

氏名	うえだ ふみひと 上田 史仁
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 4614 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	サイトカイン受容体を介した JAK2V617F 変異体による発がん誘導機構
論文審査委員	(主査) 教授 田村 悦臣 (薬学博士) (副査) 教授 三澤 日出巳 (博士(薬学)) 教授 服部 豊 (医学博士)

## 論文内容の要旨

### 【背景】

Janus kinase 2 (JAK2) は、非受容体型チロシンキナーゼであり、サイトカイン受容体と結合し、サイトカインのシグナル伝達分子として重要な役割を果たす。JAK2 は、JAK ファミリーに保存された特徴的な構造である 7 つの Janus homology (JH) ドメイン (JH1~JH7) を有する。C 末端側の JH1 は kinase domain であり、JH1 に隣接した JH2 は pseudokinase domain と呼ばれ、キナーゼ活性を持たない。JAK2 は、通常、JH1 と JH2 が会合した折りたたまれた構造をとり、不活性化状態を保っている。サイトカインがサイトカイン受容体に結合すると、JAK2 の JH1-JH2 の会合が阻害され、JH1 のアクチベーションループに存在するチロシン残基 (Y1007) が自己リン酸化を受け、活性化される。活性化された JAK2 は、サイトカイン受容体や転写因子 signal transducer and activator of transcription (STAT) をリン酸化する。種々のサイトカインにより、生体内の恒常性は厳密に制御されているため、JAK2 の活性制御の破綻は多くの疾患の原因となり得る。

2005 年に、慢性骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasm; MPN) 患者の大多数において、JAK2 の JH2 ドメインに位置する 617 番目のバリン残基がフェニルアラニンに置換した点変異 (V617F) が認められることが報告された。MPN の中でも、真性赤血球増加症 (Polycythemia vera; PV) 患者では約 95%、本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia; ET) や原発性骨髄線維症 (Primary myelofibrosis; PMF) では約 50% の患者において JAK2V617F 変異が陽性であることが明らかになった。これまでに、JAK2V617F 変異体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、JAK2V617F 変異体が MPN の原因遺伝子であることが明らかにされた。しかしながら、JAK2 の点変異 (V617F) が、MPN を引き起こす分子機構には、不明な点が多く残されている。

JAK2V617F 変異体は、単独で血球細胞に過剰発現しても活性化されないが、エリスロポエチン受容体 (EpoR) やトロンボポエチン受容体 (TpoR) などのホモダイマー型

のタイプ I サイトカイン受容体と共発現した際に、恒常的に活性化することが報告されている。これまでに私達は、IL-3 に依存して増殖するマウス血球細胞 Ba/F3 細胞に、JAK2V617F 変異体と EpoR を共発現すると、IL-3 非依存的な増殖能を示すことを報告している。さらに、この JAK2V617F 変異体と EpoR を共発現した Ba/F3 細胞をヌードマウスに移植すると顕著な腫瘍形成が誘導されることを明らかにし、EpoR の共発現下において、JAK2V617F 変異体が強力ながん遺伝子産物として機能することを示した。

EpoR の細胞内ドメインには、JAK2 によりリン酸化されることが知られている 8 個のチロシン残基 (Y343, Y401, Y429, Y431, Y443, Y460, Y464, Y479) が存在する。Epo 刺激により、リン酸化された EpoR のチロシン残基には、Src homology 2 (SH2) ドメインを有するシグナル分子が結合し、活性化されることが知られている。例えば、Epo 刺激により、転写因子 STAT5 は、EpoR のリン酸化された Y343 に結合し、JAK2 によりリン酸化され、活性化する。また、EpoR のリン酸化された Y464 には、アダプター分子 growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) が結合し、細胞増殖に重要な ERK 経路の活性化を誘導する。さらに、リン酸化された EpoR の Y479 には、PI3K p85 サブユニットが結合し、生存シグナル分子である Akt の活性化を誘導する。一方、リン酸化された EpoR には、Epo のシグナル伝達経路を負に制御する SH2 ドメイン含有分子も結合し、Epo シグナルの活性化を制御することが報告されている。サイトカインシグナル伝達経路の抑制因子である Cytokine-inducible SH2-containing protein (CIS)、suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) や SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1 (SHP1) は、リン酸化された EpoR の Y401, Y429, Y431 に結合し、JAK2 や STAT5 の活性を制御する。

TpoR の細胞内ドメインには 5 個のチロシン残基 (Y521, Y533, Y582, Y616, Y621) が存在する。これまでに、Tpo 刺激下において Y582, Y616 および Y621 がリン酸化されることが報告されている。TpoR の Y616 と Y621 のリン酸化は、Tpo 刺激による STAT3 や STAT5 の活性化を誘導する。一方、リン酸化された TpoR の Y582 には、脱リン酸化酵素 SHP1 が結合することにより、Tpo のシグナル伝達経路を抑制する。

したがって、EpoR や TpoR は、JAK2V617F 変異体の活性化に必須であるだけでなく、リン酸化されることにより、JAK2V617F 変異体が誘導する発がんシグナルにおいて重要な役割を果たすことが期待される。本研究では、JAK2V617F 変異体による発がん誘導機構における EpoR および TpoR のリン酸化の意義を検討し、各リン酸化チロシン残基の役割を解析することにより、MPN 発症メカニズムの解明をめざした (図 1)。

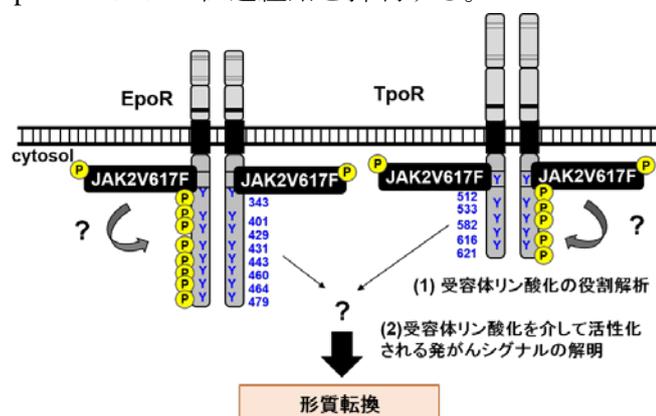


図1 研究目的の概要

## 【方法】

**プラスミド:** マウス JAK2 c-HA とマウス EpoR c-Flag あるいはマウス TpoR c-Flag をレトロウイルス発現ベクター murin stem cell virus (MSCV)-Hygro あるいは MSCV-Puro にサブクローニングした。JAK2 のアミノ酸置換 (V617F)、EpoR のアミノ酸置換 (Y343F, Y401F, Y429F, Y431F, Y443F, Y460F, Y464F, Y479F)、および TpoR のアミノ酸置換 (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F) は、Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いて行った。

**細胞株の作成:** JAK2 ノックアウトマウス由来線維芽細胞 (JAK2<sup>-/-</sup> MEF) に、野生型 JAK2 (WT) あるいは JAK2V617F 変異体と共に、EpoR、チロシン残基をフェニルアラニンに置換した EpoR-YF 変異体をレトロウイルス感染により発現させた。10%FBS, hygromycin (200 µg/mL) および puromycin (2 µg/mL) を含有する DMEM を用いて培養し、各 MEF 細胞株を作成した。マウス Ba/F3 細胞に、野生型 JAK2 (WT) あるいは JAK2V617F 変異体を発現したレトロウイルスを感染後、10%FBS, IL-3 (2 ng/mL) および hygromycin (200 µg/mL) を含有する RPMI を用いて培養した。さらに、これらの細胞に、EpoR や TpoR、あるいはこれらの非リン酸化体 (YF 変異体) を発現したレトロウイルスを感染後、10%FBS, IL-3 (2 ng/mL)、hygromycin (200 µg/mL) および puromycin (2 µg/mL) を含有する RPMI を用いて培養し、種々の細胞株を作成した。

**細胞増殖の検討:** 1% FBS 含有 RPMI を用いて、各 Ba/F3 細胞株 ( $1 \times 10^5$  cells/mL) を 24 well プレートに播種し、Epo (1 U/mL) 存在下、非存在下における 3 日間の生細胞数をトリパンブルー染色により測定した。また、1% FBS 含有 RPMI を用いて、各 Ba/F3 細胞株 ( $1 \times 10^4$  cells) を 96 well プレートに播種し、Epo (1 U/mL) あるいは Tpo (5 ng/mL) 存在下、非存在下における増殖能を WST assay によって検討した。

**腫瘍形成能の検討:** 各 Ba/F3 細胞株 ( $1 \times 10^7$  cells) をヌードマウス (4 週齢、雌) の皮下に移植した。移植後 13 日後、あるいは 21 日後に形成された腫瘍や脾臓、肝臓、リンパ節を摘出し、各臓器の重量を測定した。本実験計画は慶應義塾動物実験委員会により承認されている (承認番号 15029-0)。

**下流シグナル分子の活性化の検討:** EpoR および EpoR-YF 変異体と STAT5、Grb2、PI3K p85 の結合を免疫沈降-immunoblot 法により検討した。STAT5、STAT3、Akt、ERK のリン酸化を Immunoblot 法により検討した。また、STAT5 の標的遺伝子 (IL-2R $\alpha$ , CIS, c-Myc) の mRNA 発現を RT-PCR 法により検討した。さらに、IL-2R $\alpha$ , CIS, c-Myc mRNA 発現誘導における STAT5 の関与を ChIP assay により確認した。

## 【結果および考察】

### 1. EpoR を介した JAK2V617F 変異体による発がん誘導機構

JAK2V617F 変異体が誘導する発がんシグナルにおける EpoR のリン酸化の役割を検討するために、リン酸化される EpoR の 8 個のチロシン残基を全てフェニルアラニンに

置換した 8YF 変異体を作成し、JAK2V617F 変異体と共に、Ba/F3 細胞に発現させた。JAK2V617F 変異体は、EpoR および 8YF 変異体との共発現により、Epo 刺激の有無に関わらず恒常的に活性化した。したがって、JAK2V617F 変異体の活性化には、EpoR のリン酸化状態は関与しないことが示唆された。一方、EpoR と JAK2V617F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞は、Epo 非依存的な細胞増殖を誘導し、顕著な腫瘍形成を誘導したが、8YF 変異体の共発現は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成を顕著に抑制した。以上の結果より、JAK2V617F 変異体が誘導する形質転換に、EpoR のリン酸化が重要な役割を果たすことが明らかになった。

次に、JAK2V617F 変異体が誘導する細胞増殖や腫瘍形成に必要な EpoR のリン酸化チロシン残基を同定するために、各 1 個のチロシン残基を有する 7YF 変異体を作成し、JAK2V617F 変異体と共に、JAK2<sup>-/-</sup>MEF および Ba/F3 細胞に発現させた。JAK2V617F 変異体を発現した JAK2<sup>-/-</sup>MEF において、全ての 7YF 変異体のチロシンリン酸化が観察されたことから、EpoR の 8 個のチロシン残基はすべてリン酸化されることを確認した。しかしながら、いずれの 7YF 変異体も、JAK2V617F 変異体による Epo 非依存的な細胞増殖を誘導しなかった。したがって、JAK2V617F 変異体が誘導する発がんシグナルには、EpoR の複数のチロシン残基のリン酸化が関与することが考えられた。そこで、44 種類の EpoR-YF 変異体を作成し、それらの JAK2V617F 変異体による細胞増殖に対する影響を検討した結果、Y343, Y460, Y464 を有する 5YF-Y343/460/464 変異体が、EpoR と同程度に、JAK2V617F 変異体による細胞増殖および腫瘍形成を誘導することを見出した。6YF-Y343/460 変異体や 6YF-Y343/464 変異体は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成を部分的に誘導したのに対し、6YF-Y460/464 変異体は、細胞増殖や腫瘍形成を誘導しなかった。また、Y343, Y460, Y464 をフェニルアラニンに置換した EpoR-Y343/460/464F 変異体は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成を顕著に抑制することを確認した。これらの結果より、EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化が JAK2V617F 変異体による形質転換に必須であり、特に Y343 が重要な役割を有することが示された。続いて、JAK2V617F 変異体のシグナル伝達経路における EpoR の Y343, Y460, Y464 の役割を検討するために、STAT5、Grb2、PI3K p85 との結合を検討した。その結果、STAT5 は EpoR のリン酸化された Y343 および Y460 に結合したのに対し、Grb2 は Y460 に結合した。JAK2V617F 変異体の共発現下、PI3K p85 は EpoR と結合したが、5YF-Y343/460/464 変異とは結合しなかったことから、PI3K/Akt 経路の活性化は JAK2V617F 変異体による形質転換に必要ではないと考えられた。さらに、5YF-Y343/460/464 変異は、EpoR と同程度に、STAT5 のリン酸化や STAT5 の標的遺伝子 IL-2R $\alpha$ , CIS, c-Myc の mRNA 発現を誘導した。6YF-Y343/460 変異体や 6YF-Y343/464 変異体は、JAK2V617F 変異体による STAT5 のリン酸化や STAT5 の標的遺伝子の発現を部分的に誘導した。これまでに、私達は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成には、STAT5 の活性化が重要な役割を果たすことを報告している。以上の結果より、

JAK2V617F 変異体は EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化を介して、STAT5 の活性化を誘導することにより、形質転換能を示すことが示唆された。

## **2. TpoR を介した JAK2V617F 変異体による発がん誘導機構**

JAK2V617F 変異体は、TpoR との共発現により、恒常的に活性化し、サイトカイン非依存的な細胞増殖や腫瘍形成を誘導した。TpoR のリン酸化の役割を検討するため、TpoR の細胞内ドメインに存在する 5 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した TpoR-YF 変異体を作製した。JAK2V617F 変異体との共発現により、TpoR はチロシンリン酸化されたが、TpoR-Y616/621F 変異体はリン酸化されなかったことから、JAK2V617F 変異体発現細胞において、TpoR の Y616 と Y621 がリン酸化されることが明らかになった。また、TpoR-Y616F 変異体は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成を抑制しなかったが、STAT3 および Akt の活性化を顕著に抑制した。TpoR-Y621F 変異体は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成、STAT5、STAT3、Akt、ERK の活性化に影響を及ぼさなかった。TpoR-Y616/621F 変異体は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖や腫瘍形成を顕著に抑制し、STAT5、STAT3、Akt、ERK の活性化を阻害した。以上の結果より、JAK2V617F 変異体は、TpoR の Y616、Y621 のリン酸化を介して、STAT5、STAT3、Akt、ERK の活性化を誘導し、形質転換能を示すことが明らかになった。また、JAK2V617F 変異体による形質転換には、STAT3 や Akt よりも、STAT5 や ERK が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

現在までに、MPN の治療薬として JAK2 阻害剤 Ruxolitinib が承認され、適応されているが、MPN の根治や患者の生存率の向上をもたらすまでの治療効果は得られていない。また、Ruxolitinib は、JAK2V617F 変異体だけでなく、野生型 JAK2 も阻害することから、副作用が問題視されている。非リン化変異体である EpoR-8YF 変異体や TpoR-5YF 変異体は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖を顕著に抑制したが、Epo 刺激や Tpo 刺激による細胞増殖に関しては、部分的に抑制しただけであった。したがって、Epo 刺激や Tpo 刺激による細胞増殖に比べて、JAK2V617F 変異体による細胞増殖は、EpoR や TpoR のリン酸化の寄与が大きいことが明らかになった。本研究を通して、サイトカイン受容体は、MPN 治療薬の標的となりうる可能性を示した。今後、本研究の成果が MPN の新規治療薬開発につながることを期待される。

## 論文審査結果の要旨

Janus kinase 2 (JAK2) は、非受容体型チロシンキナーゼであり、サイトカイン受容体と結合し、サイトカインのシグナル伝達分子として重要な役割を果たす。慢性骨髄増殖性腫瘍 (myeloproliferative neoplasm; MPN) 患者の大多数において、JAK2 の JH2 ドメインに位置する 617 番目のバリン残基がフェニルアラニンに置換した点変異 (V617F) が認められたが、この点変異 (V617F) が、MPN を引き起こす分子機構には、不明な点が多く残されていた。JAK2V617F 変異体は、エリスロポエチン受容体 (EpoR) やトロポポエチン受容体 (TpoR) などと共発現すると、恒常的に活性化されることが報告されている。申請者らも、マウス血球細胞 Ba/F3 細胞に、JAK2V617F 変異体と EpoR を共発現すると、IL-3 非依存的な増殖能を示すことを報告してきた。

本博士論文において申請者は、JAK2V617F 変異体のサイトカイン非依存的な活性化 (増殖シグナル) におけるサイトカイン受容体のチロシン残基のリン酸化反応に着目し、その機能解析を目指した。そのため、EpoR の細胞質ドメインにある 8 つのチロシン残基をすべてフェニルアラニンに置き換えた変異体を作成し、1 つずつチロシンに戻すという根気のいる実験を行って、活性化に必要なチロシン残基を同定し、さらに、複数のフェニルアラニンをチロシン残基に戻す実験を行い、活性化に必要な 3 つのチロシン残基を決めた。さらに、この 3 つのチロシン残基の活性化による下流のシグナル伝達系を解析し、それぞれ異なる反応性を示すことを見出した。同様に、TpoR の 5 つのチロシンのリン酸化反応についても変異体を用いた解析を行い、2 つのチロシン残基のリン酸化の必要性とその活性化における機能を明らかにした。さらに、ヌードマウスへの移植実験により、個体レベルにおいても、結果の正しさを実証した。

以上の研究は、幅広い研究手法の熟達に加え、長時間の研究時間を必要とする。申請者の科学に対する妥協のない真摯な態度は賞賛に値する。研究成果は一流の学術誌に掲載され、申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当で、周辺知識も十分であり、博士 (薬科学) を授与するにふさわしいと判断した。

## 論文目録

### 【主論文に関する原著論文】

Ueda F, Tago K, Tamura H, Funakoshi-Tago M. Three Tyrosine residues in the Erythropoietin Receptor Are Essential for Janus Kinase 2 V617F Mutant-Induced Tumorigenesis. *J Biol Chem*. accepted for publication (Dec. 20, 2016).

### 【参考論文】

1. Tanifuji S, Funakoshi-Tago M, Ueda F, Kasahara T, Mochida S. Dynamin isoforms decode action potential firing for synaptic vesicle recycling. *J Biol Chem*. 2013 Jun 28;288(26):19050-9
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 Nov;25(11):2115-24
3. Ueda F, Iizuka K, Tago K, Narukawa Y, Kiuchi F, Kasahara T, Tamura H, Funakoshi-Tago M. Nepetaefuran and leonotinin isolated from *Leonotis nepetaefolia* R. Br. Potently inhibit the LPS signaling pathway by suppressing the transactivation of NF- $\kappa$ B. *Int Immunopharmacol*. 2015 Oct;28(2):967-76
4. Funakoshi-Tago M, Miyagawa Y, Ueda F, Mashino T, Tago K, Kasahara T, Tamura H. A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF- $\kappa$ B activation. *Int Immunopharmacol*. 2016 Nov;40(2):254-264
5. Funakoshi-Tago M, Hattori T, Ueda F, Tago K, Ohe T, Mashino T, Tamura H. A proline-type fullerene derivative inhibits adipogenesis by preventing PPAR $\gamma$  activation. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2016(5)259-260
6. Funakoshi-Tago M, Ohsawa K, Ishikawa T, Nakamura F, Ueda F, Narukawa Y, Kiuchi F, Tamura H, Tago K, Kasahara T. Inhibitory effects of flavonoids extracted from Nepalese propolis on the LPS signaling pathway. *Int Immunopharmacol*. 2016 Nov;40(2):550-560
7. Funakoshi-Tago M, Moriwaki T, Ueda F, Tamura H, Kasahara T, Tago K. Phosphorylated CIS suppresses the Epo or JAK2 V617F mutant-triggered cell proliferation through binding to EpoR. *Cell Signal*. 2016 Dec 28;31:41-57.