

Calreticulin 不全による造血器腫瘍発症機構の解明

幣 光太郎

宮崎大学 医学部 内科学講座 消化器血液学分野

【研究の背景】

本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia: ET)、原発性骨髄線維症 (Primary myelofibrosis: PMF) の約 30% に、小胞体においてタンパクの folding や輸送に関わるシャペロンタンパクである Calreticulin (CALR) に遺伝子変異がみられる^{1,2)}。申請者らは ET の臨床像解析から、CALR 変異患者は、JAK2 変異患者と比較し、末梢血の赤血球数や好中球数が少ない一方、血小板数が多いことを見出した³⁾。さらに、JAK2V617F 変異による JAK2 活性化は好中球、赤血球、血小板の 3 系統の血球増加をもたらすが CALR 変異は血小板のみを増加させることに着目し、CALR 変異が顆粒球コロニー刺激因子受容体、エリスロポイエチン受容体のシグナルには影響を与えず、トロンボポイエチン受容体 (MPL) 下流の JAK-STAT 経路のみを活性化することを証明した。更に同変異のノックイン細胞株、トランスジェニックマウスを作成し、*in vitro*, *in vivo* で変異の活性を明らかにした⁴⁾。

【目 的】

本研究では、現在まで申請者らが明らかにした研究成果を元に、変異 CALR による疾患発症の分子メカニズムを *in vitro*, *in vivo* 両面から解析し、分子病態を解明する。最終的には成果を新規治療法開発、前臨床研究へとつなげることが目的である。

【方 法】

3つのテーマについて研究を行った。

- (1) MPL の糖鎖修飾に与える変異 CALR の影響: *Calreticulin* の変異が、トロンボポエチン受容体蛋白の糖鎖修飾パターン (N グリコシル化や O グリコシル化) に影響を与えることで、機能が変化するという仮説をもとに研究を行った。野生型 293T 細胞株、N 型糖鎖欠損 293T 細胞株 (PDIS-12)、N 型及び O 型糖鎖欠損株 (PDIS-20) を用いて、変異 CALR の活性が株により変化するかどうかを比較した (PDIS-12,20 は東北大学医学系研究科、加藤幸成教授より分与)。
- (2) 野生型 CALR 欠損の正常造血、異常造血における役割の解明: 正常造血における役割を明らかにするため血球特異的な conditional KO (cKO) マウスの表現型を解析した。ほとんどの症例で CALR 変異は片アレルに生じていることに着目し、異常造血 (ET, PMF 造血) における役割を明らかにするため heterozygous KO (hKO) マウスの表現型を解析した。
- (3) エピゲノム制御分子異常との協調作用の解明: *CALR/EZH2* 二重変異マウスを作製、造血幹細胞機能や MF 様病態発症について解析を行った。

【結 果】

- (1) MPL の糖鎖修飾に与える変異 CALR の影響: PDIS-12, PDIS-20 内において、(変異型 CALR 発現下における STAT5 活性)/(野生型 CALR 発現下における STAT5 活性) の比は 2~3 倍であり、野生型 293T 細胞を用いた場合と比べ違いはなかった。western blotting においても MPL 蛋白はいずれの株でも同等の発現が見られた。以上のことから、変異型 CALR による STAT5 活性亢進は、MPL の N 型および O 型糖鎖修飾を介したものではない可能性が高いと考えられ

た。

- (2) 野生型 CALR 欠損の正常造血、異常造血における役割の解明: cKO マウスでは、野生型マウスと比較し骨髄における骨髄系前駆細胞の増加、脾臓における髄外造血などの所見が認められた。また、骨髄系細胞のプロテオーム解析では、ミエロペルオキシダーゼ (MPO) を始めとする蛋白欠損が検出され、シャペロン機能が失われたことに起因すると考えられた。hKO マウスでは、特に競合移植実験において、造血幹細胞の自己複製能亢進と、野生型細胞に対する増殖優位性が認められた⁵⁾。現在、メカニズムなど更に詳細な解析を進めている。
- (3) エピゲノム制御分子異常との協調作用の解明: *CALR/EZH2* 二重変異マウスを作製、造血幹細胞機能や MF 様病態発症について解析を行った。8 ヶ月観察した時点で、ET を発症する *CALR* 変異マウスと *CALR/EZH2* 二重変異マウスとの間で、血球数や生存期間に差を認めていない。今後は観察期間を延ばしていくと同時に、造血幹細胞の機能解析や、DNA 傷害性刺激に対する白血球発症応答の差異などを解析していく。

【考 察】

本研究課題においては、特に小テーマ(2)について、大きな成果が得られたと考える。正常造血において、CALR が担う役割については、全くの未知であった。申請者らの研究は、CALR が「骨髄系前駆細胞の数」、「脾臓への造血細胞分布」、の恒常性維持に働いていることや、MPO などの蛋白発現に必須であることを明らかにした。また、「*CALR* 変異陽性 ET, PMF 患者の異常造血幹細胞は、片アレルの正常 *CALR* 喪失、つまり haploinsufficiency を介して野生型細胞に対する増殖優位性を獲得している」という、骨髄増殖性腫瘍発症メカニズムに関する重要な知見を世界で初めて見出し、提唱することができた。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究によって、骨髄増殖性腫瘍、特に *CALR* 変異陽性 ET, PMF について、疾患発症の分子メカニズムを明らかにすることができた。*CALR* 変異は予後不良(5 年生存率 40%)である PMF では約 3 割の患者で認められる。本研究による成果には、PMF 克服へとつながる大きな意義があるであろう。

【参考・引用文献】

1. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2391-405.
2. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med.* 2013;369(25):2379-90.
3. Kubuki Y, Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Kamiunten A, et al. Differences in Hematological and Clinical Features Between Essential Thrombocythemia Cases With JAK2-or CALR-Mutations. *Annals of Laboratory Medicine.* 2017;37(2):159-61.
4. Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiunten A, et al. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia.* 2017;31(5):1136-44.
5. Shide K, Kameda T, Kamiunten A, Sekine M, Ozono Y, Yokomizo T, et al. Haploinsufficiency of CALR Confers Hematopoietic Stem Cells (HSCs) with a Clonal Advantage over Wild-Type Cells, and, in Setting of Myeloproliferative Neoplasms, Compensates for the Functions of HSCs Impaired By the CALR Mutation. *Blood.* 2018;132(Suppl 1):97-.