

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07880

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍におけるCALR変異に特異的な分子病態の解明と新規治療への応用

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular pathogenesis of myeloproliferative neoplasms with CALR mutations for the development of novel therapeutic strategies.

研究代表者

北中 明 (Kitanaka, Akira)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：70343308

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、骨髄増殖性腫瘍にみられる変異CALRがMPLシグナルを活性化する機序について、情報伝達機構における重要分子の解析を行った。その結果、Src選択的阻害薬PP2とBcr-Abl/Src阻害薬ボスチニブが、CALR変異導依存性の細胞増殖を抑制し、CALR変異により亢進したSTAT5の転写活性を抑制することを見出した。このうちボスチニブはヒト体内で到達可能な血中濃度において細胞増殖抑制作用を発揮した。血球細胞における主要なSrcファミリーであるLynを特異的に抑制したところ、CALR変異依存性の細胞増殖が阻害され、変異CALRによる情報伝達機構にLynが重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨髄増殖性腫瘍(MPN)の病態解明が著しく進歩し、病因となる変異遺伝子産物を標的とした新規薬剤JAK阻害薬が臨床応用されている。JAK阻害薬はMPN症例の多くに変異が認められるJAK2を標的としており、臨床症状の改善に有効であるが、血球減少の副作用がある。疾患の発症・進展に關与する変異型JAK2と、正常な造血の維持に必要な野生型JAK2の間で酵素活性を有する部分の構造に差異はなく、両者に異なった作用を示す阻害薬の開発は極めて困難である。本研究で見出した変異CALR下流分子の詳細を解明することは、これまでと異なった作用機序のMPN治療薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to identify key molecules in the intracellular signaling mechanism by which mutant CALR activates MPL-mediated signaling. We found that the Src-selective inhibitor PP2 and the Bcr-Abl/Src inhibitor bosutinib suppressed the proliferation of F-36P-MPL cells expressing CALR mutant and decreased the transcriptional activity of STAT5, which was enhanced by the expression of mutated CALR, in 293T cells. Of note, bosutinib inhibited cell proliferation at clinically achievable concentrations. Specific suppression of Lyn, a major Src family member in hematopoietic cells, inhibited mutant CALR-dependent cell proliferation, indicating that Lyn may play an important role in the signaling mechanism by mutant CALR.

研究分野：細胞内情報伝達機構

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 calreticulin チロシンキナーゼ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

赤血球の産生が亢進する真性赤血球増加症 (polycythemia vera: PV)、血小板の産生が亢進する本態性血小板血症 (essential thrombocythemia: ET)、骨髄で巨核球が増加し骨髄間質の線維化が生じる骨髄線維症 (primary myelofibrosis: PMF) の3疾患からなる骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms: MPN) では、サイトカインのシグナル伝達を担う JAK2 チロシンキナーゼ (PTK) の活性化変異 (JAK2V617F 変異) が高率に生じており、特に PV ではほぼ全例に JAK2 変異が認められることが明らかとなった。ET と PMF においては、JAK2V617F 変異や、JAK2 PTK の上流に位置するトロポポエチン (thrombopoietin: TPO) 受容体遺伝子 (MPL) の活性化変異などが約半数の症例で認められたものの、それらの変異を有さない症例について病因遺伝子は長らく不明であった。2013年、JAK2 と MPL 変異が陰性の症例の多くで小胞体においてタンパクの folding や輸送に関わるシャペロンとして知られている *Calreticulin* (CALR) の exon9 にフレームシフト変異が生じていることが報告された。われわれは、変異 CALR が MPL に作用し、下流シグナルを恒常的に活性化することで巨核球系の異常増殖を引き起こし、MPN 発症の原因となることを明らかとした (Shide et al. Leukemia 2017)。また、CALR 変異によって MPN を発症したモデルマウスの病勢が JAK 阻害薬 (ruxolitinib) によって緩和することを見いだしている。この知見は、JAK2 変異を有さない症例においても、MPN 下流に存在する JAK2 の PTK 活性が MPN の発症と病勢の維持に重要であることを示している。事実、ヒトの PMF についても、CALR 変異陽性 (=JAK2 変異陰性) 症例に対して ruxolitinib が脾腫や全身症候の緩和に有効であることが示されている。しかしながら、JAK2 の PTK 活性は正常な赤血球の産生に必須であることから、臨床的な ruxolitinib の使用には、治療強度を上げる目的で投与量を増加すると貧血が生じるという構造的な問題が存在する。このため JAK 阻害薬の改良による MPN 治療効果の増強については、過大な希望を持つことが出来ない。そこで、JAK2 以外の分子を標的とした新規治療の開発が期待されていた。なお、研究開始当初は、変異 CALR が MPL と細胞内または細胞外で会合すること、変異 CALR との会合に MPL の細胞外ドメインが必要であることなどが判明していたが、その機序の詳細は不明であった。また、変異 CALR に起因する MPN 発症機構における JAK2 PTK 以外の細胞内シグナル伝達分子の関与についても、その詳細は明らかではなかった。

新規薬剤のスクリーニングにはハイスループットなシステムが必要となる。疾患モデルとしての CALR 変異を有するトランスジェニック (TG) マウスについては、われわれを含む複数のグループによって作製されており、ET の病態を再現可能であることが判明しているが、その表現型は比較的マイルドであった。TG マウスを用いて薬剤の効果判定するためには、継続的な薬剤の投与と採血または組織の採取による病勢の評価を要することから、本モデルは複数の薬剤を用いた初期スクリーニングに適した実験系とは言えない。そこで、CALR 変異を有し、その存在に依存した増殖を示す細胞株が必要となったが、内因性 CALR 変異を有する既存の細胞株は ET より進展した急性白血病由来の MARIMO 細胞株のみであり、当該細胞では JAK-STAT 系依存性の増殖が観察されないことから、今回の目的には使用できなかった。また、すでに報告されているモデル細胞株は、ヒトまたはマウス細胞にヒト CALR 変異を導入することで作製されており、導入された遺伝子は強力なプロモーターの制御によって高発現を示す。過去の報告 (Chachoua et al. Blood 2016) から、変異 CALR が多量に存在する場合は、MPN 患者細胞内で特異的に活性化される MPL 以外のサイトカイン受容体も活性化されてしまうことが示唆されており、本来の特異性を失った可能性がある変異 CALR 高発現細胞株はスクリーニングの対象として最適とは言えない。われわれが CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子編集技術を用いて作製した CALR 変異導入 F-36P-MPL 細胞は、(1) サイトカイン非存在下での生存が CALR 変異に依存している、(2) 遺伝子発現は本来の CALR プロモーターによって制御されており、変異 CALR の発現量は実際の MPN 症例と同程度である、という点で独創的かつ有望な実験系であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、CALR 変異に依存性の増殖を示す細胞株ならびに、CALR 変異依存性の signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) 転写活性を定量的に観察可能なレポーターアッセイ系を用いて、変異 CALR によって誘起される細胞増殖促進効果ならびに STAT5 活性化を抑制する薬剤のスクリーニングを行う。スクリーニングによって抽出された候補薬剤のうち、JAK PTK 阻害と異なった作用機序を有するものを選択し、その効果を検証する。幅広い薬剤によるスクリーニングを行うことによって、従来と異なった視点から MPN の分子病態解明と新規治療薬の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) CALR 変異に依存性の増殖を示す細胞株を用いた薬剤スクリーニング

これまでの研究で、遺伝子編集技術を用いて作製したモデル細胞株である CALR 変異導入 F-36P-MPL 細胞は、本来の親株である F-36P-MPL 細胞が培地中にサイトカイン (IL-3、GM-CSF、TPO のいずれか) が存在しないとアポトーシスに陥り死滅するのに対し、サイトカイン非存在下であっても自律性の増殖を示す。この細胞の増殖を抑制する薬剤は、当該細胞がサイトカイン非存在

下で生存するために必要な変異 CALR 由来のシグナルを阻害している可能性がある。実際のスクリーニングは 96 ウェルプレートを用い、MTT アッセイによって細胞の生存率を測定することで行った。

(2) CALR 変異依存性の STAT5 転写活性を定量的に観察可能な一過性発現系を用いた候補薬剤の解析

われわれは、293T 細胞に CALR 変異を有するプラスミドを導入することによって、野生型 CALR の導入時と比較して 5~7 倍の STAT5 転写活性を検出することが可能なレポーターアッセイ系を構築している。前述のスクリーニングで抽出された薬剤が、変異 CALR によって誘起される STAT5 の転写活性上昇に及ぼす影響をレポーターアッセイによって検討した。

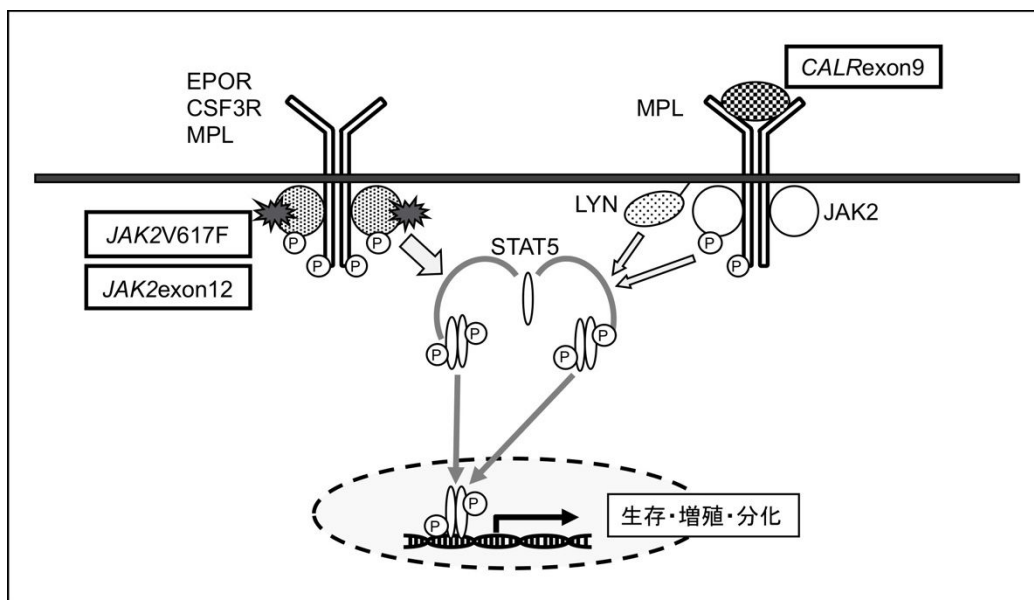
#### 4. 研究成果

複数の阻害薬、低分子化合物を使用してサイトカイン非存在下における CALR 変異導入 F-36P-MPL 細胞の細胞増殖を指標としたスクリーニングを実施した結果、MPN で変異が認められる JAK2 とは構造の異なる非受容体タンパク質 PTK である Src ファミリー PTK に対する阻害薬が、CALR 変異依存性の細胞増殖を抑制することが明らかとなった。Src 選択的阻害薬である PP2 は CALR 変異導入 F-36P-MPL 細胞の増殖を抑制し、CALR 変異の存在によって亢進した STAT5 の転写活性を低下させた。また、レポーターアッセイ系に PTK 活性を欠失したドミナント・ネガティブ変異体 *src* プラスミドを導入したところ、CALR 変異による STAT5 の転写活性は同様に抑制された。これらの結果から、JAK2 のみではなく、Src ファミリー PTK も、その PTK 活性を介して変異 CALR による STAT5 の転写活性上昇に関与している可能性が示された。

PP2 は実験用試薬であり、臨床の場で人体に投与することは不可能である。そこで、Src ファミリー PTK に対する阻害活性を有し、既に慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) 治療薬として臨床使用が行われている Bcr-Abl/Src 阻害薬ボスチニブを用いて同様の解析を行った。ボスチニブは、PP2 と同様に CALR 変異導入 F-36P-MPL 細胞の増殖を抑制し、CALR 変異依存性に上昇した STAT5 転写活性を低下させた。これらの作用は、ボスチニブが CML 治療薬として投与された際に人体で到達可能な血中濃度の範囲内において観察されたことから、ボスチニブが MPN 治療薬としての使用を目的とした臨床開発の対象となる可能性が示された。

次に、複数存在する Src ファミリー PTK うち、どのメンバーが変異 CALR による MPL 下流シグナルの活性化に中心的役割を果たすのかについて検討を行った。Lyn は血液細胞に高発現している Src ファミリー PTK であり、これまでに thrombopoietin, erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor などのサイトカイン刺激によって活性化することが報告されている。遺伝子サイレンシング技術を用いて CALR 変異導入 F-36P-MPL 細胞に発現する Lyn を特異的に抑制したところ、サイトカイン非存在下 (=CALR 変異依存性) の細胞増殖が抑制された。以上から、変異 CALR によって引き起こされる MPL を介した情報伝達機構に Lyn が重要な役割を果たしている可能性が示された (図)。

図 MPN の遺伝子変異とシグナル伝達モデル



JAK2 変異を有する MPN 細胞 (左) では、恒常的に活性化された変異 JAK2 が STAT5 をチロシンリン酸化、活性化する。CALR 変異を有する MPN 細胞 (右) では、変異 CALR が MPL と結合し、MPL 下流の野生型 JAK2、野生型 LYN を介して STAT5 をチロシンリン酸化、活性化する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kogure Y, Kameda T, Koya J, Yoshimitsu M, Nosaka K, Yasunaga JI, Imaizumi Y, Watanabe M, Saito Y, Ito Y, McClure MB, Tabata M, Shingaki S, Yoshifuji K, Chiba K, Okada A, Kakiuchi N, Nannya Y, Kamiunten A, Tahira Y, Akizuki K, Sekine M, Shide K, Hidaka T, Kubuki Y, Kitanaka A, Hidaka M, Nakano N, Utsunomiya A ほか17名	4. 巻 139
2. 論文標題 Whole-genome landscape of adult T-cell leukemia/lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 967 ~ 982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2021013568	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 Koya J, Saito Y, Kameda T, Kogure Y, Yuasa M, Nagasaki J, McClure MB, Shingaki S, Tabata M, Tahira Y, Akizuki K, Kamiunten A, Sekine M, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kitanaka A, Nakano N, Utsunomiya A, Togashi Y, Ogawa S, Shimoda K, Kataoka K	4. 巻 2
2. 論文標題 Single-Cell Analysis of the Multicellular Ecosystem in Viral Carcinogenesis by HTLV-1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 450 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-21-0044	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 Nomura K, Kitanaka A, Iwama H, Tani J, Nomura T, Nakahara M, Ohura K, Tadokoro T, Fujita K, Mimura S, Yoneyama H, Kobara H, Morishita A, Okano K, Suzuki Y, Tsutsi K, Himoto T, Masaki T	4. 巻 21
2. 論文標題 Association between microRNA-527 and glypican-3 in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 229
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.12490	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 Kurozumi N, Tsujioka T, Ouchida M, Sakakibara K, Nakahara T, Suemori SI, Takeuchi M, Kitanaka A, Shibakura M, Tohyama K	4. 巻 112
2. 論文標題 VLX1570 induces apoptosis through the generation of ROS and induction of ER stress on leukemia cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3302 ~ 3313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14982	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 Nakahata S, Syahrul C, Nakatake A, Sakamoto K, Yoshihama M, Nishikata I, Ukai Y, Matsuura T, Kameda T, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kitanaka A, Ito A, Takemoto S, Nakano N, Saito M, Iwanaga M, Sagara Y, Mochida K, Amano M, Maeda K, Sueoka E, Okayama A, Utsunomiya A, Shimoda K, Watanabe T, Morishita K	4. 巻 106
2. 論文標題 Clinical significance of soluble CADM1 as a novel marker for adult T-cell leukemia/lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 532 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.234096	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 北中 明	4. 巻 8
2. 論文標題 骨髄系腫瘍の臨床 慢性骨髄性白血病 移行期・急性転化期の慢性骨髄性白血病の病因・病態と治療	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 328-334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 小林美紀, 大倉 貢, 向井祐子, 勝原祐香里, 安福明子, 通山 薫, 北中 明	4. 巻 21
2. 論文標題 細胞形態の特徴から診断し得た病初期の急性前骨髄球性白血病の1症例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本検査血液学会雑誌	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 北中 明	4. 巻 68
2. 論文標題 造血器腫瘍のWHO分類改訂第4版(2017年)のポイント 骨髄系腫瘍	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床病理	6. 最初と最後の頁 139 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Sakakibara K, Tsujioka T, Kida JI, Kurozumi N, Nakahara T, Suemori SI, Kitanaka A, Arao Y, Tohyama K	4. 巻 110
2. 論文標題 Binimetinib, a novel MEK1/2 inhibitor, exerts anti-leukemic effects under inactive status of PI3Kinase/Akt pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of hematology	6. 最初と最後の頁 213 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02667-1	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4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木田潤一郎, 榊原佳奈枝, 辻岡貴之, 末盛晋一郎, 下田和哉, 通山 薫, 北中 明
2. 発表標題 Srcチロシンキナーゼ抑制によるCALR変異を有する骨髄増殖性腫瘍の増殖抑制
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榊原佳奈枝, 辻岡貴之, 木田潤一郎, 中原貴子, 末盛晋一郎, 北中 明, 荒尾雄二郎, 通山 薫
2. 発表標題 ヒト白血病細胞株における新規MEK1/2阻害剤ビニメチニブの効果
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 北中 明
2. 発表標題 血器腫瘍のWHO分類改訂第4版(2017)のポイント 骨髄系腫瘍
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林美紀, 大倉 貢, 向井祐子, 勝原祐香里, 安福明子, 北中 明, 通山 薫
2. 発表標題 血液形態診断のためのケースカンファレンス 前立腺癌治療中の好中球減少
3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 北中 明 (部分執筆)	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 552
3. 書名 スタンダード検査血液学 第4版	

1. 著者名 北中 明 (部分執筆)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医学書院	5. 総ページ数 2115
3. 書名 今日の治療指針 2020年版	

1. 著者名 北中 明, 通山 薫 (部分執筆)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 390
3. 書名 血液疾患最新の治療2020-2022	

〔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	通山 薫  (Tohyama Kaoru)  (80227561)	川崎医科大学・医学部・教授    (35303)	

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