

## JAK2V617F 関連免疫血栓を標的とした血栓性疾患の新規治療戦略

三阪智史

福島県立医科大学 循環器内科学講座

### 【研究の背景】

血栓症は、様々な心血管疾患の病因であるため、その制圧は喫緊の課題である。近年の研究により、好中球などの自然免疫系の細胞が動脈血栓形成の分子機構において重要な役割を果たすことが示され、この新しい概念としての Immunothrombosis を標的とした治療応用の可能性が示唆されている (ref #1: Nat Rev Cardiol 2021)。最近のゲノム解析技術の進歩により、末梢血液像が正常な健常者でも、遺伝子変異が造血幹細胞レベルで出現し、これがクローン性に拡大して末梢血で観察されるクローン性造血が明らかになった (ref #2: N Eng J Med 2014)。高齢者に潜むクローン性造血は、血栓症を病因とする心筋梗塞など複数の心血管疾患のリスクにつながることも分かってきた (ref #3: N Eng J Med 2017)。

申請者らは、これまで JAK2V617F 変異に着目して、JAK2V617F クローン性造血と心血管疾患の関連性を明らかにしてきた (Misaka T, et al. ref #3: Nat Commun 2021, ref #4: JACC CardioOncol 2021, ref #5: Haematologica 2021, ref #6: J Cardiol 2023)。JAK2V617F 変異が gain-of-function の機序により骨髄由来血液細胞における機能的な形質変化を介して、動脈硬化性疾患だけではなく、肺高血圧症の発症や重症化に重要な役割を果たすことを明らかにした。

慢性血栓塞栓性肺高血圧症 (CTEPH) は、静脈血栓塞栓によって生じた肺動脈内の器質化血栓により慢性的な肺動脈閉塞から肺高血圧症を呈する疾患であるが、JAK2 変異が静脈血栓を促進する機序の詳細や、Immunothrombosis における意義は十分に解明されていない。JAK2 変異がどのように静脈系血管の血栓形成を誘導するのか、その分子機構を明らかに出来れば、血栓形成を抑制する次世代型抗血栓療法の開発につながることを期待され、これを明らかにする必要がある。

本研究では、血球細胞の JAK2V617F が血栓性疾患を促進する分子機構を包括的に解明することで、CTEPH に対する治療開発のみならず、静脈血栓症に対する予防および治療法の確立を目指し、個別化医療の実用化に向けた基盤を構築する。

### 【目 的】

本研究では、申請者らが一貫して研究を進めてきた JAK2V617F クローン性造血による血栓形成の分子基盤を解明する。CTEPH と深部静脈血栓症患者に潜む JAK2V617F クローン性造血を JAK2V617F 関連血栓性疾患という概念として捉えて、JAK2V617F に着目した Immunothrombosis からアプローチする。JAK2V617F 関連血栓性疾患に対する個別化治療および次世代型抗血栓療法に向けた基盤を構築する。

### 【方 法】

申請者らが保有する JAK2V617F 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス (JAK2V617F マウス; ref #3) を用いて、血栓症モデルを作成して、in vivo と in vitro の双方からアプローチする。

#### 1. 下大静脈狭窄による静脈血栓症モデルの作成

JAK2V617F マウスを用いて、下大静脈狭窄による静脈血栓症モデルを作成して、超音波検査と病理組織学的解析により、血栓サイズを評価する。マウスの下大静脈に 90% 狭窄を作成すると、14 日後には血栓が形成され、ヒト深部静脈血栓症と類似した病理像を呈する (Circulation 2021)。JAK2V617F マウスに下大静脈狭窄モデルを作成し、7、14 日後に下大静脈の超

音波検査を行い、血栓の有無やサイズを評価する。その後、病理組織学的解析(HE 染色、Elastica-Masson 染色)に基づいて、血栓サイズの評価を行い、野生型マウスと比較検討する。

## 2. 塩化第二鉄による下大静脈血栓症モデルの作成

塩化第二鉄を血管外から下大静脈表面に作用させることで、急性の血管内皮障害を誘発し、血栓形成を強制的に起こすモデルを作成し、上記と同様の検討を行う。

## 3. Immunothrombosis における好中球細胞外トラップと JAK2V617F

上記モデルにおける下大静脈組織および血栓組織を用いて、JAK2V617F による血栓症増悪における Immunothrombosis の関与を明らかにする。血栓部の免疫染色により、CD45(白血球)、Ly6G(好中球)、CD68(マクロファージ)、CD3(リンパ球)などの血球細胞の数を解析してそれぞれの意義を明らかにする。Immunothrombosis のプロセスで注目される好中球細胞外トラップ(NETs; neutrophil extracellular traps)を評価する。これは自己の核内クロマチンを網目状に細胞外に放出する現象として、シトルリン化ヒストン H3 抗体と Ly6G 抗体の共染色によって、NETs を同定する(Science 2004)。

## 4. JAK2V617F による NETs 血栓形成のイニシエータ: JAK2-STAT-ALK1、血小板の関与

申請者が同定してきた JAK2-STAT-ALK1 およびその下流の Smad1/5/8 経路についてウエスタンブロッティングや免疫染色で解析を行う。NETs・血栓形成のイニシエータとして血小板に着目して、血栓組織の CD41 抗体による免疫染色を行い、血小板の関与を評価するとともに、ex vivo で解析を行う。

## 【結 果】

### 1. 下大静脈狭窄による静脈血栓症モデルでの検討

JAK2V617F マウスの腹部下大静脈を露出して 30G のニードルを用いて、90%下大静脈狭窄を作成するマウスモデルを確立した。JAK2V617F マウスと野生型(WT) littermates マウスに対して、下大静脈狭窄を形成したところ、JAK2V617F マウスでは、術後 1 日ではほぼ全例が死亡するに至り、生存解析では、WT マウスと比較して、JAK2V617F マウスが有意に生存率低下を認めた。そのため、下大静脈狭窄後 4 時間後の時点で、エコーによる観察を行ったところ、JAK2V617F マウスでは、5 匹中 5 匹が下大静脈内の血栓形成を認めたのに対して、WT マウスでは 5 匹中 0 匹であった。このことから、JAK2V617F マウスでは、下大静脈狭窄によって、急性静脈血栓症が誘導され、生存率低下に関与することが示唆された。

### 2. 塩化第二鉄誘導性静脈血栓症モデルにおける検討

JAK2V617F マウスでは、WT マウスと比較して、塩化第二鉄誘導性静脈血栓症モデル後、血栓の重量の増悪を認めた。静脈うっ滞モデル・内皮障害モデルいずれにおいても、JAK2V617F の存在によって、静脈血栓が促進することが示唆された。

### 3. JAK2V617F による静脈血栓促進のメカニズム

下大静脈狭窄 4 時間後、マウスをサクリファイし、下大静脈組織を用いて免疫組織学的解析を行った。JAK2V617F マウスの血栓組織では、Ly6G 抗体陽性の好中球の数を多数認めた。さらに、免疫染色により、シトルリン化ヒストン H3 抗体と Ly6G 抗体の共染色によって、NETs を同定したところ、JAK2V617F マウスの静脈内に、NETs の形成が認められた。JAK2V617F によって、特異的に好中球の NETs が誘導され、静脈血栓形成を引き起こす可能性が示唆された。JAK2V617F マウスでは、Ly6G 好中球は、その多くが ALK1 抗体陽性を示し、JAK2-STAT-ALK1 の亢進の機序が示唆された。すなわち、JAK2V617F は、この経路を介して特異的に NETs を誘導し、血栓形成を引き起こす可能性が示唆される。さらに、NETs・血栓形成のイニシエータとして血小板に着目して、血栓組織の CD41 抗体による免疫染色など血小板の関与について、解析を行っている。

## 【考 察】

本研究は、申請者が提案する JAK2V617F 関連血栓性疾患という新規概念に基づき、精密医療につながる可能性を検証する独創的な取り組みである。JAK2V617F は、直接 JAK-STAT を活性化するため、他のクローン性造血関連遺伝子変異より心血管疾患のリスクが高く、臨床的意義が大きい。現在、血栓症に対する個別化治療としての分子標的薬は存在しないため、本事業がその分野の先駆けとなることが期待される。これらの解析データを基に、同定した JAK2V617F 血小板活性化の

イニシエータ分子を阻害することによって、NETs の誘導の抑制から、血栓形成が抑制されるか、阻害剤やノックダウン・ノックアウトの系を用いて検証する必要があり、研究を継続する。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

10 人に 1 人の高齢者は、クローン性造血を有しており、心血管疾患患者ではさらに高頻度であることが示唆され、臨床的意義から社会的需要も大きい。現在の抗凝固薬や抗血小板薬は生理的な止血に関わる経路も標的とするが、JAK2V617F によって特異的に血栓形成を抑制する治療戦略を提案できる。Immunothrombosis に着目した新しい機序での血栓形成の意義を明らかにすることで、静脈系血栓症だけでなく、動脈系血栓症への応用につながる発展性がある。JAK2V617F 以外の血栓症に共通する分子機序の解明も期待できる。血栓イベントの予防や血栓症に対する新たな治療戦略の提案が可能となり、その実現を通じて精密医療への発展に貢献出来ることを目指す。

#### 【参考・引用文献】

1. Nat Rev Cardiol 2021; 18:666-682.
2. N Engl J Med 2014; 371: 2488-98.
3. N Engl J Med 2017; 377: 111-121.
4. Nat Commun 2021; 12: 6177.
5. JACC CardioOncol 2021; 3: 134-136.
6. Haematologica 2021; 106: 1910-1922.
7. J Cardiol 2023; 81: 3-9.