

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08372

研究課題名(和文) CALR遺伝子変異により発症する骨髄増殖性腫瘍に対する新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic strategies for myeloproliferative neoplasms caused by mutant CALR

研究代表者

楊 インジェ (Yang, Yinjie)

順天堂大学・医学部・特任助教

研究者番号：90808643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPN)患者の一部に見出されるcalreticulin(CALR)遺伝子変異依存性に増殖する細胞株を用いた化合物ライブラリースクリーニングにより得られた、腫瘍細胞選択性の高い低分子化合物(化合物X)について、MPNのモデル細胞およびモデル動物を用いて解析を行った。その結果、化合物Xが医薬候補分子としての有望であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄増殖性腫瘍(MPN)は、造血幹細胞に体細胞変異が生じることで引き起こされる造血器の腫瘍である。最新の分子標的薬を用いても寛解には至らず、根治は、治療関連死のリスクのある造血幹細胞移植に限られていることから、根治を目指した有効な治療薬の開発が切望されている。本研究により明らかにされた医薬候補分子を基盤としてMPNの根治を可能にする治療薬の開発が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, by use of myeloproliferative neoplasms (MPNs) model cell lines and animals, we analyzed a small molecule (compound X) with high tumor cell selectivity obtained by compound library screening using a cell line proliferating in a manner dependent on mutant calreticulin that was found in patients with MPNs. As a result, it was found that compound X is promising as a drug candidate molecule.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 mutant CALR 低分子化合物

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

MPN に分類される本態性血小板血症(以下 ET と略する)や原発性骨髄線維症(以下 PMF と略する)は、造血幹細胞に体細胞変異が生じ、末梢血中の血証板の異常な増加や骨髄の線維化を呈する造血器腫瘍である。ET の予後は一般に良好であるが、出血症状や QOL の著しい低下を招く脳梗塞や心筋梗塞の発症リスクが高い。さらに、特定疾患に指定されている難病の PMF 患者では、骨髄の線維化に伴う脾腫の進行、貧血による輸血依存、その他の全身症状の悪化が進み、QOL が著しく低下する上、高率に予後不良の急性白血病を発症する。このため、骨髄線維症発症者の生存期間中央値は、約 3 年半と極めて短い。

MPN に対しては、治療関連死のリスクを伴う造血幹細胞移植が唯一の根本的な治療法であるが、MPN 患者は高齢者が多いことなどから、移植適応症例の数は少ない。また、現在、最も効果的と考えられている JAK2 阻害薬による治療も、JAK2 阻害薬の腫瘍細胞に対する選択性がないことから、寛解には至らない。これらのことから、疾患の発症メカニズムを標的とした、より有効な治療薬の開発が求められている。

申請者らは、JAK2 変異と MPL 変異がともに陰性の ET と PMF の症例で見出された CALR 変異遺伝子が、巨核球系細胞の腫瘍性増殖を引き起こすことを世界に先駆けて明らかにした。次に、この変異遺伝子産物が発する増殖シグナルを標的とすることにより、腫瘍細胞を完全に駆逐できると考え、質の高い化合物ライブラリーを所蔵する東京大学創薬支援機構の協力の元、208,999 個の化合物のスクリーニングを行った。その結果、11 個のヒット化合物を得たが、それらの化合物の作用機序は不明であった。そこで、変異型 CALR による腫瘍性細胞増殖を標的とした、より効果的な医薬候補分子の取得に必要な、これらの低分子化合物の作用機序を詳細に明らかにするために、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、MPN に対する有効な治療薬を開発するために、質の高い化合物ライブラリーのスクリーニングで得た低分子化合物による変異型 CALR 依存性細胞増殖の抑制メカニズムを解明するとともに、医薬候補分子としての可能性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化合物 X が細胞の腫瘍原性に与える影響の評価

変異型 CALR による TPO 非依存性の MPL 活性化が生じている UT-7/TPO 細胞を、IMDM 培地 100ul 中に 10,000 個播種後、化合物 X を添加し、経時的に細胞の増殖を WST-8 アッセイにより評価した。

(2) 化合物 X により活性化が阻害されるシグナル伝達経路のイムノプロットによる評価

変異型 CALR による TPO 非依存性の MPL 活性化が生じている UT-7/TPO 細胞を、化合物 X 存在下で培養し、細胞を遠心して回収後、脱リン酸化阻害剤を添加したリン酸緩衝液(PBS)で洗浄、RIPA バッファーで懸濁し、超音波破碎することで細胞抽出液を調製した。これらの細胞抽出液を、SDS-PAGE 電気泳動後に PVDF 膜に転写し、5%スキムミルク溶液でブロッキングしてから、リン酸化特異的抗体と反応させ、さらに、ペルオキシダーゼ標識された 2 次抗体と反応させた後、基質を加えて、リン酸化蛋白質特異的なシグナルを、高感度 CCD カメラで検出した。

(3) 化合物 X が変異型 CALR と MPL の相互作用に与える影響の評価

変異型 CALR と MPL の相互作用に化合物 X が影響を与えるか評価するために、それぞれ FLAG タグと V5 タグを付加した変異 CLAR 遺伝子と MPL 遺伝子をリポフェクションにより導入した HEK293T 細胞を化合物 X 存在下で一定時間培養した後、細胞を遠心により回収し、0.1% Triton-X100 リン酸緩衝液で懸濁、超音波破碎することで、細胞抽出液を調整した。細胞抽出液に、抗 FLAG 抗体を添加してから Protein G ビーズと反応させることで、ビーズ上に変異型 CLAR に結合したタンパク質を捕捉した上で、ビーズに結合した蛋白質を SDS と還元剤を用いて溶出した。得られたタンパク質をイムノプロットにより解析し、変異型 CALR と MPL の相互作用に化合物 X が影響を与えているか評価した。

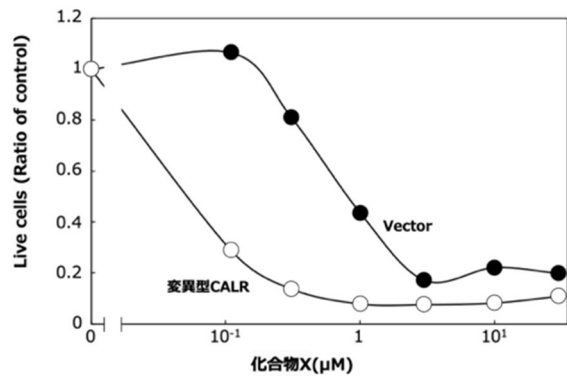
(4) MPN モデルマウスを用いた化合物 X の医薬候補分子としての可能性の評価

免疫不全マウスの皮下に変異型 CALR による TPO 非依存性の MPL 活性化が生じている UT-7/TPO 細胞を移植し、皮下での腫瘍形成後、一週間経ってから、化合物 X を経口投与し、免疫不全マウスの皮下での造腫瘍能の抑制を評価した。

4. 研究成果

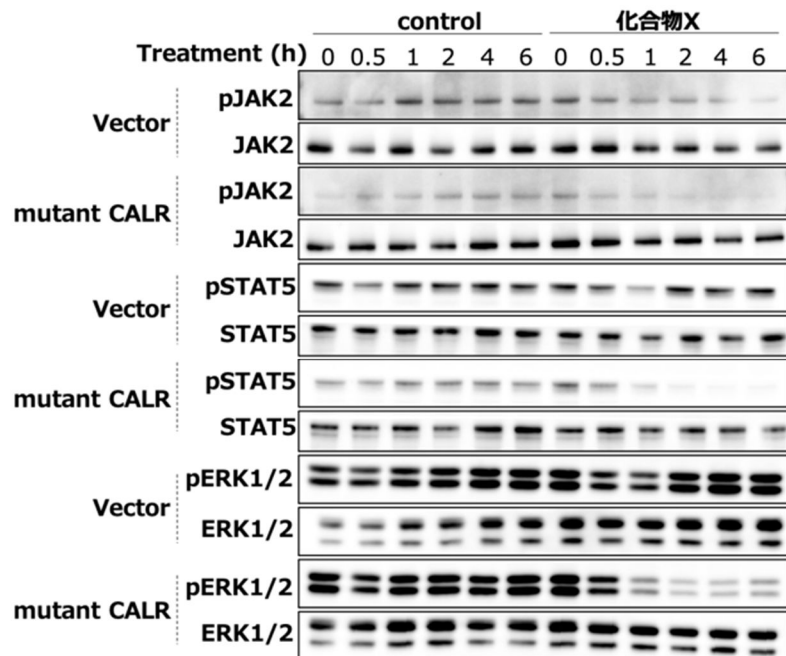
(1) 化合物 X は MPL の下流シグナル伝達経路の活性化を阻害する

申請者らは、変異型 CALR による腫瘍性細胞増殖を試験管内で再現した系を用いて、化合物ライブラリースクリーニングを行い、変異型 CALR 依存性の細胞増殖を阻害する 11 個の低分子化合物を取得した。次に、変異型 CALR 依存性の細胞増殖を阻害する 11 個の低分子化合物について、化合物ライブラリースクリーニングの再現性を確認するため、取得した低分子化合物が変異型 CALR 依存性の細胞増殖を阻害するか、WST-8 アッセイにより評価した。その結果、取得した 11 個のうち 1 個の低分子化合物(以下、化合物 X と略する)において、化合物ライブラリースクリーニングの再現性を確認できた(図 1)。



【図1. 化合物XはCALR依存性の細胞増殖を特異的に抑制する】

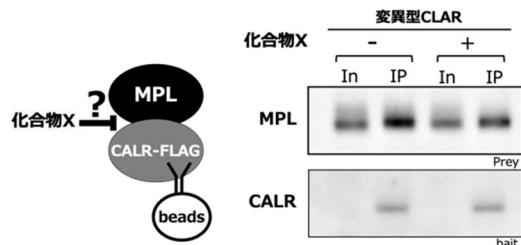
そこで、化合物 X の受容体下流シグナル伝達機構への影響を明らかにするため、変異型 CALR による TPO 非依存性の MPL 活性化が生じている UT-7/TPO 細胞を、化合物 X 存在下で培養した上で、蛋白質抽出液を調製し、イムノブロット法を用いて、MPL 下流シグナル伝達分子である JAK2、ERK、STAT ファミリーの活性化状態を評価した。その結果、化合物 X は、これらのシグナル伝達系全てを阻害することが明らかとなった(図 2)。



【図2. 化合物Xは変異型CALRによるMPL下流シグナル分子の活性化を抑制する】

(2) 化合物 X は変異型 CALR と MPL の分子間相互作用に影響を与えない

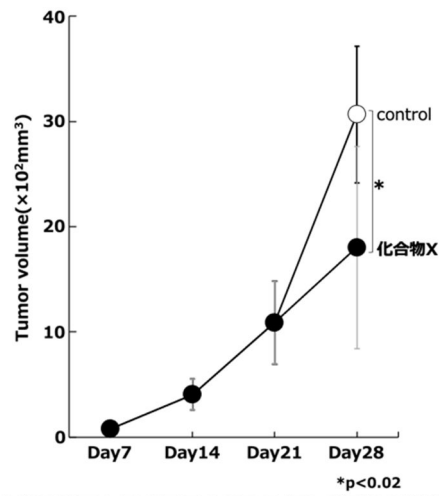
そこで、変異型 CALR 依存性の細胞増殖および変異型 CALR による TPO 非依存性の MPL 活性化を阻害する化合物 X が変異型 CALR と MPL の分子間相互作用に影響を与えるか評価を行なった。具体的には、FLAG タグを付加した CALR 遺伝子を導入した UT-7/TPO 細胞や、FLAG タグを付加した変異型 CALR 遺伝子や受容体である MPL に V5 タグを付加した遺伝子をリポフェクションにより共発現させた HEK293T 細胞を低分子化合物とともに一定時間培養後、細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体を添加してから Protein G ビーズと反応させることで、変異型 CALR と MPL の結合が阻害されるかの評価を行なった。しかしながら、化合物 X は変異型 CALR と MPL の分子間相互作用に影響を与えなかった(図 3)。



【図3.化合物Xは変異型CALRとMPLの結合を阻害しない】

(3) 化合物 X は変異型 CALR を発現する細胞の皮下での腫瘍形成を抑制する

化合物 X が、腫瘍性の細胞増殖に影響を与えるか MPN 病態モデルマウスを用いて解析を行なった。具体的には、変異型 CALR 遺伝子を導入した UT-7/TPO 細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、腫瘍の形成を確認した後、化合物 X を経口投与することで皮下での腫瘍の形成が抑制されるか検討を行なった。その結果、コントロールマウスに比べ、化合物 X を投与したマウスの皮下の腫瘍の大きさは有意に小さく、化合物 X は変異型 CALR を発現する細胞の皮下での腫瘍形成を抑制することが明らかとなった (図 4)。



【図4.化合物Xはマウス皮下でのUT-7/TPO細胞の増殖を抑制する】

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Morishita Soji, Yasuda Hajime, Yamawaki Saya, Kawaji Hideya, Itoh Masayoshi, Edahiro Yoko, Imai Misa, Kogo Yasushi, Tsuneda Satoshi, Ohsaka Akimichi, Hayashizaki Yoshihide, Ito Masafumi, Araki Marito, Komatsu Norio	4. 巻 112
2. 論文標題 CREB3L1 overexpression as a potential diagnostic marker of Philadelphia chromosome?negative myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 884 ~ 892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Edahiro Yoko, Yasuda Hajime, Gotoh Akihiko, Morishita Soji, Suzuki Toshifumi, Takeda Jun, Ando Jun, Tsutsui Miyuki, Itakura Atsuo, Komatsu Norio	4. 巻 113
2. 論文標題 Interferon therapy for pregnant patients with essential thrombocythemia in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 106 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-03001-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Edahiro Yoko, Araki Marito, Komatsu Norio	4. 巻 111
2. 論文標題 Mechanism underlying the development of myeloproliferative neoplasms through mutant calreticulin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2682 ~ 2688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masubuchi Nami, Araki Marito, Yang Yinjie, Hayashi Erina, Imai Misa, Edahiro Yoko, Hironaka Yumi, Mizukami Yoshihisa, Kihara Yoshihiko, Takei Hiraku, Nudejima Mai, Koike Masato, Ohsaka Akimichi, Komatsu Norio	4. 巻 34
2. 論文標題 Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 499 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0564-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Araki Marito, Yang Yinjie, Imai Misa, Mizukami Yoshihisa, Kihara Yoshihiko, Sunami Yoshitaka, Masubuchi Nami, Eda Hiro Yoko, Hironaka Yumi, Osaga Satoshi, Ohsaka Akimichi, Komatsu Norio	4. 巻 33
2. 論文標題 Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 122 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-018-0181-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Shioiri K, Araki M, Kitazawa S, Masubuchi N, Morishita S, Imai M, Ohsaka A, Komatsu N.
2. 発表標題 Analysis of behavior of erythropoietin receptor on the cell surface in JAK2 mutant cells.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Morishita S, Yasuda H, Yamawaki S, Kawaji H, Itoh M, Eda Hiro Y, Imai M, Kogo Y, Tsuneda S, Ohsaka A, Hayashizaki Y, Araki M, Komatsu N.
2. 発表標題 CREB3L1 overexpression as a novel diagnostic marker of myeloproliferative neoplasms.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kihara Y, Araki M, Imai M, Fukuda Y, Mori Y, Taguchi T, Masubuchi N, Mabuchi Y, Yang Y, Mizukami Y, Morishita S, Akazawa C, Ohsaka A, Komatsu N.
2. 発表標題 Therapeutic potential of myeloproliferative neoplasms by antibody targeting mutant calreticulin.
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増淵菜弥, 荒木真理人, 楊印杰, 林英里奈, 今井美沙, 枝廣陽子, 弘中由美, 水上喜久, 木原慶彦, 小池正人, 大坂顯通, 小松則夫.
2. 発表標題 変異型CALRはMPLと分泌経路で相互作用し細胞表面で活性化を引き起こす.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上喜久, 荒木真理人, 今井美沙, 林英里奈, 増淵菜弥, 楊印杰, 木原慶彦, 弘中由美, 大坂顯通, 小松則夫.
2. 発表標題 変異型calreticulin特異的配列によるゴルジ体への局在.
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増淵菜弥, 荒木真理人, 木原慶彦, 楊印杰, 今井美沙, 水上喜久, 林英里奈, 弘中由美, 竹井拓, 枝廣陽子, 大坂顯通, 小松則夫.
2. 発表標題 分泌経路における変異型分子シャペロンとサイトカイン受容体の会合による細胞の腫瘍化.
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上喜久, 荒木真理人, 今井美沙, 林絵里奈, 増淵菜弥, 楊印杰, 木原慶彦, 弘中由美, 大坂顯通, 小松 則夫.
2. 発表標題 変異型特異的配列による変異型CALRの細胞内局在の規定.
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲野資明, 荒木真理人, 福田泰隆, 森下総司, 落合友則, 三澤恭平, 伊藤雅文, 山本紘司, 楊印杰, 田口鉄平, 枝廣陽子, 今井美沙, 後藤明彦, 大坂顯通, 小松則夫.
2. 発表標題 トリプルネガティブ本態性血小板血症症例の臨床像と遺伝子変異.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 荒木真理人, 楊印杰, 今井美沙, 水上喜久, 木原慶彦, 角南義孝, 増淵菜弥, 枝廣陽子, 弘中由美, 大佐賀智, 大坂顯通, 小松則夫.
2. 発表標題 変異型 CALRの多量体化は MPLとの結合と活性化に必須である.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Araki M, Masubuchi N, Hayashi E, Yang Y, Imai M, Kihara Y, Mizukami Y, Hironaka Y, Edahiro Y, Ohsaka A, Komatsu N.
2. 発表標題 Boarding on the secretory pathway is required for the oncogenic property of mutant calreticulin.
3. 学会等名 23rd Congress of the European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小松 則夫 (Komatsu Norio) (50186798)	順天堂大学・医学部・教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今井 美沙 (Imai Misa) (50709003)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・助教 (32620)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関