

機関番号：32612

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790090

研究課題名 (和文) 真性赤血球増加症由来 JAK2 V617F 変異体によるシグナル伝達機構の解析

研究課題名 (英文) Analysis of signal transduction of *Polycythemia vera*-associated JAK2 V617F mutant

研究代表者

多胡 めぐみ (TAGO MEGUMI)

慶應義塾大学・薬学部・講師

研究者番号：30445192

研究成果の概要 (和文)：真性赤血球増加症の原因遺伝子であるチロシンキナーゼ JAK2 の点変異体 (V617F) が誘導するがん化シグナルの分子機構を解析し、発症機構を分子レベルで理解することを目的とした。JAK2 変異体は転写因子 STAT5 の恒常的な活性化を誘導し、顕著な細胞増殖や腫瘍形成を誘導することを見出した。また、JAK2 変異体の下流において、分裂期キナーゼ Aurora kinase A は抗がん剤シスプラチンによる DNA 損傷に対する耐性に寄与し、セリン・スレオニンキナーゼ Akt は、抗アポトーシス作用に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The constitutively activated mutation of tyrosine kinase JAK2 (V617F) is found in the majority of the patients with *polycythemia vera*. We found that JAK2 mutant induces transformation through aberrant activation of STAT5. Interestingly, it was found that the expression of Aurora kinase A and activation of Akt were significantly induced by JAK2 mutant. We showed that Aurora kinase A was critical for JAK2 mutant-induced resistance to cisplatin-induced DNA damage. Furthermore, we clarified that Akt activation induced the downregulation of anti-apoptotic proteins, leading to anti-apoptotic activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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、STAT5、Akt、Aurora kinase A

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、その細胞

内シグナル伝達経路に関しては、不明な点が多かった。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い。

2. 研究の目的

本研究では、真性赤血球増加症の原因遺伝子として同定された JAK2V617F 変異体の細胞内シグナル伝達機構を解析し、解明することにより、分子レベルで真性赤血球増加症の発症機序を理解することをめざした。特に、(1) JAK2 変異体により恒常的に活性化された転写因子 STAT5 の役割を解析すること、(2) JAK2 の下流で発現が誘導される遺伝子群を網羅的に解析し、各遺伝子の役割を明らかにすること、(3) JAK2 の下流で恒常的に活性化された Akt の抗アポトーシス作用における分子機構を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) ① JAK2 変異体による STAT5 の活性化を特異的に阻害する Epo 受容体 (EpoR) の点変異体を作成した。② JAK2 変異体と EpoR 変異体を発現した Ba/F3 細胞を樹立した。③ 作成した細胞株を用いて、JAK2 変異体による細胞増殖、細胞生存における STAT5 の役割を解析した。④ 作成した細胞株をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能における STAT5 の役割を解析した。⑤ JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞に、STAT5 の shRNA を導入し、細胞増殖、細胞生存における STAT5 の役割を解析した。⑥ STAT5 shRNA 導入 JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を検討した。
- (2) ① 野生型 JAK2 (WT) 発現 Ba/F3 細胞と JAK2V617F 変異体発現 Ba/F3 細胞における遺伝子発現の差異を DNA アレイ法により検討した。② JAK2 変異体発現細胞で

発現誘導が観察された遺伝子として、癌原遺伝子 c-Myc、Pim および分裂期キナーゼ Aurora kinase A を同定した。③ JAK2V617F 変異体による Aurora kinase A の発現誘導機構を解析した。④ 野生型 Aurora kinase A およびキナーゼ欠損変異体 (K175R) を導入した Ba/F3 細胞を樹立し、細胞増殖能、抗がん剤シスプラチンによるアポトーシス誘導能を検討した。⑤ JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞に、Aurora kinase A の shRNA を導入し、細胞増殖能、抗がん剤シスプラチンによるアポトーシス誘導能を検討した。⑥ JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞を Aurora kinase 阻害剤で処理し、細胞増殖能、抗がん剤シスプラチンによるアポトーシス誘導能を検討した。

- (3) ① JAK2 変異体による Akt の活性化を特異的に阻害する Epo 受容体 (EpoR) の点変異体を作成した。② JAK2 変異体と EpoR 変異体を発現した Ba/F3 細胞を樹立した。③ 作成した細胞株を用いて、JAK2 変異体による細胞増殖、細胞生存における Akt の役割を解析した。④ 作成した細胞株における Akt の基質である CREB や GSK-3 β のリン酸化を検討した。⑤ 作成した細胞における抗アポトーシス因子 Bcl-XL および Mcl-1 の発現を解析した。

4. 研究成果

- (1) ① JAK2 変異体は、EpoR の 343 番目のチロシン残基のリン酸化を介して、STAT5 の活性化を誘導することが明らかになった。② JAK2 変異体と EpoR 変異体 (Y343F) を発現した Ba/F3 細胞は、アポトーシスを誘導することが明らかになった。③ JAK2 変異体と EpoR 変異体 (Y343F) を発現した Ba/F3 細胞をヌードマウスに移植すると、腫瘍形成が顕著に抑制された。以上の結果より、JAK2 変異体による細胞増殖

および腫瘍形成において、STAT5の活性化が重要な役割を果たすことが明らかになった。

- (2) ①DNAアレイ法により、JAK2変異体発現細胞で発現誘導が観察された遺伝子として、既に報告されている c-Myc や Pim の他に、分裂期キナーゼ Aurora kinase A を同定した。②JAK2V617F 変異体による Aurora kinase A は、c-Myc の発現を介して誘導されることが明らかになった。③ Aurora kinase A やそのキナーゼ欠損変異体 (K175R) を導入した Ba/F3 細胞は、細胞増殖能に違いは認められなかった。しかしながら、Aurora kinase A 発現細胞は、シスプラチンによるアポトーシス誘導に耐性を示した。一方、Aurora kinase A キナーゼ欠損変異体を発現した細胞では、シスプラチンによるアポトーシスに耐性を示さなかったため、Aurora kinase A のキナーゼ活性が重要であると考えられた。④JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞において、Aurora kinase A をノックダウンすると、細胞増殖には影響しないが、シスプラチンによるアポトーシス誘導能が増強した。⑤Aurora kinase 阻害剤で処理した JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞は、シスプラチンによりアポトーシスを誘導した。したがって、JAK2V617F 変異体は、Aurora kinase A の発現を誘導することにより、DNA 損傷に抵抗性を示すことが明らかになった。
- (3) ①JAK2 変異体は、EpoR の Y479 のリン酸化を誘導し、PI3K-Akt 経路を活性化することが明らかになった。②JAK2 変異体と EpoR Y479F 変異体を発現した Ba/F3 細胞は、アポトーシスを誘導した。③JAK2 変異体の下流で活性化された Akt が CREB や GSK-3β の活性化を誘導することにより、抗アポトーシス因子 Bcl-XL や MCL-1 の発

現を上昇した。④JAK2 変異体と EpoR Y479F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したヌードマウスは、腫瘍形成が抑制され、生存日数が延長した。以上の結果より、JAK2 変異体により恒常的に活性化した Akt は、抗アポトーシス作用に重要な役割を果たすことが明らかになった。

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 8 件)

- ① Sumi K, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells. *FEBS Lett*. 査読有、2011 (in press)
- ② Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal*. 査読有、23(5)、2011、849-856
- ③ Funakoshi-Tago M, Tago K, Sato Y, Tominaga S, Kasahara T. JAK2 is an important signal transducer in IL-33-induced NF- κ B activation. *Cell Signal*. 査読有、23(2)、2011、363-370
- ④ Tago K, Funakoshi-Tago M, Sakinawa M, Mizuno N, Itoh H. KappaB-Ras is a nuclear-cytoplasmic small GTPase that inhibits NF-kappaB activation through the suppression of transcriptional activation of p65/RelA. *J Biol Chem*.

- 査読有、285(40)、2010、30622-30633
- ⑤ Tanifuji S, Aizu-Yokota E, Funakoshi-Tago M, Sonoda Y, Inoue H, Kasahara T. Licochalcones suppress degranulation by decreasing the intracellular Ca²⁺ level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells. *Int Immunopharmacol*. 査読有、10(7)、2010、769-776
- ⑥ Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tsuruya R, Hatanaka M, Mashino T, Sonoda Y, Kasahara T. The fixed structure of Licochalcone A by alpha, beta-unsaturated ketone is necessary for anti-inflammatory activity through the inhibition of NF-kappaB activation. *Int Immunopharmacol*. 査読有、10(5)、2010、562-571
- ⑦ Sonoda Y, Warita M, Suzuki T, Ozawa H, Fukuda Y, Funakoshi-Tago M, Kasahara T. Proteolipid protein 2 is associated with melanoma metastasis. *Oncol Rep*. 査読有、23(2)、2010、371-376
- ⑧ Funakoshi-Tago M, Tago K, Abe M, Sonoda Y, Kasahara T. STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *J Biol Chem*. 査読有、285(8)、5296-5307

[学会発表] (計9件)

- ① 小澤 広規、保科 直美、多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠、FAK 及びPLP2 ノックダウンによるメラノーマ増殖抑制について、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学大会 合同大会、2010年12月9日、神戸
- ② 鷺見 和也、多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠、JAK2 変異体 (V617F) がc-Myc の恒常的な発現を誘導する、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学大会 合同大会、2010年12月9日、神戸

- ③ 田中 和之、多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠、JAK2 変異体のシグナル伝達におけるPim の役割の解析、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学大会 合同大会、2010年12月9日、神戸
- ④ 長田 達明、多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠、JAK2 変異体による細胞生存に及ぼす Serine protease inhibitor (Serpin) の役割、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学大会 合同大会、2010年12月9日、神戸
- ⑤ 上四元 純、多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠、JAK2 変異体 (V617F) によるアポトーシス耐性ならびに腫瘍形成能の解析、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学大会 合同大会、2010年12月9日、神戸
- ⑥ 鶴谷 理奈、森脇 拓郎、多胡 めぐみ、園田 よし子、笠原 忠、JAK2 変異体 (V617F) のシグナル伝達経路に及ぼすSOCS3 の役割の解析、第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学大会 合同大会、2010年12月9日、神戸
- ⑦ 多胡 めぐみ、JAK2 変異体のシグナル伝達解析による真性赤血球増加症発症機構の解明、第54回薬学会関東支部会、2010年10月2日、東京
- ⑧ 鷺見和也、多胡 めぐみ、園田よし子、笠原 忠、真性赤血球増加症由来JAK2 変異体のシグナル伝達におけるc-Myc の役割、第54回薬学会関東支部会、2010年10月2日、東京
- ⑨ 田中和之、多胡 めぐみ、園田よし子、笠原 忠、JAK2 変異体 (V617F) によるがん化シグナルにおける Pimの役割、第54回薬学会関東支部会、2010年10月2日、東京

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・講師
研究者番号：30445192

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし