37　クローナル造血発症と白血病進展の原因解明	北村　俊雄

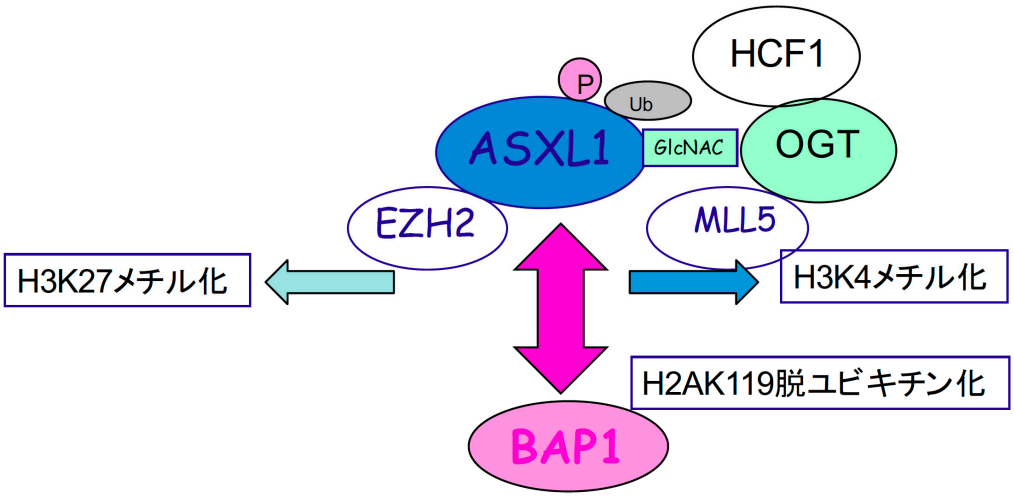
【目的】クローン性造血の病態と白血病に進展する分子機序を解析する目的でC末欠失型ASXL1変異体(ASXL1-MT)をRosa26座にノックインしたマウスを作成し、Vav-Creマウスと掛け合わせることによって造血細胞でのみASXL1-MTを発現するASXL1-MT-KIマウスを作成した。

【方法】ASXL1-MT-KIマウスを、血算、フローサイトメーター、コロニー形成法、骨髄移植モデル、RNAseq、GSEA、ChIPseq、ウエスタンブロット、real-time PCR、CellRox、Mitotracker、γH2AXのIF、コメットアッセイを利用して解析した。

【結果】ASXL1-MT-KIマウスは若年時には血算は正常であるが、1歳以降には大球性貧血、血球の軽度形態異常、血小板増多を認めた。また出生時に白血病レトロウイルスを感染させると、2ヶ月〜15ヶ月で全例急性白血病を発症した。一方、ASXL1-MT-KIマウス由来骨髄細胞に変異型Runx1導入した細胞は移植マウスにおいて6〜7ヶ月でMDS/AMLを発症を誘導した。これらの結果から、ASXL1-MT-KIマウスは前白血病状態でありクローン性造血の良いモデルと考えられた。最近、我々はASXL1-MT-KIマウスの骨髄細胞でミトコンドリア活性化、ROS上昇、DNAダメージ亢進が認められることを見出した。この結果はクローン性造血から白血病の発症頻度が高く、ASXL1-MT-KIマウスが前白血病状態であることと合致した。

次に造血器腫瘍発症の分子機構を調べるためにASXL1-MT-KIマウスを詳細に解析した。造血幹細胞は若年期から減少するが1年以上経つと増加することが判明した。マウスは野生型マウスと比較して早期にミエロイド優位の造血を示し、老化型の造血パターンであった。またクロマチン沈降法／シークエンス（ChIPseq）で、ASXL1のゲノムへの結合は代表的ヒストン活性化マークであるH3K4me3と強く相関し、ASXL1-MTが存在するとH3K4me3が著しく抑制されることが判明した。ASXL1はEZH2/PRC2と共同して代表的ヒストン抑制マークであるH3K27にメチル基を付加する(H3K27me3)とされていたが、ASXL1とH3K27me3は全体としては相関がなかった。別の抑制マークH2AK119UbはASXL1結合と強い相関を見せた。我々はその後、ASXL1-MTがBAP1と強く結合してBAP1活性を高め、H2AK119Ubの脱ユビキチン化を誘導し、HoxA9、IRF8の発現上昇を介してミエロイド系腫瘍発症に寄与することを明らかにした。これらの結果はASXL1-MTが様々なエピゲノム制御の破綻を介して造血器腫瘍発症に寄与することを示した。

エピゲノム調節において重要な働きをするASXL1の破綻が白血病発症の原因となる



37. クローナル造血発症と白血病進展の原因解明

北村　俊雄

東京大学 医科学研究所 先端医療センター 細胞療法分野

Key words：エピジェネティクス，骨髄異形性症候群，クローン性造血，白血病，ASXL1

緒　言

ASXL1 はショウジョウバエの Additional Sex Comb（ASX）の哺乳類ホモログ ASXL1-3 のうちの一つである。ASX はポリコームとトライソラックスと協調してそれぞれ遺伝子発現の抑制と活性化に関与することが知られている。ASXL1 変異は骨髄異形性症候群（MDS）、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、急性骨髄性白血病（AML）などの造血器腫瘍だけではなく、健常高齢者に認められ造血器腫瘍に移行しやすいクローン性造血においても高率に認められることが明らかになった。申請者らは以前に C 末欠失型の ASXL1（ASXL1-MT）を過剰発現した骨髄細胞を移植したマウスで、ASXL1-MT がポリコーム PRC2/EZH2 抑制、H3K27me3 低下を介して、HoxA9/10 や miR125a の発現が脱抑制し、MDS 発症を誘導することを報告した［1］。一方、ASXL1 のノックダウンやノックアウトでも MDS が発症することが報告された［2, 3］こともあり、ASXL1 変異が機能欠失型（loss-of-function）なのか機能獲得型（gain-of-function）あるいは優性抑制型（dominant-negative）なのかは議論があるところであった。最近は、1）MDS 患者の ASXL1 変異は必ず最終エクソンの 5'側のナンセンス変異か早期終結を伴うフレームシフト変異であること、2）変異は必ず片側の遺伝子座のみに起こること、3）MDS/AML 細胞株で C 末欠失型の ASXL1 が検出される［4］ことから、機能獲得型あるいは優性抑制型変異であると考えられるようになってきた。

ASXL1 変異を有する造血器腫瘍の患者は一般的に予後が悪い。我々は以前、ASXL1 変異と高率に共存する SETBP1 変異を ASXL1-MT と同時に発現する移植モデルにおいて早い時期に AML を発症することを示した［5］。一方、クローン性造血を有する人は一見健常に見えても年間 0.5～1.0%の割合で造血器腫瘍を発症することが知られている。これは同年代の人と比較して 10 倍以上高い頻度である。クローン性造血では、DNMT3a、TET2、ASXL1 など造血器腫瘍に認められる遺伝子変異が 1 つ認められるケースが多く、これらの変異がドライバー変異となって造血器腫瘍が発症しやすくなっていると考えている。このことは、クローン性造血では ASXL1 変異などドライバー変異により新たな遺伝子変異が起こりやすくなり、新たな遺伝子変異が加わることによって白血病などの造血器腫瘍を発症することを示唆した。

本研究の目的は、我々が樹立した造血細胞特異的に ASXL1-MT を発現するノックインマウス［6］を解析し、クローン性造血を有する人において造血器腫瘍が発症しやすいかを検証し、発症しやすいことが確認されたら、その分子機序を解明することである。クローン性造血（clonal hematopoiesis）は 65 歳以上の人の 10%に認められ、これらの人が高率に造血器腫瘍を発症するだけでなく、脳梗塞、心筋梗塞が多いことが予後を悪くしている。また、がん患者では 25%以上にクローン性造血が認められ、クローン性造血を有するがん患者は再発率が高く予後が悪いことが報告された。現代の高齢化社会において、クローン性造血を研究し、クローン性造血から様々な疾患が発症することを防ぐことは社会的にも極めて重要なテーマであるだけでなく、クローン性造血から白血病が発症する分子機序を解明することは白血病を含む悪性腫瘍の発症原因の解明に向けて重要なテーマである。

方　法

1.　ASXL1-MT-KI マウスの造血能の解析

末梢血は経時的に自動血算器を使用して白血球数、赤血球数、血小板数、ヘモグロビンを測定した。骨髄細胞は表面抗原によって分画化して、造血幹細胞数、各種前駆細胞数を調べた。またこれらの細胞分画で、細胞周期、コロニー形成能を調べた。長期骨髄再建能は競合的移植および非競合的移植法を用いて調べた。またクロマチン沈降法（ChIP）を利用して、ゲノムへの ASXL1 結合と H3K4me3、H3K27me3、H2AK119Ub との関係を調べ、ASXL1-MT との関係も調べた。

2.　骨髄移植モデル

ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞に転写因子 Runx1/AML1 の変異体 Runx1-S291fs あるいは MLL-AF9 融合遺伝子をレトロウイルスベクターで導入してマウスに移植して白血病の発症を調べた。

3.　挿入変異（Insertional mutagenesis）

生直後のマウスの腹腔内に複製可能白血病レトロウイルス MOL4070A を注入し、ASXL1-MT-KI マウスで白血病の発症が早くなるかを調べた。

4.　質量分析（M/S:Mas spectrometry）

質量分析を利用して ASXL-MT 結合分子として BAP1 を同定した。ASXL1-MT/BAP1 が白血病化に関与するか調べた。

5.　ゲノム不安定性

ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞で DNA ダメージが亢進しているかを、γH2AX の抗体染色とコメットアッセイで調べた。また、その原因を調べるために、ASXL1-MT-KI マウスとコントロールマウスの c-kit 陽性分画の骨髄細胞の発現解析を RNAseq と GSEA 解析を行った。さらに、Mitosox、CellRox で ROS を測定し、Mitotracker でミトコンドリアの活性化状態を調べた。

結　果

1. ASXL1-MT-KI マウスの解析

ASXL1-MT-KI マウスの末梢血は半年くらいから大球性の軽度貧血と血小板増多が認められる程度で大きな異常はなかった。生後 12～18 ヶ月のマウスでは、大球性の軽度貧血と血小板増多に加えて好中球の軽度形態異常が認められた（図 1 左）。骨髄細胞の分画では LT-HSC（造血幹細胞）数と MPP（multi-potent progenitor）数が著明に減少していた（図 1 右）。

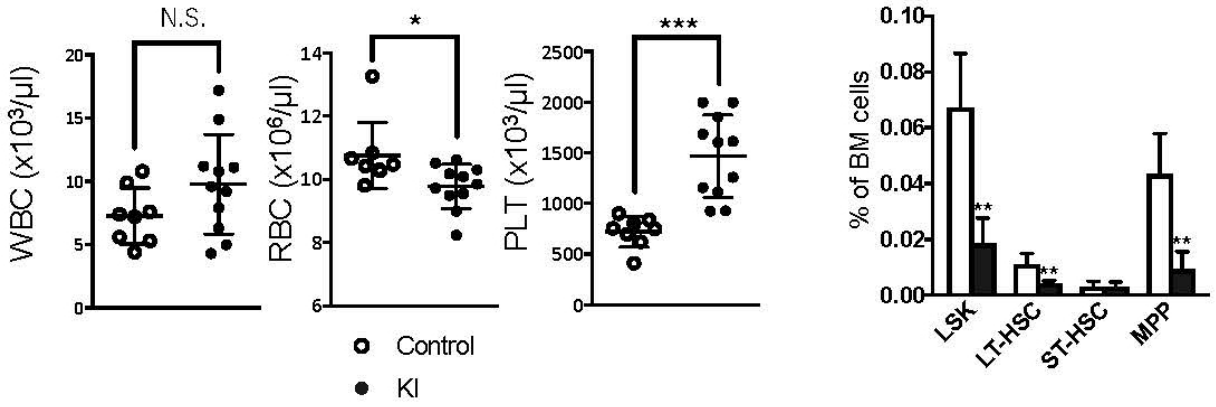


図１．ASXL1-MT-KI マウスの末梢血の血算と骨髄の造血幹前駆細胞

生後半年くらいまではあまり症状はないが、１年くらいになると大球性の軽度貧血と血小板増多が認められる（左図）。骨髄内の幹細胞（LT-HSC）や前駆細胞（MPP）は生後数ヶ月にはコントロールマウス骨髄に比べて、減少している。有意差検定には Students' t test を利用した。

全体としては CD11b 陽性細胞が優位に増加し、ミエロイド偏重（myeloid skewing）が認められた。コロニー形成能については、BFU-E 由来、CFU-E 由来コロニーは著減し、CFU-GM 由来コロニーは増加し、骨髄のミエロイド偏重を裏付けた（図 2A）。

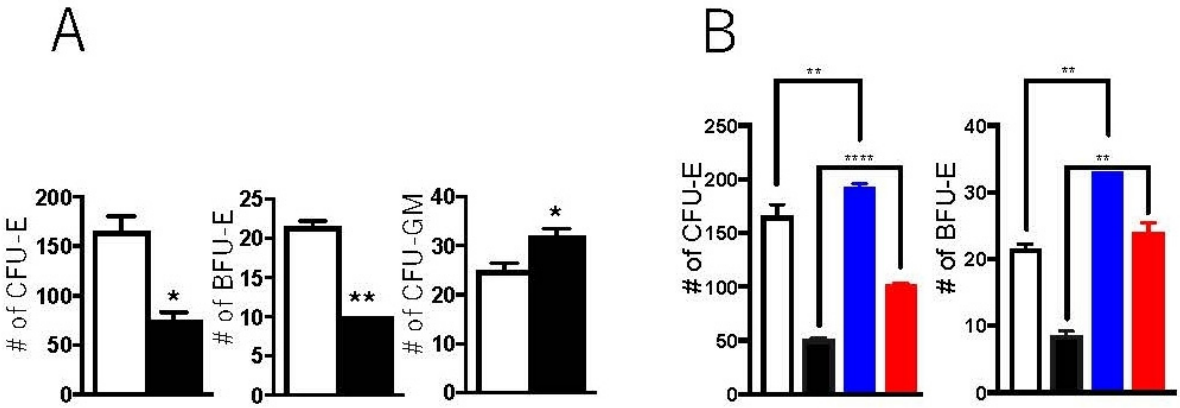


図 2. ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞のコロニー系性能

A. ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞のコロニー形成能を調べると、コントロールマウス骨髄細胞に比べて赤芽球系の CFU-E 由来、BFU-E 由来コロニーは減少していた。一方、顆粒球系コロニー（CFU-GM 由来コロニー）は増加していた。B. 赤芽球系コロニーの減少は Id3 発現によって部分的に回復した。またコントロールマウス骨髄細胞のコロニー形成も Id3 発現によって上昇した。有意差検定には Students' t test を利用した。

また、赤芽球系細胞には分化阻害が認められた。長期骨髄再建能は競合移植で明らかに抑制され、非競合移植で生着の遅れが認められた（図 3）[6]。RNAseq の結果を GSEA で解析したところ ASXL1-MT-KI マウスの骨髄 c-kit 陽性細胞では、細胞癌化に関与する HoxA9 と Myc の経路が上昇し、赤芽球系細胞の分化に関与する GATA1 と Runx1 の経路が低下していることが判明した。

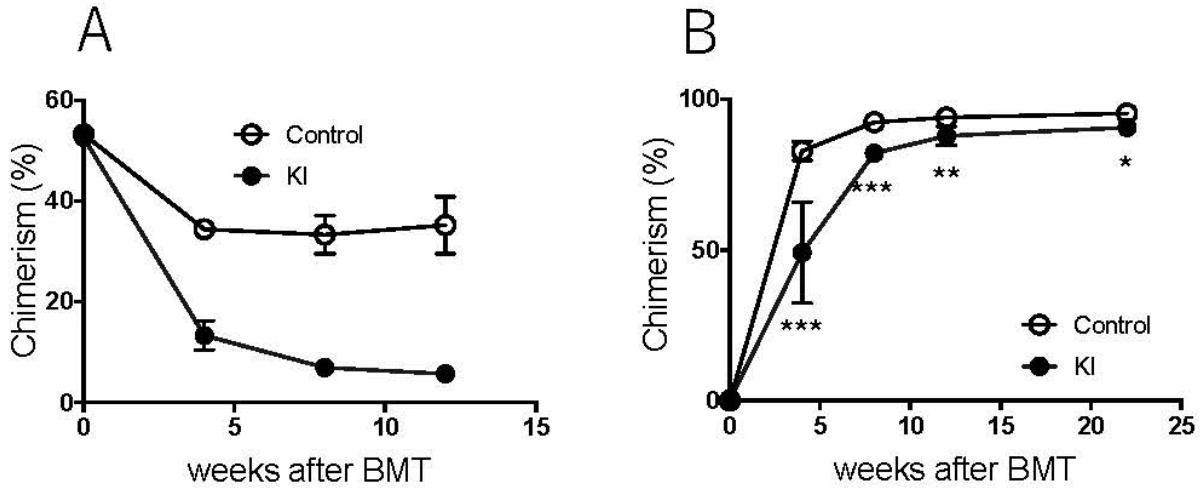


図 3. ASXL1-MT-KI マウス骨髄細胞の骨髄再建能

A. ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞（●）は競合的移植実験においてコントロールマウス骨髄細胞（○）に比べて生着率が低くなった。B. ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞（●）は非競合移植において生着がコントロールマウス骨髄細胞（○）に比べて遅延した。有意差検定には Students' t test を利用した。

ゲノムの中で、ASXL1 の結合と H3K4me3 および H2AK119Ub は強く相関した（図 4A, B）が、H3K27me3 とはほとんど相関がなかった（図 4D）。興味深いことの ASXL1-MT の結合は H3K4me3 と逆相関した（図 4C）。この結果は、ASXL1 は H3K4me3 付加に関与するが、変異型 ASXL1 はそれを阻害することを示唆している。

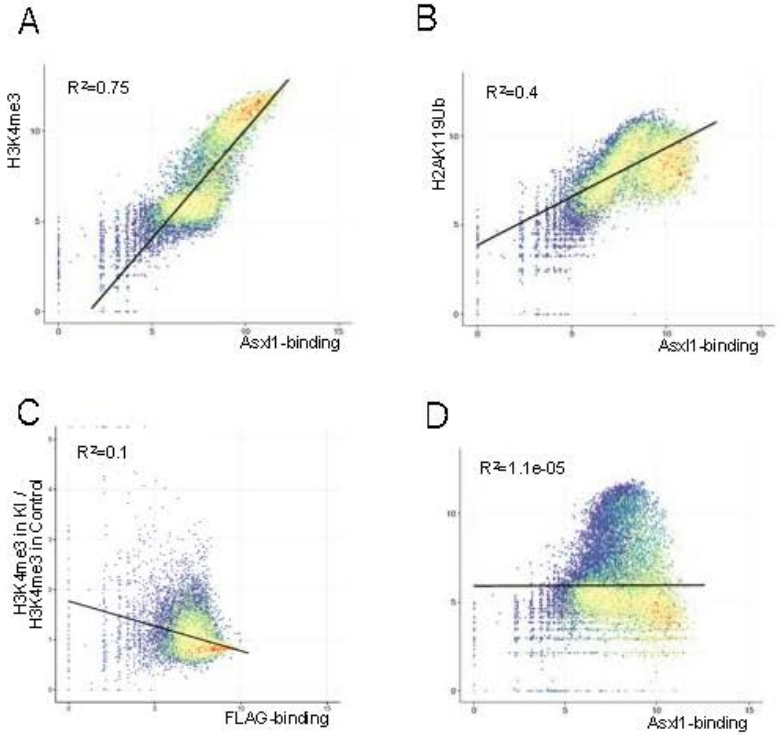


図 4. ASXL1 のゲノムへの結合と代表的ヒストンマークの相関：ChIPseq の結果を解析したもの

A. ASXL1 のゲノムへの結合とヒストンの代表的活性マーク H3K4me3 は相関する。B. ASXL1 のゲノムへの結合とヒストンの抑制マーク H2AK119Ub は相関する。C. ASXL1-MT が結合すると H3K4me3 は減少する（逆相関する）。D. ASXL1 のゲノムへの結合とヒストンの代表的抑制マーク H3K27me3 は全体としては相関が認められない。しかしながら、一部の遺伝子では ASXL1 の結合と H3K27me3 が相関しているように見える（青い部分）。

H3K4me3 が著明に低下して発現が低下している遺伝子として、Sox6、Id3、Tjp1、Hba を同定した。中でも Id3 は細胞分化に関与することが知られているので、ASXL1-MT-KI マウス由来の骨髄細胞に Id3 を過剰発現してコロニー形成能の変化を調べた。Id3 過剰発現の結果、BFU-E 由来コロニー数と CFU-E 由来コロニー数は部分的に改善した（図 2B）。この結果は ASXL1 変異による H3K4me3 低下によって発現が低下する Id3 が貧血の原因の少なくとも一部であることを示した。

2. ASXL1 変異とミエロイド系腫瘍の発症の関係性の解析

ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞に Runx1-S291fs あるいは MLL-AF9 を導入して同系マウスに移植する実験（骨髄移植モデル）を行った。コントロールマウスの骨髄細胞に Runx1-S291fs を導入して移植した場合は一部のマウスが 1 年以降に MDS 様症状を発症して約 2 年で死亡するが、ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞に Runx1-S291fs を導入して移植した場合は、全例 5～7 ヶ月目に形態異常の強い MDS/AML を発症し 10 ヶ月以内に死亡した（図 5A）。MLL-AF9 はコントロールマウスの骨髄細胞に導入しても ASXL1-MT-KI マウスの骨髄細胞に導入しても移植モデルにおいていずれも早期に急性白血病を発症して死亡したが、後者の方が有意に早く死亡した（図 5B）[6]。これらの結果は、ASXL1-MT と変位型 SETBP1 が協調して白血病発症を誘導しうる結果［5］と合わせて、ASXL1-MT が他の遺伝子変異と協調して造血器腫瘍発症を誘導することを示している。

複製可能マウス白血病レトロウイルスを生直後のマウスに感染させて白血病発症を誘導する Insertional mutagenesis の実験においては、コントロールマウスに比べて ASXL1-MT-KI マウスは明らかに早い時期に白血病を発症した（図 5C）。Insertional mutagenesis においてはレトロウイルスが挿入された場所の近傍の遺伝子が活性化することが細胞の白血化に寄与することが多い。白血病が発症したマウスの近傍の遺伝子を検索したところ、Hhex、Rnf220、H2-Eb2、Setbp1 が同定された。Setbp1 の過剰発現が ASXL1-MT と協調して白血病発症を誘導することは我々が以前に報告したとおりである［5］。

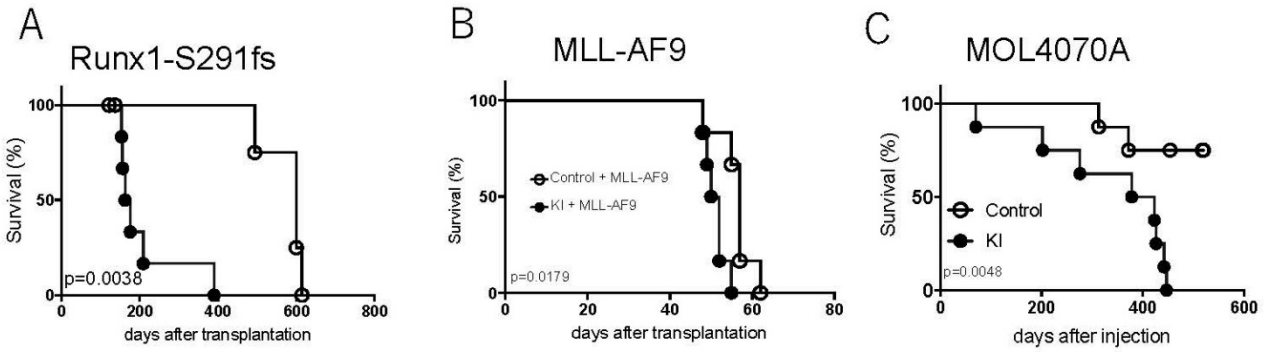


図 5. ASXL1-MT-KI マウスは前白血病である

A. ASXL1-MT-KI マウス骨髄細胞（●）およびコントロールマウス骨髄（○）に変異型転写因子 Runx1-S291fs を導入して移植すると、後者（Runx1-S291fs のみ）は約 2 年で MDS を発症す流のに比較して、前者（ASXL1-MT＋Runx1-S291fs）は数ヶ月で MDS/AML を発症する。B. ASXL1-MT-KI マウス骨髄細胞（●）およびコントロールマウス骨髄（○）に MLL-AF9 を導入して移植すると前者の方が有意に早く白血病を発症する。C. 複製可能ウイルス Mol4070A を生直後に腹腔内投与すると、コントロールマウスでは 2 年で 1 部のマウスが白血病を発症するが、ASXL1-MT-KI マウスでは 2 ヶ月から 1 年半で全てのマウスが白血病を発症して死亡する。

一方では、M/S で ASXL1 に結合が強く認められる BAP1 に注目して研究を進めた。BAP1 はヒストン H2AK119 のユビキチン修飾を外す働きをすることが知られていたが、ASXL1-MT と強く結合し ASXL1-MT にモノユビキチン化をもたらし安定化すること、同時に ASXL1-MT は BAP1 を安定化させ BAP1 の脱ユビキチン化活性を強くすることも見出した［7］。ASXL1-MT/BAP1 複合体は H2AK119ub の脱ユビキチン化、HoxA9 などの遺伝子発現の上昇を介して細胞の腫瘍化に寄与することも明らかにした。また、IRF8 の発現も上昇し、単球系への分化が強調された。このことは CMML において半数近い症例で ASXL1 変異が存在することと合致していた。さらに、ASXL1-MT、MLL-AF9 によって腫瘍化した細胞株において BAP1 をノックアウトすると増殖が抑制されることを *in vitro* および *in vivo* の系で確認した。このことは ASXL1 が造血器腫瘍の発生に寄与していること、BAP1 がミエロイド系細胞においては、従来考えられていたような腫瘍抑制因子としての役割ではなく、オンコジーンとしての役割を果たしうることを示唆した。

我々は最近 ASXL1 が OGT/HCF1/MLL5 と協調して活性化マークを付加すること、ASXL1、OGT、HCF1、MLL5 のノックダウンで H3K4me3 が著明に低下し、HL60 の ATRA（All trans retinoic acid）による好中球分化が抑制されることを示した［8］。このことは ASXL1 変異がミエロイド系細胞の分化が阻害される MDS や白血病の発症に寄与することを裏付けた。

3. ASXL1 変異による造血器腫瘍誘導の分子機構の解明

ASXL1-MT-KI マウスの造血幹細胞を調べたところ、G1 期の細胞の減少、細胞内 ROS 上昇、DNA ダメージ亢進が認められ、クローン性造血を有する人における易白血病移行性の原因となりうると考えられた（論文準備中）。

考　察

ASXL1 は内在性のヒストン修飾活性を持たないが、EZH2/PRC2、MLL5、BAP1 をと協力してヒストン H3K27 のトリメチル化、ヒストン H3K4 のトリメチル化、ヒストン H2AK119Ub の脱ユビキチン化を調節していることがわかった［1〜3, 6〜8］。MLL5 は MLL ファミリーの中でヒストンメチル化活性がないと考えられている分子であるが、HL60 細胞においては MLL5 のノックダウンでも H3K4me3 がゲノム全体でグローバルに低下し、分化が抑制された。この結果は MLL5 が他の MLL 分子とヘテロダイマーを形成してヒストンメチル化活性を発揮している可能性、何らかの翻訳後修飾によってヒストンメチル化活性を獲得する可能性を示唆した。

ASXL1 はユビキチン化［9］、モノユビキチン化［8］、リン酸化（未発表）、GlcNAC 化［9］を受けることが分かっており、ASXL1 が細胞外からのシグナルに対応して遺伝子発現を変化させるために、エピゲノムを統合的に調節する可能性を示唆した。このことは同時に、ASXL1 変異がエピゲノム異常を介して遺伝子発現を変化させ、造血器腫瘍や固形腫瘍発症の原因となることも示唆した（図 6）。

一方、クローン性造血や ASXL1-MT-KI マウスが、ASXL1 変異だけでは腫瘍化しないが、腫瘍が発症しやすい状態であること、ASXL1-MT が付加的な遺伝子変異が導入されやすい状況を作っていることを明らかにした。

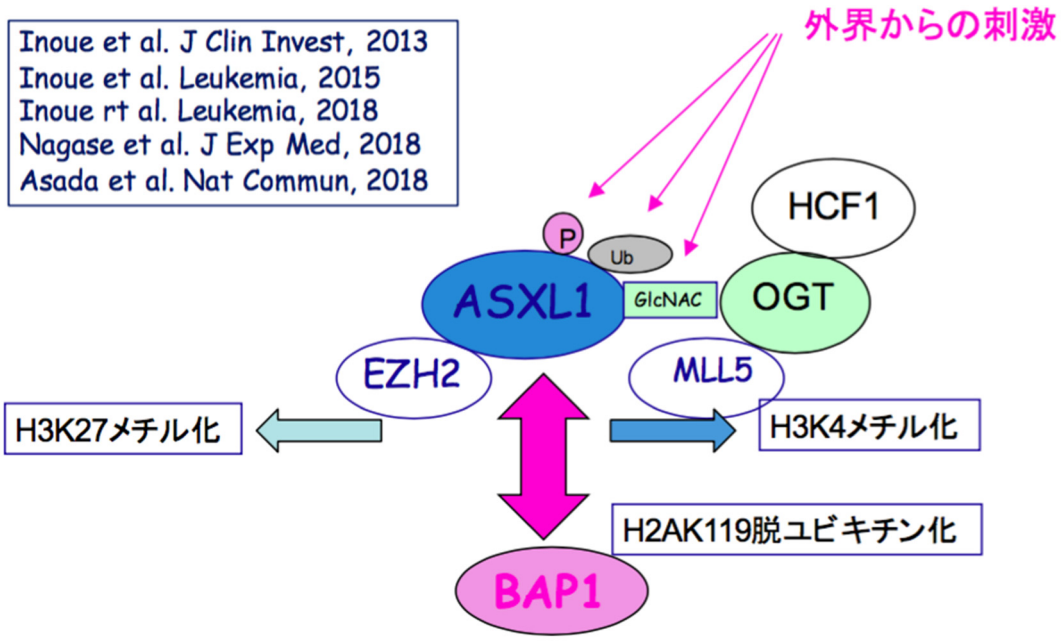


図6. 作業仮説：ASXL1は自身に酵素活性はないが、外界からのシグナルに対応して種々の翻訳後修飾を受けることによってScaffoldとして働き、エピゲノム調節を介して遺伝子発現を変化させる。

共同研究者・謝辞

本研究は主に東大医科学研究所先端医療センター細胞療法分野で行われたものである。一緒に研究してくれた研究室のスタッフ、大学院生、技術職員、秘書に心より感謝の意を表します。研究の一部は米国スローンケタリング記念がん研究所の Omar Abdel-Wahab 博士との共同研究として行った。

文　献

1) Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation–altering ASXL1 mutations.Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiyama Y, Kawabata KC, Nakahara F, Izawa K, Oki T, Maehara A, Isobe M, Tsuchiya A, Harada Y, Harada H, Ochiya T, Aburatani H, Kimura H, Thol F, Heuser M, Levine RL, Abdel-Wahab O, Kitamura T.J Clin Invest. 2013 Nov;123(11):4627-40. PMID: 24216483

2) ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC-mdiated gene expression. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave LM, Gao J, Hricik T, Shih AH, Pandey S, Patel JP, Chung YR, Koche R, Perna F, Zhao X, Taylor JE, Park CY, Carroll M, Melnick A, Nimer SD, Jaffe JD, Aifantis I, Bernstein BE, Levine RL.Cancer Cell. 2012 Aug 14;22(2):180-93. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.032.PMID: 22897849

3) Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. Abdel-Wahab O, Gao J, Adli M, Dey A, Trimarchi T, Chung YR, Kuscu C, Hricik T, Ndiaye-Lobry D, Lafave LM, Koche R, Shih AH, Guryanova OA, Kim E, Li S, Pandey S, Shin JY, Telis L, Liu J, Bhatt PK, Monette S, Zhao X, Mason CE, Park CY, Bernstein BE, Aifantis I, Levine RL. J Exp Med. 2013 Nov 18;210(12):2641-59. doi: 10.1084/jem.20131141. Epub 2013 Nov 11.PMID: 24218140

4) Truncation mutants of ASXL1 observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. Inoue D, Matsumoto M, Nagase R, Saika M, Fujino T, Nakayama KI, Kitamura T. Exp Hematol. 2016 Mar;44(3):172-6.e1. doi: 10.1016/j.exphem.2015.11.011. Epub 2015 Dec 15. PMID: 26700326
5) SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-mutated MDS. Inoue D, Kitaura J, Matsui H, Hou HA, Chou WC, Nagamachi A, Kawabata KC, Togami K, Nagase R, Horikawa S, Saika M, Micol JB, Hayashi Y, Harada Y, Harada H, Inaba T, Tien HF, Abdel-Wahab O, Kitamura T. Leukemia. 2015 Apr;29(4):847-57. doi: 10.1038/leu.2014.301. Epub 2014 Oct 13. PMID: 25306901
6) Expression of mutant Asxl1 perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. Nagase R, Inoue D, Pastore A, Fujino T, Hou HA, Yamasaki N, Goyama S, Saika M, Kanai A, Sera Y, Horikawa S, Ota Y, Asada S, Hayashi Y, Kawabata KC, Takeda R, Tien HF, Honda H, Abdel-Wahab O, Kitamura T. J Exp Med. 2018 Apr 11. pii: jem.20171151. doi: 10.1084/jem.20171151. [Epub ahead of print] PMID: 29643185
7) Mutant ASXL1 cooperates with BAP1 to promote myeloid leukemogenesis. Asada S, Goyama S, Inoue D, Shikata S, Takeda R, Fukushima T, Yonezawa T, Fujino T, Hayashi Y, Kawabata KC, Fukuyama T, Tanaka Y, Yokoyama A, Yamazaki S, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kojima S, Kawazu M, Mano H, Kitamura, T. Nat Commun. in press.
8) A novel ASXL1-OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. Inoue D, Fujino T, Sheridan P, Zhang YZ, Nagase R, Horikawa S, Li Z, Matsui H, Kanai A, Saika M, Yamaguchi R, Kozuka-Hata H, Kawabata KC, Yokoyama A, Goyama S, Inaba T, Imoto S, Miyano S, Xu M, Yang FC, Oyama M, Kitamura T. Leukemia. 2018 Mar 3. doi: 10.1038/s41375-018-0083-3. [Epub ahead of print] PMID: 29556021
9) The stability of epigenetic factor ASXL1 is regulated through ubiquitination and USP7-mediated deubiquitination. Inoue D, Nishimura K, Kozuka-Hata H, Oyama M, Kitamura T. Leukemia. 2015 Nov;29(11):2257-60. doi: 10.1038/leu.2015.90. Epub 2015 Apr 3. No abstract available. PMID: 25836587