

平成30年6月19日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19587

研究課題名(和文) 奇形腫を介した骨髄線維症モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of in vitro model for essential thrombocythemia by mutant calreticulin

研究代表者

水上 喜久 (MIZUKAMI, Yoshihisa)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：30756698

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)：骨髄増殖性腫瘍(MPN)では、著しいQOL低下や急性白血病へ移行する可能性があるが、唯一、完治する骨髄移植においても、ドナー不足や高頻度の移植関連死、重篤な合併症など多くの課題がある。MPN発症メカニズムの解明による新規治療法の開発に向けて、MPNのドライバー遺伝子CALR変異をもつ本態性血小板血症(ET)の患者からiPS細胞を樹立し、MPNにおける巨核球の形成の病態モデルをin vitroで再現することに成功した。ここから、CALR変異をもつETの造血幹細胞では、転写因子GATA1とGATA2の高発現が見られたことから、造血幹細胞が巨核球に分化が偏ることで、血小板が増加することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Somatic mutations in the calreticulin (CALR) gene have been found in most patients with myeloproliferative neoplasms (MPNs). Mutant CALR activates the thrombopoietin receptor, which promote the development of MPNs. However, the roles of mutant CALR in human hematopoietic cell differentiation remain unknown. To examine the effect of mutant CALR on hematopoietic cell differentiation, we generated induced pluripotent stem cells from an essential thrombocythaemia (ET) patient with CALR mutation. Megakaryopoiesis was observed in hematopoietic progenitor cells with mutant CALR rather than in healthy ones, suggesting that the system recapitulates megakaryocytosis occurred in the bone marrow of CALR-mutant ET patients. We established an in vitro model system that recapitulates megakaryopoiesis caused by mutant CALR. This system can be used to validate therapeutic compounds for MPN patients with CALR mutations and in detailed studies on mutant CALR in human hematological cell differentiation.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 calreticulin JAK2 ドライバー変異 骨髄線維症 本態性血小板血症 iPS細胞 造血幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍(MyeloProliferative Neoplasm; MPN)とは、造血幹細胞における JAK2 や CALR などのドライバー遺伝子変異によって発症する造血器腫瘍であり、真性多血症(赤血球の異常な増加)、本態性血小板血症(血小板の異常な増加)、または原発性骨髄線維症(骨髄の線維化)の3つの病態がある。骨髄線維症では正常造血が出来なくなるため、貧血による輸血依存や全身倦怠感などの QOL 低下が著しい。さらに、その多くが急性白血病へ移行するため、平均余命は 42 ヶ月と短い。現状は骨髄移植以外に完治する方法はないが、その適合ドナー不足や高頻度の移植関連死、重篤な合併症リスクがある。

骨髄移植以外の治療法として、近年、JAK2 阻害薬の臨床応用が始まり(N. Engl. J. Med 2010 他)、脾腫や臨床症状の改善には一定の効果があると報告されているが、慢性骨髄性白血病に対するイマチニブのような分子学的寛解は得られない上に、JAK2 を阻害することによる副作用や、阻害薬の長期使用によって薬剤耐性を獲得する可能性が高くなると懸念されている(Nature 2012)。また、MPN 患者にみられる epigenetic な異常、免疫学的異常、分子異常に基づいて、これらを直接のターゲットとした HDAC 阻害薬や DNA メチルトランスフェラーゼ阻害薬、免疫調節薬などの臨床試験も行なわれているが、完治を望める治療薬の発見には至っておらず、新規治療法の開発が急務である。

## 2. 研究の目的

骨髄線維症は、造血幹細胞におけるドライバー遺伝子変異によって発症すると考えられているが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。しかし、骨髄線維症における前線維化期に、巨核球の形態異常や血小板の増加など、同じ MPN に分類される本態性血小板血症(Essential Thrombocythemia; ET)と

似た特徴を示すことから、我々は、骨髄線維症と ET が巨核球の異常という点で共通すると考えた。MPN のドライバー遺伝子の一つ CALR 変異は、骨髄線維症と ET を発症するが真性多血症は発症しないことに着目し(N. Engl. J. Med. 2013)、CALR 変異による MPN 発症メカニズムの解明は、骨髄線維症の理解につながると考えた。そこで我々は、ET 患者の末梢血から、疾患特異的 iPS 細胞を樹立に取り組みこととした。

疾患特異的 iPS 細胞は、適切な動物モデルがなく、患者数が非常に少ないために臨床研究が遅れている希少難病疾患の病態解明や新規治療法を開発に応用できる。今回、CALR 変異を持つ ET 患者の人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell; iPS 細胞)を樹立し、それを造血幹細胞・前駆細胞に分化誘導させることで、多大な苦痛を伴う骨髄生検することなく、患者由来の細胞を大量に得ることで、その解析をおこなった。

## 3. 研究の方法

### (1) CALR 変異 iPS 細胞の樹立

当大学病院は、MPN 患者の検体(末梢血、骨髄)が多数入手出来る、国内で有数の研究機関である。我々は、CALR 変異をもつ ET 患者の末梢血から単核球を分離し、iPS 細胞を樹立(CALR-iPS 細胞)した。体細胞を初期化するための遺伝子を導入する方法として、ゲノムを傷付けることのないをエレクトロポレーション法によって遺伝子導入を行い(Science 2008) iPS 細胞のがん化リスクを下げることで安全性の向上を目指した。

また、iPS 細胞の樹立の際に、体細胞の初期化が十分にされない場合、その細胞はがん化するリスクがある。そのため、山中 4 因子(Oct3/4, SOX2, c-Myc, Klf4)に加えて、iPS 細胞の初期化効率を飛躍的に高める p53 と Lin28 の遺伝子を含む 6 遺伝子を導入した。

## (2) CALR 変異 iPS 細胞の分化誘導

MPN における赤血球や血小板などの異常な増殖が見られる原因として、以下の二つの可能性が考えられる。一つは、造血幹細胞の異常な増殖、もう一つは、造血幹細胞からの分化の促進である。このことを明らかにするために、CALR-iPS 細胞と *in vitro* で分化誘導した場合に、その分化誘導効率が健常者の iPS 細胞と比較して差が見られるか検証した。分化誘導は、既に確立された方法に従った (J Exp Med. 2010)。

また、MPN はそのドライバー遺伝子に寄って、その病態の発症頻度に違いが見られる。CALR 変異の患者には、真性多血症 (赤血球の異常な増殖) が見られない。この原因として、造血幹細胞の分化が、巨核球系へ偏っている、または、赤芽球系の細胞への分化が阻害されている、ことの 2 つの可能性が考えられる。このことを検証するために、CALR-iPS 細胞を、造血幹細胞・前駆細胞に分化誘導し、それをさらに巨核球系、または赤芽球系の細胞へと分化誘導することで、その誘導効率が健常者 iPS 細胞と比較して違いが見られるか検証した。

## 4. 研究成果

本研究は、骨髄増殖性腫瘍の病態モデル作出のために、CALR 変異をもつ疾患 iPS 細胞を用いた病態メカニズムの解明に取り組んだ。これまでの進捗として、以下の 3 つが挙げられる。

(1) CALR-iPS 細胞の樹立：これまでに、骨髄線維症の患者由来の細胞は初期化されにくいことが報告されている (Exp. Hematol. 2014)。また、骨髄線維症の病態を *in vivo* で再現することは技術的に困難であることが予想される。そこで、CALR 変異による ET 発症メカニズムの解明にむけて、CALR 変異による ET 患者の末梢血から iPS 細胞を樹立した。CALR-iPS 細胞の樹立効率は、健

常者の末梢血から樹立した場合と同等であった。

(2) CALR 変異をもつ iPS 細胞の *in vitro* における分化誘導：

CALR-iPS 細胞から造血幹細胞・前駆細胞への分化誘導を *in vitro* で行った。その誘導効率を造血幹細胞・前駆細胞のマーカーである CD34 陽性細胞の数で評価したところ、健常者由来の iPS 細胞と同等の効率であった。次に、CD34 陽性細胞から巨核球系の細胞系列へ分化誘導を行ったところ、健常者由来の細胞に比べて、巨核球マーカー CD42b 陽性細胞が多く見られた。これは、血小板血症における巨核球の異常増殖の病態を再現していると考えられる。

次に、赤血球系列の細胞へ分化誘導を行ったところ、赤芽球マーカー CD235a 陽性細胞が、健常者に比べて少なかった。これは、CALR 変異の患者には赤血球の異常増殖である真性多血症が見られない理由が、造血幹細胞の赤芽球系への分化抵抗性にあることを示唆している。

(3) CALR 変異をもつ造血幹細胞における遺伝子発現解析：CALR 変異をもつ造血幹細胞では、転写因子 GATA1 および GATA2 の発現が健常者に比べて高いことを発見した。これは、CALR 変異における巨核球への分化の偏りと赤芽球系への分化の抑制を引き起こしている可能性がある。さらに、巨核球の形成及び成熟を抑制する薬剤アナグレリドの添加によって、巨核球への分化誘導が阻害されることを確認した。一方で、赤芽球系への分化にはたらくエリストポエチンによる CD235a 陽性細胞 (赤芽球細胞マーカー) への分化は、アナグレリドの添加によって阻害されなかった。以上から、CALR-iPS 細胞を用いることで、CALR 変異における巨核球の形成モデルを *in vitro* で再現することができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

1. Takei H, Edahiro Y, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y et al.: Skewed megakaryopoiesis in human iPS cell-derived hematopoietic progenitor cells harboring calreticulin mutations. *British Journal of Haematology* (in press).
2. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y et al.: Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 127(10), 1307-16; 2016.

[学会発表](計10件)

1. Takei H, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y et al.: Skewed megakaryopoiesis observed in hematopoietic progenitor cells harboring calreticulin mutation. 2017年度 生命科学系学会合同年次大会. 神戸, 2017年12月6日-9日.
2. Takei H, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y et al.: Skewed megakaryopoiesis by mutant calreticulin is associated with increased GATA2 expression. 第79回日本血液学会学術集会. 東京, 2017年10月20日-22日.
3. Masubuchi N, Araki M, Hayashi E, Yang YJ, Imai M, Mizukami Y et al.: Engagement of mutant calreticulin and MPL in a cellular compartment is required for MPL activation. 第79回日本血液学会学術集会. 東京, 2017年10月20日-22日.
4. 眞野 修一, 竹井 拓, 森下 総司, 水上 喜久他: 家族性骨髄増殖性腫瘍患者からの iPS 細胞株の樹立. 第79回日本血液学会学術集会. 東京, 2017年10月20日-22日.
5. Takei H, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y et al.: Establishment of an in vitro model for the skewed megakaryopoiesis by calreticulin mutation in human cells. 22nd Congress European Hematology Association. Madrid, June 22-25, 2017.
6. 増淵 菜弥, 荒木 真理人, 楊 印杰, 弘中 由美, 竹井 拓, 森下 総司, 今井 美沙, 水上 喜久他: 骨髄増殖性腫瘍を引き起こす変異型 Calreticulin の細胞内局在. 第39回日本分子生物学会年会. 横浜, 2016年11月30日-12月02日.
7. Takei H, Masubuchi N, Mano S, Araki M, Morishita S, Mizukami Y et al.: Modeling MPN phenotypes in vitro by using iPSC harboring CALR ins5 mutation, 第78回日本血液学会, 横浜, 2016年10月13日-15日.
8. Masubuchi N, Araki M, Yang Y, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y et al.: Cell surface localization of mutant calreticulin that induces myeloproliferative neoplasms (MPNs). 第78回日本血液学会, 横浜, 2016年10月13日-15日.
9. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y et al.: Mutant calreticulin activate the thrombopoietin receptor in myeloproliferative neoplasm. 第78回日本血液学会, 横浜, 2016年10月13日-15日.

10. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y et al.: Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. 21st Congress European hematology association (国際学会), Copenhagen, 2016年06月09日-12日.

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

出願状況 なし

取得状況 なし

〔その他〕

ホームページ

<https://www.juntendo.ac.jp/hospital/clinic/ketsuekinaika/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

水上 喜久 (Mizukami, Yoshihisa)  
順天堂大学・医学部・ポストドクター  
研究者番号: 30756698

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

小松則夫 (Norio Komatsu)  
順天堂大学 医学部 血液学講座  
主任教授 研究者番号: 50186798

荒木真理人 (Marito Araki)  
順天堂大学 医学部 輸血・幹細胞制御学  
准教授 研究者番号: 80613843