

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07152

研究課題名(和文) クローン性造血で引き起こされるがん微小環境内の免疫応答の解明

研究課題名(英文) Characterization of immune responses in tumor microenvironment of patients with clonal hematopoiesis

研究代表者

磯部 大地 (Isobe, Taichi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：30838727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：固形がんにおいて加齢に伴うクローン性造血の合併は予後不良因子である。その機序を明らかにするために本研究では血中及び腫瘍組織中の白血球の各画分の遺伝子変異をそれぞれ解析し、クローン性造血とがん微小環境における免疫応答との関連を詳らかにすることを目的とした。解析の結果、血中及び腫瘍組織中に存在する免疫細胞の一部に遺伝子変異を認めることを確認した。認められた変異について *in vitro* での白血球の機能解析を現在行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

固形がんにおいて加齢に伴うクローン性造血の合併は予後不良因子である。今回我々の白血球画分ごとに細胞を選別した上での解析の結果、血中及び腫瘍組織中に存在する免疫細胞の一部に遺伝子変異を認めることを確認した。現在行っている機能解析により、クローン性造血由来の免疫細胞が腫瘍進展を制御できない機序を明らかにできれば、クローン性造血を標的としたがん治療の開発の足掛かりとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In solid cancers, the coexistence of clonal hematopoiesis with aging is a poor prognostic factor. To elucidate its mechanism, this study aims to analyze genetic mutations in each fraction of leukocytes in both blood and tumor tissue, clarifying the relationship between clonal hematopoiesis and immune responses in the tumor microenvironment. As a result of our analyses, genetic mutations were identified in some immune cells present in both blood and tumor tissue. Currently, functional analysis of leukocytes with identified mutations is being conducted *in vitro*.

研究分野：がん

キーワード：クローン性造血 大腸がん 腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の周囲には、炎症細胞、血管・リンパ管、線維芽細胞、細胞外基質などの間質が存在する。がんの進展において、これらの周囲組織から成る微小環境が重要な役割を果たしている。このがん微小環境における白血球 (=腫瘍浸潤白血球) は腫瘍浸潤リンパ球 (TIL)、骨髄由来抑制細胞 (MDSC)、腫瘍関連マクロファージ (TAM) 等へ分類され、腫瘍免疫応答に関与する。例えば、乳癌においては TIL の定量値が予後と相関することが判明しており、がんとの関連が明らかになりつつある。しかしながら、腫瘍浸潤白血球の構成割合は腫瘍要因のみならず宿主要因に依る部分も大きく、それを規定する因子は不明な点も多い。

ところで、加齢に伴い体細胞遺伝子変異を生じた造血幹細胞がクローン性に増殖し、造血の一部を担うことがあり、これをクローン性造血 (Clonal Hematopoiesis、以下 CH) と呼ぶ。これは白血病の前がん病変ではあるものの、白血病に進展する頻度は小さく、また一般的な検査値や形態学の異常を呈さない。変異を認める遺伝子として *TET2* と *DNMT3A* が約 2/3 を占める (Jaiswal S. et al., *NEJM* 2014; Genovese G. et al., *NEJM* 2014; Xie M. et al., *Nat Med* 2014)。CH を有する場合、有さない者と比較して死亡リスクが高いが、原因として白血病発症のリスク上昇による寄与は小さく、意外にも動脈硬化性疾患のリスク上昇の寄与が大きい (Jaiswal S. et al., *NEJM* 2017)。この機序としてマウスモデルにおいて、*Tet2* 変異を有するマクロファージが動脈壁へ高度に浸潤し、IL-1 β の上昇を介した炎症が惹起され、動脈硬化が進行することが分かっている (Fuster J. et al., *Science* 2017)。また、CH を合併するドナーからの異種骨髄移植を受けた患者は移植片対宿主病のリスクが上昇 (Frick M. et al., *J Clin Oncol* 2019) する、*TET2* の機能欠失変異によるクローン性造血を合併する悪性リンパ腫の患者において、CAR-T 細胞療法の活性が上昇する (Fraiatta JA. et al., *Nat Med* 2018) など、CH は様々な免疫応答に大きく影響すると推察される。

そのような中で、末梢血の解析の結果、がん患者において CH を合併するという報告がなされるようになった。固形がん患者 8,000 例程度を対象とした解析では、CH を合併したがん症例は予後不良であった (Coombs CC. et al. *Cell Stem Cell* 2017)。予後不良の原因として、二次性白血病の発症数や合併症の頻度ではなく、原疾患であるがんの進行が考えられている。

以上の背景から、CH を合併するがん患者では、遺伝子変異を有する腫瘍浸潤免疫細胞が、がんの微小環境においてがんの進展に有利な免疫環境を構築している (図 1) と想定される。免疫チェックポイント阻害薬をはじめとした治療が標準化してきた昨今において、免疫細胞を含めたがん微小環境成立のメカニズムを明らかにすることは、その治療成績向上には不可欠である。そのためには患者のがん臨床検体を用いた探索的解析が必要である。

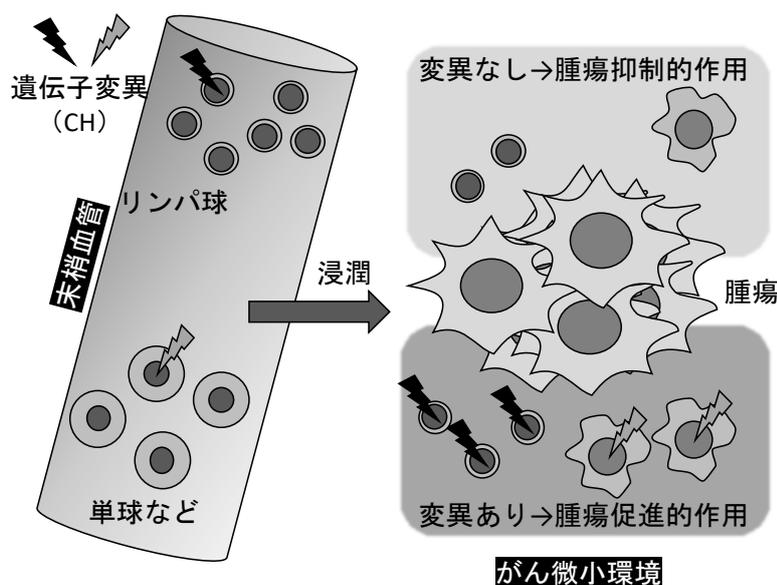


図1. 仮説：クローン性造血由来免疫細胞は腫瘍に有利な微小環境を構築する

2. 研究の目的

本研究の目的は、「CH ががん微小環境における免疫応答をどう変化させるか」を明らかにすることである。

がんと CH の作用点として考慮されるのは、がん局所のがん微小環境である。そのため、本研究の目的は、がん微小環境における CH がもたらす免疫応答の変化を明らかにすることである。細胞傷害性 T 細胞や腫瘍関連マクロファージなど、がんに浸潤する白血球は均一ではなく、機能のそれぞれ異なる様々な白血球分画から構成されている。

そこで、本研究では、末梢血検体とがん組織検体から採取した白血球の分画ごとに遺伝子変異の解析を行うこととする。さらには、CH における遺伝子変異が免疫応答にどのような影響を与えるか、について変異を有する細胞の機能解析を行うことで、CH が固形がんに与える影響について核心的な情報を付与することができる。

3. 研究の方法

大腸がん手術検体を酵素処理で単細胞にし、フローサイトメトリーで解析を行う。腫瘍組織浸潤白血球について、セルソーティングを行い細胞分画ごとに DNA ライブラリを作製し、次世代シーケンサーを用いて塩基配列決定を行う。細胞分画ごとの変異遺伝子、変異アレル頻度を解析する。同時に末梢血についてもセルソーティングを用いて細胞分画ごとに塩基配列決定をおこい、腫瘍組織浸潤白血球と比較する。

腫瘍組織に浸潤をした CH 由来白血球に認めた機能欠失型遺伝子変異について着目し、遺伝子ノックダウンを用いて遺伝子発現や機能の変化について解析を行う。

4. 研究成果

フローサイトメトリーを用いた解析では、がん組織から単離した CD45 陽性腫瘍浸潤白血球のうち、CD3 陽性リンパ球は 60~80%、CD14 陽性骨髄系細胞（マクロファージなど）は 1~3%であった。セルソーターにより各白血球画分を分けて回収し、DNA シークエンスのために各画分から DNA の抽出を行なった。回収できる細胞数の少ない CD14 陽性細胞などの白血球画分は、DNA の増幅を行なった後にライブラリ調整を行なった。DNA 増幅を行うにあたり、事前に至適な増幅条件（試薬、鋳型 DNA 量、増幅反応時間）についても検討した。

ライブラリ調整の終了した検体で DNA シークエンスを行い、解析を行った大腸がん症例の約 2 割の末梢血中に CH に由来する遺伝子変異を持つ白血球を認めた。さらに腫瘍組織中に存在する免疫細胞の一部にも同様の遺伝子変異を認めることを確認した。一部の症例では CH 由来白血球は末梢血に存在するにもかかわらず、腫瘍細胞内には浸潤を認めなかった。一方、エピゲノム修飾タンパクをコードする遺伝子に変異を有する CH 由来白血球細胞は末梢血中と同様に腫瘍組織にも浸潤していた。

現在はエピゲノム修飾タンパクをコードする遺伝子の変異について shRNA を用いたノックダウンを行い、マクロファージの分化について *in vitro* で確認を進めている。今後はさらに症例数を増やし、検証を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 12件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ito Mamoru, Nakano Michitaka, Ariyama Hiroshi, Yamaguchi Kyoko, Tanaka Risa, Semba Yuichiro, Sugio Takeshi, Miyawaki Kohta, Kikushige Yoshikane, Mizuno Shinichi, Isobe Taichi, Tanoue Kenro, Taguchi Ryosuke, Ueno Shohei, Kawano Takahito, Murata Masaharu, Baba Eishi, Akashi Koichi	4. 巻 532
2. 論文標題 Macrophages are primed to transdifferentiate into fibroblasts in malignant ascites and pleural effusions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 215597 ~ 215597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2022.215597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Kyoko, Yoshihiro Tomoyasu, Ariyama Hiroshi, Ito Mamoru, Nakano Michitaka, Semba Yuichiro, Nogami Jumpei, Tsuchihashi Kenji, Yamauchi Takuji, Ueno Shohei, Isobe Taichi, et al	4. 巻 25
2. 論文標題 Potential therapeutic targets discovery by transcriptome analysis of an in vitro human gastric signet ring carcinoma model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastric Cancer	6. 最初と最後の頁 862 ~ 878
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10120-022-01307-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kusaba Hitoshi, Moriyama Shohei, Hieda Michinari, Ito Mamoru, Ohmura Hirofumi, Isobe Taichi, Tsuchihashi Kenji, Fukata Mitsuhiro, Ariyama Hiroshi, Baba Eishi	4. 巻 52
2. 論文標題 IMPROVE bleeding score predicts major bleeding in advanced gastrointestinal cancer patients with venous thromboembolism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 367 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyac103	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshihiro Tomoyasu, Ariyama Hiroshi, Yamaguchi Kyoko, Imajima Takashi, Yamaga Satoru, Tsuchihashi Kenji, Isobe Taichi, Kusaba Hitoshi, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of insulin like growth factor 1 receptor enhances eribulin induced <scp>DNA</scp> damage in colorectal cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4207 ~ 4218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15558	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Michitaka, Taguchi Ryosuke, Kikushige Yoshikane, Isobe Taichi, Miyawaki Kohta, Mizuno Shinichi, Tsuruta Nobuhiro, Hanamura Fumiyasu, Yamaguchi Kyoko, Yamauchi Takuji, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Nakamura Masafumi, Maeda Takahiro, Kuo Calvin J., Baba Eishi, Akashi Koichi	4. 巻 -
2. 論文標題 RHAMM marks proliferative subpopulation of human colorectal cancer stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 磯部 大地、馬場 英司	4. 巻 29
2. 論文標題 新しいがん治療法 2) 抗体薬物複合体 (ADC)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 535 ~ 543
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 磯部 大地、馬場 英司	4. 巻 30
2. 論文標題 免疫チェックポイント阻害薬の併用療法のエビデンス 2) 免疫チェックポイント阻害薬と化学療法	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 腫瘍内科	6. 最初と最後の頁 8 ~ 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi Kyoko, Tsuchihashi Kenji, Tsuji Kunihiro, Kito Yosuke, Tanoue Kenro, Ohmura Hirofumi, Ito Mamoru, Isobe Taichi, Ariyama Hiroshi, Kusaba Hitoshi, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 100
2. 論文標題 Prominent PD-L1-positive M2 macrophage infiltration in gastric cancer with hyper-progression after anti-PD-1 therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e25773 ~ e25773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000002573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Eijiro, Endo Makoto, Matsumoto Yoshihiro, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Does the Use of Peripheral Immune-Related Markers Indicate Whether to Administer Pazopanib, Trabectedin, or Eribulin to Advanced Soft Tissue Sarcoma Patients?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 4972 ~ 4972
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10214972	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Palovics Robert, Keller Andreas, Schaum Nicholas, et al.	4. 巻 603
2. 論文標題 Molecular hallmarks of heterochronic parabiosis at single-cell resolution	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 309 ~ 314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-04461-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hisamori Shigeo, Mukohyama Junko, Koul Sanjay, Hayashi Takanori, Rothenberg Michael Evan, Maeda Masao, Isobe Taichi, Valencia Salazar Luis Enrique, Qian Xin, Johnston Darius Michael, Qian Dalong, Lao Kaiqin, Asai Naoya, Kakeji Yoshihiro, Gennarino Vincenzo Alessandro, Sahoo Debashis, Dalerba Piero, Shimono Yohei	4. 巻 -
2. 論文標題 Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-022-01865-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Zhao Jia, Wang Gefei, Ming Jingsi, et al.	4. 巻 2
2. 論文標題 Adversarial domain translation networks for integrating large-scale atlas-level single-cell datasets	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Computational Science	6. 最初と最後の頁 317 ~ 330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s43588-022-00251-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Uehara Koki, Tanoue Kenro, Yamaguchi Kyoko, Ohmura Hirofumi, Ito Mamoru, Matsushita Yuzo, Tsuchihashi Kenji, Tamura Shingo, Shimokawa Hozumi, Isobe Taichi, Shibata Yoshihiro, Ariyama Hiroshi, Tanaka Risa, Kusaba Hitoshi, Yamamoto Hidetaka, Oda Yoshinao, Akashi Koichi, Baba Eishi	4. 巻 72
2. 論文標題 Preferential B cell differentiation by combined immune checkpoint blockade for renal cell carcinoma is associated with clinical response and autoimmune reactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Immunology, Immunotherapy	6. 最初と最後の頁 3543 ~ 3558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00262-023-03505-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchihashi Kenji, Ito Mamoru, Arita Shuji, et al.	4. 巻 23
2. 論文標題 Survival outcomes including salvage therapy of adult head and neck para-meningeal rhabdomyosarcoma: a multicenter retrospective study from Japan	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-023-11528-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ryosuke Taguchi, Isobe Taichi, Yoshikane Kikushige, Shohei Ueno, Kenji Tsuchihashi, Hiroshi Ariyama, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 DNMT3B contributes to the stemness of left-sided colorectal cancer derived from patients
3. 学会等名 第19回 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryosuke Taguchi, Isobe Taichi, Yoshikane Kikushige, Shohei Ueno, Kenji Tsuchihashi, Hiroshi Ariyama, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 DNMT3B maintains the organoid-formation ability of left-sided colorectal cancer derived from patients
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shohei Ueno, Isobe Taichi, Ryosuke Taguchi, Kenji Tsuchihashi, Hiroshi Ariyama, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 The amplification of TPX2 is a potential biomarker of oxaliplatin-susceptibility in colorectal cancer
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shohei Ueno, Isobe Taichi, Ryosuke Taguchi, Kenji Tsuchihashi, Hiroshi Ariyama, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 The amplification of TPX2 is a potential biomarker of oxaliplatin-susceptibility in colorectal cancer with CIN phenotype
3. 学会等名 第20回 日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taichi Isobe, Kenji Tsuchihashi, Shohei Ueno, Ryosuke Taguchi, Mamoru Ito, Michitaka Nakano, Hiroshi Ariyama, Fumiyasu Hanamura, Yuta Okumura, Masato Komoda, Taito Esaki, Shuji Arita, Kenta Nio, Hitoshi Kusaba, Kazuki Hashimoto, Tadamasa Yoshitake, Yoshinao Oda, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 Outcome of parameningeal head and neck rhabdomyosarcoma in adults: Kyushu Medical Oncology Group Study
3. 学会等名 第20回 日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田口 綾祐
2. 発表標題 DNMT3B contributes to the organoid-formation ability of colorectal-cancer cells derived from patients.
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shohei Ueno, Taichi Isobe, Ryosuke Taguchi, Kenji Tsuchihashi, Koichi Akashi, Eishi Baba
2. 発表標題 TPX2-amplified is a biomarker of oxaliplatin-sensitivity of colorectal cancers (CRCs) with CIN phenotype
3. 学会等名 第82回 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	菊繁 吉謙 (Kikushige Yoshikane) (40619706)	九州大学・大学病院・講師 (17102)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	田口 綾祐 (Taguchi Ryosuke)	九州大学・医学系学府・博士課程 (17102)	
研究 協力者	上野 翔平 (Ueno Shohei)	九州大学・医学系学府・博士課程 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------