

腫瘍性リガンド変異型 CALR の切断メカニズムの解明

荒木真理人

順天堂大学大学院医学研究科 骨髄増殖性腫瘍治療薬開発講座

【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系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、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、変異型 CALR が、フレームシフト変異により生じた変異型に特異的な配列を介してホモ多量体化し、トロンボポエチン受容体 MPL と特異的に相互作用することで、MPL と下流の JAK2 を恒常的に活性化し、細胞を腫瘍化していることを明らかにしている^{3,4)}。さらに最近、変異型 CALR が、腫瘍原性に必須である変異型に特異的な配列においてプロテアーゼによる切断を受けること、さらに、患者細胞では変異型 CALR の大部分が切断型になっていることを発見した⁵⁾。この切断は、変異型 CALR の腫瘍原性を喪失させることから、MPN 患者では、切断を免れた変異型 CALR が細胞を腫瘍化して、MPN を発症させることが強く示唆された。

【目的】

本研究では、変異型 CALR の腫瘍原性に必須の配列で生じる、特異的な蛋白質切断の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 の特異的な切断が観察される UT-7/TPO 細胞から調製した RNA のシーケンス解析を行い、発現しているプロテアーゼを特定した。その中から、変異型 CALR の切断配列を基質配列とするプロテアーゼを絞り込んだ上で、それらのプロテアーゼの阻害剤を培養液に添加し、変異型 CALR の切断への影響をイムノブロット法により評価した。阻害剤を用いた評価により、変異型 CALR の切断に関与すると考えられたプロテアーゼの遺伝子発現を、RNA 干渉法により抑制して、変異型 CALR の切断への影響をイムノブロット法により評価した。

【結果】

RNA 発現解析によって高い発現が確認されたプロテアーゼをコードしている 363 個の遺伝子の中から、変異型 CALR の切断部位を基質とする可能性がある 25 個のプロテアーゼを同定した。これらのプロテアーゼの阻害剤をスクリーニングし、変異型 CALR の切断を阻害するものとして、Furin Inhibitor I を同定した。次に、Furin をコードする PCSK3 遺伝子の発現を RNA 干渉により抑制したところ、切断型の変異型 CALR の減少と、それに伴った完全長と考えられる変異型 CALR の増加が見出された。以上の結果から、Furin/PCSK3 が変異型 CALR の切断に関与することが明らかになった。

【考 察】

Furin/PCSK3 は、分泌経路や細胞外に局在するプロテアーゼであることから、同様に分泌経路に存在している変異型 CALR を切断していると結論できる。一方で、Furin/PCSK3 は、9 個の類似するプロテアーゼから構成される PCSK ファミリーに属しており、PCSK ファミリーにより切断されるアミノ酸配列には相同性があることから、PCSK ファミリーに属する他のプロテアーゼが、変異型 CALR の切断に関与している可能性が考えられる。今後、患者細胞における PCSK ファミリー遺伝子の発現解析や、培養細胞における過剰発現系を用いた解析により、PCSK ファミリーに属する他のプロテアーゼの変異型 CALR の切断への関与が明らかになることが期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、変異型 CALR の腫瘍原性に必須な配列を特異的に切断するプロテアーゼとして Furin/PCSK3 が同定された。変異型 CALR の切断を促進して、腫瘍原性を喪失させることで MPN の治療が可能であると考えられることから、Furin/PCSK3 を活性化する薬剤の MPN 治療薬としての開発が期待される。また、Furin/PCSK3 の発現抑制や活性低下が MPN の発症に関与することが示されれば、その制御機構を標的とした治療戦略の立案が可能となる。これらのことから、本研究で得られた知見を基盤として、変異型 CALR の切断を司る分子基盤を標的とした 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, Eda Hiro Y, Takei H, Yoo Y, Choi M, Sunami Y, Hironaka Y, Noguchi M, Koike M, Noda N, Ohsaka A, Komatsu N. JAK2, CALR, and MPL mutation spectrum in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*. 2015;100(2):e46-8.
2. Misawa K, Yasuda H, Araki M, Ochiai T, Morishita S, Shirane S, Eda Hiro Y, Gotoh A, Ohsaka A, Komatsu N. Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2018;107(6):673-680.
3. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y, Kan S, Shirane S, Eda Hiro Y, Sunami Y, Ohsaka A, Komatsu N. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(10):1307-16.
4. Araki M, Yang Y, Imai M, Mizukami Y, Kihara Y, Sunami Y, Masubuchi N, Eda Hiro Y, Hironaka Y, Osaga S, Ohsaka A, Komatsu N. Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation. *Leukemia*. 2019;33(1):122-131.
5. Kihara Y, Araki M, Imai M, Mori Y, Horino M, Ogata S, Yoshikawa S, Taguchi T, Masubuchi N, Mabuchi Y, Yang Y, Fukuda Y, Morishita S, Suzuki T, Domae N, Shimonaka M, Akazawa C, Ohsaka A, Komatsu N. Therapeutic Potential of an Antibody Targeting the Cleaved Form of Mutant Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. *Blood*. 2020;136;1:9-10.