

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591401

研究課題名(和文) 骨髄増殖性腫瘍における病型の進展と急性転化メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of disease progression in myeloproliferative neoplasms.

研究代表者

北中 明 (Kitanaka, Akira)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：70343308

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)：JAK2とTET2の変異が骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症と進展におよぼす影響を解析した。JAK2V617Fを持つ細胞を移植されたマウスはMPNの表現型を示した。そこにTET2欠損が加わると、表現型の増悪が認められた。JAK2単独異常および2重異常マウスは共にMPNを発症し、2重異常マウスでは重症化した。競合・継代移植実験からは、JAK2変異による造血幹細胞の自己複製能低下がTET2欠損共存により救済された。以上から、JAK2変異MPNにおけるTET2欠損には、「JAK2変異造血幹細胞の機能を強化しMPN発症を支持する」と「MPNを重症化させる」の、2つの役割があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of JAK2 and TET2 mutations on myeloproliferative neoplasms (MPNs) development and disease progression. Recipients of JAK2V617F cells developed primary myelofibrosis-like features. The addition of TET2-loss worsened this phenotype. Double-mutant (JAK2V617F plus TET2-loss) myeloid cells were more likely to be in a proliferative state than JAK2V617F single-mutant cells. In a serial competitive transplantation assay, JAK2V617F cells resulted in decreased chimerism in the second recipients, which did not develop MPNs. In marked contrast, cooperation between JAK2V617F and TET2-loss developed and maintained MPNs in the second recipients. In-vitro sequential colony formation assays also supported the observation. We conclude that loss of TET2 has two different roles in MPNs: disease accelerator and disease initiator and sustainer in combination with JAK2V617F.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 JAK2 TET2

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異による JAK2 の恒常的活性化が骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症に重要であることがあきらかとなっていたが、JAK2 阻害剤を用いた臨床研究からは JAK2 阻害剤の投与により自覚症状、脾腫、白血球増多の改善は認められるものの、腫瘍細胞の量を反映すると考えられる JAK2 の allele burden の減少や、骨髄の線維化、貧血の改善は認められなかった。その原因の一つとして、JAK2 を介するシグナル伝達経路は正常造血にも必須であり、JAK2 阻害剤は野生型 JAK2 も変異型 JAK2 と同等に阻害することから、その用量に限界があることが考えられた。JAK2 阻害剤では得られない腫瘍クローンの抑制や骨髄線維化の改善のためには、幹細胞レベルでの腫瘍クローンの維持と増幅、骨髄線維化などの分子機構を解明し、JAK2 と共に新たな治療標的に加えることが必要である。研究開始当初には、MPN について、JAK2V617F 以外の遺伝子変異に関する報告が相次ぎ、TET2、DNMT3A などのエピゲノム制御関連遺伝子の異常が報告された。

2. 研究の目的

我々は、代表的な driver mutation である JAK2V617F 変異とエピゲノム異常である TET2 欠損が骨髄増殖性腫瘍(MPN)の発症と進展、重症化におよぼす影響を解析した。

3. 研究の方法

JAK2V617F TG マウスと TET2 欠損マウスの交配により作成した 4 種類のマウス造血幹細胞(hematopoietic stem cell: HSC)(野生型/JAK2 変異/TET2 欠損/JAK2 変異かつ TET2 欠損(2 重異常))を採取し、各々の非競合的移植モデルを作成・解析した(非競合移植実験)。次に、各 HSC と野生型 HSC の競合移植モデルを作成し、さらに各レシピエントマウスの骨髄を継代移植し、HSC にストレスをかけてその動態を解析した(競合・継代移植実験)。

4. 研究成果

非競合移植実験において、JAK2 単独異常および 2 重異常マウスは共に、白血球増多、貧血、血小板増多、脾腫、肺・肝への細胞浸潤などを呈し MPN を発症した。2 重異常マウスでは、JAK2 単独異常マウスと比べて白血球数、脾腫、細胞浸潤、生存率などが重症化、悪化した。各々のマウスの個体あたりの HSC(lineage - Sca-1+c-Kit+ (LSK)分画)や前駆細胞(lineage - c-Kit+ (LK)分画)の細胞数を比較すると、JAK2 単独異常マウスでは野生型マウスと比し細胞数の経時的な減少を認められたが、2 重異常マウスでは細胞数は維持されており、脾臓では経時的な増加(髄外造血の亢進)を認めた。これと一致して骨髄・脾

臓の Ki-67 免疫染色では、2 重異常マウスでは JAK2 単独異常マウスと比較して Ki-67 陽性率が高く、造血細胞の増殖亢進が裏付けられた。巨核球系において、JAK2 単独異常マウスでは巨核球サイズの大型化、核過剰成熟(DNA 量増加)、核過剰成熟抑制、核過剰成熟抑制が認められたが、2 重異常マウスでは JAK2 単独異常マウスと比較して巨核球サイズの抑制、核過剰成熟抑制、核過剰成熟抑制が認められ、ヒト PMF でみられる“cloud-like morphology”に類似したより異常な形態所見が認められた。競合・継代移植実験の 1 次移植マウスにおいては、JAK2 単独異常マウス、2 重異常マウスともに異常クローンの拡大を認め、非競合移植実験と同様に MPN 発症を認めた。一方 2 次移植マウスにおいては、JAK2 単独異常マウスでは異常細胞のキメリズムは低下し MPN 発症は認めず、2 重異常マウスのみで MPN 発症を認めた。各々の異常 HSC の機能を解析するため、非競合移植レシピエントの骨髄細胞を用いてコロニーリプレATINGアッセイを実施し、各々の自己複製能を検討した。リプレATING可能回数は、TET2 欠損細胞では増加、JAK2 変異細胞では減少を認めたが、2 重異常細胞では TET2 欠損共存によるリプレATING回数の回復を認めた。このことから、JAK2 変異による HSC の自己複製能低下が TET2 欠損共存により救済された可能性が示唆された。また、骨髄 HSC の遺伝子発現 microarray では、JAK2 変異 HSC で認められた HSC 関連遺伝子群の発現低下が、TET2 欠損共存により部分的に回復しており、発現が回復した遺伝子群の中には自己複製関連遺伝子が多数含まれていた。競合・継代移植実験は野生型造血が大部分を占める MPN の疾患初期を模倣しており、コロニーリプレATINGアッセイと遺伝子発現 microarray の結果と併わせると、『TET2 欠損は JAK2 変異 HSC の機能を強化し MPN 発症を支持する因子である』、『TET2 欠損は MPN を重症化させる因子である』と結論づけられた。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 10 件)

1. Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Marutsuka K, Sashida G, Aoyama K, Yoshimitsu M, Harada T, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. *Blood*. 125: 304-315, 2015 査読有り
2. Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Kubuki Y,

- Shimoda H, Sashida G, Aoyama K, Yoshimitsu M, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K. Gene expression profiling of loss of TET2 and/or JAK2V617F mutant hematopoietic stem cells from mouse models of myeloproliferative neoplasms. *Genomics Data* 4: 102-108, 2015 査読有り
3. Muto T, Sashida G, Hasegawa N, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Iwama A. Myelodysplastic syndrome with extramedullary erythroid hyperplasia induced by loss of Tet2 in mice. *Leuk Lymphoma*. 56: 520-523, 2015 査読有り
 4. Izumi K, Mine K, Inoue Y, Teshima M, Ogawa S, Kai Y, Kurafuji T, Hirakawa K, Miyakawa D, Ikeda H, Inada A, Hara M, Yamada H, Akashi K, Niho Y, Ina K, Kobayashi T, Yoshikai Y, Anzai K, Yamashita T, Minagawa H, Fujimoto S, Kurisaki H, Shimoda K, Katsuta H, Nagafuchi S. Reduced Tyk2 gene expression in γ -cells due to natural mutation determines susceptibility to virus-induced diabetes. *Nat Commun*. 6: 6748, 2015 査読有り
 5. Shintani T, Ohara-Waki F, Kitanaka A, Tanaka T, Kubota Y. Cbl negatively regulates erythropoietin-induced growth and survival signaling through the proteasomal degradation of Src kinase. *Blood Cells Mol Dis*. 53: 211-218, 2014 査読有り
 6. Hashiguchi T, Oyamada A, Sakuraba K, Shimoda K, Nakayama KI, Iwamoto Y, Yoshikai Y, Yamada H. Tyk2-dependent bystander activation of conventional and nonconventional Th1 cell subsets contributes to innate host defense against *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 192: 4739-4747, 2014 査読有り
 7. Ishizaki M, Muromoto R, Akimoto T, Sekine Y, Kon S, Diwan M, Maeda H, Togi S, Shimoda K, Oritani K, Matsuda T. Tyk2 is a therapeutic target for psoriasis-like skin inflammation. *Int Immunol*. 26: 257-267, 2014 査読有り
 8. Nakaya Y, Shide K, Naito H, Niwa T, Horio T, Miyake J, Shimoda K. Effect of NS-018, a selective JAK2V617F inhibitor, in a murine model of myelofibrosis. *Blood Cancer J*. 4: e174, 2014 査読有り
 9. Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of Ezh2 and Tet2 cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 210: 2627-2639, 2013 査読有り
 10. Shide K, Kameda T, Shimoda H, Yamaji T, Abe H, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Katayose K, Kubuki Y, Yamamoto S, Miike T, Iwakiri H, Hasuike S, Nagata K, Marutsuka K, Iwama A, Matsuda T, Kitanaka A, Shimoda K. TET2 is essential for survival and hematopoietic stem cell homeostasis. *Leukemia*. 26: 2216-2223, 2012 査読有り
- [学会発表](計8件)
1. 下田和哉: 骨髄増殖性腫瘍の分子病態と治療. 第36回日本血栓止血学会学術集会 大阪 2014.05.29-31
 2. Shide K, Kameda T, Shimoda H, Kamiunten A, Sekine M, Hidaka T, Kubuki Y, Kitanaka A, Shimoda K: Therapies Targeting the MAPK pathway improve bone marrow (BM) fibrosis induced by JAK2V617F. 56th American Society of Hematology Annual Meeting, San Francisco, 2014.12.06-09
 3. Kamada T, Shide K, Akizuki K, Sekine M, Kamiunten A, Shimoda H, Hidaka T, Kubuki Y, Kitanaka A, Marutsuka K, Shimoda K: Loss-of-TET2 induces clonal expansion of JAK2V617F mutant stem/progenitor cell and initiates MPNs. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014.10.31-11.02
 4. Shide K, Kameda T, Kamiunten A, Sekine M, Akizuki K, Shimoda H, Hidaka T, Kubuki Y, Kitanaka A, Shimoda K: CALR mutation and clinical correlates in myeloproliferative neoplasms. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014.10.31-11.02
 5. Sashida G, Tomioka T, Wang C, Shide K, Shimoda K, Iwama A: Ezh2 loss accelerates JAK2V617F-driven primary myelofibrosis. 第76回日本血液学会学術集会 大阪 2014.10.31-11.02
 6. Kameda T, Shide K, Sekine M, Kamiunten A, Hidaka T, Kubuki Y, Kameda T, Kitanaka A, Marutsuka K, Shimoda K: Impact of TET2 deficiency on MPN harboring JAK2V617F mutation. 55th American Society of Hematology Annual Meeting, New Orleans, 2013.12.07-10
 7. Nakaya Y, Shide K, Naito H, Niwa T,

- Horio T, Miyake J, Shimoda K: NS-018, a selective JAK2V617F inhibitor, improves JAK2V617F-induced murine myelofibrosis without decreasing the erythrocyte or platelet count. 55th American Society of Hematology Annual Meeting, New Orleans, 2013.12.07-10
8. Tomioka T, Sashida G, Shide K, Shimoda K, Yamaguchi N, Iwama A: Ezh2 loss accelerates JAK2V617F-driven primary myelofibrosis. 55th American Society of Hematology Annual Meeting, New Orleans, 2013.12.07-10

〔産業財産権〕

該当無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

北中 明 (KITANAKA, Akira)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号： 70343308

(2)研究分担者

下田和哉 (SHIMODA Kazuya)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号： 90311844