

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790096

研究課題名（和文） STAT5 標的遺伝子による真性赤血球増加症発症機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the polycythemia vera onset mechanism by investigating STAT5-target genes

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）は、転写因子 STAT5 の活性化を介して細胞増殖や腫瘍形成を誘導する。本研究では、JAK2 変異体の下流で STAT5 の活性化を介して、転写因子 c-Myc およびその標的遺伝子であるポリアミン合成酵素 ODC や分裂期キナーゼ Aurka の発現が誘導されることを見出した。c-Myc および ODC は JAK2 変異体による細胞増殖や腫瘍形成に寄与し、Aurka は JAK2 変異体の持つ抗がん剤耐性に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：A point mutant of a tyrosine kinase JAK2 (V617F), which is a cause gene of polycythemia vera, induces cell proliferation and tumorigenesis through activation of a transcription factor STAT5. In this study, we found that a transcription factor c-Myc and its target genes such as ornithine decarboxylase (ODC) and Aurora kinase A (Aurka) were induced by JAK2 mutant through STAT5 activation. We also showed that c-Myc and ODC were important for the JAK2 mutant-induced cell proliferation and tumorigenesis and Aurka was critical for the resistance to anti-cancer drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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、c-Myc、ODC、Aurka

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、約 97% の真性赤血球増加症患者に

において、JAK2 の点変異（V617F）が見出されることが報告された。さらに、JAK2V617F 変異体は恒常的に活性化されており、増殖因子に依存しない無秩序な細胞増殖や腫瘍形成

を誘導する強力な癌遺伝子として機能することが明らかになっていた。私達は、Epo 刺激に関わらず、JAK2V617F 変異体が転写因子 STAT5 の恒常的な活性化を誘導することを見出した。興味深いことに、shRNA を用いて STAT5 をノックダウンすると、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成は顕著に阻害されることを観察した。したがって、JAK2V617F 変異体によるがん化シグナルにおいて、STAT5 は重要な役割を果たしていると考えられたが、その詳細な分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、JAK2 変異体の細胞がん化シグナルにおいて不可欠な役割を担っていると考えられる STAT5 の標的遺伝子群を包括的に解析し、それらの役割を解明することにより、JAK2V617F 変異体が真性赤血球増加症を発症するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず (1) DNA アレイ法を用いて、JAK2V617F 変異体により発現誘導される遺伝子群のうち、STAT5 に依存して発現が誘導される遺伝子群を網羅的に同定した。その後、(2) 同定された STAT5 標的遺伝子群の細胞生存、抗がん剤耐性能およびヌードマウスを用いた腫瘍形成における役割を明らかにした。

(1) ①JAK2V617F 変異体により STAT5 依存的に発現誘導される遺伝子群を同定するために、野生型 JAK2 あるいは JAK2V617F 変異体を発現した Ba/F3 細胞および JAK2V617F 変

異体発現 Ba/F3 細胞にコントロール shRNA あるいは STAT5 shRNA を導入した細胞株を作製した。②DNA アレイ法を用いて、野生型 JAK2 発現細胞と JAK2V617F 変異体発現細胞における遺伝子発現の変動および JAK2V617F 変異体発現細胞において STAT5 のノックダウンにより発現が変動する遺伝子を探索した。

(2) ①同定した遺伝子群の cDNA を RT-PCR 法によりクローニングし発現ベクターを作製した。また、同定遺伝子群の特異的な shRNA を作成した。②レトロウィルスを用いて、同定した遺伝子群を Ba/F3 細胞に導入し、過剰発現細胞株を作製した。また、同様に、JAK2V617F 変異体発現 Ba/F3 細胞に各 shRNA を導入した細胞株を作製した。これらの細胞株を用いて、細胞増殖能、抗がん剤耐性能を検討した。さらに作製した細胞株をヌードマウスに移植し腫瘍形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) DNA アレイを行い、野生型 JAK2 発現細胞に比べて、JAK2V617F 変異体発現細胞で高い発現が見られ、さらに STAT5 をノックダウンすることにより発現低下が認められる遺伝子として、転写因子 c-Myc やその標的遺伝子である分裂期キナーゼ Aurora kinaseA (Aurka) およびポリアミン合成酵素 Ornithine decarboxylase (ODC) を見出した。RT-PCR 法、ウエスタンブロット法を行った結果、JAK2 V617F 変異体は、STAT5 を介して c-Myc、Aurka、ODC の発現を誘導することが明らかになった。

(2) shRNA を用いて c-Myc をノックダウンした JAK2V617F 変異体発現では、増殖および腫瘍形成が抑制された。また、ODC 阻害剤である DL- α -Difluoromethylornithine (DFMO)

を用いて、JAK2 V617F 変異体による細胞増殖に及ぼす ODC の役割を検討した。DFMO は濃度依存的に JAK2V617F 変異体発現の G0/G1 期における細胞周期の停止を誘導した。さらに、JAK2V617F 変異体発現を移植したヌードマウスに、1% (w/v) DFMO を投与すると、腫瘍形成が顕著に抑制され、生存日数が延長した。以上の結果より、c-Myc および ODC の発現誘導は、JAK2V617F 変異体による腫瘍形成に重要であることが明らかになった。

(3) 野生型 JAK2 発現細胞は、抗がん剤シスプラチン (CDDP) に対して高い感受性を示しアポトーシスを誘導したが、JAK2V617F 変異体発現細胞は、CDDP によるアポトーシスに抵抗性を示した。また、shRNA を用いて Aurka をノックダウンすると、JAK2V617F 変異体発現細胞の CDDP に対する感受性が増加し、低濃度の CDDP 添加によりアポトーシスが誘導された。以上の結果より、Aurka の発現誘導は、JAK2V617F 変異体が持つ抗がん剤耐性に寄与することが明らかになった。

以上の結果から、JAK2V617F 変異体により STAT5 を介して発現が誘導される c-Myc、ODC、Aurka は、JAK2V617F 変異体が誘導する細胞がん化シグナルに重要な役割を果たしており、真性赤血球増加症の治療の新たな標的分子になりうる可能性が示された。

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. Funakoshi-Tago M, Sumi K, Kasahara T, Tago K. Critical roles of Myc-ODC axis in the cellular transformation induced by myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 V617F mutant. *PLoS One*. (査読 有), 8(1), 2013, e52844. doi: 10.1371/journal.pone.0052844.

2. Funakoshi-Tago M. Analysis of oncogenic signaling pathway induced by a myeloproliferative neoplasm-associated Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutant. *Yakugaku Zasshi*. (査読 有), 132(11), 2013, 1267-1272.
3. Funakoshi-Tago M, Nagata T, Tago K, Tsukada M, Tanaka K, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T. Fullerene derivative prevents cellular transformation induced by JAK2 V617F mutant through inhibiting c-Jun N-terminal kinase pathway. *Cell Signal*. (査読 有), 24(11), 2012, 2024-2034. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.06.014.
4. Funakoshi-Tago M. Analysis of the mechanism of polycythemia vera by studying JAK2 mutant-induced signaling pathway. *Yakugaku Zasshi*. (査読 有), 131(8), 2011, 1183-1187.
5. 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), 585(12), 2011, 1884-1890. doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.068.
6. Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. *Int Immunopharmacol*. (査読 有), 11(9), 2011, 1150-1159. doi: 10.1016/j.intimp.2011.03.012.
7. 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. doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.009.

[学会発表] (計 23 件)

1. 多胡めぐみ、慢性骨髄増殖性腫瘍の原因

遺伝子 JAK2V617F 変異体の癌化シグナル
の解析、日本薬学会、2011. 3. 30

2. Megumi Funakoshi-Tago. Aurora kinase A
critically contributes to the resistance to
anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F
mutant-induced transformed cells.
2012.7.30 the 37th FEBS/22nd IUBMB
Congress, Seville, Spain

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