

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16098

研究課題名（和文）骨髄増殖性腫瘍の治療標的分子の探索

研究課題名（英文）Search for target molecules for myeloproliferative neoplasms

研究代表者

増淵 菜弥（Masubuchi, Nami）

順天堂大学・医学（系）研究科（研究院）・特任助教

研究者番号：00791641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000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において見出されるcalreticulin (CALR)変異遺伝子産物が、変異型CALR発現細胞の細胞内分泌経路で、トロンボポエチン受容体(MPL)のN型糖鎖を認識して結合すること、細胞表面でMPLを活性化し、MPL依存性の細胞増殖を引き起こす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、「変異型の分子シャペロンが、サイトカイン受容体のアゴニストとして下流シグナルを恒常的に活性化することで細胞を腫瘍化する」という腫瘍生物学の新概念が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：This study showed followings: 1) the calreticulin mutant gene product found in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms binds to the N-glycan of the thrombopoietin receptor (MPL) in the secretory pathway; 2) mutant CALR activates MPL on cell surface; and 3) mutant CALR induces oncogenic transformation of the cells in a manner dependent on MPL.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 calreticulin 分子シャペロン トロンボポエチン受容体

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、研究者個人に帰属します。

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(**myeloproliferative neoplasms**,以下 **MPN** と略す)は、造血幹細胞に生じた体細胞変異によりクローナルな造血が起こり、一系統以上の血球が異常に増加する血液腫瘍である。現在 **MPN** 患者の治療に使用される薬剤は、患者の全身症状や脾腫を改善するものの、腫瘍細胞を選択的に排除できないため **MPN** の根治はできない。**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。

以前、**MPN** 患者の一部に共通して、小胞体に局在する分子シャペロンをコードしている **calreticulin (CALR)** 遺伝子の体細胞変異が報告されたが(**N Engl J Med. 2013;369:2379-90, 2391-2405**)、この遺伝子変異による **MPN** 発症の分子基盤は未解明であった。報告者らはこれまでに、変異型 **CALR** がサイトカインであるトロンボポエチン(**TPO**)の受容体 **MPL** と相互作用することで、下流シグナル分子を恒常的に活性化し、細胞を腫瘍化することを明らかにしている(**Blood. 2016;127:1307-16**)。 **MPN** の発症原因物質である変異型 **CALR** は、**MPL** を介して腫瘍化シグナルを発信することから、変異型 **CALR** による **MPL** 活性化の分子メカニズムを明らかにすることで、腫瘍特異性の高い分子標的薬の開発が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究課題では、**MPN** の治療標的分子の同定に資する、変異型 **CALR** による **MPL** 活性化の詳細なメカニズムを明らかにすることを目的として、以下の研究を行なった。

- (1) 細胞腫瘍化における変異型 **CALR** の細胞内局在の意義の解明
- (2) 変異型 **CALR** と **TPO** による **MPL** 活性化メカニズムの違いの検討
- (3) 変異型 **CALR** による細胞表面における **MPL** 活性化の検証

3. 研究の方法

- (1) 細胞腫瘍化における変異型 **CALR** の細胞内局在の意義の解明

タンパク質翻訳領域のカルボキシル末端に **FLAG** タグを付加し、シグナル配列(**SP**)を欠損させた 5 塩基挿入型の **CALR** 変異遺伝子(**CALR Ins5^{SP-FLAG}**)、別のタンパク質由来のシグナル配列を付加した **CALR** 変異遺伝子 (**CALR Ins5^{HSP90B1-FLAG}**, **CALR Ins5^{DNAJC10-FLAG}**, **CALR Ins5^{P4HB-FLAG}**)、野生型 **CALR** で報告されている糖鎖認識部位である 105 番目のチロシンをフェニルアラニンに、135 残基のアスパラギン酸をロイシンに変異を導入した **CALR** 変異遺伝子 (**CALR Ins5^{YD/FL-FLAG}**) を、レトロウイルスベクター **pMSCV-IRES-GFP** にクローニングした上でレトロウイルスを作製し、内在性に **MPL** を発現するトロンボポエチン(**TPO**)依存的なヒト細胞株(**UT-7/TPO**)に感染させ、セルソーターを用いて **GFP** 陽性のレトロウイルス感染細胞を純化した。これらの細胞における変異型 **CALR** の局在を、抗 **FLAG** 抗体とゴルジ体のマーカータンパク質に対する抗体(抗 **GM130** 抗体)を用いた免疫蛍光染色により解析するとともに、抗 **FLAG** 抗体を用いた免疫沈降法によって、**MPL** 結合能を評価した。さらに、**TPO** を含まない 10%ウシ胎児血清を含む **IMDM** 培地 100 μ l に細胞を 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。コントロールとして、**CALR** 変異遺伝子を導入していないレトロウイルスを感染させた **UT-7/TPO** 細胞(**UT-7/TPO vector**)と、**CALR** 変異遺伝子を発現する **UT-7/TPO** 細胞(**UT-7/TPO CALR Ins5-FLAG**)を用いた。

- (2) 変異型 **CALR** と **TPO** による **MPL** 活性化メカニズムの違いの検討

MPL の本来のリガンドである **TPO** による **MPL** の細胞内在化が観察できる細胞表面において、変異型 **CALR** によって **MPL** の挙動に違いが生じることを検討した。モデル細胞として、**MPN** 患者で最も高頻度に見出される 2 つの **CALR** 変異遺伝子である 52 塩基欠失型(**Del52**)もしくは **Ins5** のどちらかを発現する **UT-7/TPO** 細胞、対照に **UT-7/TPO** 細胞を用いた。細胞表面の **MPL** の挙動を捕捉するために、細胞表面への **MPL** の輸送を **Brefeldin A(BFA)**により停止させた上で、細胞表面タンパク質をビオチン標識してから、超音波破碎により細胞抽出液を調製し、アビジンを固定化したアガロース樹脂と反応させることで、ビオチン標識された細胞表面タンパク質を精製した。ビーズに結合したタンパク質を溶出、イムノブロット解析により、細胞表面の **MPL** の消失速度を測定した。さらに、細胞表面に存在する **MPL** の消失に伴う、**MPL** 下流シグナル分子の活性化の経時的な変化を解析するため、**BFA** 処理をした細胞を回収後、脱リン酸化阻害剤を添加したリン酸緩衝液で洗浄し、**RIPA** バッファーを用いて細胞抽出液を調製し、イムノブロット解析により **MPL** 下流シグナル分子のリン酸化状態を評価した。

- (3) 変異型 **CALR** による細胞表面における **MPL** の活性化の検証

細胞表面の変異型 **CALR** と **MPL** の相互作用を評価するために、**MPL** 遺伝子と **FLAG** タグを付加した **CALR** 変異遺伝子を **GFP** 遺伝子とともにリポフェクションにより一過性に発現させた **UT-7/TPO** 細胞を、細胞接着剤をコーティングしたスライドガラスに接着させた。細胞を

固定後、細胞表面の変異型 **CALR** と **MPL** を抗 **FLAG** 抗体と抗 **MPL** 抗体で標識し、核酸プローブ標識された2次抗体を反応後、近接するプローブ間で核酸を増幅、蛍光標識された増幅反応産物を蛍光顕微鏡で計測して（以後、近接ライゲーション法と呼ぶ）、変異型 **CALR** と **MPL** の相互作用を定量化した。

次に、変異型 **CALR** による **MPL** の活性化が生じる細胞内の場所を特定するために、細胞表面に局在する **MPL** を除去したときに、**MPL** の活性化状態の評価を行なった。変異型 **CALR** を発現する **UT-7/TPO** 細胞に **BFA** を反応させ、細胞を回収してリン酸緩衝液で洗浄後、トリプシンと **BFA** を含むリン酸緩衝液に懸濁し、細胞表面のタンパク質を物理的に取り除いた。残存する細胞表面の **MPL** 発現量を測定するために、細胞を回収して、蛍光標識された抗 **MPL** 抗体をウシ胎児血清を含むリン酸緩衝液に希釈した染色液に反応させ、フローサイトメーターで細胞表面の **MPL** の蛍光強度を測定した。また、この時の **MPL** 下流シグナル分子の活性化状態を評価するために、回収した細胞を脱リン酸化阻害剤を添加したリン酸緩衝液で洗浄、**RIPA** バッファーを用いて細胞抽出液を調製し、イムノブロット法により **MPL** 下流シグナル分子のリン酸化状態を評価した。コントロールとして、細胞内でシグナル分子の恒常的な活性化が起こる、**BCR-ABL** 遺伝子を発現させた **UT-7/TPO** 細胞を用いた。

4. 研究成果

(1)細胞腫瘍化における変異型 **CALR** の細胞内局在の意義

野生型 **CALR** は、C末端に小胞体保留シグナル配列(**KDEL** 配列)を有しており、組織横断的に小胞体に局在していることが知られている。一方で、変異型

CALR はフレームシフト変異により **KDEL** 配列を欠失しているため、細胞内で局在が大きく異なっていることが予想された。そこで変異型 **CALR** の細胞内局在を明らかにするために、細胞内蛍光免疫染色を行ったところ、変異型 **CALR** を発現する **UT-7/TPO** 細胞では、変異型 **CALR** は主に細胞内のゴルジ体(**Golgi**)に局在していた(図1)。一方で、野生型 **CALR** を発現する **UT-7/TPO** 細胞で、**CALR** は主に小胞体(**ER**)に局在していた(図1)。次に、変異型 **CALR** の細胞内分泌経路への局在が、**MPL** の活性化に必要なかを明らかにするため、細胞内分泌経路に乗るために必要なシグナル配列を欠失した変異型 **CALR** (**CALR Ins5^{SP}**)を発現する **UT-7/TPO** 細胞株を作成した。この細胞では、変異型 **CALR** のゴルジ体への局在が消失し(図2)、**MPL** との結合やサイトカイン非依存性の細胞増殖能も消失していた(図3)。逆に、別のタンパク質由来のシグナル配列を付加した変異型 **CALR** (**CALR Ins5^{HSP90B1}**, **CALR Ins5^{DNAJC10}**, **CALR Ins5^{P4HB}**)を発現する **UT-7/TPO** 細胞では、変異型 **CALR** のゴルジ体への局在(図4)と、**MPL** との結合とサイトカイン非依存性の細胞増殖能が維持されていた(図5)。続いて、分泌経路における変異型 **CALR** と **MPL** の相互作用の分子メカニズムについて検討を行なった。分子シャペロンである野生型 **CALR** は、小胞体で、新生タンパク質に付加した **N** 型糖鎖を認識して結合し、タンパク質の折りたたみを助けていることが知られている。この **N** 型糖鎖認識部位は変異型 **CALR** にも存在するため、変異型 **CALR** は **MPL** の **N** 型糖鎖を認識して結合している可能性が示唆された。そこで、**N** 型糖鎖認識部位に変異を導入した **CALR Ins5^{YD/FL}** を発現する **UT-7/TPO** 細胞を作成した。この細胞では、**CALR Ins5^{YD/FL}** は **MPL** と結合しておらず(図6)、サイトカイン非依存性の細胞増殖能も消失していた(図6)。これらのことから、変異型 **CALR** は、細胞内分泌経路上において **MPL** の成熟過程で付加される **N** 型糖鎖を認識して結合し、

サイトカイン非依存性の細胞増殖を引き起こすことが明らかになった。

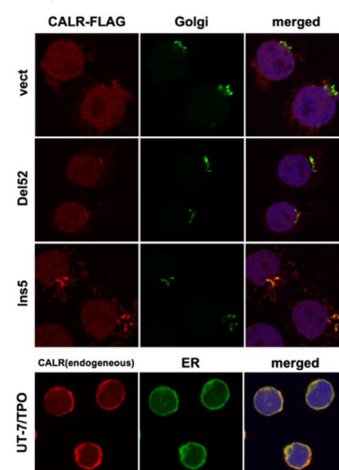


図1

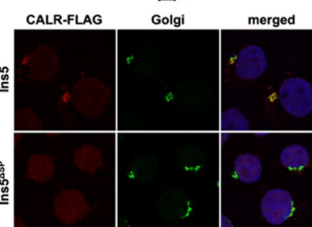


図2

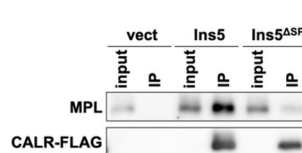


図3

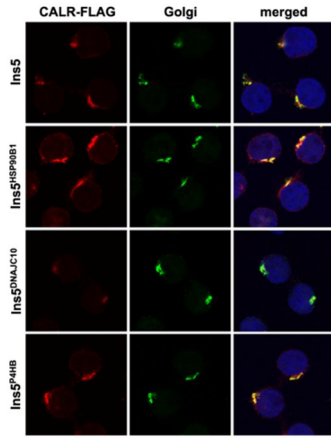


図4

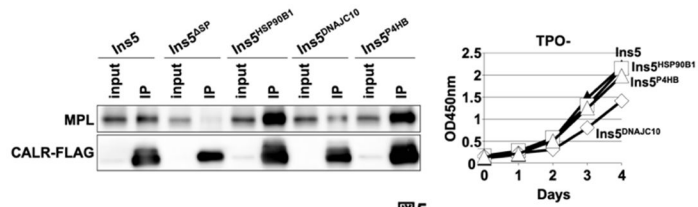


図5

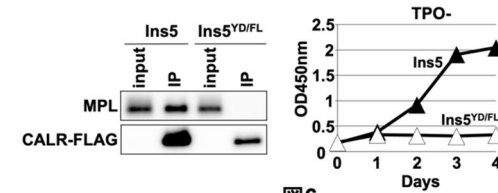


図6

(2) 変異型 CALR と TPO による MPL 活性化メカニズムの違いの検討

変異型 CALR による MPL の活性化が生じる細胞内における場所を特定するために、本来の MPL のリガンドである TPO による活性化が生じている細胞表面に着目して解析を行なった。TPO は、細胞表面の MPL と相互作用したあと、MPL の急速な細胞内化を引き起こしたが(図7) 変異型 CALR 発現細胞では、TPO 非存在下で MPL の細胞内化速度は低下していた(図7)。次に、MPL の活性化状態を下流シグナル分子 STAT5 と ERK のリン酸化状態により評価したところ、TPO による MPL の活性化が一過性であったのに対して、変異型 CALR による MPL の活性化は、より持続的であった(図8)。以上のことから、変異型 CALR による MPL の活性化は、TPO による MPL の活性化とは異なるメカニズムで生じていることが明らかになった。さらにこれらの結果は、変異型 CALR 発現細胞における MPL の活性化は、細胞内部、もしくは細胞表面で MPL の **internalization** を伴わずに持続的に生じている可能性を示した。

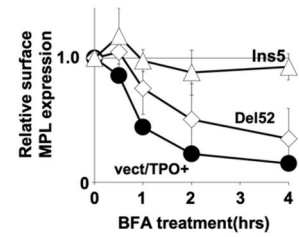


図7

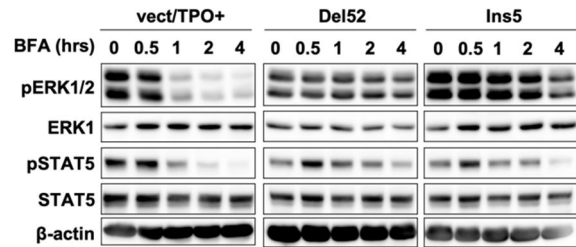


図8

(3) 変異型 CALR による細胞表面における MPL の活性化

変異型 CALR による MPL の活性化が生じる細胞内における場所を特定するために、まず、TPO による MPL の活性化が生じる細胞表面に着目して解析を行なった。まず細胞表面における変異型 CALR と MPL の相互作用について、近接ライゲーシオン法を用いて検討した。その結果、これらの分子が細胞表面において相互作用していることが明らかになった(図9)。次に細胞表面への MPL の輸送を停止した上で、プロテアーゼを用いて細胞表面の MPL を取り除いたところ、MPL 下流シグナル分子の STAT5 と ERK のリン酸化は減弱した(図10)。一方で、細胞内部でこれらの分子の活性化が生じている BCR-ABL 発現細胞では、同様の処理を行っても、STAT5 と ERK のリン酸化に変化はなかった(図11)。これらのことから、変異型 CALR による MPL の活性化は、主に細胞表面において持続的に生じていることが明らかになった。

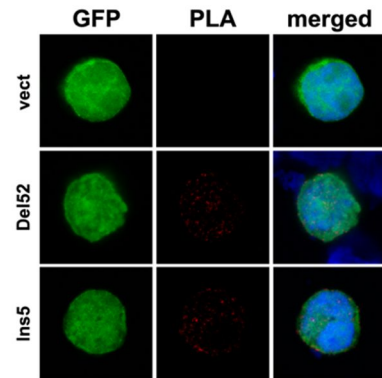


図9

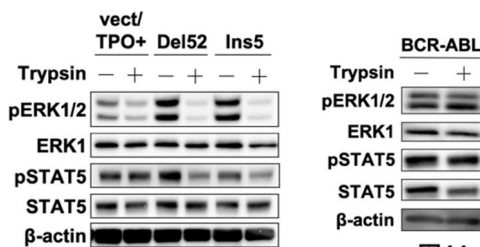


図10

図11

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masubuchi Nami, Araki Marito, Yang Yinjie, Hayashi Erina, Imai Misa, Edahiro Yoko, Hironaka Yumi, Mizukami Yoshihisa, Kihara Yoshihiko, Takei Hiraku, Nudejima Mai, Koike Masato, Ohsaka Akimichi, Komatsu Norio	4. 巻 34
2. 論文標題 Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 499 ~ 509
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-019-0564-z	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 Araki Marito, Yang Yinjie, Imai Misa, Mizukami Yoshihisa, Kihara Yoshihiko, Sunami Yoshitaka, Masubuchi Nami, Edahiro Yoko, Hironaka Yumi, Osaga Satoshi, Ohsaka Akimichi, Komatsu Norio	4. 巻 33
2. 論文標題 Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 122 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-018-0181-2	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 増淵 菜弥, 荒木 真理人, 楊 印杰, 林 英里奈, 今井 美沙, 枝廣 陽子, 弘中 由美, 水上 喜久, 木原 慶彦, 小池 正人, 大坂 顯通, 小松 則夫
2. 発表標題 変異型CALRはMPLと分泌経路で相互作用し細胞表面で活性化を引き起こす
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 増淵 菜弥, 荒木 真理人, 木原 慶彦, 楊 印杰, 今井 美沙, 水上 喜久, 林 英里奈, 弘中 由美, 竹井 拓, 枝廣 陽子, 大坂 顯通, 小松 則夫
2. 発表標題 分泌経路における変異型分子シャペロンとサイトカイン受容体の会合による細胞の腫瘍化
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木 真理人, 楊 印杰, 今井 美沙, 水上 喜久, 木原 慶彦, 角南 義孝, 増淵 菜弥, 枝廣 陽子, 弘中 由美, 大佐賀 智, 大坂 顯通, 小松 則夫
2. 発表標題 変異型CALRの多量体化はMPLとの結合と活性化に必須である
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 Araki M, Masubuchi N, Hayashi E, Yang Y, Imai M, Kihara Y, Mizukami Y, Hironaka Y, Edahiro Y, Ohsaka A, Komatsu N.
2. 発表標題 Boarding on the secretary pathway is required for the oncogenic property of mutant calreticulin
3. 学会等名 23rd Congress of the European Hematology Association (国際学会)
4. 発表年 2018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

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