

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461408

研究課題名(和文) TET2変異による造血器腫瘍の発症と進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) The pathogenesis of myeloproliferative neoplasms induced by TET2 mutation

研究代表者

下田 和哉 (Shimoda, Kazuya)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：90311844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：JAK2/TET2の2重変異マウスは、JAK2単独変異マウスに較べ血球増加、脾腫の程度が大であり、TET2変異は骨髄増殖性腫瘍(MPN)の重症化に関与していた。競合連続移植実験では、2重変異造血幹細胞の自己複製能は野生型造血幹細胞より大であるもののTET2単独変異造血幹細胞より小さい。つまりTET2変異は「JAK2変異造血幹細胞の機能を強化しMPN発症を支持する役割」と「JAK2変異MPNを重症化させる役割」を有している。

研究成果の概要(英文)：Acquired mutations of JAK2 and TET2 are frequent in myeloproliferative neoplasms (MPNs). We examined the individual and cooperative effects of these mutations on MPN development. Recipients of JAK2V617F cells developed MPNs, and the addition of loss-of-TET2 worsened this JAK2V617F-induced disease. In a serial competitive transplantation assay, JAK2V617F cells resulted in decreased chimerism in the 2nd recipients, which did not develop MPNs. In contrast, cooperation between JAK2V617F and loss-of-TET2 developed and maintained MPNs in the 2nd recipients by compensating for impaired hematopoietic stem cell (HSC) functioning. Transcriptional profiling revealed that loss-of-TET2 affected the expression of many HSC signature genes. We conclude that loss-of-TET2 has two different roles in MPNs; one is as a disease accelerator, while the other is as a 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 TET2 JAK2

1. 研究開始当初の背景

骨髓系腫瘍である骨髓増殖性腫瘍(MPN)の10-15%、骨髓異形性症候群(MDS)の18-23%、de novo AMLの12-17%に *TET2* 変異が報告されている。*TET* は 5-methylcytosine を 5-hydroxymethylcytosine(5-hmC)へ変換する酵素であり、変異がみられる症例では全体的に 5-hmC が低下していることから、*TET2* の機能低下、喪失により遺伝子のメチル化が持続することが骨髓系腫瘍の病態に関与していると推測されている。我々は、MPN に分類される真性多血症(PV)の90%以上、本態性血小板血症(ET)、原発性骨髓線維症(PMF)の約半数にみられる *JAK2*V617F 変異を発現したマウスを作成し、これら3疾患を発症することから、*JAK2* 変異が MPN の病態形成の中心であることを明らかにしてきた。この時、*JAK2* 変異骨髓細胞を放射線照射したレシピエントマウスに移植するとレシピエントマウスも MPN を発症するが、*JAK2* 変異骨髓細胞と正常骨髓細胞と1:1の割合で競合移植すると、*JAK2* 変異クローンは正常クローンに対し増殖優位性を持たず、レシピエントマウスは MPN を発症しないことから、*JAK2* 変異のみでは MPN 発症には不十分であり、他の遺伝子変異の共存を必要とすることを見出した。一方上述のように MPN の10-15%に変異がみられる *TET2* 変異マウスは、末梢血でごくわずかに単球が増加し、脾臓でごくわずかな髄外造血がみられるものの、ヒトでいう MPN 様の病態は生じない。しかし、*TET2* 変異骨髓細胞を正常骨髓細胞と1:1に混合し競合移植を行うと、レシピエントマウスの白血球数の絶対値に変化しないものの、その大多数は *TET2* 変異細胞に占められていた。つまり、*TET2* 変異により造血幹細胞活性が亢進していた。これらのことは、腫瘍の発症という観点から考えた場合、1個の細胞に *JAK2* 変異、あるいは *TET2* 変異が単独で生じても MPN は発症しないことを意味する。

2. 研究の目的

骨髓系腫瘍である骨髓増殖性腫瘍(MPN)の10-15%、骨髓異形性症候群(MDS)の18-23%に *TET2* 変異がみられる。*TET* は 5-methylcytosine を 5-hydroxymethylcytosine(5-hmC)へ変換する酵素であり、変異がみられる症例では全体的に 5-hmC が低下していることから、*TET2* の機能低下、喪失により遺伝子のメチル化が持続することが骨髓系腫瘍の病態に関与していると推測されている。本研究では、骨髓増殖性腫瘍に高頻度に認める *TET2* 変異が、造血器腫瘍の発症、進展に果たす役割を明らかにすることを目的とする。さらに造血幹細胞活性を亢進させ癌幹細胞としての性格を付与する *TET2* 変異により発現が変化するメ

カニズムを検討し、*TET2* 変異が造血器腫瘍発症、進展に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

TET2 変異マウスを解析し、*TET2* 変異が生じても個体レベルでの造血に大きな異常は認めないものの、野生型骨髓細胞との連続競合移植実験を行うと、3rd レシピエントマウスの造血はほとんどが *TET2* 変異細胞により占められることから、*TET2* が変異すると造血幹細胞の自己複製能が増加することを明らかとてきた。対照的に、MPN のドライバー変異である *JAK2* 変異を有する造血幹細胞を継代移植すると、経時的に造血能は低下し、*JAK2* 変異造血幹細胞による長期の造血維持はできない。MPN 患者では *TET2*、*JAK2* の2種類の変異を有する患者が一定数みられることから、*JAK2*/*TET2* の2重変異マウスを作成しその造血を検討した。さらに、それぞれのマウスの造血幹細胞を分取し、遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

JAK2/*TET2* の2重変異マウスは、*JAK2* 単独変異マウスに比べ血球増加、脾腫の程度が大であり、さらにより早期に死亡することから、*TET2* 変異は MPN の重症化に関与していることを明らかとした。引き続き、競合連続移植実験を行い、2重変異造血幹細胞の自己複製能は野生型造血幹細胞より大であるものの *TET2* 単独変異造血幹細胞より小さいことを明らかとした。このことは、*TET2*、*JAK2* 変異の両者を有する患者において、最初に *TET2* 変異が生じ後から *JAK2* 変異が生じると、2重変異クローンは *TET2* 単独変異クローンに比し自己複製能が低く、2重変異を有するクローンは拡大しないことを意味する。逆に *JAK2* 変異が最初に生じると、自己複製能は2重変異造血幹細胞 > 野生型造血幹細胞 > *JAK2* 単独変異造血幹細胞の順となり、2重変異を有するクローンが拡大する。つまり変異の順番により腫瘍クローンのサイズが異なる可能性を見出した。これらのことから、*JAK2* 変異 MPN における *TET2* 欠損の2つの役割、即ち「*JAK2* 変異造血幹細胞の機能を強化し MPN 発症を支持する役割」と「MPN を重症化させる役割」を明らかにした。

次に、上記の機序解明のため、*TET2* 変異により発現が変化する遺伝子の同定を行った。造血幹細胞で特異的にみられる遺伝子群の発現は、*TET2* 欠損造血幹細胞は野生型造血幹細胞とほぼ同等であったが、*JAK2* 変異造血幹細胞では減少していた。二重変異マウスでの発現は *JAK2* 変異造血幹細胞とほぼ同じ傾向であったが、造血幹細胞で特異的に発現が亢進している 245 遺伝子のうち、100 遺伝子に関しては、二重変異造血幹細胞において、*JAK2* 変異造血幹細胞と比べ発現が亢進して

いた。これらの遺伝子群の発現亢進が、TET2変異が造血幹細胞の自己複製能を亢進させ、癌幹細胞としての性格を付与する一因となっていると考えられた。

TET2変異は骨髄系腫瘍以外に、Bリンパ球系腫瘍の5.7~12%、Tリンパ球系腫瘍の18~83%に報告されている。CD4リンパ球の腫瘍である成人T細胞性白血病/リンパ腫症例においてTET2変異の検索を行い、14%にミスセンス変異を見出した。

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 14 件)

Kubuki Y, Yamaji T, Hidaka T, Kameda T, Shide K, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuike S, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K, TET2 mutation in diffuse large B-cell lymphoma., Journal of clinical and experimental hematopathology, 査読有, 56, 2017, 145-149, 10.3960/jslrt.56.145

Kubuki Y, Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Kamiunten A, Akizuki K, Shimoda H, Tahira Y, Nakamura K, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hashimoto K, Yamamoto S, Hasuike S, Hidaka T, Nagata K, Kitanaka A, Shimoda K, Differences in Hematological and Clinical Features Between Essential Thrombocythemia Cases With JAK2- or CALR-Mutations., Annals of laboratory medicine., 査読有, 37, 2017, 159-161, 10.3343/alm.2017.37.2.159.

Sekine M, Kubuki Y, Kameda T, Takeuchi M, Toyama T, Kawano N, Maeda K, Sato S, Ishizaki J, Kawano H, Kamiunten A, Akizuki K, Tahira Y, Shimoda H, Shide K, Hidaka T, Kitanaka A, Yamashita K, Matsuoka H, Shimoda K, Effects of mogamulizumab in adult T-cell leukemia/lymphoma in clinical practice., European journal of haematology., 査読有, 98, 2017, 501-507, 10.1111/ejh.12863.

上運天綾子, 下田和哉, 骨髄疾患による貧血 骨髄線維症 疾患概念・病因・病態、日本臨牀増刊号、査読無、75、2017、311-314、

http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7501Z.html

Kitanaka A, Takenaka K, Shide K, Miyamoto T, Kondo T, Ozawa K, Kurokawa M, Akashi K, Shimoda K, Splenic irradiation provides transient palliation for symptomatic

splenomegaly associated with primary myelofibrosis: a report on 14 patients., International Journal of Hematology., 査読有, 103, 2016, 423-428, 10.1007/s12185-016-1940-3

久富木庸子, 下田和哉, 遺伝子解析に基づくがん治療 骨髄増殖性腫瘍(MPN/CML)、がん分子標的治療 Vol.14 No.1、査読無、14、2016、49-53、<http://www.m-review.co.jp/magazine/id/43>

北中明, 下田和哉, 本態性血小板血症の治療 アナグレリドの位置付け、癌と化学療法、査読無、43、2016、535-538、<http://www.pieronline.jp/content/issue/0385-0684/43050>

秋月溪一, 下田和哉, 骨髄増殖性腫瘍に対するテロメラゼ阻害薬 imetelstat の効果、血液フロンティア、査読無、26、2016、84-88、

https://www.iyaku-j.com/index.php?main_page=index&cPath=5_1_17_4628

関根雅明, 下田和哉, MPN の治療は、いつ開始すべきか?、血液内科、査読無、73、2016、57-62、

<http://www.kahyo.com/item/KS201607-731>

Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiunten A, Akizuki K, Nakamura K, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Kitanaka A, Honda A, Sawaguchi A, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hasuike S, Yamamoto S, Nagata K, Shimoda K, Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib., Leukemia., 査読有, 308, 2016, 1-21, 10.1038/leu.2016.308

日高智徳, 下田和哉, 骨髄増殖性腫瘍 骨髄線維症の治療、日本臨牀増刊号、査読無、74、2016、191-195、

http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7412Z.html

幣光太郎, 下田和哉, JAK2, MPL, CALR 変異による骨髄増殖性腫瘍、日本臨牀増刊号、査読無、74、2016、329-333、http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7410Z.html

久富木庸子, 下田和哉, 骨髄増殖性腫瘍のWHO分類、日本臨牀増刊号、査読無、74、2016、381-385、

http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7410Z.html

亀田拓郎, 下田和哉, 白血病における遺伝子ゲノム研究の動向 骨髄増殖性腫瘍、日本臨牀増刊号、査読無、74、2016、468-472、

http://www.nippon-rinsho.co.jp/backnum/z_mokuji/7412Z.html

〔学会発表〕(計 4 件)

Masaaki Sekine, Yoko Kubuki, Takuro Kameda, Masaki Takeuchi, Takanori Toyama, Noriaki Kawano, Kouichi Maeda, Siichi Sato, Junzo Ishizaki, Hiroshi Kawano, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Yuki Tahira, Haruko Shimoda, Kotaro Shide, Tomonori Hidaka, Akira Kitanaka, Kiyoshi Yamashita, Hitoshi Matsuoka, Kazuya Shimoda, Mogamulizumab for adult T-cell leukemia/lymphoma in clinical practice., 58th ASH Annual Meeting & Exposition, 2016/12/3-6, アメリカ合衆国

Kotaro Shide, Takuro Kameda, Masaaki Sekine, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Yuki Tahira, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Arata Honda, Akira Sawaguchi, Akira Kitanaka, Kazuya Shimoda, Physiological Expression of Calr Mutant Increases Cell Growth and Cytokine Independency in Human Cell Lines Expressing Mpl, and Develops Essential Thrombocythemia in Mice., 58th ASH Annual Meeting & Exposition, 2016/12/3-6, アメリカ合衆国

Kotaro Shide, Takuro Kameda, Masaaki Sekine, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Yuki Tahira, Haruko Shimoda, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Arata Honda, Akira Kitanaka, Kazuya Shimoda, CALRdel52 mutation activates the JAK-STAT pathway in coordination with MPL, and causes ET in mice., 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月 15 日, 横浜市

亀田拓郎、幣光太郎、関根雅明、山路卓巳、田平優貴、秋月溪一、上運天綾子、下田晴子、日高智徳、久富木庸子、北中明、下田和哉、TET2 欠損は HBZ トランスジェニックマウスの病態を増悪させる、第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2016 年 8 月 27 日、鹿児島市

〔図書〕(計 8 件)

亀田拓郎、下田和哉、株式会社最新医学社、診断と治療の ABC113 慢性骨髄白血球 骨髄増殖性腫瘍、2016、223
幣光太郎、下田和哉、株式会社医薬ジャーナル、骨髄線維症(MF)～分子病態の解明から新規薬物治療薬の開発まで～、第 2 章 骨髄線維症の基礎 3. 骨髄線維症のマウスモデル、2016、187
下田和哉、株式会社医薬ジャーナル、Ph 陰性骨髄増殖性腫瘍～分子病態と治療の

最前線～、.Ph 陰性骨髄増殖性腫瘍の疫学と診断基準、2016、123
久富木庸子、下田和哉、株式会社中外医学社、.白血球 E. 骨髄増殖性腫瘍 (MPN) 骨髄線維症の治療 EBM 血液疾患の治療 2017-2018、2016、541
日高智徳、下田和哉、日本臨牀社、白血病学(下) - 最新の基礎、臨床研究 -、2016、582
亀田拓郎、下田和哉、日本臨牀社、白血病学(下) - 最新の基礎、臨床研究 -、2016、582
上運天綾子、下田和哉、株式会社 日本臨牀社、貧血学 最新の診断・治療動向、2017、644
日高智徳、下田和哉、南江堂、血液疾患最新の治療 2017-2019、2017、370

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：該当なし
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：該当なし
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

幣 光太郎 (SHIDE, Kotaro)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：20468028

(3) 連携研究者

該当なし()

研究者番号：

(4)研究協力者
該当なし()