

変異型 CALR によるトロンボポエチン受容体 MPL の活性化メカニズムの解明

荒木真理人

順天堂大学大学院医学研究科 輸血・幹細胞制御学

【研究の背景】

フィラデルフィア染色体陰性の骨髄増殖性腫瘍 (Myeloproliferative Neoplasms: MPN) は、造血幹細胞の異常によって一系統以上の骨髄性細胞のクローナルな増殖をきたす造血器腫瘍である。MPN 患者では、サイトカイン受容体のシグナル伝達を司るチロシンキナーゼ JAK2 や、トロンボポエチン受容体 MPL、分子シャペロン CALR をコードする遺伝子に体細胞変異が見いだされることが海外のグループにより明らかにされており、本邦の MPN 患者においても同様の変異が見られることを私たちの研究グループが明らかにしている^{1, 2)}。これらの遺伝子変異のうち、最近発見された CALR 遺伝子変異については、CALR のサイトカイン受容体シグナル伝達における役割が明らかでなかったことなどから、どのようなメカニズムにより MPN を発症させているかについては、未解明であった。私は、ごく最近、変異型 CALR が、MPL と特異的に相互作用し、トロンボポエチンの無い状況においても受容体 MPL と下流の JAK2 を活性化し、細胞を腫瘍化することを発見した。さらに、MPN 患者に共通する CALR 遺伝子のフレームシフト変異により、CALR のカルボキシル末端に生じる新規の構造が、MPL との特異的な相互作用を引き起こすことを解明し、CALR 遺伝子変異による MPN の発症メカニズムの一端を明らかにした³⁻⁵⁾。しかし、変異型 CALR が、どのような分子メカニズムにより MPL と相互作用し、活性化を引き起こしているかについては、未解明であった。

【目 的】

本研究では、変異型の分子シャペロン CALR による MPL の活性化について、その詳細な分子基盤を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

変異型 CALR の様々な欠失変異体や点突然変異体を発現させるベクターを作成した上で、レトロウイルスベクターを用いて、MPL を内在性に発現してトロンボポエチン依存性に増殖する UT-7/TPO 細胞に導入し、変異型 CALR による腫瘍性増殖に必要なドメインを探索した。さらに、間接免疫蛍光染色法を用いて、これらの変異体の細胞内での局在を明らかにした。また、細胞抽出液を調製し、共免疫沈降法を用いて、これらの変異体と MPL の相互作用を調べた。

【結 果】

変異型 CALR のアミノ末端に存在し、小胞体への移行に必須であると考えられるシグナルペプチド配列を取り除いた欠失変異体は、腫瘍原性を失った。一方この配列を、他の蛋白質のアミノ酸配列の異なるシグナルペプチド配列に置換したところ、腫瘍原性が回復した。また、変異型 CALR は、主にゴルジ体において MPL と共局在することが明らかとなったが、シグナルペプチドを欠失する変異体は、ゴルジ体には局在しなかった。さらに、この欠失変異体は、MPL とほとんど相互作用しなかった。

【考 察】

以上の結果から、変異型 CALR と MPL の相互作用と、それによる細胞の腫瘍化には、変異型 CALR の小胞体への移行が必須であることが示された。これは、本来は分子シャペロンとして小胞体内で機能している変異型 CALR が、小胞体あるいはその後移行するゴルジ体において、MPL の成熟過程に生じる特異的な性状を認識して、相互作用することで、最終的に MPL の恒常的な活性化を引き起こすことを強く示唆している(投稿準備中)。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、変異型 CALR による MPL の活性化に必要な反応が、小胞体やゴルジ体といった受容体の成熟に関与する細胞内小器官の中で生じていることが明らかになった。これらの細胞内小器官で生じている変異型 CALR と MPL の相互作用を規定している分子基盤の解明を進めることで、変異型 CALR による細胞腫瘍化シグナルを特異的に抑制する MPN の新規治療戦略の開発が大いに期待される。

【参考・引用文献】

1. Shirane S, Araki M, Morishita S, et al. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(2):e46-48.
2. Edahiro Y, Morishita S, Takahashi K, et al. JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. *Int J Hematol*. 2014;99(5):625-634.
3. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(10):1307-1316.
4. Imai M, Araki M, Komatsu N. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2017;105(6):743-747.
5. Araki M, Komatsu N. Novel molecular mechanism of cellular transformation by a mutant molecular chaperone in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Sci*. 2017;108(10):1907-1912.