

研究報告書

研究課題：A（一般）
（平成24年度）

平成26年10月7日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 高山昭三 殿

研究施設 東京大学医学部附属病院

住 所 東京都文京区本郷7-3-1

研究者氏名 吉見 昭秀



（研究課題）

骨髄増殖性腫瘍患者の急性骨髄性白血病への進展における Paracrine 仮説の検証と造血器腫瘍の治療への応用

平成25年1月29日付助成金交付のあった標記指定課題について研究が終了致しまし

たのでご報告いたします。

【研究の背景と目的】

BCR/ABL 陰性の骨髄増殖性腫瘍 (MPN ; myeloproliferative neoplasm) では JAK2 遺伝子変異が高率に認められ、また急性骨髄性白血病 (AML ; acute myeloid leukemia) への transformation がみられる (以降、MPN-BP ; MPN-blast phase と呼ぶ)。MPN-BP は非常に予後不良であるが、MPN 患者における transformation の分子学的機序はほとんどわかっていない。そこで本研究では MPN における AML への transformation の分子学的機序を解明し、予後不良である MPN-BP を克服することを目標とする。JAK2 変異陽性 MPN 患者の MPN-BP においては約半数例で JAK2 変異が陰性であることから (Beer et al. Blood 2010, Theocharides et al. Blood 2007)、JAK2 変異陽性細胞が何らかの変異原性物質を分泌 (paracrine) することにより、周囲の正常骨髄細胞の DNA 損傷を助長し、腫瘍化に重要な変異を引き起こすことが JAK2 変異陰性 MPN-BP の原因となるのではないかと仮説を立てた。本研究では、「JAK2 変異陽性細胞からの paracrine 仮説」についての検証と詳細な分子機序の解明を通じて、真に MPN における白血病発症の病態の核心に迫ることを目標とし、MPN-BP をはじめ、様々な造血器腫瘍において得られた知見を検討することにより、広く造血器腫瘍に対する治療法の開発を目指す。

【研究方法】

(1) JAK2-V617F 陽性 MPN モデルマウスの作製

JAK2-V617F をレトロウイルスによりマウス骨髄細胞に導入し、致死量放射線照射マウスに経静脈投与することにより MPN マウスモデルを作製し、解析に用いた。この際ウイルスベクター内に GFP 配列を挿入しており、JAK2-V617F 陽性細胞を GFP で識別できるようにしている。細胞内の DNA 損傷については γ H2AX の免疫蛍光染色により評価した。

(2) JAK2-V617F 陽性細胞から分泌される変異原性物質の同定

1. マウス骨髄細胞由来のセルラインである 32D 細胞に JAK2-V617F をレトロウイルスにより導入し (JAK2V617F-32D)、コントロールと比較してのパラクライン DNA 損傷を引き起こす物質の探索を行った。パラクライン効果の検証については JAK2V617F-32D の培養上清を 32D 細胞に曝露し、コントロールと比較しての DNA 損傷誘導効果を調べた。

2. 変異原性物質の同定については既存の遺伝子発現データの再解析により JAK2-V617F 陽性細胞で発現が上昇している遺伝子を絞り込み、この中から分泌タンパクをコードする遺伝子を抽出し、これらの遺伝子を short-hairpin RNA (shRNA) により個々にノックダウンし、DNA 損傷効果の変化を観察した。

【研究結果】

MPN マウスモデル骨髄中の DNA 損傷を調べたところ、GFP 陽性、陰性細胞ともに γ H2AX の核内集積がコントロールと比較して有意に亢進していることがわかった。このことから JAK2-V617F 陽性細胞のみならず、周囲の正常細胞にも DNA 損傷の蓄積が見られることが示唆された (図 1)。同様に *in vitro* においても JAK2V617F-32D の培養上清をふりかけた 32D 細胞で γ H2AX の核内集積亢進が見られたことから、JAK2-V617F 陽性細胞によりパラクライン効果が周囲の細胞に DNA 損傷効果を引き起こしていることがわかった。既存の遺伝子発現データの再解析により JAK2-V617F 陽性細胞で発現が上昇している 8 個の分泌タンパクをコードする遺伝子を抽出し、これらに対する shRNA を JAK2V617F-32D に導入した。ここで lipocalin-2 (LCN2) という遺伝子をノックダウンすると、上記のパラクライン DNA 損傷効果が有意に減少したことから、同物質の DNA 損傷誘導効果が示唆された (図 2)。

さらに LCN2 の DNA 損傷誘導メカニズムについても解析を進めたところ、LCN2 の 32D

細胞への投与により、細胞内の鉄イオン濃度が上昇し、これに伴い細胞内活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS)濃度が上昇することがわかった。鉄キレート剤投与により、ROS 上昇が抑制された。

LCN2 による DNA 損傷に伴い、正常造血細胞においては p53 経路が活性化し、細胞のアポトーシス増加、増殖抑制が引き起こされた。これとは対照的に、JAK2-V617F 陽性細胞においては p53 経路活性の誘導が弱く、細胞増殖の減少をきたさないことがわかった。従って Lipocalin-2 の存在下では、正常細胞と JAK2-V617F 陽性細胞の共培養で JAK2-V617F 陽性細胞の増殖が相対的に有意となるが、LCN2 ノックアウトマウス由来の骨髓細胞では同現象が起こらず、Lipocalin-2 の MPN 発症における役割を明らかにした。

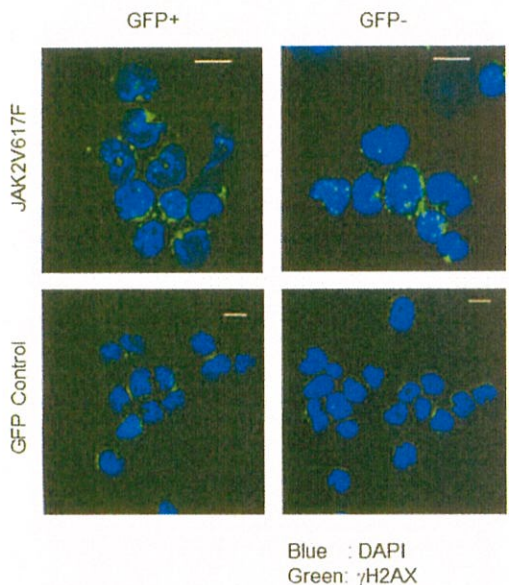


図 1. JAK2-V617F による MPN マウスモデル骨髓中細胞における γ H2AX 集積を免疫蛍光染色により観察。GFP 陽性、陰性分画ともに MPN 骨髓細胞で DNA 損傷応答が亢進している。

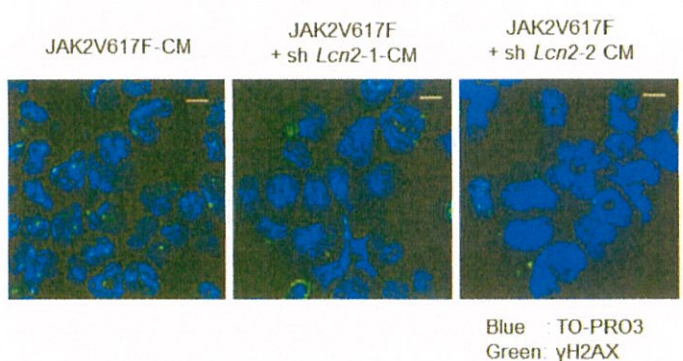


図 2. JAK2-V617F⁺32D 細胞の培養上清 32D 細胞に投与し、 γ H2AX 集積を免疫蛍光染色により観察。Lipocalin-2 をノックダウンすることにより JAK2-V617F 陽性細胞の DNA 損傷誘発能が著明に減少する。

【考察】

本研究では JAK2-V617F 陽性細胞から過剰分泌される Lipocalin-2 の 2 つの役割について明らかにした。まず Lipocalin-2 はパラクライン作用により周囲の造血細胞に DNA 損傷を引き起こし、DNA 変異の誘発を亢進させる。通常損傷細胞は p53 経路の働きにより排除され、この作用が即座に白血病進展に結びつくものではないが、遺伝子変異の蓄積リスクを高める一因になると考えられる。また、Lipocalin-2 による p53 経路活性化作用は JAK2-V617F 陽性細胞で弱く、これが同細胞の相対的増殖優位につながるということがわかった。JAK2-V617F

陽性細胞は正常造血細胞と比較して、自己複製、増殖能が変わらないことがノックインマウスを用いた解析でわかっており、この細胞が骨髄中正常細胞を凌駕して増殖するメカニズムについては知られていなかった。本研究は Lipocalin-2 が MPN の発症、その後の白血病進展の両者に関与することを示唆しており、治療標的として有望であると考えられる。

【論文発表】

・ Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S, Kurokawa M.

JAK2V617F-positive myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2.

Blood in press.

【学会発表】

・ Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Kataoka K, Arai S, Kurokawa M.

JAK2V617F mutation evokes paracrine DNA damage to adjacent cells and drives leukemic transformation

第 72 回日本癌学会総会

October 3-5, 2013, Yokohama, Japan (口演)

・ Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Kataoka K, Arai S, Kurokawa M.

JAK2V617F mutation evokes paracrine DNA damage to adjacent cells and drives leukemic transformation

第 76 回日本血液学会学術集会

October 11-13, 2013, Sapporo, Japan, Oral presentation (口演)

・ Kagoya Y, Arai S, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Kataoka K, Kurokawa M.

JAK2V617F Mutation Evokes Paracrine DNA Damage To Adjacent Normal Cells Via Secretion Of Lipocalin-2

55th ASH Annual Meeting and Exposition

December 7-10, 2013, New Orleans, USA (口演)