

令和元年6月27日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09859

研究課題名(和文) 変異CALR遺伝子によるサイトカイン受容体活性化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of cytokine receptor activation by mutant CALR

研究代表者

荒木 真理人 (ARAKI, MARITO)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80613843

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)：フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPN)において見出されるCALR遺伝子変異によるMPN発症メカニズムの解明を行い、変異型CALRがトロンボポエチン受容体と特異的に結合し、サイトカインのようにMPLを活性化することで、下流のJAK2、ERK1/2、STAT5を恒常的に活性化させて、細胞を腫瘍化することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、CALR変異遺伝子による骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症メカニズムが明らかになったことから、CALR遺伝子変異を有するMPN患者に対する有効な治療薬の開発が大いに期待される。さらに、『分子シャペロンの変異による受容体活性化が引き起こす細胞腫瘍化』という新しい腫瘍生物学の概念が明らかになったことから、他の疾患や生命現象の解明に結びつくことが大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：By studying the mechanism for the development of myeloproliferative neoplasms (MPN) by calreticulin mutation, this study uncovered that mutant CALR preferentially interacted with MPL, induced activation of MPL like cytokine, constitutively activated its downstream molecules such as JAK2, ERK1/2, and STAT5, and thus promoted the cellular transformation.

研究分野：血液学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 サイトカイン受容体 分子シャペロン シグナル伝達 トロンボポエチン JAK2 CALR MPL

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPN: myeloproliferative neoplasms)は、造血幹細胞の異常によって一系統以上の骨髄性細胞のクローナルな増殖をきたす血液疾患である。2005年に、MPNの代表的な3疾患である真性赤血球増加症(PV: polycythemia vera)、本態性血小板血症(ET: essential thrombocythemia)、原発性骨髄線維症(PMF: primary myelofibrosis)の患者の多くにおいて、サイトカイン受容体シグナル伝達において中心的な役割を果たす、チロシンキナーゼ *JAK2* を恒常的に活性化する変異が見出された (N Engl J Med. 2005;352:1779-90 など)。この発見により、少なくとも *JAK2* 変異を有する MPN 患者では、サイトカインシグナル伝達系の機能亢進により MPN が発症していることが強く示唆され、その後の *JAK2* 阻害薬の開発と、MPN 患者への使用へと結びついた (N Engl J Med. 2010;363:1117-27)。しかし *JAK2* 阻害薬は、患者の全身症状や脾腫を改善するものの、腫瘍細胞を完全に排除することができないことから根治に至らない。MPN の根本的な治療法としては、骨髄移植があるが、治療関連死のリスクや、移植不適応症例が多いことなどから、実際に移植の行われる症例はごくわずかである。これらのことから、MPN 発症メカニズムの理解に基づき、完治を目指す新たな治療戦略の開発が望まれている。

先に述べたように、多くの MPN 患者に共通して腫瘍細胞に特異的な *JAK2* V617F 変異が見出されるが、ET や PMF 患者の約半数には、*JAK2* V617F 変異が見られない (Leukemia. 2010;24:1128-38)。その後、*JAK2* 変異陰性の MPN 患者から、トロンボポエチン(TPO)受容体 MPL を恒常的に活性化する変異が、見出されたが、変異を有する患者はごくわずかであった (Leukemia. 2010;24:1128-38)。しかし、2013年に、*JAK2* 変異陰性の ET、PMF 患者の約 70% に共通して、*CALR* 遺伝子変異が認められ (N Engl J Med. 2013;369:2379-90、2391-405)、本邦の MPN 患者においても、同様の変異が見られることを申請者が明らかにしている。

野生型 *CALR* 遺伝子産物は、小胞体に局在する分子シャペロンとしての機能を有することは示されているが (Biochem J. 2009;417:651-66)、*JAK2* をはじめとするサイトカインシグナル伝達系への関与は未解明である。MPN 患者における *CALR* 遺伝子変異は、これまでに 50 種類以上報告されているが、その全てが第 9 エクソンへの短い塩基の挿入か欠失である。興味深いことに、全ての変異蛋白質に共通して、C 末端に野生型には存在しない新たなアミノ酸配列を有している。さらに、変異型 *CALR* 遺伝子を、IL-3 依存性のマウス B 細胞リンパ腫細胞株 Ba/F3 に導入すると、IL-3 非依存的に細胞が増殖することが明らかにされている (N Engl J Med. 2013;369:2379-90)。これらのことから、*CALR* 変異遺伝子は、機能獲得型の変異であると考えられているが、IL-3 シグナル伝達系と MPN 発症との関係がこれまでに明らかになっていないことなどから、変異 *CALR* 遺伝子による MPN 発症の具体的なメカニズムは未解明のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景を踏まえて、変異 *CALR* 遺伝子による MPN 発症メカニズムを明らかにするために、以下のことを明らかにすることを目的とした。

- (1) 変異 *CALR* 遺伝子が、腫瘍原性を有していること。
- (2) 腫瘍化に際して、変異型 *CALR* により活性化されるシグナル伝達経路。
- (3) 腫瘍化に必要なシグナル伝達経路を活性化させる分子メカニズム。
- (4) 変異型 *CALR* が特異的な腫瘍化能を有する分子メカニズム。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株の樹立と腫瘍原性の評価

MPN 患者で最も高頻度で見出される 2 つの変異 *CALR* 遺伝子である、52 塩基欠失型 (Del52) と 5 塩基挿入型 (Ins5) を、MPN 患者末梢血単核球の mRNA を逆転写して得た cDNA を鋳型にした PCR 反応により増幅した。増幅した DNA 断片の蛋白質翻訳領域のカルボキシル末端に FLAG タグを付加してから、レトロウイルスベクター pMSCV-IRES-GFP の EcoRI サイトにクローニングした上で、Plat-GP 細胞にヘルパーベクター VSVG とともにトランスフェクションし、産生されたレトロウイルスを培養上清から回収した後、遠心濃縮してから、トロンボポエチン(TPO)依存性の細胞株 UT-7/TPO に感染させた。セルソーターを用いて、発現ベクター上のマーカー遺伝子産物である GFP を指標に、ウイルスの感染した細胞のみを精製することで、変異型 *CALR* Del52 と Ins5 を発現する細胞株を樹立した。樹立した細胞を、TPO を含まない 10% ウシ胎児血清を含む IMDM 培地 100  $\mu$ L 中に 10,000 個播種し、経時的に細胞の増殖を WST-8 アッセイにより評価した。

### (2) 腫瘍化に際して活性化されるシグナル伝達経路の評価

変異型 *CALR* を発現することでサイトカイン非依存的に増殖している UT-7/TPO 細胞を遠心して回収後、脱リン酸化阻害剤を添加したリン酸緩衝液で洗浄後、RIPA バッファーで懸濁し、超音波破碎することで、細胞抽出液を調製した。さらに、コントロールとして、UT-7/TPO 細胞を、TPO 存在下、あるいは非存在下で 1 晩培養したのち、同様の操作を行って、細胞抽出液を調製した。これらの抽出液を、SDS-PAGE 電気泳動後に PVDF 膜に転写した上で、スキムミルク溶液でブロッキングしてから、リン酸化特異的抗体と反応させた。膜状のリン酸化蛋

白質と結合した抗体を、ペルオキシダーゼ標識された 2 次抗体で標識した後、基質を加えて、リン酸化蛋白質特異的なシグナルを、高感度 CCD カメラで撮像した(以下、SDS-PAGE からの一連の操作をイムノブロットと呼ぶ)。さらに、このようにして同定したシグナル伝達経路に対する特異的な阻害剤を、変異型 CALR を発現する UT-7/TPO 細胞を培養している培地中に添加した上で、同様の操作を行い、同定したシグナル伝達経路の活性化の阻害を評価した。

### (3) シグナル伝達経路活性化を引き起こす分子メカニズムの評価

変異型 CALR を発現することでサイトカイン非依存性に増殖している UT-7/TPO 細胞において活性化しているシグナル伝達経路の上流に位置する受容体遺伝子に対する shRNA を発現するために、標的遺伝子に対する 3 つの shRNA 配列と、コントロールの shRNA 配列を合成し、赤色蛍光蛋白質マーカーを搭載した pLKO ベクターの EcoRI と AgeI サイトにクローニングした。これらのベクターを HEK293T 細胞に、ヘルパーベクター Gag/Pol と VSVG とともにトランスフェクションし、産生されたレトロウイルスを培養上清から回収した後、遠心濃縮してから、変異型 CALR を発現する UT-7/TPO 細胞に、ほぼ全ての細胞が感染するような条件で感染させた。感染 48 時間後に、細胞を回収し、RNA を抽出、精製したのち、標的遺伝子に対する定量 RT-PCR を行い、RNA 干渉による標的遺伝子の発現抑制を評価した。感染 72 時間後に、細胞をトリパンブルー染色することで、死細胞数を評価した。

同定した受容体と、変異型 CALR の相互作用を評価するために、上述の変異 CALR 遺伝子を導入した UT-7/TPO 細胞や、FLAG タグを付加した変異 CALR 遺伝子や受容体遺伝子をリポフェクションにより発現させた HEK293T 細胞を遠心により回収、リン酸緩衝液で洗浄したのち、0.1% Triton-X を含有するリン酸緩衝液で懸濁、超音波破碎することで、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液に、抗 FLAG 抗体を添加してから Protein G ビーズと反応させることで、ビーズ上に変異型 CALR に結合した蛋白質を捕捉した上で、ビーズを洗浄してから SDS と還元剤存在化で結合した蛋白質を溶出した(以下、ビーズによる結合蛋白質の捕捉を共免疫沈降と呼ぶ)。得られた蛋白質をイムノブロットにより解析し、変異型 CALR と結合している蛋白質を評価した。

### (4) シグナル伝達経路活性化を引き起こす分子メカニズムの評価

上述の変異 CALR 遺伝子を導入した UT-7/TPO 細胞から調製した蛋白質抽出液を、グリセロールの密度勾配を有するリン酸緩衝液の上に重層した上で、一晚 4 度で超遠心を行い、蛋白質を大きさごとに分画した。得られた分画を、イムノブロットにより解析し、変異型 CALR に特異的な大きさの違いを評価した。

変異型 CALR の分子間相互作用を評価するために、FLAG タグと V5 タグを付加した変異 CALR 遺伝子をリポフェクションにより導入した HEK293T 細胞を遠心により回収、リン酸緩衝液で洗浄したのち、0.1% Triton-X を含有するリン酸緩衝液で懸濁、超音波破碎することで、細胞抽出液を調製した。得られた細胞抽出液から、共免疫沈降により得られた蛋白質をイムノブロットにより解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 変異 CALR 遺伝子による細胞腫瘍化

CALR Del52 あるいは Ins5 遺伝子を発現させると、TPO 依存性の細胞株 UT-7/TPO は、TPO 非依存性に増殖した(図 1)。一方で、野生型の CALR 遺伝子では、そのような変化は見出されなかった(図 1)。これらのことから、変異 CALR 遺伝子は腫瘍原性を有することが明らかになった。

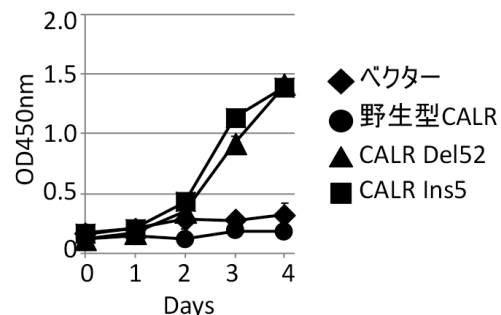


図 1

### (2) 変異 CALR 遺伝子により活性化されるシグナル伝達経路

CALR Del52 あるいは Ins5 遺伝子を発現して TPO 非依存性に増殖する細胞では、TPO 非存在下においても、JAK2、ERK1/2、STAT5 の活性化を示すリン酸化が、コントロールの UT-7/TPO 細胞を TPO 存在下で培養したときと同程度検出された(図 2)。さらに、JAK2 阻害剤 JAK inhibitor I により、変異 CALR 遺伝子の発現による ERK1/2 や STAT5 の活性化は、著しく抑制された(図 3)。これらのことから、変異 CALR 遺伝子は、UT-7/TPO 細胞において、チロシンキナーゼ JAK2 を恒常的に活性化し、下流の ERK1/2 や STAT5 を活性化することで、腫瘍原性を獲得していることが明らかになった。

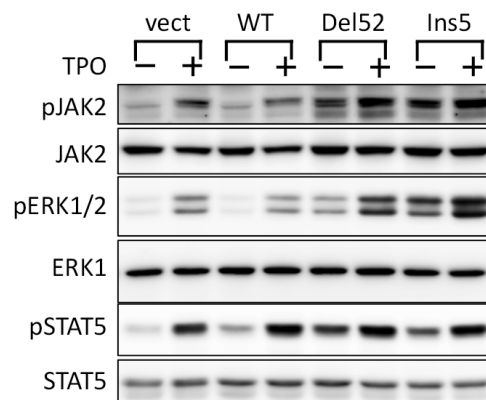


図 2

(3) 変異型 CALR によるシグナル伝達経路活性化のメカニズム

変異 CALR 遺伝子を発現する細胞において、JAK2 の上流である、TPO 受容体 MPL の発現を RNA 干渉により抑制したところ、48 時間後に著明な MPL 遺伝子の発現低下が認められた (図 4)。さらに 24 時間培養したところ、それまで TPO 非依存性に増殖していた UT-7/TPO 細胞は、MPL 遺伝子の発現が抑制されると、細胞死が誘導された (図 5)。

変異 CALR 遺伝子の MPL 遺伝子依存的な腫瘍原性の分子メカニズムを明らかにするために、共免疫沈降実験を行ったところ、細胞抽出液において MPL は、変異型 CALR と特異的に相互作用していることが明らかになった (図 6)。一方、MPL と野生型 CALR の相互作用は、極めて弱いものであった。これらのことから、変異型 CALR は、MPL と強く相互作用することで、MPL 下流の JAK2 を恒常的に活性化することで、細胞を腫瘍化していることが明らかになった。

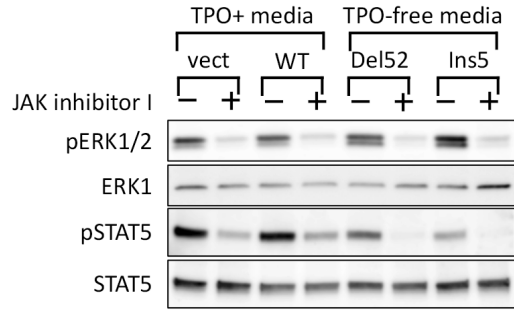


図3

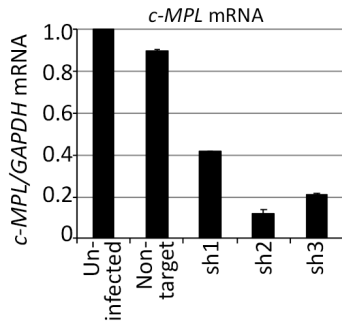


図4

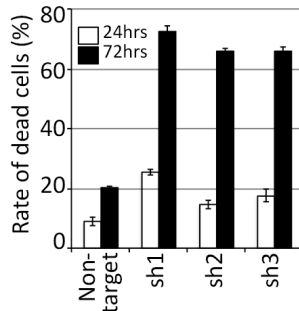


図5

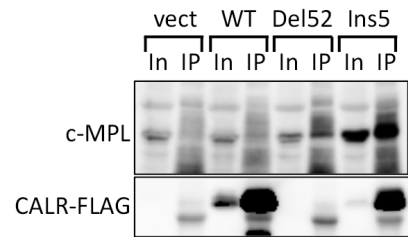


図6

(4) 変異型 CALR によるシグナル伝達経路活性化を引き起こす分子メカニズム

変異型 CALR をグリセロール密度勾配遠心により分画したところ、野生型に比べて、大きさが 2 倍以上になっていることを見出した (図 7)。共免疫沈降実験を行ったところ、変異型 CALR は、分子間で相互作用することが明らかになった (図 8)。一方で、野生型 CALR では、このような分子間相互作用は見られなかった (図 8)。これらのことから、変異型 CALR は、ホモ 2 量体を形成することで、MPL との結合能を獲得する構造変化を生じさせるとともに、ホモ 2 量体化した変異型 CALR がホモ 2 量体形成した MPL と結合することで、あたかもサイトカインのように MPL を活性化し、下流の JAK2 を恒常的に活性化することで、細胞の腫瘍化を引き起こしていることが明らかになった (図 9)。

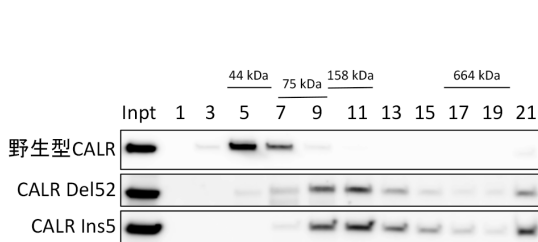


図7

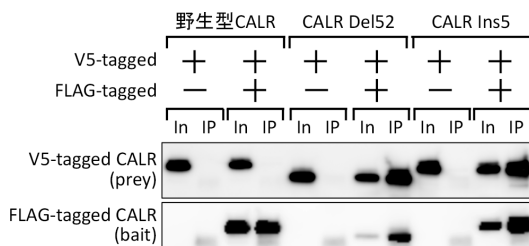


図8

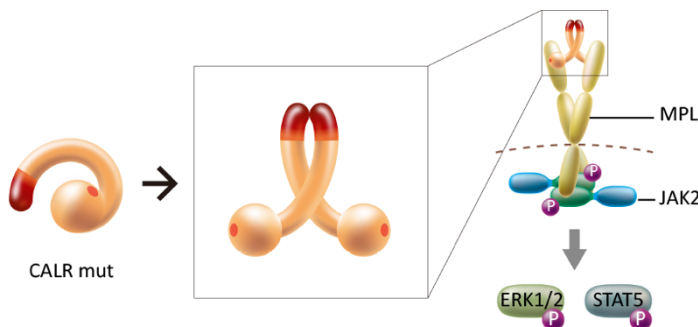


図9

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

1. Araki M, Yang Y, Imai M, Mizukami Y, Kihara Y, Sunami Y, Masubuchi N, Eda Hiro Y, Hironaka Y, Osaga S, Ohsaka A, Komatsu N: Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation. *Leukemia*. 2019;33(1);122-131
2. Takei H, Eda Hiro Y, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y, Imai M, Morishita S, Misawa K, Ochiai T, Tsuneda S, Endo H, Nakamura S, Eto K, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N: Skewed megakaryopoiesis in human induced pluripotent stem cell-derived haematopoietic progenitor cells harbouring calreticulin mutations. *Br J Haematol*. 2018;181(6);791-802
3. Araki M, Komatsu N: Novel molecular mechanism of cellular transformation by a mutant molecular chaperone in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Sci*. 2017;108(10);1907-1912

〔学会発表〕(計28件)

1. Araki M. The mechanism of the development of myeloproliferative neoplasms by mutant molecular chaperone. 第79回日本血液学会学術集会シンポジウム「骨髄系腫瘍とクリニカルシーケンス」. 東京; 2017; Oct 22.
2. Araki M. Activation of the Thrombopoietin Receptor by Mutant Calreticulin in CALR-Mutant Myeloproliferative Neoplasms. The Gordon Research Conference on Cell Biology of Megakaryocytes & Platelets. Lucca, Italy; 2017; Feb 26 - Mar 3.
3. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y, Kan S, Shirane S, Eda Hiro Y, Sunami Y, Ohsaka A, Komatsu N. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. 21st Congress of the European Hematology Association. Copenhagen, Denmark; 2016; June 9-12.

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小松 則夫

ローマ字氏名：KOMATSU, Norio

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：主任教授

研究者番号(8桁)：50186798

研究分担者氏名：森下 総司

ローマ字氏名：MORISHITA, soji

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：10635866

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：伊藤 昭博

ローマ字氏名：ITO, akihiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。