

特別講演



フィラデルフィア染色体
陰性骨髄増殖性腫瘍
—— 病態解明と今後の展開 ——
Philadelphia chromosome negative
myeloproliferative neoplasms
—— Elucidation of pathophysiology and
future development ——

後藤明彦
Akihiko GOTOH

東京医科大学血液内科学分野
Department of Hematology, Tokyo Medical University

【要旨】 骨髄増殖性腫瘍は造血幹細胞の腫瘍化によって骨髄系、赤芽球系、巨核球系のいずれかあるいは複数の系統の血球が無制限に増殖する疾患群である。慢性骨髄性白血病、真性多血症、本態性血小板血症、原発性骨髄線維症などの疾患が含まれるが、慢性骨髄性白血病については病因がフィラデルフィア染色体 (Ph) によって生じる BCR-ABL のチロシンキナーゼの恒常的活性化であることが 1980 年代に明らかにされていたのに対して、Ph 陰性の 3 疾患については 2005 年にはじめて *JAK2* の点突然変異が報告され WHO 分類第 4 版でその腫瘍的性格を明示する名称として慢性骨髄増殖性疾患から骨髄増殖性腫瘍へと変更された。*JAK2V617F* は真性多血症のほとんどの症例に認められたものの、本態性血小板血症と原発性骨髄線維症では半数強にしかみられず、2006 年に報告されたトロンボポエチンの受容体、*MPL* 遺伝子の変異も 5% 前後の頻度であったため、なぜ同一の遺伝子変異が異なる病態を生じさせるのかと共に、*JAK2* 変異を持たない本態性血小板血症と原発性骨髄線維症にあるはずのドライバー変異の正体が謎として残された。2013 年末に明らかにされたその正体は *calreticulin* というシャペロン機能をもつ意外な分子であった。これがどのようにドライバーとして働くかは 2016 年に初めて明らかにされ、ほぼ同時期に *JAK* 阻害薬 *ruxolitinib* が臨床応用された。ただ、*ruxolitinib* は脾腫縮小などの優れた臨床効果を示すものの、慢性骨髄性白血病における *imatinib* などと異なりクローンを選択的に排除する力は乏しい。現在、新規インターフェロンの治験が本邦で開始されており、選択的 *JAK2* 阻害薬の治験も開始予定である。さらに、新たな治療戦略の開発に向けた *in vitro* の研究の取組みも進めている。

令和 2 年 12 月 22 日受付 第 186 回東京医科大学総会

キーワード：骨髄増殖性腫瘍、*JAK2*、*calreticulin*、*ruxolitinib*

(別冊請求先：〒 160-0023 東京都新宿区新宿 6-7-1 東京医科大学血液内科学分野)

はじめに

今から70年前の1951年、Blood誌の初代エディターでもあったWilliam Dameshek博士は慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia; CML)、真性多血症 (polycythemia vera; PV)、本態性血小板血症 (essential thrombocythemia; ET)、原発性骨髄線維症 (primary myelofibrosis; PMF) などの疾患がいずれも造血幹細胞レベルの異常で発症すると考え、これらを骨髄増殖性疾患 (myeloproliferative diseases; MPD) と名付けた¹⁾。これは実に先見性に富んだ考察で、70年を経た現在まで基本的にこのカテゴリーが維持され、実際2008年WHO分類第4版²⁾まで上記4疾患はchronic MPDと称されていた。2008年の改訂ではこの疾患群の腫瘍性格を明確に示す名称としてmyeloproliferative neoplasms (MPN; 骨髄増殖性腫瘍) と改称され、最新のWHO2016分類³⁾でMPNはCML、PV、ET、PMFの他、chronic neutrophilic leukaemiaとchronic eosinophilic leukaemia、NOSおよびMPN、unclassifiableの病型が含まれる。

この中でいち早く病因が明らかにされたのはCMLで、Philadelphia染色体 (Ph) と名付けられた短い22番染色体の存在の発見から始まり、Phは9番と22番の相互転座の結果であり、これにより**bcr-abl**というキメラ遺伝子が生成され、正常では非活性のABLのチロシンキナーゼ活性が恒常的に活性化されることにより造血幹細胞の腫瘍化が誘導されることが明らかにされた⁴⁾。このことからWHO分類ではMPNをPh (BCR-ABL) 陽性のCMLとPh陰性MPNに分けている。これに対し

PV、ET、PMFの古典的Ph陰性MPNに関してはその相互間で病型移行があることが知られていたが、病因に関しては長年明らかでなかった。ブレイクスルーとなったのは2005年の**JAK2**と呼ばれる遺伝子の点突然変異の発見であった。

JAK2V617Fの発見

CMLに関してはBCR-ABLの恒常的活性化に対してスクリーニングされたABL特異的チロシンキナーゼ抑制剤 (TKI) imatinibの臨床導入によって不治の病からTKIを飲んでいれば大多数の患者が疾患進行をせずに生存できる疾患へと変わった。これに対してPh陰性MPNはPMFが白血病化や骨髄不全などにより50%生存率3.8年と予後が悪く、PVは8年生存割合0.84、ETは同0.91と比較的予後がいい⁵⁾ものの、血栓症や出血傾向が多く症例の予後を規定し、一部は二次性MFに移行したり白血病化したりする。しかしながら造血幹細胞の腫瘍化であることは推定されていたものの、これらの疾患の原因は明らかでなかったこともあり、アスピリン製剤で血栓症を予防するかhydroxycarbamideなどにより細胞減少療法 (PVでは瀉血) を行うといった対症療法しか無かった。

そんな中、**JAK2V617F**が2005年、4つのグループからNature、New England Journal of Medicine、Lancetなどに同時に報告され大きな注目を集めた⁶⁻⁹⁾。JAK2は図1のようにJH1がコードするチロシンキナーゼを、通常であればJH2のコードする偽のキナーゼドメインが抑制しており、エリスロポエチン (EPO) やトロンボポエチン (TPO) などのサイトカインがレセプターに結合するとレセプター

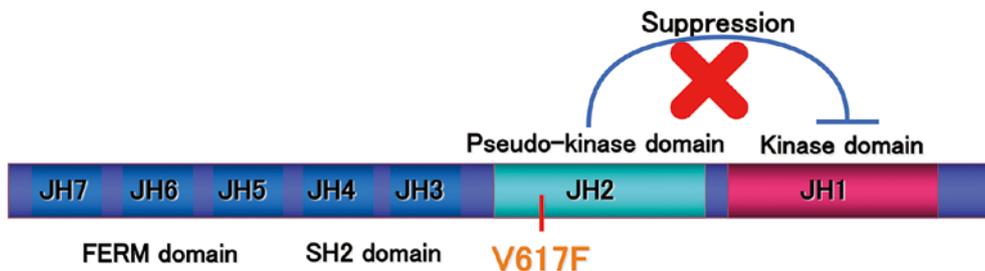


図1 JAK2 遺伝子の模式図と V617F

JH1は真のチロシンキナーゼをコードし、偽のキナーゼをコードするJH2によってその活性は抑制されている。サイトカイン受容体が活性化されるとJAK2は受容体にリクルートされて結合しJH2の抑制が外れキナーゼが活性化される。V617はJH2内にあり、1849G>Tが生ずるとV617はフェニールアラニンに変化し、JH2の抑制がキャンセルされJH1が恒常的に活性化される。FERMはサイトカイン受容体との相互作用を行う部位、SH2はチロシンリン酸化部位を認識し結合する部位である。
文献7)などを参考に筆者作成

の細胞質内部分に JAK2 がリクルートされて JH2 の抑制が外れ、チロシンキナーゼが一過性に活性化される。ところが JAK2 遺伝子の第 14 エクソンの 1849G>T 変異が生じることで JAK2 の 617 番目の Valine が Phenylalanine に置換される。V617F はチロシンキナーゼ活性を制御する JH2 中に存在するために JH1 抑制作用がキャンセルされ、サイトカイン非依存的・恒常的な JAK2 の活性化が誘導される。JAK2 は赤芽球や巨核球系の分化・増殖に重要な STA5 を恒常的に活性化させることで PV や ET、あるいは PMF を発症させると考えられた。実際に JAK2V617F を導入した骨髄細胞を移植したマウスで PV や二次性 MF のような MPN 様を発症する¹⁰⁾ ことから JAK2V617F の直接的な重要性が示された。

JAK2V617F は PV の 95% 以上、ET と PMF の 50% 強に発現していることがその後の多くの研究でも確認されたが、同一の遺伝子異常から何故異なる疾患を生じるのかは完全には明らかになっていない。PV と PMF では V617F のホモ接合型のクローンが多く、ET ではヘテロ接合型のクローンが多い¹¹⁾ ことから細胞内における JAK2 野生型と V617F 型の比率が、PV の発症に強く関与する EPO レセプターか ET や PMF の病態の核となる巨核球の増殖・成熟に関与する TPO レセプターかといった共役するレセプターの選択に影響することが想定されている。このホモ接合型とヘテロ接合型のクローン比率の変化はまた、Ph 陰性 MPN 内での病型変化 (ET から PV、ET や PV から MF など) にも関係していると考えられている。

JAK2V617F 以後の MPN の臨床： ruxolitinib の登場とその限界

PV ではほとんどの患者で JAK2V617F が認められるが ET と PMF では半数近くに認められないということから新たなドライバー遺伝子の存在が考えられたが、翌 2006 年に報告された TPO レセプターの遺伝子 MPL の変異¹²⁾ は MPL のホモ多量体化を誘導し JAK2 を活性化するが、ET や PMF の 5% 内外にしか認められず、1/3 以上を占めると予想される新たなドライバー変異の存在は長い間謎であった。しかしながら JAK2V617F の発見を機に Ph 陰性 MPN の臨床研究は大いに進展し、様々なリスク因子の解析を元に種々の予後予測システムが構築され

実臨床に生かされてきた¹³⁾。また JAK2V617F が同定されたことで CML における TKI のように JAK 阻害薬の臨床応用に期待が集まった。

初めて臨床応用された JAK 阻害薬は ruxolitinib である。PMF や二次性 MF 患者は巨脾や全身倦怠感、掻痒、発熱など様々な症状に苦しめられるが、imatinib と同様に経口薬であり JAK1 と JAK2 の阻害薬である ruxolitinib は脾腫の改善や自覚症状の改善・QOL の向上に劇的な効果を示した¹⁴⁾。長期的な効果でも全生存率を改善する¹⁵⁾ など、現在承認されている唯一の JAK 阻害薬として造血幹細胞移植の適応とならない MF 患者に広く用いられている。また、瀉血依存の PV 患者においても ruxolitinib は hydroxycarbamide など既存の治療に比べて有用性が高いことが示され¹⁶⁾、主として難治性 PV に用いられている。

しかしながら、臨床効果が速やかにみられるのに対して ruxolitinib による腫瘍細胞クローンの減少効果は低率であるのが問題である。第 III 相試験で ruxolitinib を長期に投与された 236 例の JAK2V617F 陽性の PMF 患者中、部分奏効を示したのは 20、分子学的完全奏効はわずか 6 例であり¹⁷⁾、CML における TKI のように単剤で完治あるいはそれに近い状態を望むのは不可能である。造血幹細胞移植は現在唯一完治を望める治療法であるが、平均発症年齢が 60 歳以上と高齢で、移植適応患者でも移植関連死亡率が高いため、PMF のハイリスク患者の一部でしか移植は行われていない。したがって、ruxolitinib を核として MPN の幹細胞クローンを排除できるかどうかは依然として重要なクリニカル・クエスチョンである。

Calreticulin (CALR) 遺伝子異常と MPN

前述のように JAK2V617F の発見以後、長期間謎であった MPN における第 3 のドライバー遺伝子は 2013 年末に明らかにされた。その正体は calreticulin という小胞体に存在する分子シャペロン作用をもつ意外な分子であった¹⁸⁾¹⁹⁾。シャペロンは小胞体で mRNA から翻訳され生成された蛋白が機能的に正常な構造に折りたたむのを手助けする分子である。CALR はシャペロン機能の他、カルシウムイオンの流入に関与するなど多機能の分子であることが知られていたが、これがどのようにして MPN の発症に関わるのかは新たな謎であった。CALR の変異は主

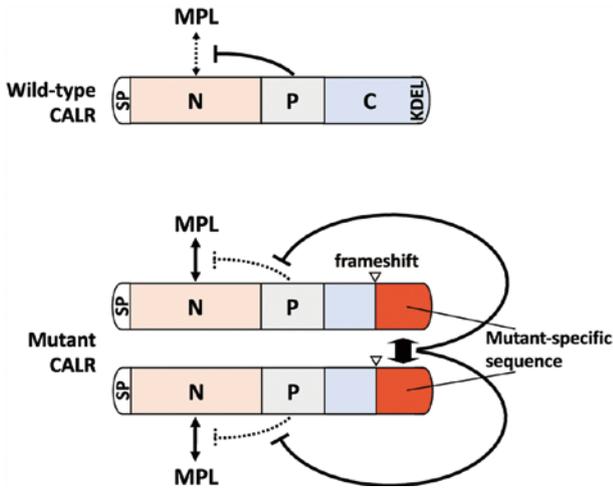


図2 野生型 CALR と変異型 CALR の模式図
 野生型 CALR は N 末から signal peptide (SP)、amino-terminal N-domain (N)、prolin-rich P-domain (P)、carboxy-terminal C-domain、C 末の小胞体把持に参与する KDEL からなる (上図)。変異型 CALR では遺伝子欠失または挿入によるフレームシフトによって KDEL を喪失し、腫瘍特異的のシーケンスを獲得するが、この部位が変異 CALR のホモ多量体形成に参与し、P-domain をブロックすることで N-domain を介して MPL と結合する。
 文献 20) から引用

に蛋白翻訳領域のエクソン 9 の 52 塩基の欠失 (type 1) か 5 塩基の挿入 (type 2) であり、いずれもフレームシフトを来して C 末に存在する KDEL という小胞体膜上に把持されるのに必要な部分が欠失し、腫瘍特異的な配列がみられる²⁰⁾ (図 2)。CALR の変異においても STAT5 が恒常的に活性化されることは報告されていたが、その実際のメカニズムの解明は荒木、小松らのグループ²¹⁾ を含む複数の研究グループからの 2016 年の報告を待たねばならなかった。

その後の彼らのデータ²²⁾²³⁾ も合わせると変異 CALR による MPN 発症のメカニズムは現在、図 3 のように考えられる。すなわち、変異 CALR はフレームシフトで生じた腫瘍特異的の部位を介してホモ多量体を形成する。ホモ多量体となった変異 CALR が小胞体で生成された未成熟型 MPL の N-glycans を認識し、結合することで MPL は TPO が結合したかのような二量体を形成する。変異型 CALR-MPL 複合体は、変異型 CALR が ER 保持シグナル (KDEL) を失っているため、分泌経路であるゴルジを経由して細胞表面に進む。変異型 CALR-MPL 複合体は細胞表面に出て初めて MPL の持続的な活性化を示し、JAK2 をリクルートして STAT5 などのシグナル伝達を恒常的に活性化させる。MPL と結合しないホモ

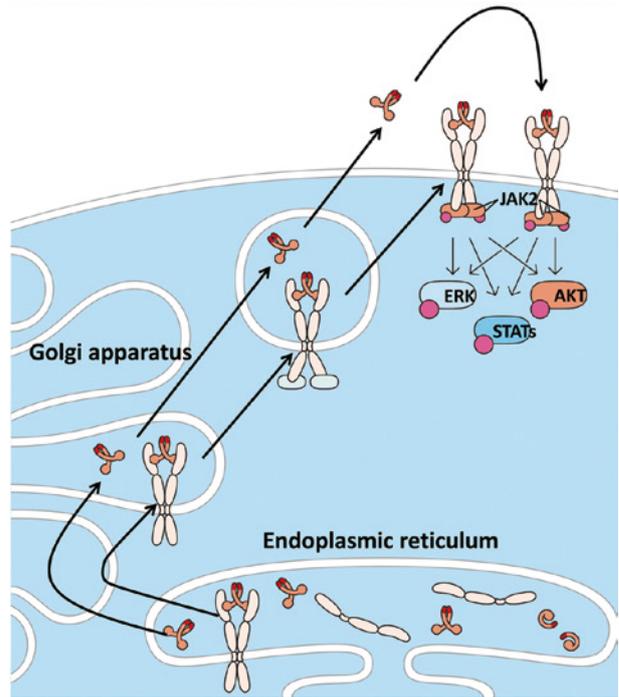


図3 変異型 CALR による MPL 活性化経路のモデル
 変異 CALR はフレームシフトで生じた腫瘍特異的の部位を介してホモ多量体を形成する。ホモ多量体となった変異 CALR は未成熟型 MPL の N-glycans を認識して、小胞体において 2 分子の MPL と結合する。変異型 CALR-MPL 複合体はゴルジを経由して細胞表面に進み、細胞表面に表出した変異型 CALR-MPL 複合体は JAK2 をリクルートして STAT や ERK、AKT などのシグナル伝達を恒常的に活性化させる。
 文献 20) から引用

多量体化変異 CALR 自体も細胞から分泌されることも示されているがその機能は現在のところ明らかではない。

CALR 変異は ET と PMF の 1/4 から 1/3 に認められ、JAK2 と MPL の変異と合わせると 85% 前後がいずれかのドライバー変異を有する。CALR 変異が PV には認められず、ET と PMF にしか認められないのは上記のメカニズムにより巨核球系の増殖・分化をもたらす TPO の受容体 MPL を活性化するが、赤芽球系の増殖・分化をもたらす EPO 受容体とは関与しないことから理解される。また、JAK 阻害薬 ruxolitinib が JAK2 変異や MPL 変異はもちろん、CALR 変異を有する MF に効果を発揮する理由も明らかになったと言える。しかしながら ruxolitinib による CALR 変異クローンの減少効果は JAK2V617F の場合よりさらに低いと考えられている。

今後の展開 (おわりにかえて)

以前に臨床試験が行われていた JAK2 に選択性が

高い JAK 阻害薬はいずれも ruxolitinib に勝る効果を示すことができず開発が中止されている。唯一、Wernicke 脳症の発現で中断されていた JAK2 選択的阻害薬 fedratinib が FDA に認可され、本邦でも治験が行われている。Ruxolitinib と他の分子標的薬との併用療法の可能性も探られていくであろう。また古くて新しい MPN に対する薬剤として interferon α (IFN) も新規の ropegIFN が PV と ET に対して治験が行われており、腫瘍クローンを減少させる効果も期待されている。

IFN に関しては妊娠に際して使用可能な唯一の細胞減少療法であることも忘れてはならない。ET は高齢者だけでなく妊娠可能な女性にも発症のピークがあり、PV の 15% は診断時に 40 歳未満であると言われており、MPN 合併妊娠では、通常の妊娠よりも周産期の血栓症、出血、流産、子癩前症、子宮内発育不全、死産、早産など妊娠合併症、胎児合併症の発症率が高い。我々は日本における ET 合併妊娠に対する IFN の有用性を最近報告した²⁴⁾ が、欧米では MPN 合併妊娠に対するガイドラインが存在するのに対して本邦では未だ整備されていないのは昨今の出産の高齢化と合わせて問題である。

基礎的にはドライバー変異のホモ接合体とヘテロ接合体あるいは野生型とのクローン比率の変化が病態に強く関与することは CML など他の造血器腫瘍と異なる点である。従来の変異遺伝子を細胞株に導入したモデルのみではモデルとして不十分である可能性があり、より実際に近い、患者から樹立したホモ接合体とヘテロ接合体あるいは野生型 iPS 細胞をモデルとして²⁵⁾ 新規治療ターゲットを探ることも有効な手立てではないかと考えている。

文 献

- 1) Dameshek W : Some speculation on the myeloproliferative syndromes. *Blood* **6** : 372-375, 1951
- 2) Thiele J, Kvasnicka HM, Tefferi A, et al : Primary myelofibrosis. Swerdlow SH, et al (eds) WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, 40-50, 2008
- 3) Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al : The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127** : 2391-2405, 2016
- 4) Gotoh A, Broxmeyer HE : The function of BCR/ABL and related proto-oncogenes. (review) *Curr Opin Hematol* **4** : 3-11, 1997
- 5) 日本血液学会編：慢性骨髄性白血病/骨髄増殖性腫瘍。造血器腫瘍診療ガイドライン 2018、89-120、金原出版、2018
- 6) James C, Ugo V, Le Couedic JP, et al : A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* **434** : 1144-1148, 2005
- 7) Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al : A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* **352** : 1779-1790, 2005
- 8) Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al : Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* **365** : 1054-1061, 2005
- 9) Levine R, Wadleigh M, Cools J, et al : Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* **7** : 387-397, 2005
- 10) Lacout C, Pisani DF, Tulliez M, et al : JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. *Blood* **108** : 1652-1660, 2006
- 11) Godfrey AL, Chen E, Pagano F, et al : JAK2V617F homozygosity arises commonly and recurrently in PV and ET, but PV is characterized by expansion of a dominant homozygous subclone. *Blood* **120** : 2704-2707, 2012
- 12) Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al : MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* **3** : e270, 2006
- 13) Gotoh A, Komatsu N : Management strategy for BCR-ABL negative myeloproliferative neoplasms. (review) *Rinsho Ketsueki* **55** : 56-65, 2014
- 14) Harrison C, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, et al : JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med* **366** : 787-798, 2012
- 15) Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjan JJ, et al : Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia* **30** : 1701-1707, 2016
- 16) Vannucchi AM, Kiladjan JJ, Griesshammer M, et al : Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med* **372** : 426-435, 2015
- 17) Deininger M, Radich J, Burn TC, et al : The effect of long-term ruxolitinib treatment on JAK2p.V617F allele burden in patients with myelofibrosis. *Blood* **126** : 1551-1554, 2015
- 18) Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al : Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* **369** : 2391-2405, 2013
- 19) Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al : Somatic mutations of calreticulin in myeloprolif-

- erative neoplasms. *N Engl J Med* **369** : 2379-2390, 2013
- 20) Araki M, Komatsu N : The role of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasmas. (review) *Int J Hematol* **111** : 200-205, 2020
- 21) Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al : Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* **127** : 1307-1316, 2016
- 22) Araki M, Yang Y, Imai M, et al : Homomultimerization of mutant calreticulin is a prerequisite for MPL binding and activation. *Leukemia* **33** : 122-131, 2019
- 23) Masubuchi N, Araki M, Yang Y, et al : Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia* **34** : 499-509, 2020
- 24) Edahiro Y, Yasuda H, Gotoh A, et al : Interferon therapy for pregnant patients with essential thrombocythemia in Japan. *Int J Hematol* **113** : 106-111, 2021
- 25) Takei H, Edahiro Y, Mano S, et al : Skewed megakaryopoiesis in human induced pluripotent stem cell-derived haematopoietic progenitor cells harbouring calreticulin mutations. *Br J Haematol* **181** : 791-802, 2018