

令和3年度シニア・リサーチフェロー
研究成果報告書

2022年04月30日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名： 藤澤 学

研究課題：がんの本態解明に関する研究
(テーマ) 血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫のモデルマウスおよび患者サンプルのシングルセル解析による腫瘍微小環境の解明

研究期間：自 2021年04月01日

至 2022年03月31日

研究指導者：氏名 千葉 滋

公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェロ一期間中の研究について

[構成]

1) 要旨

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫 (Angioimmunoblastic T-cell lymphoma:AITL) は、*TE T2*変異を代表する加齢に伴うクローニ性造血 (ACH) を背景に持つ成熟 T 細胞リンパ腫の一つで、がん細胞は T 濾胞ヘルパー (TFH) 細胞の特徴を持つ。我々は、造血幹細胞レベルで、*T ET2*変異を獲得した後、がん細胞が G17V *RHOA* 変異を獲得することで、AITL を発症するという多段階がんモデルを提唱している。そこで今回、私は、*TET2*変異を持つ免疫細胞が AITL の発生を可能にするメカニズムについて、マウスモデルおよびヒトサンプルを用いて検討した。2 種類のマウスモデルのうち、すべての血液細胞で *Tet2* を欠損したマウス (*Mx-Cre × Tet2^{fl/fl} × G17V RHOA* トランスジェニックマウス) は約 1 年以内に TFH リンパ腫を自然発症したが、T 細胞のみで *Tet2* を欠損したマウス (*Cd4-Cre × Tet2^{fl/fl} × G17V RHOA* トランスジェニックマウス) は観察期間中にリンパ腫の発症は観察されなかった。したがって、*Tet2* 欠損炎症細胞は AITL 発症のがん微小環境ニッチとして機能していることが示唆された。

マウスとヒトの AITL サンプルから得た 5 万個以上の細胞のシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) により、活性化明帯 (light zone) 様および増殖を示す暗帯 (dark zone) 様胚中心 B (GCB) 細胞の双方の性質を示す異常 GCB 細胞の著しい拡大が確認された。さらに、マウス TFH リンパ腫の GCB 細胞は、コアヒストンに関連する遺伝子の変異を再発性に認め、独自にクローニ進化していた。scRNA-seq データを用いたインシリコネットワーク解析により、*Cd40-Cd40lg* が GCB 細胞とがん細胞群の相互作用分子として抽出された。そこで、AITL モデルマウスに抗 *Cd40lg* 阻害抗体を投与すると、生存期間が延長した。マウス腫瘍で異常に拡大した異常 GCB 細胞で発現している遺伝子は、*TET2* 変異ヒト AITL の B 細胞でも広範に発現していた。

したがって、ACH 由来の GCB 細胞は独立したクローニ進化を遂げ、CD40-CD40LG 軸を介して AITL の腫瘍化を支えている可能性が示唆された。

2) 序

血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(Angioimmunoblastic T-cell lymphoma:AITL)は成熟 T 細胞リンパ腫の一つである。5 年生存は約 3 割と稀少な難治性がんであり、革新的な治療方法の開発を目指して、研究を行う必要がある。AITL の腫瘍組織では、がん細胞は T 紛胞ヘルパー細胞(TFH 細胞)の性質をもち、さらにはさまざまな炎症細胞や纏胞樹状細胞、さらには AITL の疾患名の由来でもあるように、血管(高内皮細静脈)が増生しているという特徴がある。受け入れ研究室では、AITL に関するゲノム解析、病態解析、およびこれを臨床に応用したトランスレーショナルリサーチを含む一連の研究がおこなわれてきた(Sakata-Yanagimoto, *Nat Genet* 2014 など)。さらには、AITL におけるゲノム異常の分布から、AITL のゲノム異常は多段階に加わると考えている(「AITL の多段階発がん説」Fujisawa, *J Clin Exp Hematop* 2017)。すなわち、骨髓中の未分化な造血幹細胞がエピゲノムに関わる *TET2* 変異などの体細胞変異を獲得して「前がん細胞」となり、さらに、がん細胞に運命づけられた T 細胞がさらに *G17V RH OA* 変異を獲得することで、がん細胞となる。興味深いことに、AITL 細胞に浸潤する B 細胞には *TET2* 変異などの体細胞変異がみられることから(Nguyen, Sakata-Yanagimoto, *Blood Cancer J* 2017)、こうしたがん細胞を取り囲む炎症細胞も「前がん細胞」から分化すると考えている。さらには、「体細胞変異のある炎症細胞は、がん細胞を支持する微小環境細胞としてはたらくと考えて、研究を進めてきた。これまでに、マウスモデル(図 1A)を用いた検討から、がん細胞になることを運命づけられた T 細胞にゲノム異常(*Tet2* 欠失+*G17V RHOA* 変異体発現)を再現しただけでは腫瘍を発症せず、がん組織に浸潤するがんではない炎症細胞にも *Tet2* 欠失のある場合に AITL 様の腫瘍の発症が促進されることを明らかにしてきた(図 1B)。これらの研究背景により、「体細胞変異のある炎症細胞のがん微小環境細胞としての役割を明らかにし、これを標的とする治療コンセプトを樹立するため、受け入れ研究室では、研究課題「血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫における微小環境ネットワークの標的治療開発」(2020-2020 年度革新的がん医療実用化研究事業として採択)に取り組んできた。

私は、今回の採用期間中に、マウス TFH リンパ腫とヒト AITL におけるシングルセル解析を中心に、AITL の微小環境ネットワークの本態解明を目指して研究を行なった。

3) 実験方法

[研究計画] ヒト AITL およびマウス AITL 様腫瘍のシングルセル解析による相互作用分子の抽出

ヒト AITL リンパ節生検検体およびマウス TFH リンパ腫組織から細胞懸濁液を作製する。 Chromium(10xGenomics)を用いて、シングルセル 3'RNA シーケンス用のライブラリ作製(10x Genomics)を行う。HiseqX によりシーケンスを行う。データ解析は、スーパーコンピューター SHIROKANE を用いる。

マッピング、カウントなどの一次解析(CellRanger)を行う。二次解析としては、クオリティコントロール、データ統合、クラスタリング(いずれも Seurat)、マーカー遺伝子を用いた各クラスタのアノテーション(細胞集団の種類を推定すること)、各クラスタで優位となるシグナル経路を解析(Gene Set Variable Analysis, GSVA)する。これらにより、各クラスタのうち、AITL で増加しているクラスタを同定する。さらにはがん細胞クラスタと各細胞集団間でのネットワーク解析(CellPhoneDB)を *in silico* に行い、相互作用に関わる分子を抽出する。相互作用分子がスクリーニングされた場合には、フローサイトメトリーおよび多重組織染色法による検証を行う。

また、前述のように、AITL では炎症細胞にもゲノム異常があることが特徴的である。AITL 腫瘍組織からソーティングした各クラスタについて、全エクソン解析を行って変異分布を明らかにする。がん細胞と相互作用するクラスタについて、ゲノム異常という観点からも明らかにする。

解析症例数 ヒト AITL サンプルは 5 検体、コントロール群として外科手術症例による反応性

リンパ節 3 検体、マウス TFH リンパ腫サンプルは腫瘍サンプル 2 検体、野生型コントロールサンプル 2 検体についてシングルセルデータの解析を行った。

4) 結果

結果 1. T 細胞および微小環境炎症細胞における Tet2 欠損が TFH リンパ腫の発生を促進する

AITL 腫瘍形成における *TET2* 欠損炎症細胞の機能を評価するために、我々は p. Gly17Val *RHOA* トランスジェニックマウス (*G17Vtg*) と、すべての血液細胞で *Tet2* 欠損を示すマウス (*Mx-Cre* × *Tet2^{fl/fl}* × *G17Vtg* マウス, **MxTR**) および T 細胞のみで *Tet2* 欠損を示すマウス (*Cd4-Cre* × *Tet2^{fl/fl}* × *G17Vtg* マウス, **CD4TR**; 図 1A) を樹立した。MxTR マウスのうち 43 匹 (84.3%) は 20~60 週 (中央値、46 週; 図 1B) の潜伏期間で TFH リンパ腫を発症したが、CD4TR マウスやコントロール (MxWT または CD4WT) マウスではリンパ腫の発症は観察期間中に認められなかった (図 1B)。20 週齢および 40 週齢の MxWT、CD4TR、または CD4WT マウスと比較して、MxTR では脾臓重量および脾臓の Cd4+ T および Cd4+Pdcd1+Icos+ TFH 細胞数が増加し、TFH 様リンパ腫を発症した (図 2A-D)。これらのデータは、MxTR の *Tet2* 欠損炎症細胞が TFH 様リンパ腫の発生に寄与していることを示唆している。

腫瘍形成に寄与する微小環境内 *Tet2* 欠損炎症細胞の血液細胞系統を同定するため、MxTR の腫瘍から各血液細胞系統を分取し、6 種類の懸濁液を調製した (図 3A)。それらをヌードマウスに移植した (図 3A)。興味深いことに、B 系列細胞を Cd4+ 腫瘍含有細胞と共に移植した場合のみ、ドナー由来の腫瘍細胞が検出された (図 3B)。

これらのデータは、Cd4+ 腫瘍含有細胞と共に移植された B 細胞系統がレシピエントマウスにおける腫瘍形成に特に重要な役割を果たすことを示唆している。

結果 2. TFH リンパ腫を発症したマウスの脾臓の免疫細胞プロファイルと全トランスクriptームの包括的な解析

マウス TFH リンパ腫の免疫細胞プロファイルを定義し、全トランスクriptームを詳細に解析するため、TFH リンパ腫発症 MxTR (n = 2) およびコントロール MxWT (n = 2) の脾臓細胞を用いて scRNA-seq を行なった (図 4A)。MxTR マウスと MxWT マウスからそれぞれ 10,270 個と 10,529 個の細胞を分析した)。細胞型のアノテーションは、各クラスターにおけるマーカー遺伝子の発現に基づいて行い、15 のクラスタが同定された (図 4B-C)。15 クラスタのうち、Cd4+ T 細胞 (mT4-6 クラスタに相当) の割合は MxWT マウスに比べて MxTR で著しく増加し、一方、B 細胞 (mB1-6) の割合は減少し、Cd8+ T 細胞 (mT1-3) とミエロイド細胞 (mM1-3) の割合は同等であった (図 4D)。8 つのクラスター (mT2、mT4、mT5、mT6、mB5、mB6、mM1、mM2) に割り当てられた細胞の割合は、MxWT と比較して MxTR マウスで高かった (図 4D)。mB1-6 クラスタにおいて、MsigDB C7 遺伝子セットを用いた遺伝子セット可変解析 (Gene Set Variable Analysis, GSVA) により、mB1~mB4 群はナイーブ B 細胞またはメモリー B 細胞に相当し、mB5 および mB6 細胞はそれぞれ GCB および プラズマ細胞 (PC) 関連遺伝子セットの enrichment を示していた。B 細胞サブクラスタの生物学的分化における関連性を評価するために、Monocle3 パイプラインを用いて統合 B 細胞クラスタデータの軌跡解析を行った。mB1 クラスターの遺伝子発現プロファイルを持つ細胞を擬似時間解析の出発点とした。軌跡は予想通り、以下の順序で mB1 から mB6 へと進行した (図 5D)。ナイーブメモリー B 細胞では Ighd, Ighm, Cd27, Cd38, GCB DZ では Aicda, Mki67, GCB LZ では Basp1, Cd40, Cd83, Cd86、PC では Prdm1 や Sdc1 など、それぞれのサブタイプに固有の遺伝子が B 細胞分化状態に沿って発現していた (図 5D)。これらの結果は、GSVA で示唆された mB1-4 クラスターをナイーブメモリー B 細胞、mB5 クラスターを GCB 細胞、mB6 クラスターを PCs と命名することを支持するものであった。

mB5 クラスターに注目したのは、MxTR では MxWT に比べてその割合が非常に高く、発現差遺伝子 (DEGs) の数が最も多かったからである (図 4D)。mB5 の再クラスタリングにより、

7つのサブクラスター (GCB1-6 と PBL1 ; 図 5A) が見つかった。GCB1-4 と GCB5-6 はそれぞれ DZ と LZ に関連する遺伝子セットに富み、PBL1 ではプラズマblast (PBL) 関連の遺伝子セットに富んでいた (図 5C)。MxTR サンプルは、GCB1-3 の割合が選択的に増加した (図 5B)。MxTR GCB1-3 クラスターは、DZ (Cxcr4, Aicda, Mki67) と LZ (Cd40, Cd83) の両方のマーカーの高発現によって特徴づけられた (図 5E)。

フローサイトメトリー解析を行ったところ、GCB 細胞と PC は MxWT と比較し MxTR で有意に増加していた (図 6A-B)。この結果は、scRNA-seq によるクラスタリングの結果と一致した。

まとめると、scRNA-seq は、TFH リンパ腫が 15 のクラスターに分割されることを示した。さらに、B 細胞の中でも GCB 細胞の特徴を持つ mB5 クラスターは、MxTR で拡大し DEG 数の多い集団であった。この B5 サブクラスターは、さらに 7 つのサブクラスター (GCB1-6 と PBL1) に細分化された。その中で、MxTR で大きく拡大した 3 つのサブクラスター (GCB1-3) は、*Aicda* や *Mki67*などの増殖マーカーを発現する DZ-GCB と、*Cd40* や *Cd83*などのマーカーを発現する LZ-GCB の両方の特徴を有していた。

結果 3. TFH リンパ腫を発症した MxTR マウスから分取した *Tet2*欠損 GCB 細胞のクローン拡大

TFH リンパ腫を発症した MxTR マウスの微小環境中の GCB 細胞とがん細胞である TFH 細胞のクローン進化を解析するために、脾臓から分取したこれらの細胞の全エクソン解析 (WES) を、尾部 DNA をコントロールとして行った ($n = 5$; 図 7A)。GCB サンプルの体細胞変異の頻度は、TFH サンプルのそれよりも有意に高かった (中央値、19.0 対 1.8、 p 値 < 0.05 ; 図 7B)。5 つの GCB サンプルのうち 4 つでコアヒストンをコードする遺伝子 (*Histone2* 遺伝子に 2 個、*Histone3* 遺伝子に 4 個) に体細胞変異を確認したが、TFH サンプルではコアヒストンの変異は検出されなかった (図 7B)。c.260G>A, p.Ser87Asn (S87N) *Histone3* 変異は、5 つの GCB サンプルのうち 3 つで検出された (図 7C-D)。タンパク質の三次元構造の解析から、これらのコアヒストン変異は DNA の結合部位に位置していた (図 7E)。これらのデータは、腫瘍形成におけるクローン進化に伴い、再発性の S87N *Histone3* 変異が *Tet2*欠損 GCB 細胞に蓄積されることを示唆している。

結果 4. TFH リンパ腫の治療標的としての GCB と TFH 細胞クラスター間の Cd40-Cd40lg 相互作用の同定

*Tet2*欠損炎症細胞と TFH 細胞の間のクロストークを支えるメカニズムを解析するために、CellPhoneDB を用いて炎症細胞クラスターと TFH 細胞クラスター間の細胞間リガンド・レセプター相互作用解析を行った (図 8A)。41 の有意な相互作用 (MxWT バックグラウンドのものと比較して MxTR では 28 がより強い) を同定した。さらに、mB5 クラスター内の 11 の相互作用は、MxTR では特異的に発現が上昇したが、MxWT では上昇しなかった (図 8A)。これらの相互作用に関わる 11 の遺伝子のうち、6 つが RNA-seq 解析における MxTR と MxWT のサンプル間の DEG に共通して含まれていた (図 8B)。さらに、*Lamp1*, *Madcam1*, *Cd40* は scRNAseq 解析における mB5 クラスターで高発現していた (図 8C)。GCB 細胞の成熟に生理的に必須な分子である Cd40 のレベルは、MxTR マウスの GCB 細胞の表面と血漿中で、MxWT よりも有意に高かった (図 9A-B)。MxWT マウスの脾臓では、Cd40lg と Cd40 がそれぞれ濾胞の胚中心部の Cd4+Pdcd1+細胞と濾胞の周囲の Cd19+細胞で発現していた (図 9C)。一方、TFH リンパ腫を発症した MxTR マウスでは、濾胞構造は崩壊し (図 9C)、Cd40lg+Cd4+腫瘍細胞も Cd40+Cd19+細胞もびまん性に分布していた (図 9C)。MxTR マウスにおいて両細胞型が互いに隣接して局在する複数のニッチの存在が明らかになった (図 9C)。腫瘍を移植したヌードマウスに抗 Cd40lg 阻害抗体を投与すると、生存期間が延長した (図 9D-E)。

したがって、Cd40-Cd40lg 相互作用は、TFH 細胞と *Tet2*欠損 GCB 細胞間のクロストーク

に必須である可能性がある。

結果5. ヒトAITLサンプルにおける腫瘍内B細胞の単一細胞分解能でのトランскriptom異質性

マウスモデルから得られた知見をヒトAITLに拡張するために、5つのヒトAITLと3つの反応性リンパ節(HLN)サンプルのscRNA-seqを実施した(図10A)。TET2変異は、WESの解析が可能であった4つのAITLで同定された(図10B)。36,762細胞のscRNA-seqの教師なしクラスタリングにより、T、B、および骨髓系細胞クラスターと、増殖マーカーの存在によって特徴づけられるクラスターが同定された。T細胞とB細胞のサブクラスターは、それぞれスケーリング、PCAによる次元削減、教師なしグラフによる再クラスタリングに供された。T細胞は6つのクラスター(hT1_CCR7 [hT1], hT2_FOXP3 [hT2], hT3_PDCD1 [hT3], hT4_IKZF1 [hT4], hT5_GZMA [hT5], hT6_GNLY [hT6])に分けられた(図10C-G)。B細胞は、9つのクラスター(hB1_CIITA [hB1], hB2_IGHD [hB2], hB3_IFIT3 [hB3], hB4_FOXP1 [hB4], hB5_AIM2 [hB5], hB6_CD40 [hB6], hB7_BCL2A1 [hB7]、hB8_TOP2A [hB8]、hB9_CD38 [hB9])に分けられた(図11A-C)。注目すべきは、hT3がTCR遺伝子のオリゴクローナル再配列を伴うTFH腫瘍細胞クラスターに相当することである(図10H)。B細胞サブクラスターでは、Chung et al.とMsigDBのデータセットを用いたGSVAにより、抗アポトーシス信号因子に富むナイーブまたはメモリーB細胞クラスター(hB1-5)、増殖性およびプロアポトーシス信号因子に富むGCB(hB6-8)およびPBL(hB9)クラスターが特定された(図11D)。GCB関連遺伝子セットをhB6-8に適用したGSVAでは、hB6ではLZ～intermediate(INT)、hB7ではDZ、hB8ではPBLの遺伝子セットがenrichしていることがわかった(図12A)。GCB関連マーカーの発現は、AITLのGCB(hB6、CD40、CD83、CD69、XBP1、FOXP1、BATF)およびメモリーB細胞クラスター(hB2およびhB3、CD40およびCD83；hB5、CD40およびCD69)で有意に上昇した(図12C)。MsigDB Hallmarkを用いた遺伝子セット濃縮解析(Gene Set Enrichment Analysis, GSEA)では、LZからINT GCBへの移行に対応するhB6(図12B)で有意に濃縮された遺伝子数が最も多かった。scRNA-seqでマウスTFH様リンパ腫のmB5で高発現した遺伝子からなるAITL-B特異的遺伝子セットは、GCB(hB6)およびメモリーB細胞クラスター(hB2、3、5；図12B、青線)でenrichしていた。

従って、マウスTFH様リンパ腫で異常に拡大したGCB細胞で高発現した遺伝子は、ヒトAITLでもGCB細胞だけでなく、B細胞系統で幅広く発現していた。

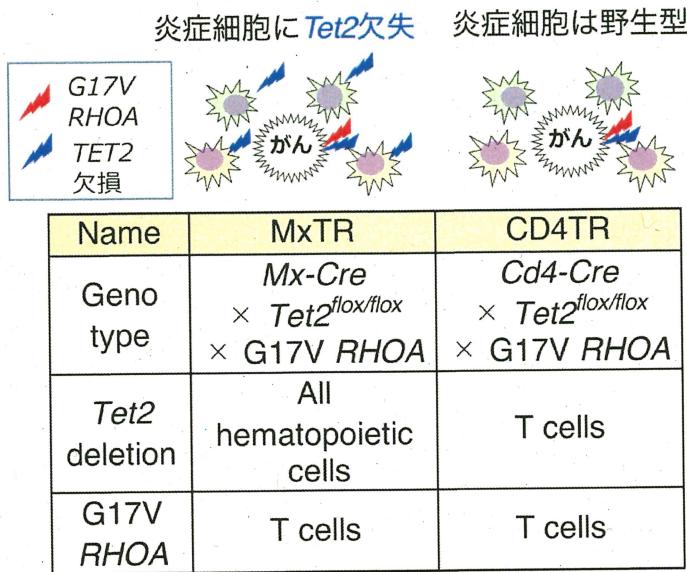
5) 考察

今回の採用期間中、私は、マウス TFH リンパ腫とヒトAITLにおけるシングルセル解析を中心に、AITLの微小環境ネットワークの本態解明を目指して研究を行なった。

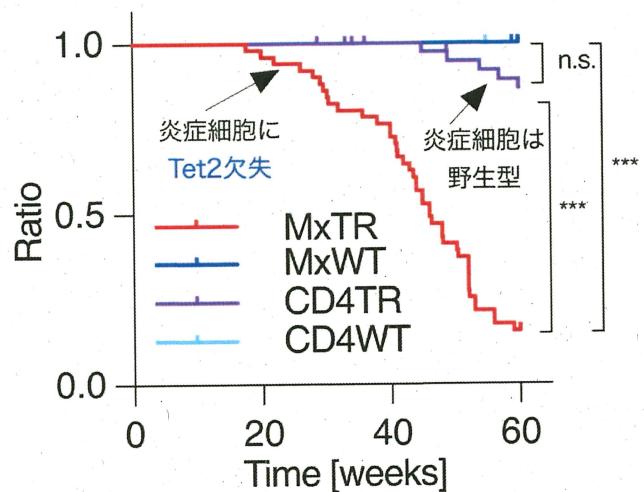
一般的に、リンパ節の濾胞内におけるGCB 細胞の成熟とTFH 細胞のクローン拡大を引き起こすためには、LZ におけるGCB 細胞の一過性の増殖の停止およびGCB-TFH 細胞間の分子間相互作用（例えば、Cd40-Cd40lg ; Icosl-IcosなどのB7 ファミリーメンバーを介して）が、重要な役割を演じている。TET2 変異を有するACH 由来のGCB 細胞は、生理的GCB 細胞を模倣しているが、それよりもはるかに大きな増殖能と活性化能を有しており、おそらくより強固な Cd40-Cd40lg 相互作用を介して、TFH 腫瘍細胞の増殖を促進する。濾胞構造の破壊は、TET2 変異を持つACH 由来のGCB 細胞が、マウス TFH 様リンパ腫の様々な部位でTFH-腫瘍細胞と相互作用することを可能にすると思われる。

コアヒストンの変異は、マウス TFH 様リンパ腫のGCB で再発した。ヒストン H1 アイソフォームをコードする遺伝子の変異は、様々なリンパ腫のサブタイプで見られ、DNA の立体構造を変え、H3K36 と H3K27 メチル化のそれぞれの増加と減少をもたらす。B 細胞におけるヒストン変異の特異的分布は、AITL 発生への本質的貢献を示唆しているが、その基礎にあるメカニズムは不明であり、今後、マウスマodelを樹立し解析を検討している。

以上、結論として、TET2 変異を有するACH 由来のGCB 細胞は、独立してクローン進化を遂げ、AITL 腫瘍形成を支援する微小環境細胞として機能していた。ACH 由来の微小環境細胞と腫瘍細胞との相互作用は、ユニークな治療ターゲットとなり得るものである。

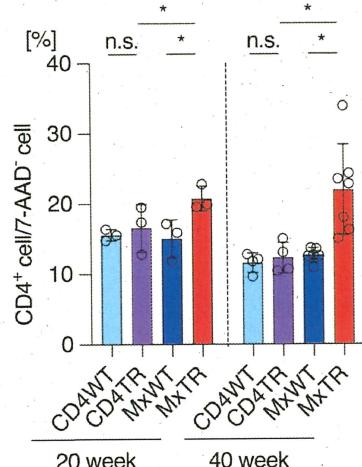
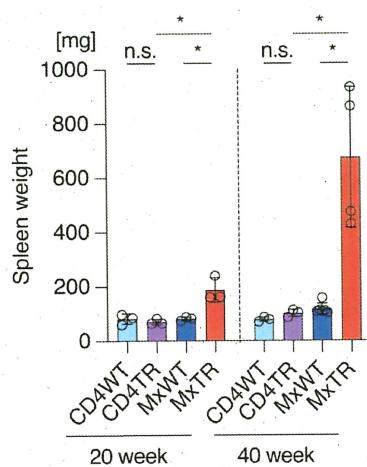


A. 樹立した二つのマウスの特徴

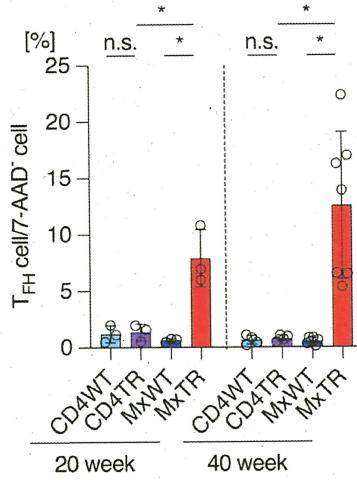
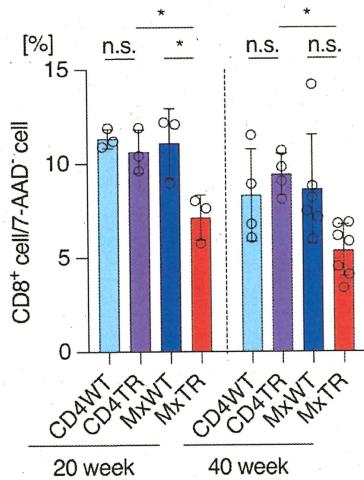
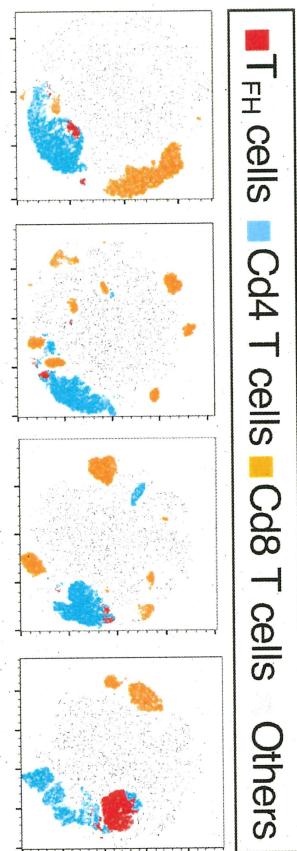


B. 生存曲線

図1. 炎症細胞の *Tet2*欠失は、TFHリンパ腫の発症を促進する

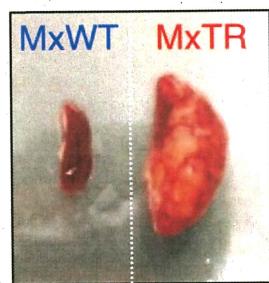


Merge

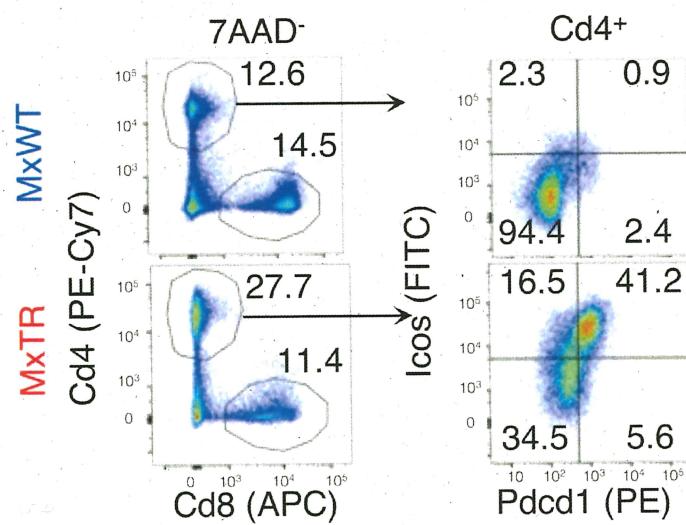


A. 脾臓の重量、T細胞の割合の経時変化

B. 図2AのT細胞画分のtSNE plot

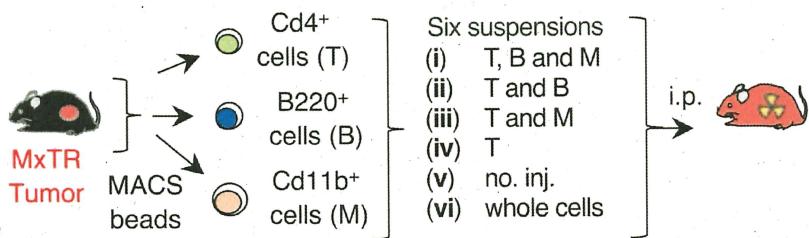


C. TFHリンパ腫発症時のMxTRの脾臓と野生型(MxWT)の脾臓

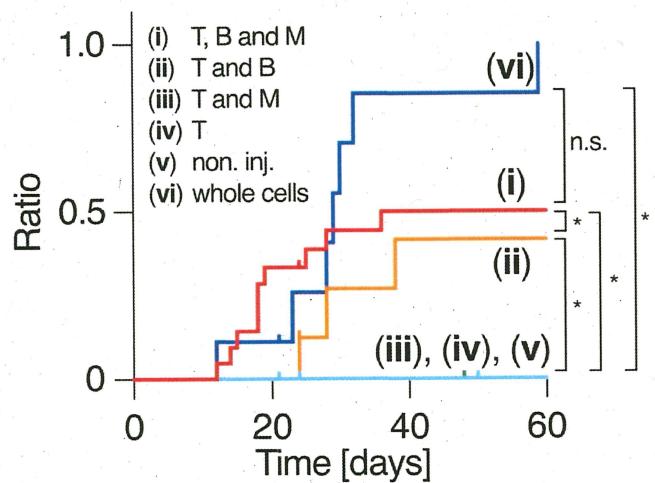


D. TFHリンパ腫発症時の脾臓におけるT細胞画分

図2. MxTRマウスは約40週でTFHリンパ腫を発症する

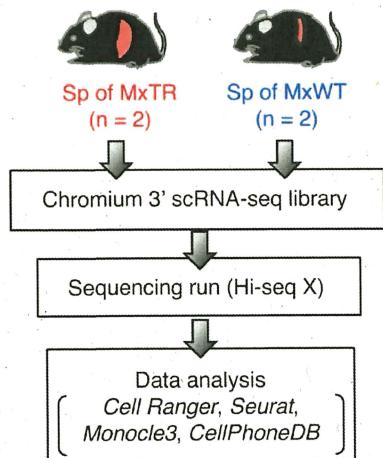


A. TFHリンパ腫から分取した分画細胞のヌードマウスへの移植

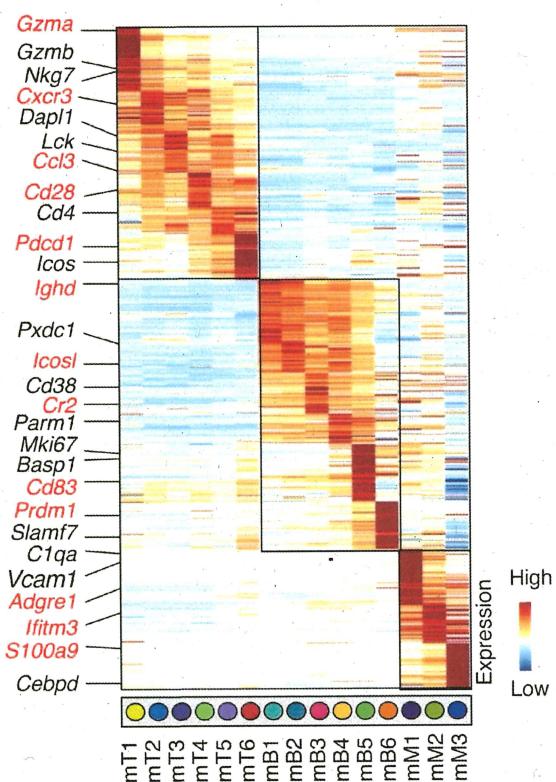


B. TFHリンパ腫の累積発生率

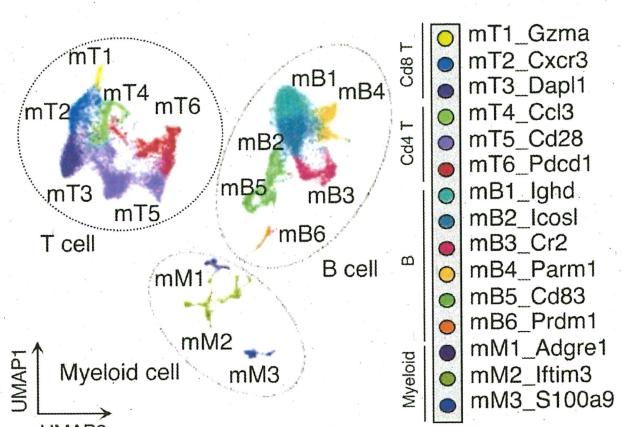
図3. MxTRマウスのTFHリンパ腫から分取された分画細胞による移植



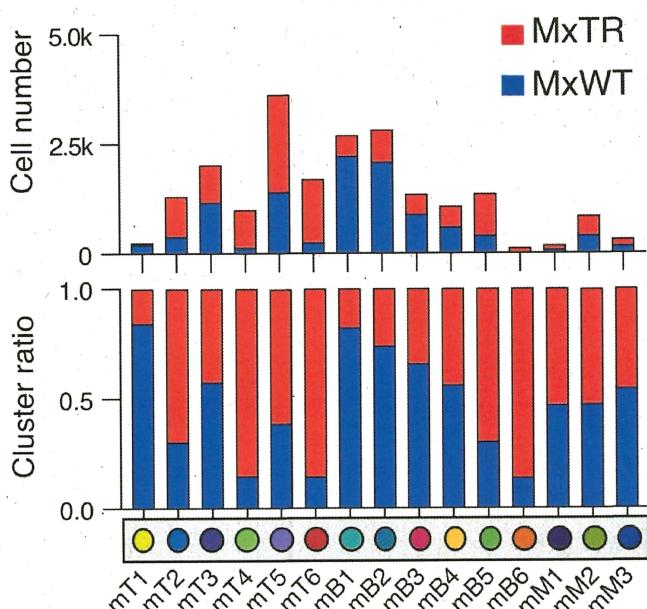
A. 脾臓細胞におけるscRNA-seqの概要



C. 各クラスタの上位50位のマーカー遺伝子のヒートマップ



B. MxTRとMxWTの統合されたデータによるUMAP



D. 各クラスタのMxTRとMxWTの細胞数と比率

図4. 腫瘍発症MxTRマウスと野生型マウスの脾臓細胞におけるscRNA-seq

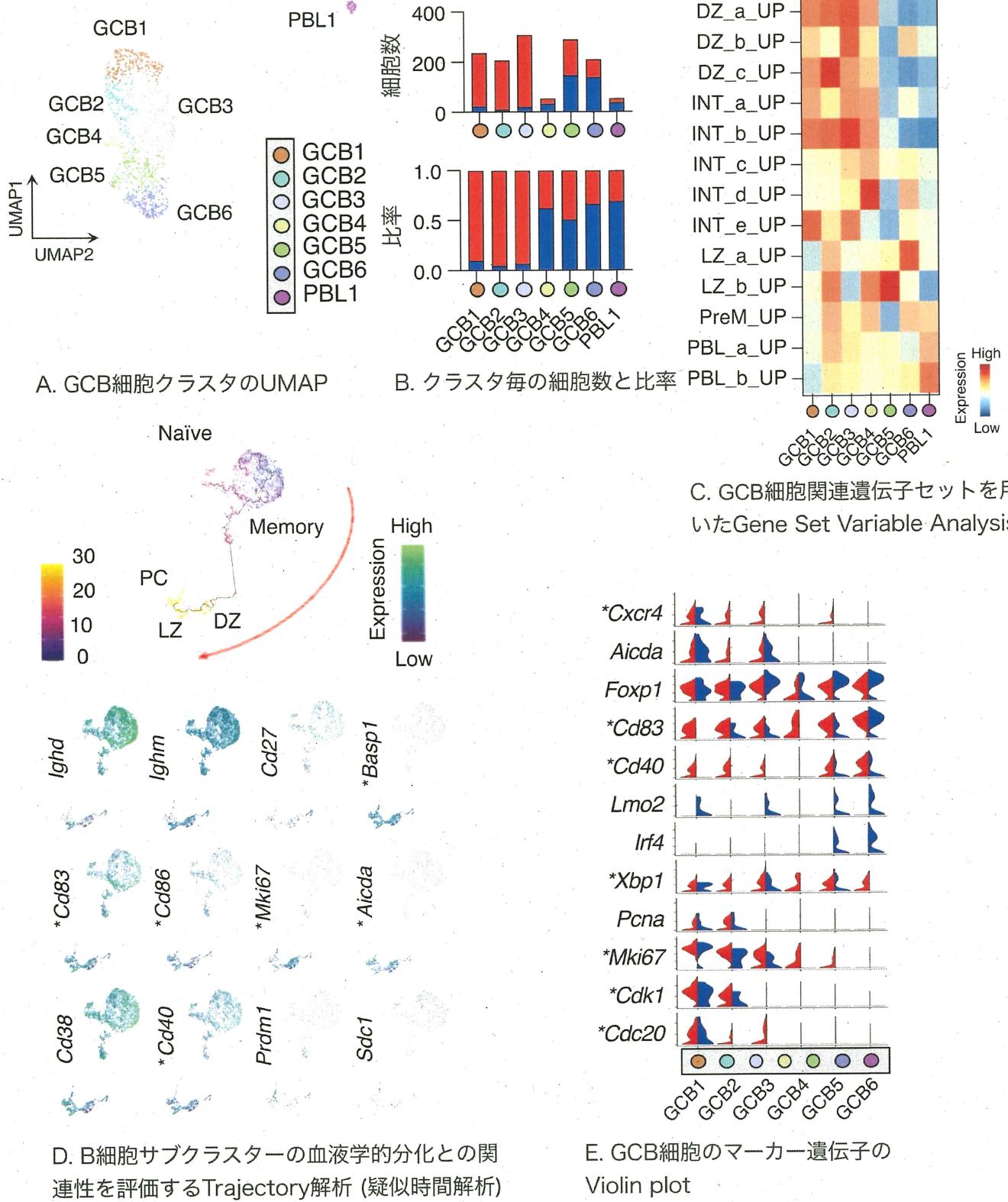
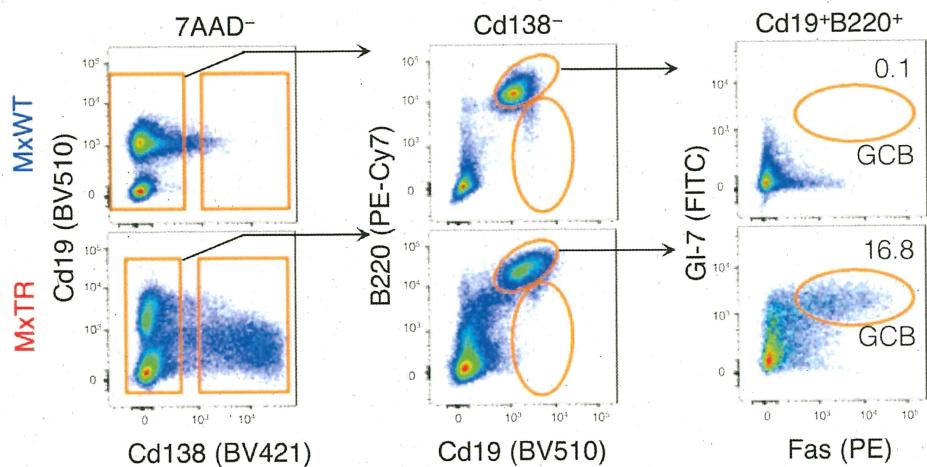
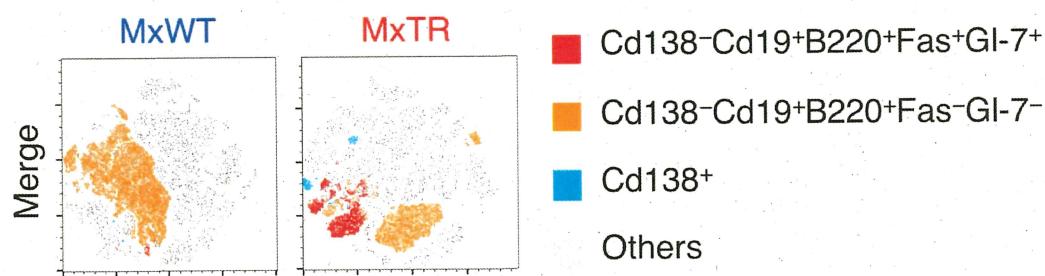


図5. GCB細胞の特徴を示す細胞のサブクラスタリング解析

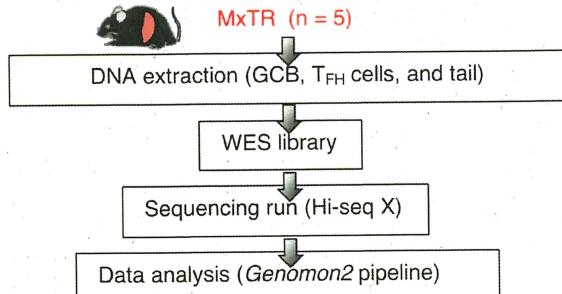


A. 脾臓細胞におけるB細胞画分のフローサイトメトリー解析

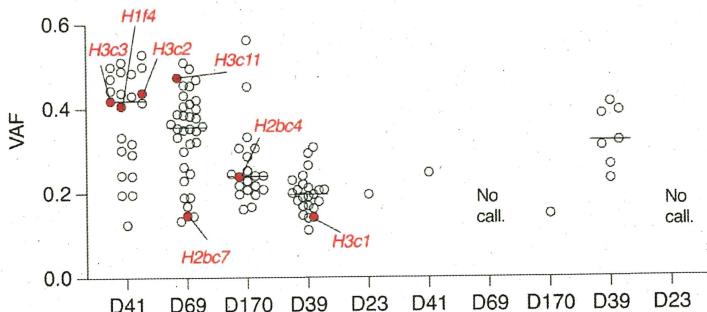


B. 図6Aのフローサイトメトリー解析のtSNE plot

図6. フローサイトメーターによるGCB細胞画分の評価



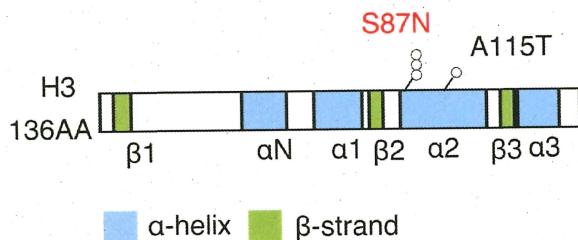
A. MxTRの脾臓のGCB、TFH細胞及び尾部の全エクソン解析の概要



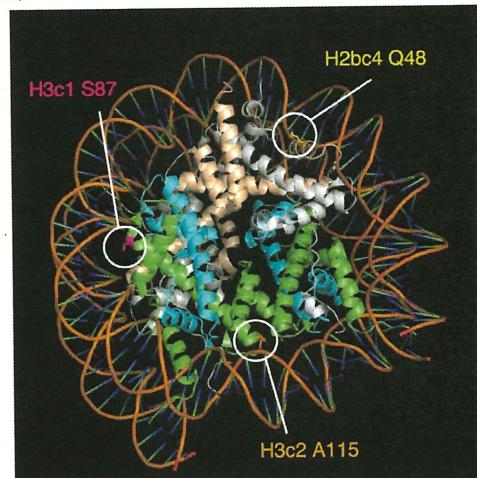
B. 全エクソン解析で検出された変異のアレル頻度

Name	Chr	Gene	AAChange	VAF
D41	13	<i>H1f4</i>	NM_015787:exon1:c.C586T:p.P196S	0.438
D41	13	<i>H3c3</i>	NM_175653:exon1:c.G260A:p.S87N	0.407
D41	13	<i>H3c2</i>	NM_178203:exon1:c.G343A:p.A115T	0.419
D69	13	<i>H3c11</i>	NM_178207:exon1:c.G260A:p.S87N	0.474
D69	13	<i>H2bc7</i>	NM_178195:exon1:c.A17C:p.K6T	0.147
D170	13	<i>H2bc4</i>	NM_001290380:exon1:c.C142A:p.Q48K	0.239
D39	13	<i>H3c1</i>	NM_013550:exon1:c.G260A:p.S87N	0.143

C. GCB細胞におけるヒストン遺伝子変異のリスト

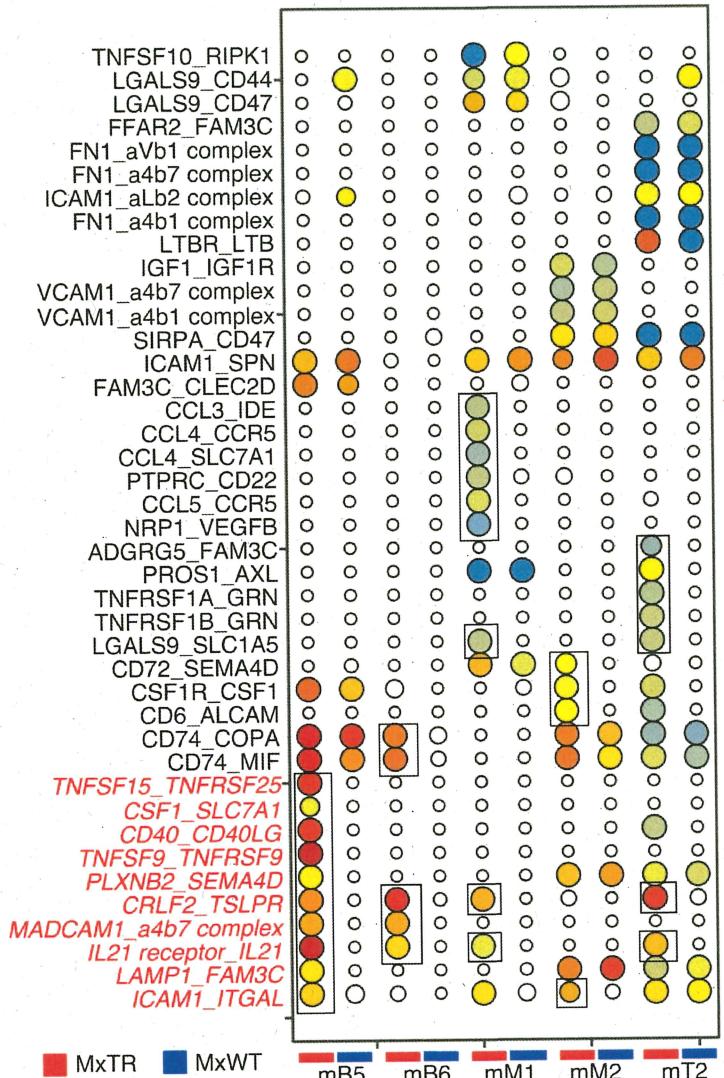


D. ヒストン3(H3)の体細胞変異の位置



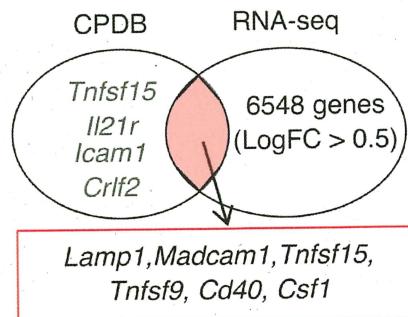
E. MxTRマウスのGCB細胞で発見された3つの変異体の相同位置を示した8つのヒストン蛋白質と二本鎖DNAを含むヌクレオソーム中核粒子の結晶構造 (PDB ID: 1U35)

図7. 腫瘍発症MxTRマウスの脾臓におけるTFH細胞とGCB細胞における全エクソン解析

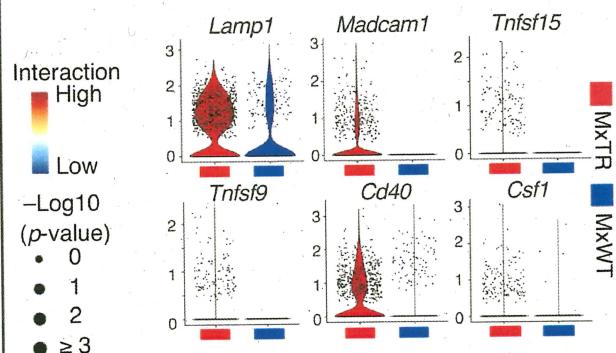


A. 免疫細胞集団とTFH-腫瘍細胞集団のインタラクトームランドスケープ

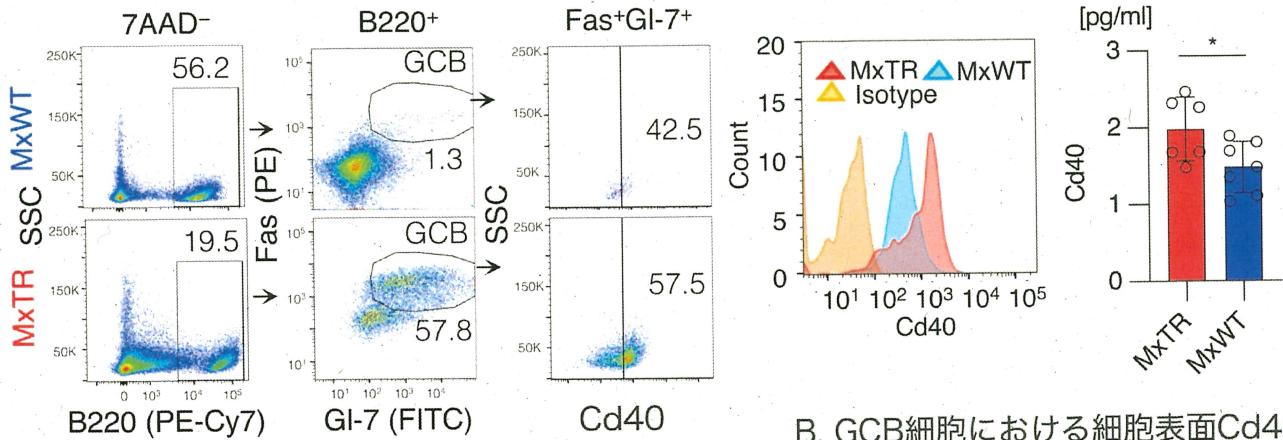
図8. GCB/TFH-腫瘍細胞集団相互作用の基盤となりうる重要なリガンド・レセプター対の同定



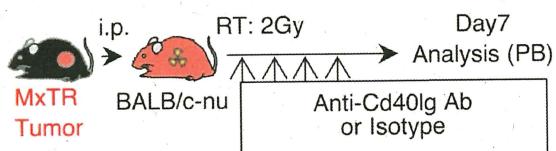
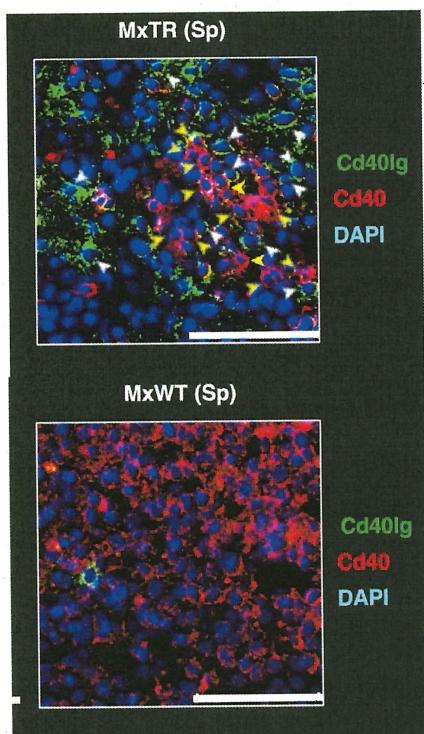
B. MxTRにおけるmB5 (GCBクラスタ)とmT6 (TFHクラスタ)の間の有意なマーク (緑) と、MxTRマウスのGCB細胞で発現が増加したマーク (青) のベン図



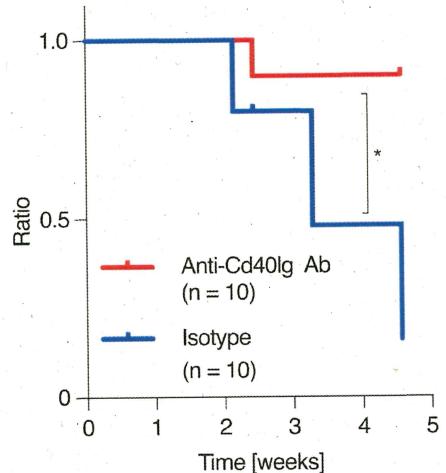
C. CPDBとRNA-seqに共通する6つのマークのViolin plot



B. GCB細胞における細胞表面Cd40の発現 (左)と血清中のCd40値 (右)

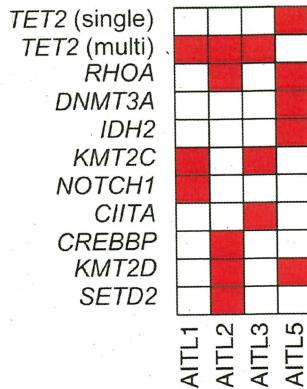
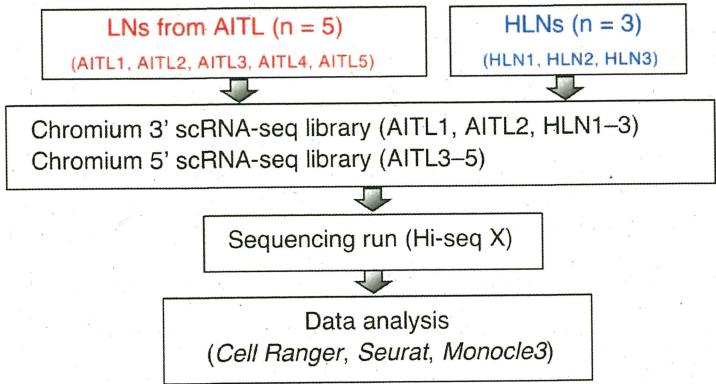


D. 抗マウスCd40Ig (C154) 抗体またはアイソタイプによる治療実験概略

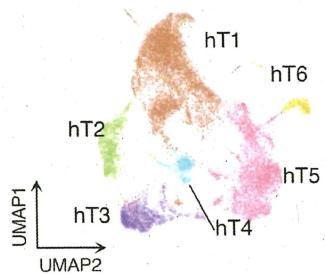


E. 抗Cd40Ig抗体 (赤)またはアイソタイプ (青)を投与したマウスの生存曲線

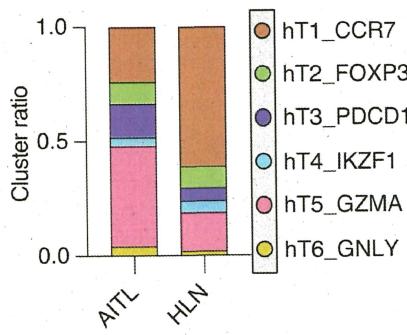
図9. GCB細胞におけるCd40の発現と抗Cd40Ig抗体による治療実験



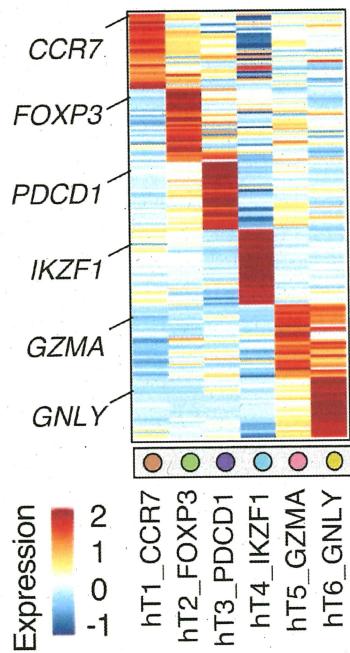
A. AITLおよび反応性リンパ節のscRNA-seqの概要



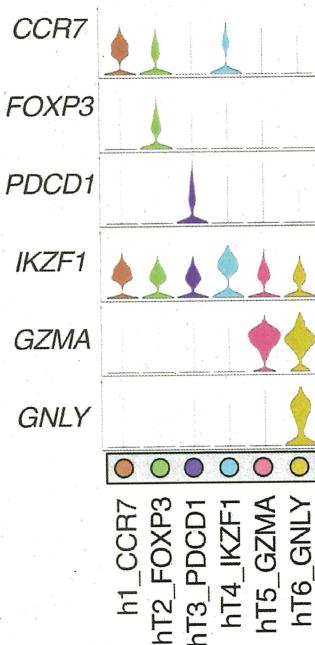
C. 総合データを、*in silico*にソートしたT細胞サブクラスターのUMAP



D. AITLまたはHLNサンプルにおける各T細胞サブクラスターの割合

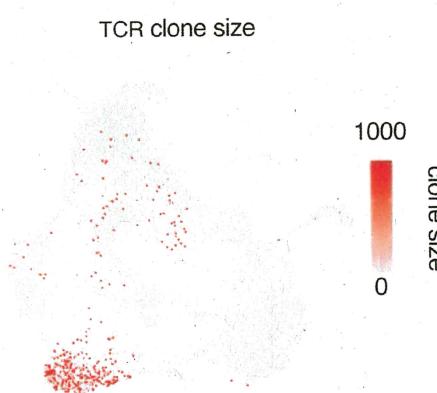
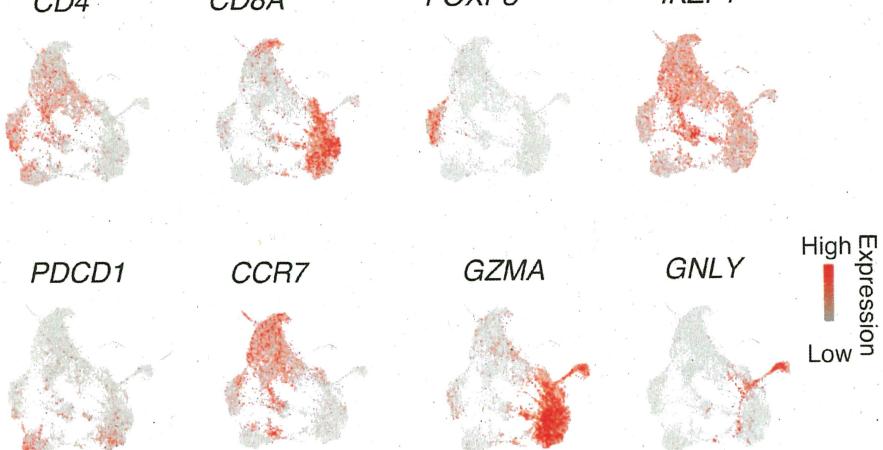


E. 上位50位のマーカー遺伝子によるHeatmap



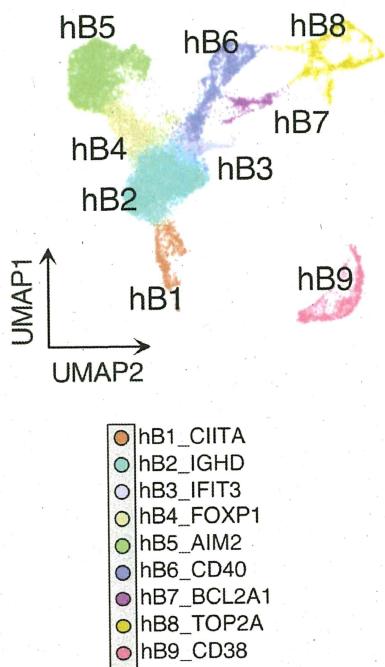
F. マーカー遺伝子のViolin plot

G. マーカー遺伝子のFeature plot

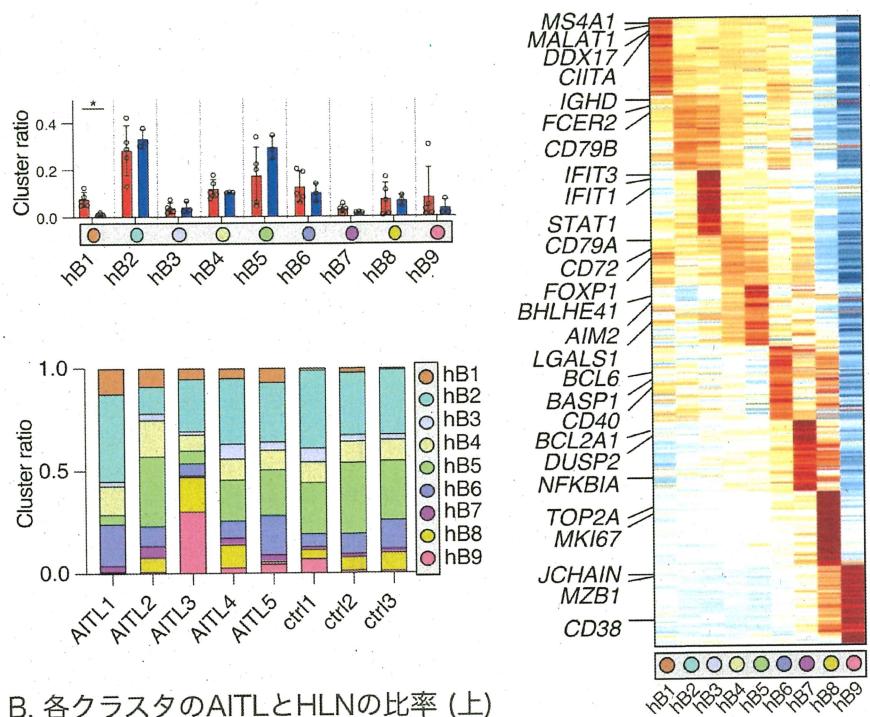


H. 各TCRクローニングタイプの大きさを示すUMAP

図10. ヒトAITL生検と反応性リンパ節におけるscRNA-seq解析

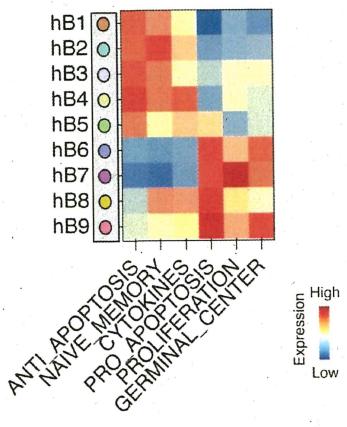


A. 統合データを、*in silico*にソートしたB細胞サブクラスターのUMAP



B. 各クラスタのAITLとHLNの比率（上）とサンプル毎の各クラスタの比率（下）

C. 上位50位のマーカー遺伝子によるHeatmap



D. 公共データベースによるGenesetを用いたGene Set Variable Analysis

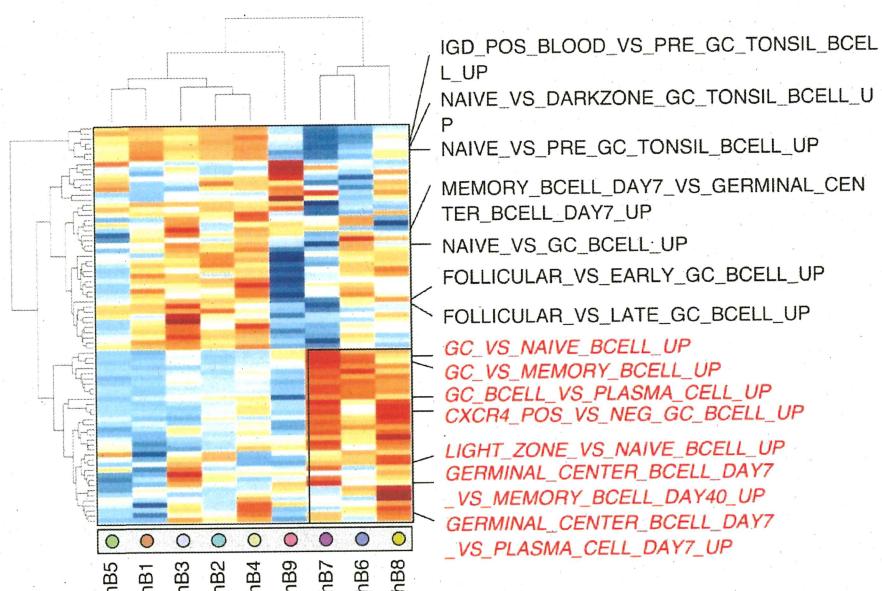
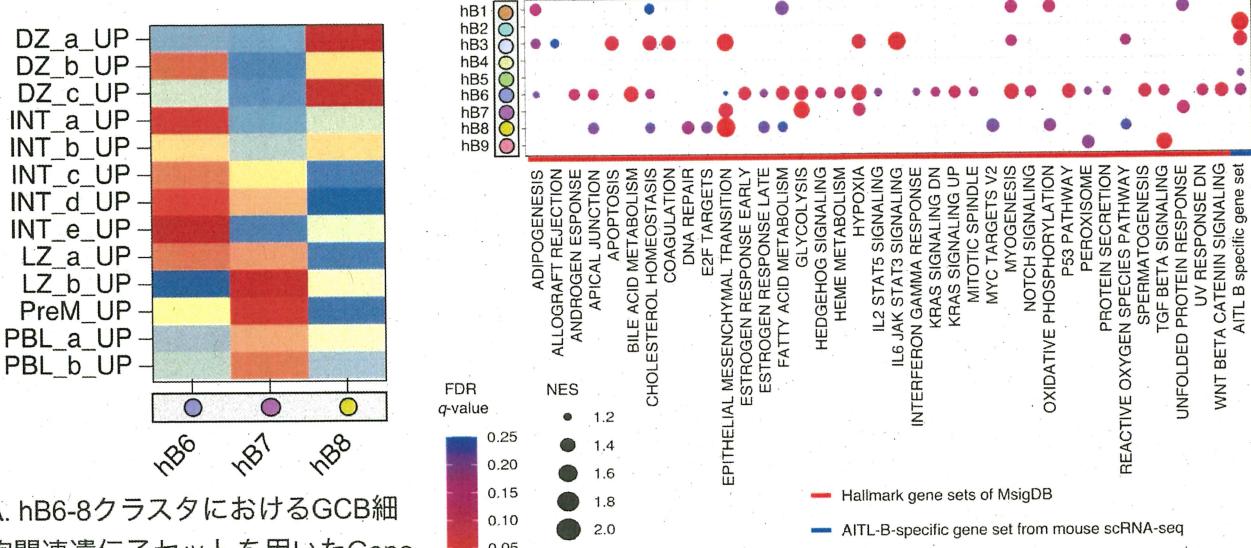


図11. AITLとHLNの統合データを、*in silico*にソートしたB細胞サブクラスターの解析



B. Hallmark geneset (赤線)およびAITL-B特異的遺伝子セット (青線)を用いたGene Set Enrichment Analysis

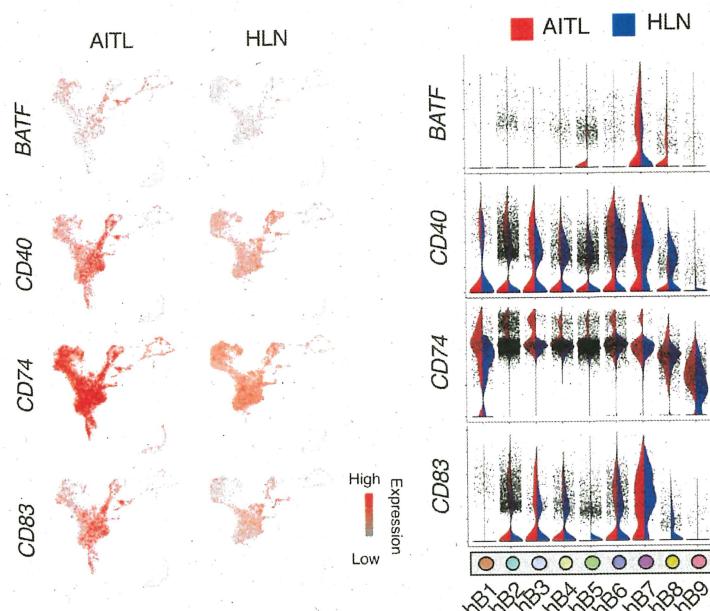
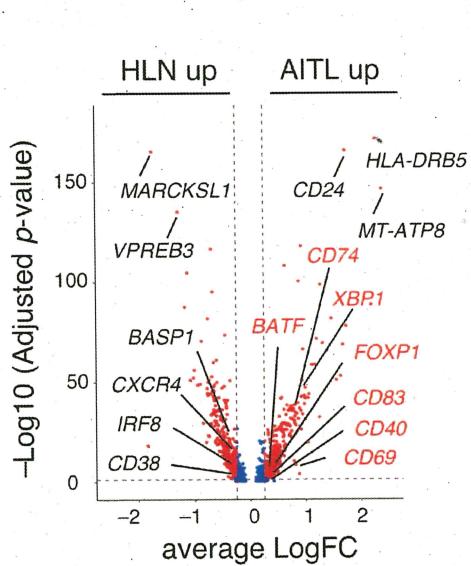


図12. ヒトAIHLサンプルは、マウスGCB細胞に類似した表現型を持つ腫瘍内B細胞を示す

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか。

この度は、シニア・リサーチフェローとしてご採用いただきありがとうございました。

受け入れ研究室は、血液内科の臨床的な研究とモデルマウスを使用した基礎実験を行なっており、私自身もマウスマodelとヒトの検体を用いて、幅広くトランスレーショナルリサーチに取り組むことができました。また、近年、発展の目覚ましいシングルセル遺伝子解析をサンプルの採取からライブラリの作製、シークエンス後の2次解析まで、自分自身で取り組むことができたことは、元々wetの実験を中心に取り組んでいた私にとっては非常に大きな経験となりました。

今回取り組んだ研究において、さらに新たな疑問（コアヒストン体部の変異の発がんにかかる機能の解明）が生まれ、マウスマodel（ヒストン変異体のノックインマウス）を作製し、さらに、研究を進めていきたいと思っています。

また今後、オリジナリティを持った研究者に発展するために、今回習得した技術をさらに発展させ、シングルセルレベルでの空間的トランскriptom解析やエピゲノム解析にも挑戦していきたいと思っています。

今回の経験を活かして、国際競争力、国際連携力を高め、研究者として更なる飛躍をしたいと考えています。ありがとうございました。