

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09852

研究課題名(和文) CALRが関わる造血シグナル伝達と、その破綻による骨髄増殖性腫瘍発症機序の解明

研究課題名(英文) Role of CALR mutation in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms and rogue hematopoietic signaling

研究代表者

幣 光太郎 (Shide, Kotaro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20468028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍に分類される本態性血小板血症、原発性骨髄線維症で高頻度に変異が生じているCalreticulin(CALR)について、その正常造血に果たす役割、および変異型CALRがMPNを発症させる仕組みを試験管内及び複数のマウスモデルを作成して個体レベルで解明した。CALR変異は細胞に増殖優位性やサイトカイン非依存性を与え、マウスに本態性血小板血症を発症させることを明らかにした。本研究では、同時にCALR変異が造血幹細胞に対しては負の影響を与えることも明らかとなり、変異が生じた造血幹細胞の維持や疾患の発症にはCALR変異以外の要素が必要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原発性骨髄線維症の予後は5年生存率40%と不良であり、新規治療法へのアンメットメディカルニーズがある。CALR変異は原発性骨髄線維症の約3割の患者で認められることから治療標的として注目されている。本研究で見出したCALR変異による疾患発症の仕組みは、原発性骨髄線維症を始め、同じくCALR変異を有する本態性血小板血症の克服、治癒を目指した治療法開発につながる成果という意味で極めて意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：We analyzed Calreticulin (CALR), which is frequently mutated in essential thrombocythemia and primary myelofibrosis. The role of CALR in normal hematopoiesis and the mechanism by which mutant CALR causes MPN were elucidated in in vitro experiments and in in vivo experiments by creating multiple mouse models. We found that CALR mutation conferred cell proliferation and cytokine independence and caused mice to develop essential thrombocythemia. However, at the same time, it also became clear that they have a negative effect on hematopoietic stem cells, suggesting that maintenance of mutated hematopoietic stem cells and development of disease require elements other than CALR mutation.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄線維症 骨髄増殖性腫瘍 マウスモデル

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

1. 研究開始当初の背景

赤血球が増加する真性多血症(polycythemia vera; PV)、血小板が増加する本態性血小板血症(essential thrombocythemia; ET)、骨髄で巨核球が増加し、間質の線維化が生じる原発性骨髄線維症(primary myelofibrosis; PMF)の3疾患からなるMPNでは、造血サイトカインのシグナル伝達を担うチロシンキナーゼ JAK2 に活性化変異(JAK2V617F 変異)が高率に生じている(James C et al. Nature 2005)。JAK2V617F 変異はPVの95%、ET、PMFの60%の症例で見られる。ET、PMFでは、JAK2上流のトロンプオエチン受容体(MPL)の活性化変異が、それぞれ全体の5%、10%に認められる。これらの変異は、導入したマウスに血球増多、肝脾腫、骨髄線維化といったヒトの病態を再現し、確かに病因である。JAK2V617F 変異やMPL変異を持たないET、PMFの病因は、大きな謎であった。2013年、JAK2及びMPLに変異を持たないET、PMFの半数以上(ET、PMF全体の約25%)の症例に、小胞体においてタンパクのfoldingや輸送に関わるシャペロンとして知られるCALRのexon9に変異が生じていることが報告された(Klampfl T et al. NEJM 2013)。CALR変異は、MPLやJAK2変異と相互排他的に生じていることから、「サイトカインシグナルの活性化」の機能をもつと予想されるが、CALRは既知のシグナル伝達経路にマッピングされていなかった分子であり、CALR変異がET、PMFの病態にどのように関与するか未解明であった。

2. 研究の目的

骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasms: MPN)に分類される本態性血小板血症(essential thrombocythemia; ET)、原発性骨髄線維症(primary myelofibrosis; PMF)で新たに高頻度の変異が発見されたCalreticulin(CALR)について、その正常造血に果たす役割、および変異型CALRがMPNを発症させる仕組みを解明する。

3. 研究の方法

(1) テーマ1: 変異CALRの*in vitro*解析

変異CALR、MPLの様々な変異体を作成し、その活性を調べる事により活性責任部位を同定する。

MPLを発現するヒト巨核球系細胞株にCRISPR/Cas9システムによるゲノム編集技術を用いて、ヒトMPNと同一のCALR変異をノックイン(knock in:KI)し、細胞増殖に与える影響、JAK-STAT経路の活性化の程度、MPLタンパクの発現量、などを元の細胞と比較し、CALR変異の生物学的活性を明らかにする。

(2) テーマ2: 変異CALR、及び正常CALRの*in vivo*解析

造血幹細胞レベルから外来遺伝子を発現可能なMHC class IIプロモータの制御下に変異CALRを発現するトランスジェニック(TG)マウスを作成し、CALR変異の*in vivo*表現型を明らかにする。

内在性のCALR遺伝子にCRISPR/Cas9を用いてフレームシフト(frameshift:FS)変異を導入したマウスを作成し、変異CALRの*in vivo*表現型を明らかにする。

ヒト患者において変異は一方のアリルにヘテロに生じており、正常CALRの量が半分になっていること(ハプロ不全)に着目し、ハプロ不全のモデルとしてCALRのヘテロノックアウト(hKO)マウスを導入し解析する。

4. 研究成果

(1) テーマ1: 変異CALRの*in vitro*解析

CALR変異体の部分欠失変異体について、それぞれ(1)MPLとの結合能、(2)細胞内シグナル活性化能、(3)細胞内局在、(4)*in vivo*疾患誘導能、を解析する実験系を確立した。現在解析を継続中である。今後、CALR変異蛋白の活性を阻害し、治療標的化するために必要なデータが得られる予定である。

MPLを発現するヒト巨核球系細胞株にヒトMPNと同一のCALR変異をノックインしたところ、元の細胞と比較し、シグナル伝達分子の恒常的活性化、細胞増殖の亢進、サイトカイン非依存性の獲得などが認められた。細胞表面のMPLタンパクの発現量に差は認めなかった。

(2) テーマ2: 変異CALR、及び正常CALRの*in vivo*解析

TGマウスはHSCレベルから変異CALRが発現しており、その発現量はヒト骨髄細胞、ヒト細胞株における生理的な正常CALR発現と同等であった。TGマウスの赤血球数や白血球数は野生型マウスと差がなく、血小板数のみが増加していた。骨髄、脾臓では大型の成熟巨核球が増加していた。TGマウスを約2年間飼育しても骨髄線維化、肝脾腫といった変化は認めず、生存も野生型マウスと同等であった。すなわち生理的発現レベルのCALR変異は、マウスにETを発症させた。

このTGマウスでは、HSCを含む広範な造血前駆細胞分画の増加が認められた。一方で、HSCの自己複製能を反映する骨髄細胞のreplating assayではTGと野生型マウスの継代回数に差はなく、同数のLSK細胞を用いた競合移植実験でも、野生型マウス細胞に対する増殖優位性を認めなかったことから、変異造血幹細胞のクローン拡大には、CALR変異以外の要素が必要である可能性が示唆された。

まず *Calr* 遺伝子 exon9 を編集したマウス ES 細胞クローンを複数樹立した。次に、その中からヒトの変異と相同的なフレームシフト変異(19 塩基欠失)が生じているクローンを選択し、マウス個体を作成した(*Calr* del19-FS)。このマウスでは、わずかな血小板数増加が認められるものの、巨核球の増加や造血幹・前駆細胞の増加などは認められなかった。このマウスに発現する *Calr* del19 変異体とヒト患者にみられる *CALR*del152 変異体との間で、ヒト MPL やマウス MPL に対する結合能を調べたところ、*Calr* del19 変異体では MPL に対する結合能が著しく低い事がわかった。マウス *Calr* のフレームシフト変異で生じたアミノ酸配列は、ヒト変異とはアミノ酸の電荷逆転など類似部分も多いが、アミノ酸の数や種類などで異なっている部分もある。この差異が MPL との結合能に極めて重要であることを明らかにした。
CALR のヘテロノックアウト(hKO)マウスの解析から、*CALR* のハプロ不全は、変異 *CALR* 蛋白の作用により障害された HSC 機能を回復させること、その結果、変異 HSC の ET 発症能力を高めること、などを見出しつつある。今後はさらに解析を継続し、*CALR* 変異 MPN における *CALR* ハプロ不全の意義を解明する。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 12 件)

- (1) **Shide K**, Kameda T, Kamiunten A(他 20 名, **1 番目**) Mice with *Calr* mutations homologous to human *CALR* mutations only exhibit mild thrombocytosis. **Blood Cancer J.** 2019 9(4):42. doi: 10.1038/s41408-019-0202-z. [査読あり]
- (2) Wakahashi K, Minagawa K, Kawano Y(他 11 名, **11 番目**) Vitamin D receptor-mediated skewed differentiation of macrophages initiates myelofibrosis and subsequent osteosclerosis. **Blood.** 2019 133(15):1619-1629. doi: 10.1182/blood-2018-09-876615. [査読あり]
- (3) Ozono Y, **Shide K**, Toyoshima F(他 12 名, **2 番目**) Monocyte-derived fibrocytes elimination had little contribution on liver fibrosis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int.** 2019 S1499-3872(19)30029-3. doi: 10.1016/j.hbpd.2019.02.002. [査読あり]
- (4) **Shide K**. Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: insights from mouse models **Rinsho Ketsueki.** 2018;59(10):2075-2083. doi: 10.11406/rinketsu.59.2075. [査読あり]
- (5) Kamiunten A, **Shide K**, Kameda T(他 18 名, **2 番目**). Early/prefibrotic primary myelofibrosis in patients who were initially diagnosed with essential thrombocythemia. **Int J Hematol.** 2018 108(4):411-415. doi: 10.1007/s12185-018-2495-2. [査読あり]
- (6) Kamiunten A, **Shide K**, Shimoda K. Myeloproliferative neoplasms: recent progresses in therapy **Rinsho Ketsueki.** 2018 59(6):741-746. doi: 10.11406/rinketsu.59.741. [査読あり]
- (7) Kamiunten A, **Shide K**, Kameda T(他 18 名, **2 番目**). Thrombohemorrhagic events, disease progression, and survival in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a retrospective survey in Miyazaki prefecture, Japan. **Int J Hematol.** 2018 107(6):681-688. doi: 10.1007/s12185-018-2428-0. [査読あり]
- (8) Ueda K, Ikeda K, Ikezoe T(他 21 名, **18 番目**). Hmga2 collaborates with JAK2V617F in the development of myeloproliferative neoplasms. **Blood Adv.** 2017 1(15):1001-1015. doi: 10.1182/bloodadvances.2017004457. [査読あり]
- (9) Shimoda K, **Shide K**, Kameda T. Mutant calreticulin causes essential thrombocythemia. **Oncotarget.** 2017 8(51):88251-88252. doi: 10.18632/oncotarget.21292. [査読あり]
- (10) Yamaji T, **Shide K**, Kameda T(他 14 名, **2 番目**). Loss of Tyrosine Kinase 2 Does Not Affect the Severity of Jak2V617F-induced Murine Myeloproliferative Neoplasm. **Anticancer Res.** 2017 37(7):3841-3847. [査読あり]
- (11) Kubuki Y, **Shide K**, Kameda T (他 19 名, **2 番目**). Differences in Hematological and Clinical Features Between Essential Thrombocythemia Cases With JAK2- or *CALR*-Mutations. **Ann Lab Med.** 2017 37(2):159-161. doi: 10.3343/alm.2017.37.2.159. [査読あり]
- (12) **Shide K**, Kameda T, Yamaji T (他 20 名, **1 番目**). Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. **Leukemia.** 2017 31(5):1136-1144. doi: 10.1038/leu.2016.308. [査読あり]

[学会発表](計 13 件)

- (1) **幣光太郎**
マウスモデルを用いた骨髄増殖性腫瘍発症機構の解析
第 29 回日本サイトメトリー学会学術集会、シンポジウム 3, S3-2 東京 2019 年 5 月 25 日
- (2) **Shide K**, Kameda T et al.

Haploinsufficiency of Calr Confers Hematopoietic Stem Cells (HSCs) with a Clonal Advantage over Wild-Type Cells, and, in Setting of Myeloproliferative Neoplasms, Compensates for the Functions of HSCs Impaired By the Calr Mutation
American Society of Hematology 60th Annual Meeting, Abstract no. 0097, San Diego CA, 米国, Dec 1. 2018

- (3) **Shide K**
Pathogenesis of myeloproliferative neoplasms: insights from mouse models (Educational Lecture 3-3F)
The 80th Annual Meeting of the Japanese society of Hematology, EL3-3F, Osaka, JAPAN, Oct 14.2018
- (4) **Shide K**, Kameda T et al.
CALR haploinsufficiency compensate HSC function of CALR-del52 transgenic mice
The 80th Annual Meeting of the Japanese society of Hematology, OS1-13A-5, Osaka, JAPAN, Oct 12.2018
- (5) Yoshimitsu M, Hachiman M et al.
JAK2 T875N, a causative novel activating germline mutation for familial essential thrombocytosis
The 80th Annual Meeting of the Japanese society of Hematology, OS1-13B-1, Osaka, JAPAN, Oct 12.2018
- (6) **Shide K**, Ikawa M et al
Generation of Calr mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9 system
Japan Society for the Promotion of Science & National University of Singapore Joint 2nd symposium, NEW HORIZONS IN NORMAL AND CANCER STEM CELL RESEARCH, P-29
熊本, 2018年1月19日
- (7) **幣光太郎**
CALR del52 変異は MPL と協調して JAK-STAT 経路を活性化し、マウスに ET を発症させる
第 54 回日本臨床分子医学会学術集会, P-13, 東京, 2017年4月14日
- (8) **Shide K**, Kameda T et al.
Murine Calr mutants homologous to human CALR mutants activate STATs, but do not develop MPNs in vivo
第 79 回日本血液学会, OS2-9C-1, 東京, 2017年10月21日
- (9) 山路卓巳、**幣光太郎** 他
TYK2 の欠損が JAK2V617F 変異により発症する骨髄増殖性腫瘍の病態に与える影響
第 20 回バイオ治療法研究会学術集会、福岡市 2016年12月10日
- (10) Ueda K, Ikeda K et al.
HMGA2 Orchestrates the Tumorigenesis of Myeloproliferative Neoplasms (MPN) in Cooperation with JAK2V617F
American Society of Hematology 58th Annual Meeting, Abstract no. 796, San Diego CA, 米国, Dec 5. 2016 (口演)
- (11) **Shide K**, Kameda T et al
Physiological Expression of Calr Mutant induces Increased Cell Growth and Cytokine Independency in Human Cell Lines Expressing Mpl, and Develops Essential Thrombocythemia in Mice
American Society of Hematology 58th Annual Meeting, Abstract no. 954, San Diego CA, 米国, Dec 5. 2016 (口演)
- (12) Ueda K, Ikeda K et al.
The role of oncogene HMGA2 in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms (MPN)
第 78 回日本血液学会, OS-3-21, 横浜, 2016年10月15日
- (13) **Shide K**, Kameda T et al.
CALRdel52 mutation activates the JAK-STAT pathway in coordination with MPL, and causes ET in mice
第 78 回日本血液学会, OS-3-22, 横浜, 2016年10月15日

〔図書〕(計 5 件)

- (1) **幣光太郎**, 下田和哉 「原発性骨髄線維症」
WHO 分類改訂第 4 版による白血病・リンパ系腫瘍の病態学, 木崎昌弘、田丸淳一 編著
中外医学社, p33-p39, 2019 ISBN978-4-498-22516-9
- (2) **幣光太郎** 「骨髄増殖性腫瘍における分子病態研究の進歩」
EBM 血液疾患の治療 2019-2020, 金倉謙、木崎昌弘、鈴木律朗、神田善伸 編集
中外医学社, p191-p195, 2018 ISBN/978-4-498-22514-5
- (3) **幣光太郎**, 下田和哉 第 2 章 骨髄線維症の基礎 3. 「骨髄線維症のマウスモデル」
骨髄線維症(MF) ~ 分子病態の解明から新規薬物治療薬の開発まで ~ 小松則夫編著
医薬ジャーナル社, p46-52, 2016, ISBN/978-4-7532-2822-5

- (4) **幣光太郎**, 下田和哉 「JAK2, MPL, CALR 変異による骨髄増殖性腫瘍」
白血病学(上), -最新の基礎, 臨床研究-,
日本臨床社, p329-333, 2016
- (5) 亀田拓郎, **幣光太郎** 「骨髄増殖性腫瘍における TET2 の役割」
Annual Review 血液, 高久史磨, 小澤敬也, 金倉譲, 小島勢二, 矢富裕編
中外医学社, p80-85, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

該当なし

取得状況(計 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：亀田 拓郎

ローマ字氏名：(KAMEDA, Takuro)

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。