

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591399

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍の新しい原因遺伝子 Lnk の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Lnk gene responsible for myeloproliferative neoplasma

研究代表者

山之内 純 (Yamanouchi, Jun)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10423451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍のうち、本態性血小板血症患者でJAK2 V617F変異とLnk遺伝子異常について解析した。その結果、JAK2 V617F変異陰性であった1人にLnk遺伝子のSH2ドメインにheterozygousな遺伝子異常を発見した。この変異は今までに報告されていない新たな変異であった。そこで、今回発見したLnkの遺伝子異常がJAK2 V617F変異と同じように恒常的にJAK/STAT系でリン酸化を起こしシグナルが伝わっているかをBaF3細胞とマウスES細胞を用いて検討した。

研究成果の概要(英文)：I analyzed for the JAK2 V617F mutation and Lnk mutations in patients with essential thrombocythemia. As a result, it was found a heterozygous gene abnormality in the SH2 domain of Lnk gene in a patient with JAK2 V617F mutation negative. This mutation was a new variant that has not been reported previously. Therefore, I analyzed the impact of this Lnk mutation on the signaling and phosphorylation in JAK / STAT system using BaF3 cells and mouse ES cells.

研究分野：血液内科学

キーワード：本態性血小板血症

1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍は造血幹細胞の異常により、一系統以上の骨髄性細胞のクローナルな増殖をきたす疾患と定義づけられている。そのうち、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、そして原発性骨髄線維症の3病系において、その原因として2005年にJAK2遺伝子変異(V617F)が同定された。この変異により、チロシンキナーゼが恒常的な活性化状態となり、過剰な細胞増殖シグナルを発生し、赤血球や血小板が増加した状態となる。真性赤血球増加症ではJAK2遺伝子変異が95%以上で認められるが、本態性血小板血症と原発性骨髄線維症では約50%にしか認められず、その発症機序はまだ明らかではない。

一方、細胞内アダプター蛋白であるLnkは、脾臓、リンパ節、骨髄などリンパ系組織で比較的強く発現し、特にB細胞や造血前駆細胞で強く発現しており、サイトカインレセプターのいくつかのシグナル経路を制御している。この*lnk*欠損マウスでは、造血幹細胞、Bリンパ球、血小板の増加を認めると報告されている。特に、血小板数は正常マウスに比べ、約5倍に増加している(J. Clin. Inv. 120:179-190, 2010)。このことより、本態性血小板血症の患者の中にはLnkに何らかの遺伝子変異があり、発現もしくは機能が制御されることによって血小板数が増加している可能性もあると考え、申請者はこのLnk遺伝子に注目し、検討することとした。

2. 研究の目的

骨髄増殖性腫瘍のJAK2遺伝子変異とは別の新しい原因遺伝子の特定を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 本態性血小板血症患者から血小板を分離し、血小板mRNAを抽出。RT-PCR法でLnk mRNAを増幅し、シークエンス解析を行う。同時に、JAK2 V617F変異の有無について、allele specific PCR法と直接シークエンス法によって解析する。この遺伝子解析は愛媛大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の承認を得ている。

(2) Lnk変異体の作製とその遺伝子発現によるJAK/STAT系シグナルの確認

今回発見したLnkの遺伝子異常がJAK2 V617F変異と同じように恒常的にJAK/STAT系

でリン酸化を起こし、シグナルが伝わっているかを確認するために今回発見した遺伝子異常のLnk変異体と、TPO依存性の細胞増殖を阻害すると報告されているLnk R392E、polymorphismとして報告されているLnk N537Dを作成する。これらと野生型のLnkをBaF3細胞に遺伝子導入して、JAK/STAT系のシグナルについて検討する。

また、JAK2阻害剤の効果についてもLnkの野生型とそれぞれの変異体が発現した細胞と共培養することで、JAK/STAT系のシグナルについて検討する。

(3) siRNAの作製とその遺伝子発現抑制効果の確認

まずマウスLnk messenger RNAを分断するshort interfering RNA(siRNA)配列を決定するためにマウスLnkの配列からノックダウンする確率が高い配列を選ぶ。マウスの細胞において、short hairpin構造によるセンス、アンチセンスRNA配列をU6 RNAプロモーターを使って導入し二本鎖RNAが細胞内で形成できるようにする。この系で作られたsiRNAの効果は、マウスNIH3T3細胞にsiRNAをトランスフェクトし、RT-PCR法を用いて確認する。コントロールのsiRNAはノックダウンできたマウスLnkのsiRNA配列から3ないし4のコードンを変化させた mismatches siRNAを作製する。これと同じようにマウスNIH3T3細胞にトランスフェクトして、マウスLnkの発現がトランスフェクトしていない細胞と変わらないことを確認する。

(4) ES細胞の分化

マウスES細胞は、赤血球、血小板への分化の効率が良いとされるR1クローン(F1 cross 129/Sv x 129/Sv-CP inbred sub-strains)を用いる。ES細胞とマウスOP9ストローマ細胞((C57BL/6 x C3H) F2-osteopetrosis (op/op)マウスから確立した骨髄ストローマ細胞で、macrophage colony-stimulating factorを欠失している。この細胞は、ES細胞から血液細胞、血管内皮細胞を含む中胚葉系への分化が促進することが証明されている。)との共培養を行う。培養5日目までに出現する中胚葉細胞にerythropoietin(EPO)、またはthrombopoietin(TPO)を加えて引き続きOP9ストローマ細胞と共培養する。培養8日目から新

しいIOP9ストローマ細胞とEPO、またはTPO存在下に共培養を続けることで、赤芽球系細胞、または巨核球系細胞を培養12 - 13日までに得ることができる。

(5) siRNAのES細胞への導入

siRNA効果を発揮するRNA配列とコントロールsiRNA配列を、GFPをマーキングとしたレンチウイルスベクターを用いてES細胞に導入する方法と、薬剤耐性をもつベクターを用いてES細胞に導入しクローンを確立する方法をとる。

レンチウイルスベクターは、ES細胞の分化後においても遺伝子のsilencingが発生しないため、未分化ES細胞にも遺伝子導入できる。しかし、今回はレンチウイルスベクターによる導入遺伝子のintegrationには1 - 2日必要なこと、siRNA形成後dicerによってmRNAの分断が開始されるまで2日以上必要なことを前提条件として考慮し、未分化ES細胞ではなく分化開始5日目のES細胞由来中胚葉細胞において感染させる。その後、赤芽球系細胞、または巨核球系細胞に分化させてコントロールと比較して検討する。

また、クローンを確立する方法は、Lnk siRNAを含む薬剤耐性をもつベクターをES細胞にelectroporationを用いて導入し、その後、耐性薬剤と培養することでクローンを確立する。その後、ES細胞にLnkの野生型と変異型を遺伝子導入し、それぞれを赤芽球系細胞または巨核球系細胞に分化させてコントロールと比較して検討する。

(6) Lnk siRNA導入ES細胞とLnk変異遺伝子導入ES細胞の分化に関する検討

まず、Lnk siRNA導入ES細胞およびLnk変異遺伝子導入ES細胞の遺伝子発現をコントロールES細胞と網羅的に比較検討する。次に、さまざまな細胞への分化誘導系を用いて、JAK/STAT系シグナルについて検討すると共に、Lnkの細胞分化に関する役割を明らかにする。特に、赤芽球系分化に関する影響を、glycophorin Aの発現、benzidine染色によるhemoglobin産生などによってコントロールと比較する。さらに、巨核球系分化に関する影響を、CD41やCD61の発現、フィブリノゲンへの結合などによってコントロールと比較する。また、JAK2阻害剤の効果についてもLnkの野

生型とそれぞれの変異体が発現した細胞と共培養することで、JAK/STAT系のシグナルについて検討する。

(7) Lnk変異ノックインマウスの作製と解析

Lnk欠損マウスは解析が進められている。それを利用し、Lnk変異遺伝子を導入したマウスを作製することを計画する。まずは、Lnk変異ノックインマウスの表現系を形態学的に詳細に観察する。その結果によって、異常臓器を中心として研究計画を立案する。特に、骨髄増殖性腫瘍としての特徴を持っているか（真性赤血球増加症になるのか、本態性血小板血症になるのか）を詳細に検討する。造血器系に異常を認めただけの場合には、骨髄細胞を用いた*in vitro*実験系で分化増殖能に関する検討を実施する。

また、骨髄増殖性腫瘍の特徴を持つようなら、JAK/STAT系シグナルについて検討すると共に、JAK2阻害剤を投与することで、骨髄増殖性腫瘍の所見が改善するかどうかを検討する。

4. 研究成果

骨髄増殖性腫瘍のうち、本態性血小板血症患者から血小板を分離し、血小板mRNAを抽出した。RT-PCR法でLnk mRNAを増幅し、シーケンス解析を行った。同時に、JAK2 V617F変異の有無について、allele specific PCR法と直接シーケンス法によって解析した。その結果、本態性血小板血症患者28人のうちJAK2 V617F変異を21人に認めた。そこでJAK2変異陰性であった7人の患者でLnk遺伝子配列を調べたところ、1人にSH2ドメインにheterozygousな遺伝子異常を発見した。この変異はpolymorphismとしては報告されていない新たな変異であった。

そこで、今回発見したLnkの遺伝子異常がJAK2 V617F変異と同じように恒常的にJAK/STAT系でリン酸化を起こし、シグナルが伝わっているかを確認することを計画し、今回発見した遺伝子異常のLnk変異体と、TPO依存性の細胞増殖を阻害すると報告されているLnk R392E、polymorphismとして報告されているLnk N537Dの3つの変異体を作成した。これらと野生型のLnkをBaF3細胞に遺伝子導入して、JAK/STAT系のシグナルについて検討した。さらにはマウスES細胞に遺伝子導入を行い、赤

芽球系細胞または巨核球系細胞に分化させ、細胞分化についても検討した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Ohkubo N, Matsubara E, Yamanouchi J, Akazawa R, Aoto M, Suzuki Y, Sakai I, Abe T, Kiyonari H, Matsuda S, Yasukawa M, Mitsuda N. Abnormal behaviors and developmental disorder of hippocampus in zinc finger protein 521 (ZFP521) mutant mice. PLoS One. 査読有、9(3)、2014、e92848

Ohkubo N, Suzuki Y, Aoto M, Yamanouchi J, Hirakawa S, Yasukawa M, Mitsuda N. Accelerated destruction of erythrocyte in Tie2 promoter-driven STAT3 conditional knockout mice. Life Science. 査読有、93(9-11)、2013、380-387

[学会発表](計 7 件)

Yamanouchi J, Hato T, Matsubara E, Azuma T, Nakanishi H, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M. Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation. 56th ASH Annual Meeting、2014 年 12 月 5 日 - 8 日、San Francisco, CA, U.S.A

Yamanouchi J, Hato T, Nakanishi H, Asai H, Matsubara E, Tanimoto K, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Yasukawa M. Activation status of integrin α IIb β 3 in essential thrombocythemia with calreticulin mutation. 第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日 - 11 月 2 日、大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

Matsubara E, Yamanouchi J, Azuma T, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Evaluation of the predictive factors of MDS patients treated with azacitidine. The 5th JSH International Symposium、2014 年 5 月 24 日 - 25 日、アクトシティ浜松 コングレスセンター (静岡県浜松市)

松原悦子、谷本一史、山之内純、東太地、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴、骨髓異形成症候群患者におけるアザシチジン治療の予後予測因子に関する解析、第 111 回日本内科学会講演会、2014 年 4 月 11 日 - 13 日、東京国際フォーラム (東京都千代田区)

Matsubara E, Azuma T, Kobayashi S, Yamanouchi J, Narumi H, Fujiwara H, Yakushijin Y, Hato T, Yasukawa M. Revised

international prognostic scoring system predicts the response of azacitidine to MDS patients. 第 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日 - 13 日、ロイトン札幌・さっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館 (北海道札幌市)

松原悦子、東太地、三好一宏、鹿田久治、山之内純、成見弘、藤原弘、薬師神芳洋、羽藤高明、安川正貴、巨脾および JAK2V617F 遺伝子変異を有する骨髓線維症に対して造血幹細胞移植を施行した 2 症例の検討、第 52 回日本血液学会中国四国地方会、2013 年 3 月 23 日、松江テルサ (島根県松江市)

山之内純、骨髓増殖性腫瘍の新しい原因遺伝子 Lnk の機能解析、第 5 回愛媛大学学術フォーラム、2013 年 1 月 11 日、愛媛大学総合情報メディアセンター (愛媛県松山市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山之内 純 (Yamanouchi, Jun)
愛媛大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10423451

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし