

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16250

研究課題名（和文）変異型CALR蛋白質の切断による骨髄増殖性腫瘍発症の抑止

研究課題名（英文）Suppression of myeloproliferative neoplasm development by cleavage of mutant CALR

研究代表者

木原 慶彦（Kihara, Yoshihiko）

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症原因分子である変異型CALR蛋白質に生じる特異的切断の分子メカニズムの解明を目的に研究を行なった結果、変異型CALRの切断に関与するプロテアーゼを同定した。さらにこれらのプロテアーゼが、CALR遺伝子変異を持つMPN患者由来の造血幹細胞と巨核球系細胞においても、変異型CALRの切断に関与する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(MPN)の発症原因分子である変異型CALR蛋白質の切断に関与するプロテアーゼを、世界に先駆けて同定した。このプロテアーゼを用いて、変異型CALR蛋白質の切断を利用した新規治療戦略の開発の可能性が示されたことから、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）：To elucidate the molecular mechanism of the specific cleavage that occurs in mutant Calreticulin (CALR) protein that causes Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms (MPN), we identified proteases involved in the cleavage of mutant CALR. We further demonstrated that these proteases are also involved in the cleavage of mutant CALR in hematopoietic stem cells and megakaryocytic cells derived from MPN patients with CALR mutation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 カルレティキュリン トロンボポエチン受容体 分子シャペロン プロテアーゼ

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 (共通)

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 の根治は、治療関連死のリスクのある造血幹細胞移植しかないが、高齢で発症する疾患であることなどから、実際に移植適応となる症例は僅かである。

このため、MPN の発症メカニズムの解明と、それを標的として根治を目指す治療法の開発が求められている。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 Calreticulin (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(Leukemia. 2019;33:122-31)。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

本研究では、変異型 CALR 蛋白質を標的とする治療戦略の構築に必要な知見を得るために、疾患特異的遺伝子変異の一つである CALR 変異遺伝子産物に生じる特異的切断の分子基盤とその制御機構を明らかにすることを目的として、以下の研究を行なった。

- (1)変異型 CALR 蛋白質切断酵素の同定
- (2)切断酵素の発現による変異型 CALR 発現細胞の腫瘍性増殖への影響
- (3)CALR 遺伝子変異患者における変異型 CALR 切断

3. 研究の方法

- (1)変異型 CALR 蛋白質切断酵素の同定

我々はこれまでに、CALR 遺伝子変異を有する MPN 患者の細胞内で変異型 CALR 蛋白質が、変異型特異的な配列において切断されることを見出している。この切断が、MPN 発症に関与していることを明らかにするため、変異型 CALR の切断部位を特定、切断部位上流を認識し、変異型 CALR の全長型と切断型を識別する抗変異型 CALR 抗体を作製した。

変異型 CALR 蛋白質切断酵素を同定するために、プロテアーゼ遺伝子の発現量および切断基質の配列情報から絞り込みを行った。まず、変異型 CALR 蛋白質を発現させたヒト造血系細胞株 UT-7/TPO CALR Del52 細胞の RNA-seq 解析を行い、得られたリードカウントデータから総リード数および転写産物長により補正した transcripts per million (tpm)値を算出、tpm 値が 1 より大きいプロテアーゼ遺伝子を相対的な発現が高いプロテアーゼとして抽出した。次に、プロテアーゼの情報が集約されているデータベース MEROPS を参照して、変異型 CALR 蛋白質の切断配列を認識・切断すると予想されるプロテアーゼを抽出した。両条件に当てはまるプロテアーゼを、変異型 CALR 蛋白質を切断する候補プロテアーゼとした。これらの候補プロテアーゼに対する阻害剤を、変異型 CALR 蛋白質を発現する UT-7/TPO 細胞に添加し、細胞内と、細胞外に分泌された変異型 CALR 蛋白質の切断を、変異型 CALR の全長型・切断型を識別する抗変異型 CALR 抗体を用いたイムノプロット解析により評価した。この結果をもとに絞り込まれたプロテアーゼをコードする遺伝子の発現を、変異型 CALR 蛋白質を発現する UT-7/TPO 細胞から調製した RNA の RT-qPCR 解析と、MPN 患者の血小板から調製した RNA の RNA-seq 解析により評価した。これらの結果をもとに、最終的に絞り込まれた候補プロテアーゼを、RNA 干渉法により発現抑制した際に変異型 CALR の切断が抑制されること、過剰発現させた際に変異型 CALR の切断が亢進することを示し、変異型 CALR の切断に関与するプロテアーゼを同定した。

- (2)切断酵素の発現による変異型 CALR 発現細胞の腫瘍性増殖への影響

変異型 CALR 蛋白質の切断亢進により、腫瘍性増殖が抑制されることを検証するために、(1)で同定した変異型 CALR の切断に関与するプロテアーゼを変異型 CALR 蛋白質を発現する UT-7/TPO 細胞で過剰発現させた。変異型 CALR の切断の亢進をイムノプロット解析で解析し、この細胞の細胞増殖能を、TPO を含まない 10%ウシ胎児血清を含む IMDM 培地 100 μ l に細胞を 10,000 個播種し、経時的に細胞の増殖を WST アッセイにより評価した。

- (3)CALR 遺伝子変異患者における変異型 CALR 切断

(1)で同定したプロテアーゼによる変異型 CALR の切断が、実際に MPN 患者細胞においても生じていることを検証するため、CALR 遺伝子変異陽性の MPN 患者の末梢血から CD34 陽性細胞を分取し、6-10 日間拡大培養した。拡大培養後の MPN 患者細胞は、フローサイトメトリ

一解析を行い細胞集団を同定した。これらの細胞でも(1)で同定したプロテアーゼによる変異型 CALR の切断が起きていることを明らかにするために、(1)で同定したプロテアーゼの阻害剤を培地に添加し、細胞抽出液のイムノブロット解析を行った。

4. 研究成果

(1)変異型 CALR 蛋白質切断酵素の同定

変異型 CALR を発現する UT-7/TPO CALR Del52 細胞の RNA-seq 解析をもとに抽出された、発現量の高いプロテアーゼ遺伝子と、変異型 CALR 蛋白質の切断配列を認識・切断すると予想されるプロテアーゼの両条件に当てはまる 25 個の変異型 CALR 切断候補プロテアーゼを見出した。これらのプロテアーゼに対する阻害剤を、変異型 CALR を発現する UT-7/TPO 細胞に添加した時に変異型 CALR の切断が抑制されるかをイムノブロット法によって解析した。その結果、細胞抽出液中では、プロテアーゼ阻害剤 A を添加すると、切断型の変異型 CALR 蛋白質の著しい減少が観察された。さらに細胞の培養上清を用いて解析を行った結果、プロテアーゼ阻害剤 A とプロテアーゼ阻害剤 B を添加すると、培養上清中の切断型の変異型 CALR 蛋白質の著しい減少と全長型の変異型 CALR 蛋白質の増加が観察された。プロテアーゼ阻害剤 A は細胞増殖に影響を与えなかったことから、プロテアーゼ阻害剤 A による切断型の変異型 CALR 蛋白質の減少は、生細胞数の減少によるものではなく、プロテアーゼの阻害によるものであると考えられた。

プロテアーゼ阻害剤 A は、特定のプロテアーゼを主な標的とする阻害剤であるが、このプロテアーゼの他のファミリー分子にも広く作用することが報告されている。また、プロテアーゼ阻害剤 B はそのファミリー分子のうちの一種類を主な標的とする阻害剤であることから、変異型 CALR 蛋白質の切断にはプロテアーゼファミリー X が関与することが示された。そこでプロテアーゼファミリー X のうち、変異型 CALR 蛋白質の切断に関与しているプロテアーゼを特定するために、変異型 CALR 蛋白質を発現する UT-7/TPO 細胞内のプロテアーゼファミリー X 遺伝子の発現量を RT-qPCR で解析した。その結果、プロテアーゼ A、プロテアーゼ B、プロテアーゼ C の発現が高いことが明らかになった。さらに、CALR 遺伝子変異陽性 MPN 患者の血小板 RNA を用いて RNA-seq 解析を行なった結果、プロテアーゼ A、プロテアーゼ B、プロテアーゼ C、プロテアーゼ D が多く発現していた。

これらの結果をもとに、変異型 CALR 蛋白質の切断に関与しているプロテアーゼを特定するために、RNA 干渉法を用いてプロテアーゼ A、プロテアーゼ B、プロテアーゼ C 遺伝子の発現を抑制した際の、変異型 CALR 蛋白質の切断への影響をイムノブロット法で解析した。その結果、プロテアーゼ A の発現を抑制すると、細胞抽出液および培養上清中において変異型 CALR 蛋白質の切断の抑制が観察された。一方で、プロテアーゼ B あるいはプロテアーゼ C の発現を抑制しても、変異型 CALR 蛋白質の切断はほとんど変化しなかった。逆に、プロテアーゼ A、プロテアーゼ B、プロテアーゼ C、プロテアーゼ D 遺伝子を、変異型 CALR を発現する UT-7/TPO 細胞で過剰発現させたところ、プロテアーゼ A とプロテアーゼ D を過剰発現させると、細胞抽出液および培養上清中において変異型 CALR 蛋白質の切断の亢進が観察された。一方で、プロテアーゼ B あるいはプロテアーゼ C を過剰発現させても、変異型 CALR 蛋白質の切断はほとんど変化しなかった。

以上の結果より、変異型 CALR 蛋白質の切断には、プロテアーゼ A とプロテアーゼ D が関与していることが強く示唆された。

(2)切断酵素の発現による変異型 CALR 発現細胞の腫瘍性増殖への影響

我々は以前、切断型の変異型 CALR 蛋白質を発現させた UT-7/TPO 細胞では腫瘍原性を喪失していることを示している。変異型 CALR 蛋白質の切断亢進により、腫瘍性増殖が抑制されることが期待されたため、変異型 CALR 発現 UT-7/TPO 細胞にプロテアーゼ A、プロテアーゼ B、プロテアーゼ C、プロテアーゼ D をそれぞれ過剰発現させて、TPO 未添加培地で培養して細胞増殖能を解析した。

(3)CALR 遺伝子変異患者における変異型 CALR 切断

モデル細胞株で明らかにした、プロテアーゼファミリー X 蛋白質による変異型 CALR 蛋白質の切断が、CALR 遺伝子変異 MPN 患者細胞においても生じていることを検証するため、CALR 遺伝子変異陽性の MPN 患者の CD34 陽性細胞を用いて、プロテアーゼ阻害剤 A 存在下の変異型 CALR 切断の抑制を解析した。CALR 遺伝子変異陽性の MPN 患者の CD34 陽性細胞を拡大培養した結果、CD34 陽性細胞、CD42b 陽性細胞、CD235a 陽性細胞が存在しており、この実験系における細胞集団は、造血幹細胞および巨核球系細胞が大部分を占めていた。これらの細胞をプロテアーゼ阻害剤 A 存在下で培養すると、細胞株での結果と同様に、変異型 CALR 蛋白質の切断が抑制された。以上の結果より、CALR 遺伝子変異陽性 MPN 患者の造血幹細胞および巨核球系細胞においても、プロテアーゼファミリー X が変異型 CALR 蛋白質の切断に関与することが示された。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Inano Tadaaki, Araki Marito, Morishita Soji, Imai Misa, Kihara Yoshihiko, Okuda Maho, Yang Yinjie, Ito Masafumi, Osaga Satoshi, Mano Hiroyuki, Edahiro Yoko, Ochiai Tomonori, Misawa Kyohei, Fukuda Yasutaka, Ando Jun, Komatsu Norio	4. 巻 11
2. 論文標題 Cell-autonomous megakaryopoiesis associated with polyclonal hematopoiesis in triple-negative essential thrombocythemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97106-9	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 Pecquet Christian, Papadopoulos Nicolas, Balligand Thomas, Chachoua Ilyas, Tisserand Amandine, Komatsu Norio, Kihara Yoshihiko, Sunami Yoshitaka, Edahiro Yoko, Araki Marito, Vainchenker William, Kralovics Robert, Constantinescu Stefan N, et al.	4. 巻 141
2. 論文標題 Secreted mutant calreticulins as rogue cytokines in myeloproliferative neoplasms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 917 ~ 929
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2022016846	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 該当する

〔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 吉川隼平, 荒木真理人, 木原慶彦, 増淵菜弥, 楊印杰, 森下総司, 今井美沙, 枝廣陽子, 安藤美樹, 小松則夫
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, Yousuke Mori, Yinjie Yang, 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
--	---------------------------	-----------------------	----

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