

活性化好中球を標的とした心血管疾患に 対する新規治療法の開発

福島県立医科大学 医学部 輸血・移植免疫学講座
教授 池田 和彦



2021年11月18日

背景

1. 骨髄増殖性腫瘍(MPN)のドライバー変異 JAK2V617F陽性
クローン性造血と心血管疾患
2. 従来技術とその問題点

背景

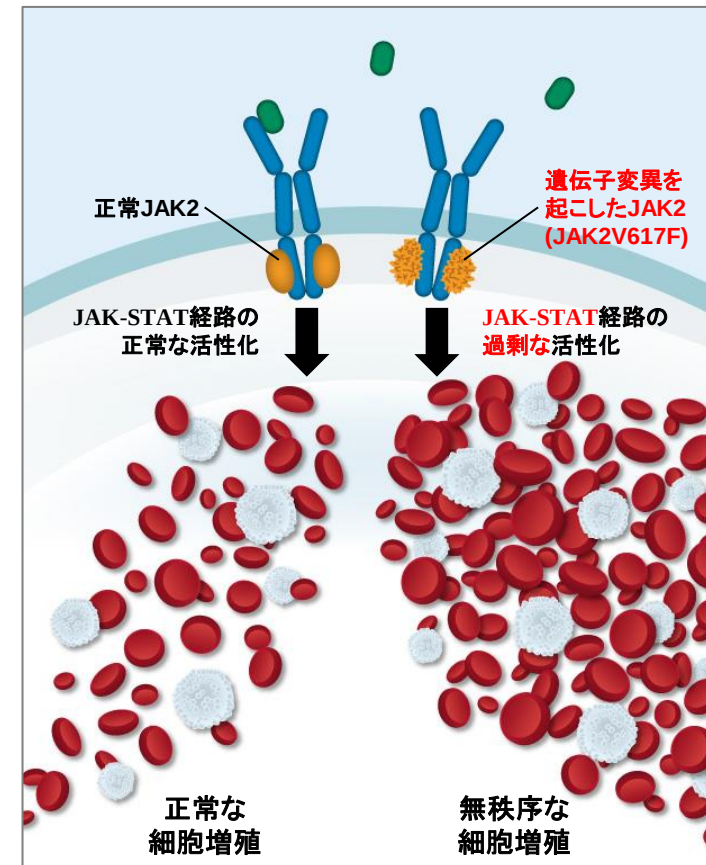
1. 骨髄増殖性腫瘍(MPN)のドライバー変異 *JAK2V617F*陽性
クローン性造血と心血管疾患
2. 従来技術とその問題点

MPN (骨髓増殖性腫瘍)

- 造血幹細胞の遺伝子異常により、刺激が無いのに活性化した血液細胞が増える
 - 分化した血球だらけになってしまう(ほとんどの症例)
 - 線維(コラーゲン)が増えてしまう(一部の症例)
 - このことによって、
 - 末梢の血球数が増加
 - 末梢の血液は活性化しているため、血栓症、心血管疾患(心筋梗塞や脳梗塞など)、肺高血圧症などを起こす要因になる
 - 骨髓から細胞がはみ出し脾臓などで血液を造る(髄外造血)
- 進行すると、より予後の悪い病態へ進行
 - 骨髓線維症
 - 骨髓異形成症候群(MDS)
 - 急性骨髓性白血病
 - 消耗期(造血障害)

MPNのドライバー遺伝子変異：細胞増殖・活性化の原因

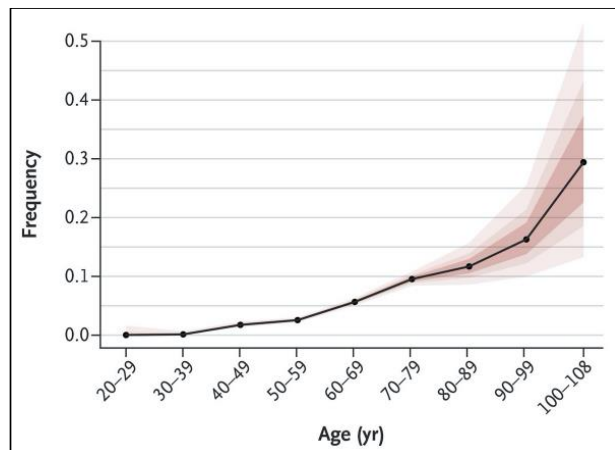
- **JAK2 V617F (2005年発見)**
 - PV 95%以上
 - ET 50-60%
 - PMF 50-60%
- **MPL W515K/L (2006年発見)**
 - PV なし
 - ET ≤10%
 - PMF ≤10%
- **CALR exon 9 変異 (2013年発見)**
 - PV なし
 - ET 20-30%
 - PMF 20-30%
- **Triple negative (JAK2/MPL/CALRともに陰性)**
 - PV 1-2%
 - ET 10-20%
 - PMF 10-20%



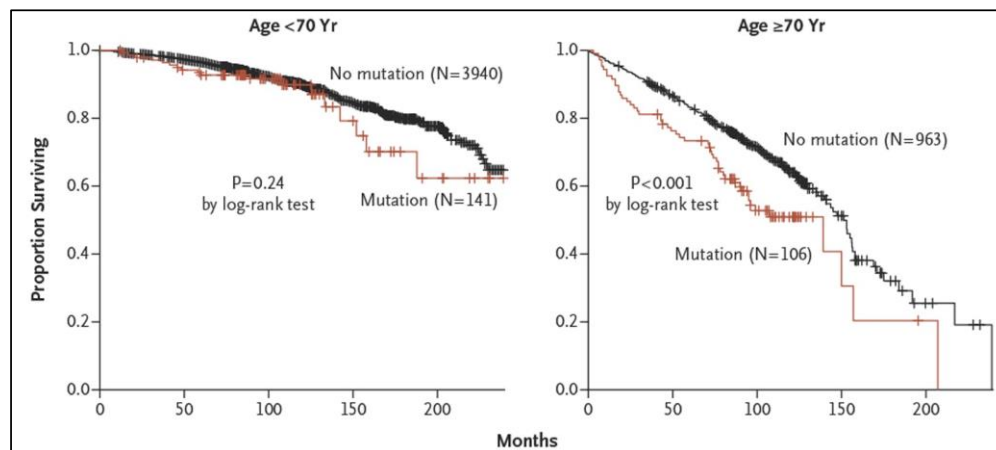
Clonal hematopoiesis (クローン性造血) と心血管疾患

骨髄系腫瘍(MDS・MPN・AML)に見られる遺伝子変異が加齢に伴い血液疾患未発症者に検出されるようになる

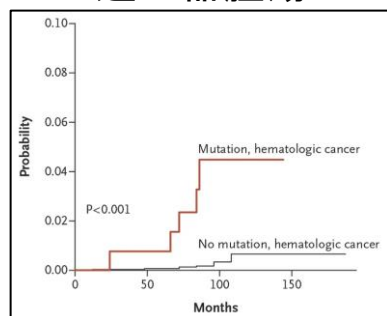
頻度



全生存

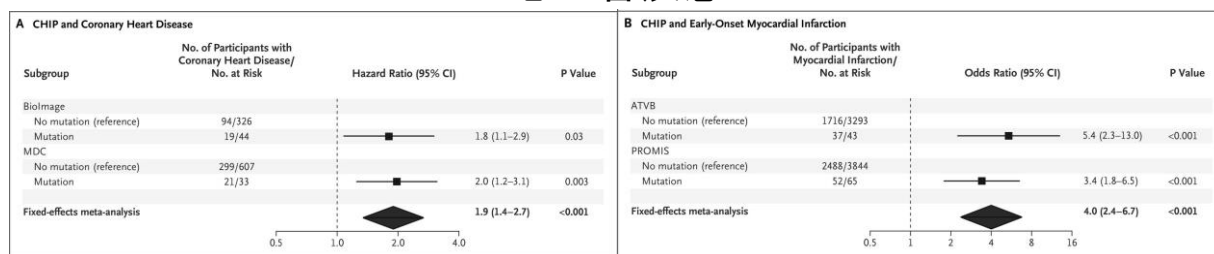


造血器腫瘍



MDS/AML
MPN

心血管疾患

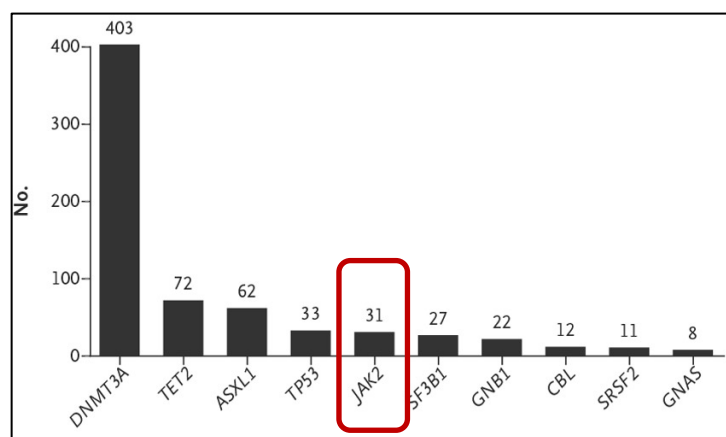


虚血性心疾患
脳血管障害 etc.

Jaiswal S et al. N Engl J Med 2014;371:2488-2498.

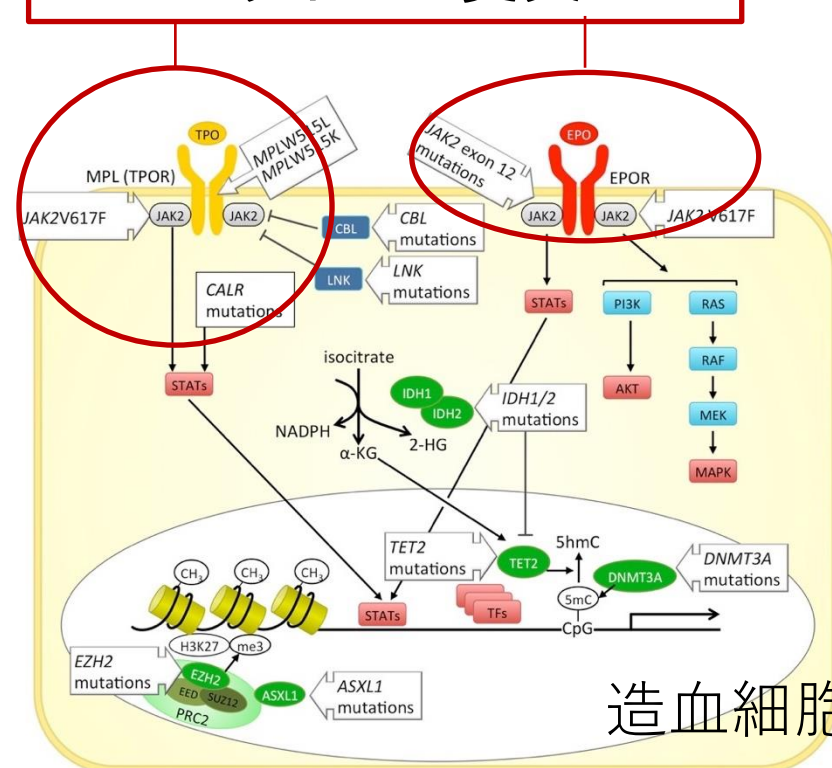
Jaiswal S et al. N Engl J Med 2017;377:111-121.

JAK2変異はクローン性造血保持者に検出される ドライバー変異として最多



JAK2変異以外はエピジェネティクス
関連遺伝子などの疾患修飾因子

細胞増殖に直接関わる ドライバー変異



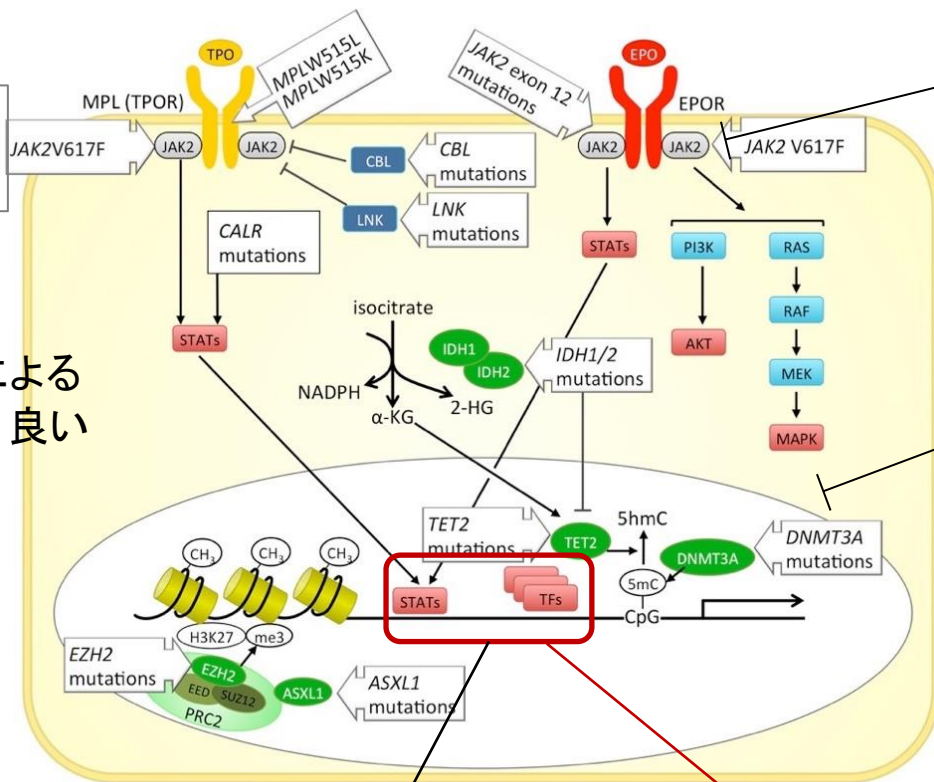
背景

1. 骨髄増殖性腫瘍(MPN)のドライバー変異 JAK2V617F陽性
クローン性造血と心血管疾患
2. 従来技術とその問題点

従来技術とその問題点

従来技術（JAK2 V617F検査）：
現在、MPN診断に用いられるPCRのcut off変異アリル比率は、1%と低い

JAK2 V617F陽性造血細胞による血管リモデリングを再現する、良い動物モデルが無かった



従来技術（JAK阻害剤）：
正常なJAKも抑制し、免疫抑制など有害事象が多いため、血液疾患未発症のクローン性造血や軽症のMPNに対しては適用できない

従来技術（細胞減少療法）：
骨髄抑制など有害事象が多く、急性白血病や骨髄線維化も防げないばかりか、二次発癌リスクなどもあり、血液疾患未発症のクローン性造血には適用できない

- ・ 抗がん剤
- ・ 代謝拮抗剤
- ・ アルキル化剤

従来技術（肺血管拡張薬）：
血管リモデリングを抑制しない

- ・ プロスタサイクリン誘導体
- ・ エンドセリンレセプター拮抗剤
- ・ PDE5阻害剤
- ・ 可溶性グアニル酸シクラーゼ刺激剤

造血器
腫瘍

骨髄増殖性腫瘍(ほぼ全て)
骨髄異形成症候群(一部)

肺高血圧症

心血管
疾患

動脈硬化性疾患
血栓症

骨髄線維化

従来技術（血栓予防）：
有効範囲が限定的で、血管リモデリングを抑制しない

- ・ 抗血小板薬
- ・ 抗凝固薬

本研究では、活性化した骨髄球系細胞において、血管リモデリングを引き起こし、心血管系疾患に関わる重要な因子を、動物モデルを確立した上で探索した

新技術の特徴・従来技術との比較

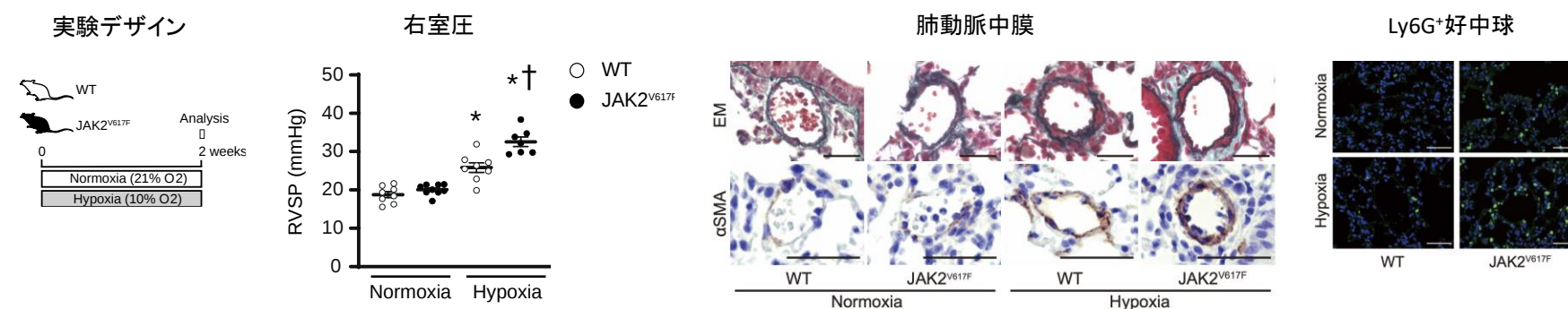
1. JAK2V617Fクローン性造血による血管リモデリングを肺および大動脈で再現するモデルを確立した。
2. JAK2 V617F陽性の分化・活性化した好中球に特異的に発現するALK1を標的として見出した。
3. 従来薬の効果は血管拡張や血栓予防といった対症的な機序に限られていたが、JAK2 V617F陽性活性化好中球による肺血管のリモデリング抑制によって肺高血圧症を根本的に治療することが可能となる。
4. 従来技術の問題点、JAK2阻害薬の特異性(野生型JAK2の阻害)や幹細胞レベルへの毒性(骨髄抑制)を回避することに成功した。
5. 我々の手法により、従来法よりも高感度にJAK2 V617Fを検出することができた。このことで、JAK2 V617F陽性者はMPN症例にとどまらず広く見られることが、日本人においても確認された。したがって、新技術がより多くの患者を救うことが期待される。

新技術の特徴・従来技術との比較

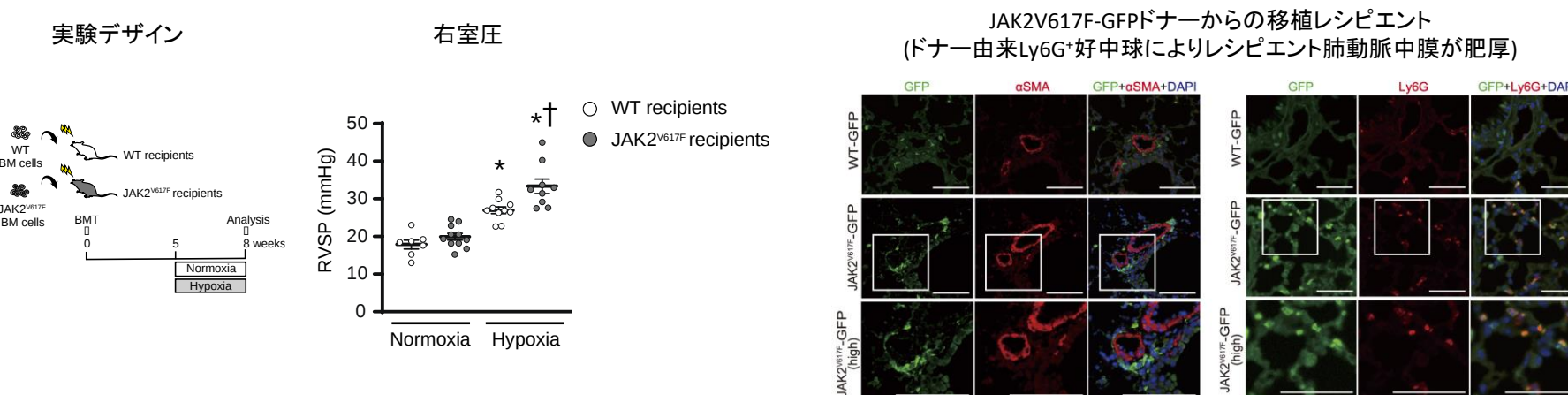
1. JAK2V617Fクローン性造血による血管リモデリングを肺および大動脈で再現するモデルを確立した。
2. JAK2 V617F陽性の分化・活性化した好中球に特異的に発現するALK1を標的として見出した。
3. 従来薬の効果は血管拡張や血栓予防といった対症的な機序に限られていたが、JAK2 V617F陽性活性化好中球による肺血管のリモデリング抑制によって肺高血圧症を根本的に治療することが可能となる。
4. 従来技術の問題点、JAK2阻害薬の特異性(野生型JAK2の阻害)や幹細胞レベルへの毒性(骨髄抑制)を回避することに成功した。
5. 我々の手法により、従来法よりも高感度にJAK2 V617Fを検出することができた。このことで、JAK2 V617F陽性者はMPN症例にとどまらず広く見られることが、日本人においても確認された。したがって、新技術により多くの患者を救うことが期待される。

JAK2^{V617F}陽性骨髓球系細胞(好中球>単球)はマウス低酸素曝露モデルの肺動脈中膜を肥厚させ、肺高血圧を促進する

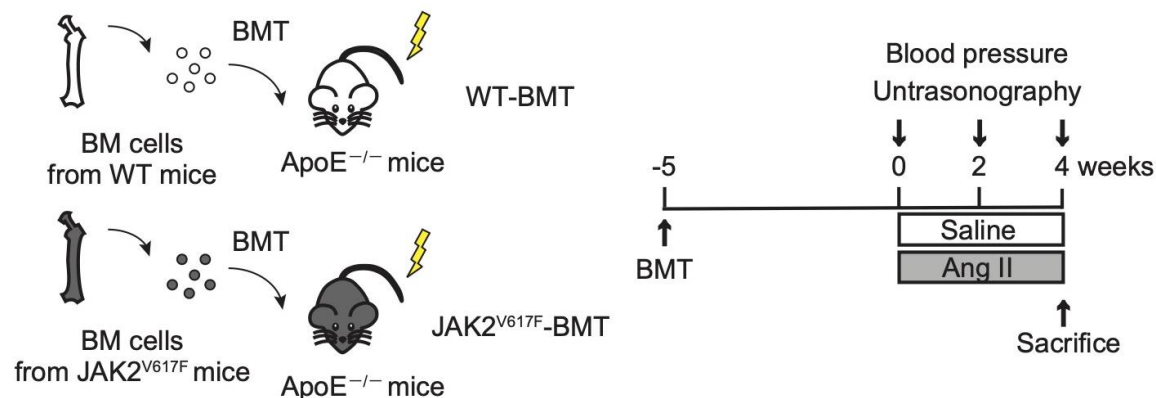
JAK2V617F-Tgマウス(骨髓球系細胞、肺中膜細胞ともにJAK2^{V617F}陽性)



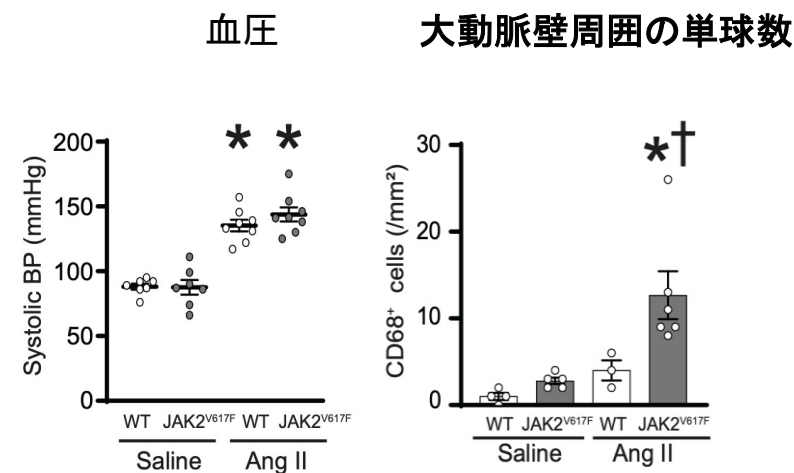
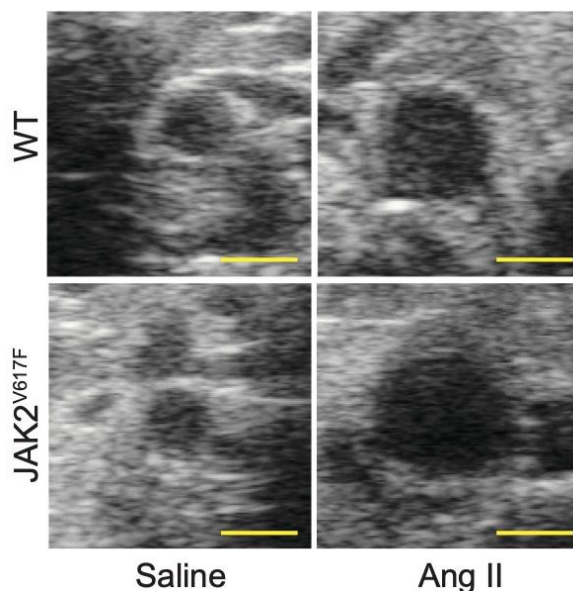
JAK2V617F-Tgマウスをドナーとした、骨髓移植レシピエントマウス(骨髓球系細胞: JAK2^{V617F}陽性、肺中膜細胞: JAK2^{V617F}陰性)



JAK2^{V617F}陽性骨髓球系細胞(単球>好中球)はマウス動脈硬化モデルの大動脈肥厚を促進し、大動脈瘤を起こす



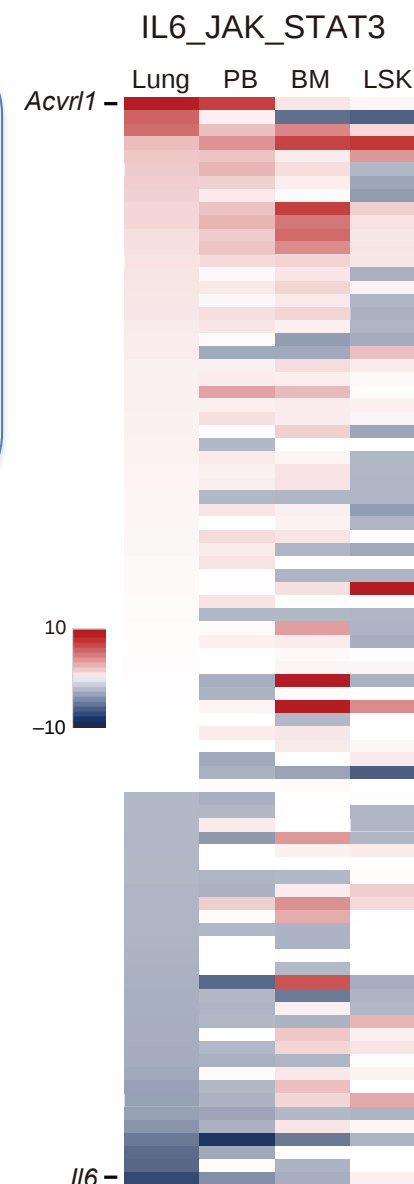
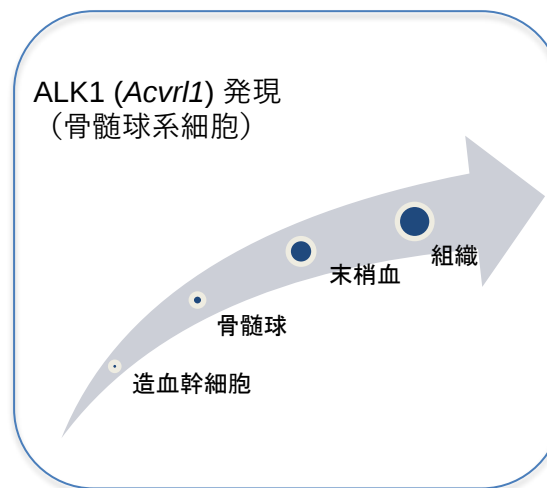
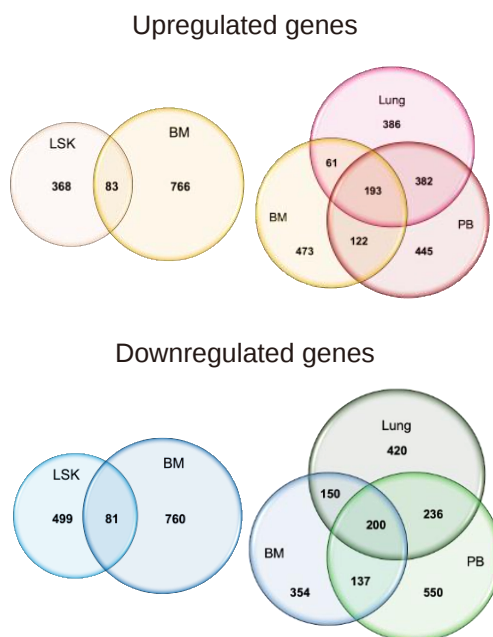
Ang II 投与によるJAK2-BMTレシピエントの大動脈壁肥厚



新技術の特徴・従来技術との比較

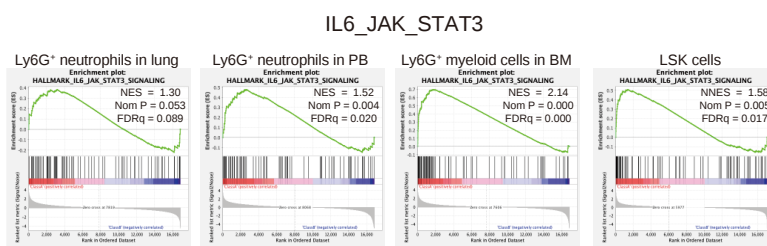
1. JAK2V617Fクローン性造血による血管リモデリングを肺および大動脈で再現するモデルを確立した。
2. JAK2 V617F陽性の分化・活性化した好中球に特異的に発現するALK1を標的として見出した。
3. 従来薬の効果は血管拡張や血栓予防といった対症的な機序に限られていたが、JAK2 V617F陽性活性化好中球による肺血管のリモデリング抑制によって肺高血圧症を根本的に治療することが可能となる。
4. 従来技術の問題点、JAK2阻害薬の特異性(野生型JAK2の阻害)や幹細胞レベルへの毒性(骨髄抑制)を回避することに成功した。
5. 我々の手法により、従来法よりも高感度にJAK2 V617Fを検出することができた。このことで、JAK2 V617F陽性者はMPN症例にとどまらず広く見られることが、日本人においても確認された。したがって、新技術がより多くの患者を救うことが期待される。

JAK2^{V617F}陽性好中球は分化に従いALK1 (*Acvrl1*) を高発現する



LSK: 造血幹細胞
BM: 骨髓Ly6G⁺細胞
PB: 末梢血Ly6G⁺細胞
Lung: 肺Ly6G⁺細胞

Gene set enrichment 解析



個々の 遺伝子発現

(IL6-JAK-STAT経路)

(なお、ALK2の発現は低い)

ALK1 (encoded by *Acvrl1*)

- Activin receptor-like kinase 1.
- 1型TGF- β スーパーファミリー受容体であり、セリン・スレオニンキナーゼサブドメインを有する
- 主なリガンドはBMP-9で、TGF- β 結合は弱い
- Smad1/5/8をリン酸化する
- ALK1は内皮細胞に発現し、造血細胞における発現は弱い
- 先天性のALK1変異はヒト遺伝性出血性毛細血管拡張症±肺高血圧症を起こす一方、ALK1 ligand trapはラット肺高血圧症を軽減したとの報告も見られる

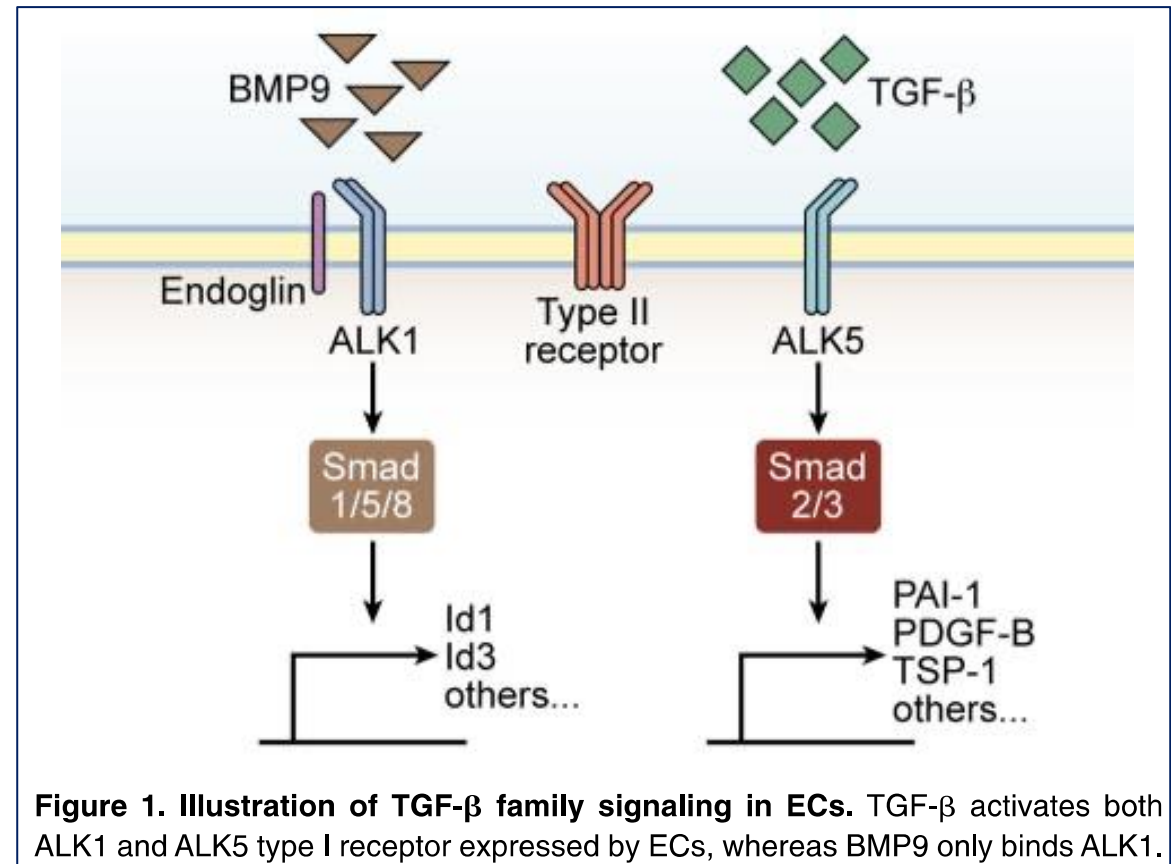


Figure 1. Illustration of TGF- β family signaling in ECs. TGF- β activates both ALK1 and ALK5 type I receptor expressed by ECs, whereas BMP9 only binds ALK1.

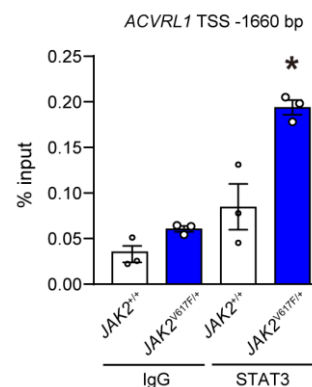
Cunha & Pietras. *Blood*. 2011; 117:6999-7006

JAK2^{V617F}はSTAT3リン酸化を介して*Acvrl1* 発現を促進する

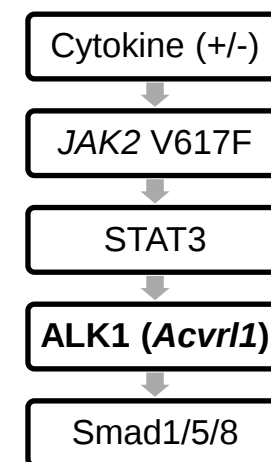
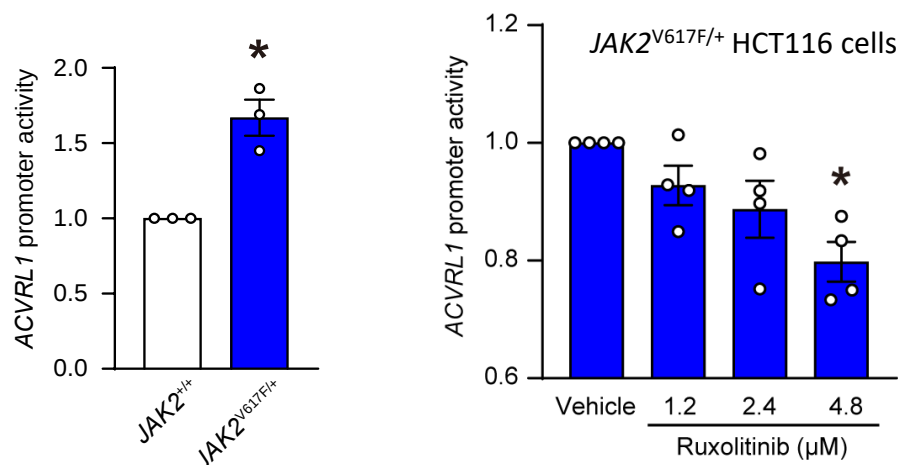
*Acvrl1*プロモーター領域における
STAT3結合予測モチーフ



STAT3はJAK2^{V617F}陽性HCT116細胞特異的に
*ACVRL1*プロモーターに結合 (ChIP-qPCR)



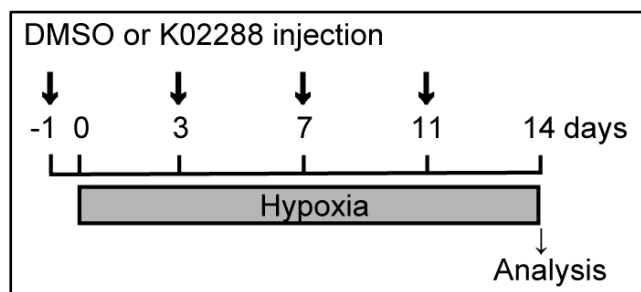
JAK2^{V617F}陽性HCT116細胞特異的な*ACVRL1*プロモーター活性上昇とJAK2阻害剤による低下



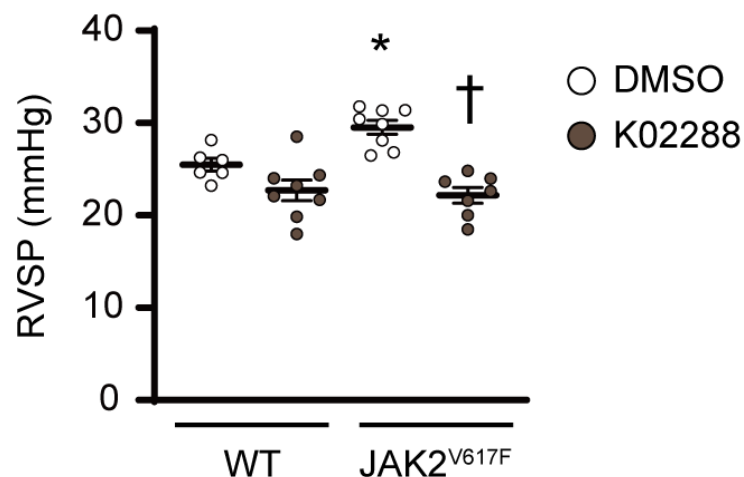
新技術の特徴・従来技術との比較

1. JAK2V617Fクローン性造血による血管リモデリングを肺および大動脈で再現するモデルを確立した。
2. JAK2 V617F陽性の分化・活性化した好中球に特異的に発現するALK1を標的として見出した。
3. 従来薬の効果は血管拡張や血栓予防といった対症的な機序に限られていたが、JAK2 V617F陽性活性化好中球による肺血管のリモデリング抑制によって肺高血圧症を根本的に治療することが可能となる。
4. 従来技術の問題点、JAK2阻害薬の特異性(野生型JAK2の阻害)や幹細胞レベルへの毒性(骨髄抑制)を回避することに成功した。
5. 我々の手法により、従来法よりも高感度にJAK2 V617Fを検出することができた。このことで、JAK2 V617F陽性者はMPN症例にとどまらず広く見られることが、日本人においても確認された。したがって、新技術がより多くの患者を救うことが期待される。

低酸素曝露JAK2^{V617F}マウスの肺高血圧症はALK1阻害薬により予防できる

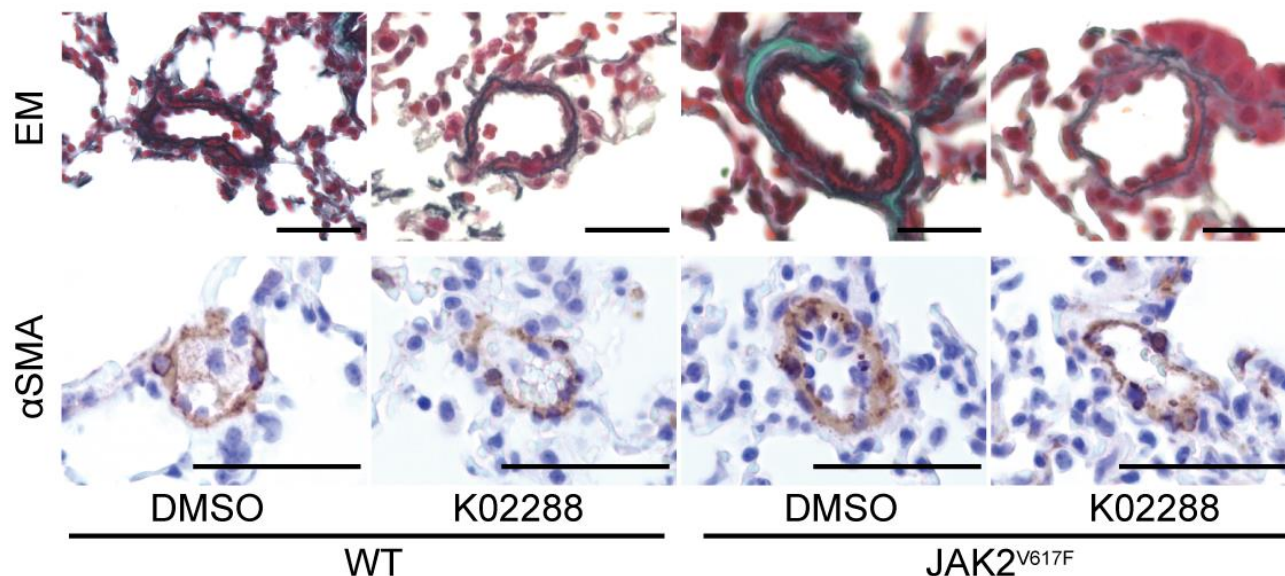


ALK1阻害薬K02288は低酸素曝露 JAK2^{V617F} マウスにおける右室圧を正常化させる

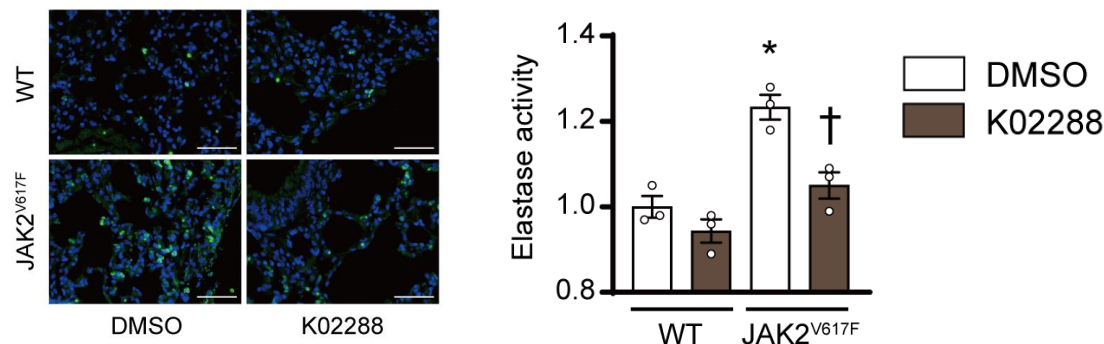


有意な血液毒性なし

ALK1阻害薬K02288は低酸素曝露 JAK2^{V617F} マウスにおける肺血管肥厚を予防する

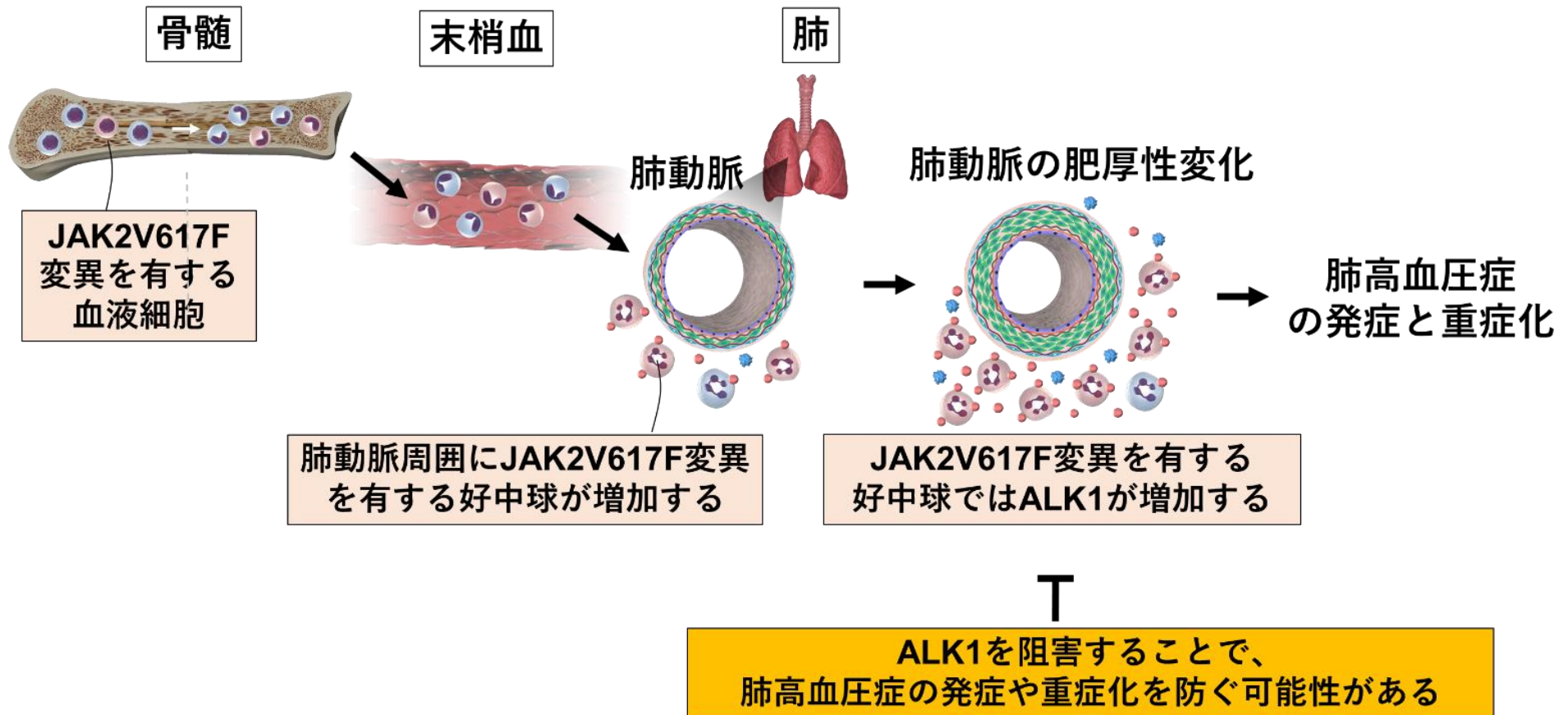


ALK1阻害薬K02288は低酸素曝露 JAK2^{V617F} マウスの肺好中球の浸潤を抑制しエラスターゼ活性を低下させる



今回の研究により明らかになったメカニズムの概要

1. 血液細胞の中に**JAK2V617F変異**が出現すると（**クローン性造血**）、その好中球が肺血管周囲に集まってきて、炎症などのプロセスから肺動脈の壁が厚くなり肺高血圧症の発症や重症化を引き起こす。
2. JAK2V617F変異があると、肺好中球でより**ALK1**が増加して、これが肺高血圧症の病態に強く関与する。
3. このALK1を阻害する治療により肺高血圧症の発症を抑えることが出来るため、これが肺高血圧症の重要なメカニズムとして考えられ、さらにALK1阻害が肺高血圧症の新規治療法となる可能性がある。



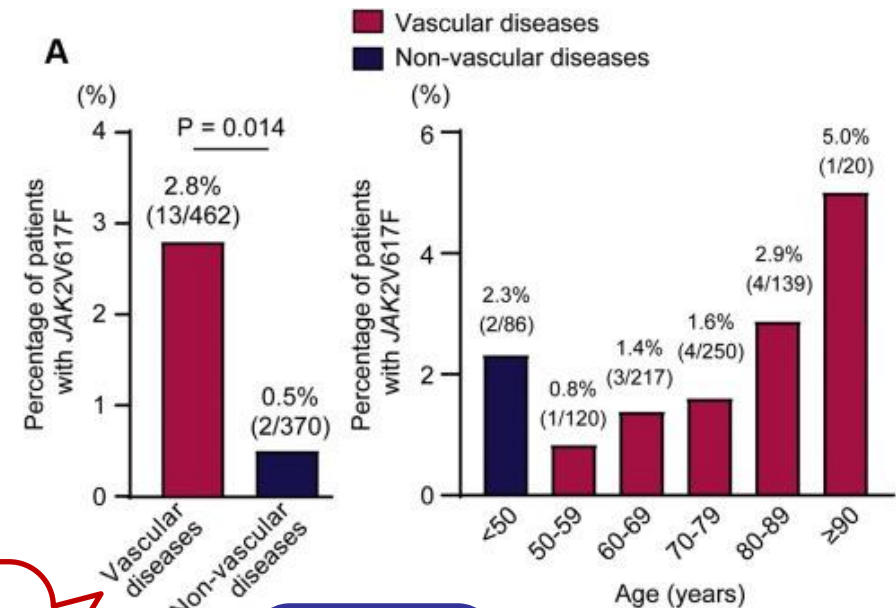
新技術の特徴・従来技術との比較

1. JAK2V617Fクローン性造血による血管リモデリングを肺および大動脈で再現するモデルを確立した。
2. JAK2 V617F陽性の分化・活性化した好中球に特異的に発現するALK1を標的として見出した。
3. 従来薬の効果は血管拡張や血栓予防といった対症的な機序に限られていたが、JAK2 V617F陽性活性化好中球による肺血管のリモデリング抑制によって肺高血圧症を根本的に治療することが可能となる。
4. 従来技術の問題点、JAK2阻害薬の特異性(野生型JAK2の阻害)や幹細胞レベルへの毒性(骨髄抑制)を回避することに成功した。
5. 我々の手法により、従来法よりも高感度にJAK2 V617Fを検出することができた。このことで、JAK2 V617F陽性者はMPN症例にとどまらず広く見られることが、日本人においても確認された。したがって、新技術がより多くの患者を救うことが期待される。

日本人心血管疾患患者におけるJAK2V617Fクローン性造血

- 2018年3月～2019年11月に福島医大病院の循環器内科に入院した心血管疾患患者(血液疾患なし)の832名について、MPNドライバー変異を検査
- JAK2V617F変異陽性: 15例(1.8%)
 - Variant allele frequency (VAF) 0.06%–1.73%
- CALR変異陽性: 1例(0.12%)
- MPL変異陽性: なし

JAK2V617F検査(JAK2遺伝子検査、区分番号D006-6)のcut offは1%



血管性
冠動脈疾患
末梢動脈疾患
大動脈瘤
脳卒中
深部静脈血栓症
急性肺血栓塞栓症

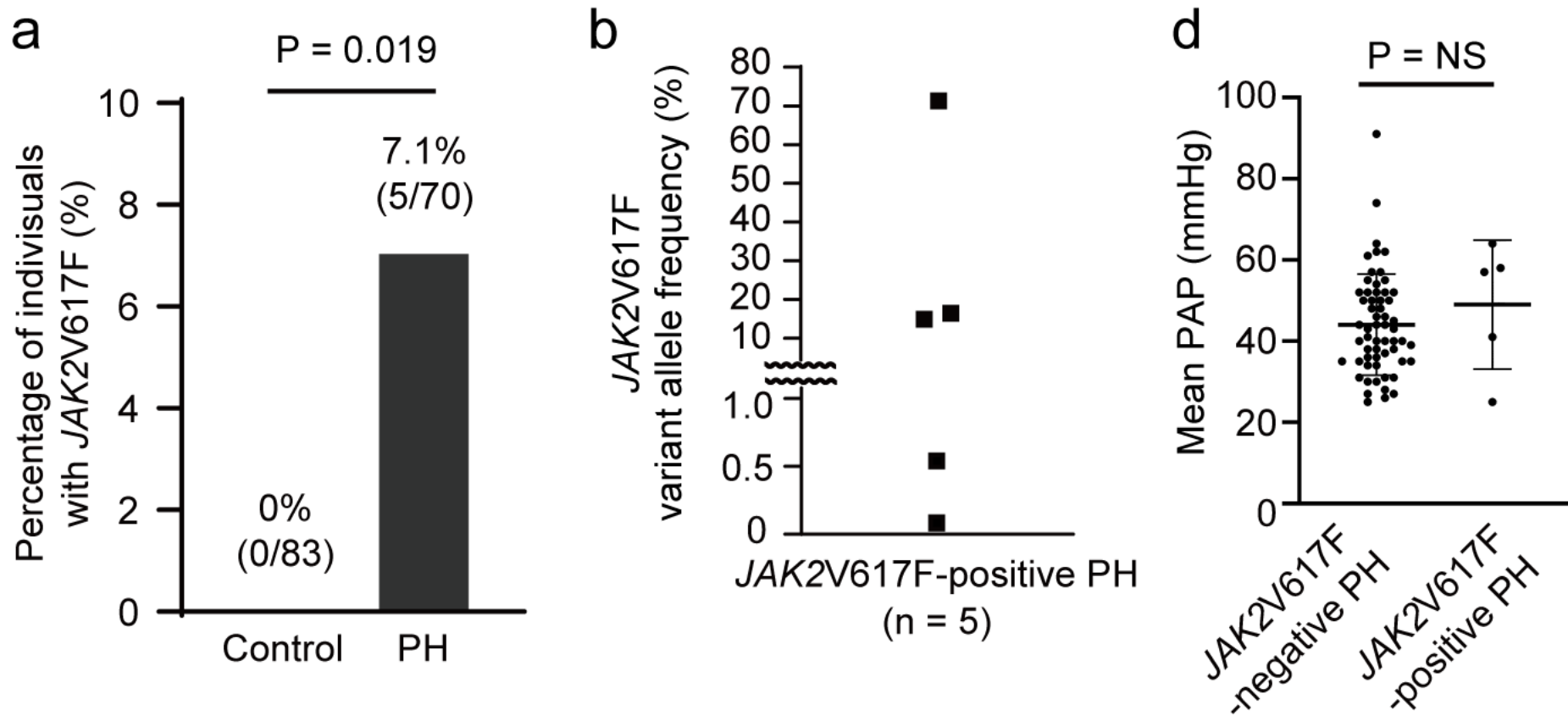
非血管性
特発性心筋症
弁膜症
不整脈
先天性心疾患
心筋炎

高齢になるほど、
JAK2V617F陽性者が多い

血管性疾患の方が、JAK2V617F陽性者が多い

日本人肺高血圧症患者におけるJAK2V617Fクローン性造血

- 肺高血圧症は、MPN患者に多く見られる(5%-60%)。
- このため、血液疾患のない肺高血圧症患者において、JAK2V617Fを検査したところ、7%が陽性だった。



Kimishima Y, Misaka T*, Ikeda K*, et al. Nature Communications. 2021;12:6177.

(* corresponding author)

想定される用途

- ALK1阻害剤
 - ALK1阻害剤は低分子化合物の他、抗体なども考慮される。
 - 従来の薬剤は対症的に肺循環を改善するものであり、根本にある肺動脈の中膜肥厚を特徴とする血管リモデリングに関与するカスケードをターゲットした薬剤は存在しない。このためALK1阻害薬は肺動脈中膜肥厚を直接抑制する最初の薬剤となる可能性がある。
 - 肺高血圧症以外に、JAK2 V617Fが関与する血管病変として動脈硬化や血栓症への効果も期待される
 - MPNによる骨髓線維化にも白血球活性化、TGF- β 亢進に伴う炎症が関与する。TGF- β -Smad2/3阻害が試みられているが、効果は限定的であり、ALK1阻害剤の効果がむしろ期待できる可能性がある。
- JAK2 V617F検査
 - 心血管リスクファクターとしてのクローン性造血の検出
 - MPN検査 (VAF<1%のJAK2 V617F陽性MPNが多数報告されている)

実用化に向けた課題

- ALK1阻害剤

- 我々が用いたものも含め、ALK1の阻害剤は動物実験データのみである。
- 少なくとも試薬として購入可能なALK1阻害剤は他のALKファミリータンパクも阻害するもののみであり、ALK1特異的な阻害剤開発が求められる。
- これまで、腎癌についてALK1のリガンドとの結合を阻害するdalanterceptについては、臨床第2相試験が行われ、認容性良好だが、効果は不十分と報告されている(Cancer. 2019;125:2400-2408.)。
- 今後、動脈硬化や血栓について実験データを取得し、血管病変全般に適用していく場合の条件設定を行っていく。
- 骨髄線維化や脾腫等、心血管疾患以外に対する効果も検討する。

- JAK2変異検査

- 標準試薬として開発していきたい

企業への期待

- 未解決の血栓や動脈硬化に対するALK1阻害剤の効果については、動脈硬化マウスモデルの技術により検証・克服できると考えている。
- 骨髄線維化に対する効果についても、我々の持つ動物モデルにより検証できる。
- ALK1阻害剤開発について、低分子化合物and/or抗体薬の技術を持つ企業との共同研究を希望。
- また、新たな遺伝子検査を開発中の企業、検診や診断薬分野への展開を考えている企業には、JAK2 V617F検査の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 :
好中球抑制剤、及びクローン性造血の予防
又は治療用医薬組成物
- 出願番号 : 特願2021-7922
- 出願人 : 福島県立医科大学
- 発明者 : 池田和彦、三阪智史、竹石恭知

産学連携の経歴

- 2017年- 北陽電機株式会社と共同研究実施
(新規凍結血漿解凍装置など)
- 2018年- 極東製薬株式会社と共同研究実施
(細胞凍害保護液など)

問い合わせ先

**福島県立医科大学
医療研究推進課 佐藤浩樹**

**T E L 024-547-1791
F A X 024-581-5163
e-mail liaison@fmu.ac.jp**