

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 12 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591197

研究課題名（和文） 骨髄増殖性疾患における骨髄内低酸素環境破壊と正常造血制御機構の解明

研究課題名（英文） Hypoxia attenuates growth of MPN cells through suppression of SHP-2 expression and subsequent inhibition of JAK2V617F activity

研究代表者

桐戸 敬太 (KEITA KIRITO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：90306150

研究成果の概要（和文）：

JAK2V617F 変異を有する MPN 細胞株を低酸素環境下で培養することにより、JAK2V617F の活性が抑制され、細胞の増殖が抑制されることを見出した。また、この過程には SHP-2 の発現抑制が関与していることが分かった。低酸素環境では、このようなメカニズムにより MPN 細胞の増殖に影響を及ぼすこと、またこのために JAK2 阻害剤などの治療戦略には再検討が必要であることも示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We found that hypoxia suppressed activity of JAK2V617F and induced growth arrest in JAK2V617F-positive MPN cells. SHP-2 plays important roles in these process. Interestingly, several studies have reported that SHP-2 is required for the activation of JAK2 by cytokines. In addition, recent studies have revealed that the activity of SHP-2 is increased in platelets from MPN patients. In conclusion, hypoxic environment may modulate fate of JAK2-positive MPN cells through suppression of SHP-2 levels and subsequent suppression of JAK2V617F activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍、JAK2V617F、SHP-2

1. 研究開始当初の背景

慢性骨髄増殖性腫瘍においては、骨髄内の過剰な血管新生をきたす。このため、正常造血に必要とされる骨髄内の低酸素ニッチが破

壊されることが正常な造血が抑制され、JAK2V617F 陽性クローンが選択的に増加することを予想した。

2. 研究の目的

低酸素環境において、JAK2V617F 陽性細胞がどのような生化学的・生物学的な影響を受けるかについて解析を進めた。

3. 研究の方法

- (1) JAK2V617F を発現する白血病細胞株である HEL および SET-2 細胞を用いた。
- (2) また、書面にて同意を得た後、真性赤血球増加症症例の瀉血治療時の末梢血検体より単核球を分離した。
- (3) JAK2 の発現レベルおよびリン酸化レベル、SHP-2 の発現レベルについてはウェスタンブロット法を用いて解析した。
- (4) 赤芽球コロニーアッセイには methocult を用いている。

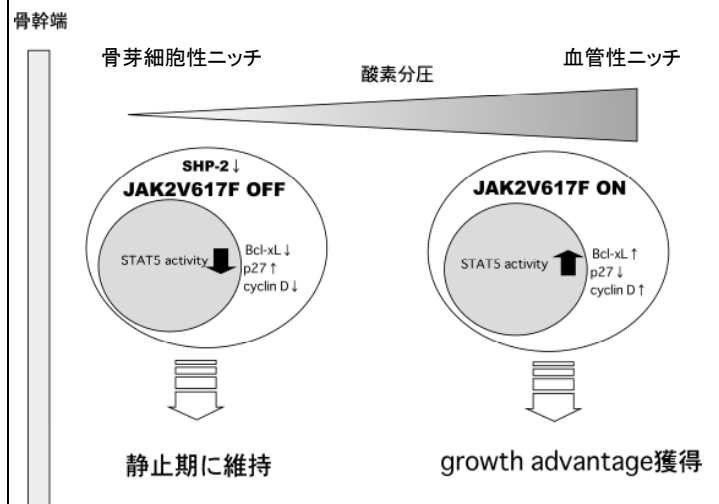
4. 研究成果

- (1) 低酸素状態において JAK2V617F の自己リン酸化および下流のシグナルの活性化は低下する。JAK2V617F を有する細胞株、HEL および SET-2 について骨髄内の造血幹細胞ニッチにおける酸素分圧に近い 1%O₂ 環境下で培養すると、JAK2V617F の自己リン酸化が抑制されることがわかった。また、下流の代表的な分子である STAT5 の恒常的リン酸化も経時的に抑制されていた。
- (2) 1%O₂ 環境下での培養により、HEL 細胞は Bim の発現増強と Bcl-xL の発現低下をきたし、アポトーシスが誘導された。
- (3) 一方、SET-2 細胞では p27/Kip の発現増加と Cyclin D2 の発現低下を認め、G₀/G₁ 期への細胞周期停止が認められた。
- (4) 真正赤血球増加症症例の瀉血後の末梢血より、単核球を分離し、エリスロポエチン非存在かでコロニー形成を行ったところ、低酸素環境下ではコロニー形成が有意に抑制された。
- (5) 低酸素環境下では、JAK2 の活性化に必要とされる SHP-2 の発現レベルが低下した。一方、SHP-2 の阻害剤を用いることにより JAK2V617F のキナーゼ活性が抑制された。このため、低酸素環境下では SHP-2 の発現が抑制されることにより、JAK2V617F のキナーゼ活性が低下するこ

とが予想された。

- (6) 低酸素環境下における SHP-2 の発現低下は真性赤血球増加症症例の末梢血単核球細胞においても確認された。

以上より、低酸素環境では SHP-2 の発現が低下し、JAK2V617F の恒常的な活性が低下することが想定された。骨髄内において造血幹細胞の維持に関わる領域である、いわゆるニッチは低酸素環境にあるとされる。このため、JAK2V617F を有する異常な造血幹細胞も低酸素ニッチに存在している場合には JAK2V617F の活性は抑制された状態にあり、増殖アドバンテージはないと予想された。一方、酸素濃度の高い血管性ニッチでは JAK2V617F が活性化され、増殖のアドバンテージを獲得することが予想された。このため、MPN の骨髄内で血管新生が進行することにより、酸素濃度が上昇することにより、JAK2V617F 陽性の MPN 細胞はますます増殖アドバンテージが高くなることが予想される(下図)。



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6件)

- ①. Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, Tomiyama Y, Okamoto S, Kurokawa M, Kirito K, Yonemura Y, Mori S, Usuki K, Iwato K, Hashino S, Wei H, Lizambri R. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial. International Journal of Hematology. 2011;94:71-80. (査読有り)

- ②. Morishita S, Komatsu N, Kirito K, Koda AH, Sekiguchi Y, Tsuneda S, Noda N. Alternately binding probe competitive PCR as a simple, cost-effective, and accurate quantification method for JAK2V617F allele burden in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia Research*. 2011;35:1632-1636. (査読有り)
- ③. Qiao Q, Nozaki Y, Sakoe K, Komatsu N, Kirito K. NF- κ B mediates aberrant activation of HIF-1 in malignant lymphoma. *Exp Hematol*. 2010;38(12):1199-1208. (査読有り)
- ④. Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N. FOXO3A as a key molecule for all-trans retinoic acid-induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(18):3787-95. (査読有り)
- ⑤. Kirito K, Hu Y, Komatsu N. HIF-1 prevents the overproduction of mitochondrial ROS after cytokine stimulation through induction of PDK-1. *Cell cycle*. 2009;8:2844-2849. (査読有り)
- ⑥. Hu Y, Kirito K, Yoshida K, Mitsumori T, Nakajima K, Nozaki Y, Hamanaka S, Nagashima T, Kunitama M, Sakoe K, Komatsu N. Inhibition of hypoxia-inducible factor-1 function enhances the sensitivity of multiple myeloma cells to melphalan. *Molecular cancer therapeutics*. 2009;8:2329-2338. (査読有り)
- ③. 桐戸敬太, MPN の分類と病態、第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 16、名古屋
- ④. 山本健夫、三森徹、川島一郎、濱中聡至、野崎由美、中寫圭、小松則夫、桐戸敬太、真性赤血球増加症における血栓症のリスク解析、第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 16、名古屋
- ⑤. Nozaki Y, Mitsumori T, Komatsu N, Kirito K. The membrane cholesterol levels of B cell lymphoma cells determine rituximab-induced AKT activation、第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 16、名古屋
- ⑥. 三森徹、野崎由美、川島一郎、山本健夫、濱中聡至、中寫圭、小松則夫、桐戸敬太、MPN 細胞において、低酸素状態は SHP-2 誘導を介し JAK2V617F の活性化を阻害する、第 73 回日本血液学会学術集会、2011. 10. 16、名古屋
- ⑦. 菖蒲侑希、三森徹、山本健夫、濱中聡至、野崎由美、中寫圭、桐戸敬太、レナリドマイド投与後に亜急性甲状腺炎を発症した 5q-症候群の 1 例、第 166 回日本血液学会例会、2011. 7. 2、東京都
- ⑧. 三森徹、野崎由美、桐戸敬太、低酸素環境は JAK2V617F 陽性 MPN 細胞の増殖を抑制する、第 8 回がんとハイポキシア研究会、2011. 1. 29、札幌市
- ⑨. 野崎由美、Qiao Qiao、迫江公己、小松則夫、桐戸敬太、Lipid Raft はリツキシマブによる HIF-1 活性化を規定する、第 8 回がんとハイポキシア研究会、2011. 1. 29、札幌市
- ⑩. 三森徹、野崎由美、小松則夫、桐戸敬太、低酸素による JAK2V617F 活性制御、第 72 回日本血液学会学術集会、2010. 10. 24、横浜市
- ⑪. 野崎由美、Qiao Qiao、迫江公己、小松則夫、桐戸敬太、リツキシマブによる HIF-1 活性化には Lipid Raft が関与する、第 72 回日本血液学会学術集会、2010. 10. 24、横浜市
- ⑫. 桐戸敬太、転写因子 HIF による赤血球造血抑制、第 72 回日本血液学会学術集会、2010. 10. 26、横浜市

〔学会発表〕(計 19 件)

- ①. Mitsumori T, Nozaki Y, Komatsu N, Kirito K. Hypoxia Blocks Activation of JAK2V617F Through Suppression of SHP-2 Expression in MPN cells. 第 53 回米国血液学会、2011. 12. 11、SanDiego.
- ②. Nozaki Y, Mitsumori T, Komatsu N, Kirito K. Rituximab Activation of AKT and Pathways Is Dependent on Membrane Lipid Raft Cholesterol Levels in Lymphoma Cells. 第 53 回米国血液学会、2011. 12. 10、SanDiego.

- ⑬. 桐戸敬太、MPN の分子病態：JAK2 変異同定より 5 年のあゆみ、第 72 回日本血液学会学術集会、2010. 10. 26、横浜市
- ⑭. 篠田大輔、三森徹、永嶋貴博、中寫圭、野崎由美、濱中聡至、桐戸敬太、若年発症の菌状息肉症（腫瘍期）の一例、第 574 回日本内科学会関東地方会例会、2010. 9. 4、東京都
- ⑮. 雨宮憲彦、小岩井孝夫、風間文智、畑山一貴、遠藤武、高野勝弘、三森徹、桐戸敬太、小松則夫、尾崎由基男、治療難治性であった T リンパ芽球性リンパ腫の一例、第 11 回日本検査血液学会学術集会、2010. 7. 24、東京都
- ⑯. 桐戸敬太、骨髄増殖性腫瘍の分子基盤と新たな治療展開、第 11 回日本検査血液学会学術集会、2010. 7. 24、東京都
- ⑰. 沼田裕樹、小佐野雅識、川島一郎、中寫圭、野崎由美、山本健夫、三森徹、小松則夫、桐戸敬太、脾癌が疑われた脾臓原発の髓外性形質細胞腫の 1 例、第 573 回日本内科学会関東地方会例会、2010. 7. 11、東京都
- ⑱. 三森徹、中寫圭、野崎由美、濱中聡至、永嶋貴博、岩尾憲明、桐戸敬太、小松則夫、たこつぼ型心筋症を発症した多発性骨髄腫、第 71 回日本血液学会学術集会、2009. 10. 23、京都府
- ⑲. 野崎由美、桐戸敬太、QiaoQiao、迫江公己、小松則夫、リツキシマブは HIF-1 を介して抗アポトーシス蛋白 Survivin を誘導する、第 71 回日本血液学会学術集会、2009. 10. 23、京都府

〔図書〕（計 1 件）

- ① 桐戸敬太・小松則夫、南江堂、血液専門医テキスト、2011 年、33-34 頁

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.yamanashi-hematology.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桐戸 敬太 (KIRITO KEITA)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：90306150

(2) 研究分担者

小松 則夫 (KOMATSU NORIO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：50186798

迫江 公己 (SAKOE KUMI)

自治医科大学・医学部・研究員

研究者番号：10398505

(3) 連携研究者

なし