様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ４ 日現在

機関番号：２１６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０９４８３

研究課題名（和文）骨髄増殖性腫瘍の病態におけるCalreticulin変異とHMGA2発現の役割

研究課題名（英文）The role of mutant Calreticulin and HMGA2 in myeloproliferative neoplasms

研究代表者

小川　一英（Ogawa, Kazuei）

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：４０４２３８００

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄増殖性腫瘍(MPN)において2013年にCALR遺伝子の変異が報告されたが、造血における役割の詳細は不明であり、マウスモデルを用いた検討を計画した。CRISPR/CAS9法により10 bp deletionを有するtype I likeのCR10dおよび2 bp insertionを有するtype 2 likeなCR2iの作成に成功した。ともに顆粒球系細胞の増加を認めている他、CR2iにおいては脾腫も認めている。今後造血幹細胞の機能解析や遺伝子発現解析などを行う予定である。さらに、Hmga2トランスジェニックマウスと交配させHmga2+CR2iおよびHmga2+CR10dマウスを作成する。

研究成果の概要（英文）：Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are a group of diseases in which mature hematopoietic cells proliferate. Recently, insertion/deletion mutations in exon 9 of Calreticulin (CALR) were discovered in MPNs. However, the role of the mutant CALR in MPN hematopoiesis are largely unknown. Thus, we generated 2 types of mice with mutant Calr; type 1-like 10 bp deletion (CR10d) and type 2-like 2 bp insertion (CR2i) using genetic modification by CRISPER/Cas9 method. Both mice mimicked mutations in patients with MPN. CR2i mice showed increased spleen weight per body weight and a reduced bone marrow T cell ratio compared with wild-type mice. Both CR10d and CR2i mice showed increased bone marrow myeloid cells. We are studying the effect of the Calr mutants on hematopoietic stem cell and progenitor function by BM transplant experiments and progenitor assays. In addition, we will generate Hmga2+CR10d and Hmga2+CR2i mice by crossing Hmga2-transgenic mice and mice with mutant Calr.

研究分野：血液学

キーワード：MPN　CALR

１．研究開始当初の背景

JAK2 変異および MPL 変異の両者が陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPN)患者の約 80%以上において、Calreticulin1 (CALR)変異が新規に同定された。CALR 変異の MPN 病態における役割を、変異 CALR 遺伝子導入マウスの樹立を通して明らかにする。さらに、EZH2 や HMGA2 など、MPN において変異や発現量の異常が報告されている遺伝子群との関連を明らかにし、JAK-STAT 経路に続く MPN の治療標的を見出す必要があった。

２．研究の目的

MPN において 2013 年に CALR 遺伝子の変異が報告されたが、造血における役割の詳細は不明であり、マウスモデルを用いた検討を計画した。

３．研究の方法

CRISPR/CAS9 法により Calr 変異マウスを作成し、造血幹細胞の機能解析や遺伝子発現解析などを行う。さらに、Hmga2 トランスジェニックマウスと交配させ Hmga2 を発現する Calr 変異マウスを作成する。

４．研究成果

CRISPR/CAS9 法により 10 bp deletion を有する type I like の CR10d および 2 bp insertion を有する type 2 like な CR2i の作成に成功した。ともに顆粒球系細胞の増加を認めている他、CR2i においては脾腫も認めている。今後造血幹細胞の機能解析や遺伝子発現解析などを行う予定である。さらに、Hmga2 トランスジェニックマウスと交配させ Hmga2+CR2i および Hmga2+CR10d マウスを作成する。

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 12 件）

1. Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara, Kazuei Ogawa, Kazuhiko Ikeda, Koki Ueda, Akiko Shichishima-Nakamura, Emi Ito, Jun-ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Waguri, Takayuki Ikezoe, Yasuchika Takeishi
Autocrine and paracrine interactions between multiple myeloma cells and bone marrow stromal cells by growth arrest-specific gene 6 cross-talk with interleukin-6
Journal of Biological Chemistry 292 (10), 4280-4292, 2017, 査読有

2. Kazuhiko Ikeda, Koki Ueda, Takahiro Sano, Kazuei Ogawa, Takayuki Ikezoe, Yuko Hashimoto, Soji Morishita, Norio Komatsu, Hitoshi Ohto, Yasuchika Takeishi
The amelioration of myelofibrosis with thrombocytopenia by a JAK1/2 inhibitor, ruxolitinib, in a post-polycythemia vera myelofibrosis patient with a JAK2 exon 12 mutation
Internal Medicine 56 (13), 1705-1710, 2017, 査読有

3. Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Takayuki Ikezoe, Kayo Harada-Shirado, Kazuei Ogawa, Yuko Hashimoto, Takahiro Sano, Hiroshi Ohkawara, Satoshi Kimura, Akiko Shichishima-Nakamura, Yuichi Nakamura, Yayoi Shikama, Tsutomu Mori, Philip J. Mason, Monica Bessler, Soji Morishita, Norio Komatsu, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Shuhei Koide, Kazumasa Aoyama, Motohiko Oshima, Atsushi Iwama, Yasuchika Takeishi
Hmga2 collaborates with JAK2V617F in the development of myeloproliferative neoplasms
blood advances 1 (15), 1001-1015, 2017, 査読有

4. Hiroshi Ohkawara, Miki Furukawa, Kazuhiko Ikeda, Akiko Shichishima-Nakamura, Masahiko Fukatsu, Takahiro Sano, Koki Ueda, Satoshi Kimura, Risa Kanai, Yuka Oka, Fumi Murakami, Osamu Suzuki, Yuko Hashimoto, Kazuei Ogawa, Takayuki Ikezoe
Steroid-resistant autoimmune myelofibrosis in a patient with autoimmune hepatitis and Evans syndrome complicated with increased expression of TGF-β in the bone marrow: a case report.
Int J Hematol. 106 (5), 718-724, 2017, 査読有

5. Kazuhiko Ikeda, Kayo Harada-Shirado, Hayato Matsumoto, Hideyoshi Noji, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Molecular response of e19a2 BCR-ABL1 chronic myeloid leukemia with double Philadelphia chromosome by dasatinib
Journal of Clinical Oncology 34 (14), e130-e133, 2016, 査読有

6. Hiroshi Ohkawara, Akiko Shichishima-Nakamura, Kazuhiko Ikeda, Masumi Sukegawa, Miki Furukawa, Takahiro Sano, Koki Ueda, Satoshi Kimura, Akiomi Yoshihisa, Hideyoshi Noji, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Infected pancreatic pseudocyst ruptured into stomach and colon associated with splenic artery pseudoaneurysm
Journal of the Pancreas 17 (3), 324-327, 2016, 査読有

7. Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Masumi Sukegawa, Takahiro Sano, Satoshi Kimura, Osamu Suzuki, Yuko Hashimoto, Yasuchika Takeishi

Favorable outcome of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorder complicated by immunoglobulin G4-related disease treated with rituximab-based therapy: a case report
Journal of Medical Case Reports 10 (1), 236, 2016, 査読有
8. Kayo Harada-Shirado, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Hiroshi Ohkawara, Hideo Kimura, Tatsuyuki Kai, Hideyoshi Noji, Soji Morishita, Norio Komatsu, Yasuchika Takeishi
Dysregulation of the MIRLET7/HMGA2 axis with methylation of the CDKN2A promoter in myeloproliferative neoplasms
British Journal of Haematology 168 (3), 338-349, 2015, 査読有
9. Miki Furukawa, Kazuhiko Ikeda, Hiroshi Ohkawara, Shunichi Saito, Hiroshi Takahashi, Koki Ueda, Hayato Matsumoto, Yuko Hashimoto, Hitoshi Ohto, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Persistent complete remission of acute leukemic-phase CCR4-positive gamma-delta peripheral T-cell lymphoma by autologous stem cell transplantation with mogamulizumab
International Journal of Hematology 102 (4), 498-505, 2015, 査読有
10. Hiroshi Takahashi, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Syunnichi Saito, Alain M Ngoma, Yumiko Mashimo, Koki Ueda, Miki Furukawa, Akiko Shichishima-Nakamura, Hiroshi Ohkawara, Kenneth E Nollet, Hitoshi Ohto, Yasuchika Takeishi
CD4+ T cells in aged or thymectomized recipients of allogenic stem cell transplantations
Biological Research 48, 41, 2015, 査読有
11. Yumiko Mashimo, Kazuhiko Ikeda, Hiroshi Ohkawara, Hiroshi Takahashi, Akiko Shichishima-Nakamura, Miki Furukawa, Satoshi Kimura, Koki Ueda, Hideyoshi Noji, Kazuei Ogawa, Kenneth Nollet, Hitoshi Ohto, Yasuchika Takeishi
Post-engraftment blood transfusion and outcomes of bone marrow transplantation
ISBT Science Series 10 (2), 93-99, 2015, 査読有
11. Hiroshi Ohkawara, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) identified as a multifunctional regulator of vascular responses
Fukushima Journal of Medical Science 61 (2), 91-100, 2015

〔学会発表〕(計 12 件)
1. 59th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition (2017.12.9-12.12, Orlando, USA)
Takahiro Sano, Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Tsutomu Mori, Takayuki Ikezoe
Functional impairment of hematopoietic stem/progenitor cells by loss of Uhrf2 in mice
2. 第 79 回　日本血液学会学術集会 (2017.10.20-10.22, 東京)
Sho Takeyasu, Hiroshi Ohkawara, Koichiro Fukuchi, Xiangmin Wang, Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Takayuki Ikezoe
A critical role of growth arrest-specific gene 6 in the pathogenesis of HSCT-associated TMA
3. 第 79 回　日本血液学会学術集会 (2017.10.20-10.22, 東京)
Takahiro Sano, Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, kazuei Ogawa, Tsutomu Mori, Takayuki Ikezoe
Loss of UHRF2 may alter HSCs function via disruption of histone H3K9 modification
4. 58th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition (2016.12.3-12.6, San Diego, USA)
Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Takayuki Ikezoe, Kazuei Ogawa, Yuko Hashimoto, Kayo Harada-Shirado, Hiroshi Ohkawara, Norio Komatsu, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Shuhei Koide, Motohiko Oshima, Atsushi Iwama, Yasuchika Takeishi
HMGA2 orchestrates the tumorgenesis of myeloproliferative neoplasms (MPN) in corporation with JAK2V617F
5. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference “The Latest Advances in Hematological Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics” (2016.7.13-7.15, Chiba, Japan)
Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Yuko Hashimoto, Soji Morishita, Norio Komatsu, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Atsushi Iwama, Yasuchika Takeishi
The role of HMGA2 in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms (MPNs)
6. 第 78 回　日本血液学会学術集会 (2016.10.13-10.15, 横浜)
Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara, Kazuhiko Ikeda, Koki Ueda, Akiko Shichishima-Nakamura, Emi Ito, Jun-ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Waguri, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Autocrine and paracrine interactions by Gas 6 signaling pathways via IL-6 between MM cells and BMSCs

7. 第 78 回　日本血液学会学術集会
(2016.10.13-10.15, 横浜)
Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Yuko Hashimoto, Soji Morishita, Norio Komatsu, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Atsushi Iwama, Yasuchika Takeishi
The role of oncogene HMGA2 in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms (MPN)
8. 57th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition
(2015.12.5-12.8, Orlando, USA)
Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara, Kazuhiko Ikeda, Emi Ito, Jun-ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Waguri, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Autocrine and paracrine regulatory mechanisms of growth arrest-specific Gene 6 contribute to disease progression of multiple myeloma
9. 57th American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting and Exposition
(2015.12.5-12.8, Orlando, USA)
Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Akiko Shichishima-Nakamura, Kotaro Shide, Kazuya Shimoda, Yuko Hashimoto, Philip J Mason, Monica Bessler, Yasuchika Takeishi
Expression of HMGA2 collaborates with JAK2V617F to progress myeloproliferative neoplasms
10. 第 77 回　日本血液学会学術集会
(2015.10.16-10.18, 金沢)
Kayo Harada-Shirado, Kazuhiko Ikeda, Kazuei Ogawa, Hiroshi Ohkawara, Yasuchika Takeishi
Dysregulation of let-7/HMGA2 axis can be a target of histone deacetylase inhibitor in MPNs
11. 第 77 回　日本血液学会学術集会
(2015.10.16-10.18, 金沢)
Koki Ueda, Kazuhiko Ikeda, Yumiko Mashimo, Hiroshi Ohkawara, Hiroshi Takahashi, Akiko Shichishima-Nakamura, Kayo Harada-Shirado, Miki Furukawa, Satoshi Kimura, Hideyoshi Noji, Kazuei Ogawa, Hitoshi Ohto, Yasuchika Takeishi
Transfusions after engraftment associate with non-relapse mortality in the setting of allo-HSCT
12. 第 77 回　日本血液学会学術集会
(2015.10.16-10.18, 金沢)
Miki Furukawa, Hiroshi Ohkawara, Kazuhiko Ikeda, Emi Ito, Jun-Ichi Imai, Yuka Yanagisawa, Reiko Honma, Shinya Watanabe, Satoshi Wagurii, Kazuei Ogawa, Yasuchika Takeishi
Autocrine and paracrine regulation by Gas 6 contributes to multiple myeloma disease progression

〔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

６．研究組織
(1)研究代表者
小川　一英（Ogawa Kazuei）
福島県立医科大学
新医療系学部設置準備室・教授
研究者番号：40423800

(2)研究分担者
池田　和彦（Ikeda Kazuhiko）
福島県立医科大学医学部
輸血・移植免疫学講座・教授
研究者番号：90381392

植田　航希（Ueda Koki）
福島県立医科大学医学部
血液内科学講座・助教
研究者番号：80632190

(3)連携研究者
(　　　)

研究者番号：

(4)研究協力者
(　　　)