分子シャペロンの遺伝子異常により引き起こされる血小板増多

荒木真理人*

Thrombocytosis caused by abnormal molecular chaperone

Marito ARAKI

要約：巨核球の腫瘍性増殖による末梢血中の血小板増多を呈する本態性血小板血症の大部分の症例では，サイトカイン受容体に結合するチロシンキナーゼ JAK2，トロンボポエチン（thrombopoietin: TPO）受容体 MPL，分子シャペロン CALR に，相互排他的な遺伝子変異が見いだされる．JAK2 と MPL 変異はいずれも機能獲得型変異であり，TPO シグナルの恒常的な活性化による巨核球の異常増殖によって，血小板増多が生じる．一方で，これらの中で最後に変異が見つかった calreticulin（CALR）遺伝子は，それまで TPO シグナルや巨核球分化などとの関連が全く報告されておらず，CALR 変異が血小板増多を引き起こすメカニズムは不明であった．本論文では，筆者らがこれまでに明らかにしてきた，変異型 CALR 蛋白質による TPO シグナル伝達経路の恒常的な活性化の分子メカニズムについて概説する．

Key words: essential thrombocythemia, myeloproliferative neoplasm, calreticulin, chaperone, MPL

1. 本態性血小板血症

血小板増多症の 1 つである本態性血小板血症（essential thrombocythemia: ET）は，骨髓増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasms: MPN）に分類される造血器腫瘍である．ET は，造血幹細胞に体細胞変異が生じ，変異を有した造血幹細胞が増幅した結果，血小板産生を行う巨核球が異常に増加することで発症すると考えられている．2005 年に，ET を含む多くの MPN 患者に共通して，サイトカイン受容体シグナルを伝達するチロシンキナーゼ JAK2 に機能獲得型の体細胞変異が見いだされた（図 1）¹⁻⁴⁾．さらに 2006 年には，JAK2 変異陰性の ET 患者の一部において，血小板産生を促す造血因子トロンボポエチン（thrombopoietin: TPO）の受容体 MPL に機能獲得型の体細胞変異が見いだされた（図 1）^{5,6)}．これらの発見により，ET では JAK2 あるいは MPL の変異によっ

て MPL 下流の JAK2 シグナル伝達経路が恒常的に活性化し（図 2），異常な巨核球の増加と，それに伴う血小板の増加が生じていることが明らかになった．また MPL は，巨核球のみならず造血幹細胞の維持や増殖にも関与していることから⁷⁻⁹⁾，変異を有する造血幹細胞の腫瘍性増殖にも寄与していると考えられている．

2. CALR 遺伝子変異の同定

JAK2 変異と MPL 変異の発見により ET の分子病態の解明が大きく進んだものの，約半数の ET 症例においてこれらの変異が見いだされなかった．そのため長期にわたって，MPL-JAK2 経路に関与する因子の変異検索が行われたが，決定的な変異は見いだされず空振りに終わった．しかし 2013 年末に，高速シーケンサーを用いた全エクソン配列解析により，JAK2 と MPL 変異が陰性の患者の約 75% に共通して，分子シャペロンをコードしている calreticulin（CALR）遺伝子に体細胞変異が見つかった^{10, 11)}．CALR は通常，蛋白質分泌経路の出発点である小胞体において，将来細胞外に分泌される蛋白質や細胞

*責任者連絡先：

順天堂大学大学院医学研究科輸血・幹細胞制御学
〒113-8421 東京都文京区本郷 2-1-1
Tel: 03-5802-1913, Fax: 03-3811-2724
E-mail: m-araki@juntendo.ac.jp

図1 本態性血小板血症で見いだされる変異遺伝子

筆者らがWHO2016分類に基づき本態性血小板血症と診断した患者の遺伝子変異頻度を記した。3例の患者が、2つの遺伝子変異を有していた。Triple-negativeは、JAK2、CALR、MPL遺伝子のいずれにも変異が見いだされない症例である。

図2 変異蛋白質によるMPL下流シグナルの活性化

文献(29)の図を改変して転載。正常な状態では、TPOの有無により下流シグナルの調節が行われているが、本態性血小板血症では、JAK2、MPL、あるいはCALRのいずれの変異型蛋白質も、TPOの無い環境でも下流のシグナル伝達経路を活性化する。

膜に局在する受容体の折りたたみを促す分子シャペロンとして働いている。また、アポトーシスを起こした細胞では細胞表面に出て、マクロファージによる貪食を促進することが知られている。このため当初、変異型CALRは、受容体の成熟不全を引き起こすことでMPL-JAK2経路を活性化、あるいは抗腫瘍免疫からの回避に関与し、ETを発症させるのではないかと考えられた。一方で、分子シャペロンの異常がシグナル伝達経路の活性化を引き起こす事例が存在しなかったことや、他の腫瘍でCALR変異が報告されていなかったことなどから、CALR変異の報告を懐疑的に感じたのは、筆者だけではなかったと想像する。

しかし、CALR変異の特徴が、この変異が偶然生じたものではないことを強く物語っていた。CALR変異は、全てが最終エクソンの限定された領域における短い塩基の挿入か欠失であり、蛋白質に翻訳するコドンの読み枠がずれるフレームシフト変異であった。さらに、通常の機能喪失型のフレームシフト変異では、1あるいは2塩基の読み枠のずれがランダムに生じるのに対し、ET患者で見いだされるCALR変異の読み枠のずれは、1塩基だけであった。このため、CALR変異遺伝子から産生される変異型CALRのカルボキシル末端には、変異型蛋白質に共通する特異的なドメインが存在する(図3)。これら

図3 CALR 蛋白質のドメイン構造

文献 (21) の図を改変して転載。野生型 CALR の構造は、小胞体移行に必要なシグナルペプチド配列 (SP)、N 型糖鎖結合ドメイン (N)、P ドメイン、C ドメイン、小胞体回帰シグナル (KDEL) に分けられる。変異型 CALR は、フレームシフト変異により、C ドメインの後半に変異型特異的ドメインが付加している。このドメインは、分子間相互作用によるホモ多量体化を引き起こし、N ドメインを介した MPL との強固な結合に必要な構造変化を惹起していると考えられる。

のことから、CALR 変異が機能獲得型の変異であることが強く疑われた。

3. CALR 変異遺伝子による血小板増多

そこで筆者らは、ET 患者において、JAK2、MPL、CALR 変異が相互排他的に見いだされることに着目し、野生型の JAK2 と MPL が機能している UT-7/TPO 細胞¹²⁾を用いて、機能不明の CALR 変異遺伝子の解析を行った。その結果、1) TPO 依存性に増殖する UT-7/TPO 細胞が、CALR 変異遺伝子の発現により TPO 非依存性に増殖すること、2) この際に、MPL 下流の JAK2 の活性化が生じていること、3) 変異型 CALR 依存性の細胞増殖に MPL が必要であること、が明らかになった¹³⁾。また他のグループから同様の研究結果に加えて^{14, 15)}、CALR 変異遺伝子を発現させた造血幹細胞を放射線照射したマウスに移植すると、骨髄中における巨核球の増加、それに伴う末梢血中の血小板の増多が観察され、ET の病態が再現されることや^{14, 16)}、トランスジェニックマウスやノックインマウスでも同様の結果が報告された^{17, 18)}。一方筆者らは、CALR 変異陽性の患者から樹立した iPS 細胞を造血幹・前駆細胞に誘導すると、TPO 非依存性に巨核球に分化すること、さらにこの分化に MPL

が必須であることを示した^{13, 19)}。これらのことから、変異型 CALR が未知の機能で MPL を恒常的に活性化させることで巨核球の増加を引き起こし、ET を発症させることが明らかになった (図 2)

4. フレームシフト変異により出現した変異型特異的ドメインの役割

次に筆者らは、変異型 CALR による MPL の特異的な活性化が生じる分子メカニズムを明らかにするために生化学的な解析を行い、変異型 CALR が MPL と強固に結合することを見出した¹³⁾。そして変異型 CALR には、フレームシフト変異により生まれた変異型特異的なドメインが存在することから、このドメインが MPL の結合ドメインと考えて解析を続けたが、結合は全く検出できなかった。そこで変異型 CALR の様々な欠失変異体を作成して結合試験を行ったところ、1) 野生型にも存在する N ドメインが MPL との結合を担っていること、2) 野生型 CALR では N ドメインによる MPL との結合が P ドメインにより抑制されていること、3) 変異型 CALR ではこの抑制が変異型特異的ドメインにより解除されるため MPL と結合できること、が明らかになった (図 3)¹³⁾。これにより変異型 CALR が、野生型では

見られない MPL との強い結合能を獲得し、MPL の活性化を引き起こしていると考えられたが、依然として MPL の活性化を引き起こす分子メカニズムは不明であった。

MPL の含まれる I 型サイトカイン受容体は、細胞外ドメインにサイトカインが結合してホモ 2 量体化し、受容体の細胞内ドメインに結合したチロシンキナーゼが相互をリン酸化することで、活性化する (図 2 左)。そこで筆者は、変異型 CALR が MPL の 2 量体化を引き起こすモデルとして、変異型 CALR のホモ 2 量体化を考えた。これは、2 つの MPL 結合ドメインを有する 1 つの変異型ホモ 2 量体が、2 分子の MPL と結合することで、MPL のホモ 2 量体化を引き起こすというモデルである。これを検証するために生化学的な解析を行い、変異型 CALR が分子間相互作用によりホモ多量体を形成することを明らかにした²⁰⁾。さらに解析を進めたところ、変異型 CALR 同士の分子間相互作用は、フレームシフト変異により生じた変異型特異的ドメインで生じていることが明らかになった。また、このような変異型 CALR のホモ多量体化を阻害すると、MPL との結合や活性化が著しく低下することが明らかになった²⁰⁾。これらのことは、変異型特異的ドメインにおけるホモ多量体化が構造変化を引き起こし、先に述べた P ドメインによる MPL 結合抑制を、解除していることを強く示唆している (図 3)²¹⁾。以上の解析により、変異型 CALR は MPL のリガンドのように働いて、MPL の活性化を引き起こしていることが明らかになった (図 2)。

5. 変異型 CALR による CALR 変異陽性細胞選択的な MPL 活性化

次に筆者らは、変異型 CALR が、TPO と同じように細胞外から細胞表面に発現している MPL を活性化する可能性について検討した。変異型 CALR は、フレームシフト変異により、野生型 CALR のカルボキシル末端に存在する小胞体回帰シグナルが喪失するため (図 3)、細胞外に分泌される²²⁾。そこで変異型 CALR を分泌する細胞と、MPL を発現する UT-7/TPO 細胞を共培養して増殖を調べたが、分泌さ

れた変異型 CALR は UT-7/TPO 細胞の表面に発現する MPL を活性化しなかった¹³⁾。これは、変異型 CALR が MPL のリガンドのように振る舞うというモデルと一見矛盾する結果であるが、CALR 変異細胞の MPL を選択的に活性化することから、CALR 変異陽性患者で見られる腫瘍細胞の増殖優位性とは合致している。

このような変異型 CALR による、CALR 変異陽性細胞に特異的な MPL の活性化が生じる背景には、MPL の成熟の違いがある。先述のとおり、野生型 CALR は小胞体内で受容体などの分子の折りたたみに関与しているが、折りたたみを行う必要のある新たに合成された蛋白質を識別する必要がある。この識別には、標的蛋白質のアスパラギン (N) 残基に付加された N 型糖鎖の成熟が関与しており、未成熟な場合にのみ CALR が結合し、折りたたみが終了し N 型糖鎖が成熟すると結合できなくなる (図 4 左下)²³⁾。この N 型糖鎖結合能は、変異型 CALR において MPL 結合を担っている N ドメインに存在し、N 型糖鎖結合部位を破壊すると MPL との結合や活性化ができなくなる^{15, 24, 25)}。これらのことは、変異型 CALR が、野生型 CALR に備わっていた未成熟な N 型糖鎖結合能を使って MPL と結合していることを示している (図 4)。そのため、通常の細胞表面に発現している成熟した N 型糖鎖を有する MPL に結合できないことから、通常の細胞に対しては、サイトカインのように働かない (図 5)。

6. 変異型 CALR による MPL の活性化が生じる場所

次に筆者らは、変異型 CALR による MPL の活性化が生じる細胞内での場所を調べた。先述のとおり、変異型 CALR は細胞外に分泌されることから、CALR 変異を有する細胞において未成熟な N 型糖鎖を有する MPL が細胞表面に発現していれば、それを autocrine に活性化する可能性が考えられる。一方で、小胞体で変異型 CALR と MPL が結合して複合体を形成し、細胞内で活性化する可能性もある。そこで筆者らは、蛋白質の細胞表面への輸送や細胞外への分泌を阻害したときの MPL の活性化状態を調べ、変

図4 変異型 CALR による MPL の活性化メカニズム

文献 (30) の図を改変して転載. 分子シャペロンである野生型 CALR は, 未成熟な N 型糖鎖を認識して MPL と結合し, MPL の折りたたみの完了に伴う N 型糖鎖の成熟により, MPL から解離する. 一方で, 変異型 CALR は MPL と強固な複合体を形成し, 小胞体回帰シグナルを喪失しているために (図 3), ゴルジ体を経由して細胞表面まで移行し, 下流のシグナル伝達経路を活性化する.

図5 変異型 CALR による CALR 変異細胞選択的な MPL 活性化

文献 (31) の図を改変して転載. 変異型 CALR は, 正常細胞表面の成熟型 MPL を活性化せず, CALR 変異細胞で発現している MPL を活性化する. 分泌された変異型 CALR が, CALR 変異細胞表面の MPL を活性化できることが示されている. 一方で, 細胞内で形成された変異型 CALR と MPL の複合体も細胞表面で活性化していると考えられることから, 分泌された変異型 CALR による活性化が患者細胞でどの程度生じているかは未解明である.

異型 CALR による MPL の活性化が、輸送や分泌の阻害に対して耐性であることを見出した²⁴⁾。これは、細胞内で変異型 CALR と MPL が複合体を形成し、細胞表面に到達する前に、活性化していることを示唆していた。これを確認するために筆者らは、細胞表面の蛋白質をプロテアーゼにより取り除いて、MPL 下流の活性化状態を調べたが、予想に反して、活性化は速やかに消失した。また、変異型 CALR を発現する細胞の表面における MPL の挙動を調べたところ、本来のリガンドである TPO で惹起されるような迅速な細胞内への移行 (internalization) は観察されず、長時間にわたって細胞表面に存在していることが明らかになった。これらのことから、変異型 CALR の結合した MPL は、細胞表面において持続的に活性化していることが明らかになった (図 4, 図 5)²⁴⁾。なお、細胞表面で MPL を活性化する変異型 CALR が、細胞内から MPL と結合していたものであるのか、細胞外に分泌されたものが結合したのかについては不明であるが、細胞外に分泌された変異型 CALR が CALR 変異細胞表面の MPL を活性化できることは示されている (図 5)²⁶⁾。

本稿で紹介したように、分子シャペロンの異常が、当初は全く想像もしていなかった分子メカニズムで受容体のリガンドとしての機能を獲得し、細胞の腫瘍化を引き起こしていることが明らかになった。しかし、変異型 CALR の細胞内動態には不明な点も多く、分子構造も解明されていないことから、今後の解析により、さらなる驚きの発見があるかもしれない。また最近になって、変異型 CALR が核内での転写調節²⁷⁾や、細胞外での免疫抑制に関与する²⁸⁾との報告がなされている。今後、CALR 変異による血小板増多の分子病態の解明がさらに進むことで、新たな治療法が開発されることを期待したい。

著者の利益相反 (COI) の開示：

本論文発表内容に関連して開示すべき企業等との利益相反なし。

文献

- 1) Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Frohling S, Dohner K, Marynen P, Vandenbergh P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG: Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387–397, 2005.
- 2) Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC: A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779–1790, 2005.
- 3) James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W: A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 434: 1144–1148, 2005.
- 4) Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR: Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054–1061, 2005.
- 5) Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, Cuker A, Wernig G, Moore S, Galinsky I, DeAngelo DJ, Clark JJ, Lee SJ, Golub TR, Wadleigh M, Gilliland DG, Levine RL: MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 3: e270, 2006.
- 6) Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, Steensma DP, Elliott MA, Wolanskyj AP, Hogan WJ, McClure RF, Litzow MR, Gilliland DG, Tefferi A: MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108: 3472–3476, 2006.
- 7) Kovtonyuk LV, Manz MG, Takizawa H: Enhanced thrombopoietin but not G-CSF receptor stimulation induces self-renewing hematopoietic stem cell divisions in vivo. *Blood* 127: 3175–3179, 2016.
- 8) Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Takubo K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Matsuoka S, Miyamoto K, Miyazaki H, Takahashi T, Suda T: Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1: 685–697, 2007.
- 9) Qian H, Buza-Vidas N, Hyland CD, Jensen CT, Antonchuk J, Mansson R, Thoren LA, Ekblom M, Alexander WS, Jacobsen SE: Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 1: 671–684, 2007.
- 10) Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR: Somatic CALR mutations in

- myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* **369**: 2391–2405, 2013.
- 11) Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, Them NC, Berg T, Gisslinger B, Pietra D, Chen D, Vladimer GI, Bagienski K, Milanese C, Casetti IC, Sant'Antonio E, Ferretti V, Elena C, Schischlik F, Cleary C, Six M, Schalling M, Schonegger A, Bock C, Malcovati L, Pascutto C, Superti-Furga G, Cazzola M, Kralovics R: Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med* **369**: 2379–2390, 2013.
 - 12) Komatsu N, Kunitama M, Yamada M, Hagiwara T, Kato T, Miyazaki H, Eguchi M, Yamamoto M, Miura Y: Establishment and characterization of the thrombopoietin-dependent megakaryocytic cell line, UT-7/TPO. *Blood* **87**: 4552–4560, 1996.
 - 13) 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* **127**: 1307–1316, 2016.
 - 14) Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, Perales-Paton J, Rosen EA, Ko A, Peisker F, Florescu N, Giannini S, Wolach O, Morgan EA, Tothova Z, Losman JA, Schneider RK, Al-Shahrour F, Mullally A: Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov* **6**: 368–381, 2016.
 - 15) Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu RI, Marty C, Gryshkova V, Defour JP, Vertenoeil G, Ngo A, Koay A, Raslova H, Courtoy PJ, Choong ML, Plo I, Vainchenker W, Kralovics R, Constantinescu SN: Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood* **127**: 1325–1335, 2016.
 - 16) Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, Villeval JL, Raslova H, Kralovics R, Constantinescu SN, Plo I, Vainchenker W: Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* **127**: 1317–1324, 2016.
 - 17) Li J, Prins D, Park HJ, Grinfeld J, Gonzalez-Arias C, Loughran S, Dovey OM, Klampfl T, Bennett C, Hamilton TL, Pask DC, Sneade R, Williams M, Aungier J, Ghevaert C, Vassiliou GS, Kent DG, Green AR: Mutant calreticulin knockin mice develop thrombocytosis and myelofibrosis without a stem cell self-renewal advantage. *Blood* **131**: 649–661, 2018.
 - 18) Shide K, Kameda T, Yamaji T, Sekine M, Inada N, Kamiyuntan A, Akizuki K, Nakamura K, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Kitanaka A, Honda A, Sawaguchi A, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Hasuie S, Yamamoto S, Nagata K, Shimoda K: Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia* **31**: 1136–1144, 2017.
 - 19) Takei H, Eda Hiro Y, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y, Imai M, Morishita S, Misawa K, Ochiai T, Tsuneda S, Endo H, Nakamura S, Eto K, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N: Skewed megakaryopoiesis in human induced pluripotent stem cell-derived haematopoietic progenitor cells harbouring calreticulin mutations. *Br J Haematol* **181**: 791–802, 2018.
 - 20) 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* **33**: 122–131, 2019.
 - 21) Araki M, Komatsu N: Mutant molecular chaperone activates cytokine receptor as a homomultimer. *Oncotarget* **9**: 35201–35202, 2018.
 - 22) Han L, Schubert C, Kohler J, Schemionek M, Isfort S, Brummendorf TH, Koschmieder S, Chatain N: Calreticulin-mutant proteins induce megakaryocytic signaling to transform hematopoietic cells and undergo accelerated degradation and Golgi-mediated secretion. *J Hematol Oncol* **9**: 45, 2016.
 - 23) Peterson JR, Ora A, Van PN, Helenius A: Transient, lectin-like association of calreticulin with folding intermediates of cellular and viral glycoproteins. *Mol Biol Cell* **6**: 1173–1184, 1995.
 - 24) Masubuchi N, Araki M, Yang Y, Hayashi E, Imai M, Eda Hiro Y, Hironaka Y, Mizukami Y, Kihara Y, Takei H, Nudjima M, Koike M, Ohsaka A, Komatsu N: Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. *Leukemia* **34**: 499–509, 2020.
 - 25) Elf S, Abdelfattah NS, Baral AJ, Beeson D, Rivera JF, Ko A, Florescu N, Birrane G, Chen E, Mullally A: Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. *Blood* **131**: 782–786, 2018.
 - 26) Pecquet C, Balligand T, Chachoua I, Roy A, Vertenoeil G, Colau D, Fertig E, Marty C, Nivarthi H, Defour JP, Xu E, Hug E, Gisslinger H, Gisslinger B, Schalling M, Casetti IC, Rumi E, Pietra D, Cavalloni C, Arcaini L, Cazzola M, Komatsu N, Kihara Y, Sunami Y, Eda Hiro Y, Araki M, Plo I, Vainchenker W, Kralovics R, Constantinescu SN: Secreted Mutant Calreticulins As Rogue Cytokines Trigger Thrombopoietin Receptor Activation Specifically in CALR Mutated Cells: Perspectives for MPN Therapy. *Blood* **132** (Supplement 1): 4, 2018.
 - 27) Pronier E, Cifani P, Merlinsky TR, Berman KB, Somasundara AV, H, Rampal RK, LaCava J, Wei KE, Pastore F, Maag JL, Park J, Koche R, Kentsis A, Levine RL: Targeting the CALR interactome in myeloproliferative neoplasms. *JCI Insight* **3**: 2018.
 - 28) Liu P, Zhao L, Loos F, Marty C, Xie W, Martins I, Lachkar S, Qu B, Waeckel-Enee E, Plo I, Vainchenker W, Perez F, Rodriguez D, Lopez-Otin C, van Ender P, Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G: Immunosuppression by Mutated Calreticulin Released from Malignant Cells. *Mol Cell* **77**: 748–760 e749, 2020.
 - 29) 荒木真理人, 森下総司, 小松則夫: 骨髓増殖性腫瘍の遺伝子変異 最近の知見. *臨床血液* **57**: 2526–2534, 2016.
 - 30) Eda Hiro Y, Araki M, Komatsu N: Mechanism underlying the development of myeloproliferative neoplasms through mutant calreticulin. *Cancer Sci* **111**: 2682–2688, 2020.
 - 31) Araki M, Komatsu N: The role of calreticulin mutations in myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol* **111**: 200–205, 2020.