

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19464

研究課題名(和文) 固形がんにおける体細胞変異のある炎症細胞によるがん発症支持機構の解明

研究課題名(英文) Tumor-supporting mechanisms by inflammatory cells with somatic mutations

研究代表者

坂田 麻実子(柳元麻実子)(Sakata-Yanagimoto, Mamiko)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80451805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：クローン造血を伴う固形がん患者のがん組織には、体細胞変異を獲得した炎症細胞が浸潤すると考えられるが、がんの進展における変異のある炎症細胞の役割は明らかにされていない。本研究では、クローン造血のモデルとして炎症細胞でTet2遺伝子を欠損するマウス(Tet2欠損マウス)あるいはコントロールマウスの背部皮下にB16メラノーマ細胞株を移植した。Tet2欠損マウスでは腫瘍形成は抑制された。脾臓においてTet2欠損マウスで骨髄由来抑制細胞および腫瘍関連マクロファージ分画は減少していた。これらの細胞は腫瘍細胞の支持に関わることから、これらの分画の減少によってメラノーマの増殖が抑制された可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、メラノーマモデルを用いることで、クローン造血を伴うがん患者のがん組織の微小環境について、体細胞変異のある炎症細胞という観点から解明する研究である。がんの微小環境を全く新しい視点から明らかにする点で、学術的に有意義である。クローン造血における体細胞変異とがんの組み合わせにより、炎症細胞の役割は多様であることが想定され、今後の研究の発展が期待される分野である。

研究成果の概要(英文)：Inflammatory cells having somatic mutations are thought to invade cancer tissues of patients with solid cancers accompanying clonal hematopoiesis. However, the roles of inflammatory cells with somatic mutations in the initiation and progression of cancers have not been clarified. In the present study, as a model for clonal hematopoiesis with TET2 mutations, B16 melanoma cell line was transplanted subcutaneously to the mice in which Tet2 gene was deficient in inflammatory cells of blood lineage (Tet2 deficient mouse) or control mice. Tumor formation was suppressed in Tet2-deficient mice. Bone marrow-derived suppressor cell and tumor-associated macrophage fractions were decreased in Tet2-deficient mice in the spleen. Since these cells are known to be involved in supporting tumor cells, reduction of these fractions may suppress the growth of melanoma.

研究分野：がん微小環境

キーワード：がん微小環境 がん免疫応答 クローン造血 マウスモデル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

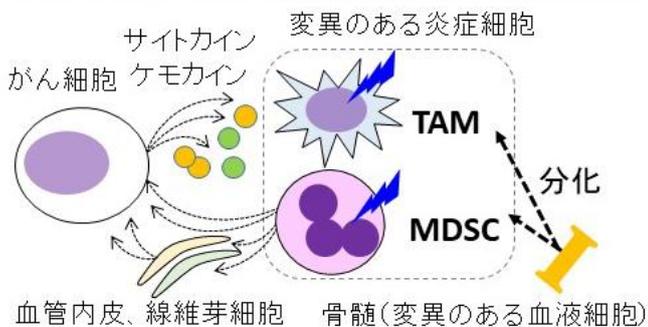
1. 研究開始当初の背景

固形がん組織においては、tumor-associated macrophage (TAM) や myeloid derived suppressor cell (MDSC) などの炎症細胞が浸潤し、これらの炎症細胞は腫瘍細胞の増殖や生存、あるいは治療抵抗性や免疫応答などに関わることが報告されている (Gabriolovich, Cancer Immunology Research 2017, review)。固形がんにおける炎症細胞は、がん細胞が分泌する炎症性メディエーターやがん組織特有の低酸素などのストレス環境をはじめとする外的シグナルによって機能成熟すると考えられてきた。

一方で、血液領域では、健常人の末梢血では、加齢とともに体細胞変異を獲得していることが報告された (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)。変異を獲得したクローン細胞由来の血液細胞に置き換わった状態は“クローン造血”と呼ばれる。健常人のクローン造血では、血液がんのドライバー変異とされる *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* 変異が約 70%を占めることが報告された (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)。変異を獲得したクローン細胞に新たなゲノム異常が加わることで、ゲノム異常の種類に応じたさまざまな血液がんが発生すると考えられる。こうした変異のある血液細胞は、多様な炎症細胞に分化する能力を維持している。最近では *TET2* 変異陽性の炎症細胞は動脈硬化疾患を増悪させることが報告されたことから (Jaiswal, NEJM 2017)、*TET2* 変異陽性炎症細胞は血液

がんにとどまらず、広く疾病に関わっていると考えられる。また、固形がん患者の 25%において、末梢血に体細胞変異がみられること、これらの患者のがん組織にも低アレル頻度ながら変異アレルが同定されることが報告された (Coombs, Cell stem cell 2017)。そこで、固形がん組織には体細胞変異を獲得した炎症細胞が浸潤していることが予想される (図 1)。

図1 がん組織中の体細胞変異のある炎症細胞の役割



申請者は、T 細胞リンパ腫を研究の専門領域としている。T 細胞リンパ腫の一つである血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫のゲノム解析により、70%の症例で *TET2* 変異と G17V *RHOA* 変異が共存していること (図 2, Sakata-Yanagimoto, Nat Genet 2014)、リンパ節病変の炎症細胞の一つである B 細胞には腫瘍細胞と同じ *TET2* 変異がみられる一方、G17V *RHOA* 変異は腫瘍細胞に局限していることを明らかにした (図 3, Blood Cancer J 2017)。

図2 T細胞リンパ腫における変異の共存

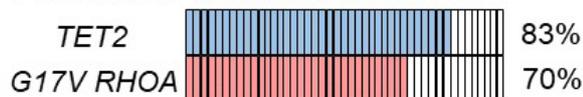


図 3 T 細胞リンパ腫に浸潤する炎症細胞 (B 細胞) における体細胞変異

	<i>TET2</i>	<i>RHOA</i>
腫瘍細胞+浸潤B細胞	19	0
腫瘍細胞	7	10
浸潤B細胞	0	0

申請者は、これらの知見をもとに、さまざまながんにおける“体細胞変異のある炎症細胞”ががんの発症や維持にはたす役割を明らかにしたいと考え、研究を進めている。本研究においては、固形がんの一つとしてメラノーマを対象に“体細胞変異のある炎症細胞”ががんの発症や維持にはたす役割を明らかにすることとした。

## 2. 研究の目的

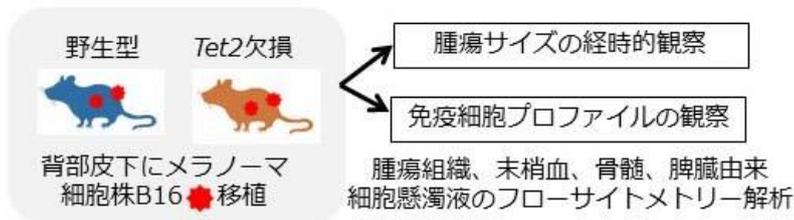
クローン造血のモデルマウスにメラノーマ細胞株を移植する実験モデルを用いて、体細胞変異のある炎症細胞ががんの進展に与える影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法 (図 4)

*Tet2*変異はクローン造血で見られる体細胞変異の中では2番目に頻度が高く (Genovese, NEJM 2014; Jaiswal, NEJM 2014)、上述のように血液がんでは *Tet2*欠損炎症細胞が腫瘍の発症を支持する微小環境細胞として働くという結果を得ている。そこで、本研究では炎症細胞特異的に *Tet2* 遺伝子を欠損するコンディショナルノックアウトマウスを用いた (*Mx-CrexTet2<sup>f/f</sup>*)。 *Mx-CrexTet2<sup>f/f</sup>*マウスおよびコントロールとして *Tet2<sup>f/f</sup>*マウスに4-6週齢時点で pI:pC を投与した。 *Mx-CrexTet2<sup>f/f</sup>*マウスでは *Tet2*遺伝子の欠損が誘導された (*Tet2*欠損マウス, data not shown)。

メラノーマ細胞株 B16 を継代後、回収し、 $2 \times 10^5$  E- $1 \times 10^6$  E/匹を *Tet2*欠損マウスあるいはコントロールマウス (8-12 週齢メス) の背部皮下へ移植した。経時的に腫瘍の大きさを計測し、両群間の腫瘍サイズを比較した。腫瘍、および腫瘍形成時の骨髓、末梢血、脾臓中の炎症細胞の分布を調べた。具体的には、腫瘍は  $1000 \text{ m}^3$  に到達する前を目安に採取し、小断片に碎き、コラゲナーゼおよび DNase をもちいて  $37^\circ\text{C}$  30 分処理して細胞懸濁液とし、ACK バッファーにより溶血した。骨髓は phosphate buffered saline (PBS) を用いて骨髓組織よりフラッシュアウトし、ACK バッファーにより溶血した。末梢血についても、ACK バッファーにより溶血した。脾臓についても、PBS によりフラッシュアウト後、ACK バッファーにより溶血した。各種抗体とインキュベートした後、フローサイトメトリー (FACS Aria II) により分析し、FlowJo (トミーデジタルバイオロジー) により解析した。

図 4 メラノーマ細胞株 B16 を利用した実験モデル



## 4. 研究成果

メラノーマ細胞株 B16 を *Tet2*欠損マウスあるいはコントロールマウスの背部皮下に移植したところ、コントロールマウスでは移植後 12 日目から次第に腫瘍を形成するのに対して、*Tet2*欠損マウスでは移植後 16 日目から腫瘍を形成した。すなわち、*Tet2*欠損マウスの炎症細胞は腫瘍形成が遅延した (図 5)。

次に、*Tet2*欠損マウスあるいはコントロールマウスの腫瘍組織、末梢血、骨髓、脾臓由来の細胞懸濁液について、フローサイトメトリーにより、骨髓球、Bリンパ球、Tリンパ球等の各系統の炎症細胞分画の比率を調べた。腫瘍組織、末梢血および骨髓中では *Tet2*欠損マウスとコントロールマウスでは、炎症細胞分画に違いはなかった (図 6, data not shown)。しかし、脾臓においては、*Tet2*欠損マウスでは、骨髓由来抑制細胞 (CD11b+Gr1+) と腫瘍関連マクロファージ (CD11b+F4/80+) の細胞表面形質をもつ分画が減少していた (図 7)。

これらの細胞は、直接的に腫瘍細胞に対して、あるいは間接的に Tリンパ球などの免疫反応を抑制することで、腫瘍細胞の増殖促進に働くことが知られる。そこで *Tet2*欠損マウスではこれらの分画の減少によって直接的、あるいは間接的にメラノーマの増殖が抑制されたと考えられた。

図5 *Tet2*欠損マウスあるいはコントロールマウスのメラノーマ細胞株 B16 の腫瘍組織の増殖曲線

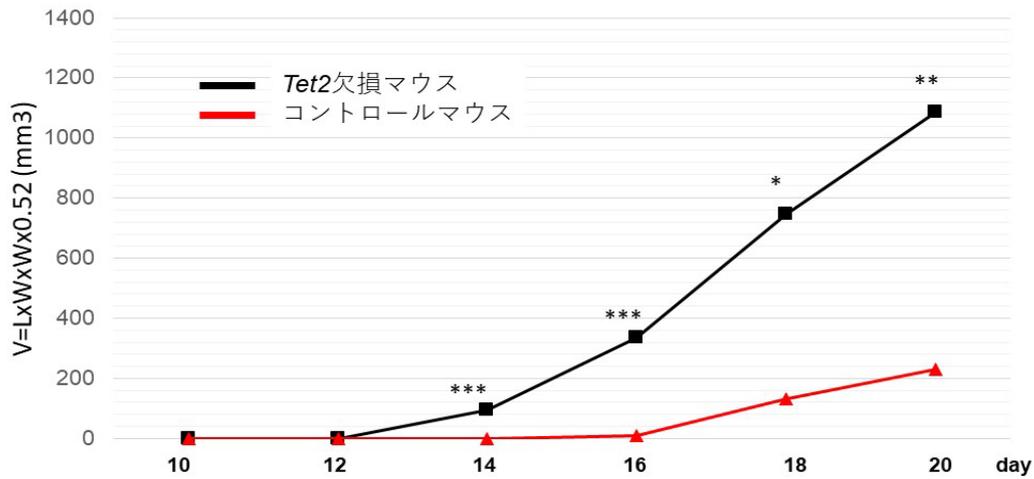
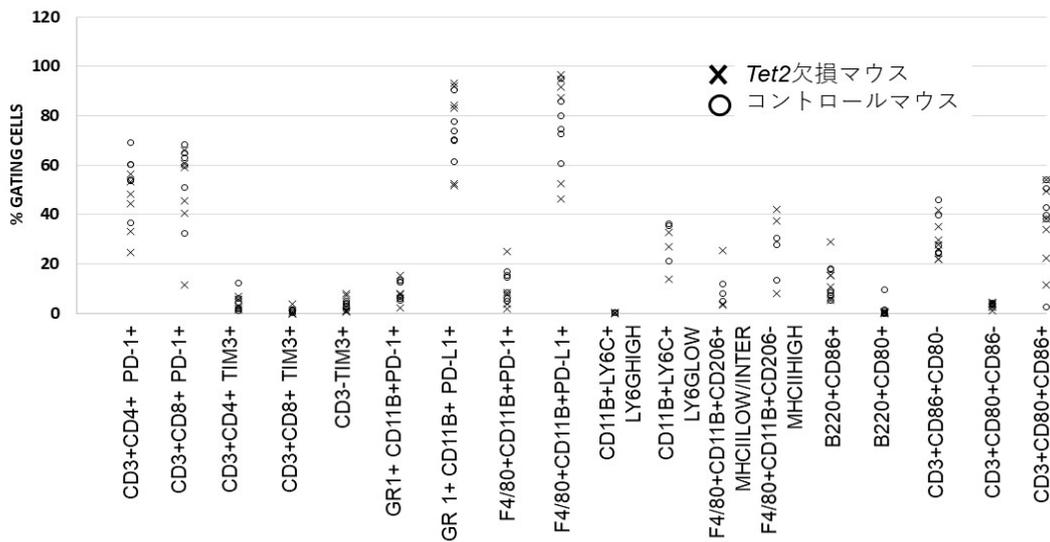


図6 *Tet2*欠損マウスあるいはコントロールマウスの腫瘍組織の炎症細胞

A 炎症細胞分画



B フローサイトメトリーのデータ

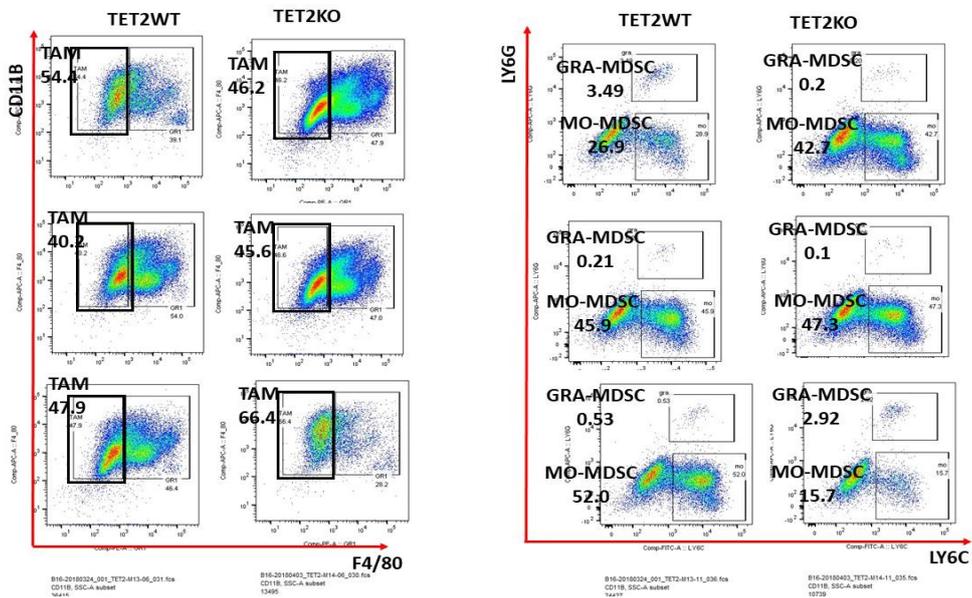
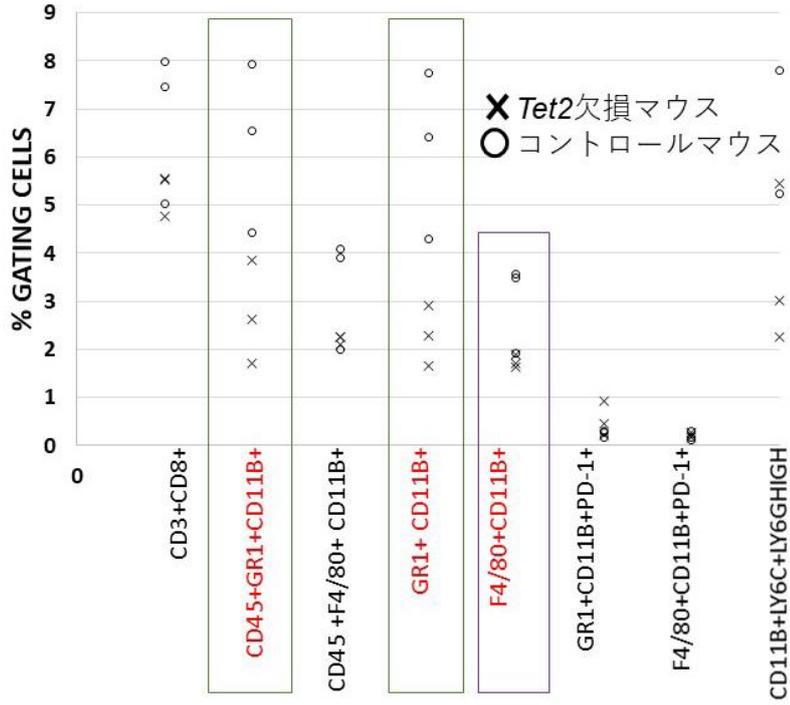
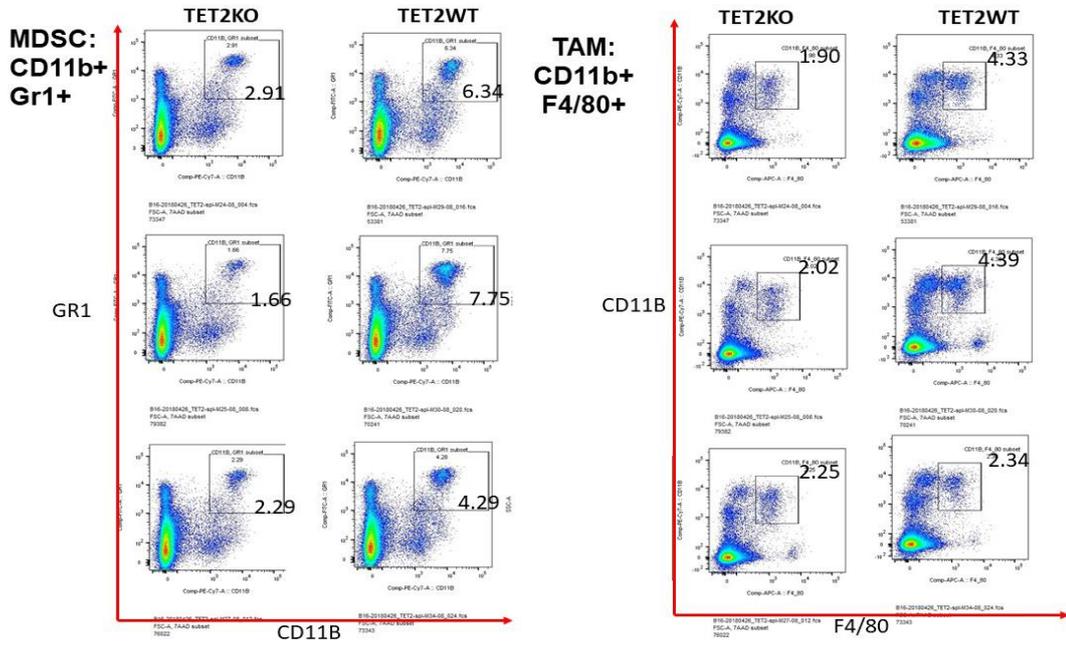


図7 *Tet2*欠損マウスあるいはコントロールマウスの脾臓の炎症細胞分画

A 炎症細胞分画



B フローサイトメトリーのデータ



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suehara Y, Sakata-Yanagimoto M, Hattori K, Kusakabe M, Nanmoku T, Sato T, Noguchi M, Chiba S.	4. 巻 110(10)
2. 論文標題 Mutations found in cell-free DNAs of patients with malignant lymphoma at remission can derive from clonal hematopoiesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer science	6. 最初と最後の頁 3375-3381
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14176	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 須摩桜子, 坂田（柳元）麻実子, Tran B. Nguyen, 服部圭一朗, 日下部学, 錦井秀和, 加藤貴康, 千葉 滋
2. 発表標題 クローン造血から進展した芽球性形質細胞様樹状細胞腫瘍（BPDCN）
3. 学会等名 第115回 日本内科学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂田（柳元）麻実子
2. 発表標題 血液がんの起源とクローン進化の解析
3. 学会等名 第28回 日本サイトメトリー学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Raksha Shrestha, Koichiro Maie, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Motohiko Oshima, Yaeko Nakajima-Takagi, Hiroataka Matsui, Takayasu Kato, Hideharu Muto, Enguerran Mouly, Olivier A. Bernard, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Loss of Tet2 and Tet3 alleles accentuate development of myeloid and lymphoid malignancies
3. 学会等名 The 16th Stem Cell Research Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Keiichiro Hattori, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Tohru Nanmoku, Yasuhito Suehara, Ryota Matsuoka, Masayuki Noguchi, Yasuhisa Yokoyama, Takayasu Kato, Naoki Kurita, Hidekazu Nishikii, Naoshi Obara, Shingo Takano, Eiichi Ishikawa, Akira Matsumura, Masafumi Muratani, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba
2. 発表標題	Genetic evidence implying the common precursor cells for primary and extra-central nervous system relapsed tumors in primary central nervous system lymphoma
3. 学会等名	23rd Congress of EHA (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	末原泰人, 坂田(柳元)麻実子, 服部圭一朗, 伊藤孝美, 梶 大介, 山本 豪, 末永孝生, 佐藤泰樹, 野口雅之, 千葉 滋
2. 発表標題	Liquid biopsy for the identification of intravascular large B-cell lymphoma
3. 学会等名	第58回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Sharna Tanzima nuhat, 坂田(柳元)麻実子, 小森大輔, 服部圭一朗, 福本浩太, 藤澤 学, 末永孝生, 若松宏武, 島津光伸, 千葉 滋
2. 発表標題	Droplet digital PCR and PNA-LNA clamp method for RHOA mutation detection in peripheral T-cell lymphoma
3. 学会等名	第58回 日本リンパ網内系学会総会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	Koichiro Maie, Racsha Shrestha, Mamiko Salata-Yanagimoto, Motohiko Oshima, Yaeko Nakajima-Takagi, Hirotaka Matsui, Takayasu Kato, Hideharu Muto, Enguerran Mouly, Oliver A. Bernard, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama, Shigeru Chiba
2. 発表標題	The Gene Dosage of Tet2/Tet3 Determines the Hematologic Cencer Development in Mice
3. 学会等名	The 9th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 Sakurako Suma, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Tran B.Nguyen, Keiichiro Hattori, Yasuhito Nannya, Seishi Ogawa, Manabu Kusakabe, Hidekazu Nishikii, Takayasu Kato, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasm Arising from Clonal Hematopoiesis
3. 学会等名 The 9th JSH International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuhito Suehara, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Keiichiro Hattori, Taiki Sato, Masayuki Noguchi, Tatsuhiro Sakamoto, Manabu Kusakabe, Naoki Kurita, Takayasu Kato, Yasuhisa Yokoyama, Hidekazu Nishikii, Naoshi Obara, Yuichi Hasegawa, Shigeru Chiba
2. 発表標題 TP53 mutations found in the serum of malignant lymphoma patients at remission derive from clonal hematopoiesis rather than minimal residual disease
3. 学会等名 2018 ASH Meeting on Lymphoma Biology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Raksha Shrestha, Koichiro Maie, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Motohiko Oshima, Yaeko Nakajima-Takagi, Hiroataka Matsui, Takayasu Kato, Hideharu Muto, Mouly Enguerran, Bernard Olivier A, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Loss of TET2 and TET3 alleles accentuate development of hematological malignancies
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真家紘一郎, Raksha Shrestha, 坂田(柳元)麻実子, 大島基彦, 中島やえ子, 松井啓隆, 加藤貴康, 武藤秀治, Enguerran Mouly, Olivier A. Bernard, 古関明彦, 岩間厚志, 千葉 滋
2. 発表標題 Tet2/3遺伝子の欠失数がマウス造血器腫瘍の発症を決定する
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Raksha Shrestha, Maie Koichiro, Mamiko Sakata-Yanagimoto, Olivier Bernard, Hirotaka Matsui, Yaeko Nakajima-Takagi, Takayasu Kato, Haruhiko Koseki, Atsushi Iwama, Shigeru Chiba
2. 発表標題 Tet2/Tet3 Allele Is the Savior Preventing Mouse Hematopoietic Progenitor Cells from Leukemia Development
3. 学会等名 The American Society of Hematology 60th Annual Meeting and Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末原泰人, 坂田(柳元)麻実子, 服部圭一朗, 日下部学, 千葉 滋
2. 発表標題 Interpretation of TP53 mutations found in circulating cell-free DNA of malignant lymphoma patients at remission
3. 学会等名 第23回 造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2019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	野口 雅之 (Noguchi Masayuki)  (00198582)	筑波大学・医学医療系・教授  (12102)	
研究分担者	小島 崇宏 (Kojima Takahiro)  (40626892)	筑波大学・医学医療系・准教授  (12102)	
研究分担者	日下部 学 (Kusakabe Manabu)  (40804381)	筑波大学・医学医療系・講師  (12102)	