

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17834

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍におけるエピゲノム異常の役割

研究課題名(英文) Role of Epigenomic alterations in Myeloproliferative neoplasms

研究代表者

上運天 綾子 (Kamiunten, Ayako)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：30800750

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)：CALR変異マウス、CALR変異/EZH2欠損マウスを作成し、解析を行った。いずれもETを発症したが、骨髄線維症や白血病は発症せず、生命予後は野生型と同等だった。次にCALR変異、CALR変異/EZH2欠損LSKを用いた競合移植を行ったところ、ETの発症は認めなかったが、キメリズム解析では野生型と比べキメリズムが上昇しており、CALR変異造血幹細胞の増殖能が高いことが示された。CALR変異/EZH2欠損LSK移植マウスとCALR変異LSK移植マウスではキメリズムの差は認められなかった。CALR変異に対してEZH2欠損が生じてもMFへの進展や幹細胞の分化能には影響を与えない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、骨髄増殖性腫瘍ではドライバー遺伝子の種類によってエピゲノム異常の与える影響が異なる事が明らかとなった。この結果により、CALR変異をもつ骨髄増殖性腫瘍の発症や急性転化に寄与するエピゲノム異常を同定し、新規治療薬の開発につながる事が期待できる。また、骨髄増殖性腫瘍患者のドライバー遺伝子やエピゲノム遺伝子変異の種類により予後の層別化を行い、新たな治療戦略の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：We generated CALR mutant mice and CALR mutant/EZH2-deficient mice. Both developed ET, but did not develop myelofibrosis or leukemia, and their survival time was equivalent to that of wild type mice.

Next, We performed competitive transplantation with CALR mutant LSKs or CALR mutant/EZH2-deficient LSKs. Although none of them developed ET, we observed increased percentage of donor-derived cells the mice transplanted with CALR mutant LSK or CALR mutant/EZH2-deficient LSK. No difference in chimerism was observed between CALR mutant/EZH2-deficient LSK transplanted mice and CALR mutant LSK transplanted mice. We found that EZH2 deficiency for CALR mutations does not affect progression to MF or the differentiation potential of stem cells.

研究分野：血液内科

キーワード：MPN ET myelofibrosis CALR EZH2

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍(myeloproliferative neoplasms: MPN)に分類される本態性血小板血症(essential thrombocythemia; ET)、原発性骨髄線維症(primary myelofibrosis; PMF)ではドライバー変異と想定されている JAK2 の変異が約 60%に、CALR の変異が約 25%に、トロンボポエチン受容体である MPL の変異がそれぞれ 5%、10%に認められる。さらに、TET2 機能喪失型変異(約 10%)や EZH2 の機能喪失型変異(約 5%)などのエピゲノム異常も認めるが、これらのエピゲノム異常の役割の詳細は明らかではない。また、ET や PMF において EZH2 変異を有する患者では白血病への急性転化の割合が高く、予後が不良である (Vannucchi et al. Leukemia 2013, Tefferi et al. blood 2016)が、急性転化に対する EZH2 変異の役割について詳細なメカニズムは明らかではない。

本研究では、現在までに申請者らの研究グループが明らかにした研究成果を元に、MPN におけるエピゲノム異常の役割や AML への急性転化に関連する未解明の課題にアプローチする。

2. 研究の目的

本研究では、ET と PMF におけるエピゲノム異常の役割、ET と PMF の白血病への急性転化に対するエピゲノム異常の役割、の 2 テーマの研究を行う。ET、PMF に対するエピゲノム異常の役割の病態を明らかにし、急性転化のメカニズムを解明することで MPN の急性転化の予防や急性転化後の治療法の進歩に資することが目標である。CALR 変異に加えエピゲノムの異常が PMF 発症に必要なことが明らかにできると、これらを標的とする治療法開発の根拠になることに加え、作成したマウスは CALR 変異を有する PMF を対象とする薬剤の薬効評価に有用であることが期待できる。

3. 研究の方法

テーマ ET と PMF におけるエピゲノム異常の役割

(1) CALR 変異マウス、CALR /EZH2 二重変異マウスを作成する。EZH2 変異は胎生致死、もしくは生後早期に死亡するため、EZH2 変異マウスに関しては造血細胞特異的欠損モデルを作成する。

(2) 作成したマウスの骨髄と脾臓における線維化の有無や芽球および巨核球数の変化、形態異常の有無、脾腫の有無や生命予後などの表現型を解析する。二重変異マウスが CALR 変異マウス、EZH2 変異マウスと比べて表現型にどのような影響を与えるかを明らかにする。

(3) CALR/EZH2 二重変異マウスに起きた表現型の責任経路をマイクロアレイもしくは RNAseq による遺伝子発現解析等によって明らかにする。この研究により MPN に対するエピゲノム異常の役割が明らかにできれば、これらを標的とする治療法開発への貢献が期待できる。

テーマ ET と PMF の白血病への急性転化に対するエピゲノム異常の役割

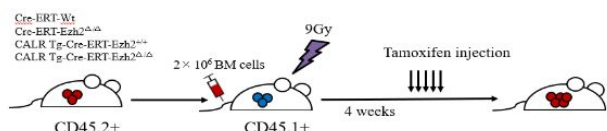
(1) CALR 変異マウス、CALR /EZH2 二重変異マウスを作成し、白血病の自然発症の有無を確認する。

(2) これらの遺伝子変異マウスの遺伝子変異の違いで白血病発症までの期間や頻度、白血病の表現型に差が生じるかを明らかにする。白血病を発症した場合、白血病細胞がどの遺伝子変異を有する骨髄細胞由来であるのかを明らかにする。

4. 研究成果

我々は ET を発症する CALR 変異マウスと血球細胞特異的 EZH2 欠損マウスを交配し、CALR 変異/EZH2 欠損マウスを作成して表現型の解析を行った。

CALR 変異マウス、CALR 変異/EZH2 欠損マウスは早期より ET の発症を認めたが、いずれも脾腫、骨髄や脾臓の線維化、白血病の自然発症を認めず(図 1)、生命予後にも差を認めなかった(図 2)。



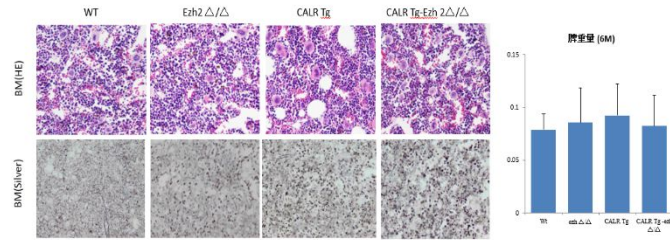


図1:各遺伝子変異を有するマウスの骨髄所見および脾重量

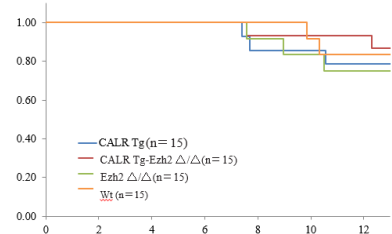


図2:各遺伝子変異を有するマウスの生存日数

次に、CALR 変異における EZH2 変異の造血幹細胞に及ぼす役割を解析するため、競合移植を行い長期観察を行った。約 1 年間の観察では、CALR 変異 LSK、CALR 変異/EZH2 欠損 LSK を移植したマウスの血球数は野生型マウスと同等で、ET の発症も認めなかった。骨髄のキメリズム解析では、CALR 変異 LSK を移植したマウスでは野生型 LSK 移植マウスと比べキメリズムが上昇しており、CALR 変異の造血幹細胞の増殖能が高いことが明らかとなった (図 3)。CALR 変異/EZH2 欠損 LSK 移植マウスは、CALR 変異 LSK 移植マウスと同等のキメリズムであり、両者に差は認められなかった。

JAK2 変異/EZH2 欠損マウスでは、EZH2 欠損により骨髄線維化の進展に関与する Hmga2 を含む PRC2 標的遺伝子の活性化がもたらされ、MF の発症の促進や生存が短縮されることが報告されている (Sashida et al. JEM 2016) が、CALR 変異では EZH2 欠損が生じてても MF への進展や幹細胞の分化能に影響は与えず、ドライバー遺伝子の種類によって、EZH2 欠損の与える影響は異なることを明らかにした。

Competitive BMT

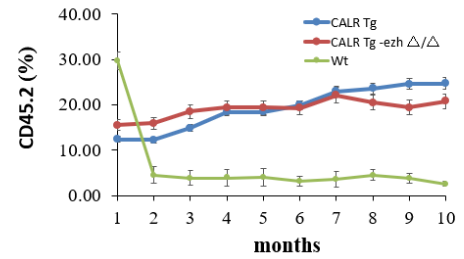
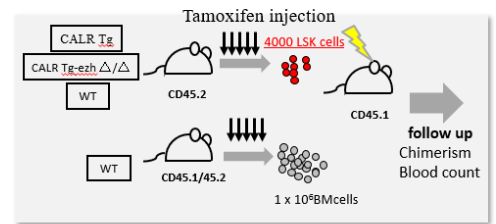


図3:CALR変異の造血幹細胞の増殖能

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 Shide Kotaro, Kameda Takuro, Kamiunten Ayako, Ozono Yoshinori, Tahira Yuki, Yokomizo-Nakano Takako, Kubota Sho, Ono Masaya, Ikeda Kazuhiko, Sekine Masaaki, Akizuki Keiichi, Nakamura Kenichi, Hidaka Tomonori, Kubuki Yoko, Iwakiri Hisayoshi, Hasuike Satoru, Nagata Kenji, Sashida Goro, Shimoda Kazuya	4. 巻 136
2. 論文標題 Calreticulin haploinsufficiency augments stem cell activity and is required for onset of myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 106-118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2019003358	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 Ozono Yoshinori, Shide Kotaro, Kameda Takuro, Kamiunten Ayako, Tahira Yuki, Sekine Masaaki, Akizuki Keiichi, Nakamura Kenichi, Iwakiri Hisayoshi, Sueta Mitsue, Hidaka Tomonori, Kubuki Yoko, Yamamoto Shojiro, Hasuike Satoru, Sawaguchi Akira, Nagata Kenji, Shimoda Kazuya	4. 巻 35
2. 論文標題 Neoplastic fibrocytes play an essential role in bone marrow fibrosis in Jak2V617F-induced primary myelofibrosis mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 454 ~ 467
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-020-0880-3	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kotaro shide, Ayako Kamiunten, Yoshinori Ozono, Takuro Kameda, Yuki Tahira, Keiichi Akizuki, Masaaki Sekine, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Kazuya Shimoda
2. 発表標題 Mechanism of enhanced IL1 production induced by JAK2V617F
3. 学会等名 the 82th Annual Meeting of the Japanese society of Hematology, OS-25-5, Kyoto JAPAN(WEB開催), Oct 10.2020(口演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuki Tahira, Kotaro shide, Yoshinori Ozono, Ayako Kamiunten, Takuro Kameda, Keiichi Akizuki, Masaaki Sekine, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Kazuya Shimoda
2. 発表標題 Myeloproliferative noplasm(MPN) nephropathy in Jak2V617F induced MPN mouse model
3. 学会等名 the 82th Annual Meeting of the Japanese society of Hematology, PS-12-6, Kyoto JAPAN(WEB開催), Oct 10.2020(ポスター)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ayako Kamiunten, Takuro Kameda, Yuki Tahira, Keiichi Akizuki, Masaaki Sekine, Kotaro shide, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Kazuya Shimoda
2. 発表標題 Loss of EZH2 does not affect the severity of murine myeloproliferative neoplasms with CALR mutation
3. 学会等名 The 83th Annual Meeting of the Japanese society of Hematology, OS2-7-3, Sendai Japan, Sep 24.2021(口演)
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
---------------------------	-----------------------	----

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