

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19559

研究課題名(和文)細胞内シグナル伝達分子JAK2の変異特異的に活性化される転写因子の機能解析

研究課題名(英文) Identification of a new transcriptional cascade activated by oncogenic JAK2 tyrosine kinase mutant

研究代表者

枝廣 陽子(EDAHIRO, YOKO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：40732863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄増殖性腫瘍の発症に、機能獲得型変異JAK2V617Fが関わる事が明らかになり、JAK2V617Fを特異的に阻害する治療戦略が求められている。申請者は、JAK2V617F特異的にAP-1の結合配列が活性化されることを明らかにし、ルシフェラーゼレポーター解析などからJAK2V617Fの下流にc-Fosが存在することを示した。さらに、JAK2V617Fによるc-Fosの活性化には、c-Fosの産生亢進だけでなく、ユビキチン蛋白質分解経路の阻害にもよることを明らかにした。以上から、c-Fosを標的とした治療法の開発、またこのレポーター解析法を用いた薬剤スクリーニングが今後可能となると考える。

研究成果の概要(英文)：JAK2V617F, a gain-of-function mutation in the tyrosine kinase JAK2, is frequently detected in myeloproliferative neoplasms (MPN), however its molecular mechanism in terms of MPN development is not fully understood. The identification of the JAK2 mutation in MPN led to the development of JAK2 inhibitors, however, treatment with these inhibitors is associated with side effects caused by blockade of function of wild-type JAK2; therefore, a new therapeutic strategy based on understanding of MPN development is required. In this study, I found that AP-1 activation by JAK2V617F through c-FOS induction involves an unidentified molecular mechanism suggesting that deregulation of AP-1 plays a role in MPN development. Additionally, the AP-1 reporter assay system I have established should be useful not only for screening novel compounds for MPN treatment but also in studying the novel pathway regulated by JAK2V617F, which would lead to the development of a novel therapeutic strategy against MPN.

研究分野：血液内科

キーワード：骨髄増殖性腫瘍 JAK2V617F

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasms; MPN) は、造血幹細胞の異常によって一系統以上の骨髄系細胞のクローナルな増殖をきたす疾患である。フィラデルフィア染色体 (Ph) 陰性 MPN の代表的な 3 疾患である、真性赤血球増加症 (polycythemia vera; PV)、本態性血小板血症 (essential thrombocythemia; ET)、原発性骨髄線維症 (primary myelofibrosis; PMF) 患者の多くに共通してみられる遺伝子変異、JAK2 V617F 変異が 2005 年に報告された (Nature 2005;434:1144-1148 他)。野生型 JAK2 は、サイトカイン受容体の細胞質内部分に結合し、サイトカインの結合に依存したレセプターの構造変化によって活性化され、下流の STAT、MAPK、PI3K へのシグナル伝達がおこる。一方で、V617F 変異は、キナーゼ活性を有する JH1 ドメインの機能を抑制していると考えられている JH2 ドメインに存在し、この変異によって JH2 ドメインによる JH1 ドメインの抑制が減弱され、サイトカイン非依存性に JAK2 シグナル伝達系の恒常的な活性化が起こり、血球細胞の異常な増加が生じていると考えられている。

JAK2 V617F 変異の発見以降、JAK2 阻害薬の臨床応用が始まり (N. Engl. J. Med 2010;363:1117-1127 他)、骨髄線維症の患者において、JAK2 阻害薬の使用によって約半数の患者で脾腫や臨床症状の改善を得られることが報告された。しかし同時に野生型の JAK2 も阻害されるため、約 20% で血小板減少や貧血などの副作用が生じて阻害薬の投与継続が不可能となる。また慢性骨髄性白血病 (Chronic myeloid leukemia) に対するイマチニブと異なり、JAK2 V617F 変異を有する腫瘍細胞数の低下で示される分子生物学的寛解への到達や、生存期間の延長についてはいまだ不明な点も多いなど、多くの課題が残っている。さらに、JAK2 阻害薬を長期使用すると薬剤耐性が生じることも懸念されており、これは試験管内で既に示されているように、JAK2 阻害薬の長期使用で、JAK2 が通常形成するホモ二量体ではなく、JAK1 や TYK2 とのヘテロ二量体を形成し、その結果、下流のシグナル伝達を再活性化することで薬剤耐性が生じていると考えられている。 (Nature 2012;489:155-159)。Ph 陰性 MPN 患者にみられる epigenetic な異常や免疫学的異常を、直接標的とする HDAC 阻害薬や DNA メチルトランスフェラーゼ阻害薬、免疫調節薬などの他の薬剤による臨床試験も行なわれている (Blood. 2011;118:2069-2076 他) が、完治を望める治療薬の発見には至っておらず、新たな治療戦略の開発が必要と考えられた。特に、JAK2 V617F を特異的に阻害するこれまでと異なる治療戦略の開発が、MPN に必要な背景があった。

## 2. 研究の目的

上記を踏まえて、JAK2 V617F 特異的なシグナルの解明による新たな治療戦略の開発が必要と考えた。そこで、JAK2 V617F 特異的に活性化される転写因子の存在を明らかにし、この転写因子による骨髄増殖性腫瘍の発症メカニズムを明らかにすることで、JAK2 V617F を特異的に阻害する骨髄増殖性腫瘍の新たな治療戦略を開発することを本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

骨髄増殖性腫瘍のドライバー遺伝子変異の一つである JAK2 V617F の下流シグナルを解析するために、JAK2 V617F によって活性化されるプロモーターの解析を行い、JAK2 V617F 特異的に活性化される配列 (JVRE) を同定した。続いて、この配列に結合する転写因子 (JVRBP1) を明らかにし、この転写因子について、mRNA、蛋白質の発現レベルを解析し、MPN の発症にどのように関わっているかを明らかにすることとした。

また、順天堂大学医学部附属順天堂医院に通院中の骨髄増殖性腫瘍が疑われる症例を収集し、JAK2 V617F 変異の有無を確認した。確認には、JAK2 V617F 変異を極めて高感度にかつ、正確に検出できる技術を使用した (Luek Res 2011;35:1632-1636)。こうして JAK2 V617F 変異が確認された検体から、CD34 陽性細胞を分離し、患者由来の細胞における JVRB1 の役割を解明することとした。

さらに、細胞株における JAK2 V617F の下流シグナルを解析するために、ヒトの骨髄球系細胞株である UT-7/GM をもとに、テトラサイクリンによる誘導によって JAK2 V617F が発現する細胞株の作製を試みた。こうして得られた細胞株を用いて、JAK2 V617F が発現した時の mRNA の発現の変化を解析することとした。

また、骨髄増殖性腫瘍のドライバー遺伝子として、JAK2 V617F 変異の他に、CALR 遺伝子変異が 2015 年に報告された。そこで、CALR 変異の独自の検出方法を構築し、本邦での CALR 変異患者の特徴を解析した。さらに、骨髄増殖性腫瘍における CALR 遺伝子変異の働きについても解析することとした。

## 4. 研究成果

### 1) 日本人における骨髄増殖性腫瘍の遺伝子変異の解析

日本全国の医療機関から収集した 4000 例超の骨髄増殖性腫瘍が疑われる症例の検体から、JAK2 V617F 変異の有無を解析するとともに、同じく骨髄増殖性腫瘍のドライバー遺伝子である MPL 遺伝子、CALR 遺伝子変異を、独自に構築した検出法を用いて解析した (PLoS ONE.

2014;9(8):e104958、Haematologica 2015;100:e46-e48)。さらに、WHO 2008 分類の診断基準に照らして、PV、ET、PMF の診断を確定させた。診断を確定させた PV:191人、ET:370人、PMF:76人のうち、JAK2 V617F 変異陽性率はそれぞれ 90%、54%、52%であった。ET、PMF における CALR 変異陽性率はそれぞれ 24%、28%であり(図 1) いずれもこれまでの欧米からの報告と同様であることを示した。

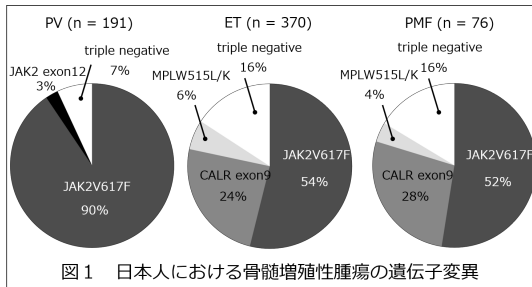


図1 日本人における骨髄増殖性腫瘍の遺伝子変異

2) JAK2 V617F により特異的に活性化される転写配列の同定

JAK2 V617F により特異的に活性化される CMV プロモーターについて、プロモーターの一部を削り、JAK2 V617F 特異的な活性が消失する部位を探索し、その部位に JAK2 V617F に特異的に活性化される転写配列(JVRE)を見つけ、この中に AP-1 の配列が含まれることを明らかにした(図 2)。

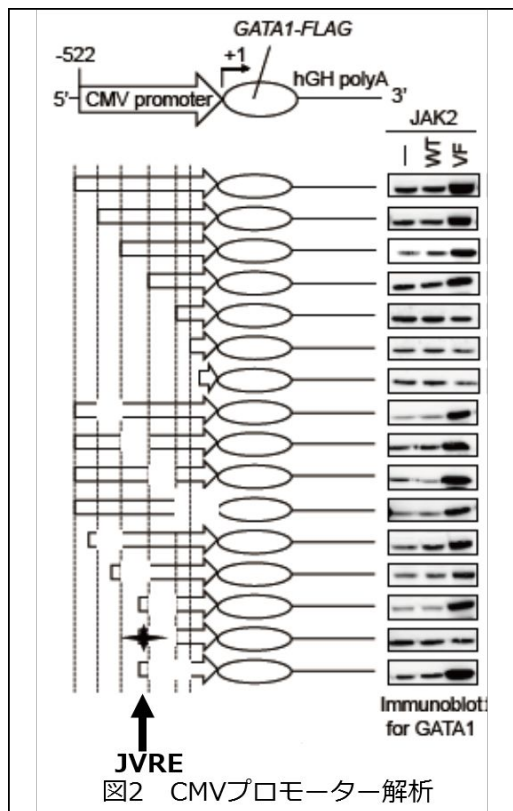


図2 CMVプロモーター解析

さらにこの活性が、JAK2 阻害薬で阻害されることを確認し、この転写因子が JAK2 V617F 特異的に活性化されているこ

とを示した。

3) JVRE に結合する蛋白質の解析

JAK2 V617F を過剰発現させた細胞では、JVRE に結合する蛋白質が、JAK2 野生型よりも多いことを、gel shift assay を行って確認した(図 3)。また、この配列には AP-1 の配列が含まれていることから、competitor assay を行い、AP-1 の配列が特異的に JAK2 V617F によって活性化されていることを示した。

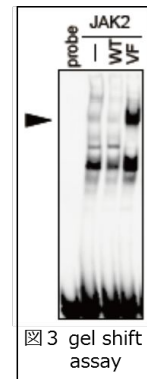


図3 gel shift assay

4) JVRE の活性化をおこす蛋白質の解析

複数の AP-1 ファミリーの抗体を用いて、supershift assay を行ったところ、AP-1 ファミリーの中でも、c-Fos と JunB が JVRE と結合することを示した(図 4)。さらに、c-Fos と JunB について、JVRE への活性の影響を検討したところ、c-Fos が JVRE を活性化させるのに必要十分であることを示した(図 5)。

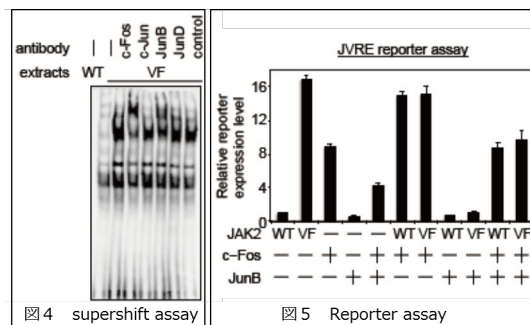


図4 supershift assay

図5 Reporter assay

5) JAK2 V617F の下流のシグナル解析

JAK2 の代表的な下流のシグナルとして、MEK、PI3K、STAT が挙げられることから、これらのいずれのシグナル経路と JVRE が関与しているかを解析した。その結果、MEK の阻害薬(PD98059)および PI3K の阻害薬(LY294002)を用いて ERK、PI3K を阻害しても、JAK2 V617F による JVRE の活性は阻害されないことが示された(図 6)。

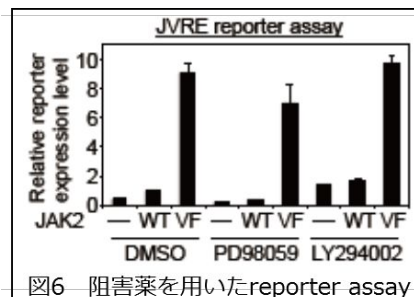


図6 阻害薬を用いたreporter assay

また、STAT3 や STAT5 単独では JVRE の活性が促進されないことを示した。これらのことから、JVRE の活性には、

MEK、PI3K、STAT のいずれのシグナル経路も関与していないことが示唆された。

6) JAK2 V617F による c-Fos 蛋白質の発現亢進のメカニズムの解析

JAK2 V617F により c-Fos の蛋白質の発現が亢進されるメカニズムについて解析した。c-Fos の mRNA について解析したところ、JAK2 V617F により蛋白質の増加のみでなく、mRNA のレベルでも発現が亢進されていることを確認した (図 7)。

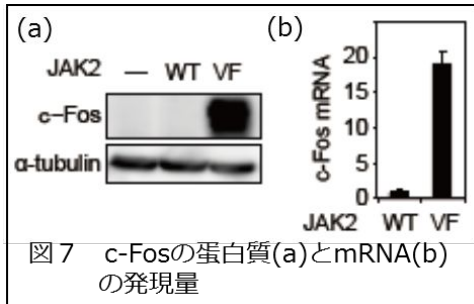


図 7 c-Fosの蛋白質(a)とmRNA(b)の発現量

さらに、シクロヘキサミドを用いて半減期を解析したところ、JAK2 V617F により c-Fos の蛋白質の分解が阻害されていることが示された (図 8)。

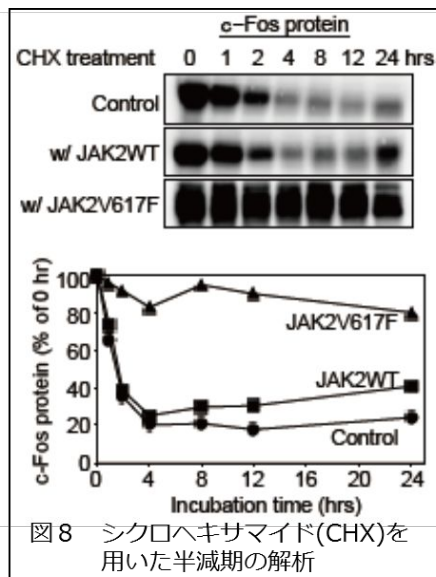


図 8 シクロヘキサミド(CHX)を用いた半減期の解析

また、プロテアソーム阻害薬(MG-132)を用いた解析によって、c-Fos の蛋白質の分解の阻害に、ユビキチン化蛋白質分解が関与していることを示した (図 9)。

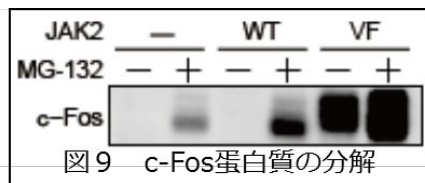


図 9 c-Fos蛋白質の分解

7) AP-1 阻害薬を用いた解析

JAK2 V617F によって c-Fos の発現が特異的に亢進されたため、AP-1 阻害薬を用いた解析を行った。しかし AP-1 阻害薬を投与しても、JVRE の活性の抑制は確認で

きなかった。

8) 細胞株を用いた JAK2 V617F の下流シグナルの解析

ヒトの骨髄球系細胞株である UT-7/GM をもとに、テトラサイクリンによる誘導によって、JAK2 V617F が発現する細胞株 D9 を作製した。この細胞株 D9 では、サイトカイン非依存性に細胞増殖が観察され、STAT の活性化および、赤芽球系細胞への分化がみられ、JAK2 V617F を有する PV 患者と同様の傾向を示すことが確認できた。そこで、JAK2 V617F を発現させた時の mRNA の発現の変化を解析したところ、AIM2、IL1B、CASP1 の発現が有意に亢進していることが示された。これまでに、JAK2 V617F 変異をもつマウスモデルにおいても、IL1B が骨髄線維化に関与していることが報告されており (Nature 2014;512:78-81) MPN の病態解析における細胞株 D9 の有用性が示唆された。

9) 骨髄増殖性腫瘍における CALR 遺伝子変異の役割の解析

CALR 遺伝子変異は PV ではみられず、血小板増加がみられる ET と PMF でみられることから、血小板産生に関わる巨核球細胞に異常がある可能性を考え、巨核球細胞の分化や増殖に必要なトロンボポエチン(TPO)とその受容体である MPL に着目した。その結果、変異型 CALR タンパク質が MPL と結合して、TPO 非存在下でも MPL を活性化させることを示した。さらに、変異型 CALR 蛋白質と MPL との結合は、変異型タンパク質に特徴的な構造により生み出されていることを明らかにした。

以上のように、本研究では、以下の点を明らかにした。

日本人の骨髄増殖性腫瘍患者について、JAK2/MPL/CALR 遺伝子変異解析を行ったが、その変異の割合は、欧米からの報告と同等であった。

JAK2 V617F により c-Fos の発現が蛋白質のレベルでも mRNA のレベルでも亢進しており、ユビキチン化蛋白質分解が関与していることを示した。

AP-1 の阻害薬を用いても、JAK2 V617F による c-Fos の発現亢進は抑制されず、さらなる解析が必要と考えた。

JAK2 V617F を誘導できる細胞株を作製し、その下流の mRNA 解析を行い、AIM2 などの mRNA の発現が亢進していることを示した。

骨髄増殖性腫瘍のドライバー遺伝子の一

つである CALR 遺伝子変異によって、TPO 受容体である MPL がサイトカイン非依存的に活性化され、骨髄増殖性腫瘍の発症に関与していることを示した。

#### 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 12 件)

- 1) Mutational subtypes of JAK2 and CALR correlate with different clinical features in Japanese patients with myeloproliferative neoplasms. Misawa K, Yasuda H, Araki M, Ochiai T, Morishita S, Shirane S, Edahiro Y, Gotoh A, Ohsaka A, Komatsu N. Int J Hematol. 2018 Jun;107(6):673-680. (査読あり)
- 2) The 2014 BCSH criteria and the 2016 WHO criteria for essential thrombocythemia: A comparison in a large-scale cohort. Ochiai T, Yasuda H, Araki M, Misawa K, Morishita S, Nudejima M, Hironaka Y, Shirane S, Edahiro Y, Gotoh A, Ohsaka A, Komatsu N. Eur J Haematol. 2018 Jun;100(6):544-549. (査読あり)
- 3) The 2016 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera renders an accurate diagnosis to a broader range of patients including masked polycythemia vera: comparison with the 2008 WHO diagnostic criteria. Misawa K, Yasuda H, Araki M, Ochiai T, Morishita S, Nudejima M, Hironaka Y, Shirane S, Edahiro Y, Gotoh A, Ohsaka A, Komatsu N. Am J Hematol. 2017 Jul;92(7):E128-E130. (査読あり)
- 4) Identification of AIM2 as a downstream target of JAK2 V617F. Liew EL, Araki M, Hironaka Y, Mori S, Tan TZ, Morishita S, Edahiro Y, Ohsaka A, Komatsu N. Exp Hematol Oncol. 2016;5:2. (査読あり)
- 5) Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y, Kan S, Shirane S, Edahiro Y, Sunami Y, Ohsaka A, Komatsu N. Blood. 2016;127(10):1307-1316. (査読あり)

〔学会発表〕(計 15 件)

- 1) Localization of Mutant Calreticulin in the Golgi Apparatus Is Required for Its Oncogenic Capacity. Masubuchi N, Araki M, Hayashi E, Yang Y, Imai M, Kihara Y, Mizukami Y, Hironaka Y, Takei H, Edahiro Y, Ohsaka A, Komatsu N. 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Atlanta, GA, USA. Dec 2017.
- 2) Establishment of an in vitro model for the skewed megakaryopoiesis by calreticulin mutation in human cells. Takei H, Mano S, Masubuchi N, Mizukami Y, Morishita S, Imai M, Edahiro Y, Hironaka Y, Nudejima M, Tsuneda S, Endo H, Nakamura S, Eto K, Ohsaka A, Araki M, Komatsu N. 22nd Congress of European Hematology Association, Madrid, Spain. June 2017.
- 3) Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, Mizukami Y, Kan S, Shirane S, Edahiro Y, Sunami Y, Ohsaka A, Komatsu N. 21st Congress of European Hematology Association, Copenhagen, Denmark. June 2016.
- 4) Activation of AP-1 by JAK2 V617F through induction and stabilization of c-Fos. Edahiro Y, Araki M, Hironaka Y, Yang Y, Morishita S, Sunami Y, Ohsaka A, Komatsu N. 7th Annual Meeting of the American Society of Hematology, Orlando FL, USA. Dec 2015.
- 5) A highly specific method for detecting a single copy JAK2 V617F mutation. Morishita S, Araki M, Hironaka Y, Sunami Y, Edahiro Y, Tsutsui M, Ohsaka A, Komatsu N. 第77回日本血液学会学術集会, 石川. 2015年10月.

〔図書〕(計 5 件)

- 1) 家族性MPN. 枝廣陽子. 最新医学(最新医学社) 2017;72(11):1544-1551.
- 2) 本態性血小板血症治療の現状と今後. 枝廣陽子, 小松則夫. 血液フロンティア(医薬ジャーナル社) 2017;27(1):134-140.
- 3) 遺伝子変異情報をMPNの診療にどのように活用すべきか. 枝廣陽子. 臨床血液 2015;56(8):949-55.

- 4) Masked PV. 枝廣陽子, 小松則夫. 血液内科(科学評論社) 2015; 270(5):650-655
- 5) 新しいWHO 分類に基づくMPNの診断. 枝廣陽子, 小松則夫. Hematology Agora 2015年春号 p5-8.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

枝廣 陽子 (EDAHIRO, Yoko)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号: 40732863

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし