

令和 3 年 6 月 28 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：18K16127

研究課題名(和文)細胞腫瘍化を引き起こす変異型CALR蛋白質の細胞内蓄積メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms governing intracellular accumulation of mutant CALR proteins

研究代表者

木原 慶彦(Yoshihiko, Kihara)

順天堂大学・医学部・博士研究員

研究者番号：70812999

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)：本研究では、骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症原因分子である変異型CALR蛋白質の細胞内蓄積制御メカニズムの解明を目的に研究を行った。その結果、多くの変異型CALR蛋白質が、既存の抗体で検出できない低分子量の型として存在することを見出した。プロテアーゼによる切断を受けたと考えられる低分子量の変異型CALR蛋白質に対する抗体を作出したところ、この抗体は全長と低分子量、いずれの変異型CALR蛋白質にも強く結合した。そこで、この抗体を基盤とするキメラ抗体や二重特異性抗体を作成し、CALR遺伝子変異を有するMPN患者に対する治療薬としての可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、世界に先駆けて、骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症原因分子である変異型CALR蛋白質の細胞内蓄積制御メカニズムが明らかになった。さらに、既存の抗体では検出されない低分子量の変異型CALR蛋白質の捕捉を可能とする抗体も開発できた。そして、この抗体がCALR遺伝子変異を有するMPN患者に対する治療薬として有望であることが示された。これらの研究成果は、CALR遺伝子変異によるMPN発症メカニズムを明らかにしただけでなく、変異型CALR蛋白質を標的とする新規治療戦略の開発の道筋を提示しており、学術的にも社会的にも意義深いと言える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the regulatory mechanism of intracellular accumulation of mutant CALR proteins that causes myeloproliferative neoplasms (MPNs). As a result, it was found that the majority of mutant CALR proteins exist as low molecular weight forms that could not be detected by existing antibodies. Antibodies against the low-molecular-weight mutant CALR protein that was thought to be cleaved by a protease(s) were generated. The antibodies bound strongly to both the full-length and low-molecular-weight mutant CALR proteins. Chimeric antibodies and bispecific antibodies based on the antibodies exhibited their potential as therapeutic agents for MPN patients with CALR mutations.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：造血器腫瘍 骨髄増殖性腫瘍 calreticulin 細胞内蓄積 蛋白質分解経路 蛋白質分泌経路 蛋白質の切断 抗体医療

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms: MPN) に分類されている本態性血小板血症 (ET) と原発性骨髄線維症 (PMF) は、骨髄中における巨核球の腫瘍性増殖により、それぞれ末梢血中の血小板の増加あるいは骨髄の線維化を呈する造血器腫瘍である。ET と PMF 患者の一部では、分子シャペロンをコードしている *CALR* 遺伝子の体細胞変異が見出される。これまでに報告者らは、*CALR* 変異遺伝子による MPN 発症メカニズムの解明を行い、変異型 *CALR* 蛋白質がホモ多量体を形成し、トロンボポエチン受容体 MPL と特異的に結合することで MPL を恒常的に活性化し、血球の腫瘍化を引き起こすことを明らかにしている。これにより、*CALR* 遺伝子変異による MPN 発症メカニズムは明らかになったが、腫瘍原性を有する変異型 *CALR* 蛋白質の細胞内における制御メカニズムには、未解明な部分が多く残されていた。

2. 研究の目的

野性型 *CALR* 蛋白質は、分子シャペロンとして主に細胞内の小胞体に局在しており、組織横断的な発現を示す極めて安定な蛋白質である。一方で、変異型 *CALR* 蛋白質は、培養細胞において同じプロモーターを使用して発現を誘導しても、野性型蛋白質に比べて著しく低い蓄積しか見られない。さらに、変異型 *CALR* 蛋白質は、*CALR* 遺伝子変異陽性患者の骨髄中の巨核球に強い蓄積が見られるのに対し、変異遺伝子の存在する顆粒球や単核球では変異型蛋白質の蓄積はほとんど見出されない。つまり、腫瘍化を引き起こされる巨核球細胞ではなんらかのメカニズムにより変異型 *CALR* 蛋白質が細胞内に高いレベルで維持されるのに対し、他の細胞では蛋白質の蓄積が抑制されていることが強く示唆されていた。そこで報告者は、*CALR* 遺伝子変異陽性の MPN 患者の腫瘍細胞を標的とした新たな治療戦略の開発に資する、変異型 *CALR* 蛋白質の細胞内における蓄積制御メカニズムの解明を目的に、本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 変異型 *CALR* 蛋白質の蓄積レベルの違いを生む分子メカニズムの解明

蛋白質の蓄積が抑制される原因として、転写あるいは翻訳の抑制、蛋白質分解あるいは蛋白質分泌の亢進が考えられた。これまでの解析から、変異型の mRNA に特異的な不安定性は確認されなかったことなどから、変異型 *CALR* は蛋白質の分解あるいは分泌により、蓄積が抑制されていると考えられた。そこで、蛋白質分解や蛋白質分泌の阻害剤を用いて、細胞内のそれぞれの経路を阻害した場合に、変異型 *CALR* 蛋白質の蓄積が見られるかについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) 変異型 *CALR* 蛋白質の蓄積は分泌経路によって規定される

野性型あるいは変異型 *CALR* 蛋白質を発現する UT-7/TPO 細胞株に、蛋白質合成阻害薬シクロヘキシミド (CHX) を作用させた後、継時的に細胞抽出液を調製し、残存する野性型あるいは変異型 *CALR* 蛋白質の量をイムノプロット法により定量した。その結果、変異型蛋白質は野性型蛋白質の 100 倍の速度で、細胞内から消失していることが見出された (図 1)。次に、上記の細胞に、CHX に加えてプロテアソーム阻害剤 MG132、リソソームおよびオートファジー阻害剤クロロキンをそれぞれ、あるいは組み合わせて作用させた後、細胞抽出液を調整し、野性型あるいは変異型 *CALR* 蛋白質の量をイムノプロット法により定量した。

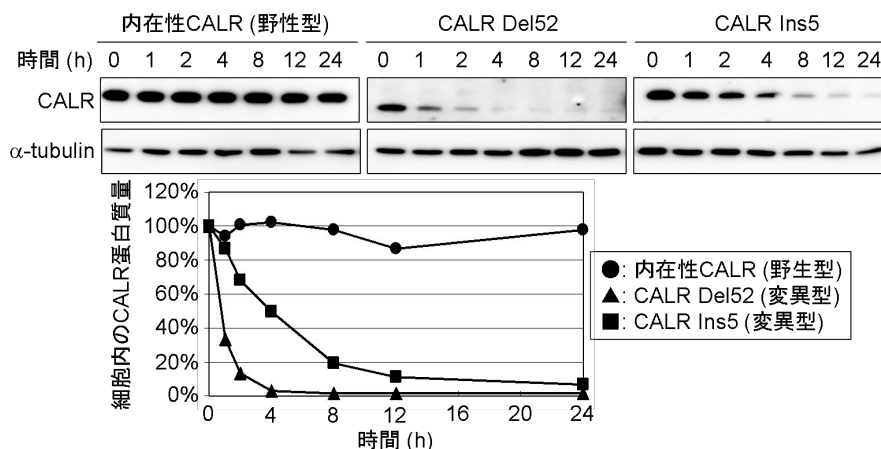


図1: 変異型*CALR*蛋白質は細胞内から速やかにクリアランスされる

予想に反して、いずれの蛋白質分解経路を阻害しても、変異型 *CALR* 蛋白質の顕著な蓄積は見られなかったことから (図 2)、変異型 *CALR* 蛋白質の消失に、蛋白質分解経路の関与は極めて限局的であることが明らかになった。次に、上記の細胞に、CHX に加えて蛋白質分泌経

路に対する阻害剤である BFA を作用させた後、細胞抽出液を調製し、野生型あるいは変異型 CALR 蛋白質の量をイムノブロット法により定量した。すると、変異型 CALR 蛋白質は、BFA 処理により顕著な蓄積が見られたことから、変異型 CALR 蛋白質の細胞内からの消失は、蛋白質分泌経路により規定されていることが明らかになった (図 3)。

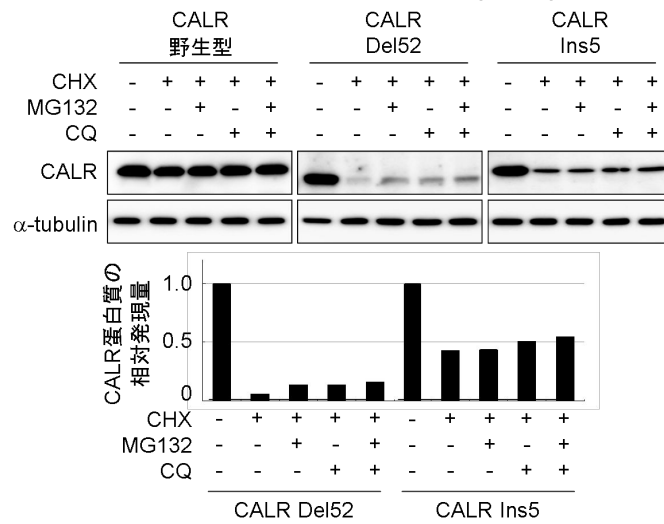


図2: 変異型CALR蛋白質の消失に蛋白質分解経路は関与しない

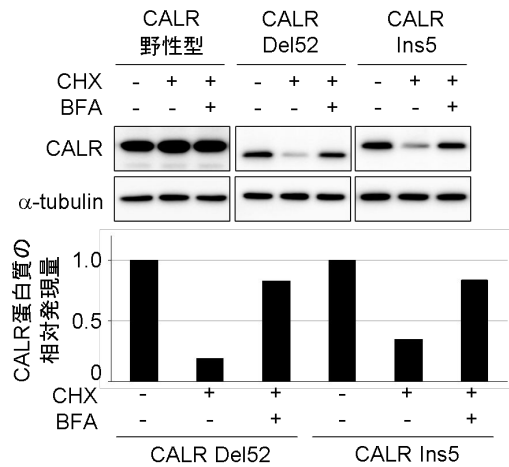


図3: 変異型CALR蛋白質の消失は蛋白質分泌経路により制御される

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1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 Yokomizo Tomomasa, Watanabe Naoki, Umemoto Terumasa, Matsuo Junichi, Harai Ryota, Kihara Yoshihiko, Nakamura Eri, Tada Norihiro, Sato Tomohiko, Takaku Tomoiku, Shimono Akihiko, Takizawa Hitoshi, Nakagata Naomi, Mori Seiichi, Kurokawa Mineo, Daniel G. Tenen, Osato Motomi, Suda Toshio, Komatsu Norio	4. 巻 216
2. 論文標題 Hlf marks the developmental pathway for hematopoietic stem cells but not for erythroid-myeloid progenitors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1599-1614
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1084/jem.20181399	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kihara Y, Araki M, Imai M, Fukuda Y, Mori Y, Taguchi T, Masubuchi N, Mabuchi Y, Yang Y, Mizukami Y, Morishita S, Akazawa C, Ohsaka A, Komatsu N
2. 発表標題 Therapeutic potential of myeloproliferative neoplasms by antibody targeting mutant calreticulin
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会 Plenary Session, 京都
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kihara Y, Araki M, Imai M, Mori Y, Horino M, Ogata S, Yoshikawa S, Taguchi T, Masubuchi N, Mabuchi Y, Yang Y, Fukuda Y, Morishita S, Suzuki T, Domae N, Shimonaka M, Akazawa C, Ohsaka A, Komatsu N
2. 発表標題 Therapeutic potential of an antibody targeting the cleaved form of mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms
3. 学会等名 62nd Annual Meeting & Exposition of American Society of Hematology, Online (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Inano T, Araki M, Morishita S, Imai M, Kihara Y, Okuda M, Ito M, Osaga S, Yang Y, Edahiro Y, Ochiai T, Misawa K, Fukuda Y, Ohsaka A, Komatsu N
2. 発表標題 Concomitant occurrence of polyclonal hematopoiesis and cell-autonomous megakaryopoiesis in triple-negative essential thrombocythemia
3. 学会等名 62nd Annual Meeting & Exposition of American Society of Hematology, Online (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木真理人, 稲野資明, 森下総司, 木原慶彦, 奥田真帆, 楊印杰, 今井美沙, 枝廣陽子, 伊藤雅文, 大佐賀智, 落合友則, 三澤恭平, 大坂顯通, 小松則夫
2. 発表標題 典型的なドライバー遺伝子変異の見いだされない本態性血小板血症の特徴
3. 学会等名 第30回日本サイトメトリー学会学術集会, 誌上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木原 慶彦, 増淵 菜弥, 張 黎臨, 荒木 真理人, 小松 則夫
2. 発表標題 抗TfR1抗体による真性多血症内因性赤芽球コロニーの形成阻害
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会, 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上 喜久, 荒木 真理人, 今井 美沙, 林 英里奈, 増淵 菜弥, 楊 印杰, 木原 慶彦, 弘中 由美, 大坂 顯通, 小松 則夫
2. 発表標題 変異型calreticulin特異的配列によるゴルジ体への局在
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会, 東京
4. 発表年 2019年

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, 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 水上 喜久, 荒木 真理人, 今井 美沙, 林 英里奈, 増淵 菜弥, 楊 印杰, 木原 慶彦, 弘中 由美, 大坂 顯通, 小松 則夫
2. 発表標題 変異型特異的配列による変異型CALRの細胞内局在の規定
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京
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, 東京
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 荒木 真理人, 楊 印杰, 増淵 菜弥, 林 英里奈, 水上 喜久, 木原 慶彦, 今井 美沙, 弘中 由美, 棚島 麻衣, 枝廣 陽子, 大坂 顯通, 小松 則夫
2. 発表標題 calreticulin変異による骨髄増殖性腫瘍発症の分子メカニズム
3. 学会等名 第29回日本サイトメトリー学会学術集会, 東京
4. 発表年 2019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 secretory pathway is required for the oncogenic property of mutant calreticulin
3. 学会等名 23rd Congress of European Hematology Association, Stockholm, Sweden (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 C Pecquet, T Balligand, I Chachoua, A Roy, G Vertenoeil, D Colau, E Fertig, C Marty, H Nivarthi, JP Defour, E Xu, E Hug, H Gisslinger, B Gisslinger, M Schalling, I Carola Casetti, E Rumi, D Pietra, C Cavalloni, L Arcaini, M Cazzola, N Komatsu, Y Kihara, et. al.
2. 発表標題 Secreted Mutant Calreticulins As Rogue Cytokines Trigger Thrombopoietin Receptor Activation Specifically in CALR Mutated Cells: Perspectives for MPN Therapy
3. 学会等名 60th Annual Meeting & Exposition of American Society of Hematology Plenary Session, San Diego, USA (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 切断型の変異型Calreticulinに結合する抗体、及び骨髄増殖性腫瘍の診断、 予防又は治療薬	発明者 荒木真理人、小松則夫、木原慶彦	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/008434	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 非公開	発明者 小松則夫、荒木真理人、木原慶彦ら、計7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-143551	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------