

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 13 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893047

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍の急性骨髄性白血病への進展機構の解明と新規治療法確立への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of transformation of myeloproliferative neoplasm into acute myelogenous leukemia for novel therapeutic strategy for the disease.

研究代表者

籠谷 勇紀 (KAGOYA, YUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70706960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、造血器悪性腫瘍の1つである骨髄増殖性腫瘍で高頻度に見られるJAK2遺伝子のV617F変異によりもたらされる病態、とりわけ同疾患の発症、急性骨髄性白血病への進展機序を解明することを目的とした。具体的には骨髄増殖性腫瘍細胞から過剰分泌されるリポカリン-2という因子に注目し、その働きを解析した。まず、同因子はパラクライン作用により正常造血細胞にDNA損傷を誘導し、このことが遺伝子変異の蓄積、白血病発症に寄与していることを示した。さらに、リポカリン-2はDNA損傷に伴うp53経路の活性化により正常造血系を抑制することで、骨髄増殖性腫瘍の発症に寄与していることを示した。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to elucidate the pathogenesis of myeloproliferative neoplasm (MPN), one of the major hematological malignancies. We focused on JAK2V617F mutation frequently seen in MPN and analyzed its contribution to the incidence of MPN and the transformation of MPN into acute myelogenous leukemia (AML). We found that MPN cells abundantly secreted lipocalin-2. First, lipocalin-2 induced DNA damage in the neighbouring normal hematopoietic cells within MPN bone marrow in a paracrine manner, which could contribute to the progression of MPN into AML through accumulation of the genetic mutation. Moreover, we showed that lipocalin-2 suppressed normal hematopoiesis through inducing the DNA damage-induced apoptosis. Since proliferation of MPN clones were not affected by lipocalin-2, lipocalin-2 secretion resulted in the relative growth advantage of MPN clones over normal hematopoietic cells, which promoted the development of MPN.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 急性骨髄性白血病 JAK2V617F遺伝子変異 リポカリン-2 DNA損傷 p53 活性酸素

## 1. 研究開始当初の背景

(1)BCR/ABL 陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPN ; myeloproliferative neoplasm ) は主に JAK2V617F 変異による JAK-STAT 経路の恒常的活性化により発症し、真性多血症(polycythemia vera; PV)、本態性血小板血症(essential thrombocythemia; ET)、骨髄線維症(myelofibrosis; MF)などの病態を呈するが、経過とともに一部の症例で急性骨髄性白血病(AML ; acute myeloid leukemia) AML への急性転化が生じ、極めて予後不良な転帰をたどる。その頻度は PV, ET で 2-5%, MF で 20%と健常人と比較して高い[1]。白血病発症においては付加的遺伝子変異の獲得が重要であるため、MPN ではゲノムの不安定性亢進に伴い遺伝子変異が生じやすくなっていることが予想されているが、その詳細な機序はわかっていない。

(2)また、JAK2V617F 変異陽性の MPN からの AML 発症例において、白血病細胞の JAK2 変異を調べるとおよそ半数の症例でこの遺伝子変異が消失していることが報告されている[2,3]。すなわち、MPN 骨髄中に存在している JAK2 変異を持たない正常造血細胞クローンが MPN クローンと同程度の確率で AML への転化を来たすリスクを持つと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、MPN から AML への急性転化のメカニズムを解明し、その進展を予防的に抑制する治療開発へつなげることを目的とする。特に、上記の MPN において高頻度に見られる JAK2V617F 遺伝子変異陽性例から進展した AML の約半数例で JAK2 変異が陰性となっているという報告に着目し、JAK2 変異陽性細胞が何らかの変異原性物質を分泌し、パラクライン作用により自身の細胞のみならず周囲の正常骨髄細胞の DNA 損傷を引き起こし、白血病進展への遺伝子変異を引き起こすという仮説を立て、その詳細な分子

機序の解明と、将来的な臨床応用を視野に入れた抑制効果の検証を行うことを目的とする。具体的には、まずマウス MPN モデルを用いて DNA 損傷応答の有無を観察し、その後 JAK2V617F 陽性細胞の遺伝子発現プロファイル解析をもとに変異原性物質を同定する。さらに同因子の作用機序、MPN における役割の解明についても研究を進める。

## 3. 研究の方法

(1)MPN モデルについては、レトロウイルスにより JAK2V617F をマウスの骨髄細胞に導入し、これを同系のマウスに移植することで作成する。同マウスの骨髄中の造血細胞をコントロールの骨髄細胞と比較し、DNA 損傷の程度をヒストン H2 のセリン 139 番のリン酸化(H2AX)により評価する。詳細な in vitro での実験には、JAK2V617F をマウスの骨髄球系細胞株の 32D 細胞に導入して解析を進める。

(2)変異原性物質の同定は、公表されているマイクロアレイデータを用いて候補遺伝子を抽出する。これらの遺伝子について、shRNA ウイルスベクターを作成し、その DNA 損傷に関する効果についての解析を進める。

(3)DNA 損傷を引き起こす物質を同定後、マウスモデルを用いて白血病発症の予防効果を検証する。また MPN 患者検体を用いて、同因子の分泌能、白血病発症リスクとの関連性についても検証を行う。

## 4. 研究成果

(1)方法で記載したように、JAK2V617F をマウスの骨髄細胞に導入し、これを同系のマウスに移植することで作成する MPN モデルマウスの骨髄細胞の DNA 損傷を観察した。JAK2V617F ウイルスベクターには GFP 蛍光がつけられており、JAK2V617F の入っている細胞とそうでない細胞を区別することができる。図 1 に示すように、JAK2V617F 導入骨髄細胞では、GFP 陽性(MPN 細胞)、陰性(正常骨髄細胞)双方において、H2AX の増加が見られた。すなわち、JAK2V617F 陽性細胞による何らかのパラクラ

イン作用により周囲の正常骨髄細胞の DNA 損傷が引き起こされていることが示唆される。

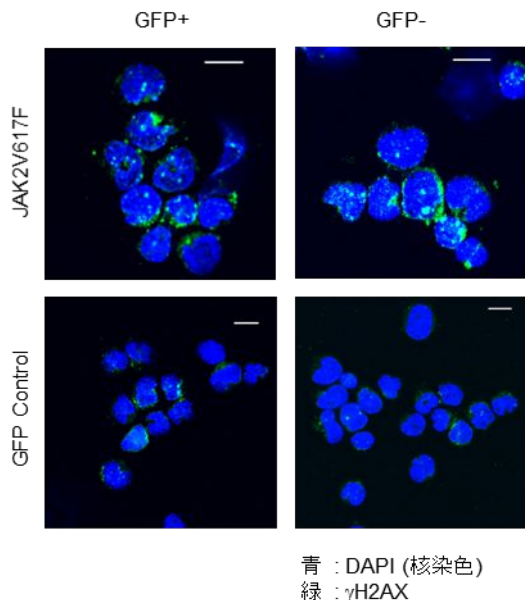


図 1. 免疫蛍光染色によるマウス骨髄細胞内の DNA 損傷の観察

(2) 既存のマイクロアレイデータを用いて、JAK2V617F 導入細胞で発現上昇が見られる遺伝子のうち、液性因子をコードする遺伝子を抽出した。図 2 のように、8 種類の候補遺伝子が得られた。

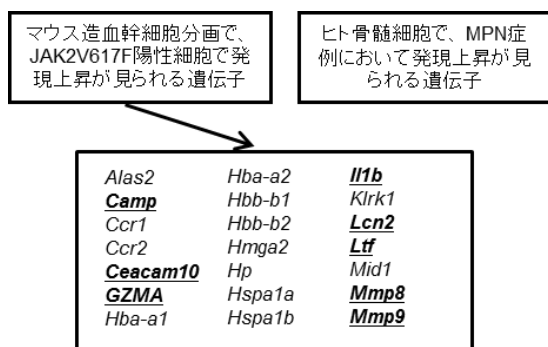


図 2. DNA 損傷に関わる候補遺伝子の探索

(3) これらの遺伝子に対する shRNA ウイルスベクターを作成し、32D 細胞株に JAK2V617F とともに各々を導入した。JAK2V617F 陽性 32D 細胞では、同細胞の培養上清が元の 32D 細胞に H2AX の増加を引き起こす効果を獲得し、

マウス MPN モデルと同様にパラクライン作用による DNA 損傷が見られる。上記の遺伝子のうち、リポカリン 2 (*Lcn2*) の発現をノックダウンすると、図 3 に示すように、H2AX が減少し、同因子がパラクライン作用による DNA 損傷を担っていることがわかった。

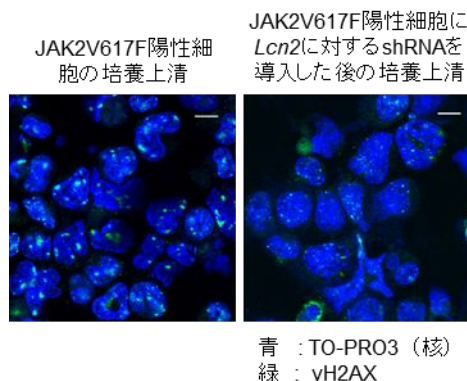


図 3. リポカリン 2 による DNA 損傷効果の確認

(4) さらにリポカリン 2 の DNA 損傷を引き起こすメカニズムについて解析を進めたところ、細胞内の鉄濃度の亢進に伴う活性酸素の上昇によることが示唆された。図 4 に示すように、リポカリン 2 を外的に投与すると細胞内の活性酸素が上昇するが、鉄キレート剤を共投与すると、その効果がキャンセルされた。

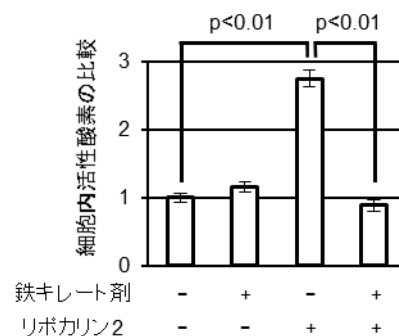


図 4. リポカリン 2 による細胞内鉄、活性酸素の上昇

(5) 正常細胞では リポカリン 2 により DNA 損傷、これに伴う p53 経路の活性化、アポトーシスの亢進が観察されたが、これとは対照的に、JAK2V617F 陽性細胞では p53 経路の活性化が弱く、アポトーシスが見られなかった。このためリポカリン 2 投与によっても、

JAK2V617F 陽性細胞では in vitro でのコロニー形成能の低下は見られなかった。すなわち、リポカリン 2 に対する反応性に違いが見られた(図 5, 図 6)。

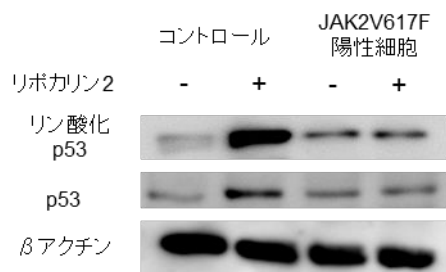


図 5. リポカリン 2 による p53 経路活性の比較

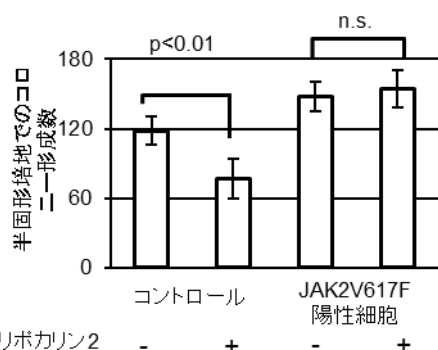


図 6. マウス骨髄細胞における、リポカリン 2 投与下でのコロニー形成能の比較

(6)上記の結果をヒト細胞でも確認するため、MPN 患者由来骨髄細胞のコロニー形成能をリポカリン 2 投与の有無で比較したところ、コントロール骨髄細胞ではコロニー数の減少が見られたが、MPN 細胞ではこれが見られなかった。すなわち、マウスモデルと同様、リポカリン 2 に対する反応性の違いが確認された。従って同因子はパラクライン作用による DNA 損傷を介して、正常造血を抑制することで、MPN 骨髄細胞の相対的な増殖に寄与していると考えられる。

<引用文献>

1. Abdel-Wahab O, Manshour T, Patel J, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic

myeloproliferative neoplasms to leukemias. Cancer Res. 2010;70:447-452.

2. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. Blood. 2010;115:2891-2900.

3. Theodorides A, Boissinot M, Girodon F, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. Blood. 2007;110:375-379.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S, Kurokawa M. JAK2V617F+ myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. Blood. 2014; 124(19): 2996-3006. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2014-04-570572.

[学会発表](計3件)

55th ASH Annual Meeting and Exposition Yuki Kagoya et al. JAK2V617F Mutation Evokes Paracrine DNA Damage To Adjacent Normal Cells Via Secretion Of Lipocalin-2. December 7-10, 2013, New Orleans, USA

第76回日本血液学会学術集会

籠谷勇紀 他 JAK2V617F mutation evokes paracrine DNA damage to adjacent cells and drives leukemic transformation. 2013年10月11-13日、札幌

第72回日本癌学会総会

籠谷勇紀 他 JAK2V617F mutation evokes paracrine DNA damage to adjacent cells and drives leukemic transformation. 2013年10月3-5日、横浜

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.u-tokyo-hemat.com/research\\_research/onbun.html](http://www.u-tokyo-hemat.com/research_research/onbun.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

籠谷 勇紀 (KAGOYA, Yuki)

東京大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内

科 助教

研究者番号：70706960

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：