

令和 2 年 4 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09849

研究課題名(和文) 骨髄増殖性疾患における、CALR遺伝子変異によるJAK2活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of activation of JAK2 in myeloproliferative disease with CALR mutation

研究代表者

野波 篤 (Nonami, Atsushi)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00758419

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)：骨髄増殖性腫瘍(MPN)において、JAK2/TPOR変異のない本態性血小板血症の67%、骨髄腺維症の88%にCalreticulin(CALR)遺伝子変異が新たに同定されたが、その発症におけるメカニズムは不明であった。我々の研究により、変異CALRによるMPN発症にはTPORの存在が必須であり、それによりJAK-STAT経路活性化していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在MPNに対する治療には、抗がん剤であるハイドロキシウレア、JAK阻害剤であるルキソニチニブなどが投与されるが、効果は十分でない。CALRはシャペロンタンパクであり、直接の機能阻害は困難と考えられるが、この新知見により、変異CALR陽性MPNの治療として現行の治療薬だけでなく、TPORの機能阻害によっても治療効果が期待できることが判明し、これにより症状や予後の改善につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Novel mutation of myeloproliferative neoplasm without JAK2/TPOR mutation was identified, however its mechanism of pathogenesis was unknown. Our research revealed that TPOR was dispensable in the pathogenesis of MPN with CALR mutation, and it induced activation of JAK-STAT pathway.

研究分野：血液悪性腫瘍

キーワード：骨髄増殖性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、疾患ゲノム解析技術の進歩により、様々な悪性腫瘍において数多くの遺伝子異常が同定されている。しかし、それらの遺伝子異常の病態における役割が解明され、ひいては予後の改善につながったものは、慢性骨髄性白血病に対する BCR-ABL 阻害剤や EGFR 変異陽性肺癌に対する EGFR 阻害剤などの例が見られるのみである。既に出現頻度の高い新規遺伝子異常は出そろったと考えられる現在、それらの情報を元に疾患特異的分子標的治療薬の開発へと進める”Next generation sequence to Next generation targeted therapy”が重要な段階に来ている。

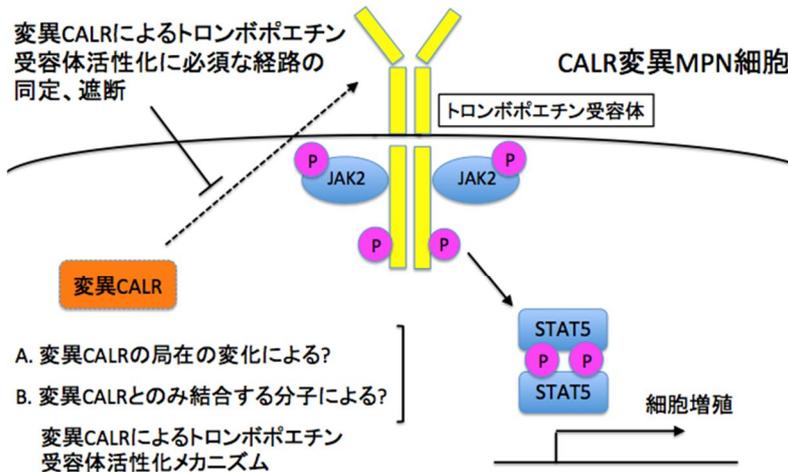


図1. 研究の目的:

変異CALRによるトロンボポエチン受容体活性化メカニズムの解明

抗がん剤投与が行われてきた。MFの5年生存率は40%と予後不良であり、ET、PVは、約6-15%の症例はMFへ移行、一部の症例(4.5-10%)は急性白血病へ急性転化する (Am J Hematol, 2013)。

最近、骨髄増殖性腫瘍症例の一部(ETの67%、PVの0%、MFの88%)にCALR変異が認められること、このような症例において細胞増殖・生存に関わるJAK2-STAT5経路が活性化されていることが報告された(N Engl J Med, 2013)。CALRは主に小胞体に存在する分子で、カルシウムの濃度調節を始め多様な機能を有することが知られている。変異CALRにはフレームシフトを伴う欠失や挿入変異を認め、その変異CALRがJAK2-STAT5経路を異常活性化するメカニズムとして図1に示すような複数の機序が考えられる。JAK2は正常造血においても細胞増殖に必須であるため直接の治療標的としては理想的ではない。すなわち変異CALRがJAK2-STAT5経路を活性化する過程に必須の分子を同定し遮断することが重要であり、それが結果として副作用が少なく臨床効果の高い新規治療薬開発につながると考えられる。

2. 研究の目的

変異CALR-JAK2-STAT5経路の全貌を明らかにし、変異CALR陽性骨髄増殖性腫瘍に対する特異的、効果的な新規治療薬開発基盤を整える。

骨髄増殖性腫瘍(MPN)は、造血幹細胞の遺伝子異常により骨髄系の各成熟段階の細胞が異常増殖する疾患であり、骨髄線維症(MF)、本態性血小板血症(ET)、真性多血症(PV)に分類される。薬物療法としては従来よりMFに対しては蛋白同化ホルモンの投与、ET、PVに対してはヒドロキシウレア、サイメリンなどの

3. 研究の方法

予備実験として、変異 CALR の血液細胞腫瘍化に対する効果を調べた。まず、IL-3 依存性の Ba/F3 細胞に欠失変異 CALR 遺伝子を強制発現したが、それのみでは腫瘍化しなかった (IL-3 非依存性とならなかった) ことから、変異 CALR による JAK-STAT 経路の活性化には Ba/F3 細胞に発現していないシグナル関連分子が重要と考えられた。ET と MF の発症には血

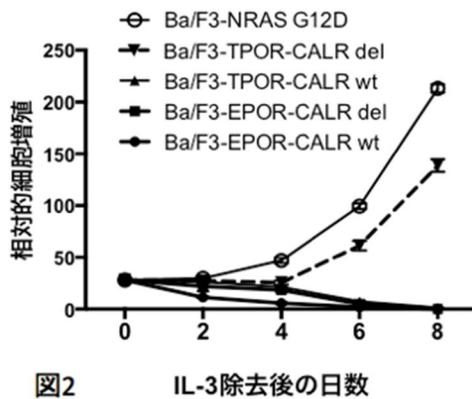


図2 IL-3除去後の日数

小板産生を刺激するトロンボポエチン(TPO)シグナルが重要であり(Blood, 2002)、上述のように CALR 変異が ET と MF 症例に見られ、PV 症例には見られないことから、CALR 変異陽性 MPN の発症に TPO 受容体(TPOR)からのシグナルが重要な役割を果たしているという仮説を立てた。そこで、TPOR、もしくは EPO 受容体(EPOR)遺伝子を導入した Ba/F3 細胞に正常または変異 CALR を強制発現させたところ、Ba/F3-TPOR 細胞のみ

が変異 CALR によって腫瘍化した(図 2)。一方機能欠失型変異 TPOR (アミノ酸 524-526: PDL-->AAA)を発現した Ba/F3 細胞は del-CALR によって腫瘍化されなかった(データ図示せず)。つまり変異 CALR は TPOR シグナルと協調して JAK-STAT 経路を活性化することが明らかになった。以上のデータに基づき本研究では、変異 CALR が TPOR-JAK2-STAT5 経路を活性化するメカニズムを次に示す方法により解明する。

1. Wt あるいは del-CALR を導入した Ba/F3-TPOR 細胞を用いて、JAK2-STAT5 経路の活性化を制御することが知られている分子(SOCS1,3, SHP2, SHIP, LNK, CBL)(Int J Hematol, 2013)の発現、活性化に差異があるかどうか検討する。
2. 変異 CALR は、未知の JAK2-STAT5 経路制御分子の発現レベルを増加させることにより、JAK2-STAT5 経路活性化を誘導している可能性がある。そのような分子を探索するために、Wt あるいは del-CALR を導入した Ba/F3-TPOR 細胞、さらには活性化型 JAK2V617F 遺伝子を導入した Ba/F3 細胞を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングと GSEA 解析を行なう。
3. 変異 CALR の C 末端はフレームシフトにより 50 前後の新しいアミノ酸に置換されている。変異 CALR はこの C 末端を介して野生型 CALR が結合できない新たな分子と会合するようになり、直接あるいは間接的に JAK2-STAT5 経路の活性化を引き起こしている可能性がある。この分子を探索するために、Ba/F3-TPOR-wt-CALR 細胞と Ba/F3-TPOR-del-CALR 細胞を用いて FLAG タグによる免疫沈降を行い、wt-CALR および del-CALR と共沈したタンパクを質量分析法により同定する。
4. Wt あるいは del-CALR を導入した Ba/F3-TPOR 細胞を用いて、後者のみで増殖を抑制するケミカルインヒビターを同定することにより、そのメカニズムを探る。

ケミカルインヒビターのライブラリーとしては、文科省標準阻害剤キット(約 400 種類)を用い、それぞれ 0.2, 1, 5 μ M の濃度を用いて、2 日間培養して、その増殖に与える影響を測定する。

4 . 研究成果

1. SOCS1,3, SHP2, SHIP, LNK, CBL いずれも発現に差はなく、JAK2 シグナルの活性化はこれらの分子の異常によるものではないことが示唆された。

2. GSEA 解析により、del-CALR を導入した Ba/F3-TPOR 細胞において myc 経路、hypoxia 関連経路等が高発現していることが判明し、これらが MPD 発症に関与している可能性が示唆された。

3. del-CALR とのみ共沈したタンパクとして、actin-related protein 3 [Mus musculus]など複数のものが判明した。今後これらの分子が腫瘍化に必須の分子かどうか検証する。

4. Sanguinarine(Na/K/Mg ATPase inhibitor), Dequalinium(K channel inhibitor)などがスクリーニング実験では差が見られたが、種々の濃度で validation をすると有意差は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----