

令和元年6月18日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19620

研究課題名(和文) CRLF2高発現を示す小児B細胞型急性リンパ球性白血病発症の分子機構の解明

研究課題名(英文) CRLF2 over-expression analysis in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children

研究代表者

成戸 卓也 (NARUTO, TAKUYA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト助教

研究者番号：60438124

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小児急性リンパ性白血病(ALL)は近年の層別化治療により治療成績は大幅に向上した。しかし、約20%の症例が再発し、再発例には既知の予後不良因子(Philadelphia染色体)を持たない例が存在する。我々はJAK2 遺伝子変異とCRLF2 の高発現を伴う再発細胞株2株を樹立した。この2株は、抗がん剤と酸化ストレスに極めて強力な抵抗性を獲得していた。またCRLF2はTSLP受容体として働き、JAK-STAT系を介してシグナル伝達すると考えられている。本研究においてJAK2を中心とした機能解析を行い、CRLF2高発現株においてはTLSPレセプターが協調して、悪性を促進していると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児の急性リンパ性白血病は小児がんの約40%を占める大きなグループであり、近年の層別化治療により治療成績は大幅に向上している。しかしなお約20%の症例で再発がみられ、その再発例では既存の予後不良因子を持たない例も存在する。遺伝子異常により遺伝子再構成を伴うCRLF2が高い発現を示しているタイプで、患者のリンパ球から樹立した細胞株を研究に用いた。シグナル伝達経路に対する阻害薬の効果等を検討し、治療層別化因子としての基礎データを提供した。

研究成果の概要(英文)：Childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) has significantly improved treatment results with recent stratification treatments. However, about 20% of cases relapse, and there are cases without recurrence of known poor prognosis factors (Philadelphia chromosome). We established two ALL cell lines with JAK2 gene mutation and high expression of CRLF2. These two strains have acquired extremely strong resistance to anticancer drugs and oxidative stress. CRLF2 also acts as a TSLP receptor and is thought to signal through the JAK-STAT pathway. In this study, we performed functional analysis centering on JAK2, and it was suggested that TLSP receptor cooperates in CRLF2 expression cell to promote malignant transformation.

研究分野：分子生物学

キーワード：CRLF2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

01 . 研究開始当初の背景

JAK-STAT 系は、多くのサイトカイン受容体機構における重要な構成要素で、増殖、生存、分化及び病原体抵抗性を制御している。これらの経路は、B 細胞の分化、形質細胞形成、及び急性期応答を共通して調節する。サイトカインの結合は受容体の二量体化を誘導し、これが会合している Jak を活性化するが、JAK は自己リン酸化と受容体のリン酸化を行う。受容体及び JAK のリン酸化部位は、SH2 を持つ STAT5 や、MAP キナーゼ、PI3/Akt、及び他の細胞経路に受容体をリンクさせるような SH2 を持つタンパク質やアダプターに対して、ドッキング部位の役目をする。受容体に結合した STAT は、JAK によってリン酸化されると二量体を形成して核内に移行し、標的遺伝子の転写を調節する。JAK1、JAK2 及び JAK3 における体細胞性の活性化型変異は、小児の急性リンパ性白血病(ALL)患者において同定された。Jak2 変異は、ダウン症候群ならびに小児の B 細胞型急性リンパ球性白血病(B-ALL)患者において、偽キナーゼドメイン R683 の付近で検出されたが、これらの変異が胸腺間質リンポイエチン受容体 (TSLP)をコードする CRLF2 遺伝子における転座もしくは変異(F232C)と関連している。CRLF2 は IL-7 レセプター 鎖とヘテロダイマーを形成して TSLP 受容体として働き、JAK-STAT 系を介してシグナル伝達すると考えられているが、変異型 JAK2 と TSLPR が協調して小児の ALL の一部において、悪性を促進していると示唆されている。

小児ダウン症候群患児における ALL 症例の約 50%~60%に CRLF2 に影響を及ぼす遺伝子変異がみられ、この遺伝子が一般に過剰発現を来している。ダウン症候群を合併していない前駆 B 細胞 ALL の小児では、CRLF2 遺伝子変異が観察される頻度ははるかに低い(10%未満)。ダウン症候群と ALL を合併した小児の最大 35%に IKZF1 遺伝子欠失が認められており、この患者群における有意に不良な転帰との関連性が指摘されている。CRLF2 の活性化につながる IL3RA、CSF2RA の共欠失は、B 細胞性 ALL の 7%、ダウン症関連 ALL の 53%に認められると報告されている。CRLF2 変異を認めない集団においても、PDGFR や ABL1、JAK2 などのキナーゼ活性変異がみられることから、TKI や JAK2 阻害剤の有効性が示唆される。

2 . 研究の目的

急性リンパ性白血病(ALL)は小児がんの約 40%を占める大きなグループであり、近年の層別化治療により治療成績は大幅に向上している。しかしなお約 20%の症例で再発がみられ、その再発例では既存の予後不良因子を持たない例も存在する。近年そうした予後不良例の BCR-ABL 陰性 ALL において IKZF1 遺伝子欠失、JAK2 遺伝子変異、CRLF2 高発現を伴う例が多いことが欧米から相次いで報告されている。我々は小児患者から ALL 細胞株を樹立しており、この中に JAK2 遺伝子変異、CRLF2 高発現を伴う株が存在する。CRLF2 異常メカニズムの解明と創薬スクリーニングを行うことにより、ALL 治療に貢献することと基礎医学に貢献することを目的とする。

3 . 研究の方法

小児患者の ALL から樹立した 11 種類の細胞株を用いた。この中に CRLF2 高発現株は YCUB-5、YCUB-5R である。これまでの遺伝子解析にてこの細胞株では DNA シーケンスでの JAK2 遺伝子変異、および細胞表面での CRLF2 高発現をフローサイトメトリーにて確認した。

細胞株から RNA を抽出し、細胞のストレス応答機構に変化が生じていないか SFRS1、SF2、SRSF3、SF4、SRSF5、SRSF7、SF9、SH1 に対して GAPDH をインターナルコントロールにし

リアルタイム PCR を行った。

全遺伝子の発現をマイクロアレイ SurePrint G3 Human GE 8x60K を用い GeneSpring ソフトウェアにて解析した。また、パスウェイ解析 IPA ソフトウェアで行った。発現量はリアルタイム PCR (Applied Biosystems 7500) を用いてバリデーションを行った。

CRLF2 は IL-7 受容体と二量体を作ることで TSLP の受容体となるため、TSLP にて刺激した。p-STAT5 の高発現は JAK2 の活性化によるものと推察されたので、ルキソリチニブを添加し細胞からタンパクを抽出した。ウェスタンブロッティング法を用いて p-STAT5, STAT5, p-JAK2, JAK, p-AKT, AKT 発現を調べた。なお、ネガティブコントロールはすべて刺激していないものとした。また、インターナルコントロールは β -actin または GAPDH を用いた。

4 . 研究成果

YCUB-5 の P2RY-CRLF2 の融合遺伝子を RNA シークエンシングで確認し、フローサイトメトリーで CRLF2 の高発現を確認した。

遺伝子再構成による細胞内のストレスの有無を調べるために、選択的スプライシング調節因子 SRSF 遺伝子群をリアルタイム PCR にて検討したが、SFRS1 ,SF2 ,SRSF3 ,SF4, SRSF5, SRSF7, SF9, SH1 のいずれに対しても、変化は観察されなかった。

細胞株のマイクロアレイ解析において YCUB-5 では CRLF2 の著明な高発現を認めた。ただし、JAK2, STAT5 の遺伝子発現は他の細胞と変わりなかった。(図 1)

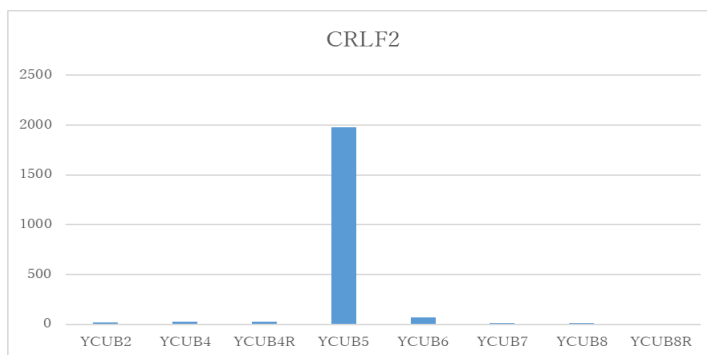


図 1. マイクロアレイによる CRLF2 遺伝子発現

遺伝子発現量で差は見られなかった TSLP シグナリングの下流にある JAK2, STAT5 をウェスタンブロッティングで確認した。YCUB5 においては JAK2 タンパクが増加しており、p-STAT5 の発現が見られた。

細胞を TSLP にて刺激したところ、YCUB5 では濃度依存的に増殖が増えた。TSLP シグナリングの下流にある JAK2 の阻害薬であるルキソリチニブ (ruxolitinib) を加えたところ、細胞の増殖は抑えられた。ルキソリチニブに TSLP を追加しても細胞の増殖は戻らず、YCUB5 では JAK2 の経路が、細胞のメンテナンスに重要であることが示唆された。CRLF2 は mTOR/PI3K シグナルも活性化するとの報告があるため、検討の余地があると考えられる。

YCUB-5 においては IKZF1 遺伝子欠失も確認されており、CRLF2 高発現が細胞の悪性化に関わっているか議論の余地がある。CRLF2 高発現株では下流の JAK2 が重要な役割を果たしていることが示唆された。

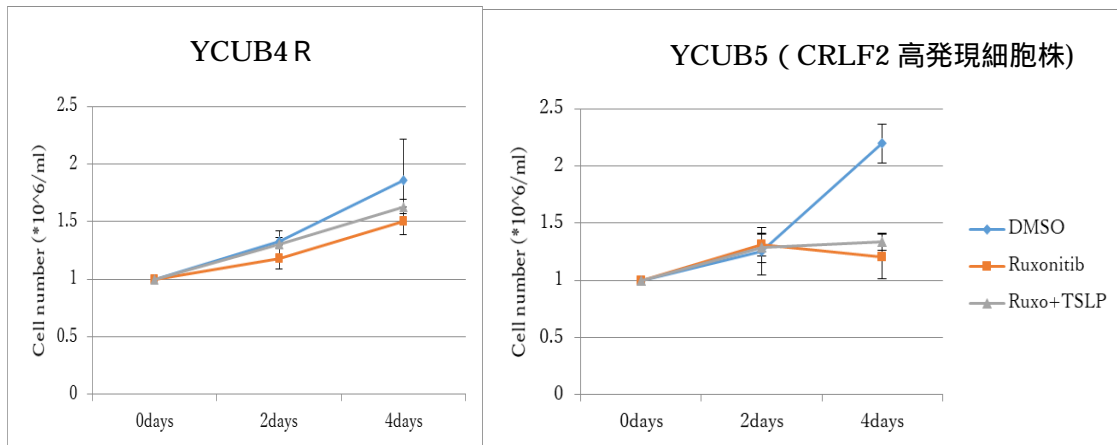


図 2. JAK 阻害薬ルキソリチニブによる細胞増殖曲線

5. 主な発表論文等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。