

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08424

研究課題名(和文) 遺伝子変異を伴わないトロンボポエチン受容体の自律的活性化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidate the autonomous activation mechanism of thrombopoietin receptor without genetic mutation

研究代表者

楊 インジェ (Yang, Yinjie)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：90808643

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)：本研究は、フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPNs)患者で見出される3種類の主なドライバー遺伝子変異の検出されないtriple-negative (TN)症例の診断に有効な新たなマーカーの同定を目的に、TN-MPNのモデル細胞として作出した、サイトカイン非依存性にMPL活性化の生じているBa/F3-MPL-FR細胞を用いて解析を行った。その結果、Ba/F3-MPL-FR細胞の自律性増殖に関与する遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子はMPNとの関連が報告されていない遺伝子であり、本研究によりMPLの自律性活性化を引き起こす新たなメカニズムが存在する可能性が初めて示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄増殖性腫瘍(MPNs)のうち、遺伝子変異の検出されないTN症例は診断に難渋することから、TN-MPN症例の診断に有効な新たなマーカーの同定と発症メカニズムの解明が求められている。本研究により明らかにされた遺伝子が、MPLの自律性活性化に関与することが明らかになれば、TN-MPN患者の診断や治療薬の開発の進展が大いに期待できる

研究成果の概要(英文)：This study aims to identify new markers effective for diagnosing triple-negative (TN) cases of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPNs), in which three major driver mutations are not found. We conducted studies using Ba/F3-MPL-FR cells, a model of TN-MPNs that exhibit cytokine-independent activation of MPL. As a result, multiple genes involved in the autonomous proliferation of Ba/F3-MPL-FR cells were identified. These genes have not been previously reported to be associated with MPNs. This study is the first to suggest the possibility of a novel causing autonomous activation of MPL.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 triple-negative 造血幹細胞 トロンボポエチン受容体

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。**MPN** のドライバー遺伝子変異として、造血幹細胞の維持や巨核球の増殖に必要なトロンボポエチン受容体の **MPL** を恒常的に活性化する変異が複数同定されている。しかし、これらの遺伝子変異の検出されない **triple-negative(TN)**症例が存在し、診断に難渋することから、**TN-MPN** 症例の診断に有効な新たなマーカーの同定と発症メカニズムの解明が求められている。

これまでに研究代表者らは、大部分の **TN-MPN** 症例では体細胞変異が見いだされないこと、**TN-MPN** 患者の造血幹細胞が自律的に巨核球に分化することを明らかにしている。これは、造血幹細胞の維持や巨核球造血を担っている **MPL** には、遺伝子変異に依存しない自律的な活性化機構が存在することを示唆している。さらに研究代表者らは、**IL-3** 依存性に増殖する **Ba/F3** 細胞に **MPL** を発現させた **Ba/F3-MPL** 細胞から、**IL-3** や **TPO** 非依存性に細胞増殖する **Ba/F3-MPL-FR** 細胞を作出した。**Ba/F3-MPL-FR** 細胞では、**TPO** 非依存性にシグナル伝達経路の自律的な活性化を引き起こしていたことから、この **Ba/F3-MPL-FR** 細胞では、**TN-ET** で見いだされた遺伝子変異に依存しない **MPL** の恒常的な活性化が生じていることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究では、**TN-ET** の迅速な診断や発症原因を標的とした治療法の開発に資する、**TN-ET** の分子病態の解明を目指して、**Ba/F3-MPL-FR** 細胞における **MPL** の自律的な活性化が生じる分子メカニズムを解明することを目的として、以下の研究を行なった。

(1)**RNA-seq** 解析による遺伝子変異に依存しない恒常的な **MPL** の活性化を引き起こす遺伝子の探索

(2)網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングによる遺伝子変異に依存しない恒常的な **MPL** の活性化を引き起こす遺伝子の探索

3. 研究の方法

(1)**RNA-seq** 解析による遺伝子変異に依存しない恒常的な **MPL** の活性化を引き起こす遺伝子の探索

Ba/F3-MPL-FR 細胞の **MPL** の自律的な活性化に関与する遺伝子を同定するため、**TPO** 存在下で培養した **Ba/F3-MPL** 細胞とサイトカイン未添加で培養した **Ba/F3-MPL-FR** 細胞から精製した **RNA** を用いて **RNA-seq** 解析を行った。**RNA-seq** リードデータは **STAR (ver. 2.5.3a)** を用いてマウスゲノムリファレンス配列 (**mm10**) にアライメントした後、得られた **BAM** ファイルから **subread (ver. 1.5.3)** に含まれるプログラム群のひとつである **feature Counts** を用いて遺伝子単位のリードカウントデータを抽出した。その後、**R (ver. 3.6.1)** のパッケージのひとつである **edgeR (ver. 3.26.8)** による尤度比検定を用いて **Ba/F3-MPL** 細胞と **Ba/F3-MPL-FR** 細胞における遺伝子発現量の比較解析を行い、**Ba/F3-MPL-FR** 細胞で発現が亢進している遺伝子を同定した。

次に、これらの遺伝子が **MPL** の自律的な活性化に関与していることを示すために、遺伝子発現抑制による細胞増殖に対する影響を解析した。まず、これらの遺伝子の **shRNA** を作成し、レンチウイルスベクター **pLKO.3R** にクローニングしたベクターからレンチウイルスを作製し、**Ba/F3-MPL-FR** 細胞に感染させた。この細胞を **IL-3** 添加培地で **48** 時間培養した後、**IL-3** 未添加培地で培養し、経時的に細胞を回収してトリパンブルー染色によって再細胞数の割合を解析した。さらに、**shRNA** 発現による遺伝子発現の抑制を解析するために、**shRNA** を発現する **DsRed** 陽性細胞をセルソーターを用いて分取した後、**RNA** を精製し、**RT-qPCR** 解析を行なった。

また、同定した遺伝子を過剰発現することで、**MPL** の活性化が亢進することを示すために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行なった。ヒト胚性腎臓細胞株の **HEK293T** 細胞に、**MPL** 下流シグナル分子の **STAT5** プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだ **pGL4.52[luc2P STAT5 RE Hygro]** vector と、内部標準コントロールとして **The pRL-TK vector** を、**MPL** と候補遺伝子の発現ベクターとともに導入した上で、**TPO** 添加または未添加で培養し、ルシフェラーゼ酵素の活性を発光量として定量することで **STAT5** の活性化を定量した。

(2)網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングによる遺伝子変異に依存しない恒常的な **MPL** の活性化を引き起こす遺伝子の探索

Ba/F3-MPL-FR 細胞の **MPL** の自律的な活性化に関与する遺伝子を同定するため、**CRISPR-Cas9** ライブラリーによるゲノムワイドな遺伝子ノックアウトスクリーニングを行った。**Ba/F3-MPL-FR** 細胞に全遺伝子をノックアウトできるように設計されたガイド **RNA** を組み込んだライブラリーを導入し、**IL-3** 添加、または未添加の培地で **Ba/F3-MPL-FR** 細胞を培養し、**Model-**

based Analysis of Genome-wide CRISPR-Cas9 Knockout (MAGeCK)パッケージを用いた解析により、IL-3未添加でMPL自律性活性化を起こさなかった細胞に導入されたガイドRNAに対応する遺伝子を同定した。

4. 研究成果

(1)RNA-seq解析による遺伝子変異に依存しない恒常的なMPLの活性化を引き起こす遺伝子の探索

Ba/F3-MPL-FR細胞におけるMPLの自律的活性化に関与する遺伝子を同定するために、Ba/F3-MPL細胞とBa/F3-MPL-FR細胞から精製したRNAのRNA-seq解析を行い、遺伝子発現を比較した。Ba/F3-MPL-FR細胞における発現変動率および平均発現量を用いてMAプロットを作製し、発現変動遺伝子を同定した(図1)。その中でも発現変動率が大きく、細胞膜で働くと予想される遺伝子の、*Rh Associated Glycoprotein(Rhag)*、*Pro-Platelet Basic Protein(Pbbp)*、*Kell Metallo-Endopeptidase (Kel)*、*WW Domain Containing Transcription Regulator 1(Wwtr1)*、をMPL活性化に関与する候補遺伝子として抽出した。また、これら

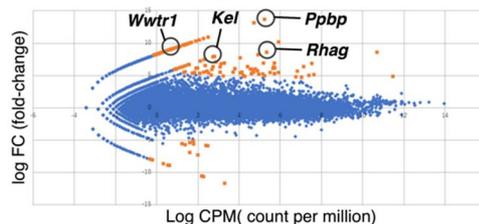


図1

の遺伝子は、TN-MPN患者の血小板に含まれるRNAでも発現していた。そこで、これらの遺伝子に対するRNA干渉用のshRNAを複数種類設計し、レンチウイルスベクターを用いて細胞に導入した。この細胞をIL-3未添加培地で培養すると、Rhag遺伝子に対するshRNAを導入した細胞と、Pbbp遺伝子に対するshRNAを導入した一部の細胞で生細胞率が著しく減少した(図2)。なお、これらの細胞ではRhagまたはPbbp遺伝子の発現が抑制されていることは、RT-qPCR法により確認している(図3)。そこで、これらの遺伝子がMPLの自律性増殖に関与することを明らかにするために、ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、MPLの下流シグナル分子であるSTAT5の転写

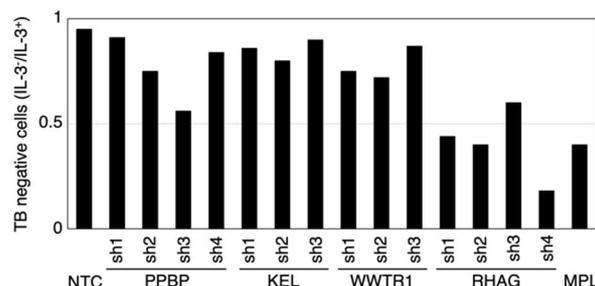


図2

活性を解析した。しかし、Rhag遺伝子をMPL遺伝子とともに発現させても、TPO未添加でSTAT5の著しい活性化は観察されなかった(図4左)。一方で、Pbbp遺伝子をMPL遺伝子とともに発現させるとTPO未添加でSTAT5活性化が見られたが、Pbbp遺伝子単独発現でもSTAT5活性化が見られたため、MPL非依存的なSTAT5活性化が起きていることが明らかになった(図4右)。よって、これらの遺伝子はBa/F3-MPL-FR細胞のMPL活性化による自律的増殖に関与している可能性は低いと考えられた。

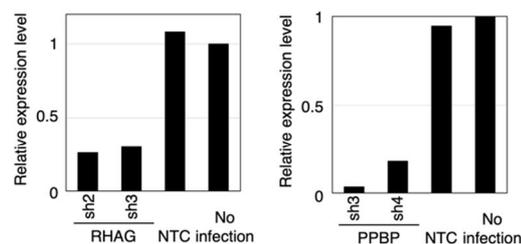


図3

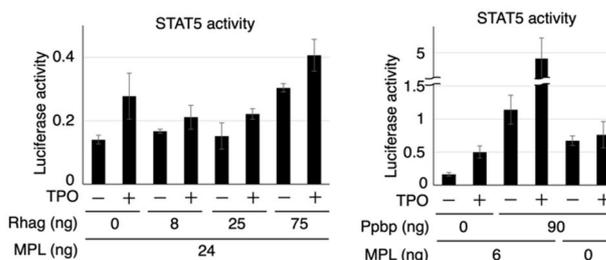


図4

(2)網羅的遺伝子ノックアウトスクリーニングによる遺伝子変異に依存しない恒常的なMPLの活性化を引き起こす遺伝子の探索

(1)とは異なる方法で、Ba/F3-MPL-FR細胞におけるMPLの自律的活性化に関与する遺伝子を同定するため、CRISPR-Cas9ライブラリーによるゲノムワイドな遺伝子ノックアウトスクリーニングを行った。IL-3未添加でMPL自律性増殖を起こさなかったBa/F3-MPL-FR細胞に導入されたガイドRNAに対応する遺伝子を同定した結果、c-AMP dependent PKA pathwayに関連する遺伝子を複数同定した。本研究により、MPLの自律性活性化に特定のpathwayが関与する可能性が初めて示された。

今後のより詳細な解析により、リガンド非依存的なMPLの活性化に関与する遺伝子が同定され、TN-ETの発症メカニズムの解明が進むことが大いに期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shumpei Yoshikawa, Marito Araki, Yoshihiko Kihara, Nami Masubuchi, Yinjie Yang, Soji Morishita, Misa Imai, Yoko Edahiro, Miki Ando, Norio Komatsu.
2. 発表標題 Elucidation of the molecular mechanism for the cleavage of mutant calreticulin.
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Satoko Ogata, Marito Araki, Yoshihiko Kihara, Maho Okuda, Soji Morishita, Misa Imai, Nami Masubuchi, Yosuke Mori, Yang Yinjie, Syunpei Yoshikawa, Tomonori Ochiai, Shuichi Shirane, Yoko Edahiro, Jun Ando, Norio Komatsu.
2. 発表標題 Quantitative measurement of mutant calreticulin in specimens of myeloproliferative neoplasm patients.
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021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
研究分担者	小松 則夫 (Komatsu Norio) (50186798)	順天堂大学・医学部・特任教授 (32620)	
研究分担者	今井 美沙 (Imai Misa) (50709003)	順天堂大学・大学院医学研究科・非常勤助教 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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	荒木 真理人 (Araki Marito) (80613843)	順天堂大学・大学院医学研究科・客員教授 (32620)	

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