

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790071  
 研究課題名(和文) 恒常的活性化型 JAK2 (V617F) 変異体による真性赤血球増加症  
 発症機序の解析  
 研究課題名(英文) Analysis of underlying mechanism of Polycythemia vera induced  
 by a constitutive active JAK2 mutant(V617F)  
 研究代表者  
 多胡 めぐみ (TAGO MEGUMI)  
 慶応義塾大学・薬学部・助教  
 研究者番号：30445192

研究成果の概要：真性赤血球増加症患者で見出された JAK2 V617F 変異体は、恒常的な活性化を示すことが報告されていたが、その詳細な活性化機構および JAK2 変異体の機能は不明であった。本研究では、JAK2 の活性に重要なチロシン残基として 613 を、また新規リン酸化部位として Y913 を同定した。また、JAK2V617F 変異体発現細胞が異常な増殖を示し、ヌードマウスに投与すると、腫瘍を形成することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：JAK2、V617F 点変異、真性赤血球増加症、Y913、L611S 点変異、白血病、リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ JAK2 は、赤血球分化を誘導するサイトカインであるエリスロポエチン (Epo) の重要なシグナル分子である。2005 年に、真性赤血球増加症の大多数の患者において、JAK2 の点変異 (V617F) が報告された。しかしながら、研究課開始時は、この変異が JAK2 の恒常的な活性化を誘導することが報告されているのみであり、その詳細

な活性化機構は不明であった。また、真性赤血球増加症の発症へと至る分子機構に関しては、ほとんど明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、JAK2 の詳細な活性機構の解析

および恒常的活性化型 JAK2 による赤血球分化・増殖機構の解明により、最終的には真性多血症の新たな予防法ないし治療法の開発をめざした。そのために、次の(1)~(4)の研究目的に対し、一連の研究を行った。

- (1) JAK2 のリン酸化と活性との関連性を明らかにすることにより、JAK2 の活性制御機構の解明を目的とした。
- (2) 病態由来の活性化型 JAK2 変異体の機能解析を目的とした。
- (3) 活性化型 JAK2 変異体の細胞内シグナル伝達機構の解析を目的とした。
- (4) 活性化型 JAK2 変異体によるサイトカイン非依存的増殖に関与する分子を包括的に探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) Mass spec 解析により、新たな JAK2 のリン酸化部位の同定を試みた。特異的リン酸化抗体を作製した。チロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異体 Y913F を Mutagenesis PCR 法により作成した。作成した変異体を JAK2 欠損線維芽細胞にレトロウイルスを用いて導入し、活性化およびシグナル伝達機構の解析を行った。さらに、JAK2 欠損マウス胎児肝細胞にレトロウイルスを用いて導入し、赤血球分化能を *in vitro* コロニーアッセイにより CFU-E および BFU-E コロニー形成能を指標に検討した。
- (2) 真性赤血球増加症由来 JAK2 変異体 (V617F) およびまだ機能の分かっていない急性リンパ性白血病由来の JAK2 変異体 (L611S) を Mutagenesis PCR 法により作成した。JAK2 欠損マウス胎児肝細胞にレトロウイルスを用いて導入し、赤血球分化能を *in vitro* コロニーアッセイにより検討した。また、サイトカイン依存性

増殖を示す BaF3 細胞に、レトロウイルスを用いて作成した変異体を導入し、サイトカイン存在下・非存在下における増殖能を検討した。JAK2 変異体を発現した BaF3 細胞をヌードマウスに投与し、*in vivo* における腫瘍形成能を検討した。

- (3) JAK2 変異体を発現した BaF3 細胞を Epo 存在下、非存在下で培養後、Stat5, ERK, Akt, NF- $\kappa$ B の活性化を Western blotting、ゲルシフト法、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。JAK2 変異体を発現した BaF3 細胞を各シグナル分子の阻害剤で処理を行い、細胞増殖能、抗アポトーシス作用に及ぼす影響を検討した。また、*in vivo* において、阻害剤の腫瘍形成能に及ぼす影響を検討した。
- (4) 遺伝子発現を比較するために、JAK2 変異体を発現した BaF3 細胞と野生型 JAK2 を発現した BaF3 細胞から、RNA を調製後、DNA アレイを行った。(申請時には、Differential Display 法により遺伝子の発現パターンの差異を包括的に検索することを計画していたが、より簡便で効率のよい DNA アレイ法を行うことにした。)

### 4. 研究成果

- (1) 新たな JAK2 のリン酸化部位として Y913 を同定し、特異的リン酸化抗体を用いた western blotting 法により、Epo の刺激に依存して、Y913 のリン酸化が誘導されることが明らかになった。野生型 JAK2 に比べて、Y913F 変異体は高い活性を示し、JAK2 欠損マウス胎児肝細胞に導入後、より高い CFU-E および BFU-E コロニー形成能を示した。一方、リン酸化状態を模倣した変異体である Y913E は、活性を示さず、CFU-E、BFU-E コロニーを形成できなかった。以上の結果より、Y913

のリン酸化は、JAK2 の活性を抑制する機能があると考えられた。

- (2) JAK2 V617F 変異体だけでなく、急性リンパ性白血病で報告された JAK2 L611S 変異体もまた、恒常的な活性を示すことが明らかになった。JAK2 V617F 変異体および JAK2 L611S 変異体を導入した JAK2 欠損マウス胎児肝細胞は、Epo 非存在下においても CFU-E コロニーを形成しうることを明らかにした。

**A. JAK2 V617F変異体による赤血球分化**



図1 JAK2 V617F 変異体による CFU-E コロニー形成

また、野生型 JAK2 を発現した BaF3 細胞は、サイトカイン除去後、アポトーシスを誘導したが、これらの JAK2 変異体発現 BaF3 細胞は、サイトカイン非存在下においても、アポトーシスを誘導せず、異常な細胞増殖を示した。

さらに、JAK2 変異体発現 BaF3 細胞をヌードマウスに投与したところ、投与部位に腫瘍が形成され、脾臓および肝臓に BaF3 細胞が浸潤することが明らかになった。JAK2 変異体発現 BaF3 細胞をヌードマウスは、約 16 日間で死亡した。したがって、JAK2 変異体は腫瘍形成能を有することが示された。

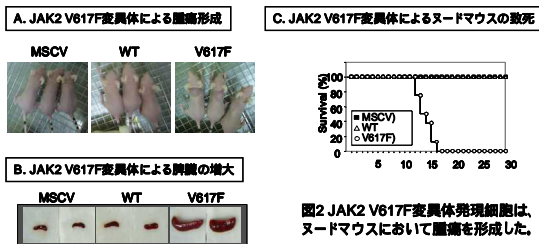


図2 JAK2 V617F変異体発現細胞は、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成した。

- (3) JAK2 変異体を発現した BaF3 細胞では、Epo 非存在下においても、Stat5, ERK, Akt, および NF- $\kappa$ B の恒常的な活性化が観察された。Akt および NF- $\kappa$ B を阻害剤 Ly294002 および DHMEQ を用いて抑制すると、JAK2 変異体発現 BaF3 細胞は、アポトーシスを誘導した。一方、ERK 阻害剤 U0126 は、JAK2 変異体発現 BaF3 細胞の細胞増殖を阻害した。現在、各シグナル分子と JAK2 変異体の機能との関連性を検討している。
- (4) DNA アレイを行った結果、JAK2 変異体を発現した BaF3 細胞では、抗アポトーシス因子である Bcl-2, 癌遺伝子である Myc, Pim-1, Pim-2 の発現が顕著に増強されていることが明らかになった。現在、これらの遺伝子の発現機序の解析、および遺伝子産物と JAK2V617F 変異体による細胞の異常増殖および腫瘍形成能の関連を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計11件)

1. Abe M, Funakoshi Tago M, Tago K, Kamishimoto J, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Kasahara T. The polycythemia vera-associated Jak2 V617F mutant induces tumorigenesis in nude mice. *Int Immunopharmacol.* (査読 有) 2009 (in press)
2. Furusawa J, Funakoshi Tago M, Mashino T, Tago K, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit

- phosphorylation of NF- $\kappa$ B p65 in LPS signaling pathway. **Int Immunopharmacol.** (査読 有) 9(4); 2009:499-507.
3. Funakoshi Tago M, Tago K, Sumi K, Abe M, Aizu-Yokota E, Oshio T, Sonoda Y, Kasahara T. The Acute Lymphoblastic Leukemia-associated JAK2 L611S Mutant Induces Tumorigenesis in Nude Mice. **J Biol Chem.** (査読 有) 284(19); 2009:12680-12690.
4. Furusawa J, Funakoshi Tago M, Tago K, Mashino T, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation at serine 276. **Cell Signal.** (査読 有) 21(5); 2009:778-785.
5. Oshio T, Sasaki Y, Funakoshi Tago M, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Matsuoka H, Kasahara T. Dermatophagoides farinae extract induces severe atopic dermatitis in NC/Nga mice, which is effectively suppressed by the administration of tacrolimus ointment. **Int Immunopharmacol.** (査読 有) 2009; 9(4):403-411.
6. Funakoshi Tago M, Kamada N, Shimizu T, Hashiguchi Y, Tago K, Sonoda Y, Kasahara T. TRAF6 negatively regulates TNF $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation. **Cytokine.** (査読 有) 45(2); 2009:72-79.
7. Funakoshi Tago M, Tago K, Nishizawa C, Takahashi K, Mashino T, Iwata S, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. **Biochem Pharmacol.** (査読 有) 76(12); 2008:1681-1693.
8. Funakoshi Tago M, Tago K, Kasahara T, Parganas E, Ihle JN. Negative regulation of Jak2 by its auto-phosphorylation at tyrosine 913 via the Epo signaling pathway. **Cell Signal.** (査読 有) 20(11); 2008:1995-2001.
9. Funakoshi Tago M, Shimizu T, Tago K, Nakamura M, Itoh H, Sonoda Y, Kasahara T. Celecoxib potently inhibits TNF $\alpha$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B. **Biochem Pharmacol.** (査読 有) 76(5); 2008:662-671.
10. Funakoshi Tago M, Tago K, Hayakawa M, Tominaga S, Oshio T, Sonoda Y, Kasahara T. TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. **Cell Signal.** (査読 有) 20(9); 2008:1679-1686.

11. Funakoshi -Tago M, Pelletier S,  
Moritake H, Parganas E, Ihle JN.  
Jak2 FERM domain interaction with  
the erythropoietin receptor  
regulates Jak2 kinase  
activity. *Mol Cell Biol.* (査読  
有) 28(5); 2008:1792 -1801.

〔学会発表〕(計2件)

1. 多胡めぐみ、急性リンパ性白血病  
由来 JAK2 点変異体 (L611S) の生  
理機能の解析 日本薬学会 第 129  
年回 2009 年 3 月 26 日 京都
2. 多胡めぐみ、真性赤血球増加症由  
来 JAK2 点変異(V617F) による  
NF - B 活性化機構の解析. 第 31  
回日本分子生物学会年会・第 81 回  
日本生化学会大会 合同大会 2008  
年 12 月 11 日 神戸

6 . 研究組織

(1)研究代表者

多胡 めぐみ (TAGO MEGUMI)  
慶應義塾大学・薬学部・助教  
研究者番号：30445192

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

阿部 美雪 (ABE MIYUKI)  
慶應義塾大学大学院薬学研究科  
博士前期課程 2 年 (平成 20 年度)

古澤 純一 (FURUSAWA JUNICHI)  
慶應義塾大学大学院薬学研究科  
博士前期課程 2 年 (平成 20 年度)