

令和 3 年 5 月 12 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17532

研究課題名(和文) Calreticulin変異での骨髄増殖性疾患に伴う肺高血圧症のメカニズム解明

研究課題名(英文) Role of mutant calreticulin in pulmonary hypertension associated with myeloproliferative neoplasm

研究代表者

横川 哲朗 (Yokokawa, Tetsuro)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80748773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄由来CALR変異が、肺動脈中膜肥厚を伴って、低酸素誘導性肺高血圧症モデルを悪化させ、エンドセリン1の肺における発現を上昇させた。さらに、低酸素誘導性肺高血圧症モデルマウスの肺動脈周囲にはマクロファージが浸潤していたため、マクロファージを用いたin vitroの実験を行った。CALR変異陽性の骨髄由来マクロファージの、エンドセリン1の発現が増えていた。以上の結果より、CALR変異陽性骨髄細胞が、マクロファージやエンドセリン1を介したメカニズムによって、肺高血圧症を増悪させることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで明らかではなかった、CALR変異を有する骨髄増殖性疾患における肺高血圧症発症のメカニズムを、エンドセリン1に着目して解明した。

研究成果の概要(英文)：To investigate whether the hematopoietic CALR mutation contributes to pulmonary hypertension, we applied a bone marrow transplantation (BMT) with the donor cells from Calr with a 10-bp deletion knock-in mice or control wild-type (WT) mice. The recipient mice transplanted with bone marrow cells from Calr with a 10-bp deletion knock-in mice (Del-R mice) and WT mice (WT-R mice) were exposed to chronic hypoxia to induce pulmonary hypertension. After chronic hypoxia exposure, the right ventricular pressure in the Del-R mice was significantly increased compared to that in the WT-R mice. Hematopoietic Calr mutation accelerated pulmonary artery muscularization as well as elevation of endothelin-1 expression. Macrophage infiltration was observed under chronic hypoxia. Bone-marrow derived macrophages carrying Calr mutation showed increases in endothelin-1 expression. These results indicated a novel mechanism through endothelin-1 expression in pulmonary hypertension associated with CALR mutation.

研究分野：肺高血圧症

キーワード：肺高血圧症 CALR変異 骨髄増殖性疾患

## 1. 研究開始当初の背景

Calreticulin (CALR) 変異は 2013 年に報告された、骨髄増殖性疾患 (真性赤血球増多症、本態性血小板血症、骨髄線維症) の 2 番目に多い遺伝子変異の一つである。骨髄増殖性疾患は肺高血圧症をしばしば合併する。肺高血圧症は骨髄増殖性疾患における予後不良因子の一つであるが、その発症メカニズムについては不明である。

## 2. 研究の目的

CALR 変異を有する骨髄増殖性疾患が、肺高血圧症を発症するメカニズムを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

当施設で有する CRISPR-Cas9 法によって作成した 2 種類の CALR 変異ノックインマウスの内、本態性血小板血症と似た病態を呈する 10-deletion の CALR 変異ノックインマウスを用いた。骨髄増殖性疾患のモデルを作成するため CALR ノックインマウスの骨髄細胞を野生型マウスに移植した。さらに、肺高血圧症モデルを作成するため、低酸素チャンバーで 3 週間飼育し、低酸素誘導性肺高血圧症モデルを作成した。肺高血圧症は右心カテーテル検査による右室収縮期圧と Fulton's index で評価した。肺高血圧症の発症メカニズムの解明は、肺組織や骨髄由来マクロファージなどを用いて、ウェスタンブロット法やリアルタイム PCR 法、免疫染色などで行った。

## 4. 研究成果

CALR 変異陽性骨髄細胞を移植し低酸素チャンバーで飼育したマウスでは、野生型マウスの骨髄細胞を移植して低酸素チャンバーで飼育したマウスと比較し、病理学的に肺動脈中膜肥厚を呈し、さらに右室収縮期圧や Fulton's index が有意に上昇した。また、CALR 変異骨髄細胞を移植したマウスでは、肺におけるエンドセリン 1 の発現や STAT3 のリン酸化が上昇した。さらに、低酸素誘導性肺高血圧症モデルマウスの肺動脈周囲には、病理学的に F4/80 陽性マクロファージが浸潤していたため、マクロファージを用いた *in vitro* の実験を行った。CALR 変異ノックインマウスの骨髄細胞を Macrophage colony-stimulating factor を用いて培養し、CALR 変異陽性-骨髄由来マクロファージを作成。そのマクロファージを Lipopolysaccharide 投与下に培養したところ、野生型マウスの骨髄由来マクロファージと比較し、エンドセリン 1 の発現や STAT3 のリン酸化が増加していた。肺におけるマクロファージの由来を特定するため、GFP を過剰発現させた EGFP マウスと CALR 変異ノックインマウスを掛け合わせ、EGFP-CALR 変異ノックインマウスを作成。その骨髄細胞を野生型マウスに移植し、低酸素誘導性肺高血圧症モデルを作成した。肺動脈周囲の F4/80 陽性マクロファージは GFP 陽性であり、骨髄由来であることが確認された。以上の結果より、CALR 変異陽性骨髄細胞が、マクロファージやエンドセリン 1 を介したメカニズムによって、肺高血圧症を増悪させることを明らかとした。本研究結果は論文にて報告した。

また、本研究に関連した臨床研究として、循環器疾患患者における CALR 変異の頻度を

リアルタイム PCR 法にて調べたが、循環器内科へ通院中の肺高血圧症患者において、CALR 変異のアレルバーデンが高値となる患者を認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yokokawa T, Sugimoto K, Kimishima Y, Misaka T, Yoshihisa A, Morisaki H, Yamada O, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y.	4. 巻 59
2. 論文標題 A case of pulmonary hypertension and hereditary hemorrhagic telangiectasia related to an ACVRL1 mutation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 221-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2169/internalmedicine.3625-19	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 Yokokawa T, Yoshihisa A, Kiko T, Shimizu T, Misaka T, Yamaki T, Kunii H, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 Residual Gensini score is associated with long-term cardiac mortality in patients with heart failure after percutaneous coronary intervention.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Circ Rep	6. 最初と最後の頁 89-94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1253/circrep.CR-19-0121.	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 Sugimoto K, Yoshihisa A, Nakazato K, Yokokawa T, Misaka T, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Ishida T, Takeishi Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 Significance of pulmonary vascular resistance and diastolic pressure gradient on the new definition of combined post-capillary pulmonary hypertension.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int Heart J	6. 最初と最後の頁 301-307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.19-476	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 Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Minakawa K, Kaneshiro T, Yoshihisa A, Ikeda K, Takeishi Y.	4. 巻 3
2. 論文標題 Clonal hematopoiesis and JAK2V617F mutations in patients with cardiovascular disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JACC: CardioOncology	6. 最初と最後の頁 134-136
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 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 Minakawa K, Yokokawa T, Ueda K, Nakajima O, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Tomita Y, Miura S, Sato Y, Miura K, Sugimoto K, Nakazato K, Nollet KE, Ogawa K, Ikezoe T, Hashimoto Y, Takeishi Y, Ikeda K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Myeloproliferative neoplasm-driving Calr frameshift promotes the development of pulmonary hypertension in mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Hematol Oncol	6. 最初と最後の頁 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13045-021-01064-8.	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 Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Minakawa K, Sugimoto K, Ishida T, Morishita S, Komatsu N, Ikeda K, Takeishi Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Crucial role of hematopoietic JAK2V617F in the development of aortic aneurysms.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2020.264085.	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 Yokokawa T, Yoshihisa A, Misaka T, Sato T, Kaneshiro T, Oikawa M, Kobayashi A, Yamaki T, Kunii H, Takeishi Y.	4. 巻 60
2. 論文標題 Anti-mitochondrial antibodies in patients with dilated cardiomyopathy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Intern Med	6. 最初と最後の頁 201-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.5422-20.	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 Sugimoto K, Yokokawa T, Misaka T, Kaneshiro T, Yamada S, Yoshihisa A, Nakazato K, Takeishi Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Endothelin-1 upregulates activin receptor-like kinase-1 expression via G i/RhoA/Sp-1/Rho kinase pathways in human pulmonary arterial endothelial cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cardiovasc Med	6. 最初と最後の頁 648981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcvm.2021.648981.	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Sugimoto K, Ishida T, Takeishi Y.
2. 発表標題 JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasm is associated with aortic aneurysm
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田健斗, 三阪智史, 横川哲朗, 君島勇輔, 皆川敬治, 義久精臣, 池田和彦, 竹石恭知
2. 発表標題 Clinical significance of myeloproliferative neoplasm driver mutation-mediated clonal hematopoiesis in patients with cardiovascular diseases
3. 学会等名 第85回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Minakawa K, Sugimoto K, Ishida T, Ikeda K, Takeishi Y.
2. 発表標題 Crucial role of Jak2V617f-positive myeloproliferative neoplasm in the development of aortic aneurysm.
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wada K, Misaka T, Yokokawa T, Kimishima Y, Minakawa K, Kaneshiro T, Yoshihisa A, Ikeda K, Takeishi Y
2. 発表標題 Clinical significance of clonal hematopoiesis with JAK2V617F in patients with cardiovascular diseases
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sugimoto K, Yokokawa T, Misaka T, Yokokawa S, Nakazato K, Ishida T, Takeishi Y
2. 発表標題 Endothelin-1 increases ACVRL-1 expression at the transcriptional and post-transcriptional levels in human pulmonary arterial endothelial cells via Gi, RhoA and Rho kinase pathway with involvement of Sp-1
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Session 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Minakawa K, Sugimoto K, Ishida T, Ikeda K, Takeishi Y.
2. 発表標題 Hematopoietic JAK2V617F mutation exacerbates aortic aneurysm development.
3. 学会等名 The 64th Annual Scientific Meeting of The Korean Society of Cardiology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wada K, Misaka T, Yokokawa T, Kimishima Y, Minakawa K, Kaneshiro T, Yoshihisa A, Ikeda K, Takeishi Y
2. 発表標題 Clinical significance of clonal hematopoiesis with JAK2V617F in patients with cardiovascular disease
3. 学会等名 The 4th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yokokawa T, Misaka T, Kimishima Y, Wada K, Minakawa K, Sugimoto K, Ishida T, Ikeda K, Takeishi Y.
2. 発表標題 Crucial role of hematopoietic JAK2V617F mutation in the development of aortic aneurysms
3. 学会等名 The 4th JCS Council Forum on Basic CardioVascular Research
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------