

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 28 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860720

研究課題名(和文) Hmga2トランスジェニックマウス等を用いた骨髄増殖性疾患の病態解明

研究課題名(英文) The role of HMGA2 in the pathogenesis of HMGA2

研究代表者

植田 航希 (UEDA, KOKI)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80632190

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)：重症の骨髄増殖性腫瘍(MPN)の病態をマウスで再現し、治療法開発に繋げるため、MPN患者で最も多く認められる遺伝子変異であるJAK2V617F変異を持つトランスジェニックマウスと、我々の以前の研究でMPNの中で予後が最も悪い骨髄線維症で過剰発現していることが多いことが明らかになったHMGA2を高発現するトランスジェニックマウスを交配した。両遺伝子が導入されたマウスは、各々片方の遺伝子が導入されたマウスより強い表現型(白血球・血小板増多、貧血、脾腫など)を示し、数か月で死亡した。現在、こうした表現型を示す詳しい機序を解明中である。

研究成果の概要(英文)：To clarify if HMGA2 affect JAK2V617F+ hematopoiesis, we crossed HMGA2-overexpressing mice (Hmga2) with JAK2V617F Tg mice (JAK2VF) and obtained Hmga2-JAK2VF mice (double-Tg). At 3 months old, leukocytosis, thrombocytosis, anemia and splenomegaly were most severe in double-Tg compared with Hmga2 or JAK2VF. Hmga2 and JAK2VF survived for over a year, but all double-Tg died within 5 months. Lineage-Sca1+Kit+ cells were most frequent in double-Tg followed by Hmga2, indicating HMGA2 contributes to expansion of JAK2V617F+ hematopoietic stem cells (HSC). In competitive/serial transplants, Hmga2 and double-Tg cells steadily expanded, while JAK2VF cells were decreased and eventually rejected in 3rd transplant. Thus, HMGA2 may accelerate proliferative hematopoiesis harboring JAK2V617F with expanding MPN HSC. In fact, endogenous HMGA2 is upregulated in JAK2VF with conditional EZH2 KO (EZH2-/-JAK2VF).

研究分野：骨髄増殖性腫瘍

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 HMGA2

1. 研究開始当初の背景

BCR-ABL 融合遺伝子陰性の骨髄増殖性腫瘍 (MPN) においては、JAK2V617F 変異 (Nature 2005;434:1144-1148)・MPL515 変異 (Blood 2006;108:3472-3476)・JAK2 exon12 変異 (Leukemia 2007;21:1960-3) といった、JAK-STAT 系の恒常的活性化を介して細胞増殖を促進させる変異が明らかになった。しかし近年、JAK2 が細胞質だけでなく核内にも存在し、JAK-STAT 系非依存的にヒストン H3Y41 のリン酸化を惹き起こして HP1 を解離させること、JAK2 変異によってこのリン酸化が恒常的に生じると Imo2 など癌遺伝子が活性化することが示された (Nature 2009;461:819-822)。また、MPN 症例の中に STAT3 や STAT5 のリン酸化を認めない症例が存在する (Leukemia 2008;22:1828-1840)。以上より、JAK-STAT 系の活性化のみでは説明できない MPN の発症機序が存在すると考えられている。実際、JAK2V617F 陽性の症例から JAK2V617F 陰性クローン由来の急性骨髄性白血病 (AML) が発生することも少なくない (Blood 2007;110:375-379) 上に、JAK2V617F knock-in マウスにおいて、競合的造血再構築アッセイでの JAK2V617F 陽性細胞クローンの再構築能は正常造血幹細胞とほぼ同程度に留まったことが報告されている (Cancer Cell 2010;17:584-596)。したがって、MPN においては JAK2 や MPL の変異に加えて、変異陽性クローンを拡大させるのに寄与する他の因子が存在していることが予想される。そうした因子として、前述の変異した JAK2 そのものによって引き起こされる癌遺伝子の活性化以外にも、TET2 (N Engl J Med 2009;360:2289-2301)・ASXL1 (Leukemia 2009;23:2183-2186)・EZH2 (Nat Genet 2010;42:722-726) などエピゲノムやその調節に關与する因子の異常が明らかになってきた。これに加えて、転写調節因子である HMGA2 の過剰発現がこれまで JAK2V617F 陽性・陰性双方の MPN 症例において報告されている (Genes Chromosomes Cancer 2004;39:82-87・Leukemia 2005;19:245-252、他)。

2. 研究の目的

JAK2 変異を始めとする JAK-STAT 系の活性化を惹起する因子以外の MPN 発症機序が徐々に明らかになってきたが、それらが JAK2 変異とどのように協調し、病態に寄与しているのかはほとんど明らかになっていない。これらを明らかにすることで、JAK2 に続く新たな MPN の治療標的を見出すことを目的として、申請者は研究を計画した。

3. 研究の方法

Hmga2 過剰発現と JAK2V617F 変異の重複によって、MPN クローンの拡大が惹起され、それが MPN の重症化や骨髄の線維化、白血病への進展などにつながるかを、マウ

スモデルを用いて検討する。

Hmga2 は胎生期造血系や神経系において Ink4a-Arf の抑制などを介して細胞増殖に必須の役割を果たしていることが知られているが、成人においては発現が抑制され、過剰発現すると癌化に寄与すると考えられている (Cell 2008;135:227-239) (Nature Cell Biol 2013;15:916-925)。申請者は、HMGA2 過剰発現が JAK2V617F 陽性 MPN 症例において高頻度に生じている点に着目し、Hmga2 の転写が恒常的に活性化したトランスジェニックマウス (Hmga2-Tg マウス) (Blood 2011;117:5860-5869) を用いて MPN における変異クローン拡大の機序を解明することを計画した。Hmga2-Tg マウスは単独でも MPN 様の病態を示すが、長期にわたって生存すること、STAT5 のリン酸化を認めないことなど、これのみで MPN の病態を説明することはできない。しかし、Hmga2-Tg マウス造血細胞は正常造血幹細胞に対して growth advantage を示すことから、JAK2V617F 変異単独では生じない MPN クローンの拡大に寄与している可能性が高いと考えている。Hmga2-Tg マウスと JAK2 V617F トランスジェニックマウス (JAK2-V617F-Tg マウス) (Leukemia 2008;22:87-95) を交配させ、ダブルトランスジェニックマウス (Hmga2+JAK2V617F+マウス) を作成し、JAK2-V617F-Tg マウスと比較して造血再構築能が向上しているか、MPN 発症までの期間と生存期間に差が生じるか、二次性の骨髄線維化や AML への進展を認めるか、などを解析し、JAK2 変異に Hmga2 過剰発現が加わることがクローン拡大に有利に働くことを示す。

MPN 症例において Hmga2 の高発現を惹起

する未知の機序を解明する。

Hmga2 の発現制御機構は主に 2 種類報告されている。Hmga2 は microRNA である let7 によって抑制的に制御されており、Hmga2 遺伝子の 3' UTR の let7 結合領域の欠損によって過剰発現が生じることが報告されている (Science 2007;315:1576-1579)。さらに JAK2 の mutation status (allele burden) が Hmga2 の発現量と相関するという報告もあり (Stem Cells 2007;25:165-173)、これについては所属予定研究室の別の研究者が臨床検体を用いて検討中である。MPN 症例においては、Hmga2 遺伝子の 3' UTR 欠損や let7 の発現低下を示さなくても、Hmga2 の発現が上昇している症例が多数存在するため (未発表データ)、これ以外の発現調整機構も關与していることが示唆される。最近マウスモデルにおいて、Ink4a/Arf-null の環境ではポリコム群遺伝子である Bmi1 や EZH2 の欠損によって Hmga2 の過剰発現が誘導されることが示された (J Exp Med 2012;209:445-454)。Ink4a/Arf の欠損は MPN を始めとする多くの骨髄系腫瘍で知ら

れており(Oncogene 2002;21:3475-95)、さらに前述のように MPN 症例において報告されている EZH2 の loss-of-function type の変異が重複して生じれば、Hmga2 の発現上昇を介して MPN の発症につながる事が予想される。よって、ポリコム複合体 (PRCs) による Hmga2 の発現制御が実際の症例において生じているか否かを、Ink4a/Arf の発現状態と合わせて検証することを計画した。

4. 研究成果

JAK2V617F トランスジェニックマウス (JAK2-Tg) と HMGA2 を交配して JAK2V617F × HMGA2 ダブルトランスジェニックマウス (double-Tg) を作製し、その表現型を同腹の HMGA2 や JAK2-Tg と比較する研究を進めてきた (平成 26・27 年度若手 B 研究課題)。その結果、HMGA2 や JAK2-Tg は脾腫や血球増多をきたすものの野生型と同等の期間生存するのに対して、double-Tg は出生後 12 週で 3g を超える巨大脾腫をきたし、末梢血白血球も平均 15 万/μL 程度まで達して 12-16 週ですべて死亡した。フローサイトメトリーを用いた骨髓造血細胞の解析では、造血幹細胞分画を示す LSK 細胞の比率は、JAK2-Tg は野生型と同程度であり (平均 0.17%)、HMGA2 ではわずかに増加していた (0.19%) が、double-Tg では大幅に増加していた (0.27%)。また、これらの Tg マウス (Ly5.2) の骨髓細胞と Ly5.1 野生型マウスの骨髓細胞を 1 対 1 で混合し、致死量放射線照射した Ly5.1 マウスをレシピエントとして競合的骨髓移植を行ったところ、HMGA2 および double-Tg の細胞は野生型細胞より有意に比率が増加し、JAK2-Tg の細胞比率は徐々に減少した。他施設からの報告でも、JAK2V617F は造血幹細胞機能を障害し、競合的移植では徐々にクローンが減少することが示されている (Blood 2010;116:1528-1538) が、我々の実験から考えると、HMGA2 の高発現が共存することで JAK2V617F による造血幹細胞機能の障害を補うほどの幹細胞分画の増加をきたし、過剰な血球を産生し続ける幹細胞プールとして機能することが、病勢の増悪に寄与していると考えられた (以上、2015 年米国血液学会で口演発表決定 #482)。先行研究および我々のこれまでの研究で、HMGA2 は多くの MPN 症例で高発現しており、幹細胞分画の増加を介して MPN の増悪に寄与していることがわかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

2015 (57th) American Society of

Hematology (ASH) Annual meeting and Exposition, Orland, FL, Dec7(5-8), 2015, Oral (#482)

Expression of HMGA2 Collaborates with JAK2V617F to Progress Myeloproliferative Neoplasms

Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Akiko Shichishima, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Yuko Hashimoto, Philip J Mason, Monica Bessler, Yasuchika Takeishi

Blood 126 (23): 482; 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

植田 航希 (UEDA KOKI)
福島県立医科大学 循環器・血液内科学講座 助教
研究者番号：80632190

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

