

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22554

研究課題名(和文) クローン性造血と固形腫瘍のクロストーク

研究課題名(英文) Crosstalk between clonal hematopoiesis and solid tumors

研究代表者

合山 進 (Goyama, Susumu)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80431849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年のゲノム解析により、特定の遺伝子変異を持つ血液細胞が増殖する「クローン性造血」が、固形腫瘍患者で高頻度に認められることが明らかとなった。本研究では、変異型ASXL1ノックインマウスをクローン性造血のモデルマウスとして活用し、ASXL1変異を持つ血液細胞が固形腫瘍の増殖に及ぼす影響を検証した。その結果、T細胞特異的に変異型ASXL1を発現させたマウス内で、固形腫瘍の増殖が亢進することが判明した。これらの結果は、クローン性造血原因遺伝子ASXL1のT細胞における変異が、腫瘍免疫反応を変化させることで固形腫瘍の発症・進展を促進している可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身を流れる血液細胞の異常は万病の基となり、様々な疾患発症や老化の原因となる。近年のゲノム解析により、特定の遺伝子変異を持つ異常な血液細胞がクローン性に増殖する「クローン性造血」が、健康な高齢者の血液中にしばしば認められることがわかってきた。そして本研究により、クローン性造血原因遺伝子ASXL1の変異を持つ血液細胞が、固形腫瘍の発症・進展を促進していることが明らかとなった。この成果は、今後の血液細胞を標的としたがん予防やがん治療の開発に大いに貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Recent sequencing analyses have revealed that clonal expansion of hematopoietic cells with acquired somatic mutations is common in aged healthy individuals. This phenomenon is called clonal hematopoiesis (CH). The most frequently mutated genes in CH include DNMT3A, TET2, and ASXL1. Interestingly, CH is particularly prevalent in solid tumor patients and its presence has an adverse impact on their overall survival. Using knockin mice that express CH-associated ASXL1-mutant (ASXL1-MT), we found that T cell-specific expression of ASXL1-MT accelerated the growth of melanoma, lung and colon cancer cells in syngraft mouse cancer models. ASXL1-MT-expressing hematopoietic cells also promoted the development of spontaneous breast cancer in the MMTV-PyMT model. Furthermore, we found that ASXL1-MT caused T cell population imbalance with a substantial reduction of naive T cells. Our results raise the possibility that CH has a causal role to promote the growth of solid tumors.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：クローン性造血 固形腫瘍 ASXL1

## 1. 研究開始当初の背景

近年のゲノム解析により、特定の遺伝子変異を持つ異常な血液細胞がクローン性に増殖する「クローン性造血」が、健康な高齢者の血液中にしばしば認められることが明らかになった。さらに、固形腫瘍患者ではクローン性造血の存在頻度が非常に高く、また、クローン性造血を有する患者の予後は悪いことが判明した。この観察結果は、**固形腫瘍の存在やそれに対する化学療法が異常な血液細胞のクローン性増殖を促進し、増殖した異常な血液細胞が今度は固形腫瘍の生存を促進するという、悪性サイクルの存在を示唆している**(Fig.1)。しかし、クローン性造血と固形腫瘍がどのような相互作用を介してお互いの進展を制御しているのかは不明であった。

クローン性造血の原因として、エピゲノム制御因子 *DNMT3A*、*TET2*、*ASXL1* 遺伝子の変異や、癌抑制遺伝子 *TP53* の変異が知られている。申請者の研究室では、変異型 *ASXL1* の条件的ノックインマウスと *Vav-Cre* マウスを掛け合わせ、造血細胞特異的に変異型 *ASXL1* を発現するマウスを作製した。このマウスは (1)通常の飼育状態では血液データは正常だがストレスや加齢に伴い血液細胞分化の異常を示す、(2)そこに付加的異常を加えることにより造血器腫瘍を発症する、という点でヒトのクローン性造血の状態を極めて良く反映していた(*JEM 2018*)。そこで、変異型 *ASXL1* ノックインマウスをクローン性造血のモデルマウスとして活用し、固形腫瘍との関連を評価する本研究を着想した。

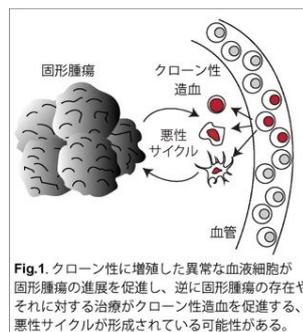


Fig.1. クローン性に増殖した異常な血液細胞が固形腫瘍の進展を促進し、逆に固形腫瘍の存在やそれに対する治療がクローン性造血を促進する、悪性サイクルが形成されている可能性がある。

## 2. 研究の目的

クローン性造血モデルマウス(変異型 *ASXL1* ノックインマウス)と様々な固形腫瘍モデルを組みあわせ、*ASXL1* 変異を有する血液細胞が、固形腫瘍(メラノーマ、肺がん、大腸がん、乳がん)の発症、進展に及ぼす影響を評価する。これにより、クローン性造血の存在が固形腫瘍の増悪に直接関与しているかどうかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

以下のマウス固形腫瘍解析モデルと変異型 *ASXL1* ノックインマウスを用いて、*ASXL1* 変異を有する血液細胞が固形腫瘍の発症及び進展に及ぼす影響を解析した。また、骨髓、末梢血、そして腫瘍部位におけるマクロファージ、好中球、NK 細胞、樹状細胞、血小板そして B/T リンパ球の浸潤および機能を評価し、血液細胞における *ASXL1* 変異が腫瘍免疫応答に及ぼす影響について解析した。

### (1) 固形がん移植モデル

変異型 *ASXL1* コンディショナルノックインマウスに *Vav-Cre* (全ての血液細胞で発現)、*LysM-Cre* (ミエロイド系の細胞で発現)、*LCK-Cre* (T 細胞で発現)を掛け合わせ、それぞれ全血液細胞、ミエロイド系の細胞、T 細胞で変異型 *ASXL1* を発現するマウスを作成した。これらの変異型 *ASXL1* 発現マウスおよびコントロールの野生型 C57BL/6 マウスに、3 種類の C57BL/6 マウス由来の固形腫瘍細胞[B16F10:メラノーマ、LLC:肺がん、MC-38:大腸がん]を移植し、その増殖速度の差異を検証した。

## (2) 自然発症乳がんモデル

乳がんの自然発症モデルである MMTV-PyMT マウスと Vav-Cre/変異型 ASXL1 ノックインマウスを掛け合わせ、ASXL1 変異を持つ血液細胞が乳がんの発症を促進するかどうかを検証した。

## 4. 研究成果

### (1) ASXL1 変異を持つ T 細胞は、固形腫瘍の発症を促進する。

Vav-Cre もしくは LysM-Cre/ 変異型 ASXL1 ノックインマウスをレシピエントマウスとして用いた実験では、B16F10 細胞(メラノーマ)、LLC 細胞(肺がん)、MC-38 細胞(大腸がん)の増殖に大きな変化は認められなかった。しかし、T 細胞特異的に変異型 ASXL1 を発現する Lck-Cre/変異型 ASXL1 ノックインマウスでは、上記全ての固形腫瘍の増殖が亢進した (Fig.2)。これにより、ASXL1 変異を持つ T 細胞が、メラノーマ、肺がん、そして大腸がんの増殖を促進する作用を持つことが明らかとなった。

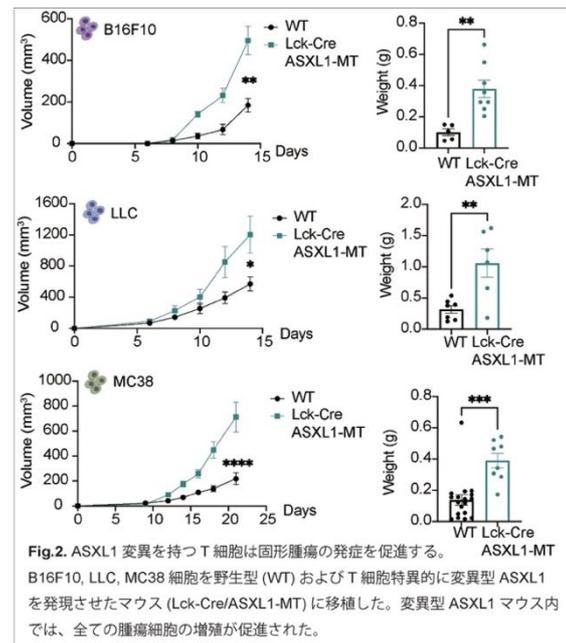


Fig.2. ASXL1 変異を持つ T 細胞は固形腫瘍の発症を促進する。B16F10, LLC, MC38 細胞を野生型 (WT) および T 細胞特異的に変異型 ASXL1 を発現させたマウス (Lck-Cre/ASXL1-MT) に移植した。変異型 ASXL1 マウス内では、全ての腫瘍細胞の増殖が促進された。

### (2) ASXL1 変異を持つ血液細胞は、乳がんの発症を促進する。

次に、Vav-Cre/変異型 ASXL1 ノックインマウスと乳がんを自然発症する MMTV-PyMT マウスを掛け合わせ、血液細胞特異的に変異型 ASXL1 を発現させたマウスにおける乳がんの発症を観察した。その結果、コントロールの MMTV-PyMT マウスと比較して、ASXL1 変異血液細胞を持つマウス内では、乳がんの発症が早まり、腫瘍数、重量ともに増加することが判明した。また、変異型 ASXL1 ノックインマウスで発症した乳がん内の CD8+ T 細胞について解析したところ、疲弊 (exhaustion) した T 細胞の割合が高い傾向があった

### (3) ASXL1 変異は T 細胞の正常な分化を阻害する。

最後に、ASXL1 変異が T 細胞分化に及ぼす影響を検証した。野生型マウスの T 細胞に比べ、変異型 ASXL1 ノックインマウスでは、CD4+ T 細胞と CD8+ T 細胞の割合や、naïve, memory, effector T 細胞の割合に変化が認められた (Fig.3)。上述の腫瘍内浸潤 T 細胞の変化とあわせて、ASXL1 変異は T 細胞の正常な分化を阻害することで、固形腫瘍の発症を促進しているものと考えられる。

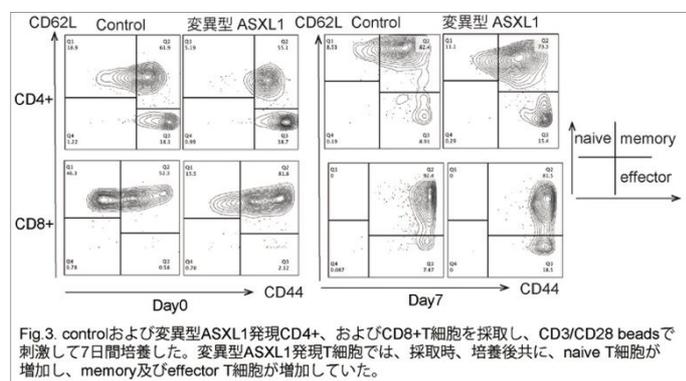


Fig.3. controlおよび変異型ASXL1発現CD4+、およびCD8+T細胞を採取し、CD3/CD28 beadsで刺激して7日間培養した。変異型ASXL1発現T細胞では、採取時、培養後共に、naïve T細胞が増加し、memory及びeffector T細胞が増加していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 合山 進	4. 巻 61
2. 論文標題 AML幹細胞	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 1130 ~ 1137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.1130	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 合山 進	4. 巻 61
2. 論文標題 AML幹細胞	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床血液	6. 最初と最後の頁 336 ~ 342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11406/rinketsu.61.336	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤野昶至、合山進、Yuki Sugiura、井上大地、浅田修平、Satoshi Yamasaki、Akiko Matsumoto、Kiyoshi Yamaguchi、土屋秋穂、四方紫織、佐藤成、Hironobu Morinaga、福山朋房、田中洋介、福島剛、竹田玲奈、山本圭太、本田浩章、Emi K. Nishimura、古川洋一、Tatsuhiko Shibata、Omar Abdel-Wahab、末松誠、北村俊雄
2. 発表標題 Mutant ASXL1 induces expansion of hematopoietic stem cells through activation of Akt/mTOR pathway
3. 学会等名 ISEH 2020 Virtual Scientific Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山本圭太、合山進、北村俊雄
2. 発表標題 Epigenetic Regulator ASXL1 Promotes Paraspeckle Formation through C-terminal Intrinsically Disordered Region in Hematopoietic Cells
3. 学会等名 ISEH 2020 Virtual Scientific Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤成、合山進、浅田修平、藤野赳至、劉瀟瀟、竹田玲奈、山本圭太、米澤大志、北村俊雄
2. 発表標題 Clonal Hematopoiesis Associated with Mutant ASXL1 Accelerates Atherosclerosis in Mice
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 劉瀟瀟、北村俊雄、合山進
2. 発表標題 ASXL1変異を伴う血液細胞が固形腫瘍の発症、進展に及ぼす影響
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本圭太、合山進、浅田修平、藤野赳至、米澤大志、佐藤成、竹田玲奈、福山朋房、田中洋介、横山明彦、昆彩奈、南谷泰仁、小川誠司、北村俊雄
2. 発表標題 造血幹・前駆細胞におけるASXL1変異による核内構造体形成異常の解析
3. 学会等名 第25回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2021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	坂本 毅治  (Sakamoto Takeharu)  (70511418)	東京大学・医科学研究所・准教授    (12601)	

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
---------	---------