

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03715

研究課題名（和文）本態性血小板血症に特異的な転写ネットワークによる細胞腫瘍化メカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding the mechanism of cell tumorigenesis promoted by essential thrombocythemia specific transcriptional network

研究代表者

小松 則夫（Komatsu, Norio）

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：50186798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍（以下、MPNと称する）は、造血幹・前駆細胞に体細胞変異が生じ、血球の異常増加や骨髄の線維化を呈する造血器腫瘍である。本研究では、MPN患者血小板に限定的に発現するCREB3L1遺伝子の、臨床的意義とMPN発症への影響を解析した。その結果、MPN患者の血小板由来RNAを用いた解析により、CREB3L1遺伝子は、MPNの診断のみならず、予後予測にも利用可能な、臨床的に価値のある遺伝子であることが示唆された。さらに、MPN患者末梢血から分取したCD34陽性細胞を用いた一連の解析により、CREB3L1遺伝子が腫瘍細胞の分化、生存に必要な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

本研究では、血液学的に前例のないCREB3L1遺伝子の高発現が、MPNs発症にどう関与するかを明らかにしたことが、学術的に意義のある点である。さらに、CREB3L1の発現がMPNsの診断や予後予測に有用である可能性を示し、CREB3L1の発現を抑制すると腫瘍細胞が死滅することを明らかにしたことから、CREB3L1がMPNsにおける新たな診断マーカーや治療標的ともなり得るため、臨床的にも非常に価値があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of hematopoietic malignancies in which somatic mutations occur in hematopoietic stem/progenitor cells, resulting in an abnormal increase in blood cells and fibrosis of the bone marrow. In this study, we analyzed the clinical significance of the CREB3L1 gene, which specifically expresses on platelets derived from patients with MPNs, and its impact on the development of MPNs. Analysis of platelet-derived RNA from patients with MPNs suggested that the CREB3L1 gene may be a clinically valuable gene that can be used not only for the diagnosis but also for prognosis prediction of MPNs. Furthermore, a series of analyses using CD34-positive cells isolated from the peripheral blood of patients with MPNs demonstrated that the CREB3L1 gene is required for tumor cell differentiation and survival in MPNs.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 小胞体ストレス応答因子 本態性血小板血症 血小板 巨核球

1. 研究開始当初の背景

本態性血小板血症 (essential thrombocythemia: ET) は、造血幹細胞に体細胞変異が生じ、腫瘍性に巨核球が増加した結果、末梢血中の血小板数の異常な増加をきたす疾患である。これまでの研究により、ET を発症させるドライバー遺伝子変異として、巨核球造血を司るトロンボポエチン受容体を恒常的に活性化する、*JAK2* V617F、*CALR* exon9、*MPL* exon10 遺伝子変異が同定され、ET の病態解明が進められてきた。しかし、約 20% の ET 症例は、これらの遺伝子変異が陰性であり、triple-negative ET (TN-ET) として分類されている。TN-ET では、全エクソン配列解析を行っても、大部分の症例において遺伝子変異が見いだされず、腫瘍を裏付ける遺伝子変異マーカーが存在しない。

一方、いずれかのドライバー遺伝子変異が陽性の症例では、その種類によらず、血小板を産生する巨核球の分化や成熟を促進するトロンボポエチン受容体シグナル伝達経路が活性化していること、TN-ET 症例でも巨核球において同じシグナル伝達経路の異常な活性化が試験管内で観察できることから、すべての ET 症例に共通して、巨核球造血シグナル経路の腫瘍性の活性化が生じていることが考えられた。そこで、ドライバー遺伝子変異の種類に関わらず、ET における普遍的な遺伝子発現が存在するという仮説のもと、血小板中の遺伝子発現を解析し、*CREB3L1* を同定した。しかし、*CREB3L1* の正常造血や造血器腫瘍、血小板産生への関与を示唆する報告は、これまでのところ、皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、ET 患者の血小板中において特異的な発現亢進の見いだされる *CREB3L1* について、*CREB3L1* が ET において特異的に発現する分子基盤と、*CREB3L1* の ET 発症への関与を明らかにすることを目的とする。

CREB3L1 は、ET と同じドライバー遺伝子変異により発症する真性多血症 (polycythemia vera: PV) と原発性骨髄線維症 (primary myelofibrosis: PMF) 患者の血小板中でも高発現しており、*CREB3L1* の巨核球での発現亢進が、ET、PV、PMF を発症させるトロンボポエチン受容体の恒常的な活性化機構の下流に存在していることを示している。さらに、*CREB3L1* は、ストレス感受性の転写因子をコードしていることから、*CREB3L1* の発現は、サイトカイン受容体下流のシグナル伝達経路の恒常的な活性化により、細胞内に生じたストレスに適応するために惹起されたと考えることができる。これらのことから、本研究は、単なる腫瘍マーカーの発現制御機構の解明ではなく、「MPN における腫瘍化の新たな分子基盤を解明」することを最終的な目的とする。

3. 研究の方法

(1) *CREB3L1* 発現の臨床的意義

MPN における *CREB3L1* 発現の臨床的意義を明らかにするため、MPN 患者の臨床データ (患者来院時血算データ、ドライバー遺伝子変異の情報、予後・転帰に関する情報) を収集し、これらと *CREB3L1* の発現量との関連性を調べた。

(2) *CREB3L1* を発現する細胞系譜同定

CREB3L1 の正常造血や造血器腫瘍、血小板産生への関与を示唆する報告は皆無であることから、健常者あるいは ET の血球における発現を明らかにした。末梢血中の細胞を表面抗原マーカーにより、さまざまな血球細胞に分画した上で mRNA を抽出し、定量 PCR 法を用いて、*CREB3L1* の発現を詳細に解析することで、*CREB3L1* の発現が生じている細胞集団を同定した。解析には、ET 患者と健常人ボランティアの末梢血を用いた。

(3) *CREB3L1* 遺伝子の ET 発症への関与

ET を発症させる *CALR* exon 9 変異遺伝子を発現するレトロウイルスベクターを、マウスの造血幹細胞に感染させ、放射線照射したマウスに移植して作出した ET モデルマウスを用いて、マウスの *Creb3l1* の発現が、血小板において特異的に亢進するか確認した。さらに、ET 患者初代細胞を用いて、*CREB3L1* に対する shRNA を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、*CREB3L1* の発現を抑制した時に、細胞の分化・増殖に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) *CREB3L1* 発現の臨床的意義

CREB3L1 が真に骨髄増殖性腫瘍 (MPN) 患者に特異的であるかを確認するため、定量的 PCR 法を用いて、MPN 患者における *CREB3L1* の発現量を、反応性血球増加の症例や健常人、他の造血器腫瘍である、慢性骨髄性白血病 (CML) と比較した。診断の確定のため、MPN 患者は、ドライバー変異である *JAK2*, *MPL*, *CALR* 変異のいずれかを有する症例を対象とした。245 例を解析した結果、全ての MPN 患者において *CREB3L1* の高発現を認めた一方で、対照群である反応性症例、CML、健常人では発現していないことがわかった (図 1)。

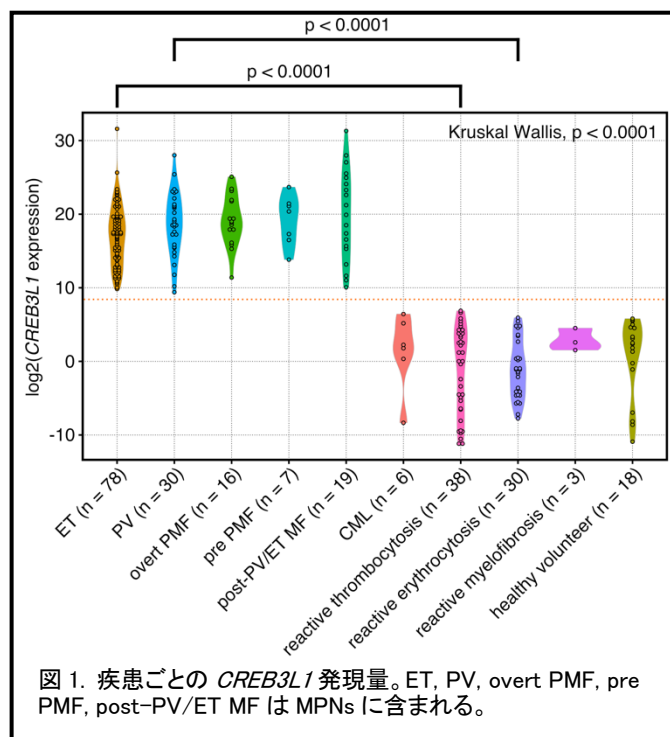


図 1. 疾患ごとの *CREB3L1* 発現量。ET, PV, overt PMF, pre PMF, post-PV/ET MF は MPNs に含まれる。

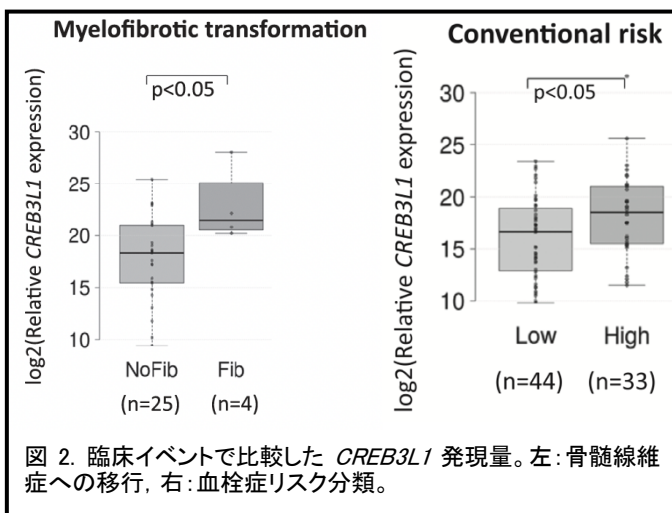


図 2. 臨床イベントで比較した *CREB3L1* 発現量。左: 骨髄線維症への移行, 右: 血栓症リスク分類。

MPN には、上述のドライバー変異すべてが陰性の症例 (トリプルネガティブ MPN) が 10~15%程度存在する。そこで、トリプルネガティブ MPN の症例 20 例を集め、*CREB3L1* の発現解析を行なったところ、*CREB3L1* を発現していない集団が存在し、その中には、経過観察中に血小板数が正常値まで減少する症例が複数例存在し、それらの血小板数減少後の骨髄は正常化しており、ET が否定された。一方、

CREB3L1 を発現する集団で血小板数が正常化するものは存在しなかった。次に、PV と ET の臨床

データと *CREB3L1* 発現量との関連性を調べたところ、血栓症の併発リスクと骨髄線維症への移行リスクの高さが、*CREB3L1* 遺伝子の発現量と正に相関することがわかった (図 2)。以上のことから、*CREB3L1* 遺伝子は、MPN の診断のみならず、予後予測にも利用可能な、臨床的に価値のある遺伝子である可能性が示唆された。

(2) *CREB3L1* 遺伝子を発現する細胞系譜同定

続いて、MPN 患者末梢血より血小板、リンパ球、顆粒球、白血球を分離し、それぞれにおける *CREB3L1* の発現を調べたところ、血小板でのみ、発現が見られた (図 3)。そこで、MPN 患者と対照群それぞれの骨髄生検から巨核球を分離して *CREB3L1* の発現を調べたところ、MPN 患者の巨核球のみ、*CREB3L1* の発現を認めたことから、MPN における *CREB3L1* の高発現は、巨核球系細胞に特異的であることがわかった。

さらに、*CREB3L1* は小胞体ストレス応答因子であることから、MPN 患者血小板由来 RNA 中の、*CREB3L1* 以外の小胞体ストレス応答因子の mRNA 発現量を調べた。その結果、*CREB3L1* とは逆に、健常者コントロールと比較し有意に減弱しており (図 4)、MPN 発症には、巨核球系細胞における *CREB3L1* の高発現が必要であることが推察された。

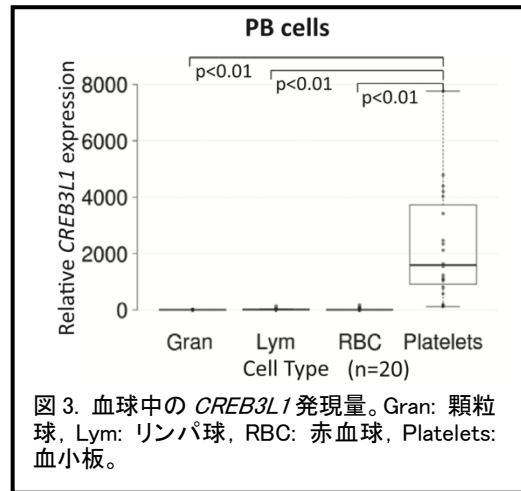


図 3. 血球中の *CREB3L1* 発現量。Gran: 顆粒球, Lym: リンパ球, RBC: 赤血球, Platelets: 血小板。

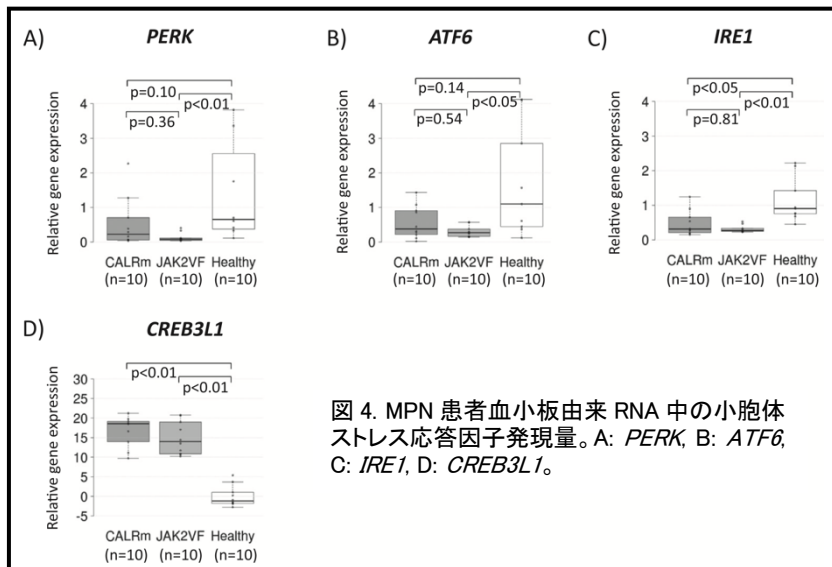


図 4. MPN 患者血小板由来 RNA 中の小胞体ストレス応答因子発現量。A: *PERK*, B: *ATF6*, C: *IRE1*, D: *CREB3L1*。

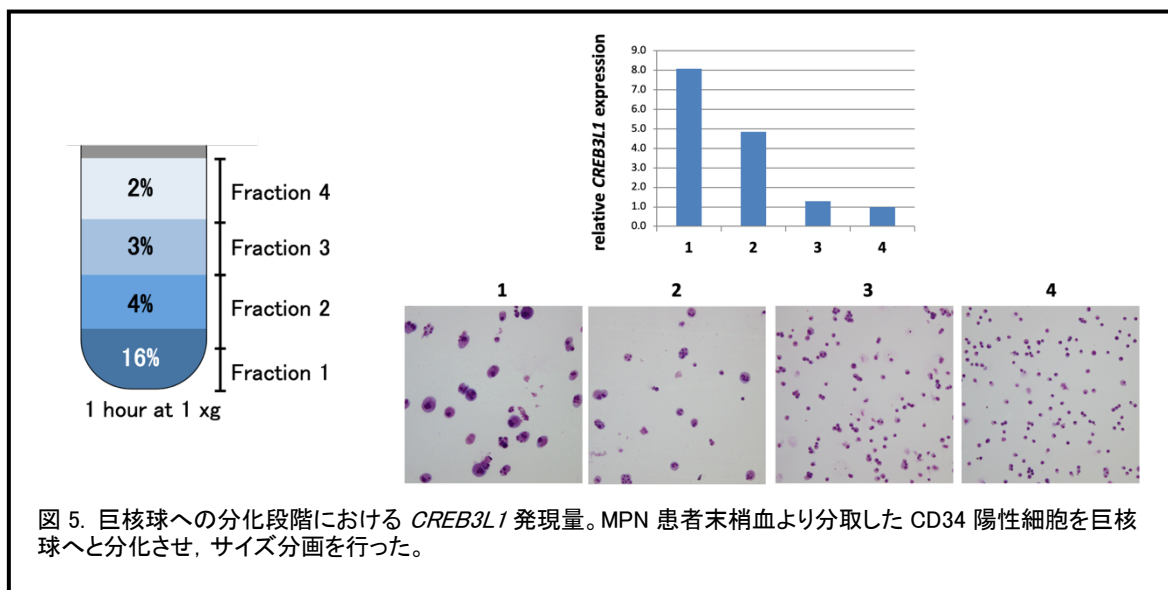


図 5. 巨核球への分化段階における *CREB3L1* 発現量。MPN 患者末梢血より分取した CD34 陽性細胞を巨核球へと分化させ、サイズ分画を行った。

(3) *CREB3L1* 遺伝子の ET 発症への関与

作出した MPN モデルマウスでは *Creb3l1* の高発現を再現できなかったため、患者初代細胞を用いて、*CREB3L1* の高発現が MPN の発症に与える影響を解析した。MPN 患者骨髓生検サンプルより磁気ビーズカラムを用いて CD34 陽性細胞を分取し、これを適切なサイトカインを用いて巨核球へと分化させ、密度勾配遠心法

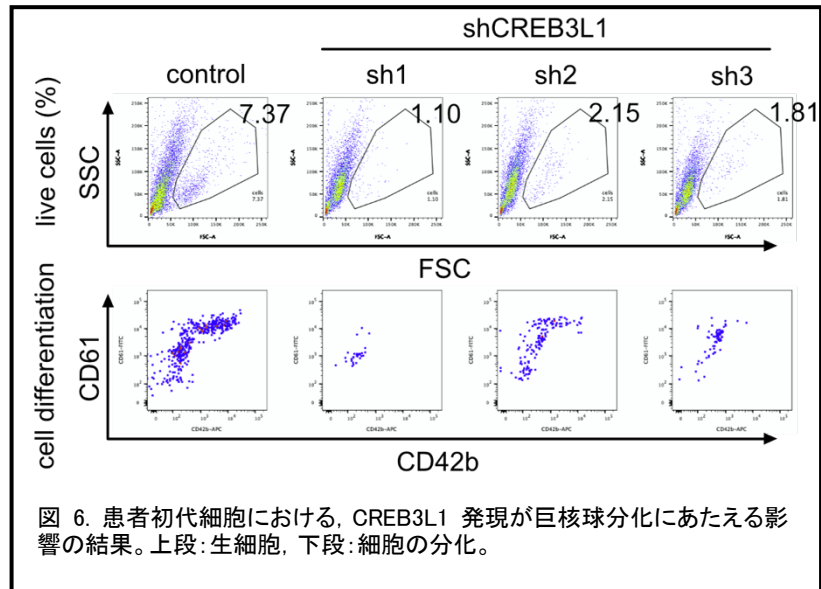


図 6. 患者初代細胞における、*CREB3L1* 発現が巨核球分化にあたる影響の結果。上段: 生細胞, 下段: 細胞の分化。

によりサイズ分画を行った。それぞれのフラクション (図 5 左、1~4) から回収した細胞中の *CREB3L1* 発現量を定量したところ、細胞が分化し、成熟するに応じて発現量が上昇することがわかった (図 5)。さらに、CD34 陽性細胞において、*CREB3L1* の発現を RNA 干渉法によりノックダウンし、細胞の巨核球系への分化をフローサイトメーターで解析したところ、細胞の生存率が低下し、ノックダウンされた細胞では CD61/CD42b 両陽性の成熟巨核球数が減少しており、細胞の分化が停止することがわかった (図 6)。以上の結果より、MPN における腫瘍細胞の成熟、増殖に *CREB3L1* の発現が必要であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 1件）

1. 著者名 OCHIAI Tomonori, MORISHITA Soji, KOMATSU Norio	4. 巻 32
2. 論文標題 Diagnosis of essential thrombocythemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Thrombosis and Hemostasis	6. 最初と最後の頁 370 ~ 375
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2491/jjsth.32.370	査読の有無 無
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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 De Marchi Federico, Okuda Maho, Morishita Soji, Imai Misa, Baba Terumi, Horino Mei, Mori Yosuke, Furuya Chiho, Ogata Satoko, Yang Yinjie, Ando Jun, Ando Miki, Araki Marito, Komatsu Norio	4. 巻 119
2. 論文標題 Clinical and biological relevance of CREB3L1 in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Leukemia Research	6. 最初と最後の頁 106883 ~ 106883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.leukres.2022.106883	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 Morishita Soji, Hashimoto Yoshinori, Furuya Chiho, Edahiro Yoko, Ochiai Tomonori, Shirane Shuichi, Inano Tadaaki, Yasuda Hajime, Ando Miki, Araki Marito, Komatsu Norio	4. 巻 110
2. 論文標題 Non driver gene mutation analysis in a large cohort of polycythemia vera and essential thrombocythemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Haematology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejh.13882	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 Furuya Chiho, Hashimoto Yoshinori, Morishita Soji, Inano Tadaaki, Ochiai Tomonori, Shirane Shuichi, Eda Hiro Yoko, Araki Marito, Ando Miki, Komatsu Norio	4. 巻 55
2. 論文標題 Reevaluation of cardiovascular risk factors for thrombotic events in 580 Japanese patients with essential thrombocythemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Thrombosis and Thrombolysis	6. 最初と最後の頁 263 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11239-022-02751-0	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 Mori Yosuke, Araki Marito, Morishita Soji, Imai Misa, Eda Hiro Yoko, Ito Masafumi, Ochiai Tomonori, Shirane Shuichi, Hashimoto Yoshinori, Yasuda Hajime, Ando Jun, Ando Miki, Komatsu Norio	4. 巻 12
2. 論文標題 Clinical features of acquired erythrocytosis: Low levels of serum erythropoietin in a subset of non neoplastic erythrocytosis patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1079 ~ 1089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4958	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 Okuda M, Araki M, Federico D, Morishita S, Imai M, Mori Y, Horino M, Ochiai T, Shirame S, Eda Hiro Y, Ando J, Komatsu N
2. 発表標題 Specific expression of CREB3L1 in megakaryocyte in myeloproliferative neoplasms
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Soji Morishita, Hajime Yasuda, Saya Yamawaki, Hideya Kawaji, Masayoshi Itoh, Yoko Eda Hiro, Misa Imai, Yasushi Kogo, Satoshi Tsuneda, Akimichi Ohsaka, Yoshihide Hayashizaki, Marito Araki, and Norio Komatsu
2. 発表標題 CREB3L1 Overexpression Can Reliably Discriminate Ph-MPNs From Reactive Cases
3. 学会等名 The 63rd American Society of Hematology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soji Morishita, Hajime Yasuda, Saya Yamawaki, Hideya Kawaji, Masayoshi Itoh, Yoko Edahiro, Misa Imai, Yasushi Kogo, Satoshi Tsuneda, Akimichi Ohsaka, Yoshihide Hayashizaki, Marito Araki, and Norio Komatsu
2. 発表標題 CREB3L1 overexpression as a novel diagnostic marker of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms
3. 学会等名 The 82nd Annual Meeting of Japanese Society of Hematology
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Soji Morishita, Yoko Edahiro, Yoshinori Hashimoto, Shuichi Shirane, Tomonori Ochiai, Kyohei Misawa, Tadaaki Inano, Yasutaka Fukuda, Yosuke Mori, Chiho Furuya, Marito Araki, Jun Ando, and Norio Komatsu
2. 発表標題 Distributions of typical non-driver mutations in essential thrombocythemia and polycythemia vera
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021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	森下 総司 (Morishita Soji) (10635866)	順天堂大学・医学部・特任助教 (32620)	
研究分担者	今井 美沙 (Imai Misa) (50709003)	順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教 (32620)	
研究分担者	荒木 真理人 (Araki Marito) (80613843)	順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授 (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
---------	---------