

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590091

研究課題名(和文) JAK/STATシグナル伝達における残された課題への挑戦と創薬への試み

研究課題名(英文) Investigation of JAK/STAT signalling and development of new reagents regulating JAK/STAT pathways

研究代表者

笠原 忠 (KASAHARA, Tadashi)

慶應義塾大学・薬学部・名誉教授

研究者番号：60049096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍(MPN)患者ではJAK2のJH2領域V617F変異がみられるが、その異常増殖や腫瘍形成に至る機序を解析した。(1) JAK2V617F変異体発現細胞において、c-Mycを介したODCの活性化やAurkaの活性化、ならびにFANCCの活性化を見いだした。ODCの阻害剤はin vivoでの腫瘍形成を抑制した。(2) 変異体細胞はCDDPのような抗がん剤抵抗性がみられたが、ファンコニ因子FANCCの活性化がその理由と考えられた。(3) フラーレン誘導体変異体細胞の増殖と造腫瘍性が抑制されることを明らかにし、MPN治療薬となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：JAK2/STAT pathway is involved in many cytokine signaling of which mechanism still requires precise investigation. JAK2 V617F mutation is observed in majority of patients with myeloproliferative neoplasms (MPNs). We investigated how JAK2V617F mutation induces dysregulated proliferation and tumorigenesis. JAK2 V617F mutation induced significant c-Myc mRNA expression mediated by STAT5 activation, which induced subsequent ornithine decarboxylase (ODC). An ODC inhibitor prevented proliferation of JAK2V617F cells. Further, JAK2V617F exhibited resistance to anti-cancer drugs such as CDDP. We found that FANCC, a member of the Fanconi anemia (FA) proteins, is responsible to the resistance against the drug-induced DNA damage. In addition, pyrrolidinium fullerene markedly induced apoptosis of JAK2 V617F cells. These observations indicated that fullerene derivatives are suitable candidates inhibiting the JAK2 V617F-mediated proliferation and tumorigenesis.

研究分野：免疫学、生化学

 キーワード：JAK/STATシグナル系 JAK2 変異体 c-Myc活性化 オルニチンデカルボキシラーゼ 抗がん剤耐性 フ
 アンコニタンパク質 フラーレン誘導体

1. 研究開始当初の背景

JAK/STAT 経路は 40 に上るサイトカインシグナル伝達に関わる多彩なシグナル系である。JAK2 欠損マウスは胎生致死であり、その変異は骨髄増殖性疾患 (MPN) を引き起こすことからその重要な役割があきらかである。しかしながら、JAK/STAT シグナル系は複雑で、まだ未解明の点も多い。とくに、JAK/STAT 分子のクロストークや制御機構あるいは制御分子についてはいまだ解明の余地がある。我々は、JAK2V617F の点変異が増殖因子非依存的に増殖するのみならず、in vivo で腫瘍形成することを明らかにしており、その機序の解明をめざした。さらに、異常増殖を制御する薬物の開発をめざした。

2. 研究の目的

(1) V617F 発現細胞では IL-3/Epo 非依存的な活性化と in vivo における造腫瘍性を示すが、下流のシグナル分子と実行因子の解析を行う。

(2) JAK2V617F による恒常的活性化ならびに造腫瘍性を抑制する新規薬物の探索する。すでにリコカルコン類やフラレーン誘導体などが著明な増殖抑制と抗腫瘍効果のあることを見いだしているが、さらにその活性構造相関の検討と in vivo の作用解析を進める。

(3) IL-33 シグナル下流における JAK/STAT 経路の役割を解析する。IL-33 は Th2 免疫応答系に重要なサイトカインであるが、JAK2 と他のシグナル系のクロストークを解析する。

最終的には、JAK/STAT 経路を標的とする分子標的治療薬の開発をめざす。

3. 研究の方法

(1) JAK2 の点変異体 V617F 変異体導入細胞の増殖因子非依存的増殖や in vivo での腫瘍形成能は評価系を確立している。既に、下流分子を DNA アレー解析や二次元電気泳動と TOF-MS により発現亢進している分子を 100 以上同定した。これら個々の分子の役割について解明するために強制発現系、ならびに siRNA により欠失細胞株を確立し、機能解析を行った。

(2) V617F 変異は慢性骨髄増殖性腫瘍 (MPL) に高頻度で認められることから、V617F 変異細胞の増殖ならびに in vivo での造腫瘍性の抑制を指標に、リコカルコン類やフラレーン誘導体などの阻害剤の探索を行った。

4. 研究成果

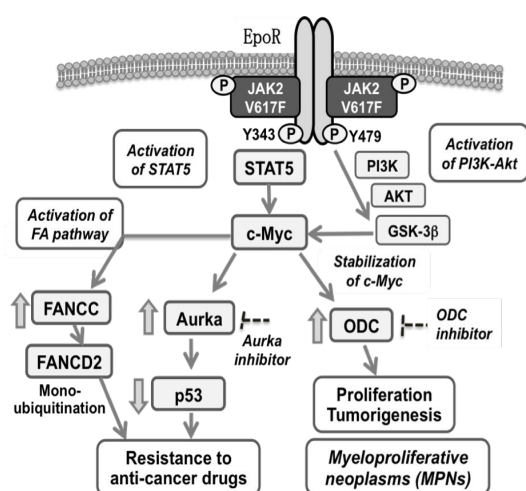
(1) JAK2V617F 変異体導入細胞における下流シグナル分子の解析: これまでに、BaF3 細胞に V617F 変異体を導入した細胞では恒常的に活性化され、ヌードマウスに移植すると腫瘍形成がみられた。JAK2 の活性化には STAT5 が必要であるが、その下流シグナルとして、PI3-kinase/Akt の構成的な活性化とアポトーシス経路抑制機序を見いだした。さらに、下流のシグナル分子や腫瘍形成に関わるエフェクター分子として、Aurora kinase A (Aurka), c-Myc, Pim-1,2, FANCC などの関与が認められた。とくに、c-Myc からの ODC 経路は重要であり、ODC 阻害剤である DFMO により、in vivo での JAK2V617F による腫瘍形成が著明に抑制された。

(2) JAK2V617F 細胞の抗がん剤耐性機序の解析: JAK2V617F 細胞では CDDP や MMC のような DNA 架橋性抗がん剤に対して抵抗性がみられた。この耐性機序を解析するために、V617F 発現細胞に特異的に発現している遺伝子群のうち、Aurka とファンコニタンパク質 FANCC に着目した。Aurka は、p53 のリン酸化 (Ser315) して不安定化していることが確認された。また、FANCC は FANCD2 のモノユビキチン化と Foci 形成を誘導することにより、抗がん剤耐性を誘導していることを明らかにした。

(3) JAK2/STAT シグナル系を標的とする抑制剤の検索: JAK2V617F 細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導活性を指標として、フラレーン誘導体であるピロリジニウム型フラレーンが in vivo での造腫瘍性を抑制することを明らかにした。すなわち、フラレーン誘導体が MPN 治療薬になる可能性を示した。

(4) IL-33/ST2 シグナル伝達系における JAK2 の役割と阻害剤: 我々は、従来から

IL-33を介するサイトカイン遺伝子発現の制御におけるJAK2の関与を示してきた。本年度はIL-33によるNF- κ B活性化におけるネパール産プロポリス成分による抑制物質の探索を行い、とくにフラボノイドの一種である 3,4-dihydroxy-4-methoxydalbergione, 4-methoxydalbergion, cearoinや chrysin に強いNF- κ B抑制作用のあることがわかった。



以上、本研究の成果として、JAK2 変異体下流の新たなシグナル系の関与を明らかにするとともに、JAK2 変異体による抗がん剤耐性の機序に関して新たな知見が得られた。これらの知見とこれらの分子に基づき、新規の抑制物質の探索を行なった。

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. Kasahara T. Study of cytokine signaling: the quest for immunomodulatory drugs interacting with cytokine production and activity. *Yakugaku Zasshi*. 査読有、2015; 135(3): 431-47. doi: 10.1248/yakushi.14-00237.

2. Funakoshi-Tago M, Okamoto K, Izumi R, Tago K, Yanagisawa K, Narukawa Y, Kiuchi F, Kasahara T, Tamura H. Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling

pathway. *Int Immunopharmacol*. 査読有、2015 Mar;25(1):189-98. doi: 10.1016/j.intimp.2015.01.012.

3. Mizushima Y, Shirasuna K, Usui F, Karasawa T, Kawashima A, Kimura H, Kobayashi M, Komada T, Inoue Y, Mato N, Yamasawa H, Latz E, Iwakura Y, Kasahara T, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi M. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of IL-1 β . *J Biol Chem*. 査読有、2015 Feb 20;290(8):5065-77. doi: 10.1074/jbc.M114.603217.

4. Funakoshi-Tago M, Tsukada M, Watanabe T, Mameda Y, Tago K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T. Effect of chemical modification on the ability of pyrrolidinium fullerene to induce apoptosis of cells transformed by JAK2 V617F mutant. *Int Immunopharmacol*. 査読有、2014 May;20(1):258-63. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.035.

5. Ueda F, Sumi K, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Critical role of FANCC in JAK2 V617F mutant-induced resistance to DNA cross-linking drugs. *Cell Signal*. 査読有、2013 Nov;25(11):2115-24. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.07.003.

6. 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、2013;8(1):e52844. doi: 10.1371/journal.pone.0052844.

7. Ishii I, Harada Y, Kasahara T. Reprofileing a classical anthelmintic, pyrvinium pamoate, as an anti-cancer drug targeting mitochondrial respiration. *Front Oncol*. 査読有、2012 Oct 2;2:137. doi: 10.3389/fonc.2012.00137. eCollection 2012.

8. 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、2012 Nov;24(11):2024-34. doi: 10.1016/j.cellsig.2012.06.014.

[学会発表](計 14件)

1. 上田史仁, 鷲見和也, 多胡めぐみ, 笠原 忠. V617変異体発現細胞の示す抗がん剤耐性に

おけるFANCCの役割. 日本薬学会第133年会, 2014年3月30日, 熊本市

2. 中村文香, 石川駿之, 大澤健太郎, 成川佑次, 木内文之, 多胡めぐみ, 笠原 忠. ネパール産プロポリス含有フラボノイドによるLPSシグナル伝達経路の抑制. 日本薬学会第133年会, 2014年3月30日, 熊本市

3. 笠原 忠. 感染症と腸管免疫-サイトカイン研究の視点から. 第52回感染性腸炎研究会総会, 2013年3月9日, 東京

4. Miyagawa Y, Nomura S, Funakoshi- Tago M, Narukawa Y, Kiuchi F, Kasahara T. Inhibitory effect of Parvifloron E on the TNF α -induced NF- κ B activation through the down-regulation of RIP1 expression. 第78回JSICR・第21回MMCB合同学術集会, 2013年5月20日, 東京

5. 上田史仁, 根本 望, 多胡めぐみ, 笠原 忠. 慢性骨髄増殖性腫瘍の原因遺伝子 JAK2V617F変異体による細胞増殖誘導におけるEpoRリン酸化の役割. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, 横浜市

6. 岡本一飛, 多胡めぐみ, 早川盛禎, 富永真一, 笠原 忠. Th2様に分化させたEL-4細胞におけるIL-33/ST2シグナル伝達機構の解析. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, 横浜市

7. 宮川友理香, 多胡めぐみ, 増野匡彦, 笠原 忠. IL-33のシグナル伝達経路におけるビスマロン酸型フラブレン誘導体の影響. 第86回日本生化学会大会, 2013年9月12日, 横浜市

8. Kasahara T, Miyagawa Y, Okamoto K, Mashino T, Funakoshi-Tago M. A fullerene derivative inhibits IL-33- induced inflammatory cytokines via IKK β -specific pathway, ICIS, Cytokine 2013, 2013年9月30日, San Francisco, USA

9. 岡本一飛, 宮川友理香, 出海里佳, 成川佑次, 木内文之, 多胡めぐみ, 笠原 忠. プロポリス含有フラボノイドのIL-33シグナル伝達経路に及ぼす影響. 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月19日, 東京

10. 根本 望, 上田史仁, 多胡めぐみ, 笠原 忠. V617FJAK2変異体のシグナル伝達におけるEpoRのリン酸化の役割. 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月19日, 東京

11. 桑江優子, 高山直人, 成川佑次, 木内文之, 多胡めぐみ, 笠原 忠. TNF α シグナル伝達

経路に及ぼすフラボノール化合物の影響. 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月19日, 東京

12. 横田重信, 上田史仁, 森脇拓郎, 多胡めぐみ, 笠原 忠. CrizotinibによるNPM-ALK発現細胞のアポトーシス誘導. 第57回日本薬学会関東支部大会, 2013年10月19日, 東京

13. 多胡めぐみ, 鷲見和也, 多胡憲治, 笠原 忠. 慢性骨髄増殖性腫瘍由来JAK2変異体のがん化シグナルにおけるc-Myc-ODC経路の役割. 第85回日本生化学会大会, 2012年12月15日, 福岡市

14. 岡本一飛, 多胡めぐみ, 笠原 忠. EL-4細胞におけるIL-33/ST2Lシグナル伝達機構の解析. 第56回日本薬学会関東支部大会, 2012年10月6日, 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1)研究代表者
笠原 忠 (Kasahara Tadashi)
慶應義塾大学・薬学部・名誉教授
研究者番号: 60049096

(2)研究分担者
多胡めぐみ (Tago Megumi)
慶應義塾大学・薬学部・准教授
研究者番号: 30445192