

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860738

研究課題名(和文) 骨髄線維症における難治性病態の分子メカニズム解明とその克服

研究課題名(英文) Molecular mechanism of treatment-resistant symptoms in myelofibrosis

研究代表者

幣 光太郎 (Shide, Kotaro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：20468028

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)：予後不良の腫瘍性疾患である骨髄線維症の治療には、近年チロシンキナーゼJAK2を標的とするJAK2阻害薬が使用可能となり成果を上げている一方、JAK2阻害薬抵抗性の以下の難治性病態が注目されている。本研究では、(1)骨髄線維化の分子メカニズム、(2)貧血、阻害薬に対する耐性獲得におけるTYK2の役割、(3)エピゲノム遺伝子異常共存による病態修飾について骨髄線維症モデルマウスを用い検討し明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For the treatment of primary myelofibrosis and post-PV, post-ET myelofibrosis, the small molecule inhibitors of JAK2 have shown a remarkable therapeutic effect. The drugs are very effective in splenomegaly and constitutional symptoms, on the other hand have no effect on bone marrow fibrosis and anemia. In this study, we studied the molecular mechanisms of these refractory symptoms using JAK2 V617F transgenic mice. (1) Bone marrow fibrosis: We identified that JAK2 mutation activates MEK-ERK1/2 pathway downstream of MPL and may contribute to TGF- β 1 overproduction, causing bone marrow fibrosis via transcriptional enhancement of USF1, and MEK inhibition improve bone marrow fibrosis. (2) Anemia and drug resistance: We showed that TYK2 defects does not affect the anemia or inhibitor resistance of the transgenic mice. (3) The role of epigenetic abnormality: We identified that loss of TET2 accelerates the degree of malignancy and sustains MPNs in combination with JAK2V617F.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄線維症

1. 研究開始当初の背景

骨髄線維症(myelofibrosis:MF)の予後は不良であり、新規治療法の開発が切望されている。MFで活性化しているチロシンキナーゼ JAK2 を標的とする JAK2 阻害薬の臨床試験では、画期的治療効果が認められた一方、JAK2 阻害薬に抵抗性の難治性病態も明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、MF モデルマウスを用いて MF の難治性病態の分子メカニズムを明らかにし、克服のための新規治療標的を同定する。以下の3つテーマについて研究を実施した。

- (1)骨髄線維化のメカニズム解明と治療標的の同定
- (2)TYK2 の機能解析による貧血・JAK2 阻害剤耐性機序の解明
- (3)エピゲノム異常が JAK2 標的治療に与える影響の解明

3. 研究の方法

- (1)骨髄線維化のメカニズム解明と治療標的の同定：
MF マウスモデルである JAK2V617F トランスジェニックマウスの解析から MPL シグナルの下流にある線維化の中心的メカニズムを同定し、細胞株やマウスモデルを用いてその治療標的としての意義を検証する。
- (2)TYK2 の機能解析による貧血・JAK2 阻害剤耐性機序の解明：
JAK2 変異と協調して貧血や耐性の誘導に関わると考えられている TYK2 について、JAK2 変異/TYK2 欠損マウスを作成し、貧血が改善するかどうか、JAK2 阻害薬への耐性が変化するかどうかを生体内で解明する。
- (3)エピゲノム異常が JAK2 標的治療に与える影響の解明：
JAK2 変異/TET2 欠損マウスを用い、エピゲノム異常が JAK2 変異マウスの病態へ与える影響を明らかにする。JAK2 阻害薬治療に与える影響について明らかにする。

4. 研究成果

- (1)骨髄線維化のメカニズム解明と治療標的の同定：
平成 26 年度は MF で高頻度に見られる JAK2V617F 変異が MAPK 経路を介して転写因子 USF1 の転写能亢進し、骨髄線維化のキーマルである TGFβ1 の過剰産生を誘導していることを明らかにした。

平成 27 年度は MF マウスモデルにおいて、MAPK 経路の標的治療が JAK2 阻害薬抵抗性の線維化を改善することを明らかにした。

- (2)TYK2 の機能解析による貧血・JAK2 阻害剤耐性機序の解明：

TYK2 が貧血の誘導、耐性獲得に関与しているという仮説のもとに、JAK2 変異マウスと JAK2 変異/TYK2 欠損マウスの表現型比較をおこなった。

平成 26 年度は、JAK2V617F 発現マウスと TYK2 KO マウスを交配して 2 重変異マウスの作成と繁殖に成功した。

平成 27 年度は、JAK2 変異マウスと JAK2 変異/TYK2 欠損マウスを用いて、表現型、JAK2 阻害薬反応性、を比較した。TYK2 の欠損は JAK2V617F 発現マウスの貧血に影響を与えなかった。JAK2 阻害薬に対する反応性については、投与 8 週間までの短期の反応性については、両マウスに差を認めなかった。現在長期投与における反応性の違いについて解析を進めており、平成 28 年秋までには明らかにできる見込みである。

- (3)エピゲノム異常が JAK2 標的治療に与える影響の解明：

平成 26 年度には、JAK2V617F トランスジェニックマウス(TG マウス)と TET2 低発現マウスを交配して 2 重変異マウスを作成し、TG マウスの表現型と比較した。TG マウスと野生型マウスの細胞を混ぜて移植すると、1 次移植マウスは MPN を発症するが、2 次移植マウスは末梢血や HSC 分画における TG マウス細胞のキメリズムが著減し、MPN を発症しない。一方で興味深いことに、JAK2/TET2 の 2 重変異マウス細胞で同じ移植実験を行うと、2 次移植マウスにおいても 2 重変異細胞のキメリズムは保たれ、MPN が発症する。試験管内で骨髄細胞を継代する replating assay でも、TG マウス細胞は野生型細胞と比較し継代能が低下していたが、2 重変異細胞は長期継代が可能であった。つまり、TET2 の異常は、JAK2 変異単独では早期に低下する異常 HSC の自己複製能を増強し、長期の維持に寄与している可能性がある。

一方、JAK2/TET2 の 2 重変異マウスは、TG マウスと比べて血球増多や臓器腫大が高度であり、生存期間が短縮した。エピゲノム異常は異常 HSC の維持だけでなく血球の分化・増殖も増強し MPN の病態を増悪させている可能性がある。

本研究期間内には、JAK2 阻害薬に対する反応性の解析までは終了しなかった。

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 10 件)

1. 亀田拓郎、幣光太郎
骨髄増殖性腫瘍における TET2 欠損の意義
血液内科, 72:220-224, 2016 [査読無]
2. Kameda T, Shide K, Yamaji T, (他 22 名, 2 番目).
Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator.
Blood, 125:304-15, 2015[査読有]
doi: 10.1182/blood-2014-04-555508.
3. Kameda T, Shide K, Yamaji T, (他 17 名, 2 番目).
Gene expression profiling of loss of TET2 and/or JAK2V617F mutant hematopoietic stem cells from mouse models of myeloproliferative neoplasms.
Genomics Data, 4:102-108, 2015 [査読有]
doi:10.1016/j.gdata.2015.04.002
4. Shide K, Kameda T, Shimoda K.
Functional analysis of TET2 using a knockdown mouse model.
Rinsho Ketsueki, 56:657-665, 2015[査読無]
doi:10.11406/rinketsu.56.657
5. Kameda T, Shide K, Shimoda K.
Genetic and epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms.
Rinsho Ketsueki, 56:614-622, 2015[査読無]
doi:10.11406/rinketsu.56.614
6. Shide K.
Molecularly pathogenesis and molecular targeted therapy for myeloproliferative neoplasms.
Rinsho Ketsueki, 56:150-158, 2015[査読無]
doi:10.11406/rinketsu.56.150
7. 幣光太郎、下田和哉
骨髄線維症におけるドライバー変異の臨床的意義
血液内科, 71:511-515, 2015 [査読無]
8. 幣光太郎、下田和哉
Beyond JAK2 inhibitors
血液内科, 70:171-175, 2015 [査読無]
9. 幣光太郎、亀田拓郎
骨髄増殖性腫瘍の異常造血幹細胞

血液フロンティア, 24:1005-1013, 2014
[査読無]

10. 幣光太郎
MPN の分子病態解明研究の進歩
血液内科, 69:214-220, 2014 [査読無]

[学会発表](計 6 件)

1. Ueda K et al.
Expression of HMGA2 Collaborates with JAK2V617F to Progress Myeloproliferative Neoplasms.
American Society of Hematology 57th annual meeting, 2015-12-7, Orlando FL(米国)
 2. Shide K et al.
Therapies targeting the MAPK pathway improve bone marrow (BM) fibrosis induced by JAK2V617F.
第 77 回日本血液学会, 2015-10-16, ホテル金沢(石川県金沢市)
 3. Wakahashi K et al.
SMA+ macrophages skewed from HSCs by vitamin D3 initiate myelofibrosis with osteosclerosis.
第 77 回日本血液学会, 2015-10-17, 石川県立音楽堂(石川県金沢市)
 4. Shide K et al.
Therapies Targeting the MAPK Pathway Improve Bone Marrow (BM) Fibrosis Induced by JAK2V617F.
American Society of Hematology 56th annual meeting, 2014-12-7, San Francisco CA(米国)
 5. Kameda T, Shide K et al.
Loss-of-TET2 induces clonal expansion of JAK2V617F mutant stem/progenitor cells and initiates MPNs.
第 76 回日本血液学会, 2014-10-31, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
 6. Shide K et al.
CALR mutation and clinical correlates in myeloproliferative neoplasms.
第 76 回日本血液学会, 2014-10-31, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)
- [図書](計 1 件)
1. 亀田拓郎、幣光太郎.
Annual Review 2016 血液 高久史磨, 小澤敬也, 金倉讓, 小島勢二, 矢富裕編.
中外医学社, 2016, p80-85

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

1. 名称：骨髄線維化の抑制剤
発明者：幣光太郎、下田和哉
権利者：宮崎大学
種類：特許
番号：特願 2015-016390
出願年月日：2015 年 1 月 30 日
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

名称：該当なし
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
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

幣 光太郎 (SHIDE, Kotaro)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：20468028

(2) 研究分担者

該当なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

亀田 拓郎 (KAMEDA, Takuro)
宮崎大学・医学部・医員
研究者番号：30468029