

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16126

研究課題名（和文）ライブセルイメージングによるMPN発症分子間相互作用の可視化

研究課題名（英文）Live imaging system to monitor mutant Calreticulin which promote myeloproliferative neoplasms

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄増殖性腫瘍（MPN）患者においてみられるCALR遺伝子変異によるMPN発症メカニズムの解明をめざし、変異型CALRを黄色蛍光タンパク質Venusと融合させたキメラタンパク質をヒト巨核球系細胞株に発現させることで、生きた細胞における変異型CALRの挙動を可視化することに成功した。この解析系を用いて、フレームシフト変異によって生じる変異型CALR特異的なCドメインの配列によって、変異型CALRのゴルジ体への局在が規定されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、分子シャペロンCALRの変異型タンパク質と、サイトカイン受容体TPORを生きた細胞内でそれぞれ可視化することに成功した。これによって、変異型CALRとTPORが細胞内のどこでどのように相互作用し、TPORを活性化するか理解することが大いに期待され、開発が急務であるCALR 遺伝子変異をもつ骨髄増殖性腫瘍患者への有効な治療薬の開発への寄与が期待される。

研究成果の概要（英文）：To investigate the mechanism for the development of myeloproliferative neoplasms (MPN) by mutant calreticulin (CALR), a live imaging system that maintains the oncogenic property of mutant CALR is established. Furthermore, mutant CALR specific sequence that is caused by frameshift mutation serves as a potent signal to make mutant CALR localizing at the Golgi apparatus.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 分子シャペロン CALR ライブセルイメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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などのドライバー遺伝子変異によって発症する稀な造血器腫瘍である。その病態は大きく三つに分類され、それぞれ真性多血症(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)である。

2013年、分子シャペロンcalreticulin(CALR)遺伝子の体細胞変異がMPN患者において発見された(N Engl J Med. 2013)。CALR は、小胞体に局在する分子シャペロンとして機能するが、MPNへの関与は未解明であった。MPN 患者にみられるCALR 遺伝子変異は、最終exonへの短い塩基の挿入または欠失であり、C 末端に野生型には存在しない新規アミノ酸配列がみられる。これまでに申請者らは、変異型CALRがトロンボポエチン(TPO)受容体TPORと特異的に結合することでTPORを恒常的に活性化し、腫瘍化することを明らかにしてきた(Blood 2016)。しかし、変異型 CALR による腫瘍化の詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。

MPNの治療に用いられるJAK2阻害薬をはじめとした薬物は、血球数のコントロールや全身症状を改善するが、当該疾患を根治できない。MPNの根治療法として、骨髄移植がある。しかし、治療関連死のリスクや、移植不適応症例が多いため、移植の行われる症例は極めて少ないのが実情である。骨髄移植以外の治療法として、10年ほど前から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が報告されているが、イマチニブによる慢性骨髄性白血病のような分子学的寛解は得られない上に、JAK2の阻害による副作用や、長期使用によって腫瘍が薬剤耐性を獲得するリスクが懸念されている(Nature 2012)。JAK2阻害薬以外の治療法として、MPN患者のエピジェネティックな異常や、免疫学的な異常に基づき、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、どの治療法も完治を望むことができず、MPN発症メカニズムの理解に基づく新規治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の背景を踏まえた MPN 発症の分子メカニズムの理解に基づく根治治療薬の開発にむけて、変異型分子シャペロン CALR によるサイトカイン受容体の活性化という、これまでに知られていない現象を可視化することである。

3. 研究の方法

細胞株の樹立と変異型 CALR キメラタンパク質の腫瘍原性の評価

CALR 変異をもつ MPN 患者には、52 塩基欠失型 (Del52)と 5 塩基挿入型 (Ins5)の 2 つの変異が高頻度で見出される。これらの CALR 変異をもつ MPN 患者の末梢血単核球から mRNA を抽出し、それを逆転写して得た cDNA を鋳型に用いた PCR によって増幅した。この DNA 断片の C 末端に 10 個のアミノ酸をリンカー配列として Venus タグを付加した後にレトロウイルスベクター-pMSCV-IRES-GFP の EcoRI サイトと AgeI にクローニングした。これを Plat-GP 細胞に VSV-G とともにトランスフェクションし、48 ~ 72 時間後に培養上清からレトロウイルスを回収した後に高速遠心によって濃縮し、ヒト血球細胞株 UT-7/TPO (トロンボポエチン依存性) または UT-7/EPO (エリスロ

ポエチン依存性)に感染させた。数日間、培養した後に Venus 陽性細胞をセルソーターでソーティングすることで、Venus タグ付き変異型 CALR Del52 または Ins5 を発現する細胞株をそれぞれ樹立した。これらの細胞株を、96 well plate を用いて、10% ウシ胎仔血清を含む IMDM 培地 100 μ L に 10,000 個を各ウェルに播種し、経時的な細胞増殖を WST-8 アッセイを用いて評価した。

また、変異型 CALR キメラタンパク質を発現する UT-7/TPO 細胞を遠沈管に回収し、脱リン酸化阻害剤を添加した PBS で洗浄後、RIPA バッファーで懸濁し、超音波処理で破碎することで細胞抽出液を調製した。

局在の評価

変異型 CALR の細胞内における局在はゴルジ体であり、小胞体に局在する野生型と異なる。変異型 CALR のキメラタンパク質の局在が、タグのない変異型 CALR と同様か検証するために、変異型 CALR キメラタンパク質を発現する UT-7/TPO 細胞 50,000 個をガラス底 dish に播種し、37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 環境下で、共焦点顕微鏡を用いて撮影した。また、10,000 個の細胞をサイトスピンによってスライドガラスに貼り付け、4% パラフォルムアルデヒドで固定後に PBS によって洗浄し、5% ウマ血清入り 0.1% PBS-T によってブロッキングし、抗 GFP 抗体で Venus タグをラベルし、同時に各種オルガネラマーカー用の抗体によって免疫染色を行い、共焦点顕微鏡を用いて評価した。

変異型 CALR の局在が、野生型にみられる小胞体滞留シグナル KDEL の消失によるものか検証するために、野生型 CALR の C 末端にある KDEL を除去した cDNA を PCR で増幅し、さらに Venus タグを付加した。また、変異型 CALR は、野生型に見られない負電荷のアミノ酸クラスターがあることに着目し、野生型 CALR では正電荷アミノ酸で構成される当該領域を負電荷アミノ酸に置換(Asp, Glu を Arg または Lys に置換)した上で、KDEL を取り除いた cDNA を PCR で増幅し、Venus タグを付加した。これらを用いて、上述と同様に UT-7/TPO 細胞株を樹立した。

さらに、変異型 CALR の細胞内局在が、変異型 CALR 特異的なアミノ酸配列によって規定されるか検証するために、GFP の cDNA を鑄型にして、N 末端に CALR のシグナルペプチド(SP)、C 末端に小胞体滞留シグナル KDEL を付加した GFP(SP-GFP-KDEL)と、SP と変異型 CALR 特異的 C ドメインを付加した GFP(SP-GFP-C mutant)をそれぞれ PCR で作成し、上述と同様に UT-7/TPO 細胞株を樹立した。

4. 研究成果

(1) 変異型 CALR キメラタンパク質による細胞の腫瘍化

変異型 CALR はトロンボポエチン受容体 TPOR に直接結合することで腫瘍原性を示す。Venus タグ付き変異型 CALR のキメラタンパク質を、TPOR を発現するヒト細胞株 UT-7/TPO (TPO 依存性)に発現させたところ、野生型 CALR キメラタンパク質を発現する細胞では、TPO 依存性にしか細胞増殖が見られなかったのに対し、変異型 CALR Del52 または Ins5 を発現させた細胞ではサイトカイン非依存的な増殖がみられた。さらに、TPOR 発現しない細胞株 UT-7/EPO では、サイトカイン非依存的な増殖はみられなかった。ウェスタンブロットによって細胞内のタンパク質の蓄積量をみたところ、野生型に比べて変異型 CALR は細胞内の蓄積量が有意に少なく、タグのない CALR と同様であった。以上から、変異型 CALR のキメラタンパク質は、タグのない変異型 CALR と同様

に、TPOR を活性化する機能を持つと考えられる。

(2) 変異型 CALR の局在を規定する配列の決定

ライブイメージングと免疫染色から、野生型 CALR では小胞体に局在が見られたが、変異型 CALR はゴルジ体へ集積が見られた。この局在の違いが ER 滞留シグナル KDEL の消失によるものか検証するために、野生型 CALR の KDEL を除去したキメラタンパク質を UT-7/TPO に発現させると、一部でゴルジ体へ集積が見られたが、小胞体への局在がメインであった。同様に、野生型 CALR から KDEL を除去し、さらに C ドメインの電荷チャージを反転させたキメラタンパク質の局在も小胞体がメインであった。また、これらの細胞株は、サイトカイン非依存的な増殖能をもたなかった。以上から、変異型 CALR の局在や腫瘍原性の変化は、KDEL の消失や C ドメインの電荷の変化以外にも原因があることが明らかとなった。

続いて、KDEL をもつ GFP (SP-GFP-KDEL) は、野生型 CALR と同様に小胞体に局在が見られたのに対して、変異型 CALR 特異的配列をもつ GFP (SP-GFP-C mutant) では、変異型 CALR と同様にゴルジ体へ局在が見られた。以上の結果から、KDEL の消失や電荷の変化によるものではなく、変異型 CALR に特異的な配列によることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Araki M, Yang Y, Imai M, Mizukami Y, Kihara Y, Sunami Y, Masubuchi N, Edahiro Y, Hironaka Y, Osaga S, Ohsaka A, Komatsu N.	4. 巻 33
2. 論文標題 Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation	5. 発行年 2019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 -

1. 著者名 Takei H, Edahiro Y, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y, Imai M, Morishita S, Misawa K, Ochiai T, Tsuneda S, Endo H, Nakamura S, Eto K, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N.	4. 巻 181
2. 論文標題 Skewed megakaryopoiesis in human induced pluripotent stem cell-derived haematopoietic progenitor cells harbouring calreticulin mutations.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British journal of haematology	6. 最初と最後の頁 791-802
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bjh.15266	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takei H, Edahiro Y, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y, Imai M, Morishita S, Misawa K, Ochiai T, Tsuneda S, Endo H, Nakamura S, Eto K, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N.
2. 発表標題 JAK2V617F変異アレル数はヒト血球分化を変化させる
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 Takei H, Edahiro Y, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y, Imai M, Morishita S, Misawa K, Ochiai T, Tsuneda S, Endo H, Nakamura S, Eto K, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N.
2. 発表標題 The Zygosity of JAK2V617F Determines the Disease Entities of Myeloproliferative Neoplasms By Modulating Erythropoiesis but Not Megakaryopoiesis.
3. 学会等名 第60回 米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2018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 Mizukami Y, Araki M, Imai M, Hayashi E, Masubuchi N, Yang Y, Kihara Y, Hironaka Y, Ohsaka A, Komatsu N.
2. 発表標題 Mutant specific sequence promotes accumulation of mutant CALR in the Golgi apparatus
3. 学会等名 第81回 日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019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