

変異型分子シャペロンの多量体化によるサイトカイン受容体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(MPN)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 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¹⁾。これらの遺伝子変異のうち、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から、MPN の発症との因果関係が解明されていなかった。私はこれまでに、CALR 遺伝子の最終エクソンに生じたフレームシフト変異によって出現した新たな変異型特異的ドメインが、ドメイン同士で相互作用することで変異型 CALR がホモ多量体化すること²⁾、これにより引き起こされる構造変化によって変異型 CALR が MPL と強固に相互作用すること³⁾、そして、変異型 CALR の結合により MPL が恒常的に活性化し、下流の JAK2 を介して細胞を腫瘍化することを明らかにした⁴⁾。しかし、変異型 CALR のホモ多量体化や変異型 CALR による MPL 活性化の分子基盤には、未解明な部分が多くある。

【目 的】

本研究では、変異型 CALR がホモ多量体化する分子基盤の解明と、ホモ多量体化した変異型 CALR による MPL の活性化が生じる細胞内における場所を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

変異型 CALR のホモ多量体化に必要な相互作用が生じている変異型特異的ドメインの様々なアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を、変異型 CALR の腫瘍原性を評価可能なトロンボポエチン依存性の UT-7/TPO 細胞株に導入し、腫瘍原性とホモ多量体化状態を評価した。さらに、変異型 CALR を発現する UT-7/TPO 細胞において、MPL の細胞表面への輸送を停止した際、あるいは、プロテアーゼを用いて細胞表面から MPL を排除した際の、MPL 下流のシグナル伝達経路の活性化状態を調べた。

【結 果】

変異型 CALR のカルボキシル末端の変異型特異的ドメインに存在する複数のシステイン残基は、一部がジスルフィド結合しており、この結合が変異型 CALR のホモ多量体化の原因のひとつであることが明らかになった。しかし、このジスルフィド結合を完全に破壊した変異型 CALR は、依然、多量体化するとともに、腫瘍原性を有していることが明らかになった。さらに、変異型 CALR のホモ多量体化は、変異型特異的ドメインに存在する疎水性アミノ酸クラスター間の分子間相互作用により成立していることが明らかになった(投稿準備中)。

変異型 CALR を発現する UT-7/TPO 細胞では、細胞表面への MPL の輸送を停止しても、ERK1/2 や STAT5 などの下流シグナル伝達分子の活性化は、持続していた。これは、変異型 CALR と MPL が複合体を形成する細胞内部において、下

流シグナル伝達経路の活性化が生じていることを示唆していたが、細胞表面から変異型 CALR と MPL を削り取ったところ、変異型 CALR に依存したシグナルが完全に消失した。また、変異型 CALR と MPL は、細胞表面への MPL の輸送を停止しても、細胞表面において長時間存在し、活性化状態を維持していることが明らかになった。これらのことから、変異型 CALR による MPL の活性化は、細胞表面で生じていることが明らかになった^{5,6)}。

【考 察】

以上の結果から、変異型 CALR のカルボキシル末端に存在する疎水性アミノ酸クラスター間の分子間相互作用が、腫瘍化に重要な役割を果たしていることが明らかになったが、このドメインは、既知の蛋白質との類似性が見られないことから、なお、その詳細な結合様式は不明である。現在行っている構造生物学的な解析により、新しい結合様式の解明が期待される。さらに、変異型 CALR による MPL の活性化は、受容体が本来活性化する細胞膜表面において生じていた。このことは、細胞表面に到達するまでに生じる、MPL あるいは変異型 CALR の修飾や他の蛋白質との結合が、変異型 CALR による MPL の活性化に必要なことを強く示唆している。

【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 の活性化に必要な変異型 CALR の多量体化が、変異蛋白質に特異的なドメインに存在する疎水性アミノ酸クラスターを介して生じていることが明らかになった。さらに、変異型 CALR により MPL の活性化が主に細胞表面で生じていたことから、細胞外から変異型 CALR の多量体化を阻害することで、MPL を介した腫瘍性シグナルの発生を減弱できる可能性が示された。さらに、MPL が活性化する細胞表面への輸送を阻害することで、変異型 CALR による MPL の活性化を抑制できる可能性が示された。今後、本研究で得られた知見を基盤として、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, Edahiro Y, Takei H, Yoo Y, et al. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015 Feb;100(2):e46-8.
2. Araki M, Yang Y, Imai M, Mizukami Y, Kihara Y, Sunami Y, et al. Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation. *Leukemia*. 2019 Jan;33(1):122-31.
3. Araki M, Komatsu N. Novel molecular mechanism of cellular transformation by a mutant molecular chaperone in myeloproliferative neoplasms. *Cancer Sci*. 2017 Oct;108(10):1907-12.
4. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016 Mar 10;127(10):1307-16.
5. Masubuchi N, Araki M, Yang Y, Hayashi E, Imai M, Edahiro Y, et al. Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia*. 2019 Aug 28.
6. Araki M, Komatsu N. The role of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2019 Dec 17.