴を示す CD4 抗原と CD8 抗原を調べたところ、*p53*^{-/-} *VAV1-Tg* マウスから得られたものは CD8 単独陽性（SP）が多く、一方で *p53*^{-/-}マウスから得られたものは CD4 CD8 両陽性（DP）のものが多く結果となりました。このことは、T リンパ球が成熟していく段階で CD4 CD8DP を経て、CD4SP あるいは CD8SP の T リンパ球となることから、*p53*^{-/-} *VAV1-Tg* マウスから得られたものがより成熟した段階のものであることがわかりました。また、成熟リンパ腫は *p53*^{-/-} *VAV1-Tg* マウスのみで認められており、CD4 SP のもの、あるいは CD4 CD8 両陰性（DN）のものを確認しました（図 1 B）。組織切片の観察では、胸腺腫瘍を発症したマウスでは、皮質と髄質の境界が破壊され、成熟していないリンパ球によって浸潤されており、一方で、脾腫を発症したマウスでは、濾胞の拡大あるいは構造が破壊され、成熟リンパ球の浸潤が認められました（図 1 C）。また、T 細胞受容体シグナル^{注1)} を伝達する *VAV1* タンパク質の活性化の状態を確認するため、リン酸化 *VAV1* を評価したところ、*p53*^{-/-} V-Fus マウス (*VAV1* 遺伝子が融合変異し *TP53* 遺伝子が欠損したマウス) から得られた成熟リンパ球系腫瘍サンプルのみで *VAV1* タンパク質が活性化した状態を示すリン酸化 *VAV1* が陽性であることが確認されました。

次に、野生型マウスおよび腫瘍を発症したマウスにおける血清中のサイトカイン濃度を比較したところ、野生型マウスおよび T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫を発症した *p53*^{-/-}マウス・*p53*^{-/-} *VAV1-Tg* マウスと比較して、成熟リンパ系腫瘍を発症した *p53*^{-/-} *VAV1-Tg* マウスで、ヘルパー T 細胞^{注2)} の一種であり主にアレルギー反応に応答すると知られている TH2 細胞が主に分泌すると知られているインターロイキン-4 (IL-4)、IL-6、IL-10 のサイトカイン濃度が有意に増加していました。この結果から、成熟リンパ系腫

瘍の細胞は TH2 細胞の表現型へ傾倒しており、成熟リンパ系腫瘍を発症した $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウスの体内で TH2 細胞が増加していることを示唆しています (図 2)。

2. 腫瘍細胞の発生に関与する分子機構とクローン構造、それに基づく治療モデル実験

得られた T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫および成熟リンパ腫の細胞を取り出し、野生型マウスの胸腺と脾臓から取り出した細胞とともに網羅的ゲノム解析を行い、全遺伝子の発現を層別化すると、野生型マウス・ $p53^{-/-}$ マウス・ $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウスで層別化される結果となりました。(図 3 A) T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫と成熟リンパ腫に共通して $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウスにおいて、対照群に比べて 3 倍以上遺伝子発現が高かった遺伝子には *Myc* 遺伝子が含まれており、*Myc* に関連したシグナル伝達経路が有意に高発現であったことも分かりました。

さらに、 $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウス由来の成熟リンパ腫について、ヒトにおける T 細胞性腫瘍と比較したところ、TH2 細胞を特徴付ける遺伝子セットが高発現を示していました。(図 3 B) 血清中サイトカイン濃度の結果も含めたこれらのデータは、 $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウス由来の成熟リンパ腫が TH2 細胞の特徴を示す末梢性 T 細胞リンパ腫の亜型 (PTCL-GATA3) を模倣していることを示唆しており、PTCL-GATA3 と同様に、Ccr4 タンパク質と Gata3 タンパク質が発現していることが確認されました。(図 3 C)

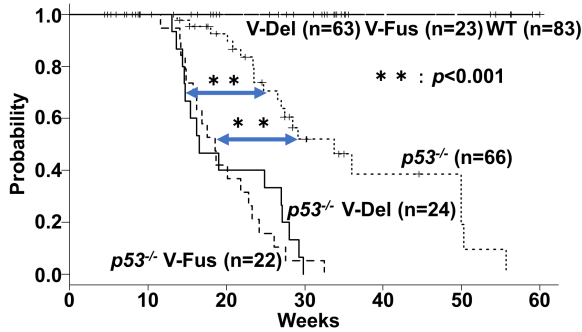
次に、得られた腫瘍細胞のクローン構造を調べるため、腫瘍細胞と正常対照群として尻尾から抽出した DNA を用い、DNA の塩基配列中でタンパク質合成の情報を持つ領域を解析しました。その結果、ヒトにおける成人 T 細胞リンパ腫と末梢性 T 細胞リンパ腫非定型型と共通する遺伝子変異 4 つ (*Notch1*, *Ddx3x*, *Jak1*, *Tet2*) と、体細胞コピー数多型異常 5 つを同定しました (図 4)。

これらの結果に基づき、 $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウス由来あるいは $p53^{-/-}$ マウス由来の腫瘍細胞を移植したヌードマウスから得られた腫瘍細胞を二次移植したヌードマウスに対して、*Myc* の活性を抑制するプロモドメイン阻害剤^{注3)}である JQ1 を投与し、その効果を調べました。すると、JQ1 は $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウス由来の腫瘍細胞を移植したマウスの生存期間を延長した一方、 $p53^{-/-}$ マウス由来の T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫を移植したマウスの生存期間は、JQ1 を投与しないコントロールマウスと同等でした (図 5)。このことから *Myc* の活性を抑制することにより $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウス由来の腫瘍細胞のみ発生を抑えることができ、 $p53^{-/-}$ VAV1-Tg マウス由来の腫瘍細胞では、VAV1 変異体の発現による *Myc* 活性への影響が腫瘍発症に関与していることがわかりました。

今後の展開

一般に予後が悪いとされる末梢性 T 細胞リンパ腫において、その亜型 PTCL-GATA3 に分類されるサブグループはさらに予後が悪く、*MYC* 遺伝子の高発現が特徴で、しばしば *MYC* の増幅を伴う複雑なゲノム異常を示します。今回の研究では、VAV1 変異体の発現によって、血清中サイトカイン濃度、腫瘍細胞における遺伝子プロファイルに基づいて PTCL-GATA3 に類似した腫瘍細胞を発症しており、さらにその腫瘍細胞は *Myc* の高発現も確認されました。また、CCR4 タンパク質の発現が高いことも示唆され、抗 CCR4 抗体薬剤 (モガムリズマブ) が治療に有効である可能性が示されました。これらの知見は、*MYC* 阻害剤やモガムリズマブなどを用いた悪性リンパ腫の新規治療法の開発に応用できると考えられます。

A マウスの生存曲線



B 腫瘍細胞のCD4 CD8の発現

		<i>p53</i> ^{-/-} V-Del	<i>p53</i> ^{-/-} V-Fus	<i>p53</i> ^{-/-}
T-LBL	CD8 SP T-LBL	73 % (11/15)	93 % (13/14)	25 % (3/12)
	DP T-LBL	27 % (4/15)	7 % (1/14)	75 % (9/12)
	Extrathymic	87 % (13/15)	57 % (8/14)	50 % (6/12)
Lym	CD4 SP Lym	50 % (2/4)	25 % (2/8)	-
	DN Lym	50 % (2/4)	75 % (6/8)	-
	Extrasplenic	100 % (4/4)	100 % (8/8)	-

C 腫瘍細胞の病理所見

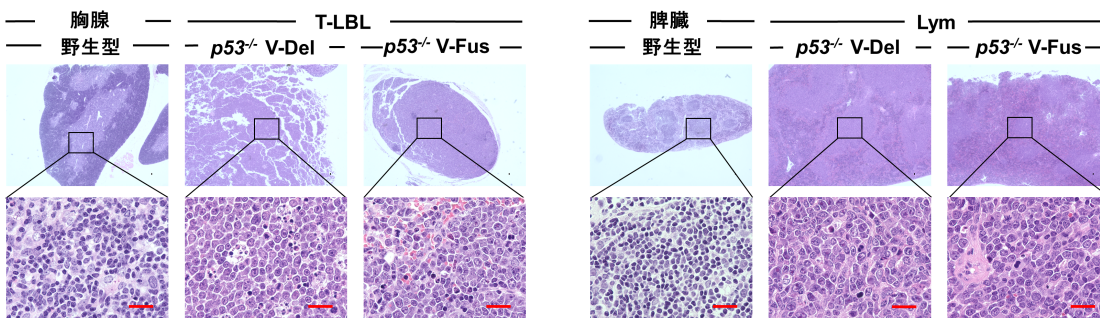


図1 遺伝子改変マウスの生存曲線と腫瘍細胞の特徴

- A. *p53*^{-/-} V-Del、*p53*^{-/-} V-Fus、*p53*^{-/-}、V-Del、V-Fus、野生型マウスの全生存期間の比較。
- B. 腫瘍細胞における T リンパ球の特徴である CD4 CD8 の発現による層別化と、T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫 (T-LBL) および成熟リンパ腫 (Lym) の発症率。
- C. 腫瘍細胞組織切片の病理所見。

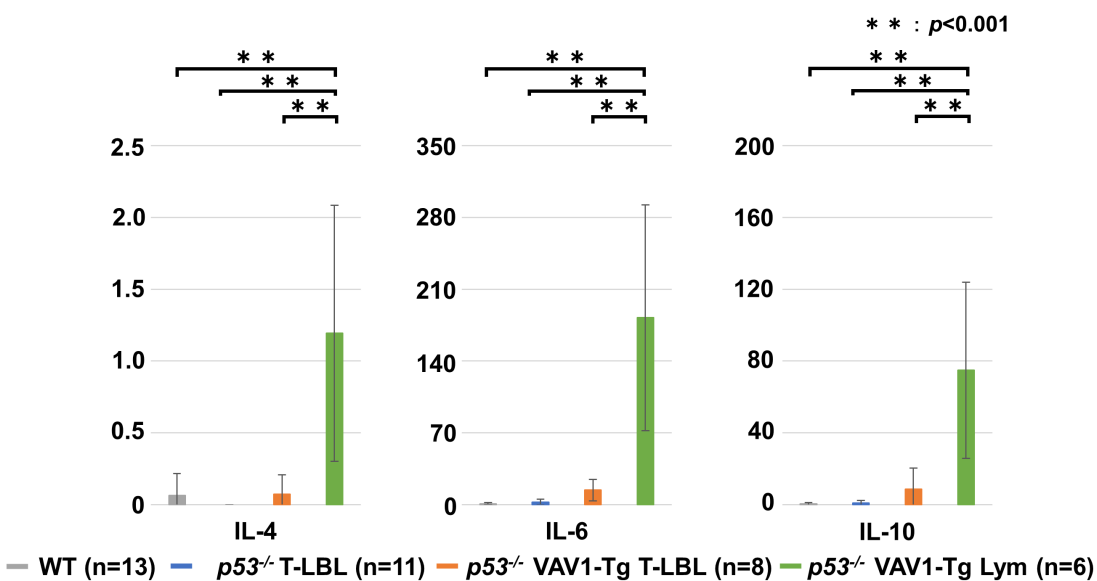
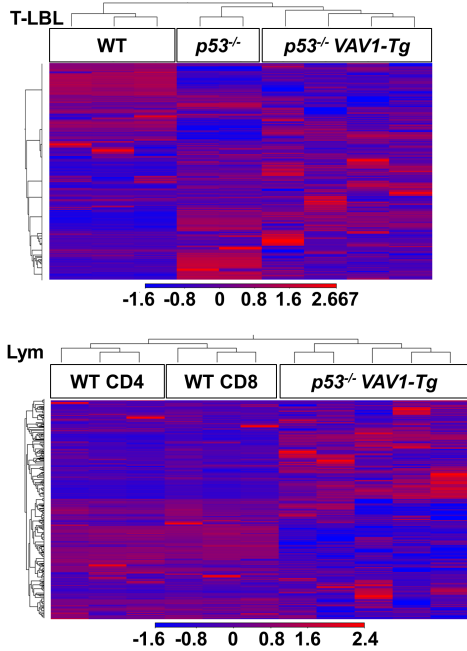


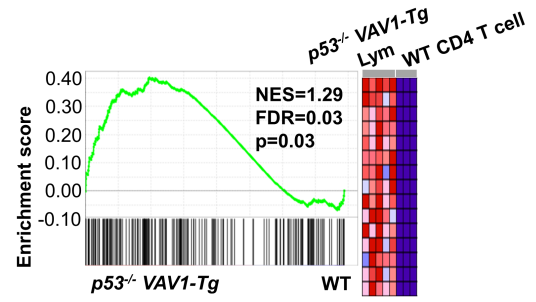
図2 腫瘍発症マウスの血清サイトカイン濃度

野生型マウスと T 細胞性リンパ芽球性リンパ腫あるいはリンパ腫を発症した *p53*^{-/-} VAV1-Tg マウス、あるいは *p53*^{-/-} マウスの血清中のサイトカイン (IL-4、IL-6、IL-10) 濃度の比較。

A 野生型・腫瘍細胞の遺伝子発現による層別化



B Lym腫瘍細胞のTH2様の遺伝子発現



C Lym腫瘍細胞のCcr4・Gata3の発現

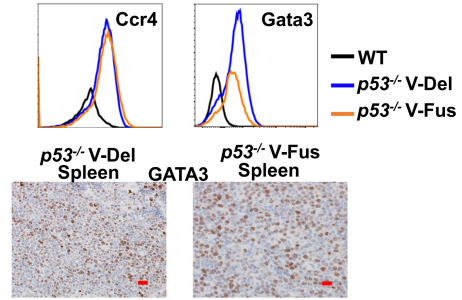


図3 腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイル

- A. 野生型の胸腺細胞およびT細胞性リンパ芽球性リンパ腫を発症した $p53^{-/-}$ $VAV1-Tg$ マウス、あるいは $p53^{-/-}$ マウスから採取した腫瘍細胞、野生型の脾細胞および成熟リンパ腫を発症した $p53^{-/-}$ $VAV1-Tg$ マウスから分取した腫瘍細胞の遺伝子発現の特徴を元にした層別化。
- B. 成熟リンパ腫の腫瘍細胞の遺伝子発現と TH2 細胞の遺伝子発現プロファイルとの比較。
- C. 成熟リンパ腫の Ccr4 および Gata3 タンパク質の発現。

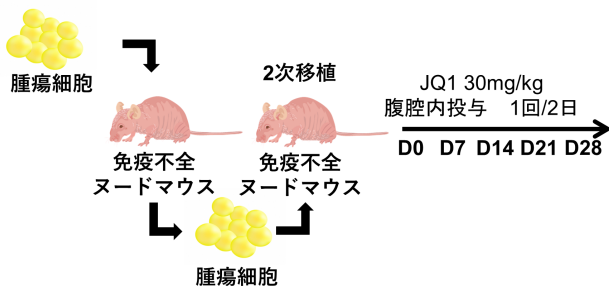
Tumor Line ID	T-LBL						Lymphoma					
	$p53^{-/-}$		$p53^{-/-}$ V-Del		$p53^{-/-}$ V-Fus		$p53^{-/-}$ V-Del		$p53^{-/-}$ V-Fus			
Notch1												
Ddx3x												
Jak1												
Tet2												
14qE4												
15qD1												
6qB1												
14qC2												
16qA1												

Legend: Blue = Nonsynonymous, Red = Frameshift indels, Purple = Amplification, Yellow = Deletion

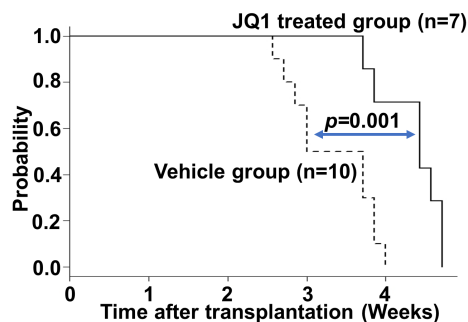
図4 得られた腫瘍細胞のゲノム異常の個体ごとのまとめ

15qD1 腫瘍細胞では *Myc* 遺伝子を含む領域で、*VAV1* 変異体を発現するマウスでのみ増幅を認めた。

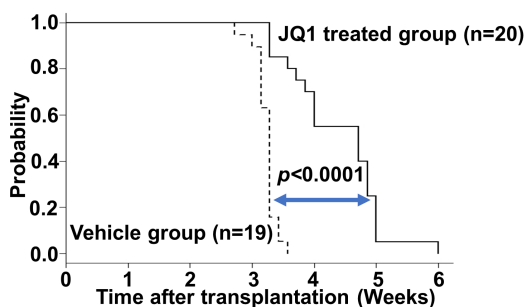
A 治療実験のプロトコル



B $p53^{-/-}$ VAV1-Tg T-LBLを移植されたマウスの生存曲線



C $p53^{-/-}$ VAV1-Tg Lymを移植されたマウスの生存曲線



D $p53^{-/-}$ T-LBLを移植されたマウスの生存曲線

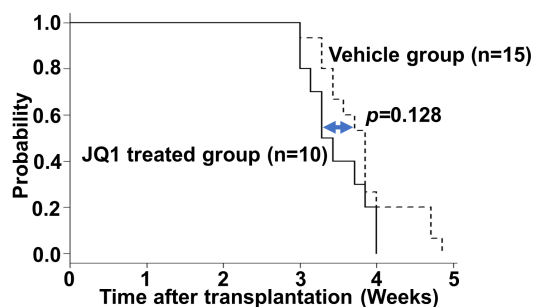


図5 MYC 阻害剤による生体内での治療実験

A. 腫瘍細胞を2次移植した免疫不全マウスを作製し、これに、Mycの活性を抑制するJQ1という薬剤を2日に1回、腹腔内投与を行った。

B-D. $p53^{-/-}$ VAV1-Tgマウスから採取したT細胞性リンパ芽球性リンパ腫 (B)、 $p53^{-/-}$ VAV1-Tgマウスから採取した成熟リンパ腫 (C)、 $p53^{-/-}$ マウスから採取したT細胞性リンパ芽球性リンパ腫 (D)を移植された免疫不全マウスのJQ1による生存曲線の改善状況の比較。

用語解説

注1) T細胞受容体シグナル

T細胞の細胞膜上に発現するT細胞受容体複合体が刺激されることにより、細胞内に伝達される一連のシグナルのこと

注2) ヘルパーT細胞

細胞表面にCD4抗原を発現しているリンパ球。分泌するサイトカインのパターンによってタイプ1 (TH1)、TH2、TH17、濾胞性ヘルパーT細胞などに分類され、他の免疫細胞を活性化させるなどの機能を持つ

注3) ブロモドメイン阻害剤

ブロモドメインはエピジェネティクスの制御に関わるタンパク質のドメインであり、これを阻害することによってがん細胞の増殖を妨げることが期待されている薬剤。

研究資金

本研究は、日本学術振興会が助成する科学研究費補助金 (基盤研究) 「血管免疫芽球性T細胞リンパ腫の病態解明と診断・治療法開発をめざす統合的アプローチ」 (研究期間:平成28~30年度)、および日本医療研究開発機構が助成する次世代がん医療創世研究事業「血液がんにおける腫瘍細胞と微小環境

との相互作用の分子メカニズムに基づく治療標的の照準化」(研究期間：平成 28～33 年度)などの研究資金によって実施されました。

掲載論文

【題名】 *VAV1* mutations contribute to development of T-cell neoplasms in mice.

(*VAV1* 変異トランスジェニックマウスにおける T 細胞性腫瘍の発生)

【著者名】 Kota Fukumoto¹, Mamiko Sakata-Yanagimoto^{1,2,3}, Manabu Fujisawa², Tatsuhiro Sakamoto^{1,2,3}, Hiroaki Miyoshi⁴, Yasuhito Suehara^{2,3}, Tran B. Nguyen², Sakurako Suma¹, Shintaro Yanagimoto⁵, Yuichi Shiraishi⁶, Kenichi Chiba⁶, Alyssa Bouska⁷, Keisuke Kataoka^{8,9}, Seishi Ogawa⁸, Javeed Iqbal⁷, Koichi Ohshima⁴, and Shigeru Chiba^{1,2,3}

1. Department of Hematology, Comprehensive Human Biosciences, University of Tsukuba.

2. Department of Hematology, Faculty of Medicine, University of Tsukuba.

3. Department of Hematology, University of Tsukuba Hospital.

4. Department of Pathology, School of Medicine, Kurume University.

5. Division for Health Service Promotion, University of Tokyo.

6. Division of Cellular Signaling, National Cancer Center Research Institute.

7. Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center.

8. Department of Pathology and Tumor Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University.

9. Division of Molecular Oncology, National Cancer Center Research Institute.

【掲載誌】 Blood

【掲載日】 2020 年 9 月 29 日

【DOI】 10.1182/blood.2020006513

問い合わせ先

【研究に関すること】

千葉 滋 (ちば しげる)

筑波大学 医学医療系 (血液内科) 教授

URL: <https://www.ketsunai.com>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報室

TEL: 029-853-2040

E-mail: kohositu@un.tsukuba.ac.jp