

# 博士論文

造血幹・前駆細胞において変異型 ASXL1 は  
ミトコンドリアの機能異常と ROS による DNA 損傷を惹起する

藤野 赳至

## 要旨

*ASXL1* 遺伝子の体細胞変異は、骨髓異形成症候群 (MDS) や急性骨髓性白血病 (AML) などの骨髓系腫瘍でしばしば検出される。近年の研究では、加齢に伴うクローン性造血においても変異が見出され、腫瘍発症の過程で最も早期に起こる事象の一つであると考えられている。本研究では、造血器特異的に C 末端欠失型 *ASXL1* (*ASXL1*-MT) を発現するコンディショナルノックインマウス (cKI) を用い、*ASXL1*-MT が造血幹・前駆細胞 (HSPC) の機能を障害することを明らかにした。*ASXL1*-MT は、ミトコンドリアの活性を異常に亢進させ、活性酸素 (ROS) の過剰な産生による DNA 損傷を引き起こした。本研究で得られた知見は、*ASXL1* 変異を有する骨髓系腫瘍やクローン性造血の治療に示唆を与える可能性がある。

## 目次

第1章 序文-----	4
第2章 方法と材料-----	17
第3章 結果	
3.1 ASXL1-MT cKI マウスでは HSPC の機能が低下している -----	32
3.2 ASXL1-MT cKI マウスの HSPC はミトコンドリアの活性が亢進して いる -----	33
3.3 ASXL1 変異は ROS の増加と DNA 損傷を引き起こす -----	35
3.4 p53 は ASXL1 変異を有する HSPC の造血再構築能を低下させる --	36
3.5 ASXL1 の変異は Foxo1 の発現低下を通じて DNA 損傷の増加と造血 再構築能の低下を引き起こす -----	37
第4章 考察-----	40
第5章 結論-----	54
謝辞-----	55
引用文献-----	56
図表-----	79

## 第1章 序文

成熟した血液細胞を産み出すプロセスは造血と呼ばれ、1日に数千億個ものの白血球、赤血球、および血小板を供給し、生体の恒常性維持に寄与している。造血では様々な分化段階にある細胞がヒエラルキーを形成しており、その頂点にあるのが造血幹細胞（Hematopoietic stem cell; HSC）である。HSCは極めて少数の集団ではあるが、必要に応じて自己複製を行うとともに、より高い増殖能を有する多能性前駆細胞へ分化する能力を保持しており、生涯に及ぶ造血の維持を担っている。

生体内の細胞は、ミトコンドリアでの好気呼吸の副産物であるROSやDNAの複製エラーのような内因性、あるいは放射線、紫外線、化学物質などの外因性の変異源に常に曝されており、実に1日あたり数万から数十万回の頻度でDNA損傷が発生していると言われている。HSCは長期間にわたり造血を維持するため、修復されない、あるいは誤って修復されたゲノムの損傷は、細胞の機能を永続的に損なう可能性がある。このようなDNA損傷を最小限にとどめるため、HSCではいくつかの防御機構が発達していることが知られている。第一に、大部分のHSCは細胞周期が静止期（G0）であり、複製エラーによる

DNA 損傷を回避している<sup>1</sup>。第二に、HSC はエネルギー産生を解糖系に依存しており、好気呼吸による ROS の産生は極めて低レベルに抑制されている<sup>2-4</sup>。第三に、HSC ではトランスポーターである ABCG2 (ATP-binding cassette sub-family G member 2) が発現しており、細胞外に有害な薬物を排出する能力が高いことが挙げられる<sup>5</sup>。その一方、HSC は DNA 損傷の中でも極めて有害である二本鎖切断に対する修復機構として、エラーを起こしやすい非同末端連結 (Nonhomologous end joining; NHEJ) を用いることが明らかとなっており、老化、アポトーシス、および癌化の原因であることが示唆されている<sup>6</sup>。

以上で述べた多様な変異源のうち、ROS は DNA に加えて脂質、蛋白質、および RNA をはじめとする多様な分子を酸化することで、細胞機能を障害することが知られている。ROS とは、反応性の高いラジカル種に変化した酸素化合物の総称である。細胞内では、主にスーパーオキシドアニオン ( $O_2^{\cdot-}$ )、過酸化水素 ( $H_2O_2$ )、およびヒドロキシルラジカル ( $OH^{\cdot}$ ) の3種類として存在する。スーパーオキシドアニオンは反応性が非常に高く、スーパーオキシドジスムターゼ (Superoxide dismutase; SOD) によって速やかに過酸化水素

へ還元されなければならない。さらに、過酸化水素はグルタチンペルオキシダーゼ（Glutathione peroxidase; GPX）、ペルオキシレドキシン（Peroxi-redoxins; PRX）、またはカタラーゼ（Catalase）によってさらなる還元を受けて無毒化される。このような機構により、細胞内で生じた ROS はスカベンジャーによって還元され、その存在量は一定の範囲内に保たれている<sup>7</sup>。

ROS がマウス HSC の機能に与える影響に関する検討では、ROS レベルの高い HSC は骨髄系細胞への分化シフトを認め、造血再構築能の低下をきたすことが明らかとなっている<sup>8</sup>。また、ヒト HSC を用いた別の研究では、ROS の増加とともに DNA 損傷が蓄積し、移植時の生着能が低下することが示されている<sup>9</sup>。これらの現象は抗酸化物質である NAC の投与により回復することから、ROS が DNA 損傷を引き起こし、HSC の機能を低下させることが示唆された。したがって、ROS レベルの厳密な調節は、HSC の機能を維持するために重要な役割を果たしていると考えられる。遺伝子改変マウスを用いた研究より、ROS の調節に影響を与える因子がいくつか同定されている。転写因子である Foxo（Forkhead box-containing protein O）を欠失する HSC では、静止状態が失われるとともに造血再構築能が障害される<sup>10-12</sup>。その原因は、

Foxo のターゲットである Catalase や *SOD2* の発現が低下することにより、ROS が増加するためだと考えられている。また、DNA 損傷応答で重要な役割を果たす *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) を欠失した HSC においても、ROS の増加と自己複製能の低下が認められる<sup>13</sup>。このような機能障害は NAC の投与により改善することから、ROS が HSC の機能低下の原因であることは明らかである。しかしながら、*ATM* の欠失が ROS の増加につながる理由については解明されていない。

近年の研究より、細胞の代謝調節が HSC の恒常性を維持するために重要な役割を果たしていることが明らかとなってきた。細胞内に取り込まれたグルコースは、解糖系でいくつかの中間代謝物を経てピルビン酸に変換される。これが乳酸脱水素酵素 (Lactate dehydrogenase; LDH) による還元を受けると、最終産物として乳酸が生成して解糖系は完結する。一方、ピルビン酸がピルビン酸デヒドロゲナーゼ (Pyruvate dehydrogenase; PDH) により酸化されるとアセチル CoA が生成し、これはミトコンドリア内で TCA サイクル (Tricarboxylic acid cycle) に供給される。TCA サイクルで生成された還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (還元型 Nicotinamide adenine

dinucleotide; NADH) ならびに還元型フラビンアデニンジヌクレオチド (還元型 Flavin adenine dinucleotide; FADH<sub>2</sub>) は呼吸鎖複合体に電子を供与し、ミトコンドリア内膜におけるプロトン勾配が形成される。最後に、酸化リン酸化による ATP 合成が行われ好氣的代謝は完結する。この呼吸鎖複合体における電子伝達こそが、細胞内で ROS が産生される主因であることが知られている。前述した通り、HSC でのエネルギー産生は解糖系に依存しているが、これはミトコンドリアでの ROS の産生を抑制する意義がある。また、このような代謝特性は、HSC が骨髓腔で低酸素ニッチに存在し、嫌氣的代謝にエネルギー産生を依存せざるを得ないことが背景にあると考えられる<sup>2-4,14-16</sup>。転写因子である HIF-1 (Hypoxia-inducible factor-1) は、HSC の代謝調節に重要な役割を果たすことが知られている。これは HIF-1  $\alpha$  と HIF-1  $\beta$  から構成されるヘテロダイマー蛋白質であるが、前者は酸素濃度の低下により安定性が上昇する一方、後者は恒常的に発現している<sup>17</sup>。低酸素下で、HIF-1 はグルコース輸送体や解糖系酵素の転写を活性化し、解糖系への代謝の流れを増加させる<sup>18</sup>。さらに、HIF-1 は PDH をリン酸化することで不活性化し、ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (Pyruvate dehydrogenase kinase; PDK) の転



写も増加させることが明らかとなっている<sup>3</sup>。PDK はピルビン酸からアセチル CoA への変換を阻害し、解糖系から TCA サイクルへの代謝の流れを遮断することから、好氣的呼吸の制御点として重要であると考えられる。*HIF-1* や *PDK* を欠失した HSC では、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化と ROS の産生が増加し、静止状態と造血再構築能が損なわれる<sup>3,14</sup>。したがって、低酸素ニッチに存在する HSC は、*HIF-1* の発現を上昇させて TCA サイクルへの代謝の流れを抑制し、解糖系でのエネルギー産生を維持していると考えられる。

HSC の恒常性維持に嫌氣的代謝が重要である一方、ミトコンドリアでの好氣的代謝もその機能に必要不可欠であることが示されている。HSC は必要に応じて分化するが、その際には静止期を脱して細胞周期に入ることになる。この時、エネルギー需要は嫌氣的代謝では満たされず、ミトコンドリアでの好氣的代謝に切り替える必要が生じる。ミトコンドリア蛋白質である *Ptpmt1* (PTEN-like mitochondrial phosphatase) を欠失させてミトコンドリアでの呼吸を阻害すると、解糖系の活性化と HSC プールの増加が引き起こされた。その一方、HSC の分化障害が引き起こされ、早期に骨髄不全をきたした<sup>19</sup>。

以上より、定常状態では自己複製能を保持するために嫌氣的代謝が維持される一方、分化に伴うエネルギー需要の増大に対してはミトコンドリアでの好氣的代謝が必要であることが示唆された。このように、HSC が自己複製能と分化能を維持するために、ミトコンドリアにおける代謝スイッチの制御機構は非常に重要であると考えられる。

近年の次世代シーケンス技術の目覚ましい進歩により、骨髄系腫瘍で見出される体細胞変異の概観が明らかとなってきた。疾患により占める割合は異なるものの、変異を有する遺伝子は機能的にいくつかのカテゴリーに分類される。すなわち、シグナル伝達分子、癌抑制因子、DNA メチル化関連分子、クロマチン修飾因子、転写因子、スプライシング因子、そしてコヒーシン複合体に含まれる分子である。これらのうち、クロマチン修飾因子として知られている *ASXL1* (*Addition of Sex Combs Like1*) 遺伝子の変異が、骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome; MDS)、慢性骨髄単球性白血病 (Chronic myelomonocytic leukemia; CMML)、急性骨髄性白血病 (Acute myelogenous leukemia; AML) を含む骨髄系悪性腫瘍で高頻度に見出され、単独の予後不良因子であることが示された<sup>20-22</sup>。加えて、*ASXL1* 変異は骨髄

増殖性疾患 (Myeloproliferative neoplasms; MPN) や再生不良性貧血 (Aplastic anemia; AA) でも認められ、幅広いスペクトラムの造血器疾患の発症に関与することが明らかとなっている<sup>23,24</sup>。これらの中でも特に *ASXL1* の変異率が高いのは、MDS (14-23%) , CMML (~40%) および MPN に属する骨髄線維症 (Primary myelofibrosis; PMF) (17-24%) である。近年の研究より、加齢に伴うクローン性造血 (Clonal hematopoiesis; CH) においても *ASXL1* 変異がしばしば認められることが明らかとなった<sup>25-27</sup>。CH を有する場合には、MDS や AML などの造血器腫瘍の発症リスクが有意に上昇することから、*ASXL1* 変異が白血病の発症過程において最も早期に起こる遺伝子変異の一つであることが示唆されている (図 1)。このような背景から、*ASXL1* 変異がもたらす CH、そしてその先にある造血器腫瘍の発症プロセスとメカニズムを詳細に理解することは極めて重要と考えられる。

*ASXL1* は、*Drosophila* における *Asx* のヒトアナログとして同定された。*Drosophila* では、体節構造の形成に必要なホメオティック遺伝子の発現は、トライソラックス群 (Trithorax group; TrxG) 複合体とポリコーム群 (Polycomb group; PcG) 複合体によって制御されている。TrxG はヒストン

H3K4 をトリメチル化し、標的遺伝子の転写活性化にはたらく。PcG には PRC1 (Polycomb repressive complex 1) と PRC2 の 2 種類が存在し、前者はヒストン H2AK119 をモノユビキチン化し、後者はヒストン H3K27 をトリメチル化することで遺伝子発現を抑制する。*Asx* を欠失すると、TrxG と PcG 遺伝子の両者を欠失した表現型を呈することから、*Asx* は両者の機能に必要であることが示唆されている<sup>28</sup>。ヒト細胞においても、ASXL1 と PRC2 の構成要素である EZH2、EED および SUZ12 が結合し、これらと協調して H3K27 トリメチル化を行うことが示されている<sup>29</sup>。一方で、ASXL1 の H3K4 トリメチル化に対する作用は明らかでなかったが、最近になってその関連を示唆する研究結果が報告されている<sup>30,31</sup>。さらに、ASXL1 は脱ユビキチン化酵素である BAP1 と結合して Polycomb-repressive deubiquitinase (PR-DUB) を形成し、H2AK119Ub を脱ユビキチン化することで、標的遺伝子の脱抑制を行うことも明らかとなっている<sup>32-35</sup>。このように、ASXL1 は多様なエピジェネティック因子と協調することによって、遺伝子発現を調節する役割を果たしていると考えられている (図 2)。

ASXL1 蛋白質は 1541 残基のアミノ酸から構成され、N 末端領域に ASXH

ドメインが、C 末端領域に PHD (Plant homeodomain) ドメインが存在する。ASXH ドメインは BAP1 との結合に必要であり、PHD ドメインはクロマチンや DNA と結合することから、これらの領域はエピジェネティクスの制御という観点から重要だと考えられる<sup>33,36</sup>。患者に見出される変異には若干のバリエーションがあるものの、ラストエキソン 5' 側のフレームシフト変異やナンセンス変異が大部分であり、これにより PHD ドメインが欠失した変異型 ASXL1 蛋白質 (ASXL1-MT) が生じることになる<sup>20</sup> (図 3)。通常、読み枠の途中で終止コドンが生成されるとナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (Nonsense-mediated mRNA decay; NMD) によって mRNA は分解されるが、ASXL1 変異はラストエキソンに存在するために分解を免れると考えられる。一方、ASXL1-MT の存在は患者検体で証明されておらず、病態への関与は明らかではなかった<sup>29</sup>。したがって、ASXL1 変異が機能喪失に帰するのか、それとも ASXL1-MT による機能獲得あるいは優性阻害を意味するのか、ということが大きな問題となる。Omar と Wang らは、ASXL1 ノックアウトマウスが造血幹細胞レベルで機能異常と MDS 様の病態を呈するとともに H3K27me3 の減少を引き起こすことを見出し、ASXL1 変異が機能喪失であ

ると主張した<sup>37,38</sup>。その一方、Inoue らは ASXL1-MT 発現細胞の骨髄移植モデルにおいても MDS は発症し、H3K27me3 が減少することを示した<sup>39</sup>。さらに、*ASXL1* を変異した白血病細胞株の解析で、ASXL1-MT が質量分析や WB で検出され、蛋白質レベルで存在することが明らかとなった<sup>40</sup>。したがって、実際に ASXL1-MT が白血病細胞で発現し、病態形成に関与していることが示唆された。

より生理的な条件下で ASXL1-MT が造血に与える影響を評価するため、当研究室ではヒト *ASXL1* E635Rfsx15 変異を *Rosa26* 遺伝子座に挿入した変異型 ASXL1 コンディショナルノックイン (ASXL1-MT cKI) マウスを作製した<sup>30</sup> (図 4)。このマウスを Vav-cre トランスジェニックマウスと交配すると、造血器特異的に ASXL1-MT を発現させることが可能になる。ASXL1-MT cKI マウスは、赤血球の分化障害と加齢に伴う軽度の貧血、血小板増加、および骨髓系細胞への分化シフトを認めた。その一方、造血器腫瘍の発症には至らず、*ASXL1* 変異単独では悪性化に不十分であると考えられた。その一方、変異型 RUNX1 の共発現やレトロウイルスによる変異挿入によって白血病の発症が促進されることから、ASXL1-MT は白血病発症への感受性を高めることが示

唆された。これらの結果は、臨床において *ASXL1* 変異単独で MDS を発症することは少なく、大部分の症例で追加の変異が見出されることと合致する。さらに、*ASXL1*-MT がヒストン修飾に果たす影響を検討するため、骨髄 c-kit 陽性細胞を用いてウエスタンブロッティングやクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析が行われた。その結果、H3K4me3 と H2AK119Ub のグローバルな減少が認められる一方、H3K27me3 の減少は軽度であることが明らかとなった (図 5 A, B)。H3K4me3 の減少と遺伝子発現の低下を認めた遺伝子として、複数の赤血球分化関連遺伝子が同定され、赤血球の分化障害に関与している可能性が考えられた。H3K4me3 が減少するメカニズムについては不確定であるものの、*ASXL1*-MT は多様なヒストン修飾を変化させることで、造血器腫瘍の発症に関与していることが示唆された。

本研究では、*ASXL1*-MT cKI マウスの HSPC が機能障害を生じることを見出し、その原因について代謝という観点から解明することを試みた。これまでに述べた通り、HSC の機能を維持するためには代謝の厳密な制御が重要である。*ASXL1* 変異と代謝の関係性を検討することは、それが HSPC の機能に及ぼす影響を評価する上で重要な所見であると考えられる。また、代謝の制御機

構の破綻は HSPC の静止状態を失わせ、複製ストレスや ROS による DNA 損傷を引き起こす。代謝の異常な変化によりゲノム不安定性が惹起され、悪性化の一因となる可能性も考えられることから、本研究では代謝に加えて DNA 損傷に関する解析も合わせて行った。



## 第2章 方法と材料

### マウス

C57BL/6J (Ly5.1) マウスは三協ラボサービス株式会社より、C57BL/6J (Ly5.2) マウスは日本チャールスリバー株式会社より購入した。 $p53^{-/-}$ マウスは、東京大学医科学研究所の松田浩一先生よりご供与いただいた。ASXL1-MT cKI マウスは当研究室で作製し、Vav-cre トランスジェニックマウスと交配した。実験は、6 週齢から 12 週齢のマウスで行った。すべての実験で、同腹仔を野生型コントロールとして用いた。本研究で用いたマウスは東京大学医科学研究所実験動物研究施設動物センターにおいて飼育し、実験に際しては東京大学動物実験実施規則並びに東京大学動物実験実施マニュアルに則って行った。

### フローサイトメトリー

骨髓細胞は、2% FBS を含んだ PBS で長管骨（大腿骨および脛骨）を洗い流して回収した。骨髓細胞を赤血球溶解バッファー（150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM

KHCO<sub>3</sub>, 100  $\mu$ M EDTA-Na<sub>2</sub>) で懸濁して赤血球を溶解し、40  $\mu$ m 径のフィルターにかけた。その後、lineage マーカー (CD5, B220, CD11b, Gr-1 and Ter119) に対するビオチン化モノクローナル抗体で細胞を懸濁し、4 °C、10 分間インキュベートした。続けて、抗ビオチンマイクロビーズ (Miltenyi Biotec) 中で4 °C、15 分間インキュベートした。さらに、MACS separation LS columns (Miltenyi Biotec) を用い、Lin 分画を純化した。その後、Lin 細胞を CD150-PE (BioLegend, 115904, 1:200)、c-kit-PE-Cy7 (BioLegend, 105814, 1:400)、Sca1-APC (BioLegend, 108112, 1:400)、CD48-Brilliant Violet 421 (BioLegend, 103427, 1:400) そして Streptavidin-Brilliant Violet 605 (BioLegend, 405229, 1:400) で4 °C、30 分間染色した。末梢血中のキメリズム解析には、CD11b-PE (eBioscience, 120112-85, 1:1000) と CD45.2-APC (BioLegend, 109813, 1:1000) 抗体を用いた。ROS とミトコンドリア膜電位の測定には、Sca1-APC 抗体の代わりに Sca1-Brilliant Violet 785 (BioLegend, 108139, 1:400) 抗体を使用した。アポトーシスと細胞周期の解析では、CD48-Brilliant Violet 421 および Sca1-APC 抗体の代わりにそれぞれ CD48-APC-Cy7 (BioLegend, 103431, 1:400) と Sca1-

Brilliant Violet 785 抗体を用いた。Propidium iodide (PI, 1:500) もしくは 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:3000) を死細胞の除去に用いた。すべてのデータは、FACSVerse もしくは FACS Aria で取得し、FlowJo で解析を行った。

## 細胞内染色

表面抗原を染色した骨髄細胞を、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定し、0.2% Triton X-100 で 15 分間透過処理を行った後、5% ヤギ血清を用いて 15 分間ブロッキング処理した。すべての反応は室温で行った。その後、細胞周期の解析では、細胞を Ki-67-eFluor660 (eBioscience, 50-5698-82, 1:100) と DAPI (1:3000) で 4°C、30 分間染色した。 $\gamma$ -H2AX の染色では、細胞を抗 p-H2A.X (Cell Signaling Technology, #9718, 1:200) 抗体で室温、1 時間染色し、洗浄後に Alexa Fluor 647 二次抗体 (Invitrogen, 1:2000) を用いて室温で 1 時間染色した。染色した細胞を、フローサイトメーターにより解析した。

## アポトーシス解析

骨髓細胞を表面抗原に対する抗体で染色した後、Annexin V binding buffer (10mM Hepes (pH 7.4) , 140mM NaCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>) 中で、Annexin V-APC (BioLegend, 640920, 1:100) で室温、30 分間染色した。染色した細胞を、フローサイトメーターを用いて解析した。

## HSPC 移植

致死量的線量（総量 900cGy, 4 時間間隔を空けて 450cGy を 2 回照射）の放射線照射を受けた C57BL/6 レシピエントマウス (CD45.1) に、200 個の HSC もしくは 3,000 個の MPP (CD45.2) を、 $4.0 \times 10^5$  個の C57BL/6 マウスの骨髓有核細胞 (CD45.1) とともに尾静脈から競合的に移植した。移植後、1 か月おきに末梢血を採取し、ドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーにより経時的に評価した。

## 連続移植

ASXL1-MT cKI マウスおよび野生型マウスから回収した  $10^6$  個の骨髓有核

細胞を混合し、致死量的線量の放射線照射を受けた C57BL/6 レシピエントマウスへ経静脈的に移植した。移植から 6 ヶ月後、3 匹のレシピエントマウスから合わせて  $6 \times 10^6$  個の骨髓有核細胞を回収し、致死量的線量の放射線照射を受けたレシピエントマウスへ連続的に移植した。移植後、1 か月おきに末梢血を採取し、ドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーにより経時的に評価した。

## ROS の定量

細胞内とミトコンドリア内の ROS の解析では、骨髓細胞を表面抗原に対する抗体でラベルした後、それぞれ  $5 \mu\text{M}$  CellROX Deep Red (Thermo Fisher Scientific) もしくは  $10 \mu\text{M}$  MitoSOX Red (Thermo Fisher Scientific) プロブを加えて、 $37^\circ\text{C}$ 、30 分間インキュベートした。反応後に細胞を洗浄し、フローサイトメーターで解析した。

## NAC 投与

野生型および ASXL1-MT cKI マウスに、 $1\text{mg/mL}$  の NAC を含んだ水を 2

か月間与えた。その後、致死量的線量(総量 900cGy, 4 時間間隔を空けて 450cGy を 2 回照射)の放射線照射を受けた C57BL/6 レシピエントマウス (CD45.1) に、 $1 \times 10^6$  個の NAC 投与マウス由来の骨髓有核細胞 (CD45.2) とともに  $1 \times 10^6$  個の C57BL/6 マウスの骨髓有核細胞 (CD45.1) を、尾静脈から競合的に移植した。移植後も NAC を投与し続け、1 か月後に末梢血中ドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーにより評価した。同時に、骨髓細胞を取り出して表面抗原に対する抗体により染色し、CellROX プローブおよび  $\gamma$ -H2AX 抗体を用いて、LSK 分画における細胞内 ROS と DNA 損傷を評価した。

### ミトコンドリア膜電位の定量

表面抗原に対する抗体でラベルした骨髓細胞を、 $100 \mu\text{M}$  MitoTracker Red (Thermo Fisher Scientific) で  $37^\circ\text{C}$ 、15 分間インキュベートした。反応後に細胞を洗浄し、フローサイトメーターで解析した。

### 酸素消費量の測定

FACS (Fluorescence activated cell sorting) でソートした  $3 \times 10^5$  個の Lin<sup>-</sup>

c-kit<sup>+</sup>細胞を、CELL-TAK (CORNING) でコーティングした XF24 細胞培養マイクロプレートに固定した。その後、ミトコンドリアの呼吸能を、XF24 extracellular flux analyzer と XF cell Mito Stress Test Kit (Agilent) を用いて測定した。酸素消費量は、定常状態に続けて ATP 合成酵素阻害薬である Oligomycin (0.5  $\mu$ M)、脱共役剤である FCCP (Trifluorocarbonylcyanide phenylhydrazine; 1.0  $\mu$ M)、および電子伝達系複合体 III の阻害薬である Antimycin A (0.5  $\mu$ M) と複合体 I の阻害薬である Rotenone (0.5  $\mu$ M) を順次投入して測定した。

## 免疫蛍光染色

MPP もしくは LT-HSC を Poly-L lysine (SIGMA) でコートしたスライドガラスに、フローサイトメーターを用いてソートした。氷上で細胞を 30 分間静置してスライドガラスに接着させ、4 %パラホルムアルデヒドで固定処理を 20 分間行った。その後、細胞を 0.2% TritonX-100 で透過処理を 15 分間行い、5 %ヤギ血清で 1 時間ブロッキングした。以上の処理はすべて室温下で行った。続いて、細胞を抗 p-H2A.X 抗体 (Cell Signaling Technology, #9718,

1:200) または抗 Tom20 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, sc-11415, 1:500) で 4 °C、overnight で反応させ、洗浄した後にさらに Alexa Fluor 568 二次抗体 (Invitrogen, 1:1000) で室温、1 時間染色した。細胞核を DAPI で染色し、fluorescence mounting medium (DAKO) を用いて封入した。画像は共焦点顕微鏡 AIR または超解像度顕微鏡 N-SIM (Nikon) で撮影し、NIS-Elements software (Nikon) を用いて画像処理を行なった。ミトコンドリアの形態学的定量では、ImageJ により画像の閾値を定めて二値化し、個々のミトコンドリア断片の面積と数を測定した<sup>41,42</sup> (図 6)。

## メタボローム解析

3 匹のマウスから、フローサイトメーターを用いて分離した  $5 \times 10^4$  個の LSK (Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>) 細胞をプールし、洗浄した後に凍結した。凍結した細胞を内部標準化合物 (2-morpholinoethanesulfonic acid (MES) および 1,3,5-benzenetricarboxylic acid (trimesate)) とともに氷冷したメタノールで懸濁し、さらにクロロホルムと超純水 (LC/MS grade, Wako) を添加した。その後、懸濁液を 15,000rpm で 4 °C、15 分間遠心した。遠心後、濾過フィルタ



ー (Ultrafree MC-PLHCC, Human Metabolome Technologies) を用いて水層を限外ろ過した。ろ液を減圧濃縮装置 (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific) によって濃縮し、超純水に溶解した後に IC-MS (Ion chromatography-Mass spectrometry) 解析に供した。

アニオン性代謝産物の解析では、Orbitrap 質量分析計 (Q-Exactive focus, Thermo Fisher Scientific) とイオンクロマトグラフィーシステム (ICS-5000+, Thermo Fisher Scientific) を接続した装置を用いた。イオンクロマトグラフィーによる分離とフーリエ変換型質量分析装置を用いることで、高感度かつ特異的に代謝産物を定量することが可能になる。サンプルが質量分析計に入る前に溶離液中の水酸化カリウムを水に変換するため、イオンクロマトグラフィーには電解再生サプレッサー (Dionex AERS 500, Thermo Fisher Scientific) を搭載した。サンプルの分離は、Dionex IonPac AS11-HC-4  $\mu$ m Column (Thermo Fisher Scientific) を用いて行なった。イオンクロマトグラフの流速は 0.25mL/min とし、ポストカラム法でのメイクアップ溶媒として、メタノールを 0.18mL/min で送液した。溶離液中の水酸化カリウム濃度勾配は、1mM~100mM (0~40 分)、100mM (40~50 分)、1mM (50~60 分)

とし、カラムの温度は 30°C に設定した。Q Exactive Focus 質量分析計は、すべての検出において ESI ネガティブモードで操作した。Full mass scan ( $m/z$  70-900) を分解能 70,000 で行った。Automatic gain control (AGC) target は  $3 \times 10^6$  ions、maximum ion injection time (IT) は 100 ミリ秒とした。イオン源の設定値は、spray voltage 3 kV、transfer temperature 320°C、S-Lens level 50、heater temperature 300°C、Sheath gas pressure 36 psi、Aux gas pressure 10 psi とした<sup>43</sup>。

## RNA シークエンス解析

フローサイトメーターを用いてソートした LSK 細胞より、RNeasy Micro kit (QIAGEN) を用いて RNA を抽出し、Agilent TapeStation High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent) により RNA の収量と品質を確認した。RNA ライブラリーは、15ng の total RNA から QIAseq FX Single cell RNA library kit (QIAGEN) を用いて調製した。ライブラリーの収量と品質は、Agilent TapeStation D1000 (Agilent) と KAPA Library Quantification Kits (KAPA BioSystems) / Real-time PCR Systems Step One Plus

(Applied Biosystems) を用いて確認した。ライブラリーは、Illumina HiSeq2500 System によるペアエンドシーケンスに供した。得られたリードは cutadapt (1.8.1) と fastx-toolkit (0.0.13) を用いて処理し、Illumina アダプター配列の除去とクオリティフィルタリングを行なった。リードの品質は FastQC を用いて評価した。処理されたリードは、TopHat (2.1.1) - Cufflinks (2.1.1) pipeline を用いてリファレンス配列である GRCm38 にアラインメントし、FPKM 値を得た<sup>44-46</sup>。ヒートマップは、ダナ・ファーマー癌研究所より公開されている MeV (<http://mev.tm4.org/>) を用いて作成した。Gene set enrichment analysis (GSEA) は、ブロード研究所より公開されている解析ツールである GSEA (<http://software.broadinstitute.org/gsea/>) を使用して行った。

## コメットアッセイ

コメットアッセイは CometAssay Kit (Trevigen) を用いて行った。FACS でソートした LT-HSC を LM アガロースに埋め込み、Comet Slide に移した。その後、細胞を Lysis solution で溶解し、アルカリ溶液 (200mM NaOH,

1mM EDTA) 中に浸した。アルカリ溶液中でコメットスライドを電気泳動し、SYBR Green で染色した。解析には ImageJ を用い、comet tail moment を算出した。

### **ASXL1-MT/*p53*<sup>-/-</sup>マウス移植**

致死量的線量（総量 900cGy, 4 時間間隔を空けて 450cGy を 2 回照射）の放射線照射を受けた C57BL/6 レシピエントマウス (CD45.1) に、 $1 \times 10^6$  個のドナーマウスの骨髓有核細胞 (CD45.2) を、 $1 \times 10^6$  個の C57BL/6 マウスの骨髓有核細胞 (CD45.1) とともに尾静脈から競合的に移植した。移植後、1 か月おきに末梢血を採取し、ドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーにより経時的に評価した。

### **Foxo1 過剰発現細胞の移植**

HA-Foxo1 ベクターは Addgene (Plasmid #12142) より購入し、pMYs-IRES-NGFR ベクターの SnaBI 切断部位にクローニングした。パッケージング細胞である PlatE 細胞に、リン酸カルシウム共沈降法を用いてプラスミド

をトランスフェクションし、レトロウイルス粒子を産生した。トランスフェクションの48時間後にウイルス液を回収し、レトロネクチンでコートしたプレートに移してウイルス粒子を吸着させた。MACS カラムを用いて骨髓 Lin<sup>+</sup> 細胞 (CD45.2) を分離し、20%FBS、2mM L-glutamine、SCF (50 ng/mL)、Flt3-ligand (50 ng/mL)、および TPO (50 ng/mL) を添加した IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) 培地中で一晩培養した後、48 時間ウイルスを感染させた。その後、プレートからウイルス感染細胞 (CD45.2) を回収し、 $4.0 \times 10^5$  個の C57BL/6 マウスの骨髓有核細胞 (CD45.1) とともに尾静脈から競合的に移植した。移植後、1 か月おきに末梢血を採取し、ドナー由来細胞の割合をフローサイトメトリーにより経時的に評価した。すべてのサイトカインは R&D systems より購入した。

## 定量 PCR 解析

RNA の抽出は、製造元のプロトコルに従い RNeasy Micro Kit (QIAGEN) を用いて行った。cDNA の合成には、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific) を用いた。定量 PCR は SYBR

Premix Ex Taq II (TaKaRa) を用いて行い、Rotor-Gene Q 2plex System (QIAGEN) で定量を行なった。相対的発現レベルは  $\Delta\Delta Ct$  法により算出し、*Actb* 遺伝子の値を用いて正規化した。後述のプライマーを用い、*Foxo1*、*Foxo3*、ならびに *Actb* 遺伝子の定量を行なった。

*Foxo1* forward 5'-TTCAATTCGCCACAATCTGTCC-3'

*Foxo1* reverse 5'-GGGTGATTTTCCGCTCTTGC-3'

*Foxo3* forward 5'- CTGGGGGAACCTGTCCTATG-3'

*Foxo3* reverse 5'- TCATTCTGAACGCGCATGAAG-3'

*Actb* forward 5'- ACCAACTGGGACGACATGGAGAAG-3'

*Actb* reverse 5'-TACGACCAGAGGCATACAGGGACA-3'

## 統計解析

実験データは、平均値 $\pm$ 標準偏差もしくは標準誤差として表現した。P 値は図の説明文に示す通り、unpaired, two-tailed Student's t-test あるいは Mann-Whitney rank sum test を用いて算出した。コホート間の生存解析では、Kaplan-Meier 法と log-ranked tests を用いた。P 値が 0.05 未満の場合

に有意差ありと判定した。すべての計算は GraphPad Prism を用いて行なった。

## 第3章 結果

### 3.1 ASXL1-MT cKI マウスでは HSPC の機能が低下している

我々は最近、早期の MDS やクローン性造血のモデルとして、floxed アレルに C 末端欠失型 ASXL1 (1900-1922del;E635RfsX15) を有するコンディショナルノックインマウスを作成した (以下、ASXL1-MT cKI マウスと呼ぶ)<sup>30</sup>。このマウスと Vav-cre トランスジェニックマウスを交配し、造血器特異的に ASXL1-MT を発現させ、*ASXL1* の変異が造血に及ぼす影響について検討した。

ASXL1-MT cKI マウスの骨髄細胞数は正常であったが、Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup> (LSK) 細胞、多能性前駆細胞 (MPPs; Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD150<sup>-</sup>CD48<sup>+</sup>)、および長期造血幹細胞 (LT-HSCs; Lin<sup>-</sup>Sca1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>) を含む、HSPC 分画の割合は著明に減少していた (図 7、図 8 A, B)。また、未分画の骨髄細胞や特定の集団 (MPP もしくは LT-HSC) を用いた競合的移植実験より、*ASXL1* の変異により造血再構築能が損なわれることが示された (図 9 A-D)。したがって、ASXL1-MT cKI マウスの HSPC は数的減少ならびに機能的低下をきたしていることが明らかとなった。ASXL1-MT cKI マウスにおける HSPC



の機能低下についてより詳細に調べるため、FACS 解析によりアポトーシスと細胞周期を検討した。ASXL1-MT cKI マウスの HSPC では、Annexin V 陽性細胞の割合が有意に増加しており、野生型と比較してよりアポトーシスを起こしやすいことが示唆された (図 10 A, B)。さらに、Ki-67 と DAPI を用いた細胞周期の解析では、静止期 (G0) にある LT-HSC の割合が有意に減少し、MPP と LT-HSC の両方で S/G2/M 期にある細胞の割合が増加していた (図 11 A, B)。これらの結果から、ASXL1-MT は主にアポトーシスを誘導することによって、HSPC の減少を引き起こすことが示唆された。HSC の静止状態の消失も、造血再構築能の低下に寄与しているのかもしれない。

### 3.2 ASXL1-MT cKI マウスの HSPC はミトコンドリアの活性が亢進している

近年の研究で、ミトコンドリアの動態と幹細胞の維持や運命決定の間に、密接な関係があることが示されている<sup>3,19,47-50</sup>。そこで、ASXL1-MT がミトコンドリアの活性に及ぼす影響について検討を行った。MitoTracker プローブを用いた解析において、ASXL1-MT を発現する HSPC は野生型と比較してミトコンドリア膜電位の上昇を認めた (図 12 A, B)。加えて、c-kit 陽性細胞を用

いて酸素消費量を測定すると、*ASXL1* 変異により基礎呼吸と最大呼吸能が増加することが明らかとなった（図 1 3）。次に、LSK 細胞中の代謝産物を網羅的に解析するため、IC-MS によるメタボローム解析を行った<sup>51</sup>。図 1 4 に示す通り、*ASXL1*-MT を発現する LSK 細胞では、ATP ならびに TCA サイクルを構成する代謝産物のプールが増加していた。ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が TCA サイクルによって駆動されること、そして ATP が専らミトコンドリアで産生されることから、これらの代謝変化はミトコンドリアの活性化に矛盾しない所見と考えられた。さらに、LSK 細胞を用いた RNA シークエンス（RNA-seq）解析では、*ASXL1*-MT 発現細胞においてミトコンドリア関連遺伝子の発現上昇が認められた（図 1 5 A, B）。興味深いことに、ミトコンドリア蛋白質である Tom20 の免疫染色によるミトコンドリアの形態的評価では、*ASXL1*-MT を発現する HSPC はより少数で凝集した形態をとる一方、野生型では点状に散らばった形態を示していた（図 1 6 A-D）。このような形状の変化は、*ASXL1*-MT 発現細胞においてミトコンドリアの融合と分裂のバランスが変化していることを示唆する所見である<sup>50,52-54</sup>。以上の結果をまとめると、*ASXL1*-MT は HSPC のエネルギー代謝やミトコンドリアの動態を変化

させることが明らかとなった。

### 3.3 ASXL1 変異は ROS の増加と DNA 損傷を引き起こす

次に、ミトコンドリアは ROS の主要な産生源であることから、HSPC における ROS の存在量を評価した<sup>7,55,56</sup>。予想した通り、CellROX プローブを用いた細胞内 ROS の評価では、ASXL1-MT を発現する HSPC は ROS が増加していた (図 1 7 A, B)。過剰な ROS は好気呼吸で生じる有害な副産物であり、DNA 損傷を引き起こすことが知られている<sup>7,9,57,58</sup>。そこで、コメットアッセイにより DNA 損傷の程度を検討したところ、ASXL1-MT を発現する LT-HSC では DNA 鎖切断が増加していることが分かった (図 1 8 A, B)。また、野生型と ASXL1-MT 発現細胞を競合的に移植して比較したところ、ASXL1-MT を発現する LSK 細胞においてミトコンドリア内の ROS と  $\gamma$ -H2AX の発現上昇が認められた (図 1 9 A-D)。これらの結果より、ASXL1-MT は HSPC において、ROS の蓄積と DNA 損傷の増加を引き起こすことが示唆された。さらに、抗酸化物質である NAC を投与して、HSPC における造血再構築能の低下を回復させることができるかを検討した。野生型ならびに ASXL1-MT cKI マ

ウスに8週間 NAC を投与した後、骨髓細胞をレシピエントマウスへ競合的に移植した。移植後にも、レシピエントマウスへ NAC を投与し続けた。その結果、NAC の投与は *ASXL1* 変異を有する HSPC において ROS と  $\gamma$ -H2AX を効果的に減少させ、部分的に造血再構築能を回復した (図 20 A-E)。ASXL1-MT を発現する HSPC は骨髓系細胞へ造血が偏ることから、NAC の投与が分化に及ぼす影響について評価した<sup>30</sup>。しかしながら、NAC を投与しても異常な骨髓系細胞への分化の偏りは正常化されず、ASXL1-MT は ROS の存在量に関わらず分化異常を引き起こしていることが示唆された (図 20 F)。以上の結果より、ROS を減少させることで ASXL1-MT を発現する HSPC の機能障害が改善されたことから、ROS が造血再構築能の低下の要因であることが明らかとなった。

### 3.4 p53 は *ASXL1* 変異を有する HSPC の造血再構築能を低下させる

ROS や DNA 損傷は、p53 の活性化を引き起こすことが知られている<sup>59,60</sup>。*ASXL1* 変異を有する HSPC の機能制御に対する p53 の役割を評価するため、ASXL1-MT cKI マウスと *p53* ノックアウトマウス (*p53*<sup>-/-</sup>) を交配した。

ASXL1-MT/*p53*<sup>-/-</sup>マウスの LSK 細胞の割合は、ASXL1-MT cKI マウスと比較して増加しており、野生型との有意差は認められなかった (図 2 1 A, B)。競合的移植実験では、*p53* の欠失により ASXL1-MT を発現する HSPC の造血再構築能は回復した (図 2 2)。したがって、*p53* の欠失により ASXL1-MT cKI マウスにおける HSPC の数的減少と機能的低下は改善されることが明らかとなった。また、ASXL1-MT/*p53*<sup>-/-</sup>マウスの骨髓細胞を移植されたマウスは 6 ヶ月以内に全個体が胸腺リンパ腫で死亡する一方、*p53*<sup>-/-</sup>マウスの骨髓細胞を移植されたマウスは 33% の個体が死亡するにとどまっていた (図 2 3 A-C)<sup>61,62</sup>。以上の結果から、*p53* は *ASXL1* を変異した HSPC の造血再構築能を阻害する一方、悪性化を抑制していることが示唆された。

### 3.5 *ASXL1* の変異は *Foxo1* の発現低下を通じて DNA 損傷の増加と造血再構築能の低下を引き起こす

これまでの研究で、ASXL1 は多様なエピジェネティクスを変化させることで、遺伝子発現の制御を行うことが明らかとなっている。そこで、ASXL1-MT を発現する LSK 細胞の RNA-seq 解析により、DNA 損傷を引き起こすような

遺伝子発現の変化を探索したところ、*Foxo1* と *Foxo3* の発現が低下していることが分かった。転写因子である Foxo は、解糖系酵素や還元酵素の発現を介して、代謝や ROS の産生に関与することが示されている<sup>10-12,63,64</sup>。加えて、Foxo は DNA 修復酵素の転写調節を行い、DNA 損傷応答を制御することが知られている<sup>65,66</sup>。定量 PCR でも *Foxo1* と *Foxo3* の発現低下が確認され (図 2 4 A)、RNA-seq 解析では *Foxo1* のターゲット遺伝子群の発現が低下していることが明らかとなった (図 2 4 B)。最近、我々は ASXL1 と H3K4me3 の結合部位がよく相関していること、ならびに ASXL1-MT が結合していると H3K4me3 が大きく損なわれることを、ChIP-seq 解析を用いて報告した<sup>30</sup>。そこで、*Foxo1* と *Foxo3* の遺伝子座について調べたところ、プロモーター領域に野生型ならびに変異型 ASXL1 が結合し、この領域では ASXL1-MT を発現する細胞は H3K4me3 が著しく減少することが明らかとなった (図 2 5)。したがって、ASXL1-MT は H3K4me3 を減少させることで、*Foxo* の発現を低下させることが示唆された。さらに、公共データベース (Gene Expression Omnibus accession number: GSE58831) の MDS 患者データを参照したところ、*ASXL1* 変異を有する MDS 患者に由来する CD34 陽性細胞では、健常

者と比較して *FOXO1* の発現が有意に低下していることが分かった(図 2 6)。

*ASXL1* 変異を有する HSPC における *Foxo1* の役割を調べるため、骨髄 Lin<sup>+</sup> 細胞に *Foxo1* を過剰発現させて移植した。*Foxo1* の発現により、*ASXL1*-MT を発現する HSPC は  $\gamma$ -H2AX の減少を認め (図 2 7 A, B)、レシピエントマウスにおける生着が有意に改善した (図 2 7 C)。その一方、ミトコンドリア活性や ROS の増加は正常化しなかったことから、*ASXL1*-MT は *Foxo1* の発現低下とは異なった機序により、これらの変化を引き起こしていることが示唆された。以上の結果から、*ASXL1*-MT は *Foxo1* の発現低下を介して DNA 損傷を引き起こし、造血再構築能の低下の一因となっていると考えられた。

## 第4章 考察

本研究では、ASXL1-MT cKI マウスを用いた解析により、*ASXL1* 変異が HSPC の機能に及ぼす影響を検討した。競合的移植実験により、ASXL1-MT cKI マウスの HSPC は造血再構築能が著しく損なわれていることが明らかとなった。さらに、HSPC の機能低下は細胞周期の変化やアポトーシスの増加を伴っていた。過去の複数の報告より、HSC の静止状態の喪失が自己複製能の障害と関連することが示されており、*ASXL1* を変異した HSPC においても細胞周期の適切な制御が重要であると考えられた<sup>67</sup>。

*ASXL1* 変異が HSPC の機能を低下させる機序を解明するため、本研究ではこの問題に代謝という視点からアプローチした。HSC は低酸素ニッチにおいて嫌氣的代謝を行っており、静止状態を維持するためにミトコンドリアでの好氣的代謝は抑制されている<sup>2-4,14-16</sup>。そこで、*ASXL1* 変異と代謝の関連について調べるため、ミトコンドリアの活性を4つの方法で評価した。第一に、ミトコンドリアの膜電位に応じて蛍光強度が増大する MitoTracker Red プローブを用いた解析を行い、ASXL1-MT を発現する HSPC ではミトコンドリア膜電位が上昇することを示した。ミトコンドリアの膜電位は、ミトコンドリア内



膜に存在する呼吸鎖複合体 I, III, IV によりプロトンが内膜から膜間腔へ運び出され、プロトン勾配が生じることで形成される。したがって、膜電位の上昇は電子伝達系の活性が亢進していることを示唆する所見である。第二に、c-kit 陽性細胞を用いた酸素消費量の測定で、*ASXL1* 変異細胞で酸素消費量の増加が認められた。細胞内において、酸素はミトコンドリアの呼吸鎖複合体 V (ATP 合成酵素) による酸化的リン酸化反応に用いられる。したがって、酸素消費量の増加は電子伝達系で実際に ATP 合成が増加していることを表している。第三に、LSK 分画を用いたメタボローム解析で、*ASXL1* 変異細胞において TCA サイクルを構成する代謝産物ならびに ATP が増加していた。これは、解糖系から TCA サイクルへの代謝の流れが増加し、それに伴って ATP の産生が亢進していることを示唆する所見である。第四に、RNA-seq 解析のデータを用いた GSEA において、TCA サイクルの酵素や電子伝達系の構成分子を含むミトコンドリア関連遺伝子群の発現上昇が認められたことから、ミトコンドリアの生合成が増加していることが明らかとなった。以上の結果から、*ASXL1*-MT の発現によってミトコンドリアの生合成が促進され、TCA サイクルへの代謝の流れが増加し、電子伝達系での酸化的リン酸化が亢進していると考え

られた。好氣的代謝の異常な亢進は、HSPC の機能低下を引き起こす原因となり得る所見である。

興味深いことに、ミトコンドリア蛋白質である Tom20 の免疫染色によるミトコンドリアの形態的評価では、ASXL1-MT を発現する HSC ではミトコンドリアが増大し、より融合した形態をとることが分かった。ミトコンドリアの増大は生合成の亢進と合致する所見と考えられるが、融合した形態をとる理由については明らかでない。このようなミトコンドリアの形態変化は、分裂と融合のバランスが変化していることを示唆しているのかもしれない。ミトコンドリアの融合は、酸化リン酸化による ATP 産生が亢進しているときに著しく増加する<sup>68</sup>。また、ミトコンドリア DNA の変異などにより機能が低下したミトコンドリアをレスキューするため、ミトコンドリアどうしが融合することも知られている<sup>69</sup>。さらに、ミトコンドリアのダイナミクスの変化が、HSC の機能に影響を与えることも報告されている<sup>48-50</sup>。理由はともあれ、ASXL1 の変異はミトコンドリアの機能に加え、ダイナミクスにも影響を与えることが示された。

ミトコンドリアの活性化に続き、ASXL1-MT cKI マウスの HSPC では ROS

が増加していた。競合的移植実験において、ROS の増加は NAC の投与によってほぼ完全に抑制されたが、NAC による造血再構築能の改善は部分的であった。これは、ROS の増加以外に HSPC の機能を低下させる要因が存在すること、あるいは ROS が HSPC に与える損傷の一部は不可逆的であることを示唆しているのかもしれない。ROS はグアニン塩基の酸化による 8-オキシグアニンの生成、DNA 一本鎖切断、および DNA 二本鎖切断により DNA 損傷を引き起こし、遺伝子変異を起こし得ることが知られている<sup>7</sup>。ROS の増加と一致して、コメットアッセイによる検討において、ASXL1-MT を発現する LT-HSC で DNA 損傷が増加することが見出された。競合的移植実験では、 $\gamma$ -H2AX の発現上昇は NAC の投与により完全に抑制されたことから、ROS が DNA 損傷の原因であることが明らかとなった。したがって、HSPC において ASXL1-MT はミトコンドリアの活性化と ROS の増加を引き起こし、DNA 損傷を惹起することが明らかとなった。以上の結果は、*ASXL1* 変異が新たな変異を促進することを示唆しており、*ASXL1* の変異が骨髄系腫瘍の発症過程で早期に起こる事象である理由を説明し得る可能性がある。過去の報告で、*TET2*、*IDH1*、ならびに *JAK2* 変異も DNA 損傷を増加することが示されてお

り、ある遺伝子変異が別の遺伝子変異を促進することは、腫瘍の発症過程において一般的な現象なのかもしれない<sup>70-72</sup>。

生理的条件下で、p53 は SOD2、GPX1、SESN1 (Sestrin-1)、SESN2 (Sestrin-2) などの抗酸化酵素の発現を活性化させ、ROS を低レベルに維持する役割を担っている<sup>60</sup>。また、DNA 損傷によって p53 は ATM、ATR、CHK1、CHK2 などによるリン酸化を受け、細胞周期の停止やアポトーシスの誘導にはたらくことも知られている。ROS や DNA 損傷による p53 の活性化は、ゲノム安定性の維持に重要な機構だと考えられるが、その活性自体が HSC の機能を損なうことも報告されている<sup>73</sup>。そこで、ASXL1-MT を発現する HSPC では ROS や DNA 損傷により p53 が活性化し、その機能に影響を与えていると推測した。ASXL1 を変異した HSPC における p53 の役割を検討するため、ASXL1-MT cKI マウスと *p53*<sup>-/-</sup>マウスを交配した。ASXL1-MT/*p53*<sup>-/-</sup>マウスでは、ASXL1-MT cKI マウスで見られる LSK 分画の有意な減少を認めず、造血再構築能の低下も抑制されていた。よって、*p53* の欠失により ASXL1-MT cKI マウスにおける HSPC の数的減少と機能低下は改善することが分かった。一方で、ASXL1-MT/*p53*<sup>-/-</sup>マウスは *p53*<sup>-/-</sup>マウスと比較して早期にリンパ腫を発

症し、生存期間は有意に短縮した。したがって、p53 の活性化は ASXL1-MT cKI マウスの HSPC に機能障害を引き起こす一方、ROS や DNA 損傷による悪性化に対する防御機構として重要な役割を果たしていることが示唆された。

最後に、ASXL1-MT が DNA 損傷を引き起こす原因を、RNA-seq 解析のデータを用いて探索した。その結果、ASXL1-MT を発現する LSK 細胞では、転写因子である Foxo の発現が有意に低下していることを見出した。ASXL1-MT を発現する骨髓 Lin 細胞に *Foxo1* を過剰発現して移植すると、造血再構築能の低下を有意に改善することができた。さらに、 $\gamma$ -H2AX の細胞内染色により、*Foxo1* の発現によって DNA 損傷の増加が抑制されることも明らかとなった。したがって、ASXL1-MT cKI マウスにおける HSPC の機能低下は、*Foxo1* の発現低下が原因となっていることが示唆された。その一方、ASXL1 変異細胞におけるミトコンドリア膜電位や ROS レベルの上昇は、*Foxo1* の過剰発現によって改善されなかった。過去の報告で、ヒト臍帯静脈内皮細胞である HUVEC 細胞に *Foxo1* を発現すると、酸素消費量や ROS レベルが低下することが示されている<sup>63</sup>。別の報告では、*Foxo* を欠失した HSC ではミトコンドリアの活性化と ROS の増加が引き起こされ、自己複製能の低下を導くこ

とが明らかとされている<sup>10</sup>。この点につき、本研究と結果が乖離した原因については明らかでない。用いた細胞種や、過剰発現系であるが故の発現量の違いが、その差を生み出しているのかもしれない。他方、*Foxo* は DNA 修復酵素である GADD45 や DDB1 の転写を正に制御するほか、ATM と協調して DNA 損傷応答を促進することが知られている<sup>65,66,74</sup>。したがって、*Foxo1* の過剰発現による  $\gamma$ -H2AX の発現低下は、DNA 損傷応答を介した機序であることが示唆される。

近年、変異型 ASXL1 蛋白質の病態への関与が受け入れられつつあることを背景に、変異型 ASXL1 ノックインマウスに関する論文が相次いで報告された。いずれも、ラストエキソンの変異による C 末端欠失型 ASXL1 の発現を想定しているが、切断部位のわずかな違いや実験系による発現量の差の影響から、表現型に差異が生じている。Yang らは、*Vav1* プロモーター制御下にヒト ASXL1 Y588X 変異を発現するトランスジェニック (Tg) マウスを 2 ライン作製して解析を行った<sup>75</sup>。このマウスでは HSC のプールが増加し、AML、MDS、および MPN で死亡する個体が出現することから、変異型 ASXL1 が骨髄系腫瘍の発症を促進することが明らかとなった。Tg マウスの c-kit 陽性細

胞を用いた RNA-seq と ATAC-seq (Assay for Transposase-Accessible Chromatin Sequencing) 解析より、HSC や骨髄系細胞分化に関連する遺伝子の発現量、ならびにクロマチンへのアクセシビリティの増加が確かめられ、これらが造血器腫瘍の発症に寄与している可能性が考えられた。さらに、変異が ASXL1 と他の蛋白質との結合に影響を及ぼすかを調べるため質量分析を行った。その結果、BRD4 が変異型 ASXL1 と結合する一方、野生型 ASXL1 とは結合しないことを見出した。BRD4 は H3K122 をアセチル化するとともに、p-TEFb を動員して RNA ポリメラーゼ II をリン酸化することで、転写伸長を促進することが知られている。筆者らは、RNA-seq の結果から、白血病の発症に関与する遺伝子である *Prdm16* の発現が亢進していることに着目した。ChIP-qPCR より、Tg マウスの c-kit 陽性細胞では *Prdm16* のプロモーター領域に BRD4、リン酸化 RNA ポリメラーゼ II、および H3K112ac が野生型と比較してより多く結合していることが明らかとなった。以上の結果から、変異型 ASXL1 が BRD4 と結合して RNA ポリメラーゼ II による転写を活性化し、さらに H3K112 のアセチル化を促進していると考えられた。

Hsu らは、ヒト患者でしばしば検出される G646WfsX12 変異を、マウス

*Asx1l* 遺伝子の相同部位に導入したノックインマウスを作製した<sup>76</sup>。競合的移植実験により、*Asx1l* 変異体が HSC の機能を低下させることが示された。また、18 か月の観察期間で造血器腫瘍は発症せず、*Asx1l* 変異体単独では発症に不十分であると考えられた。筆者らは、*ASXL1* の変異した患者ではがん原遺伝子である *MN1* の発現が高く予後不良であることを見出し、*ASXL1* と *MN1* が協調して病態形成に関与する可能性を考えた。骨髓 *Lin*<sup>-</sup> 細胞に *MN1* を過剰発現させてマイクロアレイ解析を行なったところ、*Asx1l* 変異マウスでは野生型と比較して発現変動遺伝子が有意に増加していた。その中には、KRAS および MEK 経路に関連する遺伝子が含まれていたことから、*ASXL1* と *MN1* が協調して遺伝子発現を変化させ、腫瘍化を惹起している可能性が考えられた。また、野生型と *Asx1l* 変異マウスでは H3K27me3 の分布が異なっており、変異型 *Asx1l* が H3K27me3 の分布を攪乱していることが示唆された。

Uni らは、ヒト骨髓系腫瘍患者で認められる G646WfsX12 変異変異を、マウス *Asx1l* 遺伝子座に導入したノックインマウスを作製した<sup>77</sup>。このマウスの造血は骨髓系細胞に偏り、LSK 細胞はアポトーシスが亢進するとともに数



が減少していた。これらの表現型は本研究で用いたマウスと類似しているが、およそ 1.5 年の潜時を経て MDS/MPN 様の病態で死亡するという点が異なる。LSK 分画の RNA-seq 解析より、*Asx1l* 変異マウスでは BMI1 や EZH2 のターゲット遺伝子の脱抑制が認められ、PRC1 ならびに PRC2 の機能低下が示唆された。筆者らは、老化関連遺伝子である *p16Ink4a* の発現が上昇していることに着目し、そのプロモーター領域において H2AK119 のユビキチン化が低下していることを見出した。*Asx1l* 変異マウスと *p16* ヘテロ欠損マウスを交配すると、LSK 分画におけるアポトーシスの亢進と数的減少が正常化した。したがって、*Asx1l* 変異による LSK 細胞の異常には、*p16Ink4a* の脱抑制が寄与していることが示唆された。さらに、BMI1 が野生型 ASXL1 と結合する一方、変異型 ASXL1 とは結合しないことを明らかにした。以上の結果から、変異型 ASXL1 は PRC1 をそのターゲット領域に正しくリクルートできないため、H2AK119Ub の低下による遺伝子発現の脱抑制が引き起こされると考えられた。

上述した通り、変異型 ASXL1 が腫瘍発症に寄与する様々な機序が提唱されているが、コンセンサスは得られていない。少なくとも、変異型 ASXL1 がエ

ピジェネティクスに異常を引き起こし、遺伝子発現を変化させることは共通している。本研究と同様に、いくつかの報告では *ASXL1* 変異によって HSC の機能低下やアポトーシスの亢進が認められている。他のマウスモデルにおける HSC の機能低下が、ミトコンドリアの機能異常と関連しているかどうかは不明であり、今後検討すべき課題の一つである。

*ASXL1*-MT による HSPC の機能低下は、*Foxo* 遺伝子座における H3K4me3 の低下のような、エピジェネティクスの変化によって引き起こされることが明らかとなった。しかしながら、ミトコンドリアの活性がなぜ亢進するのか、という問いに対しては答えを見出すことができていない。これまでの報告と照らし合わせ、ミトコンドリアの活性化に影響する因子がいくつか考えられる。第一に、PDK のような代謝の制御点としてはたらく分子である。PDK はピルビン酸からアセチル CoA への変換を阻害し、TCA サイクルへの代謝の流れを遮断することで好氣的代謝を抑制する<sup>3</sup>。*PDK* の欠失により、クエン酸回路にアセチル CoA が流入し、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が増加することになる。第二に、Hif-1 や Myc を始めとする代謝を制御する転写因子群である。Hif-1 は解糖系酵素の転写をプログラムしており、その欠損に

より嫌氣的代謝から好氣的代謝への転換が起こる<sup>14,18</sup>。Myc は転写をグローバルに活性化し、細胞周期の進行や代謝の亢進により増殖を促進する。Myc のターゲットとして400種類を超えるミトコンドリア遺伝子が同定されており、Myc の活性化はミトコンドリア容量と呼吸能の増加を引き起こす<sup>78</sup>。第三に、mTOR (mammalian target of rapamycin) シグナル伝達経路が挙げられる。mTORC1 は YY1 (Ying Yang 1) や PGC-1  $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator -1  $\alpha$ ) と複合体を形成し、ミトコンドリア遺伝子の発現とそれに続くミトコンドリアの生合成を促進する<sup>79</sup>。また、脂質、蛋白質、および核酸合成にもはたらき、代謝を統合的に調節していると考えられている<sup>80</sup>。mTORC1 の活性を阻害する Tsc1 (Tuberous sclerosis 1) を欠失すると、ミトコンドリア容量が増加するとともに ROS の産生が亢進する<sup>47</sup>。また、mTORC1 は PI3K-AKT および MAPK シグナル伝達経路により正の制御を受けており、これらの経路の活性化はミトコンドリアの機能を亢進させる<sup>81,82</sup>。以上のように、ミトコンドリアにおける代謝は様々な因子により規定されるが、それらは互いに排他的ではなく協調、あるいは拮抗し、制御されていると考えられる。ASXL1 変異によるミトコンドリア

の活性化も、代謝の複雑な制御を経ている可能性があり、その原因を明らかにするためにより詳細な解析が必要である。

冒頭で述べた通り、*ASXL1* の変異は加齢に伴う CH でしばしば認められ<sup>25</sup>、<sup>27</sup>、本研究で用いた *ASXL1*-MT cKI マウスはそのモデルとして有用である可能性がある。*ASXL1*-MT cKI マウスでは、加齢に伴い軽度の貧血をきたすとともに骨髄系細胞が増加し、造血器腫瘍発症への感受性が増大することが示されており<sup>30</sup>、高齢者における造血の特徴と類似している。加齢に伴うこれらの変化は、HSC の自己複製能や分化能の低下が原因の一つとして考えられている。C57BL/6 系統のマウスでは、加齢に伴って表面マーカーで定義した HSC の数は増加するものの、造血再構築能は低下する<sup>83</sup>。また、ヒト HSC においても加齢に伴って機能低下をきたすことが示唆されている<sup>84</sup>。このような HSC の機能低下の一因として、DNA 複製や ROS による DNA 損傷の蓄積が考えられている<sup>85,86</sup>。本研究において、*ASXL1*-MT は ROS を増加させることにより DNA 損傷を惹起し、HSC の機能低下を引き起こすことが示された。加えて、HSC において細胞周期の進行が促進されていることから、複製ストレスによる DNA 損傷の増加が、HSC の機能を低下させる原因となっている

ことも考えられる。すなわち、加齢に伴う HSC の老化を ASXL1-MT が促進している可能性がある。さらに、ASXL1-MT cKI マウスの HSC は DNA 損傷を蓄積しながらその集団を緩徐に拡大させ、造血器腫瘍の発症リスクを増大させていることが推察される。実際に、高齢の ASXL1-MT cKI マウスでは LT-HSC が野生型と比較して増加するとともに、DNA 損傷を蓄積していることが確認されている (Data not shown)。このような観察結果は、CH における変異クローンの拡大、ならびに造血器腫瘍の発症リスクの増大を模倣しているのかもしれない。ミトコンドリアは細胞活動を行う際のエネルギー源であるから、細胞周期の進行と密接に関連していると考えられる。ミトコンドリアの異常な活性化を阻害することができれば、細胞周期の進行による変異クローンの拡大、ならびに複製ストレスや ROS による DNA 損傷の増加が抑制されることが期待され、CH の治療標的となり得る可能性がある。今後は、ASXL1 変異がミトコンドリアを活性化するメカニズム、ミトコンドリアの活性化と CH の関連、さらにはミトコンドリア活性の抑制による CH の治療可能性について、さらなる検討が必要であると考ええる。

## 第5章 結論

ASXL1-MT cKI マウスの解析より、ASXL1-MT を発現する HSPC は機能的に低下していることが分かった。ASXL1-MT は、HSPC においてミトコンドリアの異常な活性化を惹起し、ROS による DNA 損傷を引き起こした。ASXL1-MT が引き起こした DNA 損傷の増加と造血再構築能の低下は、NAC の投与や *Foxo1* の過剰発現によって回復した。したがって、ASXL1-MT を発現する HSPC の機能低下は、DNA 損傷の増加が原因であると考えられた。本研究の結果は、*ASXL1* 変異を有する CH や骨髄系腫瘍の治療に、示唆を与えるものだと考えられる。今後の研究では、*ASXL1* の変異によりミトコンドリアの活性が亢進する原因を究明する必要がある。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導頂いた東京大学医科学研究所細胞療法分野の北村俊雄先生、合山進先生に深く感謝の意を表します。メタボローム解析を行って頂いた、慶應義塾大学医学部医化学教室の末松誠先生、杉浦悠毅先生に厚く御礼申し上げます。RNA シークエンス解析を行って頂いた、東京大学医科学研究所ゲノム医科学分野の柴田龍弘先生、山崎智先生、松本明子先生に深く感謝申し上げます。コメットアッセイをご指導頂いた、東京医科歯科大学幹細胞医学分野の西村栄美先生、森永浩伸先生に厚く御礼申し上げます。ASXL1-MT cKI マウスを作製頂いた、東京女子医科大学先端生命医学専攻疾患モデル研究分野の本田浩章先生に感謝の意を表します。ChIP シークエンスのデータをご提供頂いた、メモリアルスローンケタリング癌センターの Omar Abdel-Wahab 先生、井上大地先生に厚く御礼申し上げます。*p53* ノックアウトマウスを供与頂いた、東京大学医科学研究所シークエンス技術解析分野の松田浩一先生に感謝申し上げます。本研究にご協力を頂いた、東京大学医科学研究所細胞療法分野の福山朋房先生、田中洋介先生、佐藤成先生、土屋秋穂先生、四方紫織先生、永瀬玲奈先生、浅田修平先生、福島剛先生に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1 Johanna Flach, Sietske T. Bakker, Mary Mohrin, Pauline C. Conroy, Eric M. Pietras, Damien Reynaud, Silvia Alvarez, Morgan E. Diolaiti, Fernando Ugarte, E. Camilla Forsberg, Michelle M. Le Beau, Bradley A. Stohr, Juan Me´ndez, Ciaran G. Morrison & Emmanuelle Passegue. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; **512**: 198–202.
- 2 Suda T, Takubo K, Semenza GL. Review Metabolic Regulation of Hematopoietic Stem Cells in the Hypoxic Niche. *Stem Cell* 2011; **9**: 298–310.
- 3 Keiyo Takubo, Go Nagamatsu, Chiharu I. Kobayashi, Ayako Nakamura-Ishizu, Hiroshi Kobayashi, Eiji Ikeda, Nobuhito Goda, Yasmeen Rahimi, Randall S. Johnson, Tomoyoshi Soga, Atsushi Hirao, Makoto Suematsu, and Toshio Suda. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2013; **12**: 49–61.



- 4 César Nombela-Arrieta, Gregory Pivarnik, Beatrice Winkel, Kimberly J. Canty, Brendan Harley, John E. Mahoney, Shin-Young Park, Jiayun Lu, Alexei Protopopov and Leslie E. Silberstein. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 2013; **15**: 533–543.
- 5 Sheng Zhou, John D. Schuetz, Kevin D. Bunting, Anne-Marie Colapietro, Janardhan Sampath, John J. Morris, Irina Lagutina, Gerard C. Grosveld, Mitsujiro Osawa, Hiromitsu Nakauchi and Brian P. Sorrentino. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med* 2001; **7**: 1028–1034.
- 6 Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Le Beau MM, Morrison CG, Passegué E. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 174–185.

- 7 Bigarella CL, Liang R, Ghaffari S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* 2014; **141**: 4206–4218.
- 8 Jang Y, Sharkis SJ. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 2007; **110**: 3056–3063.
- 9 Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2015; **118**: 2941–2951.
- 10 Rimmelé P, Liang R, Bigarella CL, Kocabas F, Xie J, Serasinghe MN, Chipuk J, Sadek H, Zhang CC, Ghaffari S. Mitochondrial metabolism in hematopoietic stem cells requires functional FOXO3. *EMBO Rep* 2015; **16**: 1164–1176.
- 11 Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N,

- Suda T, Hirao A. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool. *Cell Stem Cell* 2007; **1**: 101–112.
- 12 Tothova Z, Kollipara R, Huntly BJ, Lee BH, Castrillon DH, Cullen DE, McDowell EP, Lazo-Kallanian S, Williams IR, Sears C, Armstrong SA, Passegué E, DePinho RA, Gilliland DG. FoxOs Are Critical Mediators of Hematopoietic Stem Cell Resistance to Physiologic Oxidative Stress. *Cell* 2007; **128**: 325–339.
- 13 Ito K, Hirao A, Arai F, Matsuoka S, Takubo K, Hamaguchi I, Nomiyama K, Hosokawa K, Sakurada K, Nakagata N, Ikeda Y, Mak TW, Suda T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 2004; **431**: 997–1002.
- 14 Takubo K, Goda N, Yamada W, Iriuchishima H, Ikeda E, Kubota Y, Shima H, Johnson RS, Hirao A, Suematsu M, Suda T. Regulation of the HIF-1  $\alpha$  level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 391–402.
- 15 Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson

- EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 380–390.
- 16 Parmar K, Mauch P, Vergilio J-A, Sackstein R, Down JD. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**: 5431–5436.
- 17 Wang, G. L. & Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 1995; **270**: 1230–1237.
- 18 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix- PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; **92**: 5510–5514.
- 19 Yu WM, Liu X, Shen J, Jovanovic O, Pohl EE, Gerson SL, Finkel T, Broxmeyer HE, Qu CK. Metabolic regulation by the mitochondrial phosphatase PTPMT1 is required for hematopoietic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* 2013; **12**: 62–74.
- 20 Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner

- K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Göhring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Heuser M, Ganser A. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 2499–2506.
- 21 Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Roquain J, Adélaïde J, Carbuccia N, Esterni B, Finetti P, Murati A, Arnoulet C, Zerazhi H, Fezoui H, Tadrist Z, Nezri M, Chaffanet M, Mozziconacci MJ, Vey N, Birnbaum D. ASXL1 mutation is associated with poor prognosis and acute transformation in chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; **151**: 365–375.
- 22 Mengistu G, Balcha F, Britton S. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2015; **373**: 1136–52.
- 23 J. Nangalia, C.E. Massie, E.J. Baxter, F.L. Nice, G. Gundem, D.C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D.G. Kent, A. Aziz, A.L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, A.V. Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H.P. Harding, J.D. Fitzpatrick, C.T. Goudie,

- C.A. Ortmann, S.J. Loughran, K. Raine, D.R. Jones, A.P. Butler, J.W. Teague, S. O'Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M.-Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B.J.P. Huntly, C.N. Harrison, N.C.P. Cross, D. Ron, A.M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P.J. Campbell, and A.R. Green. Somatic *CALR* Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated *JAK2*. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2391–2405.
- 24 Yoshizato T, Dumitriu B, Hosokawa K, Makishima H, Yoshida K, Townsley D, Sato-Otsubo A, Sato Y, Liu D, Suzuki H, Wu CO, Shiraishi Y, Clemente MJ, Kataoka K, Shiozawa Y, Okuno Y, Chiba K, Tanaka H, Nagata Y, Katagiri T, Kon A, Sanada M, Scheinberg P, Miyano S, Maciejewski JP, Nakao S, Young NS, Ogawa S. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. *N Engl J Med* 2015; **373**: 35–47.
- 25 Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC,

- McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, Dipersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med* 2014; **20**: 1472–1478.
- 26 Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2488–2498.
- 27 Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landén M, Höglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran

- JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Grönberg H, Hultman CM, McCarroll SA. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. *N Engl J Med* 2014; **371**: 2477–2487.
- 28 Milne TA, Sinclair DAR, Brock HW. The Additional sex combs gene of *Drosophila* is required for activation and repression of homeotic loci, and interacts specifically with Polycomb and super sex combs. *Mol Gen Genet* 1999; **261**: 753–761.
- 29 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. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. *Cancer Cell* 2012; **22**: 180–193.
- 30 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. Expression of mutant *Asxl1* perturbs hematopoiesis and promotes susceptibility to leukemic transformation. *J Exp Med* 2018.
- 31 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. A novel ASXL1–OGT axis plays roles in H3K4 methylation and tumor suppression in myeloid malignancies. *Leukemia* 2018; **32**: 1327–1337.
- 32 Scheuermann JC, de Ayala Alonso AG, Oktaba K, Ly-Hartig N, McGinty RK, Fraterman S, Wilm M, Muir TW, Müller J. Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. *Nature* 2010; **465**: 243–247.
- 33 Balasubramani A, Larjo A, Bassein JA, Chang X, Hastie RB, Togher SM, Lähdesmäki H, Rao A. Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex. *Nat*

*Commun* 2015; **6**: 1–15.

- 34 Sahtoe DD, Van Dijk WJ, Ekkebus R, Ovaa H, Sixma TK. BAP1/ASXL1 recruitment and activation for H2A deubiquitination. *Nat Commun* 2016; **7**: 1–13.
- 35 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. Mutant ASXL1 cooperates with BAP1 to promote myeloid leukaemogenesis. *Nat Commun* 2018; **9**: 1–18.
- 36 Sanchez R, Zhou MM. The PHD finger: A versatile epigenome reader. *Trends Biochem Sci* 2011; **36**: 364–372.
- 37 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. Deletion of *Asxl1* results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo. *J Exp Med* 2013; **210**: 2641–2659.
- 38 Wang J, Li Z, He Y, Pan F, Chen S, Rhodes S, Nguyen L, Yuan J, Jiang L, Yang X, Weeks O, Liu Z, Zhou J, Ni H, Cai CL, Xu M, Yang FC. Loss of *Asxl1* leads to myelodysplastic syndrome-like disease in mice. *Blood* 2014; **123**: 541–553.
- 39 Inoue D, Kitaura J, Togami K, Nishimura K, Enomoto Y, Uchida T, Kagiya 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. Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation–altering *ASXL1* mutations. *J Clin Invest* 2013; **123**: 4627–4640.
- 40 Inoue D, Matsumoto M, Nagase R, Saika M, Fujino T, Nakayama KI, Kitamura T. Truncation mutants of *ASXL1* observed in myeloid malignancies are expressed at detectable protein levels. *Exp Hematol* 2016; **44**: 172–176.

- 41 Senyilmaz D, Virtue S, Xu X, Tan CY, Griffin JL, Miller AK, Vidal-Puig A, Teleman AA. Regulation of mitochondrial morphology and function by stearylolation of TFR1. *Nature* 2015; **525**: 124–128.
- 42 Rehman J, Zhang HJ, Toth PT, Zhang Y, Marsboom G, Hong Z, Salgia R, Husain AN, Wietholt C, Archer SL. Inhibition of mitochondrial fission prevents cell cycle progression in lung cancer. *FASEB J* 2012; **26**: 2175–2186.
- 43 Kunisawa J, Sugiura Y, Wake T, Nagatake T, Suzuki H, Nagasawa R, Shikata S, Honda K, Hashimoto E, Suzuki Y, Setou M, Suematsu M, Kiyono H. Mode of Bioenergetic Metabolism during B Cell Differentiation in the Intestine Determines the Distinct Requirement for Vitamin B1. *Cell Rep* 2015; **13**: 122–131.
- 44 Dobin A, Gingeras TR. “ TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 2013; **14**: R36.
- 45 Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren

- MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010; **28**: 511–515.
- 46 Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL, Pachter L. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nat Protoc* 2012; **7**: 562–578.
- 47 Chen C1, Liu Y, Liu R, Ikenoue T, Guan KL, Liu Y, Zheng P. TSC–mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *J Exp Med* 2008; **205**: 2397–2408.
- 48 Ho TT, Warr MR, Adelman ER, Lansinger OM, Flach J, Verovskaya EV, Figueroa ME, Passegué E. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells. *Nature* 2017; **543**: 205–210.
- 49 Ito K, Turcotte R, Cui J, Zimmerman SE, Pinho S, Mizoguchi T, Arai

- F, Runnels JM, Alt C, Teruya-Feldstein J, Mar JC, Singh R, Suda T, Lin CP, Frenette PS, Ito K. Self-renewal of a purified Tie2<sup>+</sup> hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance. *Science (80- )* 2016; **354**: 1156–1160.
- 50 Luchsinger LL, De Almeida MJ, Corrigan DJ, Mumau M, Snoeck HW. Mitofusin 2 maintains haematopoietic stem cells with extensive lymphoid potential. *Nature* 2016; **529**: 528–531.
- 51 Hu S, Wang J, Ji EH, Christison T, Lopez L, Huang Y. Targeted Metabolomic Analysis of Head and Neck Cancer Cells Using High Performance Ion Chromatography Coupled with a Q Exactive HF Mass Spectrometer. *Anal Chem* 2015; **87**: 6371–6379.
- 52 Youle RJ, Blik AM Van Der, Complementation FP, Mitochondria BD, Fusion M, Proteins F. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science (80- )* 2012; **337**: 1062–1065.
- 53 Archer SL. Mitochondrial Dynamics — Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. *N Engl J Med* 2013; **369**: 2236–2251.

- 54 Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; **11**: 872–884.
- 55 Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 2012; **48**: 158–166.
- 56 Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 2010; **35**: 505–513.
- 57 Ito K, Hirao A, Arai F, Takubo K, Matsuoka S, Miyamoto K, Ohmura M, Naka K, Hosokawa K, Ikeda Y, Suda T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2006; **12**: 446–451.
- 58 Douglas C. Wallace. Mitochondria and Cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; **12**: 685–698.
- 59 Abbas HA, Maccio DR, Coskun S, Jackson JG, Hazen AL, Sills TM, You MJ, Hirschi KK, Lozano G. Mdm2 Is Required for Survival of Hematopoietic Stem Cells/Progenitors via Dampening of ROS-Induced

- p53 Activity. *Cell Stem Cell* 2010; **7**: 606–617.
- 60 Sablina AA, Budanov A V., Ilyinskaya G V., Agapova LS, Kravchenko JE, Chumakov PM. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* 2005; **11**: 1306–1313.
- 61 Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992; **356**: 215–221.
- 62 Kemp CJ, Wheldon T, Balmain A. P53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nat Genet* 1994; **8**: 66–69.
- 63 Wilhelm K, Happel K, Eelen G, Schoors S, Oellerich MF, Lim R, Zimmermann B, Aspalter IM, Franco CA, Boettger T, Braun T, Fruttiger M, Rajewsky K, Keller C, Brüning JC, Gerhardt H, Carmeliet P, Potente M. FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. *Nature* 2016; **529**: 216–220.



- 64 Ferber EC, Peck B, Delpuech O, Bell GP, East P, Schulze A. FOXO3a regulates reactive oxygen metabolism by inhibiting mitochondrial gene expression. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 968–979.
- 65 Tran H, Brunet A, Grenier JM, Datta SR, Fornace AJ Jr, DiStefano PS, Chiang LW, Greenberg ME. DNA repair pathway by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science* (80- ) 2002; **296**: 530–534.
- 66 Ramaswamy S, Nakamura N, Sansal I, Bergeron L, Sellers WR. A novel mechanism of gene regulation and tumor suppression by the transcription factor FKHR. *Cancer Cell* 2002; **2**: 81–91.
- 67 Pietras EM, Warr MR, Passegué E. Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J Cell Biol* 2011; **195**: 709–720.
- 68 Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci* 2009; **106**: 11960–11965.

- 69    Chen H, Vermulst M, Wang YE, Chomyn A, Prolla TA, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial fusion is required for mtdna stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 2010; **141**: 280–289.
- 70    Marty C, Lacout C, Droin N, Le Couédic JP, Ribrag V, Solary E, Vainchenker W, Villeval JL, Plo I. A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia* 2013; **27**: 2187–2195.
- 71    Inoue S, Li WY, Tseng A, Beerman I, Elia AJ, Bendall SC, Lemonnier F, Kron KJ, Cescon DW, Hao Z, Lind EF, Takayama N, Planello AC, Shen SY, Shih AH, Larsen DM, Li Q, Snow BE, Wakeham A, Haight J, Gorrini C, Bassi C, Thu KL, Murakami K, Elford AR, Ueda T, Straley K, Yen KE, Melino G, Cimmino L, Aifantis I, Levine RL, De Carvalho DD, Lupien M, Rossi DJ, Nolan GP, Cairns RA, Mak TW. Mutant IDH1 Downregulates ATM and Alters DNA Repair and Sensitivity to DNA Damage Independent of TET2. *Cancer Cell* 2016; **30**: 337–348.

- 72 Pan F, Wingo TS, Zhao Z, Gao R, Makishima H, Qu G, Lin L, Yu M, Ortega JR, Wang J, Nazha A, Chen L, Yao B, Liu C, Chen S, Weeks O, Ni H, Phillips BL, Huang S, Wang J, He C, Li GM, Radivoyevitch T, Aifantis I, Maciejewski JP, Yang FC, Jin P, Xu M. Tet2 loss leads to hypermutagenicity in haematopoietic stem/progenitor cells. *Nat Commun* 2017; **8**: 1–10.
- 73 Dumble M, Moore L, Chambers SM, Geiger H, Van Zant G, Goodell MA, Donehower LA. The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* 2007; **109**: 1736–1742.
- 74 Tsai W Bin, Chung YM, Takahashi Y, Xu Z, Hu MCT. Functional interaction between FOXO3a and ATM regulates DNA damage response. *Nat Cell Biol* 2008; **10**: 460–467.
- 75 Yang H, Kurtenbach S, Guo Y, Lohse I, Durante MA, Li J, Li Z, Al-Ali H, Li L, Chen Z, Field MG, Zhang P, Chen S, Yamamoto S, Li Z, Zhou Y, Nimer SD, Harbour JW, Wahlestedt C, Xu M, Yang FC. Gain of

- function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies. *Blood* 2018; **131**: 328–341.
- 76 Hsu YC, Chiu YC, Lin CC, Kuo YY, Hou HA, Tzeng YS, Kao CJ, Chuang PH, Tseng MH, Hsiao TH, Chou WC, Tien HF. The distinct biological implications of Asxl1 mutation and its roles in leukemogenesis revealed by a knock-in mouse model. *J Hematol Oncol* 2017; **10**: 1–15.
- 77 Uni M, Masamoto Y, Sato T, Kamikubo Y, Arai S, Hara E, Kurokawa M. Modeling ASXL1 mutation revealed impaired hematopoiesis caused by derepression of p16Ink4a through aberrant PRC1-mediated histone modification. *Leukemia* 2018; : 191–204.
- 78 Li F, Wang Y, Zeller KI, Potter JJ, Wonsey DR, O'Donnell KA, Kim JW, Yustein JT, Lee LA, Dang CV. Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol*, 2005; **25**: 6225–6234.
- 79 Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK,

- Puigserver P. mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1  $\alpha$  transcriptional complex. *Nature* 2007; **450**: 736–740.
- 80 Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; **168**: 960–976.
- 81 Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by Erk: Implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. *Cell* 2005; **121**: 179–193.
- 82 Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat Cell Bio* 2002; **4**: 648–657.
- 83 Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, Globerson A, Weissman IL. The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med*. 1996; **9**: 1011–1016.
- 84 Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, Filipovich AH, Hegland J, Kamani N, Kernan NA, King R, Ratanatharathorn V,

- Weisdorf D, Confer DL. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: The effect of donor age. *Blood* 2001; **98**: 2043–2051.
- 85 Yahata T, Takanashi T, Muguruma Y, Ibrahim AA, Matsuzawa H, Uno T, Sheng Y, Onizuka M, Ito M, Kato S, Ando K. Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood* 2015; **118**: 2941–2951.
- 86 Flach J, Bakker ST, Mohrin M, Conroy PC, Pietras EM, Reynaud D, Alvarez S, Diolaiti ME, Ugarte F, Forsberg EC, Le Beau MM, Stohr BA, Méndez J, Morrison CG, Passegué E. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. *Nature* 2014; **512**: 198–202.

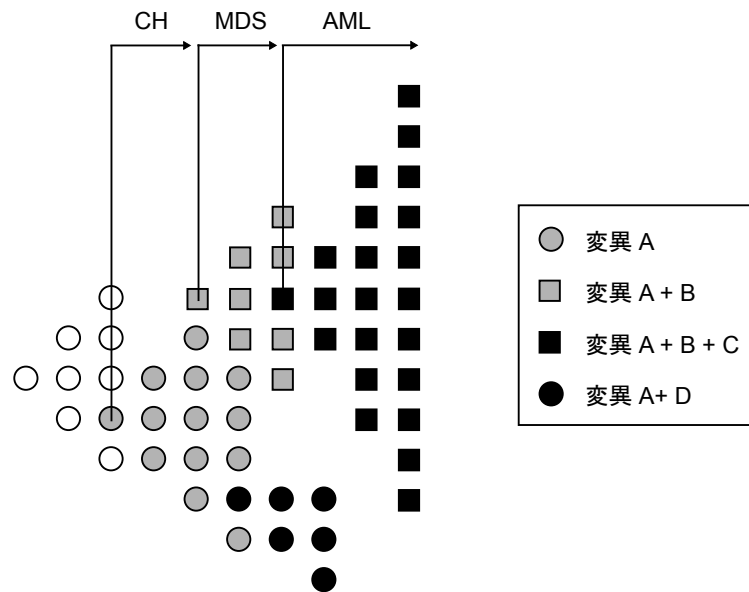


図1 クローン性造血から白血病に至るモデル

加齢に伴い遺伝子あるいはエピジェネティクスに変異が蓄積され、CH は MDS や AML に至ると考えられる。ASXL1 変異は CH でしばしば認められ、造血器腫瘍発症の過程で最も早期に起こる遺伝子変異の一つであることが示唆されている。

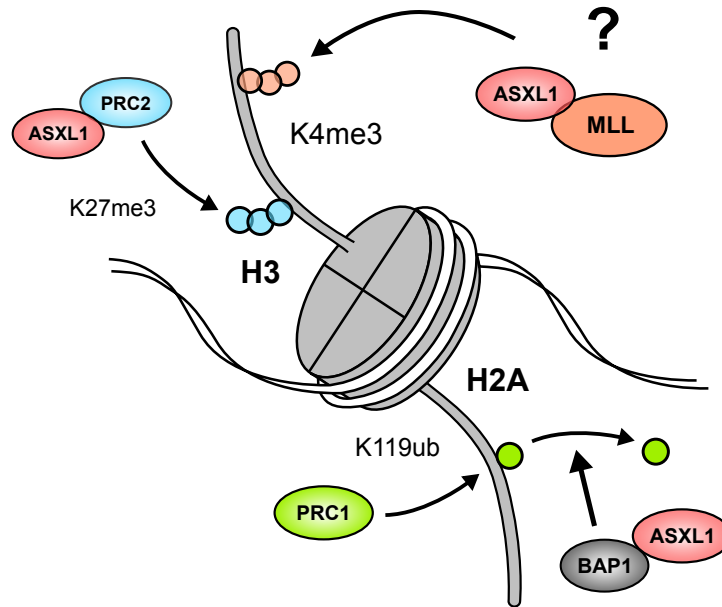


図2 ASXL1 は多様なヒストン修飾を通じて遺伝子発現を調節する

ASXL1 は PRC2 を介した H3K27 トリメチル化、BAP1 との協調によるH2AK119Ub の脱ユビキチン化、ならびに H3K4 トリメチル化に寄与しており（機序不明）、ヒストン修飾の足場蛋白として機能している可能性が考えられる。



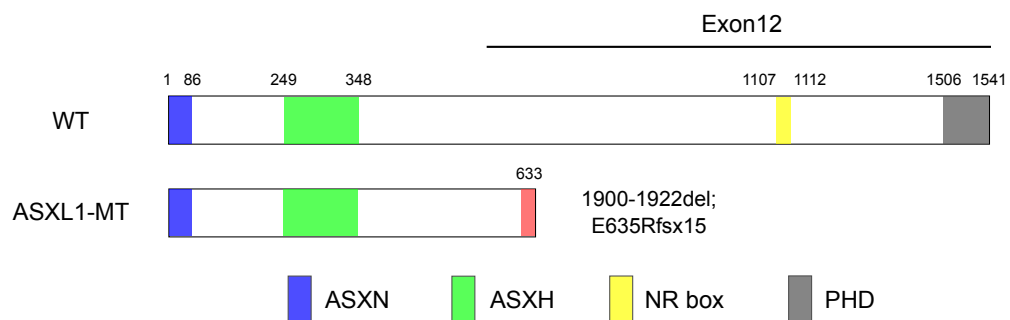


図3 野生型および変異型 ASXL1 蛋白質の構造

ASXL1 蛋白質は 1541 残基のアミノ酸から構成され、N末端領域に ASXH ドメインが、C末端領域に plant homeodomain (PHD) ドメインが存在する。患者で見出される変異は、ラストエキソン5' 側のフレームシフト変異やナンセンス変異が大部分であり、これにより PHD ドメインが欠失した変異型 ASXL1 蛋白質が生じる。ASXL1-MT cKI マウスでは、1900-1922del;E635Rfsx15 変異が Rosa26 locus に挿入されている。

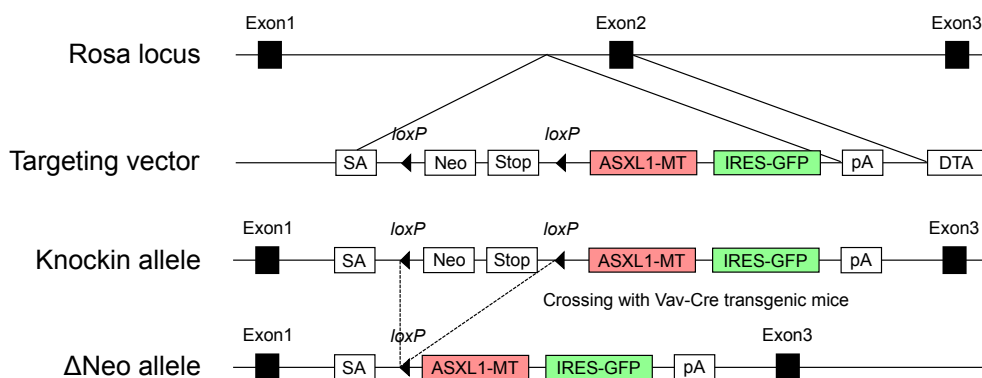


図4 変異型 ASXL1 コンディショナルノックインマウス設計

Rosa locus、ターゲティングベクター、およびノックインアレルのシェーマ図を示した。ネオマイシン耐性遺伝子およびストップ配列を loxP 配列で挟み、続けて3xFLAG - ASXL1-MT (p.E635RfsX15) - internal ribosome entry site (IRES) - enhanced GFP (EGFP) 配列を組み込んだターゲティングベクターを、相同組換えにより Rosa26 locus に挿入した。このノックインアレルを有するマウスを Vav-Cre トランスジェニックマウスと交配し、造血器特異的に変異型 ASXL1 を発現するコンディショナルノックインマウスを作製した。DTA, diphtheria toxin A gene; EV, empty vector; SA, splicing acceptor.

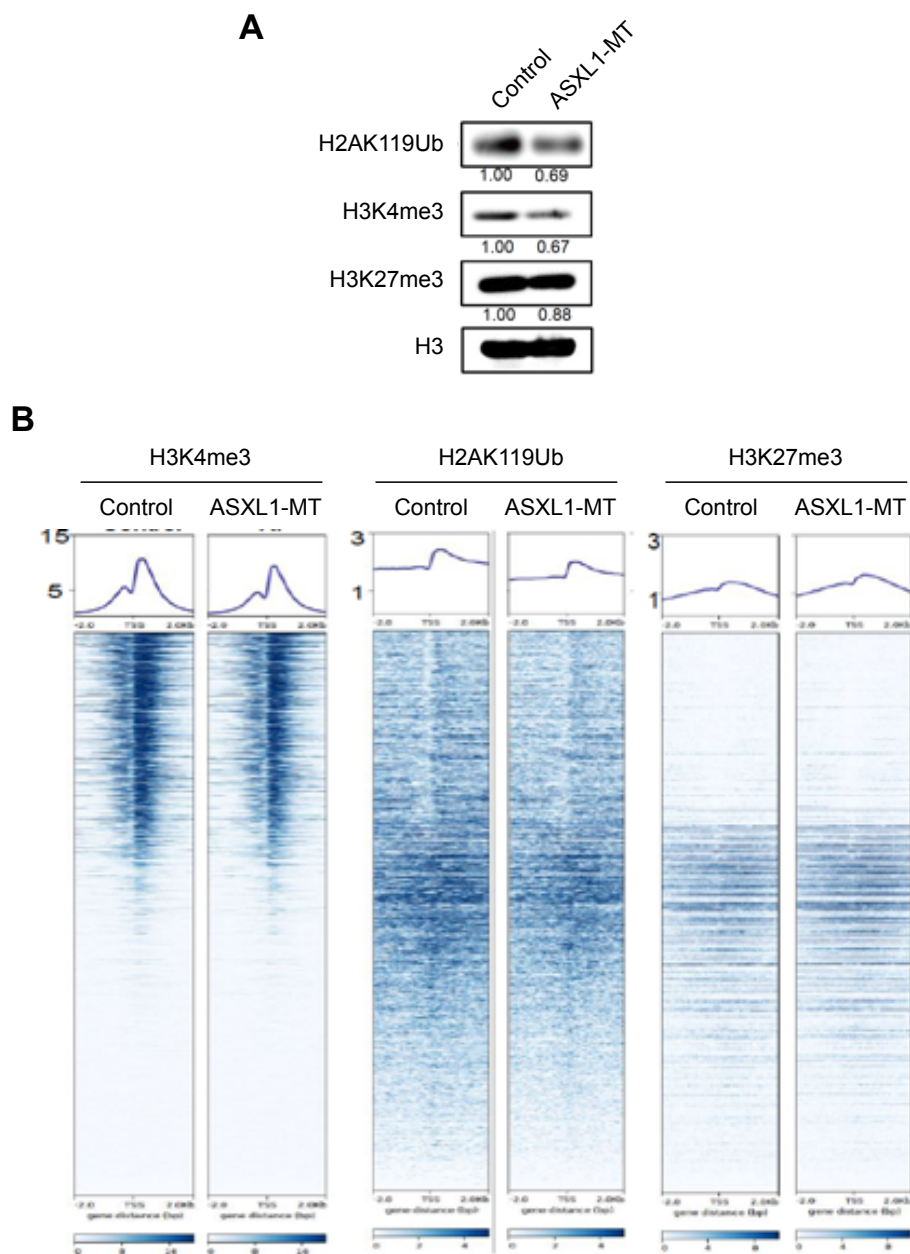
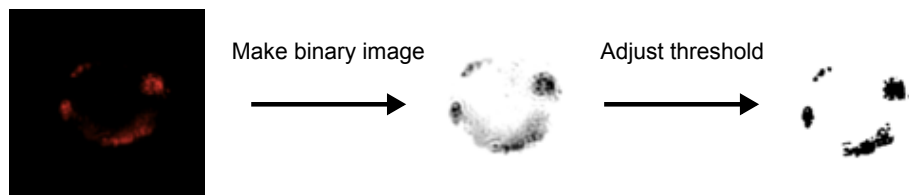


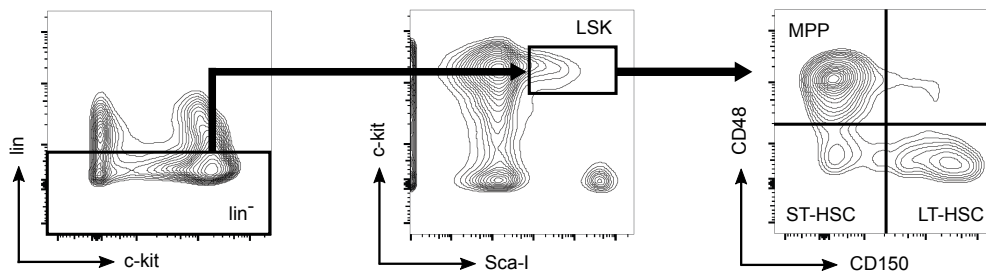
図5 ASXL1-MT がヒストン修飾に及ぼす影響の検討

A, 野生型と ASXL1-MT cKI マウスより骨髓細胞を分離し、H2AK119Ub、H3K4me3、H3K27me3、および H3 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。B, 骨髓 c-kit 陽性細胞を用い、H3K4me3、H2AK119Ub、ならびにH3K27me3 の ChIP シークエンス解析を行った。転写開始領域 (Transcript Start Site; TSS) を中心として、シグナル値をヒートマップ表示した。



**図6 ミトコンドリアの定量**

細胞の断面積が最大となるよう二次元画像を取得し、二値化した後に閾値を定め、ミトコンドリアの断片数と面積を計測した。さらに、ミトコンドリアの面積を断片数で除し、ミトコンドリア1断片あたりの面積を定量した。



population	marker
lineage	CD11b, Gr-1, CD5, B220, Ter119
LSK	Lin <sup>-</sup> Sca1 <sup>+</sup> c-kit <sup>+</sup>
MPP: multipotent progenitor	CD150 <sup>-</sup> CD48 <sup>+</sup> LSK
ST-HSC: short term-hematopoietic stem cell	CD150 <sup>-</sup> CD48 <sup>-</sup> LSK
LT-HSC: long term-hematopoietic stem cell	CD150 <sup>+</sup> CD48 <sup>-</sup> LSK

図7 FACS による造血幹・前駆細胞分画の解析

HSPC の解析では、骨髓細胞から MACS カラムを用いて lin<sup>-</sup> 分画を分離し、表面抗原を染色した。その後、FACS 解析で細胞をプロット図に示した通りに展開し、MPP、ST-HSC、ならびに LT-HSC を同定した。

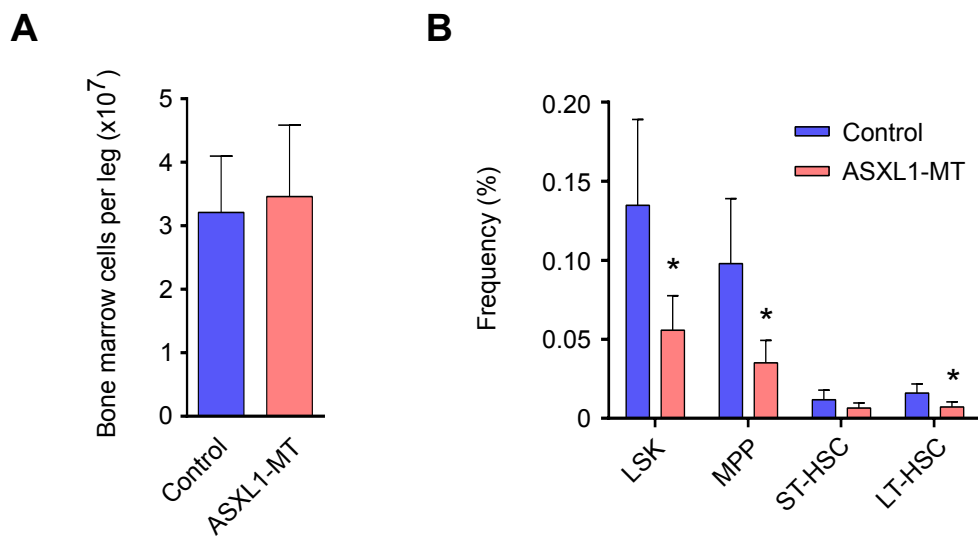


図8 ASXL1-MT cKI マウスの HSPC は著明に減少している

A, 片足（大腿骨および脛骨）あたりの骨髓細胞数（ $n=5$ ）。B, 全骨髓細胞に対する MPP、ST-HSC（Short-term HSC; 短期造血幹細胞）、および LT-HSC の占める割合（ $n=5$ ）。データは平均値  $\pm$  標準偏差。\* $P < 0.05$ ; two-tailed Student's t-test.

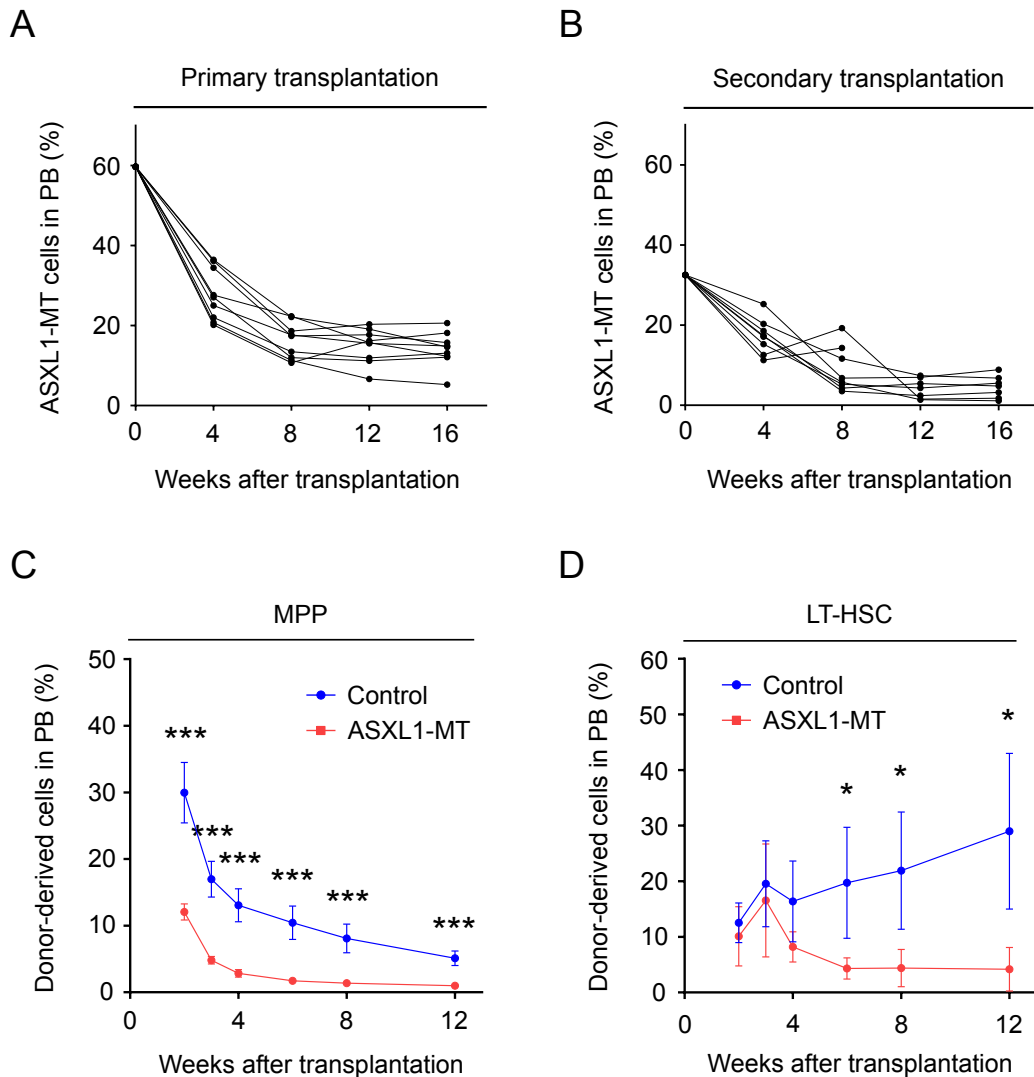
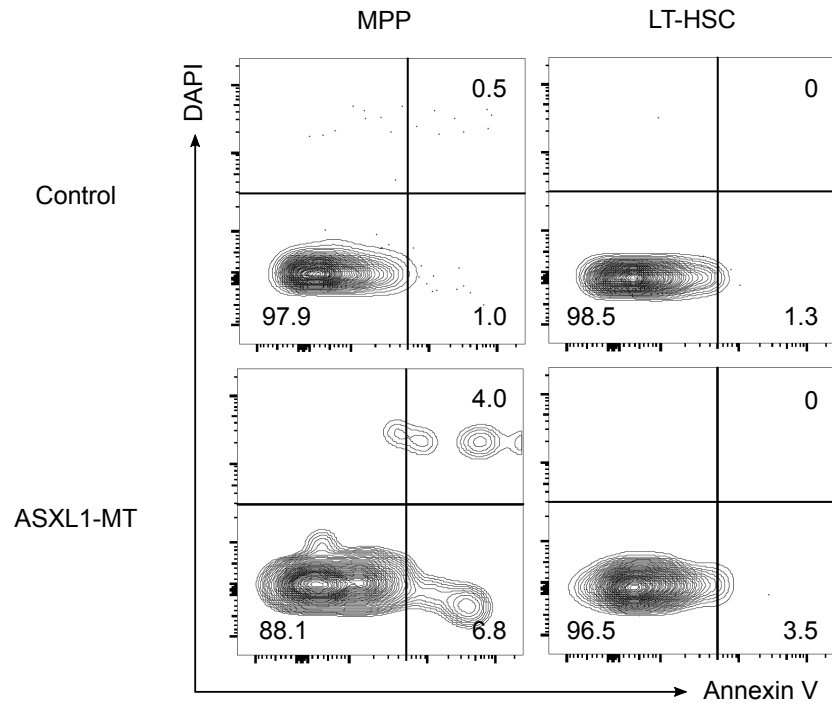


図9 ASXL1-MT cKIマウスの HSPC は機能低下をきたしている

A, B, 野生型と ASXL1-MT cKI マウスより骨髓細胞を分離し、致死量の放射線照射を受けたレシピエントマウスへ競争的に移植した。移植から16週後、レシピエントマウス3匹より骨髓細胞を取り出してプールし、1匹あたり  $6 \times 10^6$  個の細胞をレシピエントマウスへ二次移植した。一次移植 (A) および二次移植 (B) における、末梢血中のASXL1-MT細胞の割合の経時的な変化を示す。C, D, 野生型 (コントロール) または ASXL1-MT cKI マウスより 3,000 個の MPP (C) および 200 個の LT-HSC (D) を分離し、400,000 個の野生型細胞とともに致死量の放射線照射を受けたレシピエントマウスへ競争的に移植した (n=3-4)。末梢血中のドナー細胞の割合の経時的な変化を示す。データは平均値  $\pm$  標準偏差。\*P < 0.05, \*\*\*P < 0.001; two-tailed Student's t-test.

A



B

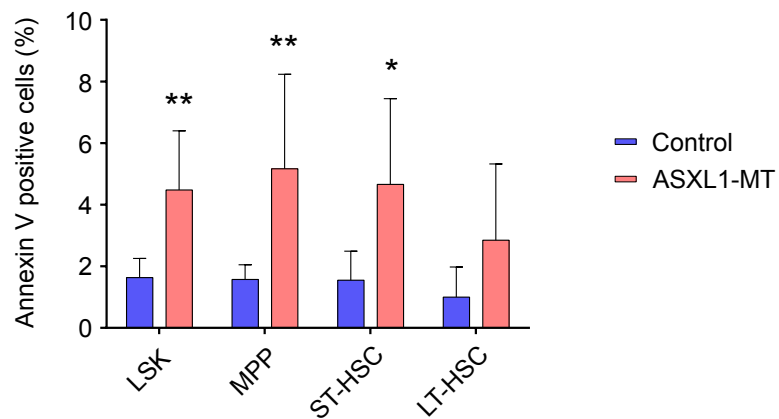
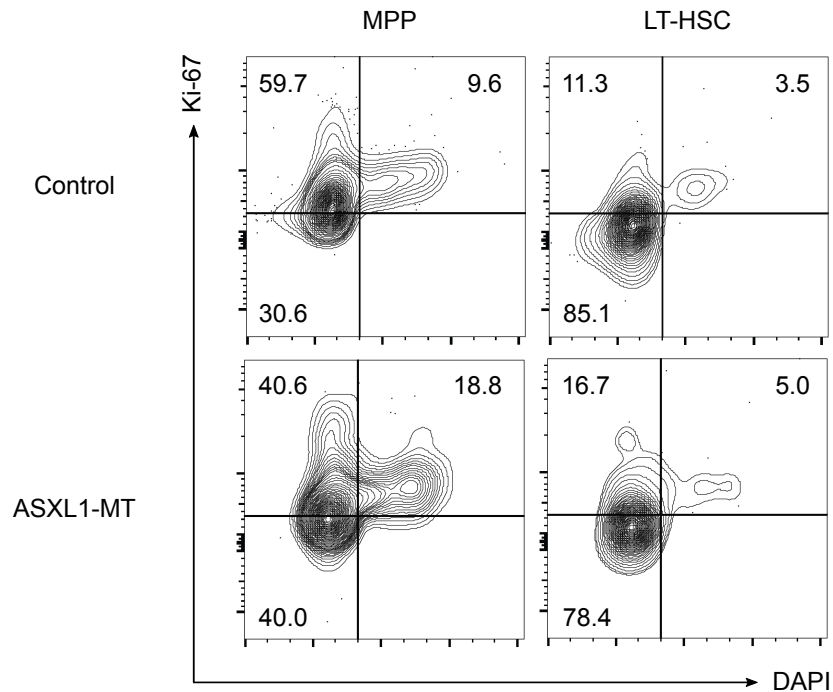


図10 ASXL1-MTはHSPCのアポトーシスを亢進させる

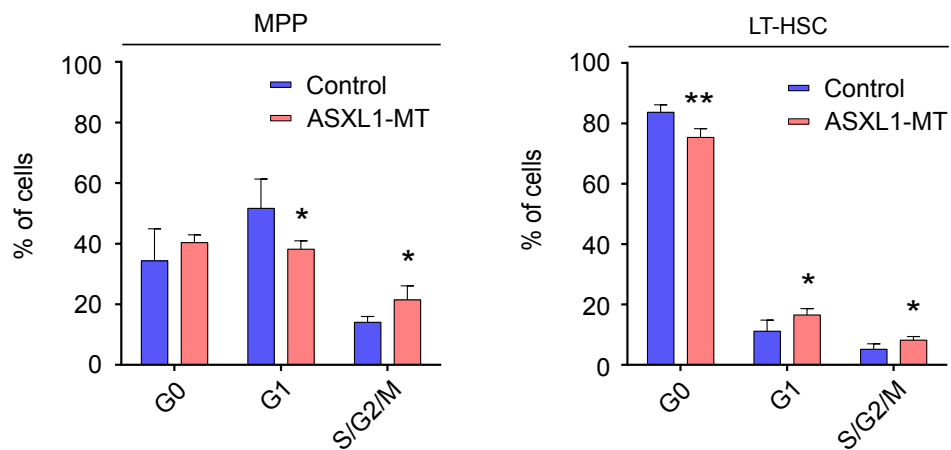
Annexin V / DAPI 染色により HSPC のアポトーシスを評価した (n=7)。A, MPP (左) および LT-HSC (右) での代表的なプロット図。B, Annexin V 陽性細胞の割合を定量的に示す。データは平均値 ± 標準偏差。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; two-tailed Student's t-test.



**A**



**B**



**図 1 1 ASXL1-MT は HSPC の細胞周期に変化を与える**

Ki-67 / DAPI 染色による細胞周期の解析 (n=6)。A, MPP (左) および LT-HSC (右) での代表的なプロット図。B, G0, G1 ならびに S/G2/M 期の細胞の割合を定量的に示す。データは平均値 ± 標準偏差。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; two-tailed Student's t-test.

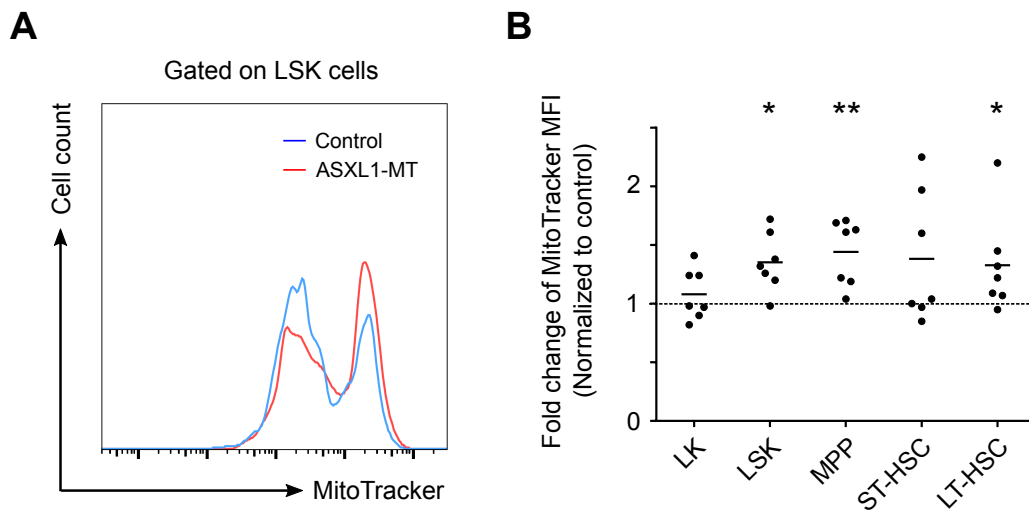


図12 ASXL1-MT は HSPC のミトコンドリア膜電位を上昇させる

MitoTracker Red プローブを用いてミトコンドリア膜電位を検討した (n=7)。A, LSK 分画における野生型コントロール (青) および ASXL1-MT (赤) の代表的なヒストグラム。B, Lin<sup>c-kit</sup><sup>+</sup>Sca1<sup>+</sup>(LK) 細胞、MPP、ST-HSC および LT-HSC における定量データを示す。結果は野生型コントロールと比較したときの MFI の fold change として表現した。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; Mann-Whitney's u-test.

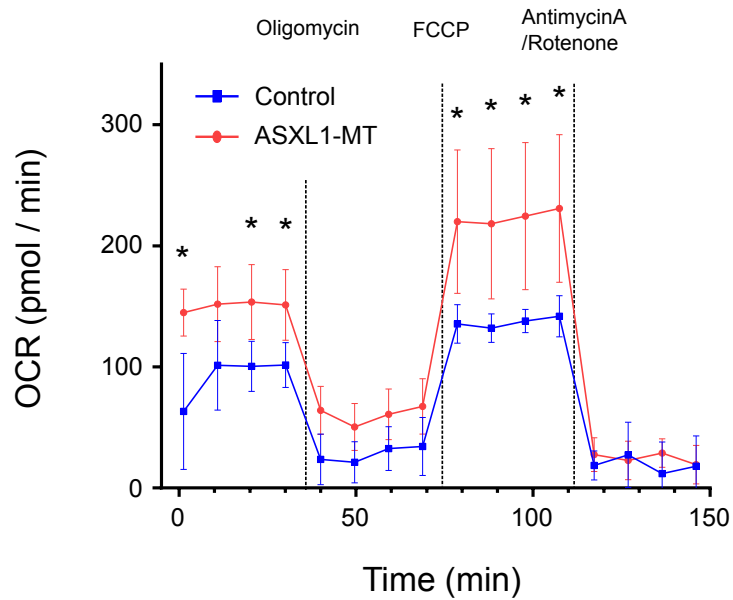
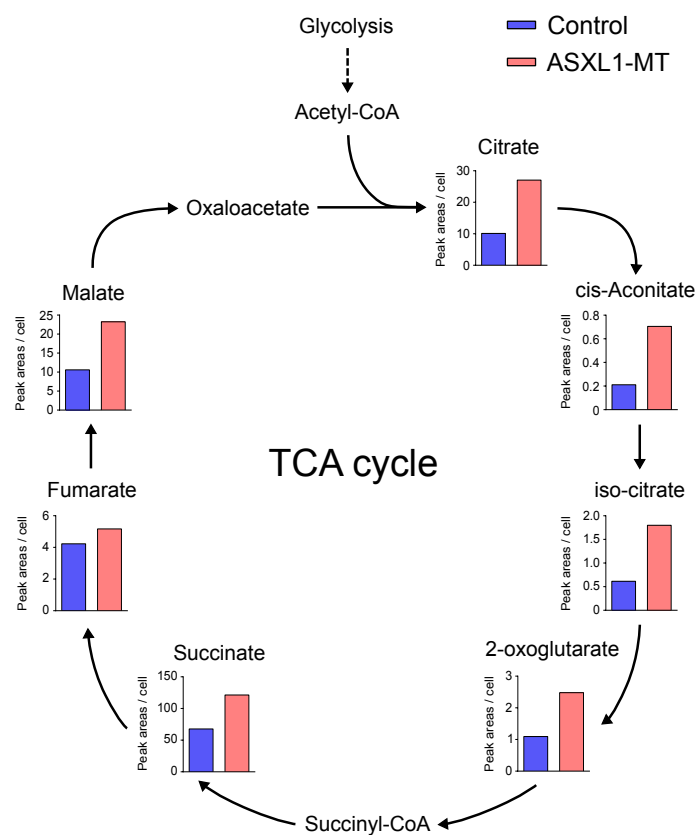


図13 ASXL1-MT 発現細胞では酸素消費量 (OCR) が増加している

XF24 extracellular flux analyzer を用いてミトコンドリアの呼吸能を評価した。3x10<sup>5</sup> 個の LK 細胞の OCR を、定常状態に続いて Oligomycin、Trifluorocarbonylcyanide phenylhydrazine (FCCP)、および AntimycinA/Rotenone 投入下で経時的に測定した。細胞は3匹のマウスより得たものをプールした。データは平均値 ± 標準誤差。\*P < 0.05; two-tailed Student's t-test.

**A**



**B**

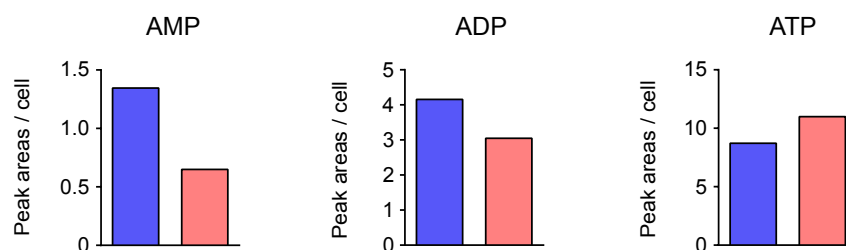


図14 ASXL1-MT 発現細胞では TCA サイクルを構成する代謝物質のプールや ATP が増加している  
 IC-MS によるメタボローム解析。5x10<sup>4</sup> 個の LSK 細胞を用い、TCA サイクルの代謝産物 (A) ならびにアデノシンリン酸 (B) の定量を行った。Peak areas は細胞数で補正している。細胞は3匹のマウスより得たものをプールした。

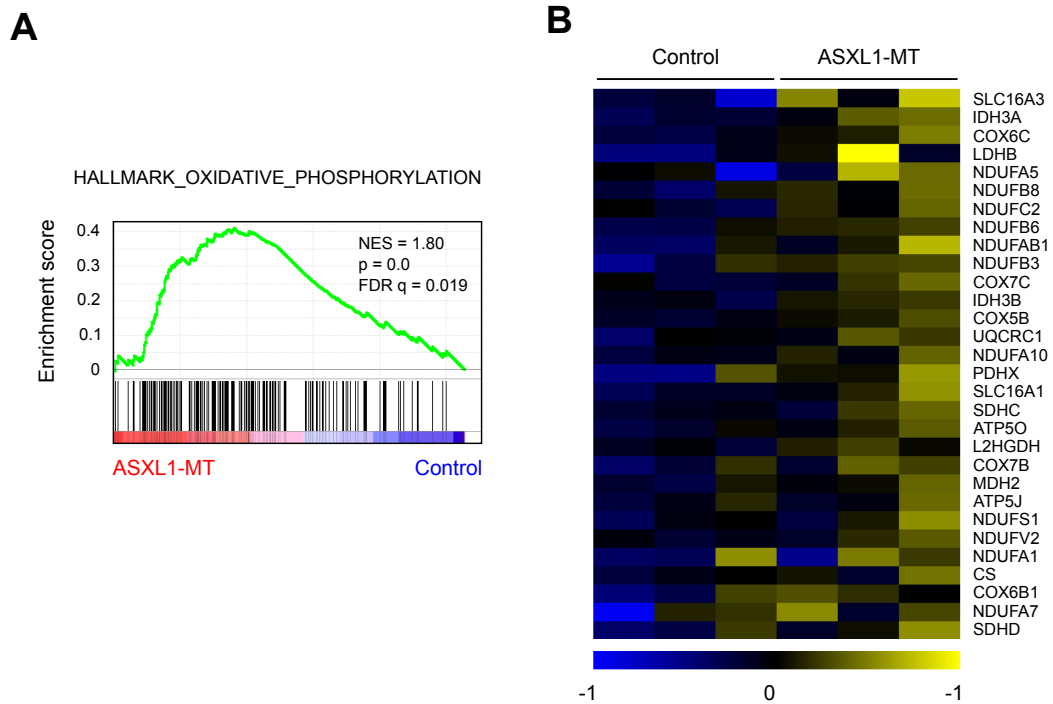


図15 ASXL1-MT 発現細胞ではミトコンドリア関連遺伝子の発現が上昇している  
LSK 細胞を RNA-seq 解析に供し、遺伝子発現を網羅的に解析した (n=3)。A, 酸化的リン酸化に関連する遺伝子セットを用いて Gene set enrichment analysis (GSEA) を行なった。B, ASXL1-MT 細胞において発現が上昇していたミトコンドリア蛋白質のうち、上位30個の遺伝子発現量をヒートマップで表示した。

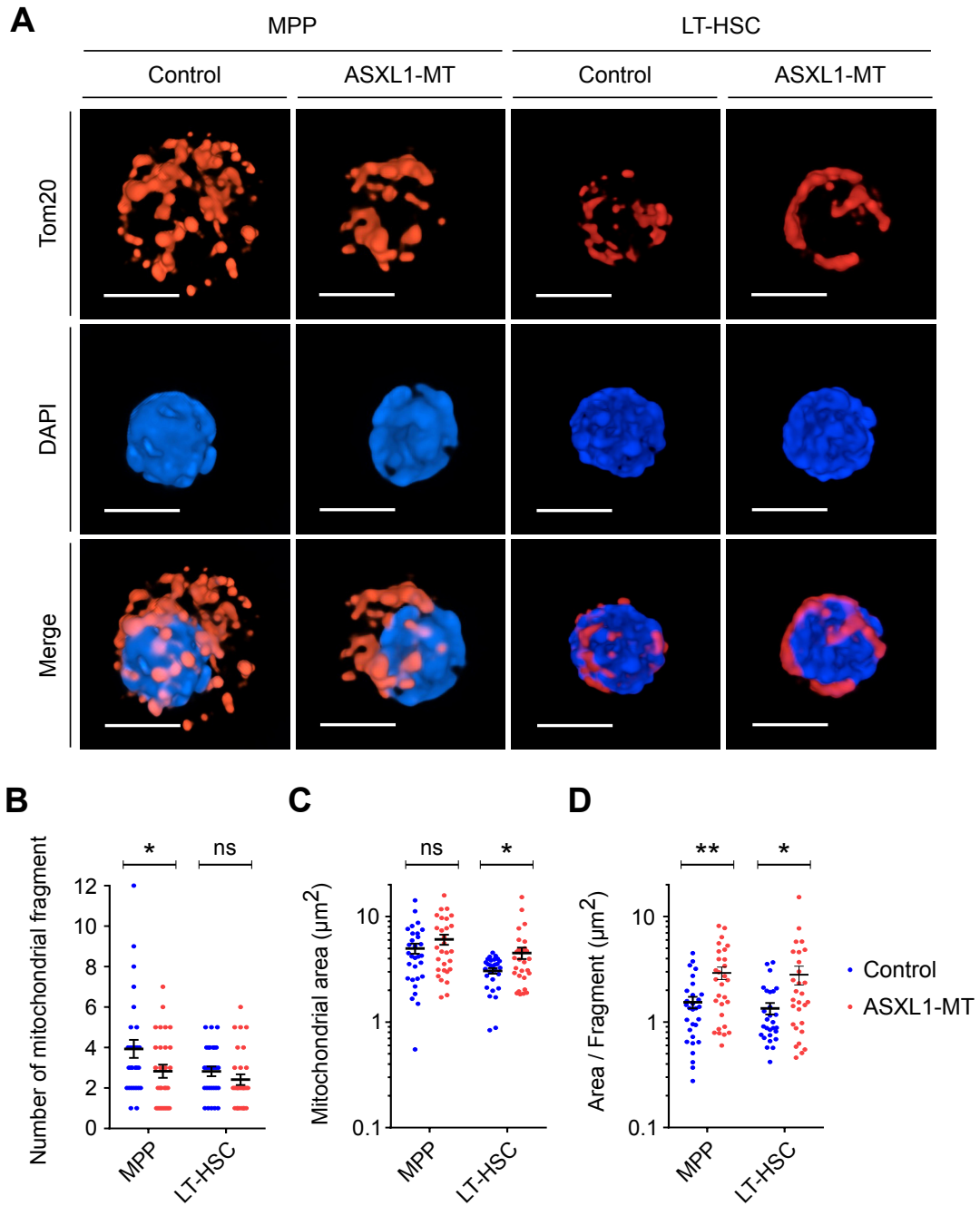


図16 ASXL1-MT はミトコンドリアの形態に影響を与える

MPP と LT-HSC をミトコンドリア蛋白質である Tom20 で免疫染色し、超解像度顕微鏡 N-SIM を用いて観察した。A, 代表的な染色像を示す。(Scale bars,  $5\mu\text{m}$ ) B-D, 1 断面あたりのミトコンドリア断片数 (B)、面積 (C)、ならびに 1 断片あたりの面積 (D) を定量的に解析した。1 グループあたり約30個の細胞を観察した。データは平均値  $\pm$  標準誤差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; two-tailed Student's t-test.

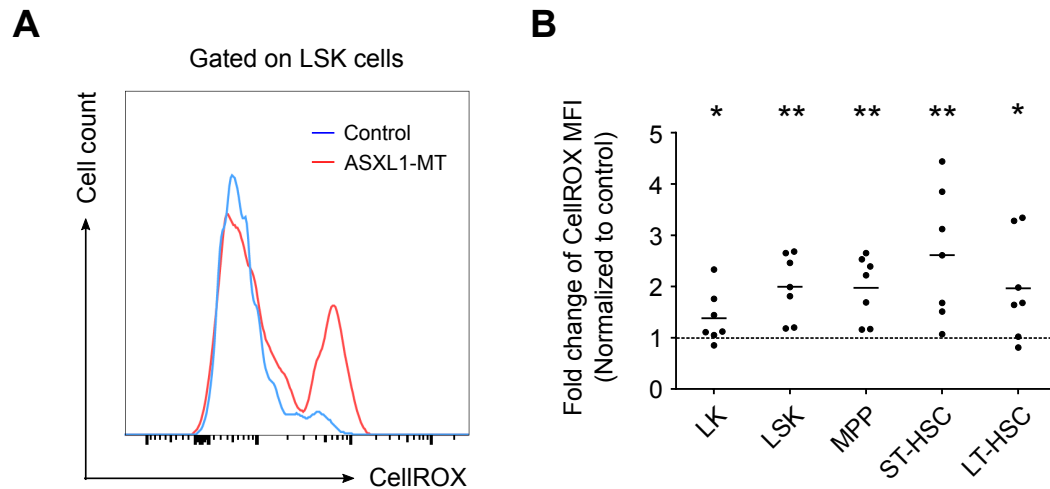
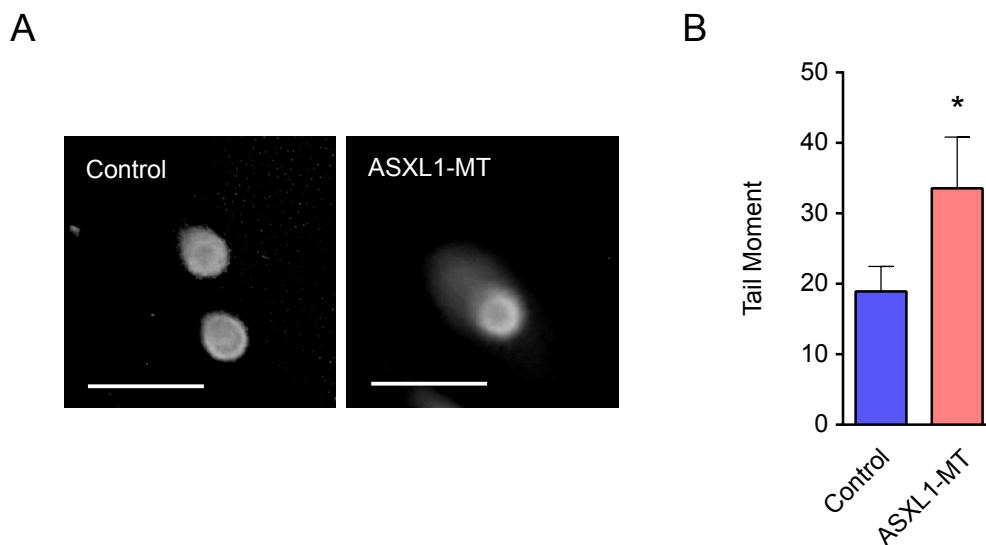


図17 ASXL1-MT 発現細胞では ROS が増加している

CellROX Deep Red プローブを用いて細胞内 ROS の存在量を検討した (n=7)。A, LSK 分画における野生型コントロール (青) および ASXL1-MT (赤) の代表的なヒストグラム。B, LK 細胞、MPP、ST-HSC および LT-HSC における定量データを示す。結果は野生型コントロールと比較したときの fold change として表現した。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; Mann-Whitney's u-test.



**図18 ASXL1-MT 発現細胞では DNA 損傷が増加している**

コメットアッセイにより LT-HSC における DNA 損傷を評価した (n=3)。A, 代表的なコメット像 (Scale bars, 20  $\mu$ m) (A) と olive tail moment の定量データ (B) を示す。データは平均値  $\pm$  標準偏差。\*P < 0.05; two-tailed Student's t-test.



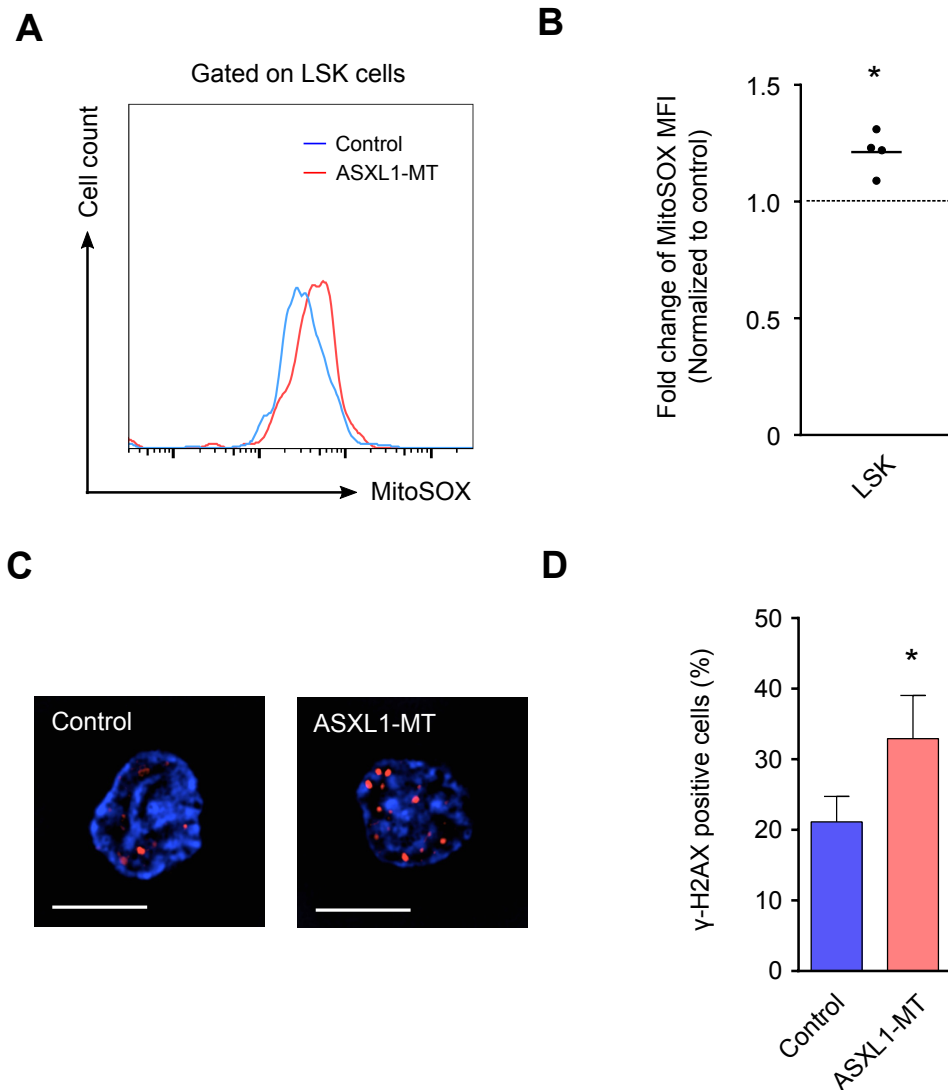
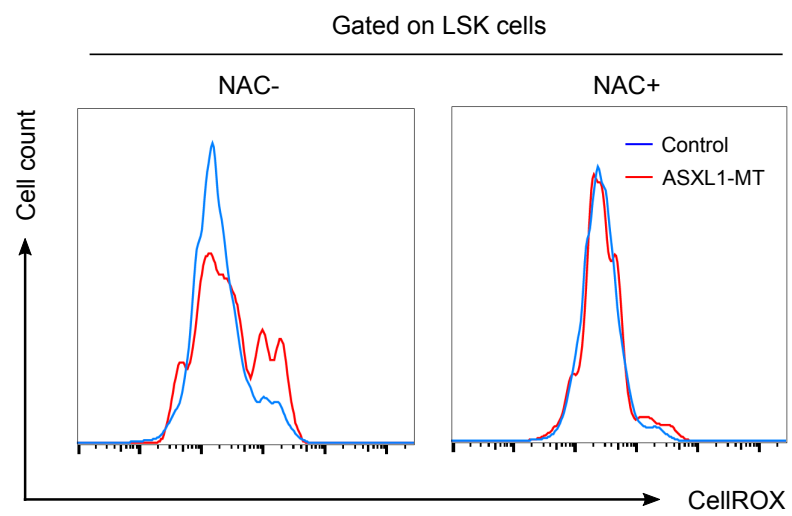
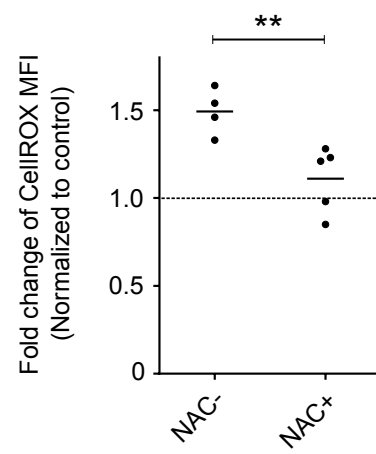
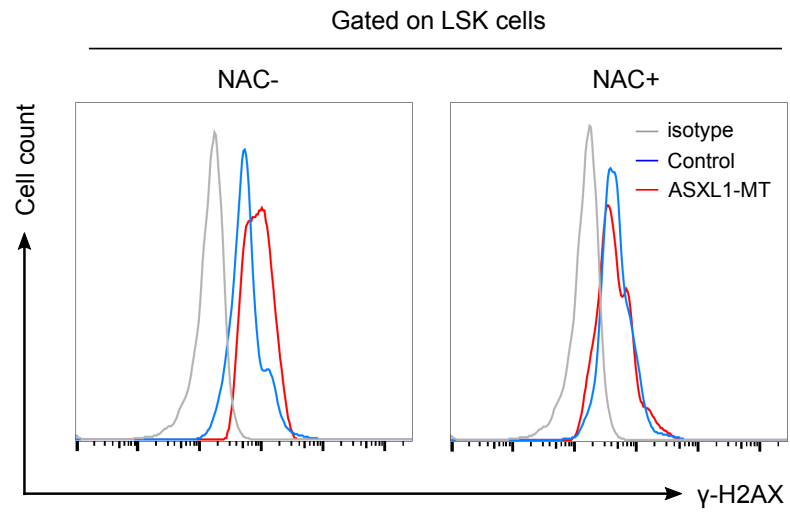
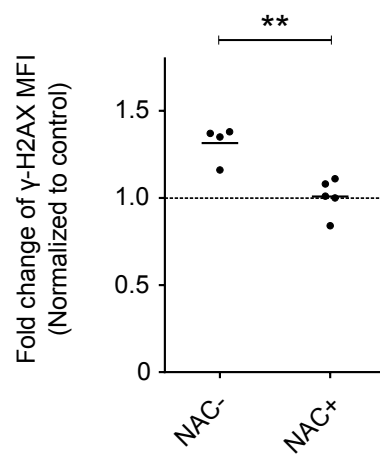
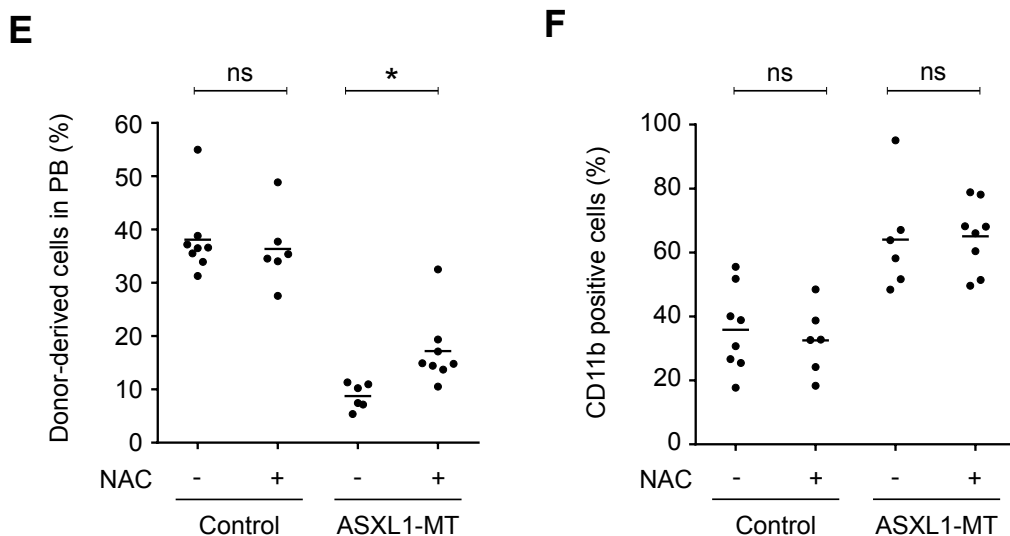


図19 競合的移植下で ASXL1-MT 発現細胞におけるミトコンドリア内の ROS と DNA 損傷は増加している

野生型（コントロール）および ASXL1-MT cKI マウスより骨髓細胞を分離し、致死量的線量で放射線照射を受けたレシピエントマウスへ競合的に移植した。A, B, MitoSOX Red プローブを用いて LSK 細胞のミトコンドリア内での ROS の存在量を評価した (n=4)。代表的なヒストグラム (A) と定量データ (B) を示す。結果は野生型と比較したときの fold change として表現した。\*P < 0.05; Mann-Whitney's u-test. C, D, γ-H2AX の免疫染色により LSK 細胞における DNA 損傷を評価した (n=3)。代表的な染色像 (Scale bars, 5 μm) (C) と γ-H2AX foci を有する細胞の割合 (D) を示す。データは平均値 ± 標準偏差。\*P < 0.05; two-tailed Student's t-test.

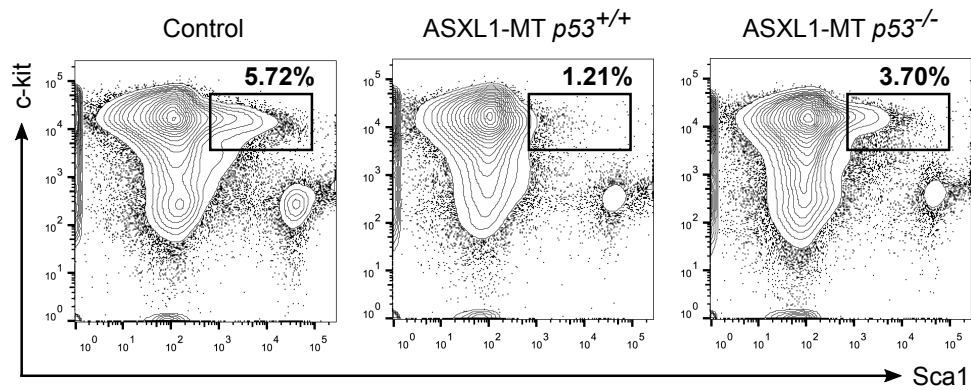
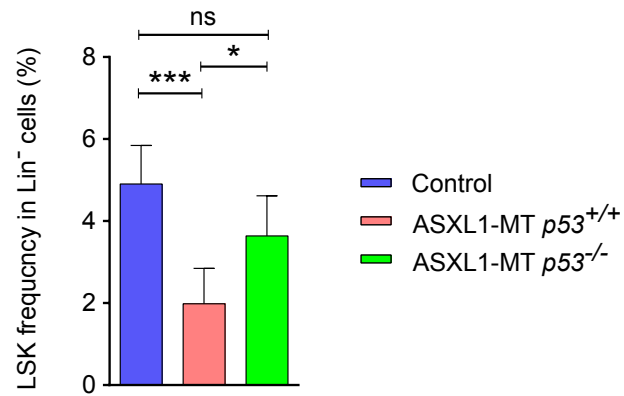
**A****B**

**C****D**



**図20 NACの投与はASXL1-MT発現細胞におけるROSとDNA損傷の増加を抑制し造血再構築能を部分的に回復させる**

NACを8週間投与した野生型（コントロール）およびASXL1-MT cKIマウスより骨髓細胞を分離し、野生型マウスの骨髓細胞（コンペティター）とともに致死量の放射線照射を受けたレシピエントマウスへ競合的に移植した。レシピエントマウスには、移植後も継続的にNACを投与し続け、6週間が経過した時点で解析を行った。A-D, CellROX Deep Redプローブと $\gamma$ -H2AXの細胞内染色により、LSK分画におけるROS（A, B）とDNA損傷（C, D）をそれぞれ評価した（n=4-5）。代表的なヒストグラム（A, C）と定量データ（B, D）を示す。結果は野生型コントロールと比較したときのfold changeとして表現した。E, F, 末梢血におけるドナー由来細胞の割合（E）、およびドナー由来細胞に占めるCD11b陽性細胞の割合（F）を解析した（n=6-8）。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01; two-tailed Student's t-test.

**A****B**

**図2 1 ASXL1-MT cKI マウスにおける HSPC の減少は *p53* の欠失により回復する**

野生型（コントロール）、ASXL1-MT、および ASXL1-MT/*p53*<sup>-/-</sup> マウスの Lin<sup>-</sup> 分画に占める LSK 細胞の割合を調べた (n=6)。代表的なプロット図 (A) と定量データ (B) を示す。データは平均値 ± 標準偏差。\*P < 0.05; one-way ANOVA with Tukey-Kramer's post-hoc test.

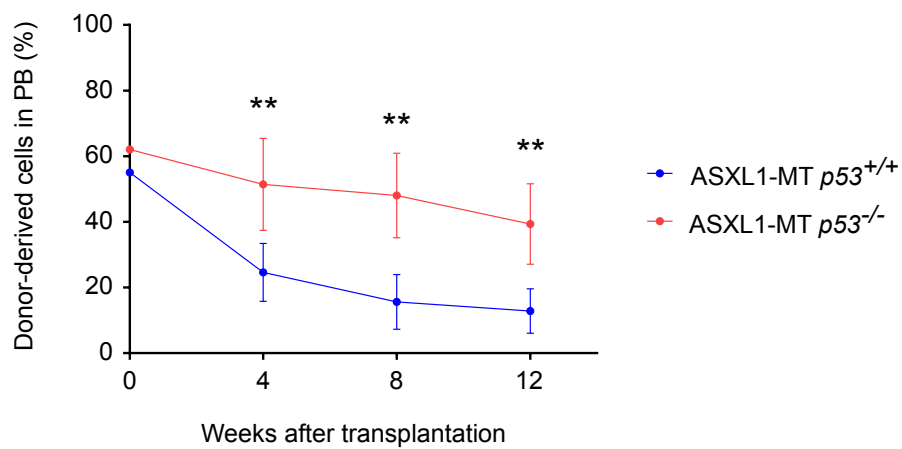


図2 2 ASXL1-MT cKI マウスにおける HSPC の造血再構築能の低下は  $p53$  の欠失により回復する

ASXL1-MT および ASXL1-MT/ $p53^{-/-}$  マウスより分離した骨髄細胞を、野生型マウスの骨髄細胞（コンペティター）とともに、致死量的線量で放射線照射を受けたレシピエントマウスへ移植した。移植後、末梢血中のドナー由来細胞のキメラリズムを経時的に解析した。（ASXL1-MT;  $n=7$ , ASXL1-MT/ $p53^{-/-}$ ;  $n=11$ ）データは平均値  $\pm$  標準偏差。\*\* $P < 0.01$ ; two-tailed Student's t-test.

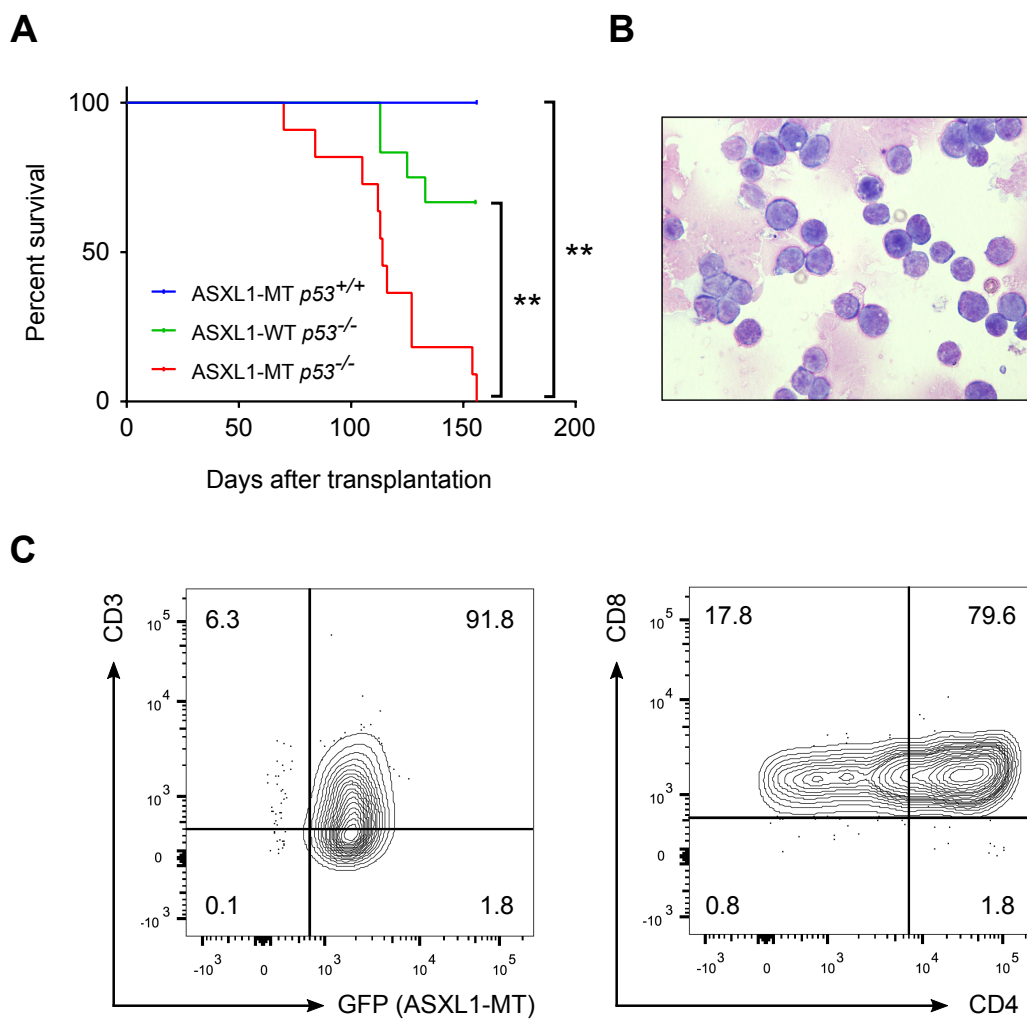


図23 ASXL1-MT/ $p53^{-/-}$  マウスは胸腺 T 細胞性リンパ腫で死亡する

ASXL1-MT、ASXL1-MT/ $p53^{-/-}$  および  $p53^{-/-}$  マウスより分離した骨髄細胞を、野生型マウスの骨髄細胞（コンペティター）とともに、致死量の放射線照射を受けたレシピエントマウスへ移植した。（ASXL1-MT;  $n=7$ , ASXL1-MT/ $p53^{-/-}$ ;  $n=11$ ,  $p53^{-/-}$ ;  $n=12$ ）A, Kaplan-Meier 生存曲線。 $**P < 0.01$ ; log-ranked test. B,C, 死亡した ASXL1-MT/ $p53^{-/-}$  マウスの胸腺細胞の代表的な組織像 (B) とプロット図 (C) を示す。

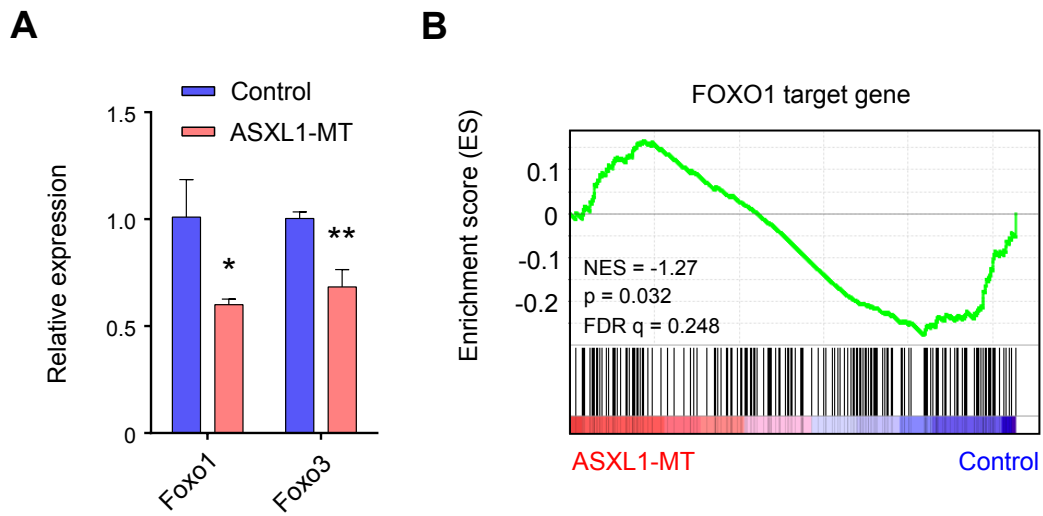


図2 4 ASXL1-MT 発現細胞では *Foxo* の発現が低下している

A, LSK 細胞より RNA を抽出し、*Foxo1* と *Foxo3* の発現量を定量 PCR 解析によって解析した (n=3)。データは平均値 ± 標準偏差。\*\*P < 0.01; two-tailed Student's t-test. B, LSK 細胞を用いた RNA-seq 解析のデータを用い、Foxo1 のターゲット遺伝子の発現を GSEA により評価した (n=3)。



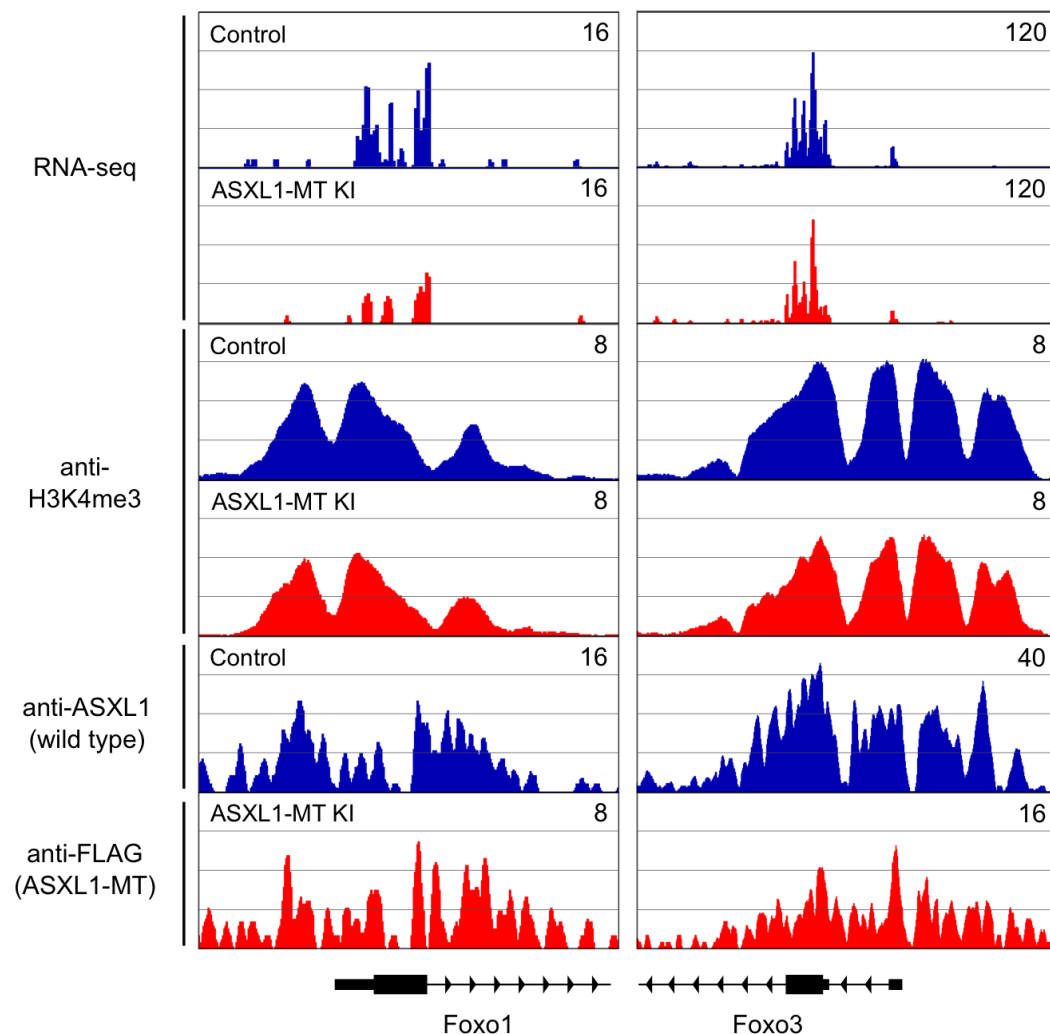


図25 *Foxo* の発現低下は *Foxo* 遺伝子座への ASXL1-MT の結合と H3K4me3 の減少を伴う  
c-kit 陽性細胞を用いて RNA-seq および ChIP-seq 解析を行い、*Foxo1* と *Foxo3* 遺伝子座におけ  
る H3K4me3、野生型 ASXL1、ならびに ASXL1-MT (FLAG) の結合を評価した。図の左端に  
は用いた抗体を示した。

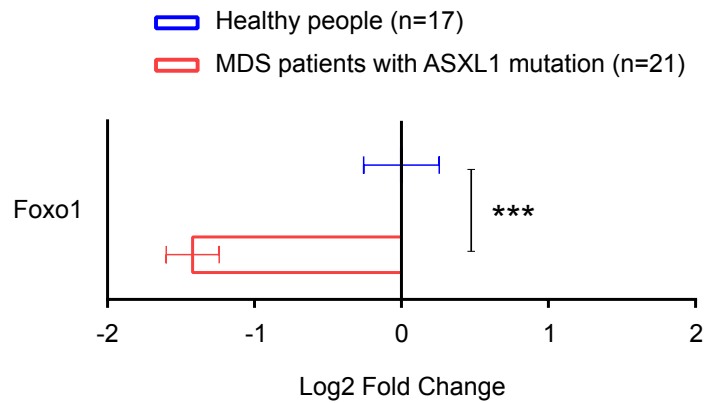


図2 6 ASXL1 変異を有する MDS 患者では *Foxo1* の発現が低下している

*ASXL1* 変異を有する MDS 患者 (n=21) もしくは健常コントロール (n=17) の CD34 陽性骨髄細胞における *Foxo1* の発現量を、公共データベース (Gene Expression Omnibus accession number: GSE58831) を利用して調べた。結果は健常コントロールに対する log2 fold change として示している。データは平均値  $\pm$  標準誤差。\*\*\*P < 0.001; two-tailed Student's t-test.

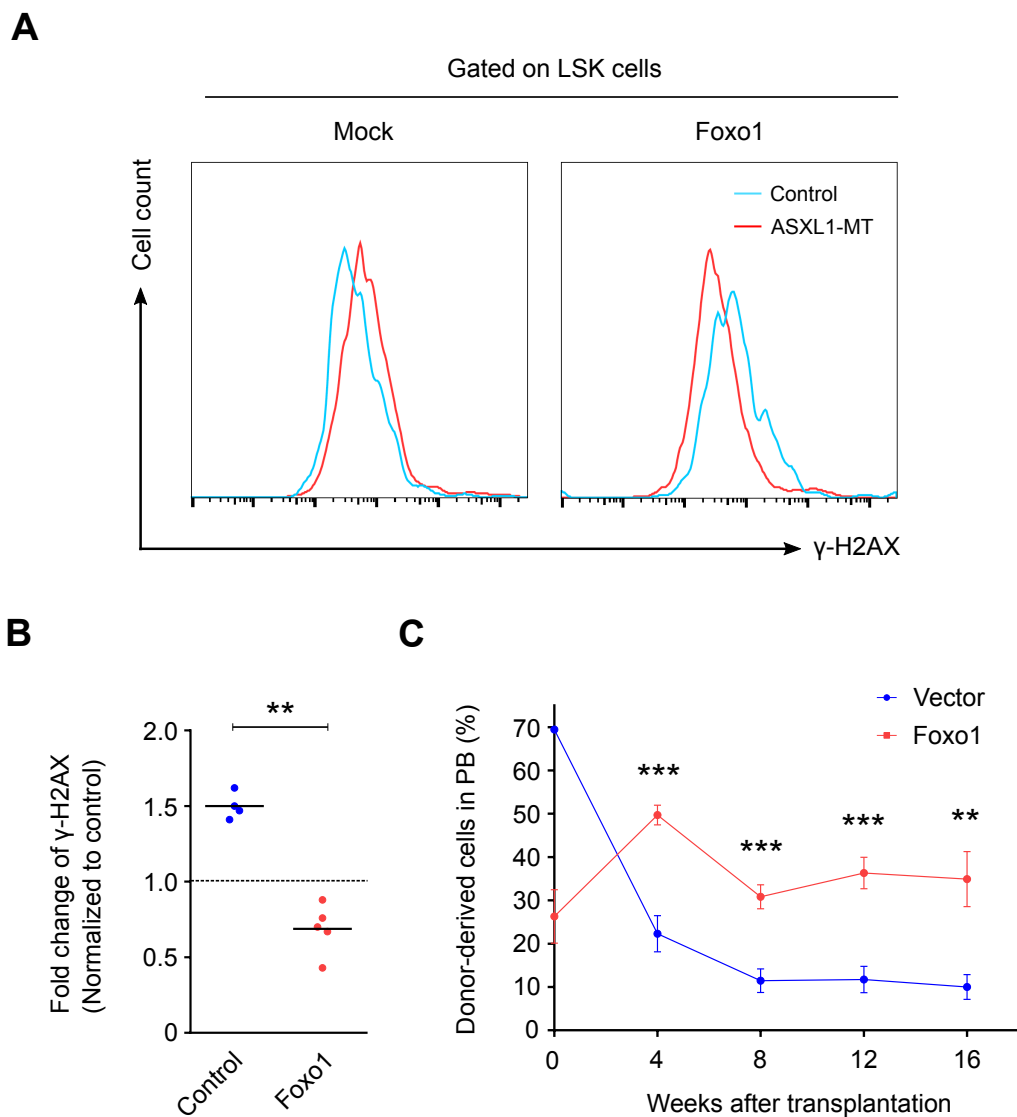


図27 *Foxo1* の過剰発現により *ASXL1* 変異細胞における DNA 損傷の増加と造血再構築能の低下は抑制される

ASXL1-MT を発現する  $\text{Lin}^-$  細胞に、レトロウイルスを用いてコントロールベクターもしくは *Foxo1* を導入し、野生型マウスの骨髓細胞（コンペティター）とともに致死量の放射線照射を受けたレシピエントマウスに移植した。A, B, 移植から6週後、*Foxo1* の発現が LSK 分画の DNA 損傷に与える影響を、 $\gamma$ -H2AX の細胞内染色により評価した（ $n=4-5$ ）。結果は野生型細胞（コントロール）と比較したときの fold change として表現した。C, 移植後、末梢血採血を行って経時的に生着を評価した（ $n=8$ ）。移植時のコントロールベクターおよび *Foxo1* の感染率を0週の数値として示している。データは平均値  $\pm$  標準誤差。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; two-tailed Student's t-test.