

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08319

研究課題名(和文)小胞体ストレスネットワーク制御による骨髄線維症制御へのアプローチ

研究課題名(英文)Enhanced ER stress response in MPN cells involved in development of myelofibrosis through secretion of GRP78

研究代表者

桐戸 敬太(KIRITO, Keita)

山梨大学・大学院総合研究部・教授

研究者番号：90306150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、骨髄増殖性腫瘍(MPN)細胞における小胞体ストレス亢進が、分子シャペロンタンパクGRP78の発現を誘導し、骨髄環境を改変し骨髄線維化進行に関わることを検証した。以下の事項について明らかにした。

(1)MPN細胞では、PERK-eIF2 γ -ATF4経路、XBP1およびATF6など様々な小胞体ストレス応答分子の活性化とGRP78の発現上昇が確認された(2)これらはJAK2V617F阻害剤およびmetforminにより抑制された。(3)MPN細胞と骨髄間質細胞株HS-5を共培養したところ、CAFの特徴である α -SMAおよび、lysyl oxidaseの発現が誘導されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MPNに併発する骨髄線維症は、造血不全による貧血進行、炎症性サイトカインの増加による倦怠感などの全身症状の増悪、髄外造血による脾腫の進行など生命予後のみならず生活の質を極めて不良とする。一方、その効果的な治療法は確立されていない。

本研究により、MPN細胞での小胞体ストレス亢進が起点となり、骨髄環境内にGRP78が放出されることが、骨髄線維芽細胞を活性化させ線維化進行につながるとのモデルを提示することができた。この結果より、骨髄線維化進行を抑制する新たな手段として、MPN細胞での小胞体ストレスの抑制、中和抗体などを用いた骨髄微小環境内におけるGRP78の機能抑制などへ発展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Initially, we confirmed activation of ER stress response molecules including ATF4, ATF6 and XBP1s in MPN derived cell lines. Enhanced expression of ATF4 were also found in primary megakaryocytes from MPN patients. GRP78, which regulates ER stress response as downstream effector of ATF4, were also elevated in MPN cells and secreted into culture media. Ruxolitinib, a relatively selective inhibitor for JAK kinase, blocked activation of ATF4 and reduced GRP78 secretion from MPN cells. For further study, we cultured MPN cells with human bone marrow derived fibroblast cell line, HS-5. Co-culture with MPN cells enhanced expression of alpha-smooth muscle actin, one of the important marker for cancer associated fibroblast. Expression of lysyl oxidase, an enzyme which mediates cross-linking of collagen fibers, was also increased. Taken together, enhanced ER stress response in MPN cells might contribute to development of myelofibrosis through GRP78-mediated activation of fibroblast.

研究分野：血液内科学

キーワード：小胞体ストレス 骨髄線維症 ATF4 MMP9 GRP78 Lysyl oxidase

1. 研究開始当初の背景

骨髄線維症(MF;Myelofibrosis)の合併は、骨髄増殖性腫瘍(MPN; myeloproliferative neoplasms)の生命予後のみならず生活の質を増悪させる因子として広く認識されていた。MF 進行のメカニズムとしては、MPN で高頻度に認められるドライバー遺伝子変異とエピゲノム制御系制御分子の機能異常が複合的に関与することがマウスモデル等で明らかになりつつあった。これらの複合的な異常により、TGF- β や TNF- α 等の炎症性サイトカインやケモカインの産生などが誘導され、骨髄微小環境において骨髄間質細胞を刺激することがその病態の中心であると想定されていた。このため、MF に対する治療戦略についても、遺伝子変異をターゲットした JAK 阻害剤や炎症性サイトカインを抑制する手法に力点がおかれ、開発が進んでいた。

一方、様々な造血系腫瘍においても、小胞体ストレスが亢進していること、これにともなって UPR(unfolded protein response)としても知られる小胞体ストレス応答経路が活性化されていることが明らかになりつつあった。造血系腫瘍における UPR 活性化は、オートファジーの制御を介して、薬剤耐性獲得や治療抵抗性に関与するとの報告がなされていた。加えて、UPR 経路分子群の中でも、転写因子 ATF4 とその下流の分子シャペロン GRP78 は様々ながん組織における線維化、プレオマイシンによる肺線維化、虚血性心疾患後の心臓の線維化、さらには肝臓線維化など多彩な臓器の線維化進行において、重要な役割をもつことが報告されていた。特に GRP78 はがん細胞から周囲に放出され、腫瘍局所の線維芽細胞を Cancer associated fibroblast(CAF)へと形質転換させ、線維化進行に関与することが報告されていた。

このような背景をもとにして、MPN における MF 進行について、MPN 細胞内での小胞体ストレスが亢進していること、これにより ATF4-GRP78 経路が活性化され、GRP78 の骨髄微小環境中への放出がおこり、周囲線維芽細胞を活性化するとの仮説モデルを構築するに至った。

2. 研究の目的

本研究課題では、MPN に併発する MF の進行について、小胞体ストレスを介した MPN 細胞と骨髄間質細胞とのネットワーク形成が重要であるとの仮説をたて、解明することを目的と定めた。このために、以下のような具体的な目標を設定した。

- (1) MPN 細胞では小胞体ストレス応答経路、特に ATF4-GRP78 経路の活性化を認めるか、
 - (2) 小胞体ストレス応答経路の活性化を認める場合には、ドライバー変異が関与しているのか、
 - (3) GRP78 が細胞外に放出されるのか、
 - (4) MPN 細胞が骨髄間質細胞を CAF に誘導しうるのか、またその場合には ATF4-GRP78 経路を介しているのか、
 - (5) ATF4 あるいは GRP78 の抑制により、MPN 細胞による骨髄間質細胞の CAF の形質転換を抑制することができるか。
- 上記の各項目について、順序立てて研究を行う計画とした。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

MPN 細胞のモデルとして、MPN を引き起こす代表的なドライバー変異である JAK2V617F 変異を有するヒト白血病細胞株 HEL および SET-2 細胞を用いた。他に、BCR-ABL 変異を有する細胞株 K562 および KU812, Flt3-ITD を有する細胞株 PL21, MOLM13 を用いた。

骨髄線維芽細胞のモデルとしては、ヒト骨髄線維芽細胞を不死化させることにより樹立された HS-5 細胞を用いた。

これらの細胞については、既報に従って細胞培養を行なった。

また、山梨大学医学部附属病院にて、診療を受け一般診療の一環として骨髄生検を受けた MPN 症例の骨髄生検検体を免疫組織化学的解析に用いた。(山梨大学医学部倫理委員会 承認番号) 原発性骨髄線維症 4 症例と真性多血症・本態性血小板増多症より移行した 3 例を解析している。

(2) MPN 細胞と HS-5 細胞との共培養

MPN 細胞と HS-5 との共培養には、Nunc Cell culture insert を用いた

(3) 阻害剤

JAK 阻害剤 Ruxolitinib, PERK 阻害剤 GSK, PERK 阻害剤 GSK265157 については、Cayman Chemical より購入した。

(4) ウェスタンブロッティング

細胞質および核における各細胞の発現については、既報に従いウェスタンブロッティング方にて解析を行なった。抗体については、抗 GRP78 抗体(Cell signaling, #3177), 抗 ATF4 抗体(Cell signaling, #11815), -smooth muscle actin 抗体(Cell signaling, #19245)を用いている。

(5) 免疫組織化学

MPN 症例の骨髄生検検体について、既報に従って免疫組織化学方によりタンパク発現を解析した。

(6) 細胞外への GRP78 の放出解析

HEL および SET-2 細胞の培養上清を回収し、スピンカラムを用いて 50 倍に濃縮した。このサンプルを用いて GRP78 の発現をウェスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

(1) MPN 細胞では小胞体ストレス経路が活性化している。

JAK2V617F 変異を要する細胞株 (HEL, SET-2) と BCR-ABL 陽性細胞株 (K562, KU812) および Flt3-ITD 変異陽性細胞株 (PL-21 および MOLM-3) について、定常状態における小胞体ストレス経路の活性化について、ウェスタンブロッティングを用いて解析した。MPN 細胞株では、PERK-eIF2a-ATF4 経路の各分子および XBP1 の活性化が強く確認された。また、ATF4 により発現が制御される分子シャペロン GRP78 の発現も上昇していた。

HEL および SET-2 細胞の培養上清を濃縮しウェスタンブロットで確認したところ、GRP78 が確認された。

骨髓生検検体を用いた解析では、骨髓線維症症例の巨核球では周囲の細胞質と比べ強い ATF4 の発現が確認されている。

(2) MPN 細胞における ATF4-GRP78 経路の活性化は JAK2V617F と PI3K/AKT 経路に依存している

MPN 細胞で認められた小胞体ストレス経路の活性化がドライバー変異である JAK2V617F に依存しているかを調べるために、JAK 阻害剤 ruxolitinib を用いた。Ruxolitinib は PERK-eIF2a 経路は抑制しなかったが、ATF4 の発現は高度に抑制した。これより、MPN 細胞における ATF4 の活性化は、JAK2V617F には依存するが、PERK-eIF2a を介するものではないと考えられた。ATF4 は PI3K/AKT 経路を介して制御されるとする報告もあるため、この経路の阻害剤である LY294002 を用いたところ、ATF4 の抑制が確認された。一方、PERK 阻害剤である GSK2656157 を用いた場合には、p-eIF2a は抑制されたが ATF4 の発現はむしろ増加することがわかった。GRP78 の発現についても、Ruxolitinib および LY294002 で抑制されたが、GSK2656157 の影響は受けなかった。

Metformin はビグアナイド系血糖降下剤であるが、細胞内の ATP レベルを低下させることにより、エネルギーセンサータンパク AMPK を活性化させる。ついで、mTOR 経路を抑制し、細胞内でのタンパク合成を抑制する。このため、過剰タンパク合成に伴う小胞体ストレスに対しては、抑制的に作用する。また、我々は Metformin が AMPK に加えタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A を活性化することにより JAK2V617F を抑制することを報告している (Exp. Hematology, 2016)。これより、metformin は MPN 細胞における ATF4 および GRP78 の発現を抑制するのではないかと考えた。実際に、metformin は PERK eIF-2a, ATF4 および XBP1 と広く小胞体ストレス応答を抑制していた。また、GRP78 の発現も抑制された。

Ruxolitinib および Metformin については、細胞内での GRP78 発現を抑制するのみならず、細胞培養上清中の GRP78 レベルをも低下させた。

(3) MPN 細胞が線維芽細胞に対して CAF 形質を誘導しうるか？

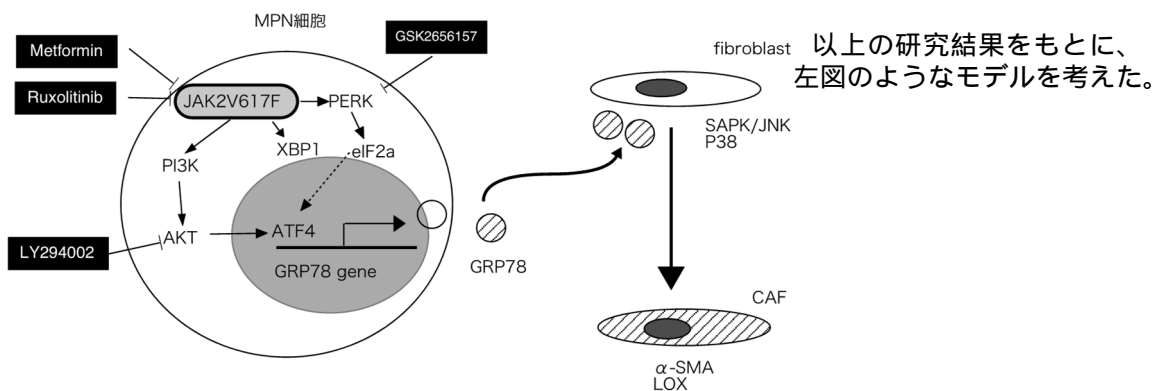
HS-5 細胞と HEL および SET-2 細胞を直接的な接触が可能な状態で培養をおこなったのち、浮遊している MPN 細胞を除去し、HS-5 細胞のみを回収した。MPN 細胞との共培養により、HS-5 において、pSAPK/JNK 経路および p38MAPK の活性化が認められた。また、 α -SMA および LOX の発現が上昇することも分かった。

trans-well system を用いて HS-5 と HEL および SET-2 の直接的なコンタクトを阻害した状態で共培養を行った場合にも、HS-5 における α -SMA および LOX の発現上昇が確認された。

また、pSAPK/JNK および p38 の活性化も確認された。

上記の培養系において、MPN 細胞を ruxolitinib で処理を行うと、HS-5 での α -SMA および LOX の誘導は抑制された。

MPN 細胞は様々なサイトカインを産生することから、HS-5 での α -SMA および LOX の発現上昇にもこれらのサイトカインが関与している可能性を想定した。これより、HS-5 を TGF- β 、IL-1 および TNF- α で処理を行ったが、 α -SMA および LOX の誘導は認められなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakajima Kei, Kawashima Ichiro, Koshiishi Megumi, Kumagai Takuma, Suzuki Megumi, Suzuki Jun, Mitsumori Toru, Kirito Keita	4. 巻 78
2. 論文標題 Glycolytic enzyme hexokinase II is a putative therapeutic target in B-cell malignant lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 46 ~ 55.e3
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2019.09.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kiladjian Jean-Jacques, Zachee Pierre, Hino Masayuki, Pane Fabrizio, Masszi Tamas, Harrison Claire N, Mesa Ruben, Miller Carole B, Passamonti Francesco, Durrant Simon, Griesshammer Martin, Kirito Keita et al.	4. 巻 7
2. 論文標題 Long-term efficacy and safety of ruxolitinib versus best available therapy in polycythaemia vera (RESPONSE): 5-year follow up of a phase 3 study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Lancet Haematology	6. 最初と最後の頁 e226 ~ e237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/S2352-3026(19)30207-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawashima Ichiro, Kumagai Takuma, Suzuki Megumi, Suzuki Jun, Koshiishi Megumi, Nakajima Kei, Kirito Keita	4. 巻 98
2. 論文標題 Molecular response of CSF3R T618I harboring chronic neutrophilic leukemia after induction chemotherapy linked to cord blood transplantation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2249 ~ 2250
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-019-03733-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawashima Ichiro, Fukasawa Hiroko, Kasai Kazunari, Kumagai Takuma, Koshiishi Megumi, Nakajima Kei, Kondo Tetsuo, Hashi Akihiko, Hirata Shuji, Kirito Keita	4. 巻 58
2. 論文標題 Bone Marrow Invasion of Small Cell Neuroendocrine Carcinoma of the Endometrium: A Diagnostic Pitfall Mimicking a Haematological Malignancy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2561 ~ 2568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2533-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimoda Kazuya, Takahashi Naoto, Kirito Keita, Iriyama Noriyoshi, Kawaguchi Tatsuya, Kizaki Masahiro	4. 巻 112
2. 論文標題 JSH Practical Guidelines for Hematological Malignancies, 2018: I. Leukemia-4. Chronic myeloid leukemia (CML)/myeloproliferative neoplasms (MPN)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 268 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02964-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kirito Keita	4. 巻 112
2. 論文標題 Myeloid neoplasm with isolated del(5q) and the MPLW515L mutation fulfills the WHO diagnostic criteria for ET	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 238 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02872-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kirito Keita	4. 巻 99
2. 論文標題 Expansion of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in MPLW515L mutation harboring primary myelofibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2707 ~ 2709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04088-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 桐戸敬太
2. 発表標題 8p11骨髄増殖症候群と類縁疾患
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 桐戸敬太、竹中克斗、池田和彦
2. 発表標題 骨髄線維症に対する治療 造血幹細胞移植か?薬物療法か?
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 細川 恵理子, 輿石 めぐみ, 鈴木 潤, 熊谷 拓磨, 鈴木 愛, 川島 一郎, 中島 圭, 桐戸 敬太
2. 発表標題 APL細胞の細胞表面マーカーの特徴と限界
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木愛、鈴木潤、輿石めぐみ、川島一郎、中島圭、三森徹、桐戸敬太
2. 発表標題 日本における二次性骨髄線維症の予後予測モデルの比較検討
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木潤、佐藤葉子、輿石めぐみ、鈴木愛、川島一郎、中島圭、桐戸敬太
2. 発表標題 骨髄増殖腫瘍における18F-FDG-PET/CT所見
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川島一郎、鈴木潤、熊谷琢磨、鈴木愛、輿石めぐみ、中島圭、桐戸敬太
2. 発表標題 CSF3RT618I変異検出により診断することができた慢性好中球性白血病
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Megumi Suzuki, Jun Shuzuki, Megumi Koshiishi, Ichiro kawashima, Kei Nakajima, Keita Kirito
2. 発表標題 Metformin suppresses expression of pre-fibrotic Enzyme Lysyl-oxidase levels through Inhibition of UPR in MPN cells
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Megumi Suzuki, Jun Shuzuki, Megumi Koshiishi, Ichiro kawashima, Kei Nakajima, Keita Kirito
2. 発表標題 Metformin suppresses expression of pre-fibrotic Enzyme Lysyl-oxidase levels through Inhibition of UPR in MPN cells
3. 学会等名 第60回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Minori Matsuura, Megumi Koshiishi, Eriko Hosokawa, Ayato Nakadate, Jun Suzuki, Takuma Kumagai, Megumi Suzuki, Ichiro Kawashima, Takeo Yamamoto, Masaru Tanaka, Keita Kirito
2. 発表標題 Possible link between the development of myelofibrosis and autoimmune action in AITL
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kei Nakajima and Keita Kirito
2. 発表標題 Aberrant regulation of extracellular matrix homeostasis by JAK2V617F
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 桐戸敬太
2. 発表標題 MPNにおける遺伝子変異解析：病態解明から臨床への橋渡し
3. 学会等名 第21回日本検査血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔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
研究 分担者	川島 一郎 (KAWASHIMA Ichiro) (20622369)	山梨大学・大学院総合研究部・助教 (13501)	
研究 分担者	三森 徹 (MITSUMORI Toru) (80377514)	山梨大学・大学院総合研究部・講師 (13501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------