

平成30年6月14日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09480

研究課題名(和文) 正常造血及びMPN発症におけるCalreticulinの役割解明

研究課題名(英文) The roles of calreticulin in MPN development and normal hematopoiesis.

研究代表者

北中 明 (Kitanaka, Akira)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70343308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：変異型Calreticulin (CALR)の骨髄増殖性腫瘍(MPN)発症における役割を解析した。変異型 CALRは293T細胞においてトロンボポエチン受容体(MPL)の存在下でSTAT5を活性化した。CALR変異導入巨核球系細胞株では、STAT5リン酸化を伴う細胞増殖亢進、サイトカイン非依存的増殖を認めた。CALR変異導入トランスジェニックマウスは、骨髄での成熟巨核球増加とともに血小板の増加を示したが、ヘモグロビン上昇や白血球増加は認めなかった。以上から、変異型 CALRのC末端によるMPL下流のJAK-STATシグナル活性化がMPN発症において重要な役割を果たしていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of calreticulin (CALR) mutations on myeloproliferative neoplasms (MPNs) development. CALR mutations activated signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) in 293T cells in the presence of thrombopoietin receptor (MPL). Human megakaryocytic cell lines with CALR mutations showed increased growth and acquisition of cytokine-independent growth accompanied by STAT5 phosphorylation. Transgenic mice expressing a human CALR mutation developed ET, with an increase in platelet count, but not hemoglobin level or white blood cell count, in association with an increase in bone marrow mature megakaryocytes. We conclude that the C-terminal of mutant CALR activates JAK-STAT signaling specifically downstream of MPL and may have a crucial role in CALR-induced MPNs.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 Calreticulin

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍(Myeloproliferative neoplasms: MPN)は造血幹細胞の異常によって1系統以上の骨髄系細胞(顆粒球系、赤芽球系、巨核球系)が腫瘍性に増殖する疾患の総称である。MPNのうち、真性赤血球増加症(PV)、本態性血小板血症(ET)、原発性骨髄線維症(PMF)の3疾患は、その臨床的共通点から、古典的MPNとしてまとめられてきた。わが国においては、毎年5-6千人が新たにMPNを発症すると考えられている。MPNは高齢での発症が多いことから、未曾有の高齢化社会を迎えようとしているわが国では年々罹患者数が増加しており、その発症機序解明は、有効な治療法を開発するためにもきわめて重要である。

1951年に米国のダムシェックが提唱して以来、半世紀以上にわたって古典的MPN発症の分子メカニズムは不明であったが、2005年にPVの大多数、ETおよびPMFの約半数例でJAK2遺伝子の変異が見いだされた。また、翌年にはMPLの遺伝子変異が報告された。これらの変異は、サイトカインの刺激なしにサイトカイン受容体以降のシグナル伝達を恒常的に活性化し、細胞の自律増殖を引き起こすと考えられている。

JAK2やMPL変異のないET、PMF症例の遺伝子異常は、その後も長らく不明であったが、2013年、大多数の症例でcalreticulin(CALR)遺伝子の変異が同定され、これによって引き起こされたフレームシフトに由来する新規のC末端を有する変異タンパクが生じることがあきらかとなった。CALR変異は、JAK2/MPL変異と相互に排他的であることからMPNの発症に深く関与すると想像されたが、CALR変異がMPNを発症させる機序は不明であった。分子シャペロンとされるCALRは、従来のサイトカイン受容体シグナル伝達経路中にマップされず、CALR変異がMPNを発症させる分子メカニズムに注目が集まっていた。

2. 研究の目的

MPNの臨床検体を用いた先行研究でCALR変異がJAK2/MPL変異と相互に排他的であったことから、CALR変異はMPN発症のドライバー変異として機能することが予想された。そこで、本研究では、*in vitro*、*in vivo*モデルを用いて、変異型CALRのMPN発症における役割と、野生型CALRの正常造血における役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 変異型CALRの*in vitro*機能解析

293T細胞株にG-CSFR、EPOR、MPLのいずれかを変異型CALRと共に導入し、下流のSTAT5を始めとするシグナル伝達経路の活性化をレポーターアッセイによって調べる。

トロンボポエチン受容体(MPL)を恒常的に発現している細胞株に、CRISPR/Cas9遺伝子編集法を用いてCALR遺伝子変異をノックインし、細胞の増殖および細胞内シグナル伝達経路に及ぼす影響を解析する。

(2) 変異型CALRおよび野生型CALRの*in vivo*機能解析

MPN症例にみられる52bp欠失のヒトCALR遺伝子変異(CALRdel52)を発現するトランスジェニック(TG)マウスを作成し、個体レベルでCALR遺伝子変異の影響を検討する。また、血球特異的なCALR発現欠損マウスを用いて正常造血における野生型CALRの機能解析を実施する。

4. 研究成果

293T細胞を用いた一過性発現系において、CALR遺伝子変異が、シグナル伝達およびSTAT5を活性化するためにはMPLの存在が必須であることをあきらかにした。MPL以外のサイトカイン受容体であるG-CSF受容体やエリスロポエチン受容体の共存では、変異型CALRはSTAT5を活性化することができなかった。

次に、MPLを恒常的に発現している巨核球系細胞株CMK11-5および赤白血病由来細胞株F-36P-MPLにCRISPR/Cas9システムを用いてCALR遺伝子変異をノックインした。樹立した2種のCALR遺伝子変異ノックイン細胞株いずれにおいても、STAT5リン酸化とともに、細胞増殖の亢進またはサイトカイン非依存的増殖の獲得が認められ、変異型CALRがドライバーとして機能することがあきらかとなった。

ヒトMPN症例と同様のCALRdel52を発現するTGマウスでは、骨髄中の成熟巨核球の増加とともに血小板数が増加し、ET様の病態を呈した。CALRdel52-TGマウスではヘモグロビン濃度上昇や白血球数増加は認められず、骨髄線維症は生じなかった。これらの表現型もヒトETに酷似している。また、*in vivo*での競合的継代移植実験において、CALRdel52-TGマウスの骨髄細胞は野生型骨髄細胞を排除しなかった。このことから、CALRdel52造血幹細胞(HSC)の自己複製能は野生型マウスのHSCと同様であることが示唆された。JAK阻害薬ruxolitinibは、TGマウスにおいて血小板血症を改善し、骨髄中の巨核球数およびHSC数の増加を抑制した。正常CALRの機能解析については、これまでに作成した血球特異的なCALR発現欠損モデルマウスの解析を継続中である。

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 14 件)

Kataoka K, Iwanaga M, Yasunaga JI, Nagata Y, Kitanaka A, Kameda T, Yoshimitsu M, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Ochi Y, Aoki K, Suzuki H, Shiozawa Y, Yoshizato T, Sato Y, Yoshida K, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Ishii R, Nureki O, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Shibata T, Miyano S, Ishitsuka K, Utsunomiya A, Shimoda K, Matsuoka M, Watanabe T, Ogawa S, Prognostic relevance of integrated genetic profiling in adult T-cell leukemia/lymphoma., *Blood*, 査読有, 131, 2018, 215-225, doi: 10.1182/blood-2017-01-761874

北中 明, 通山 薫, 骨髓異形成症候群の診断と病型分類 update 2016 年改訂 WHO 分類を踏まえて, *血液内科*, 査読無, 76, 2018, 20-25, <http://www.kahyo.com/brand/b-KS201801-761>

Sekine M, Kubuki Y, Kameda T, Takeuchi M, Toyama T, Kawano N, Maeda K, Sato S, Ishizaki J, Kawano H, Kamiunten A, Akizuki K, Tahira Y, Shimoda H, Shide K, Hidaka T, Kitanaka A, Yamashita K, Matsuoka H, Shimoda K, Effects of mogamulizumab in adult T-cell leukemia/lymphoma in clinical practice., *Eur J Haematol*, 査読有, 98, 2017, 501-507, doi: 10.1111/ejh.12863

Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiunten A, Akizuki K, Nakamura K, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Kitanaka A, Honda A, Sawaguchi A, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hasuike S, Yamamoto S, Nagata K, Shimoda K, Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib., *Leukemia*, 査読有, 31, 2017, 1136-1144, doi: 10.1038/leu.2016.308

Kubuki Y, Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hashimoto K, Yamamoto S, Hasuike S, Hidaka T, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K, Differences in hematological and clinical features between essential thrombocythemia cases with JAK2- or CALR-mutations., *Ann Lab Med.*, 査読有, 37, 2017, 159-161, doi: 10.3343/alm.2017.37.2.159

Kubuki Y, Yamaji T, Hidaka T, Kameda T, Shide K, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki

K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K, TET2 mutation in diffuse large B-cell lymphoma., *J Clin Exp Hematop.*, 査読有, 56, 2017, 145-149, doi: 10.3960/jslrt.56.145

松本 剛, 出居真由美, 北中 明, 長谷川寛雄, 本田孝行, ルーチン検査(基本的検査)の読み方・考え方 信州大学方式 RCPC, *臨床病理*, 査読無, 65, 2017, 325-330, <https://ci.nii.ac.jp/naid/40020995426>

Kataoka K, Shiraishi Y, Takeda Y, Sakata S, Matsumoto M, Nagano S, Maeda T, Nagata Y, Kitanaka A, Mizuno S, Tanaka H, Chiba K, Ito S, Watatani Y, Kakiuchi N, Suzuki H, Yoshizato T, Yoshida K, Sanada M, Itonaga H, Imaizumi Y, Totoki Y, Munakata W, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Masuda K, Minato N, Kashiwase K, Izutsu K, Takaori-Kondo A, Miyazaki Y, Takahashi S, Shibata T, Kawamoto H, Akatsuka Y, Shimoda K, Takeuchi K, Seya T, Miyano S, Ogawa S, Aberrant PD-L1 expression through 3'-UTR disruption in multiple cancers., *Nature*, 査読有, 534, 2016, 402-406, doi: 10.1038/nature18294

Kitanaka A, Takenaka K, Shide K, Miyamoto T, Kondo T, Ozawa K, Kurokawa M, Akashi K, Shimoda K, Splenic irradiation provides transient palliation for symptomatic splenomegaly associated with primary myelofibrosis: a report on 14 patients., *Int J Hematol.*, 査読有, 103, 2016, 423-428, doi: 10.1007/s12185-016-1940-3

北中 明, CML 進行期の対応, *臨床血液*, 査読無, 57, 2016, 1962-1971, https://www.jstage.jst.go.jp/article/rinketsu/57/10/57_1962/_article/-char/ja/

北中 明, 通山 薫, 骨髓異形成/骨髓増殖性腫瘍(分類不能型)の臨床的特徴と治療の選択肢, *血液内科*, 査読無, 73, 2016, 349-354, <http://www.kahyo.com/item/KS201609-733>

北中 明, 下田和哉, 本態性血小板血症の治療 アナグレリドの位置付け, 癌と化学療法, 査読無, 43, 2016, 535-538, <http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=ab8gtkr&vo=43&nu=5&UserID=202.244.205.67>

Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani

Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S, Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia /lymphoma., Nat Genet., 査読有, 47, 2015,1304-1315, doi: 10.1038/ng.3415
Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Kubuki Y, Sashida G, Aoyama K, Yoshimitsu M, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K, Gene expression profiling of loss of TET2 and/or JAK2V617F mutant hematopoietic stem cells from mouse models of myeloproliferative neoplasms., Genom Data. 4, 2015, 102-108, doi: 10.1016/j.gdata.2015.04.002

〔学会発表〕(計 4 件)

幣光太郎, 亀田拓郎, 本田 新, 関根雅明, 上運天綾子, 秋月溪一, 田平優貴, 日高智徳, 久富木庸子, 北中 明, 下田和哉, CALR de152 変異は MPL と協調して JAK-STAT 経路を活性化し, マウスに ET を発症させる, 第 54 回日本臨床分子医学会学術集会, 2017/4/14-15, 東京
Shide K, Kameda T, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Tahira Y, Hidaka T, Kabuki Y, Honda A, Sawaguchi A, Kitanaka A, Shimoda K, Physiological expression of calr mutant increases cell growth and cytokine independency in human cell lines expressing Mpl, and develops essential thrombocythemia in mice., 58th ASH Annual Meeting & Exposition, 2016/12/03-06, San Diego (USA)
Shide K, Kameda T, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Tahira Y, Shimoda H, Hidaka T, Kubuki Y, Honda A, Kitanaka A, Shimoda K, CALRde152 mutation activates the JAK-STAT pathway in coordination with MPL, and causes ET in mice., 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016/10/13-15, 横浜市
Shide K, Kameda T, Kamiunten A, Sekine M, Akizuki K, Shimoda H, Hidaka T, Kubuki Y, Kitanaka A, Shimoda K, Therapies targeting the MAPK pathway

improve bone marrow (BM) fibrosis induced by JAK2V617F (JAK2VF). 第 77 回日本血液学会学術集会, 2015/10/16-18, 金沢市

〔図書〕(計 1 件)

北中 明, 医学書院, 今日の治療指針 2018 年版, 2018, 654-656

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 : 該当なし

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 : 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

北中 明 (KITANAKA, Akira)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号 : 70343308

(2) 研究分担者

幣 光太郎 (SHIDE, Kotaro)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号 : 20468028

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号 :

(4) 研究協力者

該当なし ()