

研究報告書  
令和2年度：A課題

令和4年 4月30日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 筑波大学

住 所 茨城県つくば市天王台 1-1-1

研究者氏名 きかた やなぎもと まみこ  
坂田 (柳元) 麻実子

(研究課題)

一細胞解析を用いた悪性リンパ腫の微小環境リモデリングの解明

---

令和4年 3月 1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

[研究課題名]

一細胞解析を用いた悪性リンパ腫の微小環境リモデリングの解明

筑波大学医学医療系血液内科 教授

坂田（柳元）麻実子

[背景]

濾胞性リンパ腫は悪性リンパ腫のなかでは2番目に多く、*IgH/BCL2*転座が約9割にみられる。進行が緩やかである場合が多い一方で、根治が難しいという点が臨床上の課題である。そこで、濾胞性リンパ腫と診断した時点では、無症状の場合には「注意深く経過観察(= watch and wait)」し、疾患に関連した症状がみられるなど進行が観察されたタイミングで抗がん剤と抗体療法を組み合わせた治療を行うのが一般的である。

一方、リンパ節には間質細胞と呼ばれる細胞群が存在すること、間質細胞には、リンパ節内でのリンパ球のホーミング、さらには成熟や活性化等を促すことが報告されてきた。リンパ節の間質細胞は、古くから follicular dendritic cell (FDC)、marginal reticular cell (MRC)、T-zone reticular cell (TRC)、perivascular reticular cell (PvRC)などに大別されてきた。しかしながら、マウスリンパ節については、間質細胞の一細胞解析（シングルセル解析）の結果が報告され、リンパ球のホーミングや活性化、血管内皮のサポート等を担うと推定される新たな細胞分画（クラスター）が同定された(Rodda, Immunity 2018)。しかしながら、ヒトのリンパ節の間質細胞の多様性については、十分には明らかにされてはいなかった。我々は、濾胞性リンパ腫の進展における間質細胞の役割に着目し、研究を行ってきた。本研究では、濾胞性リンパ腫における間質細胞の多様性についてシングルセル解析技術を用いて同定し、さらには間質細胞-腫瘍細胞間の相互作用の分子基盤とこれを阻害する方

法を探索することを目的とする。

#### [実験の目的]

濾胞性リンパ腫の微小環境について、間質細胞の多様性という観点から解明するとともに、間質細胞-腫瘍細胞間のネットワークを同定し、これを阻害する新たな治療法を提案する。

#### [実験の方法]

##### 1. シングルセル解析を用いた濾胞性リンパ腫の間質細胞の多様性の同定

我々はヒトリンパ節から微量 (<1%) に存在する間質細胞を分取し、シングルセル RNA シーケンス (scRNAseq) 解析により網羅的に細胞の分布を調べる系を樹立した。濾胞性リンパ腫のリンパ節病変あるいは正常リンパ節 (がん患者の手術検体のうち浸潤のないリンパ節を正常と定義) を酵素処理により細胞懸濁液にし、セルソーター (FACS Aria) により CD45 陰性細胞分画を分取した。scRNAseq 用ライブラリを作製 (10x Genomics)、シーケンスを行い、スーパーコンピュータ SHIROKANE を用いてデータ解析を行った。一次解析は Cell Ranger (10x Genomics)、二次解析は Seurat、Monocle3 等を用いた。間質細胞分画を *in silico* に抽出し、データを統合、クラスタリングし、DEseq2、MAST などの方法により遺伝子発現差を調べた。

##### 2. 腫瘍細胞と間質細胞クラスタ間のネットワークの解明

間質細胞/腫瘍細胞のシングルセルデータについて、CellPhone DB により *in silico* に相互作用分子を同定した。

#### [結果]

濾胞性リンパ腫および正常リンパ節の非血液細胞のシングルセルデータをクラスタリングした後、間質細胞分画に相当する細胞データのみを *in silico* に抽出し、再度クラスタリングした。その結果、濾胞性リンパ腫、正常リンパ節とも、12 種類の分画に分類された。

濾胞性リンパ腫と正常リンパ節の対応する間質細胞クラスタの間で遺伝子発現差解析を行ったところ、間質細胞の各クラスタはそれぞれ 100 以上の遺伝子発現に違いがみられた。たとえば、TNF ファミリーに属する B 細胞活性化因子をコードする TNFSF13B は、正常リンパ節

では FDC で高発現するが、濾胞性リンパ腫では MRC と FDC の両方で発現し、特に MRC ではより高いレベルで発現していた。

また、間質細胞と腫瘍細胞間のネットワーク解析によれば、49 種類のネットワークが見いだされた。

#### [考察および展望]

今回の研究では、濾胞性リンパ腫および正常リンパ節の双方においてこれまでに同定されていない間質細胞の分画が同定された。これらの新たに同定された分画の機能解析をさらに進めることで、間質細胞がリンパ節において果たす役割について、さらに深く明らかにできるものと期待される。

濾胞性リンパ腫における間質細胞と腫瘍細胞のクロストークとしては CXCL13-CXCR5 シグナル (Chang, J Pathol 2003)、CXCL12-CXCR4 シグナル (Pandy, Blood 2017) 等について報告されてきた。一方で、実際のシングルセルデータを用いた *in silico* ネットワーク解析では未知のシグナルが複数同定されている。今後これらのネットワーク解析から得られたシグナルの研究を進めることにより、濾胞性リンパ腫においてあらたな治療標的探索が可能であると期待される。

#### [本研究に関連する研究成果]

Yoshiaki Abe, Mamiko Sakata-Yanagimoto (corresponding author), Manabu Fujisawa, Hiroaki Miyoshi, Yasuhito Suehara, Keiichiro Hattori, Manabu Kusakabe, Tatsuhiro Sakamoto, Hidekazu Nishikii, Tran B Nguyen, Yohei Owada, Tsuyoshi Enomoto, Aya Sawa, Hiroko Bando, Chikashi Yoshida, Rikako Tabata, Toshiki Terao, Masahiro Nakayama, Koichi Ohshima, Kensuke Usuki, Tatsuya Oda, Kosei Matsue, Shigeru Chiba.

“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. doi: 10.1038/s41556-022-00866-3.

[謝辞]

本研究を進めるにあたり、がん研究振興財団からご支援いただきましたことに感謝申し上げます。特に、研究初期のセットアップの段階からご支援をいただいたことは格別に貴重であり、その後の研究を進め、本研究成果に繋がりました。ご支援に重ねて心より感謝申し上げます。