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

Title	定量的リン酸化プロテオーム解析による慢性骨髄増殖性腫瘍の発症機序の解析
Sub Title	Analysis of the onset mechanism of myeloproliferative neoplasms by the quantitative phosphorylation proteome analysis
Author	多胡, めぐみ(Tago, Megumi) 杉山, 直幸(Sugiyama, Naoyuki) 上田, 史仁(Ueda, Fumihito)
Publisher	
Publication year	2016
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2015.)
JaLC DOI	
Abstract	チロシンキナーゼJAK2の点変異体(V617F)は, 慢性骨髄増殖性腫瘍の原因遺伝子である。JAK2V617F変異体は恒常的な活性化型であり, 異常な細胞増殖や腫瘍形成を誘導することが知られているが, JAK2V617F変異体が誘導する発がんシグナルの分子機構は不明である。JAK2V617F変異体が誘導する発がんシグナルを理解するには, JAK2V617F変異体の下流における全てのシグナル分子の状態変化を同時に網羅的に解析する必要がある。本研究では, 定量的リン酸化プロテオーム解析を行い, JAK2V617F変異体の下流でリン酸化される分子を同定し, それらの発がんシグナルにおける役割を解析した。 A somatic mutation (V617F) in tyrosine kinase JAK2 was found in the majority of myeloproliferative neoplasm (MPN) patients. It has been shown that the JAK2 V617F mutant was constitutively active and induced the cytokine-independent cell proliferation and tumorigenesis, suggesting that it behaves as a potent oncogene product. However, the molecular mechanism how JAK2 V617F mutant induces cellular transformation has not been elucidated. To clarify the molecular mechanism of JAK2 V617F mutant-induced transformation, it is necessary to analyze the states of all signal molecules at the downstream of JAK2 V617F mutant at the same time. Therefore, we performed quantitative phosphoproteome analysis to identify the phosphorylated proteins at downstream of JAK2 V617F mutant and analyze the roles of these molecules.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2013 ~ 2015 課題番号 : 25460073 研究分野 : シグナル伝達
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25460073seika

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、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２８ 年　 ６ 月　 ６ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2013～2015
課題番号：２５４６００７３

研究課題名（和文）定量的リン酸化プロテオーム解析による慢性骨髄増殖性腫瘍の発症機序の解析

研究課題名（英文）Analysis of the onset mechanism of myeloproliferative neoplasms by the quantitative phosphorylation proteome analysis

研究代表者
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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：チロシンキナーゼJAK2の点変異体（V617F）は、慢性骨髄増殖性腫瘍の原因遺伝子である。JAK2V617F変異体は恒常的な活性化型であり、異常な細胞増殖や腫瘍形成を誘導することが知られているが、JAK2 V617F変異体が誘導する発がんシグナルの分子機構は不明である。JAK2V617F変異体が誘導する発がんシグナルを理解するには、JAK2V617F変異体の下流における全てのシグナル分子の状態変化を同時に網羅的に解析する必要がある。本研究では、定量的リン酸化プロテオーム解析を行い、JAK2V617F変異体の下流でリン酸化される分子を同定し、それらの発がんシグナルにおける役割を解析した。

研究成果の概要（英文）：A somatic mutation (V617F) in tyrosine kinase JAK2 was found in the majority of myeloproliferative neoplasm (MPN) patients. It has been shown that the JAK2 V617F mutant was constitutively active and induced the cytokine-independent cell proliferation and tumorigenesis, suggesting that it behaves as a potent oncogene product. However, the molecular mechanism how JAK2 V617F mutant induces cellular transformation has not been elucidated. To clarify the molecular mechanism of JAK2 V617F mutant-induced transformation, it is necessary to analyze the states of all signal molecules at the downstream of JAK2 V617F mutant at the same time. Therefore, we performed quantitative phosphoproteome analysis to identify the phosphorylated proteins at downstream of JAK2 V617F mutant and analyze the roles of these molecules.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：JAK2V617F変異体　定量的リン酸化プロテオーム解析　慢性骨髄増殖性腫瘍

１．研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ JAK2 は、血球細胞の分化・増殖を誘導するサイトカインの重要なシグナル伝達分子であり、その活性制御の破綻が多くの疾患の原因となることが知られている。2005 年に、慢性骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasm; MPN) 患者において、JAK2 の点変異（V617F）が認められることが報告された。JAK2 変異体（V617F）のノックインマウスは、赤血球や血小板の異常な増加をはじめとする MPN 様の症状を呈することが報告されており、JAK2 変異体が MPN の原因遺伝子であることが明らかにされた。

また、私達は、JAK2 変異体は恒常的に活性化状態にあり、サイトカイン依存性増殖を示す Ba/F3 細胞に JAK2 変異体を導入すると、サイトカイン非依存的な増殖を示すことを見出した。さらに、JAK2 変異体を発現した細胞をヌードマウスに移植すると、顕著な腫瘍形成を誘導することを見出し、JAK2 変異体が強力な癌遺伝子産物として機能することを明らかにした。しかしながら、JAK2 の点変異が MPN 発症へと至るメカニズムは不明であり、分子レベルにおける MPN の発症機序の解明が重要な問題として残されていた。

２．研究の目的

JAK2 変異体が誘導する複雑な発がんシグナルを理解し、そのメカニズムの全貌を明らかにするためには、細胞内において JAK2 変異体の下流における全てのシグナル分子の状態変化を同時に網羅的に解析する必要がある。したがって、本研究では、1）異なる安定同位体で標識した野生型 JAK2（WT）発現細胞および JAK2 変異体（V617F）発現細胞を用いた定量的リン酸化プロテオーム解析により、JAK2 変異体の下流で、特異的にリン酸化されるタンパク質を網羅的に探索することを目的とした。このリン酸化タンパク質の中には、JAK2 変異体の発がんシグナルにおいて中核的に機能するタンパク質が含まれることが期待される。さらに、プロテオーム解析により得られた各シグナル分子の機能やシグナル伝達機構を解析することにより、JAK2 変異体のシグナル伝達機構の全貌を解明し、MPN の発症機序を理解することをめざした。

３．研究の方法

(1) 細胞株の作成

レトロウィルス感染により、マウス Ba/F3 細胞に、エリスロポエチン受容体（EpoR）と共に、野生型 JAK2 あるいは JAK2 V617F 変異体を発現させた細胞株を作製した。

(2) 定量的リン酸化プロテオーム解析

SILAC 法（Stable Isotope Labeling by Amino acids in Cell culture）により、野生型 JAK2 発現 Ba/F3 細胞と JAK2V617F 変異体発現 Ba/F3 細胞をそれぞれ異なる安定同位体（^{12}C、^{13}C）で標識されたアミノ酸を含む完全培地を用いて培養した。HAMMOC 法 (Hydroxy Acid-Modified Metal Oxide Chromatography) により回収したリン酸化ペプチドを LC-MS/MS により同定し、Mass Navigator によりペプチドのリン酸化を定量し、JAK2 変異体の下流でリン酸化されるペプチドを同定した。

(3) リン酸化分子の機能解析

リン酸化分子の発現ベクターおよび特異的な shRNA の発現ベクターを作成し、Ba/F3 細胞、JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞にレトロウイルス感染により導入した。また、各分子の非リン酸化変異体を作成し、同様に、Ba/F3 細胞、JAK2 変異体発現 Ba/F3 細胞にレトロウイルス感染により導入した。これらの細胞株の増殖能、腫瘍形成能を検討した。

４．研究成果

定量的リン酸化プロテオーム解析を行った結果、野生型 JAK2 発現細胞に比べて、JAK2 変異体発現細胞において、リン酸化が 4 倍以

上亢進したペプチドを560種類同定した。これまでに報告されているJAK2自体の523番目のセリン残基（S523）のリン酸化が、野生型JAK2に比べて、JAK2変異体では約6倍亢進していることが観察された。また、JAK2変異体発現細胞の生存に関与するキナーゼAktの244番目のセリン残基（S244）のリン酸化は、JAK2変異体の下流で約5倍亢進した（図1)。

まず、JAK2V617F変異体発現細胞で、リン

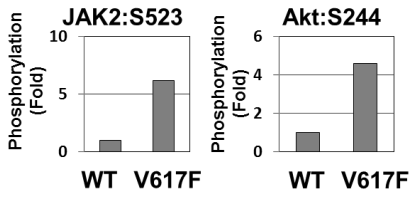

図1 定量的リン酸化プロテオーム解析
（JAK2、Aktのリン酸化）

酸化が亢進していた分子の中には、DNAの安定化に関与するファンコニ貧血症原因因子(FANC）と呼ばれる一連の因子が含まれていた。次に、FANCファミリーの発現を検討した結果、JAK2変異体は転写因子STAT5の活性化を介して、FANCCの発現を特異的に誘導することが明らかになった。FANCCの強制発現やノックダウンを行っても、JAK2変異体発現細胞の増殖能は変化しなかったことから、FANCCはJAK2変異体による細胞増殖誘導には関与しないことが示唆された。

また、JAK2変異体発現細胞では、FANCCの発現により、FANCD2のユビキチン化が誘導され、DNA修復系が活性化されることを見出した。実際、JAK2変異体発現細胞は多くの抗がん剤に対し耐性を示すことが知られているが、FANCCをノックダウンするとCDDP（シスプラチン）やMMC（マイトマイシン）などのDNA架橋剤に対して感受性が亢進することが明らかになった。一方、FANCCをノックダウンしても、JAK2変異体発現細胞のDNA切断活性を持つBLM（ブレオマイシン）や葉酸代謝拮抗剤MTX(メトトレキサート)に対する感受性は変化しなかったことから、FANCファミリーは、JAK2変異体発現細胞におけるDNA架橋剤に対する耐性に寄与することが考えられた。

さらに、JAK2変異体発現細胞では、サイトカイン抑制因子であるSOCS3の204番目および221番目のチロシン残基（Y204, Y221）がリン酸化されていることを見出した。SOCS3をJAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に強制発現すると、増殖能が顕著に抑制された。一方、RNA干渉法により、内在性SOCS3をノックダウンすると、JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞の増殖能が有意に増強された。さらに、SOCS3のリン酸化部位であるチロシン残基をフェニルアラニンに置換したY204F変異体、Y221F変異体、Y204/221F変異体を作成し、SOCS3のリン酸化の生理的意義を検討した。その結果、Y204F変異体は、SOCS3と同様に、JAK2V617F変異体発現細胞の増殖能を抑制したが、Y221F変異体およびY204/221F変異体はJAK2V617F変異体発現細胞の増殖能に影響を及ぼさなかった。したがって、Y221のリン酸化が、SOCS3の機能を制御することが明らかになった。

＜引用文献＞

① Mullally A, Lane SW, Ball B, Megerdichian C, Okabe R, Al-Shahrour F, Paktinat M, Haydu JE, Housman E, Lord AM, Wernig G, Kharas MG, Mercher T, Kutok JL, Gilliland DG, Ebert BL. Cancer Cell. 17(6),2010, 584-596

② 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. 285(8), 2010, 5296-5307.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 10 件）

① 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. 2014, 20(1):258-263. doi: 10.1016 （査読あり）

② 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. 2013, 25(11):2115-24. doi: 10.1016 （査読あり）

③ 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. 2013, 8(1): e52844. doi: 10.1371 (査読あり)

〔学会発表〕（計 26 件）

①上田史仁、多胡めぐみ、田村悦臣、慢性骨髄増殖性腫瘍由来 JAK2 V617F 変異体による形質転換における EpoR リン酸化の役割、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

② 安積尊、上田史仁、多胡憲治、柳澤健、多胡めぐみ、田村悦臣、慢性骨髄増殖性腫瘍の原因遺伝子産物 JAK2V617F 変異体が誘導する形質転換における DDX5 の役割、第 38 回　日本分子生物学会年会・第 88 回　日本生化学大会　合同大会、2015 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸）

③ 多胡めぐみ、MPN 原因遺伝子としての JAK2 キナーゼ変異と増殖制御、第 16 回 Pharmaco-Hematplogy シンポジウム、2015 年 6 月 13 日、日本薬学会生物系薬学部会、日本薬学会長井記念ホール（東京都、渋谷）

④ 上田史仁、多胡めぐみ、田村悦臣、慢性骨髄増殖性腫瘍由来 JAK2V617F 変異体による Epo 受容体のリン酸化の機能、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜）

〔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：
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

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

(2)研究分担者

（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者

杉山　直幸　（SUGIYAMA, NAOYUKI）

京都大学・薬学部・准教授
研究者番号：50545704

(4)研究協力者
上田　史仁　(Fumihito, Ueda)