慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	シグナル伝達分子の異常の解析とこれを標的とする薬物の開発
Sub Title	Investigation of abnormal cytokine signaling and the development of the drugs modulating these signaling
Author	笠原, 忠(Kasahara, Tadashi) 多胡, めぐみ(Tago, Megumi)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究では、(1)メラノーマ細胞の接着、浸潤、転移に関わるFAK下流分子としてPLP2を同定し、その機能を解析した。(2)JAK2V617F変異体は恒常的に活性化ならびに腫瘍形成能を示すが、その下流分子を同定した。下流分子としてSTAT5、さらに、STAT5の標的分子としてAkt, Aurka, c-Myc, Pim-1,2, FANCC, CISを同定し、これらの役割について詳細に解析した。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2009～2011 課題番号：21590072 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21590072seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年５月２２日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21590072
研究課題名（和文）　シグナル伝達分子の異常の解析とこれを標的とする薬物の開発

研究課題名（英文）Investigation of abnormal cytokine signaling and the development of the drugs modulating these signaling

研究代表者
笠原　忠　（KASAHARA TADASHI）
慶應義塾大学・薬学部・教授
研究者番号：60049096

研究成果の概要（和文）：200 字
本研究では、（１）メラノーマ細胞の接着、浸潤、転移に関わる FAK 下流分子として PLP2 を同定し、その機能を解析した。（２）JAK2V617F 変異体は恒常的に活性化ならびに腫瘍形成能を示すが、その下流分子を同定した。下流分子として STAT5、さらに、STAT5 の標的分子として Akt，Aurka，c-Myc，Pim-1,2，FANCC，CIS を同定し、これらの役割について詳細に解析した。

研究成果の概要（英文）：
(1) We previously reported that a FAKY929F mutant in the B16F10 melanoma cell line gave poor metastasis. Here, we identified that the phospholipid protein (PLP)2 was downregulated in this cell line, acting as an effector molecule downstream of FAK. Why PLP2 induces the metastatic activity was investigated in vitro and in vivo. (2) A JAK2 mutant, JAK2V617F was constitutively active and induced abnormal proliferation, tumorigenesis in nude mice, as well as exhibited resistance to antitumor drugs including cisplatin. The reason why JAK2V617F has such potent activities was studied. We presented a notion that JAK2 mutation constitutively activated STAT5, which enhanced various transcription factors and kinases including c-Myc, Aurora kinase A or Pim-1/2, thus inducing transformation in vitro and in vivo.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総　計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：　(1)接着斑キナーゼ FAK　　(2) JAK キナーゼ　　(3) JAK2 V617F 変異体　(4) Epo シグナル（5）STAT5 の恒常的な活性化　(6)　腫瘍形成能　(7)リコカルコン A

１．研究開始当初の背景

我々はこれまで、接着斑キナーゼ(FAK)が種々のがん細胞において増殖や接着、抗アポトーシス作用があることを示す他、メラノーマ細胞の転移に関与することを明らかにしてきた。FAK 分子ではどの部位が直接がん細胞の浸潤や転移に関与しているかその役割についてはまだ解析が不十分であった。FAK の自己リン酸化部位である Y397 やパキシリンとの結合に必要な Y925 部位が抗アポトーシス作用に重要である。そこで、これらの部位の変異体を導入したメラノーマ細胞を作成し、in vitro での接着能や浸潤能ならびに、in vivo での転移能が抑制されるかどうか検討が必要と考えた。また、FAK のリン酸化が下流のどのようなシグナル分子を介して NF-κB の活性化やがん細胞の接着、転移を制御しているかの理解はまだ不十分であり、解析が必要である。

一方、チロシンキナーゼ JAK2 は IL-3 やエリスロポエチン(Epo)などのサイトカインシグナル系で中心的な役割を果たしている。我々はこれまでに、JAK2 内の多数のリン酸化部位の役割について検討を重ねてきた。とくに、JH2 ドメイン内の Y613 は構成的な活性化に関わる部位であり、また、JH1 キナーゼドメイン内の Y913 は Epo シグナル系で負に制御する部位であることなどを明らかにした。また、これまでに JAK2 V617F 変異体を BaF3 に発現させた細胞は増殖因子非依存的に増殖するのみならず、in vivo での転移、浸潤能が亢進することを明らかにしてきた。

細胞内シグナル分子群のシグナルネットワークにおける役割は複雑であり、本研究では、細胞の異常増殖、接着、転移という正常および異常な細胞の基本的な特性の解明のために、特に JAK2 分子のその下流シグナルの解析を遺伝子変異導入による改変、DNA アレー、プロテオミクス等の方法を駆使して、新たなアプローチで解析することが必要と考えた。さらに、種々のキナーゼ類に対する阻害剤がすでにがんの分子標的治療薬が開発されているが、当初期待されたような特異性は必ずしも高くはなく、JAK2 シグナル系を特異的な阻害剤の検討が必要と考えた。

２．研究の目的

（１）メラノーマ細胞の接着、浸潤、転移に関わる FAK 下流分子の同定とその役割の解析： Y925F 変異 FAK の下流分子として、Proteolipid protein 2 (PLP2)を同定しており、PLP2 過剰発現細胞はメラノーマの転移を亢進させることを見いだした。そこで、in vitro および in vivo において、PLP2 の果たす役割とその機序の解明をめざす。

（２）JAK2V617F 変異体細胞の増殖因子非依存性増殖ならびに腫瘍形成能の検討：JAK2 の V611S、V617F 変異体は JAK2 欠損胎児細胞あるいは BaF3 細胞に導入した細胞の赤血球分化誘導や腫瘍形成において重要であることを証明しているが、本プロジェクトでは、JAK2 内の多数のリン酸化部位の役割についての解析を行う。さらに、JAK2V617F 変異体細胞の in vitro での細胞増殖亢進の機序、抗アポトーシス耐性の機序、抗がん剤耐性の機序、ならびに in vivo 腫瘍形成とその機序の解析をめざす。

（３）JAK2V617F 変異体細胞の下流分子の解析：V617F 細胞の異常増殖ならびに腫瘍形成の機序については現在不明であり、その機序の解析ならびに下流のシグナル分子を同定することが急務である。JAK2 点変異体 V617F 細胞は恒常的に活性化されて、下流の標的分子を明らかにすることは、本プロジェクトの重要な目標である。

３．研究の方法

（１）マウスメラノーマ細胞株への FAK 変異体ならびに PLP2 導入細胞株の作成と転移実験：Y925F 変異体を導入したマウスメラノーマ細胞（B16F10）とコントロールベクター導入した細胞での発現遺伝子の解析から、Y925F 変異体では、PLP2 の発現が低下していることを見いだした。そこで、PLP2 過剰発現細胞株を作成するとともに、特異的な抗体を調整した。PLP2 過剰発現細胞をマウスに皮下注し、肺への転移能を解析した。さらに、PLP2 の細胞内局在や会合する分子の解析を行った。

（２）JAK2点変異体V617Fの作成と腫瘍形成能の検討：

Epo受容体のリン酸化を阻害する変異体(Y343F, Y401F, Y479F)の発現ベクターを作成しレトロウイルスを用いてBaF3細胞で過剰発現細胞株を作成した。細胞増殖や細胞周期は, BrdUならびにFACSを用いて解析するほ

か、ヌードマウスでの腫瘍形成能を測定した。さらに、JAK2 の下流分子の同定を行う目的で、DNA アレー法ならびにプロテオーム解析を行った。

４．研究成果

（１）FAK 下流分子としての PLP2 役割の解析：FAK のメラノーマ細胞の浸潤や転移における役割を明らかにするために、Y925F 変異体導入メラノーマ細胞の転移能を invivo で検討したところ、著明に低下していた。そこで、Y925F 変異体を導入細胞での DNA アレーの結果から、PLP2 の発現が低下しており、この新規分子に着目した。PLP2 過剰発現したメラノーマ細胞株を作成して、in vitro で検討したところ、その接着、運動、浸潤能の増大がみられた。また、in vivo でマウス転移能を検討した所、肺への転移が亢進することがわかった（Sonoda et al.　Oncol Report 2010）。さらに、その機序についての解析すすめた。一方、メラノーマ細胞を用いて、天然物由来化合物による in vitro におけるスクリーニングを行い、in vitro での接着、運動、浸潤能を指標に、フラボノイドならび 3,6 -スルファチドなど、転移、浸潤を抑制する新たな化合物を見いだした。

（２）JAK2 点変異体 V617F の増殖因子非依存性増殖ならびに腫瘍形成能の検討：

我々はこれまでに、JAK2 内の多数のリン酸化部位の役割について検討するとともに、JAK2 点変異 V617F 導入細胞の異常増殖機構の解析を行った。JAK2V617F 変異体は、in vivo において著明な腫瘍形成を誘導することを見いだした。そこで、V617F 下流のシグナル分子の同定ならびに腫瘍形成における役割を解析し、以下のような結果を得た。

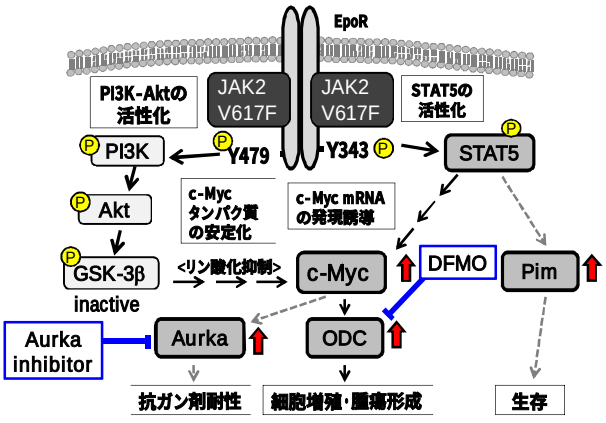
① JAK2内の多数のリン酸化部位の役割について検討した。JH1やJH2キナーゼドメイン内のチロシンリン酸化は、Epoシグナル系で負に制御する部位であることを明らかにした。Epo受容体やJAK2内のリン酸化部位の検討から、JAK2に少なくとも13カ所のTyrリン酸化を同定しており、これらの部位間のクロストークと各々の役割を解析し、その活性化や負に制御する部位の同定を行った。

② JAK2V617F 変異体は、in vitro で異常な増殖を引き起こし、ヌードマウスにおいて著明な腫瘍形成を誘導した。JAK2 変異体のシグナル伝達経路の解析を行ったところ、JAK2 V617F 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（Funakoshi-Tago et al. J Biol Chem 2010）。

③ さらに、JAK2 変異体の下流においてセリン・スレオニンキナーゼ Akt が CREB や GSK -3βのリン酸化を誘導することにより、抗アポトーシス因子である Bcl -XL や Mcl -1 の発現を上昇させ、抗アポトーシス作用を示すことを明らかにした（Kamishimoto et al. Cell Signal. 2011）。

④ JAK2 下流分子の中で、STAT5 の恒常的な活性化が重要であるが、さらに、STAT5 の標的分子として Akt, Aurora kinase, c -Myc, Pim -1,2, FANCC, CIS などの分子を同定した。とくに、c -Myc は Aurora Kinase (Aurka) の活性化をもたらすことがわかった。Aurka の活性化は、JAK2V617F 変異体のシスプラチン耐性に関与していることを明らかにした（Sumi K et al. Cell Signal, 2011）。また、STAT5 の下流分子として、Pim -1,2 の発現亢進が認められ、この分子をノックアウトすると、増殖が抑制され、アポトーシスが誘導されることから、細胞の異常増殖に関わっていることが明らかとなった。

⑤ なお、甘草由来のリコカルコン A は NF -κB 活性化抑制するが、NF -κB 阻害作用におけるリコカルコン A の構造活性相関の検討を行った(Int Immunopharmacol. 2010)。さらに、3 種類のフラボノイド化合物 Apigenin, Luteolin, Fisetin は、JAK2V617F 変異体の増殖を抑制するとともに、カラゲニン浮腫を顕著に抑制することを見出し、その作用機構として NF -kB 活性化を阻害することを明らかにした（Funakoshi-Tago M et al. Int Immunopharmacol. 2011）。



本研究の意義と重要性については、JAK2 シグナルの異常は真性赤血球増加症や慢性骨髄増殖性疾患を引き起こすことから容易に理解される。JAK2 シグナルの異常がなぜ標記疾患の原因となるか、その機構の解析は重要であり、我々は、シグナル系に関わる標的分子を明らかにした。とくに、転写因子 STAT5 や c-Myc とその下流分子を同定した。JAK2 シグナル系、JAK/STAT 経路を標的とする分子標的治療薬の開発は重要であり、今後、これらの標的分子の活性を制御する天然物由来ならびに低分子化合物などの薬剤の探索につなげて行く予定である。

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 16 件）

①Harada Y, Ishii I, Hatake K, Kasahara T. Pyrvinium pamoate inhibits proliferation of myeloma/erythroleukemia cells by suppressing mitochondrial respiratory complex I and STAT3.
Cancer Lett. 319 (1), 2012, 83-88.
j.canlet.2011.12.034

②Sumi 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. 585(12), 2011, 1884-1890.
j.febslet.2011.04.068

③ Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, MashinoT, Kasahara T. Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin.
Int Immunopharmacol. 11(9), 2011, 1150-1159.
j.intimp.2011.03.012

④ 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. 23(5), 2011, 849-856.
j.cellsig.2011.01.009

⑤ Funakoshi-Tago M, Tago K, Sato Y, Tominaga S, Kasahara T. JAK2 is an important signal transducer in IL-33-induced NF-κB activation.
Cell Signal. 23(2), 2011, 263-270.
j.cellsig.2010.10.006

⑥Funakoshi-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-kB activation.
Int Immunopharmacol. 10(5), 2010, 562-571.
j.intimp.2010.02.003,

⑦Funakoshi-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. 258(8), 2010, 5296-5307.
jbc.M109.040733

⑧Sonoda Y, Warita M, Suzuki T, Ozawa H, Fukuda Y, Funakoshi-Tago M, Kasahara T. Proteolipid protein 2 is associated with melanoma metastasis.
Oncol Report 23(2), 2010, 371-376.
or_00000645

⑨Tanifuji S, Aizu-Yokota E, Funakoshi-Tago M, Sonoda Y, Inoue H, Kasahara T. Licochalcones suppress degranulation by decreasing the intracellular Ca^{2+} level and tyrosine phosphorylation of ERK in RBL-2H3 cells.
Int Immunopharmacol. 10(7), 2010, 769-770.
j.intimp.2010.04.007

⑩Funakoshi-Tago M, Tanabe S, Tago K, Itoh H, Mashino T, Sonoda Y, Kasahara T, A potently inhibits TNFa-induced NF-kB activation through the direct inhibition of IkB kinase complex activation.
Mol Pharmacol. 76(4), 2009, 745-753.
mol.109.057448

⑪ 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. 9(7-8), 2009, 870-877. j.intimp.2009.03.011

⑫Funakoshi-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. 284(19), 2009, 12680-12690.
jbc.M808879200

⑬Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Mashino T, Tago K, Sonoda Y, Kasahara T. Glycyrrhiza inflata-derived chalcones, Licochalcone A, Licochalcone B and Licochalcone D, inhibit phosphorylation of NF-kB p65 in LPS signaling pathway. Int Immunopharmacol. 9(4), 2009, 499-507.

⑭Furusawa 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-kappaB p65 phosphorylation at serine 276. Cell Signal. 21(5), 2009, 778-785. j.cellsig.2009.01.021

〔学会発表〕（計 25 件）

①庄司貴一、鷲見和也、多胡めぐみ、笠原 忠、慢性骨髄増殖性腫瘍由来 JAK2 変異体のシグナル伝達経路における c-Myc の役割、第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2011 年 6 月 17 日、富山市、

②田中和之、長田達明、多胡めぐみ、中村成夫、増野匡彦、笠原 忠、 フラーレン誘導体を用いた慢性骨髄増殖性腫瘍の治療法の開発、第 12 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、 2011 年 6 月 17 日、富山市、

③村上はるか、上四元純、多胡めぐみ、笠原 忠、JAK2 新規リン酸化部位 Y423 の同定および機能解析、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都市、

④小澤広規、園田よし子、多胡めぐみ、笠原 忠、 FAK及びPLP2ノックダウンによるメラノーマ転移抑制について、日本薬学会第130年会、 2010年3月28日、岡山市、

⑤多胡めぐみ、阿部美雪、園田よし子、笠原 忠、真性赤血球増加症由来JAK2変異体(V617F) のシグナル伝達経路に及ぼすSTAT5の役割、日本薬学会第130年会、日本薬学会第130年会、2010年3月28日、岡山市、

⑥森脇拓郎、岡本一飛、多胡めぐみ、笠原 忠、慢性骨髄増殖性腫瘍由来 JAK2 変異体のシグナル伝達における CIS の機能解析、 第 10 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2011、2011 年 10 月 9 日、仙台市、

⑦長田達明、多胡めぐみ、園田よし子、笠原 忠、真性赤血球増加症におけるセリン・プロテアーゼインヒビター群の役割、第11回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2010年6月17日、東京、

⑧鷲見和也、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 5 日、東京、

⑨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 83 回日本生化学大会、 2010 年 12 月 4 日、 神戸市、

⑩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 83 回日本生化学大会, 2010 年 12 月 4 日、神戸市、

⑪鷲見和也、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(V617F) によるファンコニ貧血原因遺伝子群の発現誘導、第 82 回日本生化学大会、2009 年 10 月 24 日、神戸市、

⑫上四元純、 多胡めぐみ、 園田よし子、笠原忠、 真性赤血球増加症由来 JAK2 点変異（V617F）によるアポトーシス耐性機構の解析、第 82 回日本生化学大会、2009 年 10 月 24 日、神戸市、

〔図書〕（計 6 件）

①笠原 忠、臨床免疫・アレルギー科（総説、ケモカイン：エオタキシン-1/CCL11）、印刷中、科学評論社、2012、

②笠原 忠、「疾病と病態」改訂第３版、監修 豊島 聡（分担、免疫疾患と炎症）、南江堂、2012、305-326、

③笠原 忠、ヒューマニズム薬学入門、笠原忠、越前宏俊共編、培風館、2012、33-42、71-79、

④笠原 忠、多胡めぐみ、IL-33 レセプターのシグナル伝達、 臨床免疫・アレルギー科、科学評論社、2011、359-364、

⑤笠原 忠、からだの科学、日本評論社 2009、148-151、

⑥笠原 忠、多胡めぐみ、炎症・再生医学事典(松島綱治、西脇徹編)、朝倉書店、2009、52-54、

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称： なし

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：なし
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.pha.keio.ac.jp/laboratory/laboratory14.html

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・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・講師
研究者番号：30445192

(3)連携研究者
なし