

博士論文 平成 28 (2016) 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

上田 史仁

目次

1. 序論-----	1
2. 材料と方法-----	5
3. 結果-----	12
4. 図-----	33
5. 考察-----	76
6. 参考文献-----	82
7. 謝辞-----	91

1. 序論

非受容体型チロシンキナーゼである Jauns kinase (JAK) ファミリーは、サイトカイン受容体と結合し、酵素活性のない受容体に代わって、シグナル分子をリン酸化することにより、細胞内シグナル伝達経路の活性化に寄与する。現在までに、JAK ファミリーとして、JAK1、JAK2、JAK3 および Tyk2 の 4 種類が知られている。JAK ファミリーには、保存された 7 つのアミノ酸の相同性が高い領域である JAK homology (JH) domain が存在する。N 末端側の JH4-JH7 は FERM (four-point-one, ezrin, radixin, moesin) domain と呼ばれ、サイトカイン受容体との結合に重要な領域である。また、C 末端側の JH1 は kinase domain であり、JH1 に隣接した JH2 は psuedokinase domain と呼ばれ、キナーゼ活性を持たない。JAK 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、JAK 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が自己リン酸化を受け、活性化される [1-5]。

サイトカイン受容体は、細胞膜貫通領域の直下に、2 つのプロリン残基を持つ box1 領域と疎水性に富む box2 領域が保存されており、これらの領域を介して JAK ファミリーと結合する。各サイトカイン受容体に結合する JAK ファミリーの種類は決まっており、その違いによって、サイトカインは多様な生理機能を発揮することが可能になる。例えば、抗ウイルス作用や腫瘍増殖抑制作用を持つ Interferon alpha (IFN α) の受容体 (IFN α R1 および IFN α R2) には、JAK1 および Tyk2 が結合し、IFN γ の受容体 (IFN γ R1 および IFN γ R2) には、JAK1 および JAK2 が結合する。また、主要な炎症性サイトカインである Interleukin-6 (IL-6) の受容体 (IL-6R) は、gp130 とヘテロダイマーを形成し、IL-6 刺激により、JAK1 および JAK2 を活性化する。Th1 サイトカインである IL-2 の受容体 (IL-2R) は、 γ 鎖とヘテロダイマーを形成し、IL-2 刺激により、JAK1 および JAK3 の活性化を誘導する。これらに対し、赤血球の分化、増殖に重要なエリスロポエチン (Erythropoietin: Epo) や血小板の分化、増殖を制御

するトロンボポエチン (Thrombopoietin: Tpo) の受容体である EpoR や TpoR は、ホモダイマーを形成し、JAK2 のみが結合する [6]。サイトカインが特異的な受容体に結合すると、JAK を起点として、転写因子 signal transducer and activator of transcription (STAT) や、phosphatidyl inositol 3 kinase (PI3K)/Akt 経路、mitogen activated protein kinase (MAPK) 経路などが活性化される。これらのシグナル伝達経路は、細胞の生存、増殖や分化に重要な役割を果たすことが知られており、JAK ファミリー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、617 番目のバリン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 [7, 8]。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。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 [9]。しかしながら、現在まで、JAK2 の点変異が、MPN の発症へと至る分子機構は不明である。また、2011 年に、米国で最初の MPN の治療薬として JAK2 阻害剤 Ruxolitinib (INC424) が承認され、適用されているが、脾腫の改善効果は認められたものの、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 [10]。また、Ruxolitinib は、JAK2V617F 変異体だけでなく、野生型 JAK2 の活性も抑制することから、副作用が問題視されている。したがって、JAK2 の点変異による MPN 発症メカニズムを分子レベルで解明し、その理解に基づいた有効な MPN 治療薬を開発することが重要な課題である。

JAK2V617F 変異体は、血球細胞に、単独で過剰発現しても活性化されないが、EpoR や TpoR、顆粒球刺激因子受容体 (GCSFR) 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 [11]。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 [12]。

EpoR は、Epo 刺激により、細胞内ドメインに存在する 8 個のチロシン残基 (Y343, Y401, Y429, Y431, Y443, Y460, Y464, Y479) が、JAK2 によりリン酸化を受けることが知られている。これまでに、EpoR のリン酸化された Y343 に、STAT5 が Src homology 2 (SH2) domain を介して結合することが明らかにされている [13, 14]。また、STAT3 は、リン酸化 Y431 を介して活性化されることが報告されている [15]。さらに、アダプター分子 growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2) や PI3K p85 サブユニットが、リン酸化された Y464、Y479 にそれぞれ結合することが知られている [16, 17]。Grb2 は Ras-Raf-mitogen-activated protein kinase (MAPK)/ extracellular-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (MEK) 経路の活性化を介して ERK1/2 の活性化を誘導し [18]、PI3K はホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP2) のリン酸化を介して、生存シグナル分子 Akt の活性化を誘導する [19, 20]。また、リン酸化された EpoR には、Epo シグナルを負に調節する分子も結合することが報告されている。サイトカインシグナル経路の negative regulator として知られる Cytokine-inducible SH2-containing protein (CIS) はリン酸化された Y401 に結合し、また suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) はリン酸化された Y401 に加えて、Y429、Y431 に結合する [21-23]。さらに、SH2 domain-containing tyrosine phosphatase 1 (SHP1) はリン酸化された Y429、Y431 に結合し、JAK2 や STAT5 の活性を制御することで Epo による細胞増殖や分化誘導を阻害する [24-26]。

一方、JAK2V617F 変異体のトランスジェニックマウスにおいて、TpoR をノックアウトすると、血小板血症、好中球増加、および脾腫が改善されるなど、MPN 様の症状が緩和され

たことから、JAK2V617F 変異体による MPN 発症において、TpoR もまた、重要な役割を果たすことが明らかにされている [27]。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) が存在し、これまでに、Tpo 刺激下において、Y582、Y616 および Y621 がリン酸化を受けることが知られている。TpoR の Y616 のリン酸化を介して、アダプター分子 Shc やホスファターゼ Shc-associated p145 inositol phosphatase (SHIP) のリン酸化が誘導される [28-31]。Y616 をフェニルアラニンに置換した TpoR-Y616F 変異体は、Tpo 刺激による STAT3 の活性化を顕著に抑制し、Y616 と共に Y621 をフェニルアラニンに置換した TpoR-Y616/621F 変異体は、Tpo 刺激による STAT3 の活性化を顕著に抑制する。したがって、STAT3 の活性化には、TpoR の Y616 と Y621 のリン酸化が重要であるが、主に TpoR の Y616 のリン酸化を介して誘導されると考えられている。一方、TpoR-Y616/621F 変異体は、Tpo 刺激による STAT5 の活性化をわずかに抑制するだけであり、TpoR の Y616 と Y621 のリン酸化は、STAT5 の活性化に部分的に寄与することが示唆される。一方、Y582 がリン酸化を受けると、サイトカイン刺激を負に制御する SHP1 がリクルートされることが報告されている [32]。

本研究では MPN 発症メカニズムの解明を目指し、まず、JAK2V617F 変異体による形質転換に重要な役割を果たす EpoR に着目した。特に、JAK2V617F 変異体による発がん誘導における EpoR のリン酸化の役割を明らかにすることを目的とした。また、TpoR のリン酸化を介した JAK27F 変異体による発がんシグナルの誘導機構について検討した。

2、方法

2-1 試薬

Recombinant murine Interleukin-3 (IL-3) は PEPROTECH INC. より、エリスロポエチン (ESPO®3000) は協和発酵キリンより購入した。抗 ERK 抗体、抗 PI3Kp85 抗体、抗リン酸化 JAK2 抗体 (Y1007/1008)、抗リン酸化 STAT5 抗体 (Y694)、抗リン酸化 Akt 抗体 (S473)、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Y705)、および抗リン酸化 ERK 抗体 (T202/Y204) は Cell Signaling Technology より購入した。抗 JAK2 抗体、抗 STAT3 抗体、抗 Grb2 抗体、抗 β -actin 抗体および抗リン酸化 STAT5 抗体 (S780) は Santa Cruz より購入した。抗 CrkL 抗体は abcam より購入した。抗リン酸化チロシン抗体 (PY20) は BD Biosciences より購入した。抗 HA 抗体 (3F10) は Roche より、抗 Flag 抗体 (M2) は SIGMA より購入した。Peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse、goat anti-rabbit、rabbit anti-goat 及び rabbit anti-rat 二次抗体は Dako-Japan より購入した。

2-2 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 をそれぞれ、murin stem cell virus (MSCV)-Hygro あるいは MSCV-Puro (Clontech) にサブクローニングした。Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE) を用いて、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) を行った。

2-3 細胞培養

Ba/F3 細胞は、10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS) (gibco)、2 mM L-グルタミン (Nacalai tesque)、100 U/mL ペニシリン (Nacalai tesque) および 100 μ g/mL ストレプトマイシン (Nacalai

tesque) を含有する Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) (Nacalai tesque) を用い、IL-3 (2 ng/mL) の存在下において、37°C 5% CO₂ に保たれたインキュベーター内で培養した。また、JAK2 ノックアウト murine embryonic fibroblasts (MEFs) および HEK293T 細胞は、10 % FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Nacalai tesque) を用いて 37°C 5% CO₂ に保たれたインキュベーター内で培養した。

2-4 レトロウイルスの調製

HEK293T 細胞 (3×10^5 cells) を 10 cm dish に播種し、各 1.3 μ g の 2 種類のヘルパーベクター (pE-Eco helper, pGP helper) および 1.4 μ g の各レトロウイルス発現ベクター を 12 μ L の Eugene 6 (Roche) を用いてトランスフェクトした。16 時間培養後、メディウムを除き、新しい培養メディウムを 3.5 mL 加えた。4~6 時間後にレトロウイルスを含む培養上清を回収し、さらに 3.5 mL の新しい培養メディウムを加えた。この操作を 2 日間繰り返した後、回収したレトロウイルスを含む培養メディウムを 0.45 μ m のフィルターでろ過し、-80°C に保存した。

2-5 レトロウイルスの感染

ノントリートメントタイプの 6 well プレート (IWAKI) あるいは 24 well プレートに、50 μ g/mL の RetroNectin[®] (TAKARA) を 2 mL あるいは 500 μ L 加え、4°C で一晩静置し、プレートをコーティングした。RetroNectin[®] を除き、2% BSA/PBS 溶液を 2 mL あるいは 500 μ L 加え、室温で 30 分間静置し、ブロッキングを行った。2% BSA/PBS 溶液を除き、PBS で洗浄後、レトロウイルス溶液を 3 mL あるいは 1 mL 加え、37°C で 5 時間インキュベートした。レトロウイルス溶液を除き、IL-3 (2 ng/mL) および 10% FBS 含有 RPMI 培地で 1×10^4 cells/mL となるように調整した Ba/F3 細胞懸濁液を 2 mL 加え、37°C で 2 日間培養した。感染した細胞を選別するために、IL-3 (2 ng/mL) に加えて、Hygromycine (200 μ g/mL) ある

いは Puromycine (2 µg/mL) を添加した 10 % FBS 含有 RPMI 培地で 3~4 日間培養し、それぞれの細胞株を樹立した。

また、JAK2 ノックアウト MEFs をウイルス感染させるために、培養メディウムを除去後、polybrene (100 ng /mL) 含有レトロウイルス溶液を 4 mL 添加し 4 時間 37°C で培養した。その後さらに polybrene 含有レトロウイルス溶液を 4 mL 加え、4 時間 37°C で培養した。培養メディウムをさらに 4 mL 加え、一晩 37°C で培養した。翌日、培養メディウムを除去し、新しいメディウム 10 mL を添加し、37°C で 2 日間培養した。感染した細胞を選別するために、Hygromycine (200 µg/mL) あるいは Puromycine (2 µg/mL) を添加した 10 % FBS 含有 DMEM 培地で 4 日間培養し、それぞれの細胞株を樹立した。

2-6 細胞生存率、増殖能の測定

マウス Ba/F3 細胞株 (1×10^5 cells/mL) を 1 % FBS 含有 RPMI 培地を用いて、24 well プレートに 1 mL ずつ播種し、サイトカイン非存在下、Epo 存在下 (1 U/mL) あるいは IL-3 (2 ng/mL) 存在下で培養した。Beckman Coulter VI-Cell (Beckman Coulter, Fullerton, CA) を用いて細胞数を測定し、細胞生存率を算出した。

また Ba/F3 細胞株 (1×10^5 cells/mL) を 1 % FBS 含有 RPMI 培地を用いて、96 well プレートに 100 µL ずつ播種し、サイトカイン非存在下、Epo 存在下 (1 U/mL) あるいは IL-3 (2 ng/mL) 存在下で培養した。24 時間、48 時間、72 時間後に WST-1 試薬 (Nacalai tesque) を 10 µL 添加し、37 °C で 2 時間インキュベートした。その後、波長 450 nm で吸光度を測定した (対照波長 : 690 nm)。

2-7 細胞周期解析

マウス Ba/F3 細胞株 (1×10^5 cells/mL) を 1% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 48 時間培養した。細胞を回収後、PBS (-) で洗浄し、-20°C の 70% エタノールで細胞を一晩固定した。翌

日、細胞を 5,000 rpm で 2 分間遠心し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の RNase および 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の propidium iodide (PI) (Sigma) 含有 PBS で再溶解した。30 分後、FACSCalibur を用いて細胞周期のパラメーターを測定し、測定値をソフトウェア "CellQuest" を用いて解析した。

2-8 RNA 抽出と RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

マウス Ba/F3 細胞株 (1×10^5 cells/mL) を 1 % FBS 含有 RPMI 培地を用いて 24 時間培養した。細胞を回収後、PBS (-) で洗浄し、Trizol (Life technologies) により、total RNA を抽出した。first-strand cDNA の合成には total RNA 1 μg 及び oligo (dT)₂₀ primer (10 pmol/ μL) を用いて、42°C で 60 分間逆転写反応を行った。cDNA をテンプレートとし、KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems) 5 μL を添加し (全量 10 μL)、PCR を行った。iCycler detection system (Bio Rad) により遺伝子発現量を解析した。各遺伝子を増幅するために用いたプライマーは以下の通りである。

GAPDH 5'-actccactcacggcaaatc-3' (upstream) and 5'-cctccacaatgccaaagt-3' (downstream); IL-2R α 5'-agaacaccaccgatttctgg-3' (upstream) and 5'-agctggccactgctacctta-3' (downstream); Pim-1 5'-cttcggctcggctactctg-3' (upstream) and 5'-ccgagctcaccttctcaac-3' (downstream); CIS 5'-cccagaggaagtgcagagg-3' (upstream) and 5'-tagtgetgcacaaggctgac-3' (downstream); c-Myc 5'-tgcgacgaggaagaattt-3' (upstream) and 5'-aaccgctccacatacagtc-3' (downstream).

2-9 免疫沈降 (Immunoprecipitation (IP)) および Immuno blot 法

JAK2 ノックアウト MEFs および Ba/F3 細胞株 (5×10^6 cells/mL) をそれぞれ、1 % FBS 含有 DMEM 培地あるいは 1 % FBS 含有 RPMI 培地を用いて 24 時間培養した。細胞を回収後、PBS (-) で洗浄し、Lysis バッファー [50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5% NP-40, 10 mM β -glycerophosphate, 2.5 mM NaF, 0.1 mM Na_3VO_4 , 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptin] を加え細胞を溶解した。細胞溶解液を 4°C、15,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上

清を用いて Bradford 法によりタンパク定量を行なった。タンパク量を一定に補正した後、免疫沈降したサンプルでは、各抗体と共に protein G sepharose (Zymed Laboratory) を添加し、4°Cで4時間 rotate した。免疫複合体を沈降後、5回洗浄し、SDS サンプルバッファーを加え、100°Cで10分間加熱した。EpoR や EpoR 複合体の免疫沈降では、5回洗浄後、3×FLAG ペプチド (200 µg/mL) (Sigma) を用いて複合体を溶出し、SDS サンプルバッファーを加え、100°Cで10分間加熱した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (polyacrylamide gel electrophoresis : PAGE) を行った後、500 mA の定電流で90分間通電し PVDF 膜に転写した。転写した PVDF 膜を 5% スキムミルク/T-PBS (0.02% Tween20 含有 PBS) あるいは 1% BSA/T-PBS を用い1時間ブロッキングを行った。抗体 (1:1000 希釈) を加えた 5% スキムミルク/T-PBS または 1% BSA/T-PBS に PVDF 膜を入れ、室温で1時間あるいは4°Cで一晩静置した。次に PVDF 膜を T-PBS で5分間洗浄し、これを3回繰り返した。2次抗体 (1:3000 希釈) を加えた 5% スキムミルク/T-PBS または 1% BSA/T-PBS に PVDF 膜を浸し、1時間振とうした。その後、PVDF 膜を T-PBS で5分間洗浄し、これを3回繰り返した。ECL 反応液 (GE Healthcare) を用いて目的のタンパク質を可視化した。

2-10 クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

マウス Ba/F3 細胞株 (5×10^6 cells/mL) を 1% FBS 含有 RPMI 培地を用いて24時間培養した。細胞を回収後、ホルムアミド (final 1%) を添加し室温で5分間インキュベートした。グリシンを加え、クロスリンク反応を停止させた後、SDS lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA (pH8.0), 1% SDS, 2 µg/mL PMSF, 2 µg/mL aprotinin, 2 µg/mL leupeptin] で細胞を溶解した。細胞溶解液を超音波処理後、4°C、15,000 rpm で15分間遠心分離し、上清を2mLに希釈した (input 画分)。input 画分の一部に抗 STAT5 抗体、抗 STAT3 抗体あるいは抗 normal rabbit IgG 抗体を 2 µg 添加し、4°Cで12時間 rotate した。さらに protein G sepharose/salmon sperm DNA slurry (millipore) を 20 µL 加え、4°Cで2時間 rotate した。免疫複合体を5回洗浄

した後、200 μ L の elution buffer [10 mM Tris-HCl(pH 8.0), 300 mM NaCl, 5mM EDTA, 0.5% SDS] を加え、65°C、4 時間加熱した。これらのサンプルに RNase A (20 μ g/mL) (Nacalai tesque)、proteinase K (50 μ g/mL) (invitrogen) を加え 37°C で 1 時間ずつインキュベートした。さらにフェノール/Chloroform:Isoamyl Alcohol (CIAA) (Nacalai tesque) を用いて各抗体に結合したゲノム DNA を精製した。精製した DNA を 150 μ L の TE buffer で溶解し、これをテンプレートとして KAPA SYBR® FAST qPCR Kit5 μ L を添加し (全量 10 μ L)、PCR を行った。iCycler detection system により遺伝子発現量を解析した。PCR に用いたプライマーは以下の通りである。

IL-2R α -1: 5'-gcatgatgatgtgacagttcttc-3' (upstream) and 5'-tcaggactggtggttggtg-3'; cis-1: 5'-caactctaggagctccccgc-3' (upstream) and 5'-aacaccttgacagattccaagaac-3' (downstream); cis-2: 5'-gtccaaagcactagacgctg-3' (upstream) and 5'-ttcccgaagcctcatctt-3' (downstream); c-myc-1: 5'-ccctcctgcctcctgaagg-3' (upstream) and 5'-caggatccctcccctccc-3' (downstream); c-myc-2: 5'-gaacaggaagctgggaaat-3' (upstream) and 5'-tgcaaggaggctttcctaa-3' (downstream); c-myc-3: 5'-caccagcctcaattcagt-3' (upstream) and 5'-gctgcatgacttctaaacgg-3' (downstream); pim-1-1: 5'-cccaggatctagcccacata-3' (upstream) and 5'-tctgtgttcccggagattt-3' (downstream); pim-1-2: 5'-ttgggttgaatcgatacgc-3' (upstream) and 5'-gcttcagccaaggacaagac-3' (downstream).

2-11 ノードマウスへの移植

in vivo における腫瘍形成能を検討するため、マウス Ba/F3 細胞株 (1×10^7 cells/mL) を 4 週齢雌の BALB/cSlc-*nu/nu* マウス (三共ラボラトリー) の皮下に移植した。移植後 13 日後、あるいは 21 日後に肝臓、脾臓、リンパ節を摘出し各臓器の重量を測定した。また、肝臓および脾臓の組織切片を作製し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色を行った。All-in-One Fluorescence Microscope (BZ-X710) (KEYENCE) で、肝臓および脾臓の組織切片を観察した。動物実験のプロトコルは慶應義塾大学動物実験委員会により承認されており (承認番号

15029-0)、また承認されたガイドラインに従って動物実験を行った。

3. 結果

3-1 JAK2V617F 変異体による Epo 非依存的な EpoR のリン酸化

EpoR の細胞内ドメインに存在する 8 個のチロシン残基 (Y343, Y401, Y429, Y431, Y443, Y460, Y464, Y479) は、JAK2 によりリン酸化されることが知られている [33-35](Fig. 1A, EpoR)。JAK2V617F 変異体によ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、まず 8 個のチロシン残基をすべてフェニルアラニンに置換した非リン酸化 EpoR-8YF 変異体を作成した (Fig. 1A, 8YF)。JAK2 ノックアウトマウス由来線維芽細胞 (JAK2^{-/-}MEF) に、レトロウイルス感染により、C 末端側に Flag タグを付加した EpoR や 8YF 変異体と共に、C 末端側に HA タグを付加した野生型 JAK2 (WT) あるいは JAK2V617F 変異体と共発現した (Fig. 1B)。

まず、JAK2 の活性化ループに存在する Y1007/1008 のリン酸化を指標として、Epo 刺激の有無による野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体の活性化を検討した。抗 HA 抗体を用いて、野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体を免疫沈降後に、抗リン酸化 JAK2 抗体 (Y1007/Y1008) を用いたイムノブロット法を行い、JAK2 のリン酸化を検出した。EpoR や 8YF 変異体と共発現させた際に、Epo 刺激によって、野生型 JAK2 (WT) のリン酸化が誘導された (Fig. 2, Lane 10, 12)。一方、Epo 刺激や EpoR の有無に関わらず、JAK2V617F 変異体の Y1007/1008 のリン酸化はわずかに誘導された (Fig. 2, Lane 13-18)。さらに、EpoR や 8YF 変異体との共発現下において、JAK2V617F 変異体のリン酸化は増強された (Fig. 2, Lane 15-18)。次に、EpoR や 8YF 変異体と野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体との結合および EpoR や 8YF 変異体のリン酸化を検討するために、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、抗 HA 抗体および抗リン酸化チロシン抗体 (pY) を用いてイムノブロット法を行った。野生型 JAK2 (WT) および JAK2V617F 変異体は、Epo 刺激に関わらず、恒常的に EpoR や 8YF 変異体と結合した (Fig. 2, Lane 9-12, 15-18)。したがって、EpoR のリン酸化状態や JAK2 の活性化状

態は、EpoR と JAK2 との結合に影響しないことが示唆された。また、野生型 JAK2 (WT) と共発現した際、Epo 刺激により、EpoR のリン酸化は誘導されたが、Epo 刺激後も、8YF 変異体はリン酸化されなかった (Fig. 2, Lane 10, 12)。JAK2V617F 変異体を共発現した場合には、Epo 刺激の有無に関わらず、EpoR のリン酸化が誘導されたが (Fig. 2, Lane 15, 16)、8YF 変異体はリン酸化を受けなかった (Fig. 2, Lane 17, 18)。これらの結果より、EpoR は、Epo 刺激により活性化した野生型 JAK2 (WT) によってリン酸化されるだけでなく、恒常的に活性化した JAK2V617F 変異体によってもリン酸化を受けることが明らかになった。さらに、EpoR のリン酸化状態は、JAK2 との会合や JAK2V617F 変異体の活性化に影響を及ぼさないことが示唆された。

3-2 JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖に及ぼす EpoR のリン酸化の役割

JAK2V617F 変異体による形質転換に及ぼす EpoR のリン酸化の役割を検討するため、レトロウイルス感染により、Ba/F3 細胞に、空ウイルス (-)、Flag タグを付加した EpoR や 8YF 変異体と共に、HA タグを付加した野生型 JAK2 (WT) あるいは JAK2V617F 変異体 (V617F) を発現させ、9 種類の細胞 (-/-, -/EpoR, -/8YF, WT/-, WT/EpoR, WT/8YF, V617F/-, V617F/EpoR, V617F/8YF) を作成した (Fig. 3A)。

まず、Ba/F3 細胞において、EpoR や 8YF 変異体と野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体との結合を検討するために、抗 Flag 抗体で免疫沈降を行い、抗 HA 抗体を用いてイムノブロット法を行った。Epo 非存在下において、野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体は、EpoR あるいは 8YF 変異体と結合した (Fig. 3B, Lane 5, 6, 8, 9)。さらに、9 種類の細胞を Epo で刺激し、野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体のリン酸化を検討した。抗 HA 抗体で免疫沈降後、抗リン酸化 JAK2 抗体 (Y1007/Y1008) を用いたイムノブロット法を行った。Ba/F3 細胞においても、EpoR や 8YF 変異体の共発現下において、野生型 JAK2 (WT) は、

Epo 刺激によってリン酸化されたが、JAK2V617F 変異体は、Epo 刺激に関わらず恒常的にリン酸化された (Fig. 3C, Lane 9-12, 15-18)。

次に、WST assay により、サイトカイン存在下あるいは非存在下における 9 種類の細胞の増殖能を検討し、Epo 刺激、IL-3 刺激および JAK2V617F 変異体による細胞増殖における EpoR のリン酸化の役割を検討した。サイトカイン非存在下では、JAK2V617F 変異体と EpoR を発現させた V617F/EpoR 細胞のみが増殖した (Fig. 4A, left graph)。一方、V617F/8YF 細胞は、細胞増殖を誘導できなかったことから、EpoR のリン酸化は、JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖に必須であることが示唆された。また、Epo 刺激により、EpoR を発現した Ba/F3 細胞 (-/EpoR, WT/EpoR, V617F/EpoR) はすべて高い増殖能を示した (Fig. 4, right graph)。これらの細胞の増殖能に比べて、8YF 変異体を発現した Ba/F3 細胞 (-/8YF, WT/8YF, V617F/8YF) では、部分的な増殖能の低下が認められた (Fig. 4A, right graph)。IL-3 存在下では、すべての細胞は同程度の増殖能を示した (Fig. 4B)。また、9 種類の細胞を Epo 存在下、非存在下で培養し、トリパンブルー染色により、生存率を測定した (Fig. 5A)。Epo 刺激により、EpoR を発現した Ba/F3 細胞 (-/EpoR, WT/EpoR, V617F/EpoR) はすべて高い生存率を示した。これらの細胞の生存率に比べて、Epo 存在下における 8YF 変異体を発現した-/8YF 細胞や WT/8YF 細胞の生存率はわずかに低下したが、V617F/8YF 細胞の生存率は、V617F/EpoR 細胞の生存率とほとんど同じであった。一方、Epo 刺激の有無に関わらず、V617F/EpoR 細胞は高い生存率を示したのに対し、Epo 非存在下において、V617F/EpoR 細胞の生存率は顕著に低下した (Fig. 5A)。さらに、フローサイトメトリーを用いて、Epo 存在下あるいは非存在下における 9 種類の細胞の細胞周期を解析した (Fig. 5B)。Epo 非存在下では、V617F/EpoR 細胞以外の細胞で、S 期の細胞の割合が減少し、アポトーシスの指標となる sub-G1 期の細胞の割合が顕著に増加した。Epo 存在下では、EpoR や 8YF 変異体を発現した Ba/F3 細胞 (-/EpoR, -/8YF, WT/EpoR, WT/8YF, V617F/EpoR, V617F/8YF) における S 期の細胞の割合は増加し、sub-G1 期の細胞の割合は減少した。以上の結果より、JAK2V617F

変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖や生存には、EpoR のリン酸化が必要であることが明らかになった。また、リン酸化を受けない 8YF 変異体も、Epo 刺激による細胞増殖や生存を誘導したことから、Epo 刺激による細胞増殖や生存には、EpoR のリン酸化は必須ではないことが示唆された。

3-3 JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖における EpoR の複数のチロシン残基のリン酸化の必要性

JAK2V617F 変異体が発現した細胞において、実際に EpoR の細胞内ドメインに存在する 8 個のチロシン残基がリン酸化を受けているかを検討した。まず、各 1 個のチロシン残基を保存し、残りの 7 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した 8 種類の EpoR-7YF 変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y401, 7YF-Y429, 7YF-Y431, 7YF-Y443, 7YF-Y460, 7YF-Y464, 7YF-Y479) を作成した。JAK2 ノックアウトマウス由来線維芽細胞 (JAK2^{-/-}MEF) に、JAK2V617F 変異体と共に、EpoR、EpoR-8YF 変異体、およびこれらの 7YF 変異体を発現させた。抗 Flag 抗体で EpoR や EpoR 変異体を免疫沈降後、抗リン酸化チロシン抗体 (pY) を用いてイムノブロットを行い、EpoR や EpoR 変異体のリン酸化を検出した。JAK2V617F 変異体を発現した JAK2^{-/-}MEF において、EpoR はチロシンリン酸化されたが、8YF 変異体はリン酸化を受けなかった (Fig. 6, Lane 2, 3)。また、すべての EpoR-7YF 変異体のチロシンリン酸化を示すバンドが検出された (Fig. 6, Lane 4-11)。よって、JAK2V617F 変異体発現細胞において、EpoR の 8 個すべてのチロシン残基がリン酸化を受けることが明らかになった。

そこで次に、JAK2V617F 変異体が誘導するサイトカイン非依存的な細胞増殖における、EpoR の各リン酸化チロシン残基役割を検討することを試みた。レトロウイルス感染により、Ba/F3 細胞あるいは JAK2V617F 変異体を発現した Ba/F3 細胞に、7YF 変異体を発現させた (Fig. 7A, 8A)。WST assay を行い、増殖能を検討した結果、Epo 刺激により、7YF-Y343、7YF-Y401、7YF-Y431、7YF-Y460、7YF-Y464、7YF-Y479 変異体を発現した細胞は、8YF 変

異体発現細胞と比較して、高い増殖能を示した (Fig. 7B)。一方、7YF-Y429 や 7YF-Y443 変異体は、8YF 変異体と同程度の増殖能であった。トリパンブルー染色により、生存率を測定した結果、すべての EpoR-7YF 変異体を発現した細胞が、8YF 変異体発現細胞より高い生存率を示した (Fig. 7C)。以上の結果より、EpoR の Y343、Y401、Y431、Y460、Y464、Y479 のリン酸化は、Epo による細胞増殖に関与するが、Y429 や Y443 のリン酸化は、Epo による細胞増殖に必要なではないと考えられた。

また、Epo 非存在下における JAK2V617F 変異体による細胞増殖に及ぼす EpoR-7YF 変異体の影響を WST assay により検討した (Fig. 8B)。しかしながら、JAK2V617F 変異体と共に、いずれの 7YF 変異体を発現しても、サイトカイン非依存的な細胞増殖を誘導しなかった (Fig. 8B)。さらに、Epo 非存在下で 2 日間培養後、これらの細胞は、V617F/8YF 細胞と同程度の低い生存率を示し、細胞死を誘導した (Fig. 8C)。以上の結果より、JAK2V617F 変異体による細胞増殖には、EpoR の 1 個のチロシン残基のリン酸化では不十分であり、複数のチロシン残基のリン酸化が必要であることが示唆された。

3-4 JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖に重要な EpoR のチロシン残基 Y343, Y460, Y464 の同定

これまでに、JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖には転写因子 STAT5 が重要であることを報告している [36]。また、Epo 刺激により、EpoR はリン酸化された Y343 を介して STAT5 と結合し、STAT5 の活性化を誘導することで、細胞増殖を誘導することが明らかにされている [13, 14]。これらの知見より、JAK2V617F 変異体による細胞増殖には、EpoR の Y343 が重要な役割を果たすと推測し、Y343 に加えて、さらに他のチロシン残基を 1 個保存し、残りの 6 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した 7 種類の EpoR-6YF 変異体 (6YF-Y343/401, 6YF-Y343/429, 6YF-Y343/431, 6YF-Y343/443, 6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y343/479) を作成した。レトロウイルス感染により、

JAK2V617F 変異体を発現した Ba/F3 細胞に、これらの 6YF 変異体を発現させた (Fig. 9A)。WST assay を行い、JAK2V617F 変異体による細胞増殖誘導における EpoR-6YF 変異体の影響を検討した (Fig. 9B)。JAK2V617F 変異体と共に、6YF-Y343/460 あるいは 6YF-Y343/464 変異体を発現した Ba/F3 細胞は、V617F/EpoR 細胞に比べて弱い、サイトカイン非依存的な細胞増殖を部分的に誘導した (Fig. 9B)。また、トリパンブルー染色により、生存率を測定した結果、V617F/8YF 細胞の生存率と比べて、6YF-Y343/460 あるいは 6YF-Y343/464 変異体を発現した JAK2V617F 変異体発現細胞の生存率は有意に高かった (Fig. 9C)。したがって、JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖には、EpoR の Y343 に加えて Y460、Y464 のリン酸化が重要である可能性が示唆された。

さらに、Y343、Y460 に加えて、他のチロシン残基を 1 個保存し、残りの 5 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した EpoR-5YF 変異体 (5YF-Y343/460/401, 5YF-Y343/460/429, 5YF-Y343/460/431, 5YF-Y343/460/443, 5YF-Y343/460/464, 5YF-Y343/460/479) を作成し、同様に JAK2V617F 変異体発現細胞に発現させた (Fig. 10A)。WST assay を行った結果、JAK2V617F 変異体と共に、5YF-Y343/460/464 変異体を発現した細胞が、V617F/EpoR 細胞と同程度のサイトカイン非依存的な細胞増殖を誘導した (Fig. 10B)。5YF-Y343/460/401、5YF-Y343/460/429、あるいは 5YF-Y343/460/443 変異体発現細胞は、6YF-Y343/460 変異体発現細胞と同程度の増殖能を示した。一方、5YF-Y343/460/431 や 5YF-Y343/460/479 変異体発現細胞は、6YF-Y343/460 変異体発現細胞に比べて、増殖能が低下した (Fig. 10B)。以上の結果より、Y343、Y460、Y464 の EpoR の 3 個のチロシン残基のリン酸化を介して、JAK2V617F 変異体はサイトカイン非依存的な細胞増殖を誘導することが示された。また、トリパンブルー染色を行い、生存率を測定すると、JAK2V617F 変異体と共に、5YF-Y343/460/464 変異体を発現した細胞の生存率は、6YF-Y343/460 変異体を発現した細胞の生存率より有意に増加し、V617F/EpoR 細胞の生存率と同程度であった (Fig. 10C)。

また、EpoR の Y343、Y460、Y464 の重要性を確かめるために、Y343、Y464 に加えて、

他のチロシン残基を 1 個保存し、残りの 5 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した EpoR-5YF 変異体 (5YF-Y343/464/401, 5YF-Y343/464/429, 5YF-Y343/464/431, 5YF-Y343/464/443, 5YF-Y343/460/464, 5YF-Y343/464/479) を作成し、JAK2V617F 変異体発現細胞に発現させた (Fig. 11A)。WST assay を行った結果、同様に、JAK2V617F 変異体と共に、5YF-Y343/460/464 変異体を発現した細胞が、V617F/EpoR 細胞と同程度の増殖能を示すことが確認された (Fig. 11B)。また、JAK2V617F 変異体と共に、6YF-Y343/464 変異体を発現した細胞に比べて、5YF-Y343/464/401 変異体を発現した細胞が、わずかに高い増殖能を示しただけであった (Fig. 11B)。IL-3 存在下では、JAK2V617F 変異体と共に、いずれの EpoR-5YF 変異体を発現した細胞の増殖能に違いは認められなかった (Fig. 11C)。

さらに、JAK2V617F 変異体による細胞増殖における EpoR の Y343、Y460、Y464 の役割の差異を検討するために、Y460 と Y464 を保存し、残りの 6 個のチロシン残基をフェニルアラニンに置換した 6YF-Y460/464 変異体を作成した。レトロウイルス感染により、EpoR-7YF 変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、EpoR-6YF 変異体 (6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/464)、5YF-Y343/460/464 を JAK2V617F 変異体発現細胞に発現させた (Fig. 12A)。WST assay により、サイトカイン非存在下、IL-3 存在下における各細胞の増殖能を検討した (Fig. 12B)。これまでの結果と一致して、JAK2V617F 変異体と共に、6YF-Y343/460 や 6YF-Y343/464 変異体を発現した細胞は、サイトカイン非存在下において、部分的な増殖能を示したが、6YF-Y460/464 変異体を発現した細胞は増殖しなかった (Fig. 12B)。一方、IL-3 存在下では、すべての細胞の増殖能に違いは認められなかった (Fig. 12C)。さらに、フローサイトメトリーを用いて、サイトカイン非存在下における各細胞の細胞周期を解析した (Fig. 12D)。JAK2V617F 変異体と共に、6YF-Y343/460 あるいは 6YF-Y343/464 変異体を発現した細胞では、V617F/8YF 細胞と比較して、sub-G1 期の細胞の割合が減少し、S 期の細胞の割合が増加した (Fig. 12D)。一方、JAK2V617F 変異体と共に、5YF-Y343/460/464 変異体を発現した細胞の細胞周期は、V617F/EpoR 細胞と同様であり、6YF-Y460/464 変異体を発現し

た細胞の細胞周期は、V617F/8YF 細胞と同様であった (Fig. 12D)。これらの結果より、JAK2V617F 変異体による細胞増殖に必要な EpoR の Y343, Y460, Y464 の 3 個のチロシン残基の中でも、Y343 のリン酸化が、JAK2V617F 変異体による細胞増殖に不可欠であると考えられた。

3-5 JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖における EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化の役割

JAK2V617F 変異体による細胞増殖における EpoR の 3 個のチロシン残基 Y343, Y460, Y464 の重要性をさらに確かめるため、これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した EpoR 変異体 (Y343F, Y460F, Y464F, Y343/460F, Y343/464F, Y460/464F, Y343/460/464F) を作成し、レトロウイルス感染により、これらの変異体を JAK2V617F 変異体発現細胞に発現させた (Fig. 13A)。WST assay により増殖能を検討した結果、JAK2V617F 変異体と共に、Y343F, Y460F、あるいは Y343/460F 変異体を発現した細胞では、V617F/EpoR 細胞と比べて、部分的に増殖能が低下した (Fig. 13B)。Y464F, Y343/464F、あるいは Y460/464F 変異体を発現した細胞では、さらに顕著な増殖能の低下が認められた (Fig. 13B)。また、V617F/8YF 細胞と同様に、Y343/460/464F 変異体を発現した細胞の増殖能は、ほぼ完全に抑制された (Fig. 13B)。トリパンブルー染色を行い、生存率を測定すると、V617F/EpoR 細胞の生存率と比較して、Y464F, Y343/460F, Y343/464F、あるいは Y460/464F 変異体を発現した細胞の生存率は、有意に低下した (Fig. 14A)。また、Y343/460/464F 変異体を発現した細胞の生存率は、V617F/8YF 細胞の生存率と同程度であった (Fig. 14A)。さらに、フローサイトメトリーを用いて、これらの細胞の細胞周期を解析した (Fig. 14B)。V617F/EpoR 細胞に比べて、Y343/464F 変異体を発現した細胞では、sub-G1 期の細胞の割合が増加した (Fig. 14B)。さらに、Y343/460/464F 変異体を発現した細胞の細胞周期は、V617F/8YF 細胞の細胞周期と同様であり、sub-G1 期の細胞の割合の顕著な増加に加えて、S 期や G2/M 期の細胞の割合の低下

が認められた (Fig. 14B)。これらの結果から、JAK2V617F 変異体による細胞増殖には EpoR の Y343、Y460、Y464 のリン酸化が必須であることが確かめられた。また、EpoR の Y343 や Y460 のリン酸化の抑制に比べて、Y464 のリン酸化の抑制は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖を最も顕著に阻害すると考えられた。

3-6 JAK2V617F 変異体による EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化を介した STAT5 の活性化

これまでに、EpoR のリン酸化された Y343 には転写因子 STAT5 が結合し、リン酸化された Y460 にはアダプター分子 CrkL が結合することが知られている [13, 14, 37]。また、リン酸化された Y464 にはアダプター分子 Grb2 が結合し、リン酸化された Y479 には PI3Kp85 がリクルートされ、Akt の活性化を誘導することが報告されている [16, 17]。JAK2V617F 変異体による細胞増殖に必要な EpoR の Y343, Y460, Y464 の役割を検討するために、JAK2V617F 変異体と共に、EpoR、8YF 変異体、7YF 変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464) および 5YF-Y343/460/464 変異体を発現した Ba/F3 細胞を用いて、免疫沈降-イムノブロット法により、EpoR や EpoR 変異体と、JAK2V617F 変異体、STAT5、Grb2、CrkL、PI3K p85 との結合を検討した。JAK2V617F 変異体は、EpoR やすべての EpoR 変異体と結合した (Fig. 15, IB: HA)。EpoR は、STAT5、Grb2、PI3Kp85 と結合したが、8YF 変異体はこれらの分子と結合しなかった (Fig. 15, Lane 2, 3)。一方、CrkL は、JAK2V617F 変異体発現細胞において発現が確認されたが、EpoR と結合しなかった (data not shown)。興味深いことに、STAT5 は、EpoR とだけでなく、7YF-Y343 や 7YF-Y460、5YF-Y343/460/464 とともに結合したことから、JAK2V617F 変異体発現細胞において、STAT5 は EpoR のリン酸化された Y343 や Y460 に、STAT5 は結合すると考えられた (Fig. 15, Lane 2, 4, 5, 7)。また、7YF-Y460 および 5YF-Y343/460/464 変異体が、Grb2 と結合したことから、リン酸化された Y460 のリン酸化を介して Grb2 が EpoR にリクルートされることが示唆された (Fig. 15, Lane 2, 5, 7)。さらに、こ

これらの EpoR 変異体はすべて、PI3Kp85 と結合しなかったことから、PI3K/Akt 経路は JAK2V617F 変異体による細胞増殖誘導には必要でないと考えられた (Fig. 15, Lane 2-7)。

次に、JAK2V617F 変異体と共に、EpoR、8YF 変異体、7YF 変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、6YF 変異体 (6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/Y464) および 5YF-Y343/460/464 変異体を発現した Ba/F3 細胞を用いて、JAK2V617F 変異体による STAT5 および ERK の活性化に及ぼす Y343、Y460、Y464 のリン酸化の影響をイムノブロット法により検討した。EpoR との共発現下において観察された JAK2V617F 変異体による STAT5 の Y694 のリン酸化は、8YF 変異体との共発現下ではほぼ完全に抑制された (Fig. 16, Lane 2, 3)。7YF-Y343、7YF-Y460、7YF-Y464 変異体は、8YF 変異体よりもわずかに強く STAT5 の Y694 のリン酸化を誘導した (Fig. 16, Lane 3-6)。6YF-Y343/460 や 6YF-Y343/464 変異体は、各 7YF 変異体に比べてより強く、STAT5 の Y694 のリン酸化を誘導したが、6YF-Y460/464 変異体は STAT5 のチロシンリン酸化を誘導できなかった (Fig. 16, Lane 7-9)。一方、5YF-Y343/460/464 変異体は、EpoR と同程度に、STAT5 の Y694 のリン酸化を誘導した (Fig. 16, Lane 10)。これまでに、Pircher らにより、ERK が直接 STAT5a と相互作用し、STAT5a の trans-activation domain に存在する S780 をリン酸化することが報告されている [38]。しかしながら、JAK2V617F 変異体発現細胞において、STAT5a の S780 はリン酸化されており、EpoR や EpoR 変異体の共発現によってリン酸化レベルは変化しなかった (Fig. 16, IB: p-STAT5 (S780))。また、JAK2V617F 変異体と EpoR を共発現すると、ERK1/2 のリン酸化が誘導されたが、8YF 変異体、7YF-Y343、7YF-Y460、7YF-Y464、6YF-Y343/460 変異体を共発現させても、ERK1/2 はリン酸化されなかった (Fig. 16, Lane 2-7)。一方で、6YF-Y343/464、6YF-Y460/464 や 5YF-Y343/460/464 変異体を JAK2V617F 変異体と共発現すると、ERK1/2 のリン酸化が誘導された (Fig. 16, Lane 8-10)。したがって、JAK2V617F 変異体発現細胞において、EpoR の Y464 のリン酸化だけでは ERK の活性化に不十分であるが、Y464 に加えて Y343 や Y460 がリン酸化されると、ERK の活性化が誘導されると考えられた。以上の結果より、

JAK2V617F 変異体の下流では、EpoR の Y343、Y460、Y464 のリン酸化を介して、STAT5 の Y694 のリン酸化が誘導されることが明らかになった。

次に、これらの細胞における STAT5 の標的遺伝子として知られる IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1 の mRNA 発現を RT-PCR により解析した (Fig. 17)。V617F/EpoR 細胞では、IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1 の mRNA 発現が誘導された。JAK2V617F 変異体と 5YF-Y343/460/464 変異体を共発現した細胞では、V617F/EpoR 細胞と同程度に、IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1 の mRNA 発現が誘導された。JAK2V617F 変異体発現細胞において、6YF-Y343/460 や 6YF-Y343/464 変異体を発現すると、IL-2R α mRNA の発現がわずかに誘導され、CIS mRNA の発現は顕著に誘導された。一方、他の EpoR 変異体は、IL-2R α および CIS の mRNA 発現を誘導しなかった。それに対して、c-Myc mRNA の発現は、JAK2V617F 変異体と共に、7YF-Y460 あるいは 7YF-Y464 変異体を発現すると、わずかに誘導され、6YF-Y343/460 や 6YF-Y343/464 変異体の発現により、より強く誘導された。Pim-1 mRNA 発現は、7YF-Y343 や 6YF-Y343/460 変異体の発現によりわずかに誘導され、6YF-Y343/464 変異体の発現により顕著に誘導された。以上の結果より、JAK2V617F 変異体による IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1 の mRNA 発現誘導には、EpoR の Y343、Y460、Y464 の 3 個のチロシン残基のリン酸化が必要であるが、個々のリン酸化チロシン残基の役割は、遺伝子の種類により異なることが示唆された。

種々のがん細胞において、STAT5 だけでなく STAT3 も高頻度に活性化されていることが報告されている [39-41]。また、STAT3 と STAT5 はどちらも、STAT 結合サイト (TTCNNGAA) と結合し、遺伝子発現を誘導する。そこで、JAK2V617F 変異体の下流で発現が誘導された IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1 の遺伝子発現における STAT3 および STAT5 の関与を検討するために、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った。V617F/-細胞および V617F/EpoR 細胞由来のゲノム DNA (gDNA) を抗 STAT3 抗体、あるいは抗 STAT5 抗体を用いて免疫沈降を行った。Fig. 18 に示す IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1 のプロモーター領域やエンハンサー領域に存在する STAT 結合サイトを含む DNA 断片を特異的に増幅するプライ

マーを設計し、リアルタイム PCR を行った (Fig. 19)。V617F/EpoR 細胞において、IL-2R α や CIS のプロモーター領域における STAT 結合部位に、STAT3 ではなく、STAT5 が結合した (IL-2R α -1, CIS-1, CIS-2)。c-Myc 遺伝子は、プロモーター領域だけでなく、下流のエンハンサー領域にも 2 箇所の STAT 結合サイトが存在する。c-Myc のエンハンサー領域に、STAT3 ではなく、STAT5 が結合した (c-Myc-2, c-Myc-3)。Kiuchi らは、STAT3 が c-Myc のプロモーター領域内の STAT 結合サイトに結合することを報告しているが [42]、V617F/EpoR 細胞では、c-Myc のプロモーター領域には、STAT3 および STAT5 は結合しなかった (c-Myc-1)。一方、Pim-1 のプロモーター領域内の 2 箇所の STAT 結合サイトにおける、STAT3 および STAT5 の結合は観察されなかった (Pim-1-1, Pim-1-2)。さらに、抗リン酸化 STAT5 抗体 (Y694) を用いて免疫沈降後、ChIP アッセイを行い、IL-2R α や CIS のプロモーター領域や c-Myc のエンハンサー領域に、リン酸化された STAT5 が結合することを明らかにした (Fig. 20)。また、V617F/EpoR 細胞では、STAT3 はリン酸化されていないことを確認している (data not shown)。以上より、JAK2V617F 変異体は、EpoR との共発現下において、STAT5 の活性化を誘導することにより、IL-2R α 、CIS および c-Myc の mRNA 発現を誘導することが明らかになった。

3-7 JAK2V617F 変異体による STAT5 の活性化における EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化の役割

続いて、JAK2V617F 変異体による STAT5 や ERK1/2 のリン酸化に対する EpoR の Y343、Y460、Y464 の重要性を確かめるために、JAK2V617F 変異体発現細胞において、これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した EpoR 変異体 (Y343F, Y460F, Y464F, Y343/460F, Y343/464F, Y460/464F, Y343/460/464F) の影響を検討した。Y343/460/464F 変異体は、8YF と同様に、STAT5 のチロシンリン酸化 (Y694) を誘導しなかった (Fig. 21, Lane 3, 10)。JAK2V617F 変異体と共に、Y343F、Y460F、Y464F、および Y460/464F 変異体を共発現した細胞では、V617F/EpoR 細胞と同程度の STAT5 の Y694 のリン酸化が誘導された。一方、

Y343/460F や Y343/464F 変異体を共発現した細胞では、STAT5 の Y694 のリン酸化がわずかに抑制された (Fig. 21, Lane 4-9)。また、STAT5a の S780 のリン酸化は、JAK2V617F 変異体発現細胞で認められ、EpoR 変異体の共発現によって、そのリン酸化レベルは変化しなかった (Fig. 21, IB: p-STAT5 (S780))。さらに、ここで用いた Y343F, Y460F, Y464F, Y343/460F, Y343/464F, Y460/464F, Y343/460/464F のいずれの EpoR 変異体も、8YF 変異体と同様に、JAK2V617F 変異体による ERK1/2 のリン酸化を誘導しなかった (Fig. 21, Lane 3-10)。

次に、これらの細胞における STAT5 標的遺伝子 (IL-2R α 、CIS、c-Myc、Pim-1) の mRNA 発現を RT-PCR により検討した (Fig. 22)。V617F/EpoR 細胞における IL-2R α mRNA の発現量に比べて、JAK2V617F 変異体と共に、Y343F および Y460/464F 変異体を発現した細胞では、IL-2R α mRNA の発現量はわずかに低下したが、Y460F、Y464F、Y343/460F や Y343/464F、Y343/Y460/Y464 変異体を共発現した細胞では、IL-2R α mRNA の発現量は顕著に低下した。V617F/EpoR 細胞における CIS mRNA の発現量に比べて、Y343F、Y343/460F、Y343/464F、Y460/464F、Y343/460/464F 変異体を共発現した細胞では、CIS mRNA の発現量が顕著に低下した。したがって、CIS mRNA の発現誘導には Y343 のリン酸化が最も重要であると考えられた。また、ここで用いたいずれの EpoR 変異体も、8YF 変異体と同様に、JAK2V617F 変異体による c-Myc mRNA の発現を誘導しなかった。Fig. 21 で示した STAT5 の Y694 のリン酸化誘導能と同様に、JAK2V617F 変異体と共に、Y343F、Y460F、Y464F、および Y460/464F 変異体を共発現した細胞では、Pim-1 mRNA の発現量が高く、Y343/460F や Y343/464F、Y343/460/464F 変異体を共発現した細胞では、Pim-1 mRNA の発現はほとんど誘導されなかった。以上の結果より、各 STAT5 標的遺伝子の発現に対する Y343、Y460、Y464 の役割は異なったが、JAK2V617F 変異体による STAT5 の full activation には、これら 3 個のチロシン残基のリン酸化が必要であると考えられた。

3-8 JAK2V617F 変異体による EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化を介した腫瘍形成

JAK2V617F 変異体による腫瘍形成能に及ぼす EpoR の Y343、Y460、Y464 の役割を明らかにするため、JAK2V617F 変異体と EpoR や各 EpoR 変異体 (8YF, 7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464, 6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/Y464, 5YF-Y343/460/464) を発現させた Ba/F3 細胞をヌードマウスに移植した。JAK2V617F 変異体を単独で発現させた (-) 細胞を移植したヌードマウスでは変化が認められなかったが、JAK2V617F 変異体と共に、EpoR や 5YF-Y343/460/464 変異体を発現させた Ba/F3 細胞を移植したマウスでは顕著な腫瘍形成が観察された (Fig. 23A, B)。一方、8YF 変異体や、7YF-Y464、6YF-Y460/464 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、小さな腫瘍が形成された。それに比べて、7YF-Y343 や 7YF-Y460 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、わずかに大きな腫瘍が形成された。さらに、6YF-Y343/460 や 6YF-Y343/464 を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、EpoR を共発現した細胞を移植したマウスで形成された腫瘍よりは小さいが、より大きな腫瘍が形成された (Fig. 23A, B)。各 EpoR 変異体が示した腫瘍形成能は、JAK2V617F 変異体発現細胞の増殖に及ぼす影響と一致していた。さらに、細胞移植後 13 日のヌードマウスから、脾臓、肝臓、リンパ節を摘出し、各臓器の重量を測定した (Fig. 24A, B)。JAK2V617F 変異体と EpoR や 5YF-Y343/460/464 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、脾臓、肝臓、リンパ節が顕著に肥大化していた。また、6YF-Y343/460 や 6YF-Y343/464 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、脾臓やリンパ節がわずかに肥大化していた (Fig. 24A, B)。

さらに、JAK2V617F 変異体による腫瘍形成能に及ぼす EpoR の Y343、Y460、Y464 の重要性を確認するため、EpoR 変異体 (Y343F, Y460F, Y464F, Y343/460F, Y343/464F, Y460/464F, Y343/460/464F) を共発現した Ba/F3 細胞をヌードマウスに移植した。EpoR と同様に、Y343F, Y460F, Y464F, Y343/460F, Y343/464F、および Y460/464F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、顕著な腫瘍形成が観察されたが、Y343/460/464F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスで形成された腫瘍の重量は有意に低下した (Fig. 25A, B)。ま

た、Y343/460/464F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、8YF 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスと同様に、脾臓、肝臓、リンパ節の肥大化は観察されなかった (Fig. 26A, B)。Y464F や Y460/464F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスでは、脾臓、肝臓、リンパ節の肥大化が観察された (Fig. 26A, B)。これらの結果より、EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化が、JAK2V617F 変異体による腫瘍形成能に重要な役割を果たすことが明らかになった。

3-9 JAK2V617F 変異体による TpoR を介した形質転換

JAK2V617F 変異体は、EpoR との共発現だけでなく、他の I 型サイトカイン受容体である TpoR と共発現させた場合にも、恒常的に活性化することが知られている [11]。しかしながら、JAK2V617F 変異体による TpoR を介した発がんシグナルの分子機構はほとんど解析されていない。そこで、次に、JAK2V617F 変異体が誘導するサイトカイン非依存的な細胞増殖や腫瘍形成における TpoR の役割を検討し、JAK2V617F 変異体の TpoR を介したシグナル伝達機構の解明をめざした。

まず、Ba/F3 細胞、野生型 JAK2 (WT) 発現細胞、あるいは JAK2V617F 変異体発現細胞に、空ウイルス (-)、あるいは TpoR c-Flag を発現したレトロウイルスを感染させた細胞 (-/-, WT/-, V617F/-, -/TpoR, WT/TpoR, V617F/TpoR) を作成した (Fig. 28A)。これらの細胞を用いて、Tpo 刺激による野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体の活性化、および TpoR との結合を調べた。まず抗 HA 抗体で、野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体を免疫沈降し、JAK2 の活性化の指標である Y1007/1008 のリン酸化をイムノブロット法により検討した。TpoR と共発現した際には、Tpo 刺激によって、野生型 JAK2 (WT) のリン酸化が誘導された (Fig. 28B, Lane 8)。一方、JAK2V617F 変異体は、Tpo 刺激の有無に関わらず、恒常的にリン酸化された (Fig. 28B, Lane 11, 12)。また、抗 Flag 抗体で、TpoR を免疫沈降し、抗 HA 抗体を用いたイムノブロット法を行い、TpoR と野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体との結

合を検討した。その結果、Tpo 刺激の有無に関わらず、野生型 JAK2 (WT) や JAK2V617F 変異体は、恒常的に TpoR と結合した (Fig. 28B, Lane 7, 8, 11, 12)。

次に、WST assay により、これらの細胞の増殖能を解析した (Fig. 29A)。Tpo 非存在下において、JAK2V617F 変異体と TpoR を共発現させた V617F/TpoR 細胞のみが、顕著な増殖能を示した (Fig. 29A, left graph)。また、Tpo 存在下では、TpoR を発現した-/TpoR 細胞や WT/TpoR 細胞は、3 日目まで増殖したが、5 日目では増殖能が低下した。この現象は、おそらく、5 日間の培養の間に、Tpo が枯渇してしまったためだと考えられた。それに対し、V617F/TpoR 細胞は、Tpo 刺激後 5 日目においても顕著な増殖能を示した (Fig. 29A, right graph)。また、各細胞を Tpo 存在下、あるいは非存在下において 2 日間培養し、フローサイトメトリーを用いて細胞周期を解析した (Fig. 29B)。Tpo 非存在下において、V617F/TpoR 以外の細胞では、アポトーシスの指標となる sub-G1 期の細胞の割合が顕著に増加した (Fig. 29B)。一方、Tpo 存在下では、TpoR 発現細胞 (-/TpoR、WT/TpoR、V617F/TpoR) における sub-G1 期の細胞の割合は減少した (Fig. 29B)。以上のことから、JAK2V617F 変異体を TpoR と共発現した Ba/F3 細胞は、Tpo 非存在下においても、顕著な増殖能を示すことが明らかになった。

さらに、Tpo 刺激により活性化されることが知られている STAT5、STAT3、Akt、ERK1/2 のリン酸化をイムノブロット法により検討した (Fig. 30)。-/TpoR 細胞や WT/TpoR 細胞では、Tpo 刺激によって、STAT5、STAT3、Akt、ERK1/2 のリン酸化が誘導された (Fig. 30)。V617F/TpoR 細胞では、Tpo 刺激に関わらず、恒常的に STAT5、STAT3、Akt、ERK1/2 がリン酸化された (Fig. 30)。以上の結果より、JAK2V617F 変異体を TpoR と共発現した Ba/F3 細胞では、恒常的な STAT5、STAT3、Akt、ERK の活性化が誘導されることが確認された。

さらに、空ウイルスを感染させたコントロール細胞 (-/-)、-/TpoR 細胞、WT/TpoR 細胞、および V617F/TpoR 細胞をヌードマウスの皮下に移植し、これらの細胞の腫瘍形成能を検討した (Fig. 31 A, B)。コントロール細胞 (-/-) や -/TpoR 細胞を移植したヌードマウスでは、

腫瘍は形成されなかったが、WT/TpoR 細胞を移植したヌードマウスでは、小さな腫瘍が形成された。V617F/TpoR 細胞を移植したヌードマウスでは、顕著な腫瘍形成が観察された (Fig. 31A, B)。さらに、移植後 21 日後のマウスから脾臓、肝臓、リンパ節を摘出し、各臓器の重量を測定した (Fig. 32A, B)。V617F/TpoR 細胞を移植したマウスでは、脾臓、肝臓、リンパ節が顕著に肥大化した。また、肝臓および脾臓の組織切片を作成し、Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色により、組織構造を観察した (Fig. 33A, B)。V617F/TpoR 細胞を移植したマウスでは、肝細胞の構造が変化し、青色に核が染色されたがん細胞と思われる細胞が門脈に多く浸潤していた (Fig. 33A)。また、コントロール細胞 (-/-) や -/TpoR 細胞、あるいは WT/TpoR 細胞を移植したマウスの脾臓では、リンパ球の産生に関わる白脾髄が放射状に形成され、その周辺を、赤血球からなる赤脾髄が囲んだ特徴的な構造が観察された (Fig. 33B)。一方、V617F/TpoR 細胞を移植したマウスの脾臓では、白脾髄および赤脾髄の区別が不明瞭になっており、脾臓の組織構造が破綻していた (Fig. 33B)。これらの結果より、TpoR の共発現下において、JAK2V617F 変異体のがん原遺伝子産物として機能することが明らかになった。

3-10 JAK2V617F 変異体による細胞増殖における TpoR の Y616, Y621 のリン酸化の役割

TpoR は細胞内ドメインに 5 個のチロシン残基 (Y512, Y533, Y582, Y616, Y621) が存在する (Fig. 34A)。JAK2V617F 変異体による発がん誘導における TpoR のリン酸化の役割を検討するために、それぞれ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 (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F) を作成し、JAK2V617F 変異体発現細胞に発現させた (Fig. 34B)。まず、抗 Flag 抗体で免疫沈降後、抗リン酸化チロシン (pY) 抗体でイムノブロット法を行い、JAK2V617F 変異体発現細胞における TpoR および TpoR-YF 変異体のリン酸化を検討した。その結果、Tpo 非存在下において、JAK2V617F 変異体発現細胞では、TpoR がリン酸化された。また、Y512F、Y533F、Y582F、Y616F、および Y621F 変異

体は、リン酸化されたが、Y616/621F 変異体はリン酸化されなかった (Fig. 34B)。したがって、JAK2V617F 変異体発現細胞において、TpoR の Y616 と Y621 が恒常的にリン酸化されることが明らかになった。

さらに、サイトカイン非存在下におけるこれらの細胞の増殖能を検討した (Fig. 35A)。JAK2V617F 変異体と共に、Y512F、Y533F、Y582F、Y616F、あるいは Y621F 変異体を発現した細胞は、TpoR を共発現した細胞と同程度の細胞増殖能を示した (Fig. 35A)。一方、JAK2V617F 変異体と共に、Y616/Y621F 変異体を発現した細胞は増殖しなかった (Fig. 35A)。次に、フローサイトメトリーを用いて、細胞周期を解析した結果、サイトカイン非存在下、JAK2V617F 変異体を単独で発現した細胞では、S 期の細胞の割合が低く、sub-G1 期の細胞の割合が高かったことから、アポトーシスが誘導されたと考えられた (Fig. 35B)。JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y512F、Y533F、Y582F、Y616、あるいは Y621F 変異体を発現した細胞では、S 期の細胞の割合が高く、sub-G1 期の細胞の割合は低かった (Fig. 35B)。それに対して、JAK2V617F 変異体と共に、Y616/Y621F 変異体を発現した細胞では、S 期の細胞の割合が低く、sub-G1 期の細胞の割合が高かったことから、アポトーシスが誘導されたと考えられた (Fig. 35B)。以上の結果より、JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖や生存には、TpoR の Y616 および Y621 の両方のチロシン残基のリン酸化が必要であることが明らかになった。

また、JAK2V617F 変異体による STAT5、STAT3、Akt、ERK1/2 のリン酸化に対する TpoR-YF 変異体の影響をイムノプロット法により検討した (Fig. 36)。JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y512F、Y533F、Y582F、あるいは Y621F 変異体を発現した細胞では、STAT3 および Akt のリン酸化が誘導されたが、Y616F 変異体および Y616/Y621F 変異体を共発現した細胞では、STAT3 および Akt はリン酸化されなかった (Fig. 36)。さらに、JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y512F、Y533F、Y582F、あるいは Y621F 変異体を発現した細胞では、STAT5 および ERK1/2 がリン酸化されたが、Y616/Y621F 変異体を共発現した細胞では、STAT5 お

よび ERK1/2 はリン酸化されなかった (Fig. 36)。これらの結果より、JAK2V617F 変異体は、TpoR の Y616 のリン酸化を介して、STAT3 や Akt を活性化するが、JAK2V617F 変異体による STAT5 や ERK の活性化には、TpoR の Y616 と Y621 の両方のチロシン残基のリン酸化が必要であることが明らかになった。

3-11 JAK2V617F 変異体による腫瘍形成における TpoR の Y616, Y621 のリン酸化の役割

次に、ヌードマウスにおける JAK2V617F 変異体による腫瘍形成に及ぼす TpoR の細胞内ドメインに存在するチロシン残基の役割を検討した (Fig. 37A, B)。JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y512F、Y533F、Y582F、あるいは Y621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したヌードマウスでは、顕著に腫瘍が形成された (Fig. 37A, B)。一方、JAK2V617F 変異体と共に、Y616/Y621F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したヌードマウスでは、腫瘍形成が有意に抑制された (Fig. 37A, B)。さらに、移植後 21 日後のマウスから脾臓、肝臓、リンパ節を摘出し、各臓器の重量を測定した (Fig. 38A, B)。JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y512F、Y533F、Y582F、あるいは Y621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したヌードマウスでは、脾臓、肝臓、およびリンパ節の肥大化が見られた (Fig. 38A, B)。それに対して、JAK2V617F 変異体と共に、Y616/Y621F 変異体を共発現した Ba/F3 細胞を移植したヌードマウスの脾臓、肝臓、およびリンパ節の肥大化は、有意に抑制された (Fig. 38A, B)。また、JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y616F、Y621F、あるいは Y616/621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したヌードマウスの脾臓および肝臓の組織切片を作成し、Hematoxylin & Eosin (H & E) 染色を行った (Fig. 39A, B)。JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、Y616F、あるいは Y621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスの肝臓では、核が青色に染色されたがん細胞と思われる細胞が門脈に多く観察されたが、Y616/621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスの肝臓では、これらのがん細胞の浸潤が認められなかった (Fig. 39A)。また、JAK2V617F 変異体と共に、TpoR、あるいは Y616F 変異体を発現した Ba/F3 細

胞を移植したマウスの脾臓では、白脾髄および赤脾髄から構成される特徴的な脾臓の構造が破綻していた (Fig. 39B)。それに対し、JAK2V617F 変異体と共に、Y621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスの脾臓では、白脾髄および赤脾髄が確認でき、Y616/621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞を移植したマウスの脾臓の構造は正常に近く、JAK2V617F 変異体による脾臓の構造破綻はほとんど認められなかった (Fig. 39B)。これらの結果より、JAK2V617F 変異体による腫瘍形成にも、TpoR の Y616 および Y621 のリン酸化が重要であることが示された。

3-12 Tpo 刺激による細胞増殖、STAT5、STAT3、Akt、ERK の活性化における TpoR の各チロシン残基の役割

最後に、Tpo 刺激による細胞増殖における TpoR の細胞内ドメインに位置する 5 個のチロシン残基の影響を検討するために、Ba/F3 細胞に、TpoR、TpoR-YF 変異体 (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F) あるいは 5 個全てのチロシン残基をフェニルアラニンに置換した TpoR-5YF 変異体を発現させた (Fig. 40A)。Tpo 非存在下では、いずれの細胞も増殖しなかった (Fig. 40B, C, left graph)。Tpo 存在下で培養した際、3 日目まで、TpoR、Y512F、Y533F、あるいは Y621F 変異体を発現した細胞は、同程度の増殖能を示した (Fig. 40B, right graph)。一方、Y582F 変異体を発現した細胞は、より高い増殖能を示した。それに対し、Y616F 変異体、あるいは Y616/621F 変異体を発現した細胞の増殖能は、部分的に抑制された (Fig. 40B, right graph)。したがって、Tpo 刺激による細胞増殖には、TpoR の Y616 と Y621 のリン酸化が部分的に寄与し、TpoR の Y582 のリン酸化は、Tpo 刺激による細胞増殖に対し、抑制的に機能することが示唆された。さらに、Tpo 存在下では、TpoR 発現細胞に比べて弱いが、TpoR-5YF 変異体発現細胞も増殖した (Fig. 40C, right graph)。

フローサイトメトリーを用いて、細胞周期を解析した結果、TpoR、Y512F、Y533F、Y582F、Y616F、Y621F、Y616/621F および TpoR-5YF 変異体を発現したすべての細胞において、Tpo

刺激により、sub-G1 期の細胞の割合は顕著に減少し、S 期の細胞の割合は増加した (Fig. 41A, B)。以上の結果より、TpoR の Y616 と Y621 のリン酸化は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖には必須であるが、Tpo 刺激は TpoR のリン酸化を介さずに細胞増殖および生存を誘導すると考えられた。

また、各細胞における Tpo 刺激による STAT5、STAT3、Akt および ERK1/2 のリン酸化をイムノブロット法により検討した (Fig. 42)。TpoR および TpoR-YF 変異体発現細胞を Tpo 存在下、非存在下で培養後、細胞溶解液を作成した。Tpo 刺激により、TpoR およびすべての TpoR-YF 変異体発現細胞において、JAK2 のリン酸化が誘導された (Fig. 42, IB: p-JAK2)。さらに、TpoR 発現細胞では下流の STAT5、STAT3、Akt および ERK1/2 のリン酸化が誘導されることが確認できた (Fig. 42, Lane 4)。Y512F 変異体は、TpoR と同程度に、STAT5 のリン酸化を誘導したが、Y533F、Y582F、Y616F、Y621F、および Y616/Y621F 変異体は、STAT5 のリン酸化を部分的に抑制した。また、Y512F、および Y582F 変異体は、TpoR と同程度に STAT3 のリン酸化を誘導し、Y533F、Y616F、Y621F 変異体は、STAT3 のリン酸化を部分的に抑制した。さらに、Y616/Y621F 変異体は、STAT3 のリン酸化をほぼ完全に抑制した。また、いずれの TpoR-YF 変異体も Akt のリン酸化を抑制しなかった。さらに、Y512F 変異体は TpoR と同程度に、ERK1/2 のリン酸化を誘導したが、Y533F、Y582F、Y616F、および Y621F 変異体は、ERK1 のリン酸化を抑制した。一方、Y616/Y621F 変異体は、ERK1 だけでなく、ERK2 のリン酸化も部分的に抑制した。したがって、Tpo 刺激によって、TpoR の Y533、Y616、Y621 を介して STAT3 や ERK が活性化され、TpoR の Y533、Y582、Y616、Y621 を介して STAT5 が活性化されると考えられた。また、いずれの TpoR-YF 変異体も、少なくとも部分的に STAT5、Akt、ERK1/2 のリン酸化を誘導したことから、STAT5、Akt、ERK の活性化は TpoR のリン酸化を介さずに部分的に誘導されることが示唆された。

4. 図

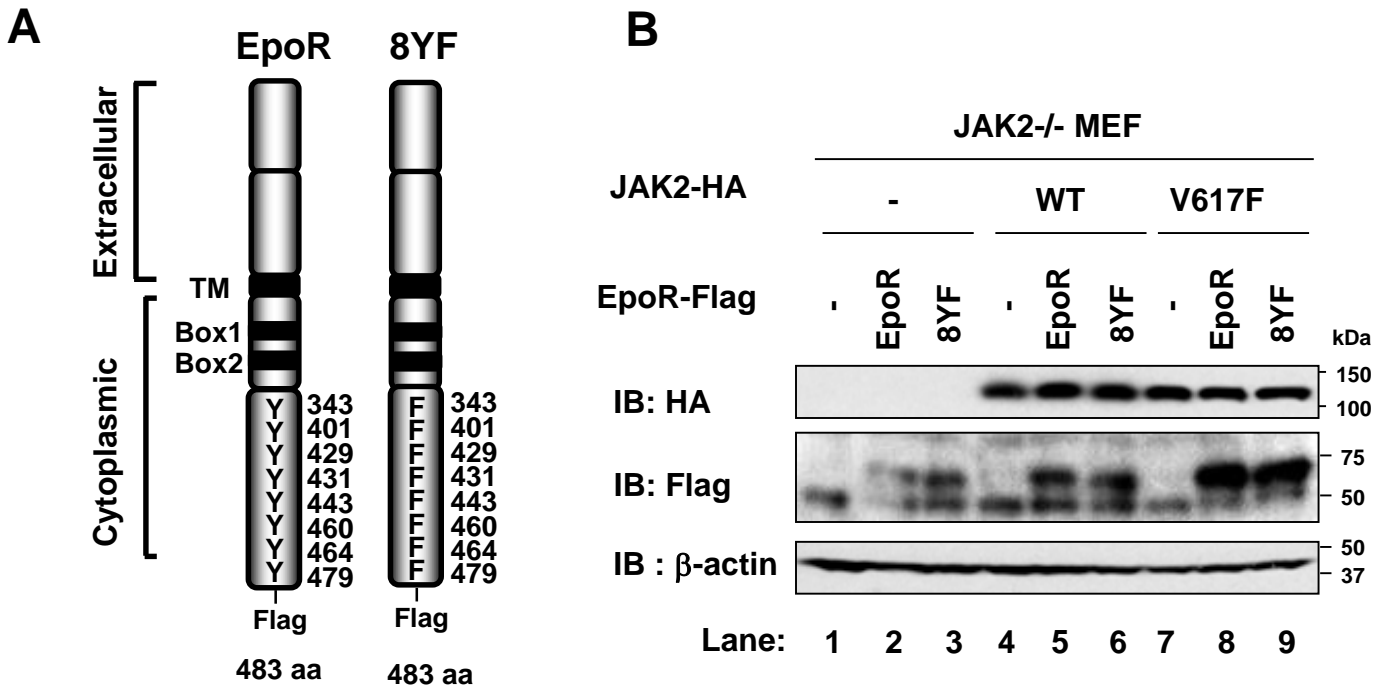


Figure 1. JAK2^{-/-}MEFにおける野生型JAK2 (WT)、JAK2V617F変異体、EpoR、8YF変異体の発現

(A) EpoR c-FlagとEpoRの細胞内ドメインに存在する8個のチロシン残基 (Y343, Y401, Y429, Y431, Y443, Y460, Y464, Y479) をフェニルアラニンに置換した8YF変異体c-Flagの模式図。TM は膜貫通ドメインを表している。JAK2はEpoRのBox1およびBox2を介して結合する。(B) レトロウイルス感染により、JAK2^{-/-}MEFに、野生型JAK2 c-HA (WT)、あるいはJAK2V617F変異体c-HA (V617F)、およびEpoR c-Flagあるいは8YF変異体 c-Flag (8YF) を発現させた。細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体、あるいは抗 β -actin抗体を用いて免疫ブロット法を行った。

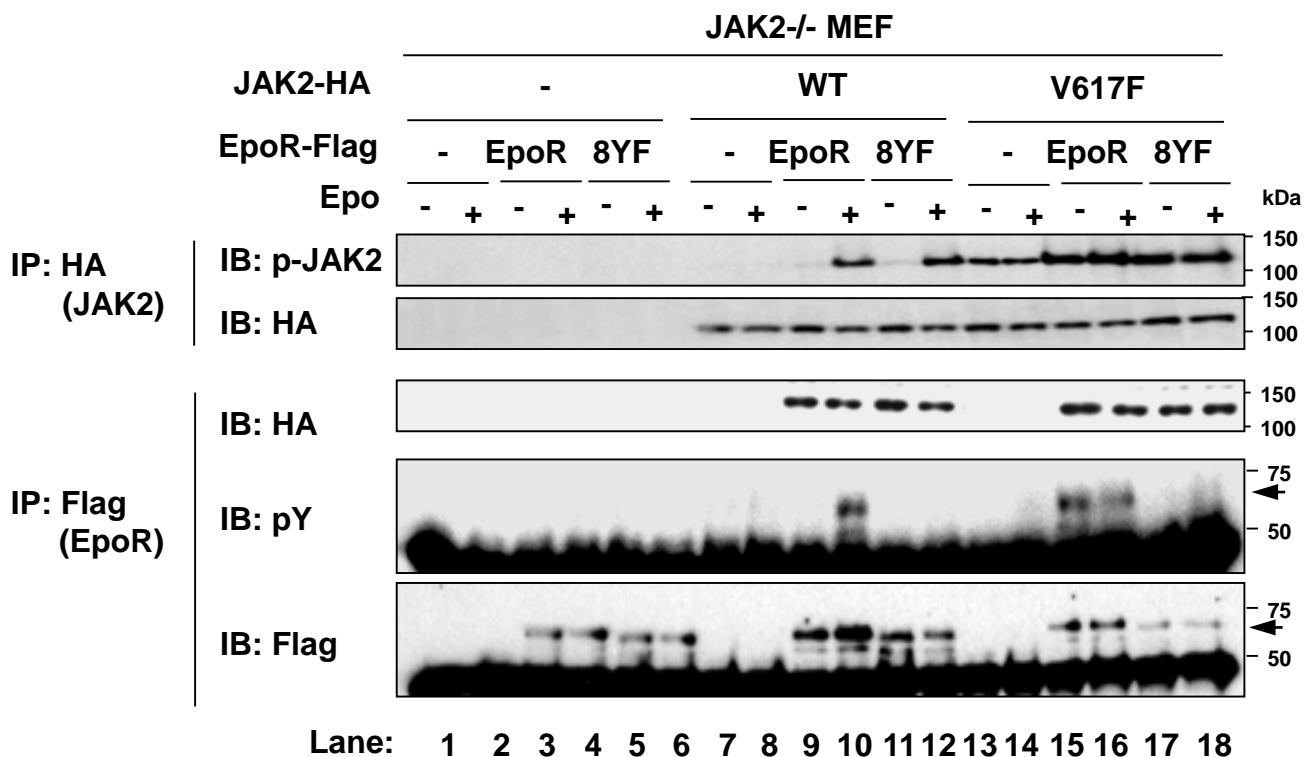


Figure 2. . JAK2^{-/-}MEFにおける野生型JAK2 (WT)、JAK2V617F変異体、EpoR、8YF変異体のリン酸化

レトロウイルス感染により、野生型JAK2 (WT)、JAK2V617F変異体 (V617F)、EpoR あるいは8YF変異体を発現したJAK2^{-/-}MEFを1% FBS含有DMEMで24時間培養後、Epo (1 U/mL) で15分刺激した。細胞溶解液を抗HA抗体あるいは抗Flag抗体を用いて免疫沈降した (IP: HAやIP: Flagと表記)。その後、抗リン酸化JAK2 (Y1007/1008) 抗体 (IB: p-JAK2と表記)、抗HA抗体、抗リン酸化チロシン (pY) 抗体、あるいは抗Flag抗体を用いて免疫ブロット法を行った。

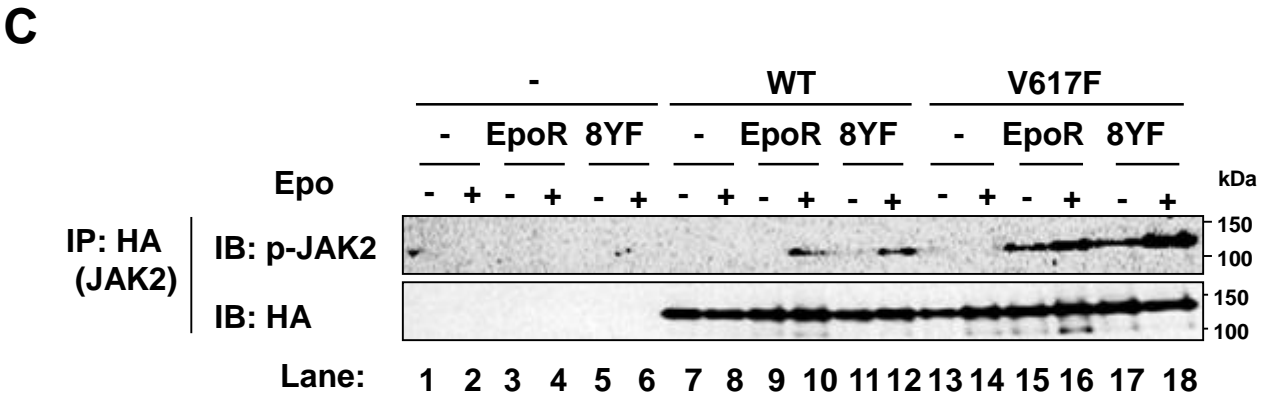
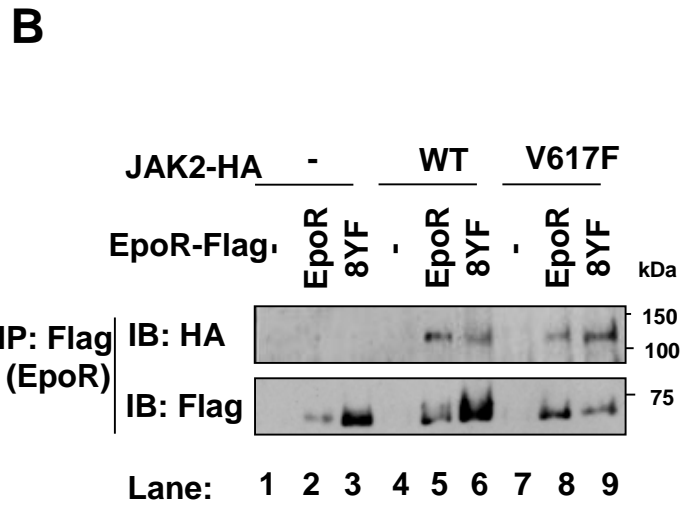
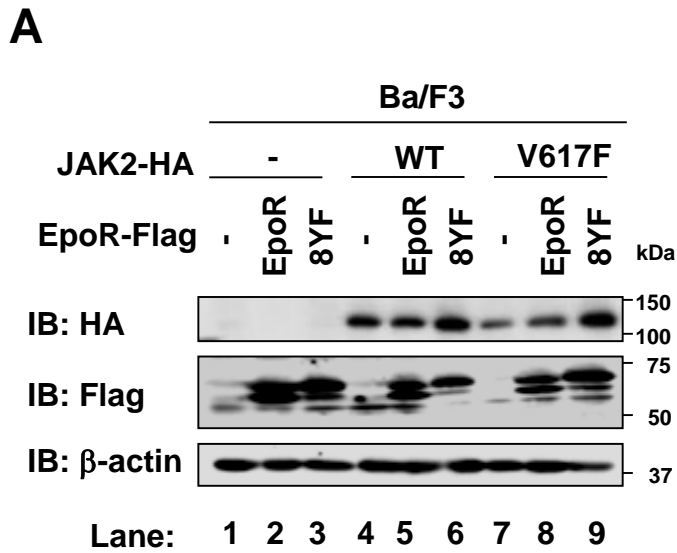
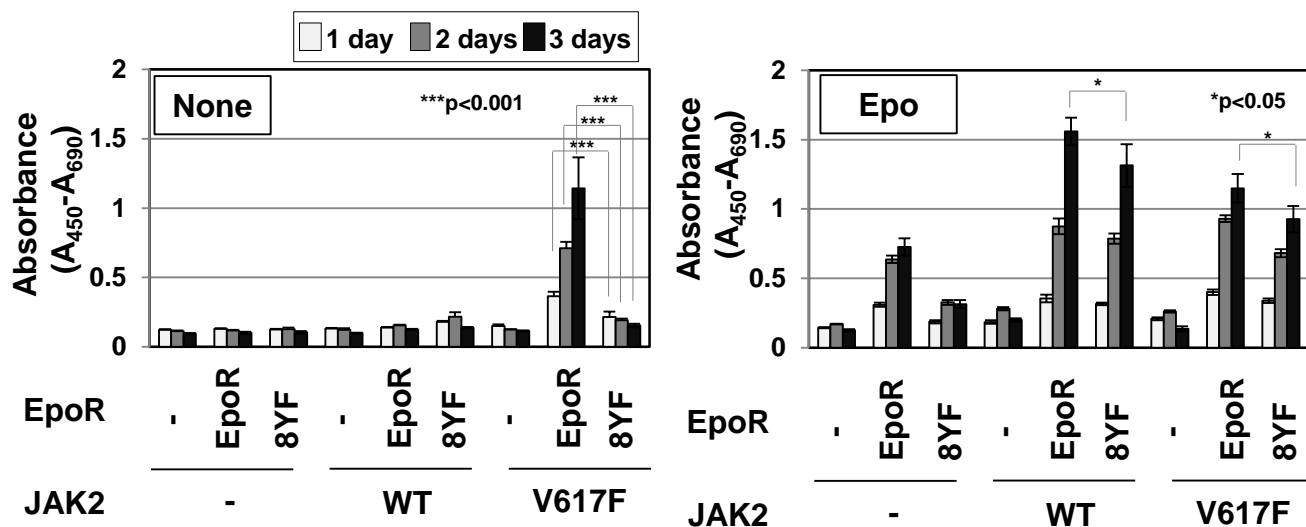


Figure 3 Ba/F3細胞における野生型JAK2 (WT)、JAK2V617F変異体、EpoR、8YF変異体の発現、結合およびリン酸化

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、野生型JAK2 c-HA (WT)、あるいはJAK2V617F変異体c-HA (V617F) を発現させた後、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag あるいは8YF変異体 c-Flag (8YF) を発現させた。(A) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIで24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体、あるいは抗 β -actin抗体を用いてイムノプロット法を行った。(B) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIで24時間培養後、細胞溶解液を作成し、抗Flag抗体を用いて免疫沈降した (IP: Flagと表記)。免疫沈降物をFlag peptide (200 μ g/mL) を用いて溶出し、抗HA抗体あるいは抗Flag抗体を用いてイムノプロット法を行った。(C) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIを用いて、Epo (1 U/mL) 存在下、非存在下において24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗HA抗体を用いて免疫沈降し (IP: HAと表記)、抗リン酸化JAK2 (Y1007/1008) 抗体あるいは抗HA抗体を用いてイムノプロット法を行った。

A



B

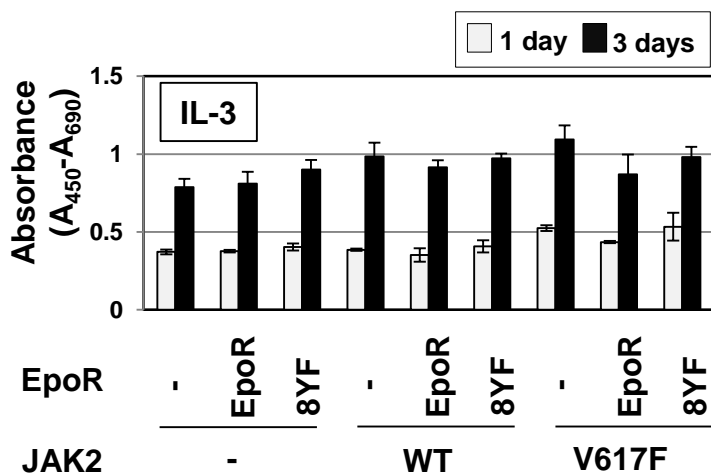
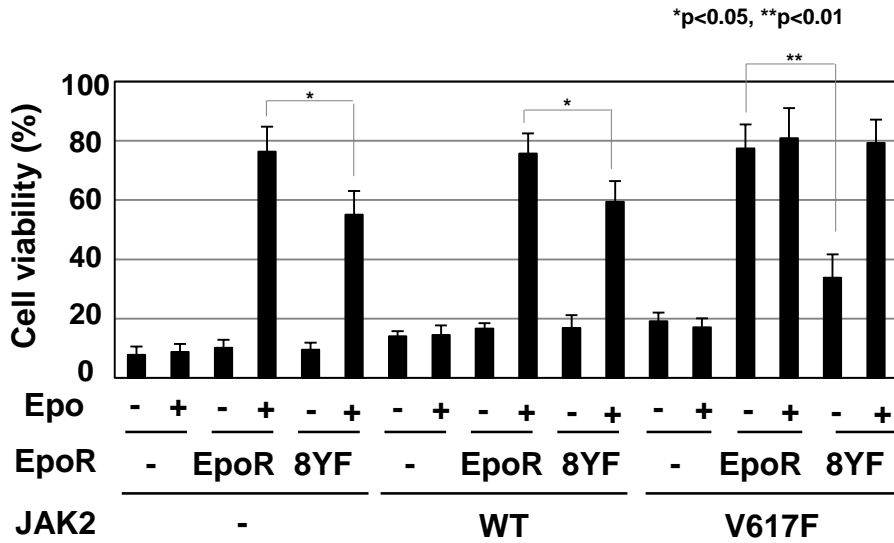


Figure 4. Epo刺激、IL-3刺激、あるいはJAK2V617F変異体による細胞増殖におけるEpoRのリン酸化の役割

(A) Ba/F3細胞株を、1% FBS含有RPMIを用いて、Epo (1 U/mL) 存在下、非存在下で3日間培養した。(B) Ba/F3細胞株を、1% FBS含有RPMIを用いて、IL-3 (2 ng/mL) 存在下で3日間培養した。(A, B) WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, *p<0.05、p***<0.001)

A



B

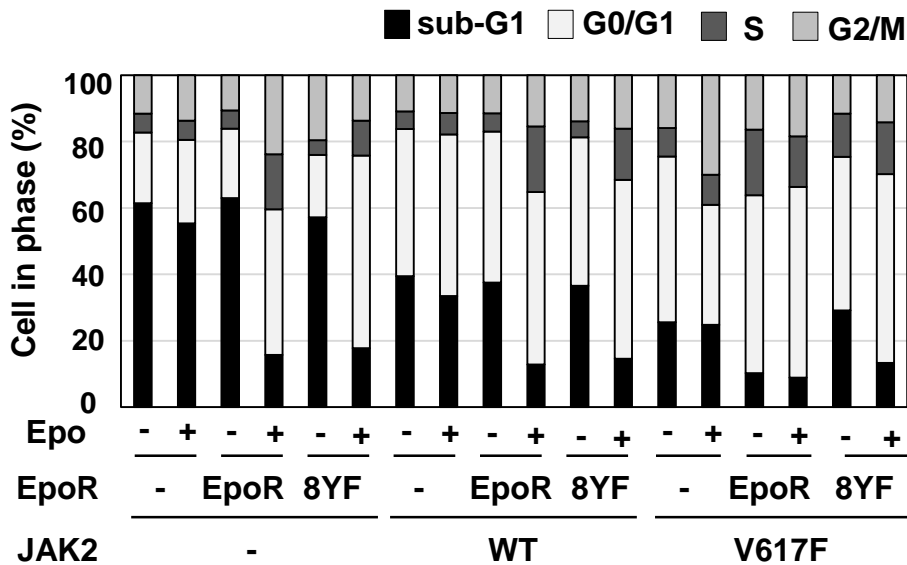


Figure 5. Epo刺激、IL-3刺激、あるいはJAK2V617F変異体による細胞生存におけるEpoRのリン酸化の役割

Ba/F3細胞株を、1% FBS含有RPMIを用いて、Epo (1 U/mL) 存在下、非存在下で24時間培養した。トリパンブルー染色法により、細胞生存率を算出した。(n=3, *p<0.05、p**<0.01)
 (B) Ba/F3細胞株を、1% FBS含有RPMIを用いて、Epo (1 U/mL) 存在下、非存在下で48時間培養した。細胞を固定し、propidium iodide (PI) で染色後、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。

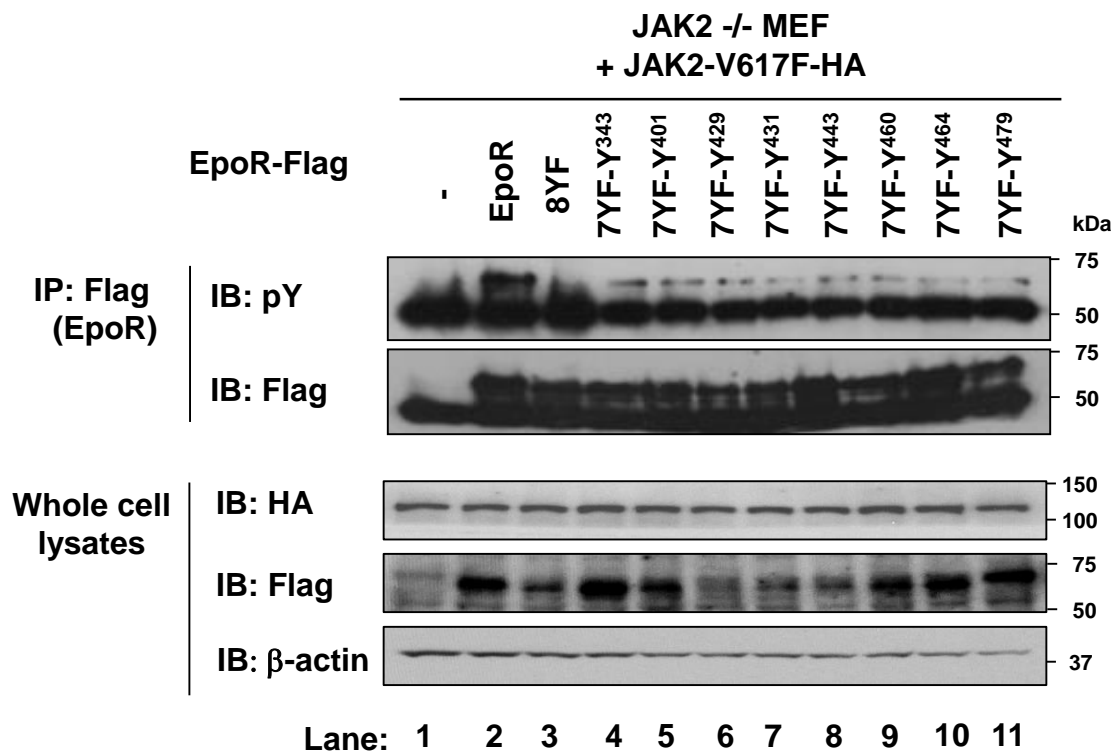


Figure 6. JAK2V617F変異体発現細胞におけるEpoRの8個のチロシン残基のリン酸化

JAK2^{-/-}MEFに、レトロウイルス感染により、JAK2V617F変異体c-HA (V617F)を発現させた後に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、あるいは7YF変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y401, 7YF-Y429, 7YF-Y431, 7YF-Y443, 7YF-Y460, 7YF-Y464, 7YF-Y479)を発現させた。各JAK2^{-/-}MEFを1% FBS含有DMEMで24時間培養し、細胞溶解液を作成した。抗Flag抗体を用いて免疫沈降し、抗リン酸化チロシン抗体 (pY)、あるいは抗Flag抗体を用いてイムノブロット法を行った。また、細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体あるいは抗β-actin抗体を用いたイムノブロット法を行った。

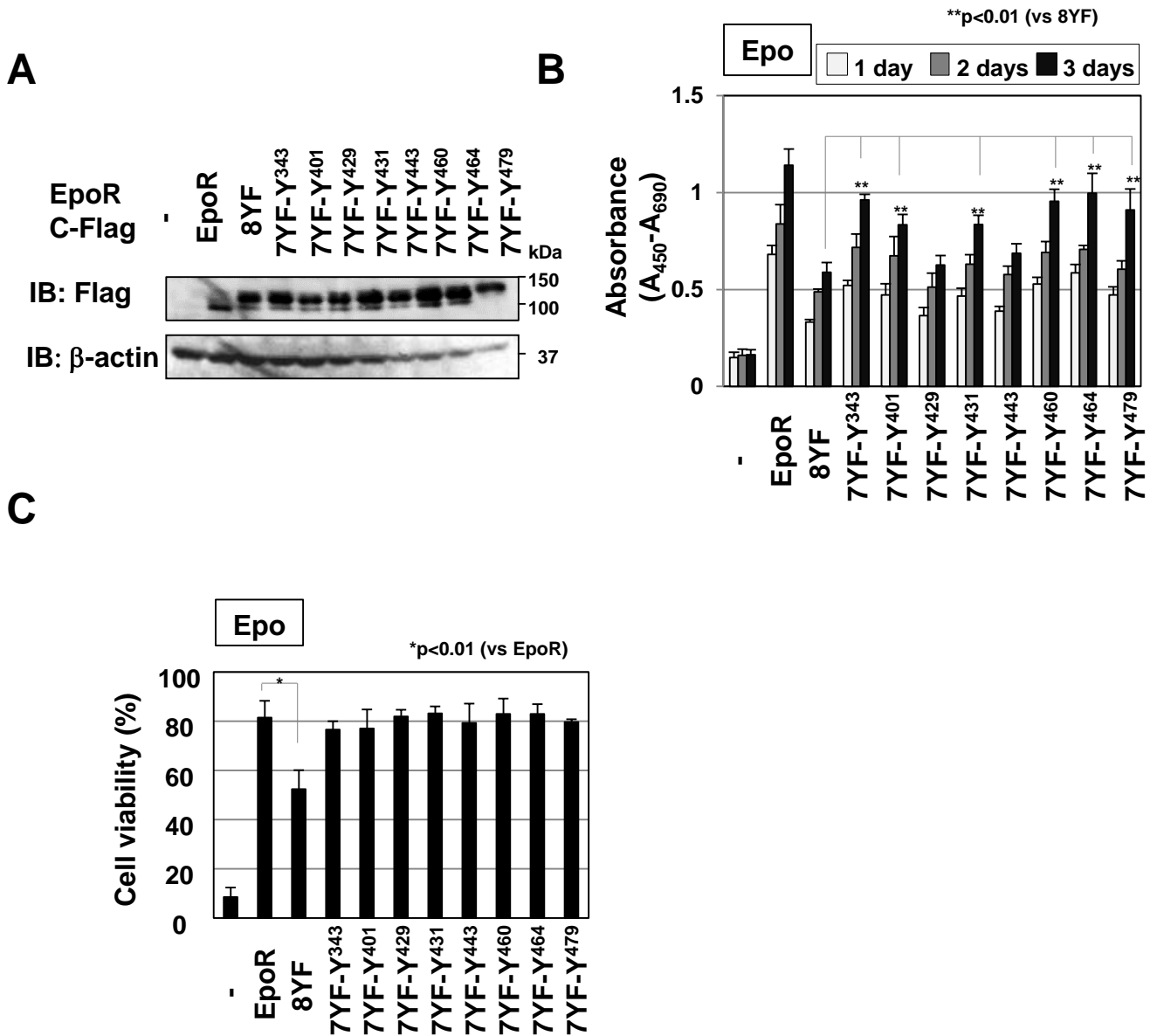


Figure 7. Epo刺激による細胞増殖におけるEpoR-7YF変異体の役割

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、あるいは7YF変異体 c-Flag (7YF-Y343, 7YF-Y401, 7YF-Y429, 7YF-Y431, 7YF-Y443, 7YF-Y460, 7YF-Y464, 7YF-Y479)を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗Flag抗体あるいは抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をEpo (1 U/mL) 存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, *p<0.05, p***<0.001 (vs 8YF)) (C) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をEpo (1 U/mL) 存在下で72時間培養したトリパンブルー染色法により、細胞生存率を算出した。(n=3, *p<0.05)

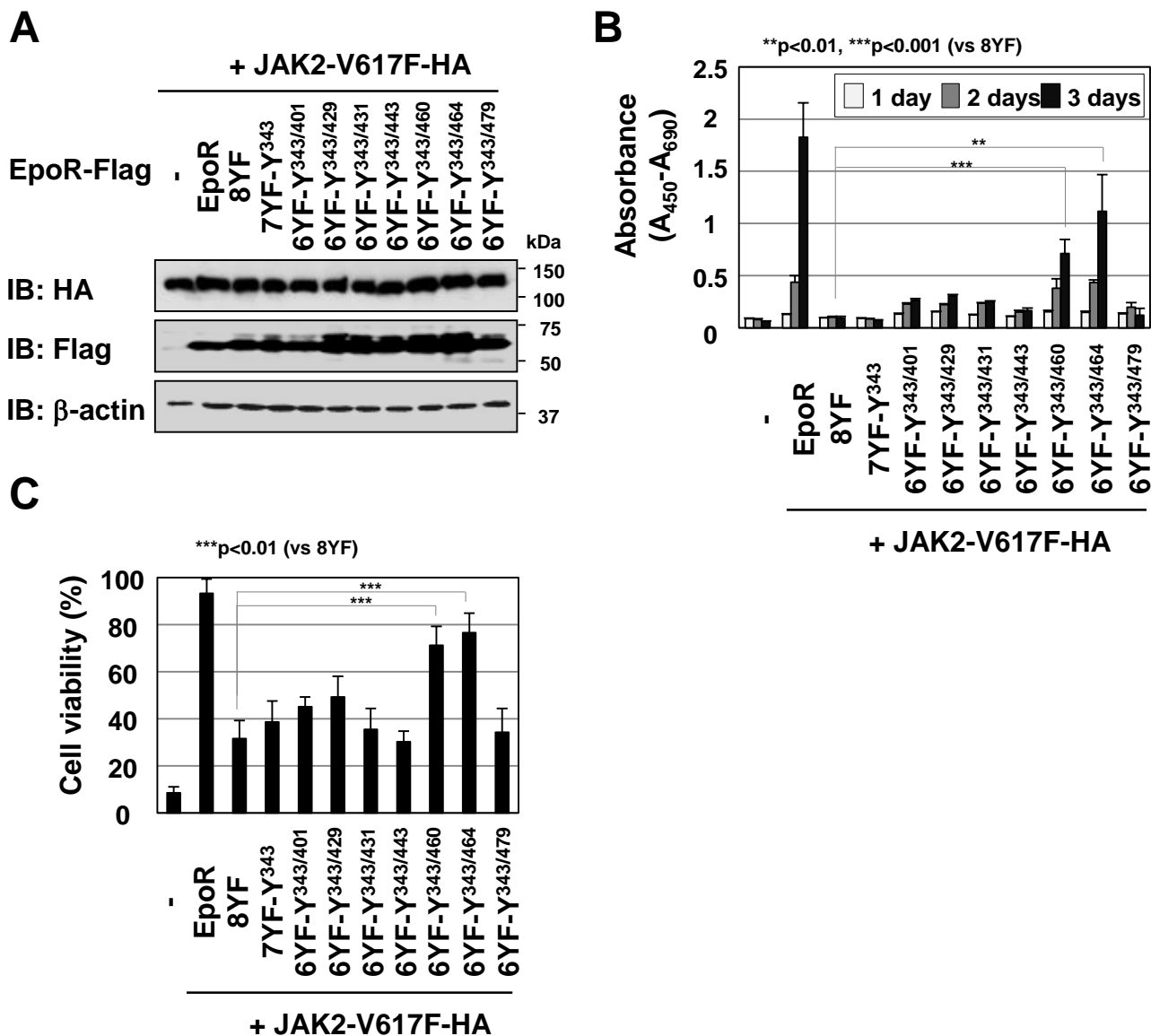


Figure 9. JAK2V617F変異体による細胞増殖におけるEpoR-6YF変異体の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、7YF-Y343変異体、あるいは6YF変異体 (6YF-Y343/401, 6YF-Y343/429, 6YF-Y343/431, 6YF-Y343/443, 6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y343/479) を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体あるいは抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF)) (C) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で72日間培養した。トリパンブルー染色法により、細胞生存率を算出した。(n=3, ***p<0.001 (vs 8YF))

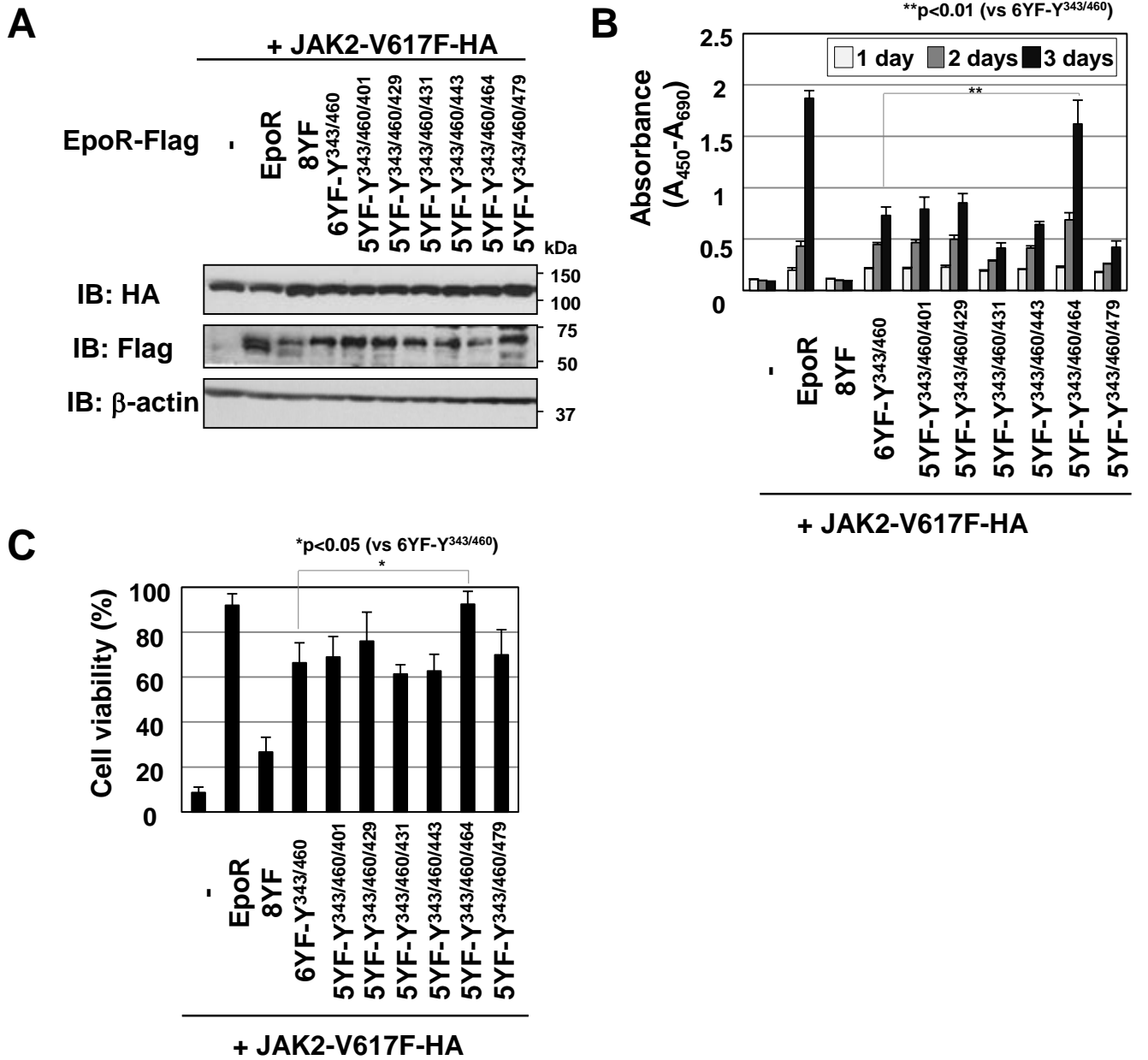


Figure 10. JAK2V617F変異体による細胞増殖におけるY343およびY460のリン酸化の役割
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、6YF-Y343/460変異体、あるいは5YF変異体 (5YF-Y343/460/401, 5YF-Y343/460/429, 5YF-Y343/460/431, 5YF-Y343/460/443, 5YF-Y343/460/464, 5YF-Y343/460/479) を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体あるいは抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 6YF-Y^{343/460})) (C) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で72時間培養した。トリパンブルー染色法により、細胞生存率を算出した。(n=3, *p<0.001 (vs 6YF-Y^{343/460}))

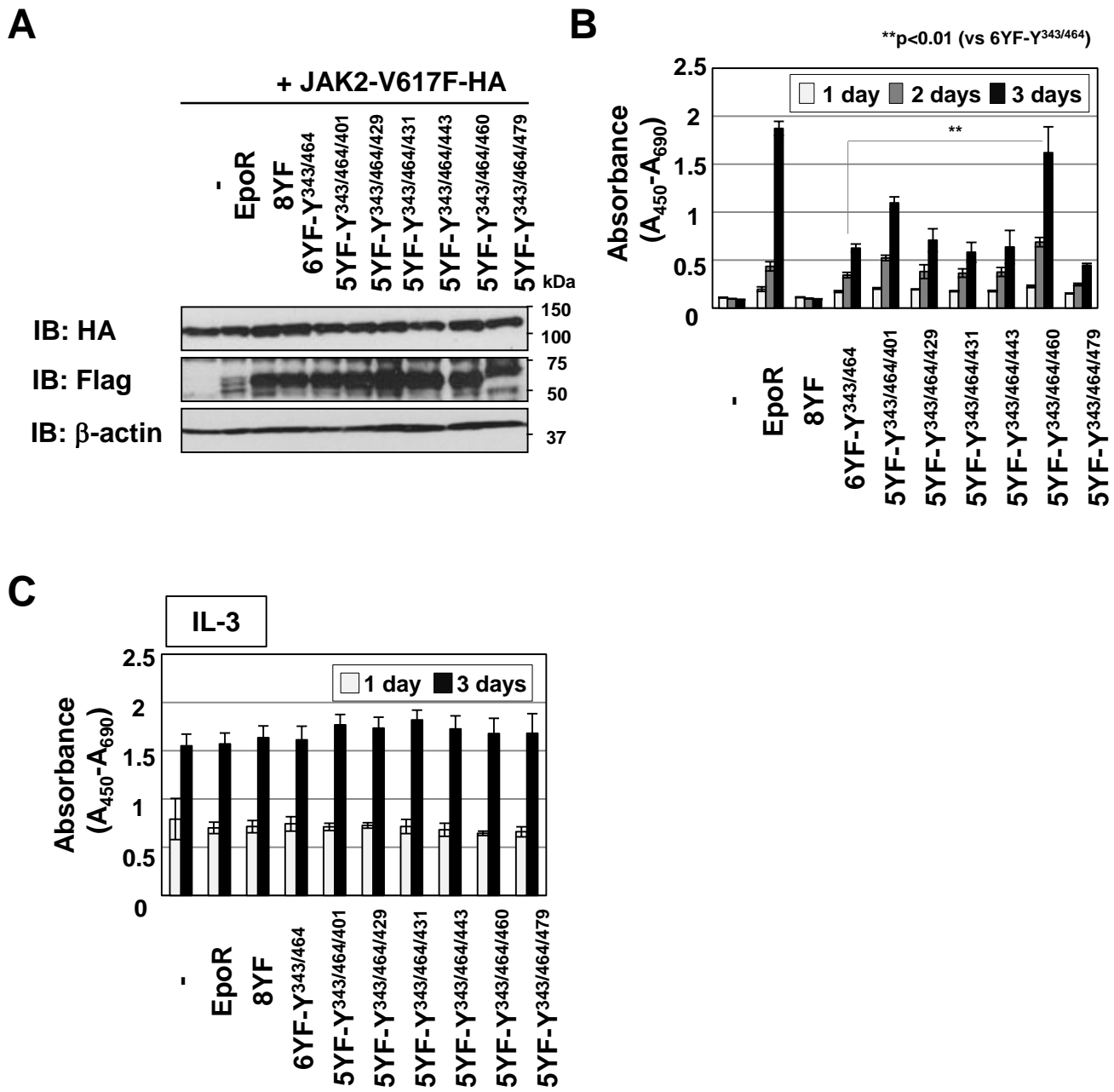


Figure 11. JAK2V617F変異体による細胞増殖におけるY343およびY464のリン酸化の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、6YF-Y^{343/464}変異体、あるいは5YF変異体 (5YF-Y^{343/464/401}, 5YF-Y^{343/464/429}, 5YF-Y^{343/464/431}, 5YF-Y^{343/464/443}, 5YF-Y^{343/464/460}, 5YF-Y^{343/464/479}) を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体あるいは抗β-actin抗体を用いて免疫ブロット法を行った。(B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, **p<0.01 (vs 6YF-Y^{343/464})) (C) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をIL-3 (2 ng/mL) 存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4)

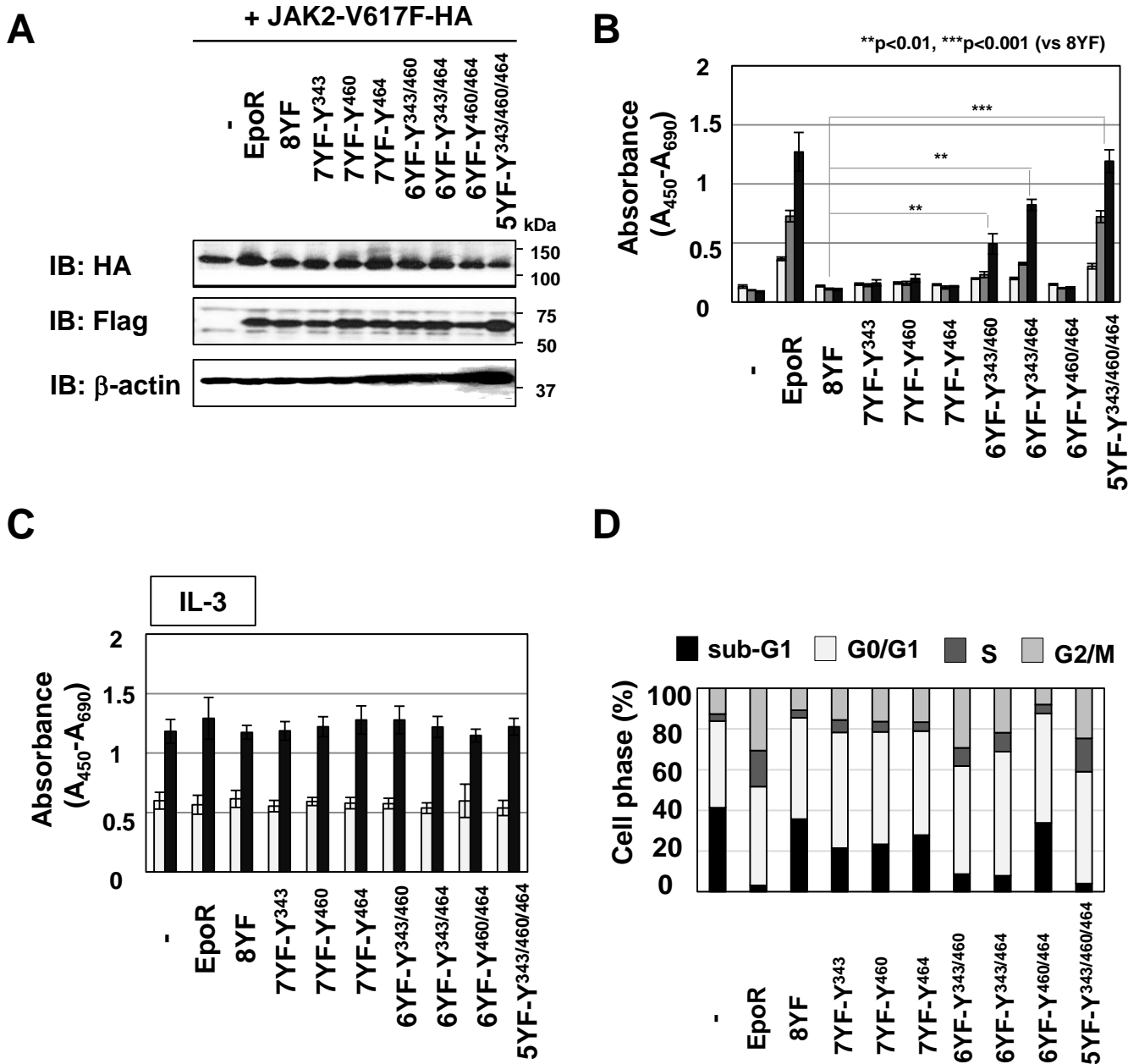


Figure 12. JAK2V617F変異体による細胞増殖におけるEpoR のY343, Y460, Y464の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、7YF変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、6YF変異体 (6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/464)、あるいは5YF-Y343/460/464変異体を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体あるいは抗β-actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF)) (C) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をIL-3 (2 ng/mL) 存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4) (D) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。細胞を固定し、propidium iodide (PI) で染色後、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。

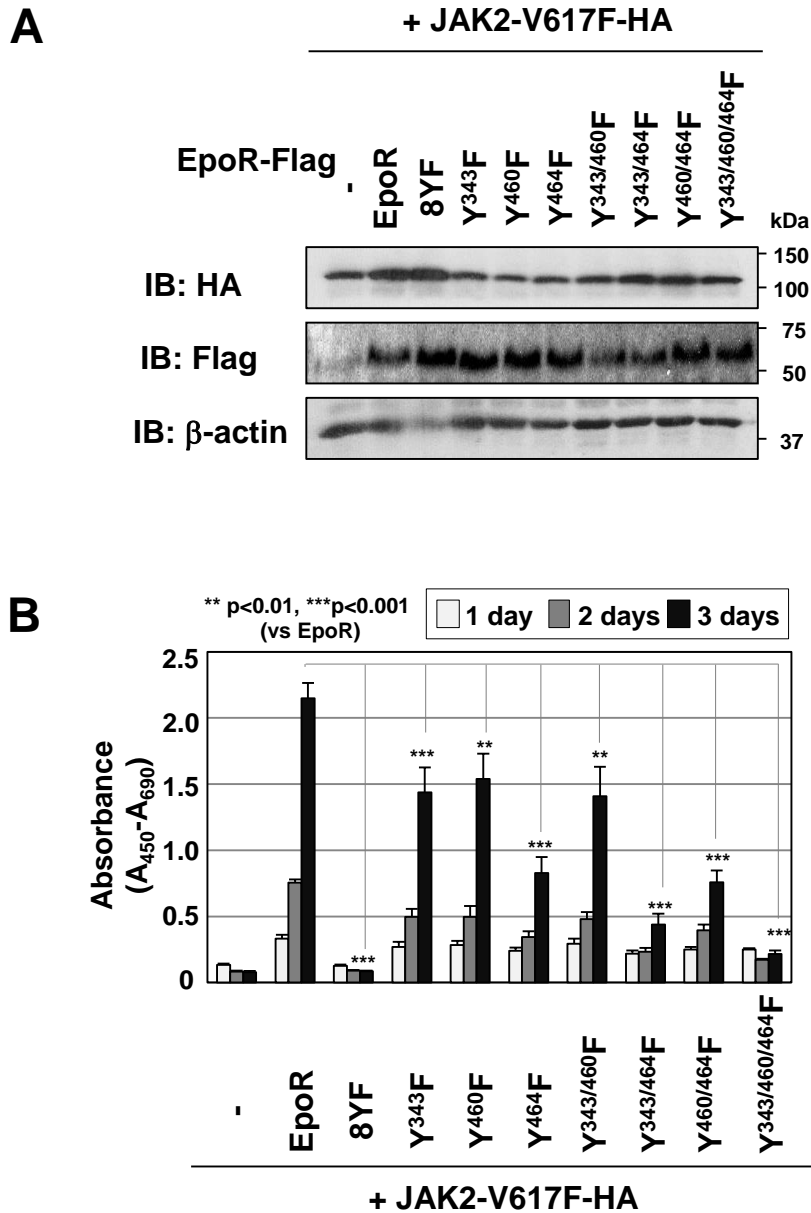


Figure 13. JAK2V617F変異体による細胞増殖におけるEpoR のY343, Y460, Y464のリン酸化の重要性
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、 Y343F変異体、Y460F変異体、Y464F変異体、Y343/460F変異体、Y343/464F変異体、Y460/464F変異体、Y343/460/464F変異体を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体あるいは抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, **p<0.01, ***p<0.001 (vs EpoR))

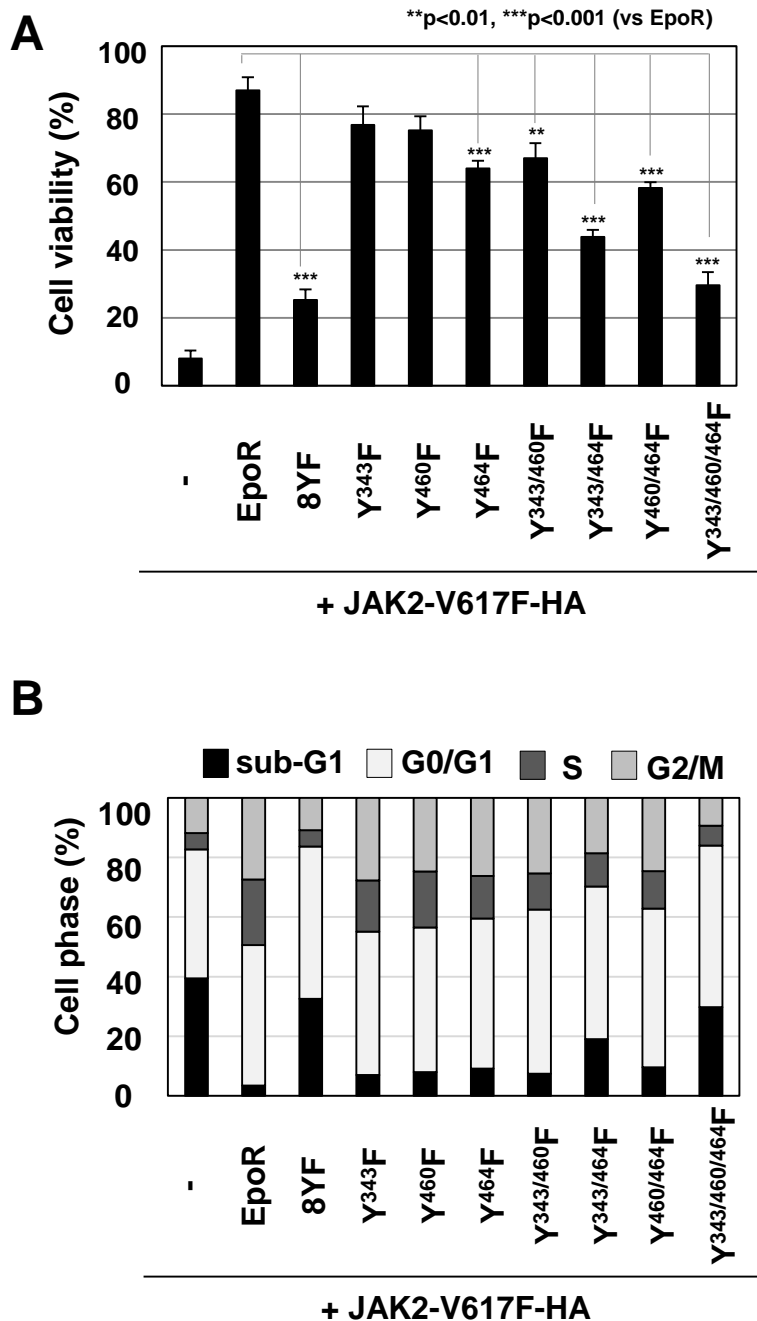


Figure 14. JAK2V617F変異体による細胞生存におけるEpoR のY343, Y460, Y464のリン酸化の重要性
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、Y343F変異体、Y460F変異体、Y464F変異体、Y343/460F変異体、Y343/464F変異体、Y460/464F変異体、Y343/460/464F変異体を発現させた。(A) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。トリパンブルー染色法により、細胞生存率を算出した。(n=4, **p<0.01、p***<0.001 (vs EpoR)) (B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をサイトカイン非存在下で3日間培養した。細胞を固定し、propidium iodide (PI) で染色後、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。

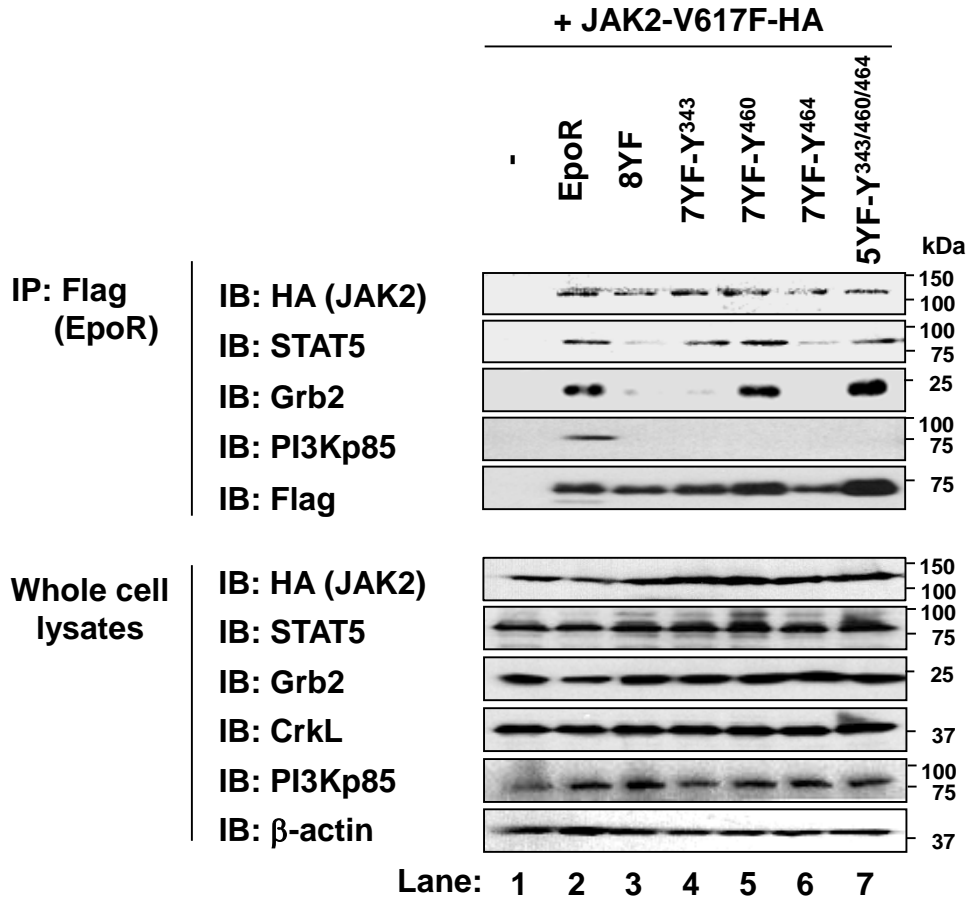


Figure 15. JAK2V617F変異体発現細胞におけるSTAT5, Grb2, PI3Kp85との結合に対するEpoR のY343, Y460, Y464の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、7YF-Y343変異体、7YF-Y460変異体、7YF-Y464変異体、あるいは5YF-Y343/460/464変異体を発現させた。細胞溶解液を作成し、抗Flag抗体を用いて免疫沈降を行い、免疫沈降物をFlag peptide (200 μ g/mL)を用いて溶出した。抗HA抗体、抗STAT5抗体、抗Grb2抗体、抗PI3Kp85抗体、または抗Flag抗体を用いてイムノブロット法を行った。細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗STAT5抗体、抗Grb2抗体、抗CrkL抗体、抗PI3Kp85抗体、または抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF)

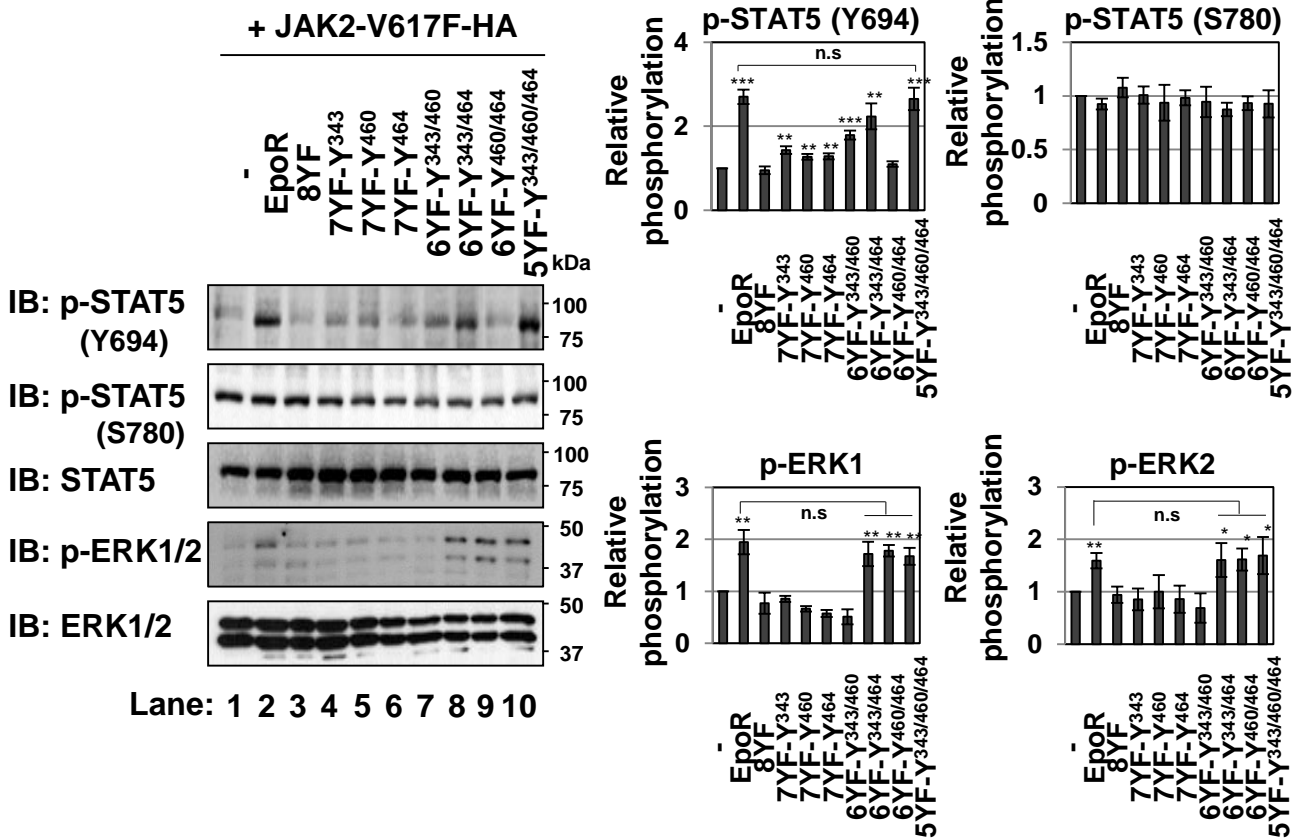


Figure 16. JAK2V617F変異体によるSTAT5およびERK1/2のリン酸化におけるEpoR のY343, Y460, Y464のリン酸化の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR c-Flag、または8YF変異体 c-Flag (8YF)、7YF変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、6YF変異体 (6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/464) あるいは5YF-Y343/460/464変異体を発現させた。細胞溶解液を作成し、抗リン酸化STAT5抗体 (Y694)、抗リン酸化STAT5抗体 (S780)、抗STAT5抗体、抗リン酸化ERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体を用いて、イムノブロット法を行った。Image Jを用いて、STAT5、ERK1、ERK2のリン酸化を定量化した。(n=3, *p<, *p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF))

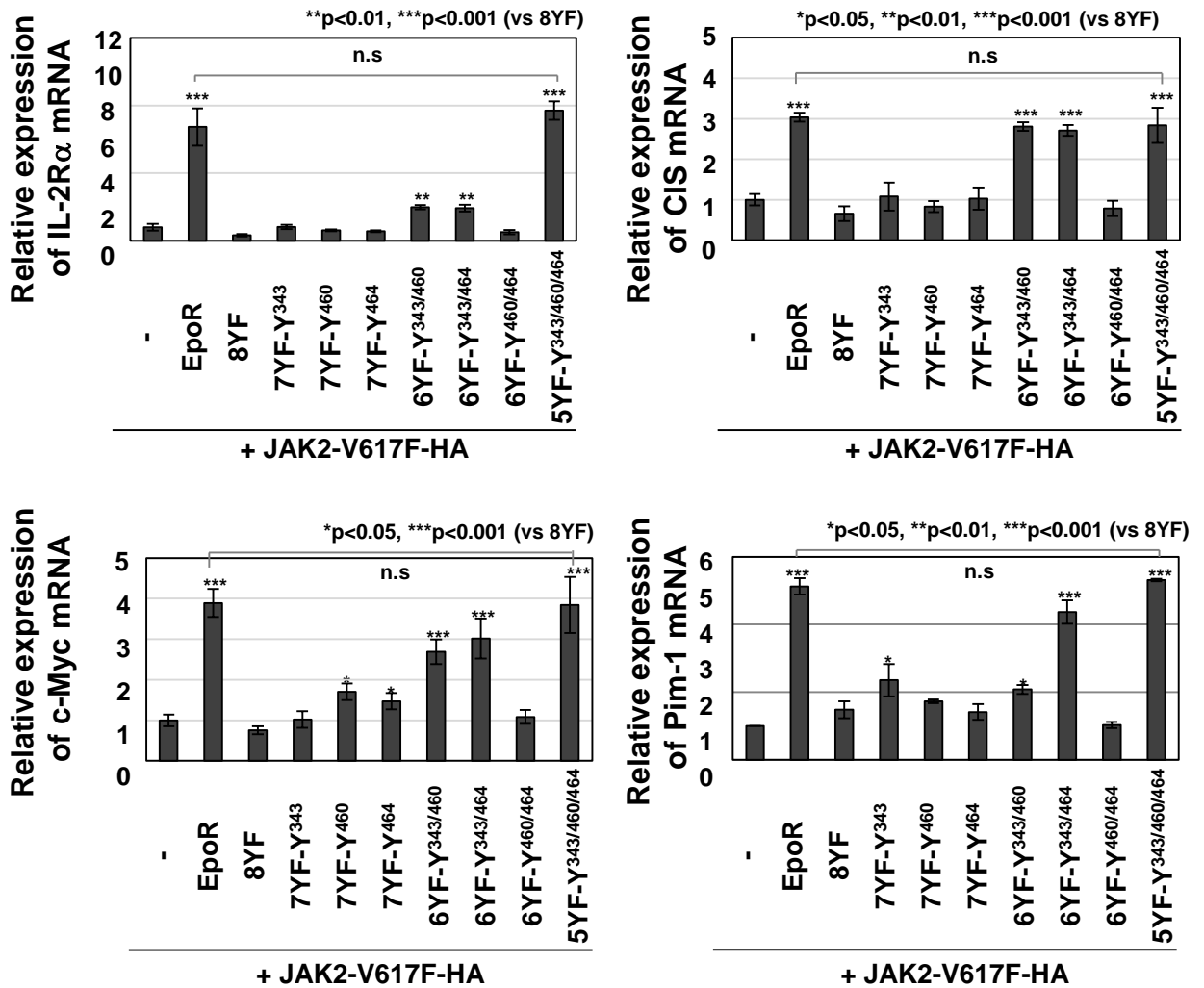


Figure 17. JAK2V617F変異体によるIL-2R α , CIS, c-Myc, Pim-1 mRNA発現誘導に及ぼすEpoR のY343, Y460, Y464の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、7YF変異体(7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、6YF変異体(6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/464)あるいは5YF-Y343/460/464変異体を発現させた。Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIで24時間培養し、total RNAを抽出した。IL-2R α , CIS, c-Myc, Pim-1 mRNA発現をRT-PCR法により測定した。GAPDH mRNAの発現量を用いて、各遺伝子のmRNA発現量を標準化した。(n=4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF))

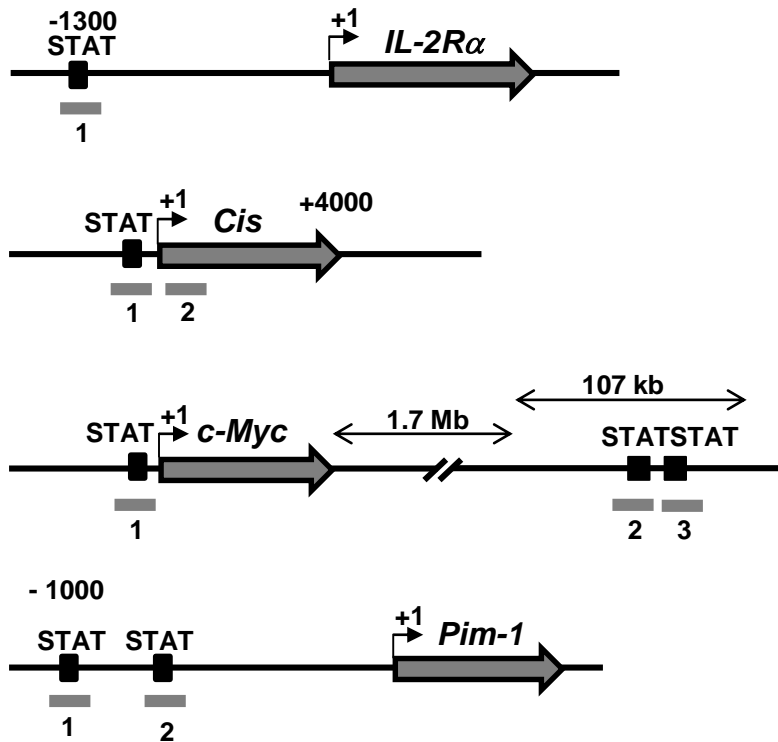


Figure 18. IL-2R α , CIS, c-Myc, Pim-1のプロモーターおよびエンハンサーにおけるSTAT結合部位
 転写開始点を+1と表記した。また、IL-2R α , CIS, c-Myc, Pim1遺伝子のプロモーター領域およびエン
 ハンサー領域に存在するSTAT結合部位を黒色で示した。また、設計したPrimerにより、増幅される
 PCR産物を灰色で示した。

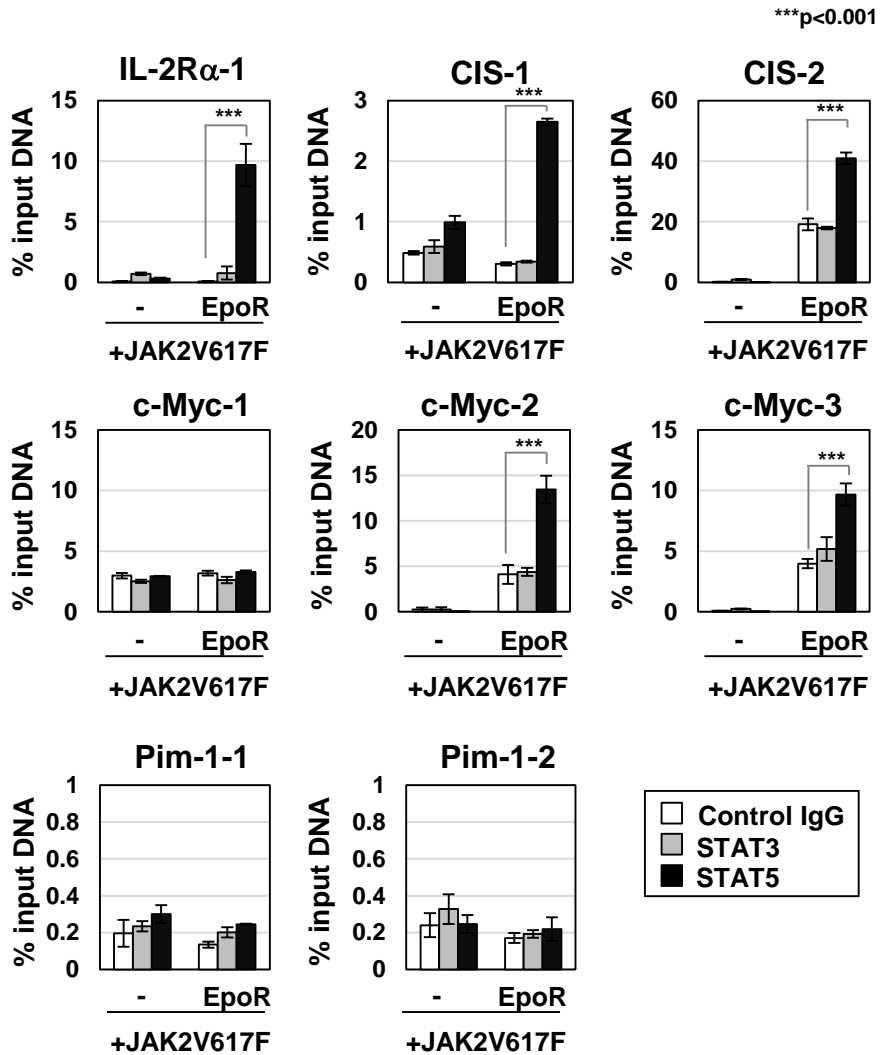


Figure 19. IL-2R α , CIS, c-Myc, Pim-1のプロモーターあるいはエンハンサーのSTAT結合部位におけるSTAT3およびSTAT5の結合
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoRを発現させ、1% FBS含有RPMIで24時間培養した。細胞溶解液を作成し、コントロール抗体 (Control IgG)、抗STAT3抗体、あるいは抗STAT5抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。沈降したゲノムDNAを用いて、qPCRを行った。(n=3, ***p<0.001)

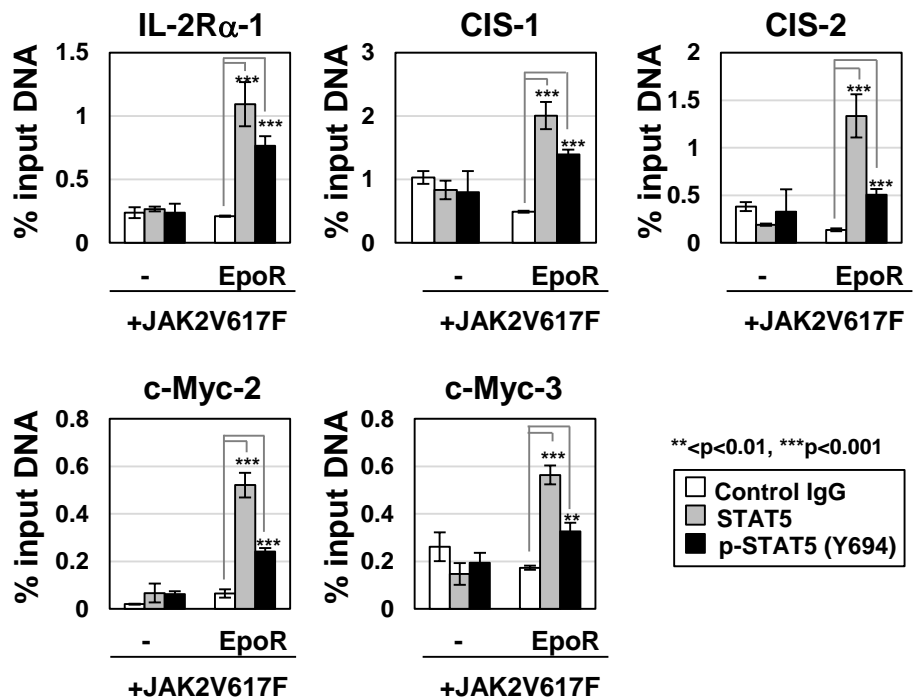


Figure 20. IL-2R α , CIS, c-Myc, Pim-1のプロモーターあるいはエンハンサーのSTAT結合部位におけるリン酸化STAT5の結合

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoRを発現させ、1% FBS含有RPMIで24時間培養した。細胞溶解液を作成し、コントロール抗体 (Control IgG)、抗STAT5抗体、あるいは抗リン酸化STAT5 (Y694) 抗体を用いてクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。沈降したゲノムDNAを用いて、qPCRを行った。(n=3, ***p<0.001)

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs EpoR)

+ JAK2-V617F-HA

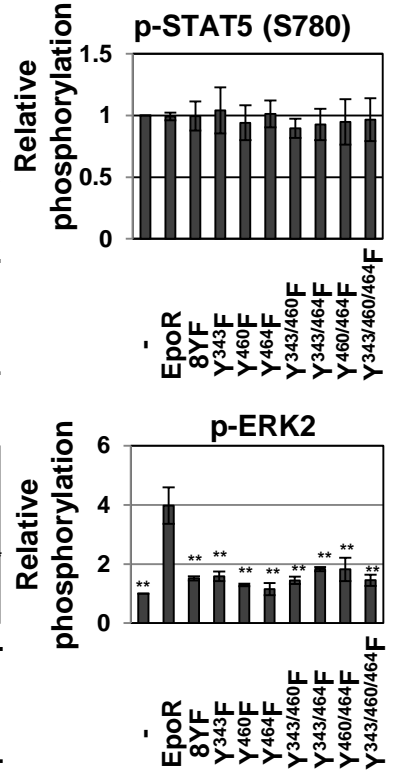
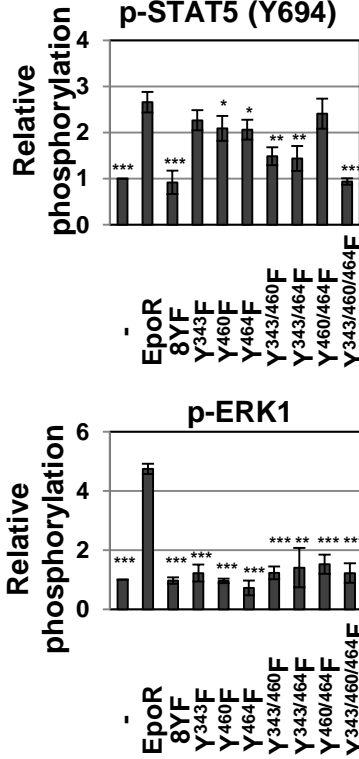
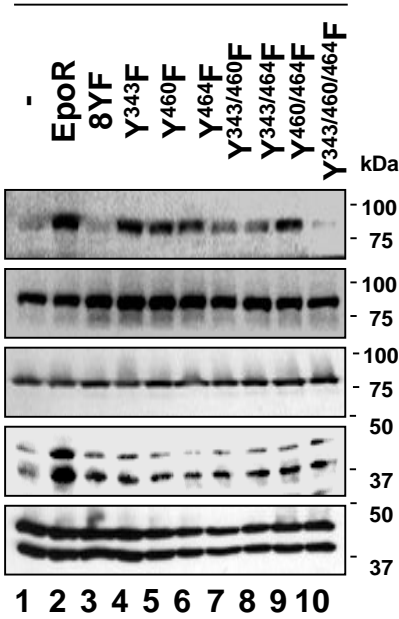


Figure 21. JAK2V617F変異体によるSTAT5およびERK1/2のリン酸化におけるEpoR のY343, Y460, Y464の重要性

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、Y343F変異体、Y460F変異体、Y464F変異体、Y343/460F変異体、Y343/464F変異体、Y460/464F変異体、Y343/460/464F変異体を発現させた。細胞溶解液を作成し、抗リン酸化STAT5抗体 (Y694)、抗リン酸化STAT5抗体 (S780)、抗STAT5抗体、抗リン酸化ERK1/2抗体、抗ERK1/2抗体を用いて、イムノブロット法を行った。Image Jを用いて、STAT5、ERK1、ERK2のリン酸化を定量化した。(n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs EpoR))

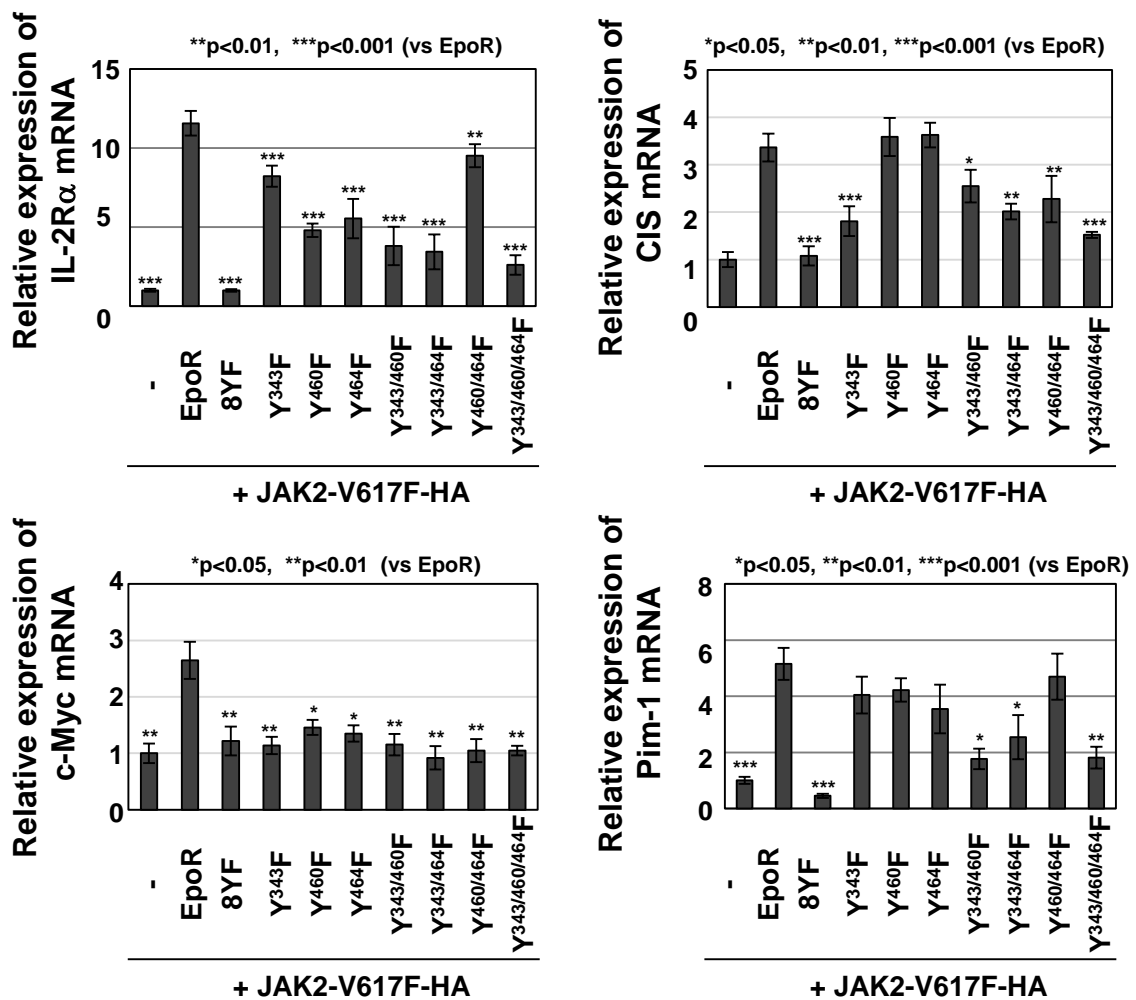


Figure 22. JAK2V617F変異体によるSTAT5の活性化に及ぼすEpoRのY343, Y460, Y464点変異の影響
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、Y343F変異体、Y460F変異体、Y464F変異体、Y343/460F変異体、Y343/464F変異体、Y460/464F変異体、Y343/460/464F変異体を発現させた。Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIで24時間培養し、total RNAを抽出した。IL-2Rα, CIS, c-Myc, Pim-1 mRNA発現をRT-PCR法により測定した。GAPDH mRNAの発現量を用いて、各遺伝子のmRNA発現量を標準化した。(n=4, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs EpoR))

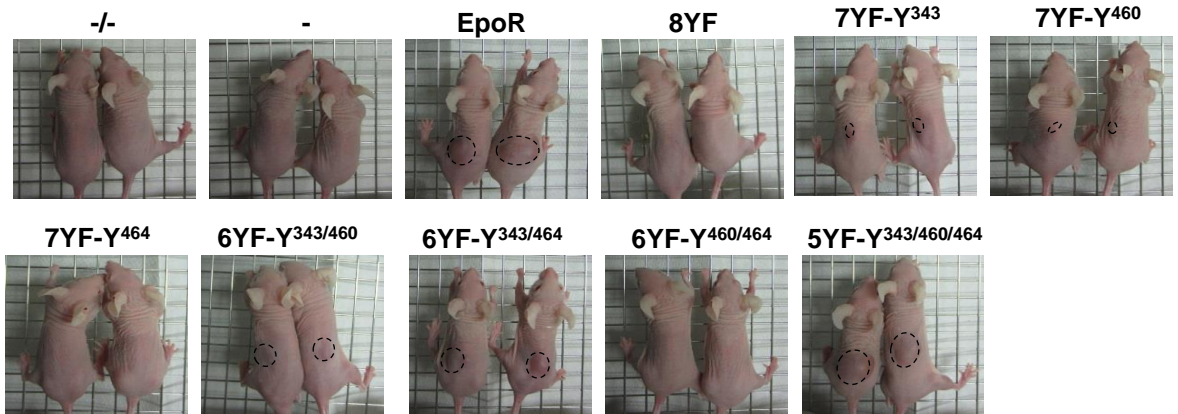
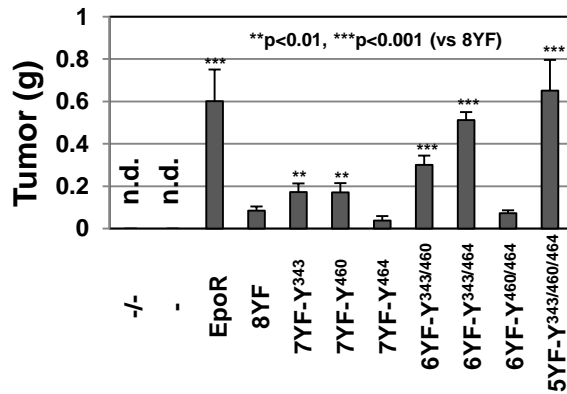
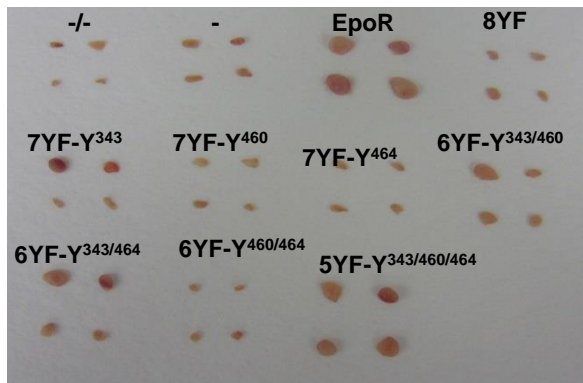
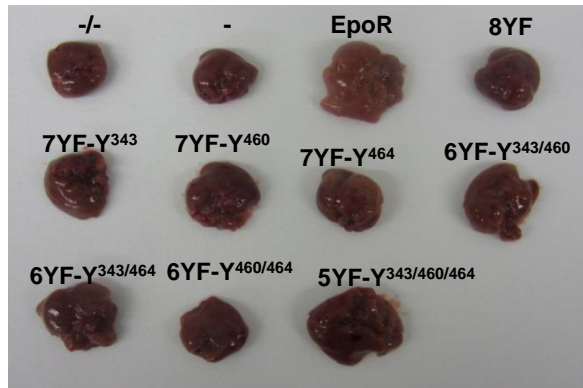
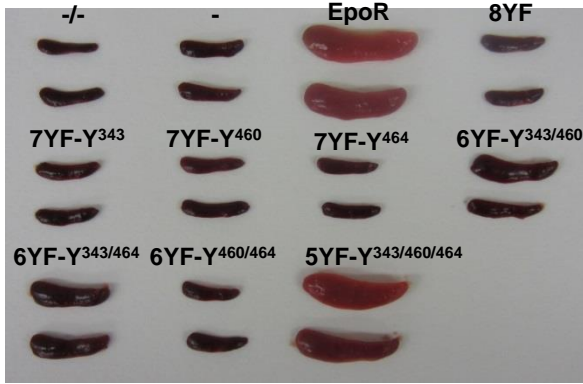
A**B**

Figure 23. JAK2V617F変異体による腫瘍形成におけるEpoR のY343, Y460, Y464の役割

Ba/F3細胞に空ウイルス(-)を感染させた。JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、7YF変異体(7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、6YF変異体(6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/464)あるいは5YF-Y343/460/464変異体を発現させた。Ba/F3細胞株(1×10^7)をヌードマウスに皮下注射した。(A)移植12日後のヌードマウスの写真を撮影した。(B)移植13日後にヌードマウスに形成された腫瘍を摘出し、重量を測定した。(n=3, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF))

A



B

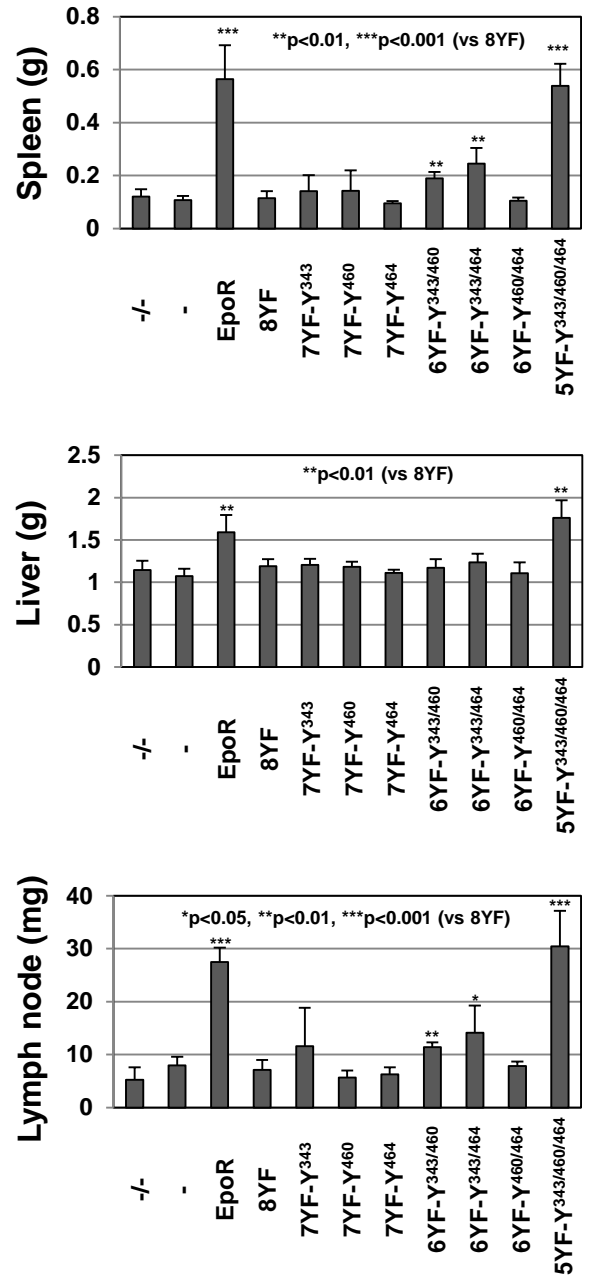


Figure 24. JAK2V617F変異体による脾臓、肝臓、リンパ節の肥大化におけるEpoRのY343, Y460, Y464の役割

Ba/F3細胞に空ウイルス (-) を感染させた。JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、7YF変異体 (7YF-Y343, 7YF-Y460, 7YF-Y464)、6YF変異体 (6YF-Y343/460, 6YF-Y343/464, 6YF-Y460/464) あるいは5YF-Y343/460/464変異体を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。(A) 移植13日後にヌードマウスの脾臓、肝臓、リンパ節を摘出し、各臓器の写真を撮影した。(B) 脾臓、肝臓、リンパ節の重量を測定した。(n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs 8YF))

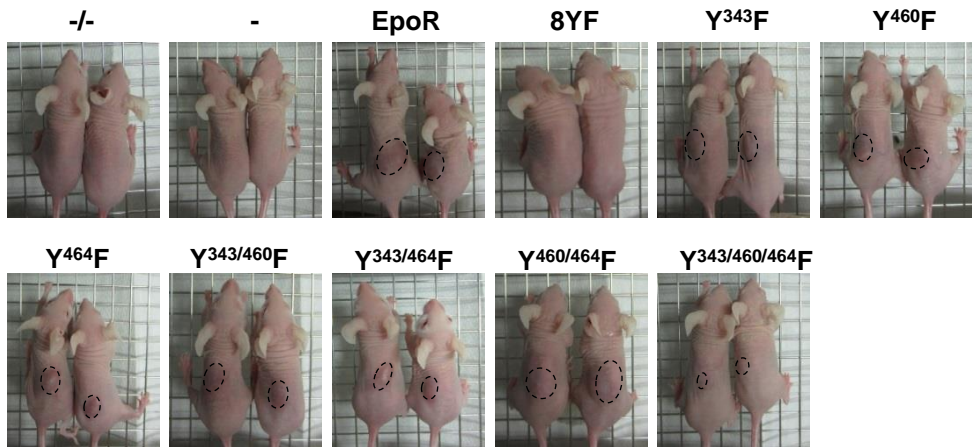
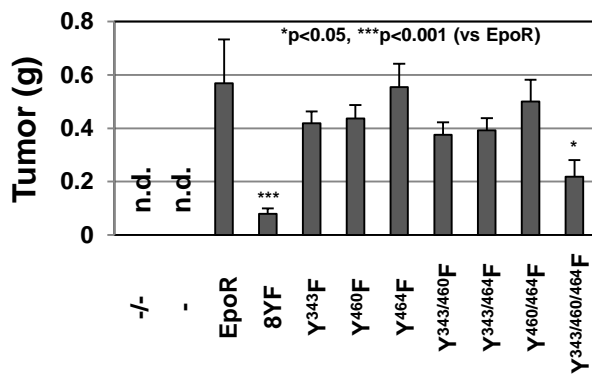
A**B**

Figure 25. JAK2V617F変異体による腫瘍形成におけるEpoR のY343, Y460, Y464の役割

Ba/F3細胞に空ウイルス (-) を感染させた。JAK2V617F変異体発現に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、Y343F変異体、Y460F変異体、Y464F変異体、Y343/460F変異体、Y343/464F変異体、Y460/464F変異体、Y343/460/464F変異体を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。(A) 移植12日後のヌードマウスの写真を撮影した。(B) 移植13日後にヌードマウスに形成された腫瘍を摘出し、重量を測定した。(n=3, *p<0.05, ***p<0.001 (vs EpoR))

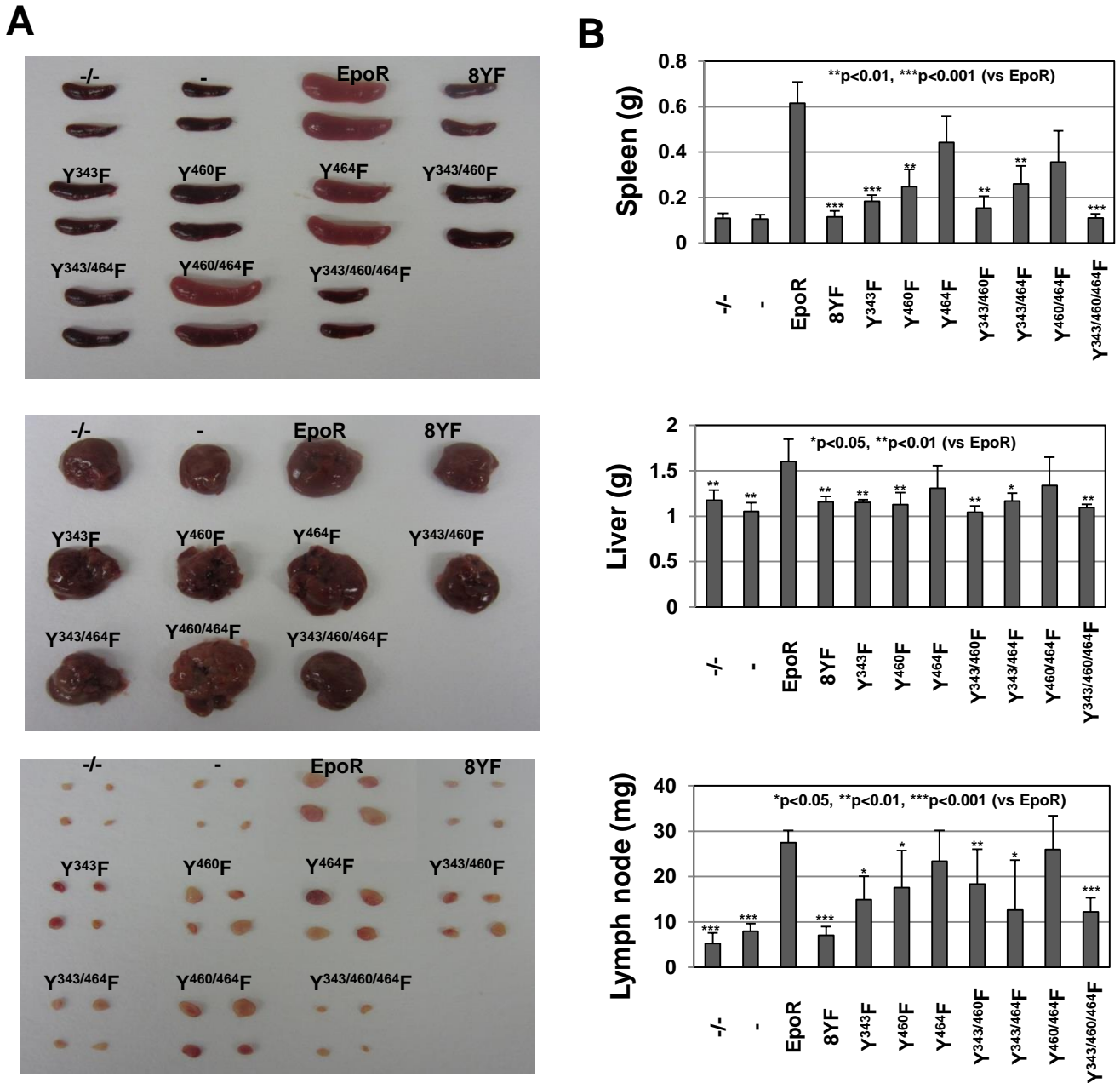


Figure 26. JAK2V617F変異体による脾臓、肝臓、リンパ節の肥大化におけるEpoRのY343, Y460, Y464の役割

Ba/F3細胞に空ウイルス(-)を感染させた。JAK2V617F変異体発現に、レトロウイルス感染により、EpoR、または8YF変異体、Y343F変異体、Y460F変異体、Y464F変異体、Y343/460F変異体、Y343/464F変異体、Y460/464F変異体、Y343/460/464F変異体を発現させた。Ba/F3細胞株(1×10^7)をヌードマウスに皮下注射した。Ba/F3細胞株(1×10^7)をヌードマウスに皮下注射した。(A)移植13日後にヌードマウスの脾臓、肝臓、リンパ節を摘出し、各臓器の写真を撮影した。(B)脾臓、肝臓、リンパ節の重量を測定した。(n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 (vs EpoR))

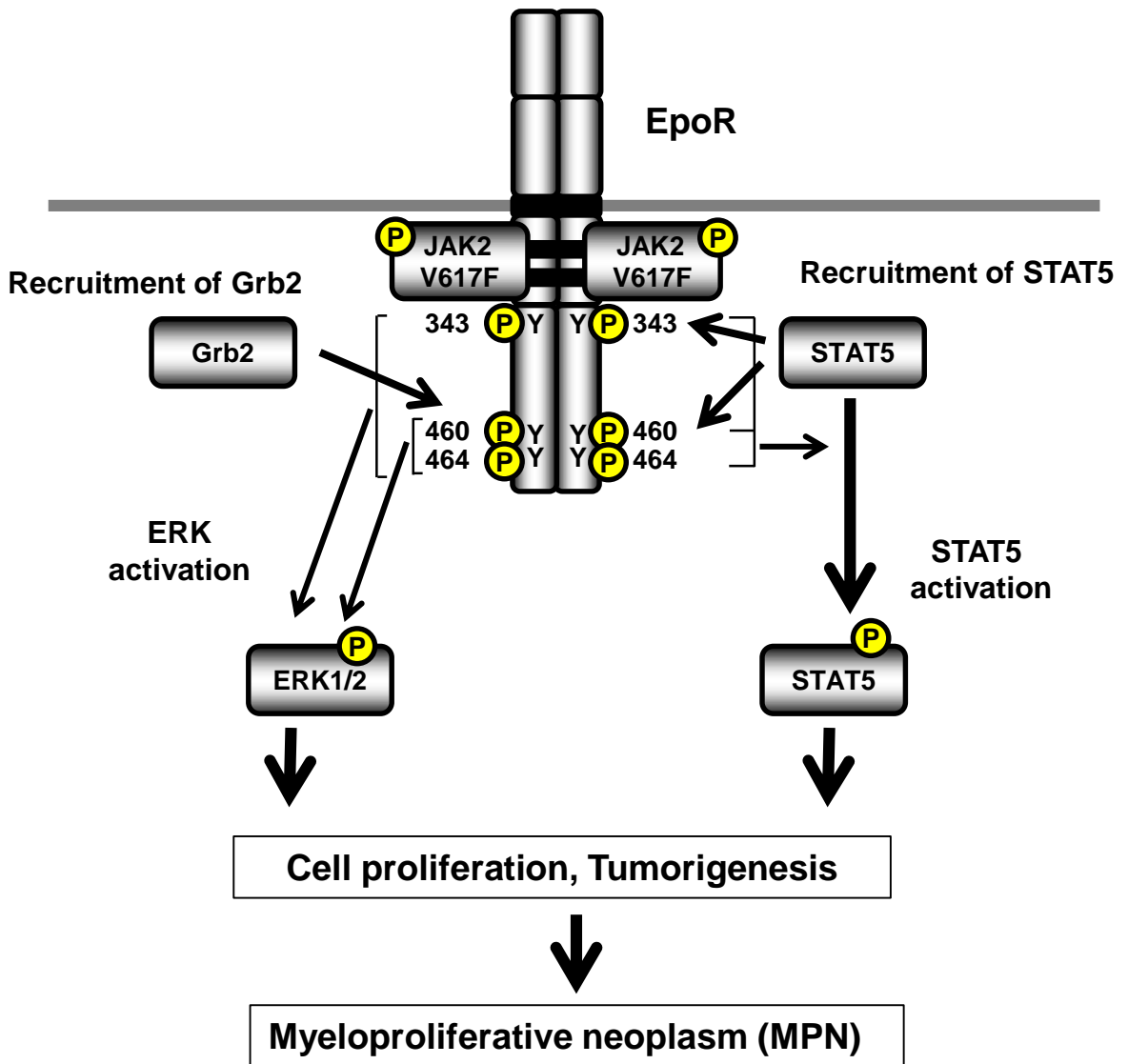


Figure 27. JAK2V617F変異体が示す形質転換におけるEpoR のY343, Y460, Y464のリン酸化の役割
 JAK2V617F変異体は、EpoRと結合した際に恒常的な活性化を示した。活性化したJAK2V617F変異体はEpoRの細胞内ドメインに存在する8個のチロシン残基をリン酸化した。その中で3個のチロシン残基 (Y343, Y460, Y464) が、JAK2V617F変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖や腫瘍形成に重要であった。EpoRのリン酸化されたY343およびY460は、STAT5の結合に関与しており、EpoRのY343, Y460, Y464のリン酸化がSTAT5の活性化に必要であった。一方、Grb2はEpoRのリン酸化されたY460に結合した。また、EpoRのY343とY460のリン酸化およびY343とY464のリン酸化がERK1/2の活性化に必要であった。

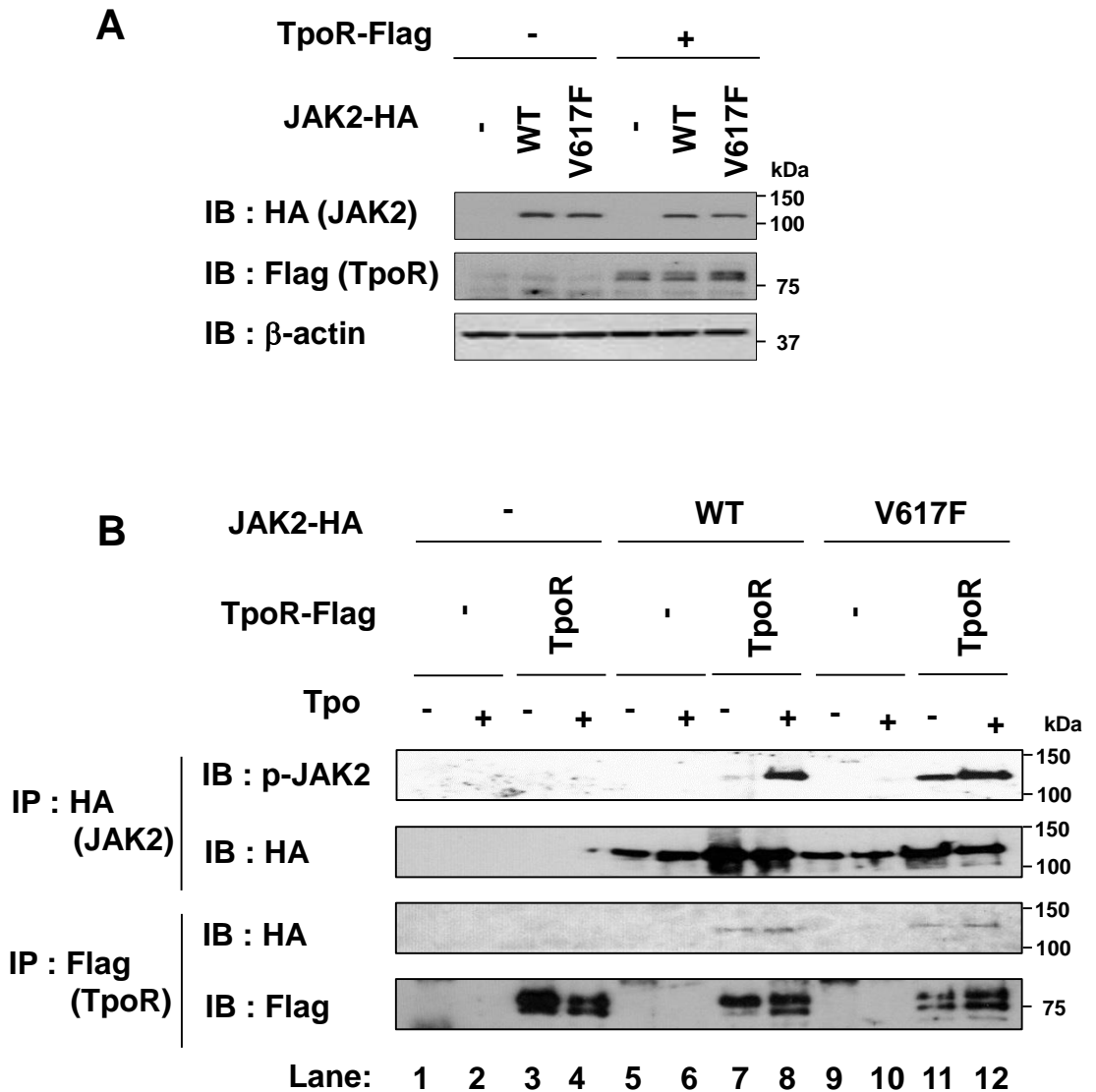


Figure 28. Ba/F3細胞における野生型JAK2 (WT), JAK2V617F変異体、TpoRの発現およびリン酸化
 Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、野生型JAK2 c-HA (WT)、またはJAK2V617F変異体c-HA (V617F) を発現させた後、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag を発現させた。(A) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIで24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗HA抗体、抗Flag抗体、あるいは抗 β -actin抗体を用いて免疫ブロット法を行った。(B) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIを用いて、Tpo (5 ng/mL) 存在下、非存在下で24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗HA抗体あるいは抗Flag抗体を用いて免疫沈降した。抗リン酸化JAK2 (Y1007/1008) 抗体、抗HA抗体、抗Flag抗体を用いて、免疫ブロット法を行った。

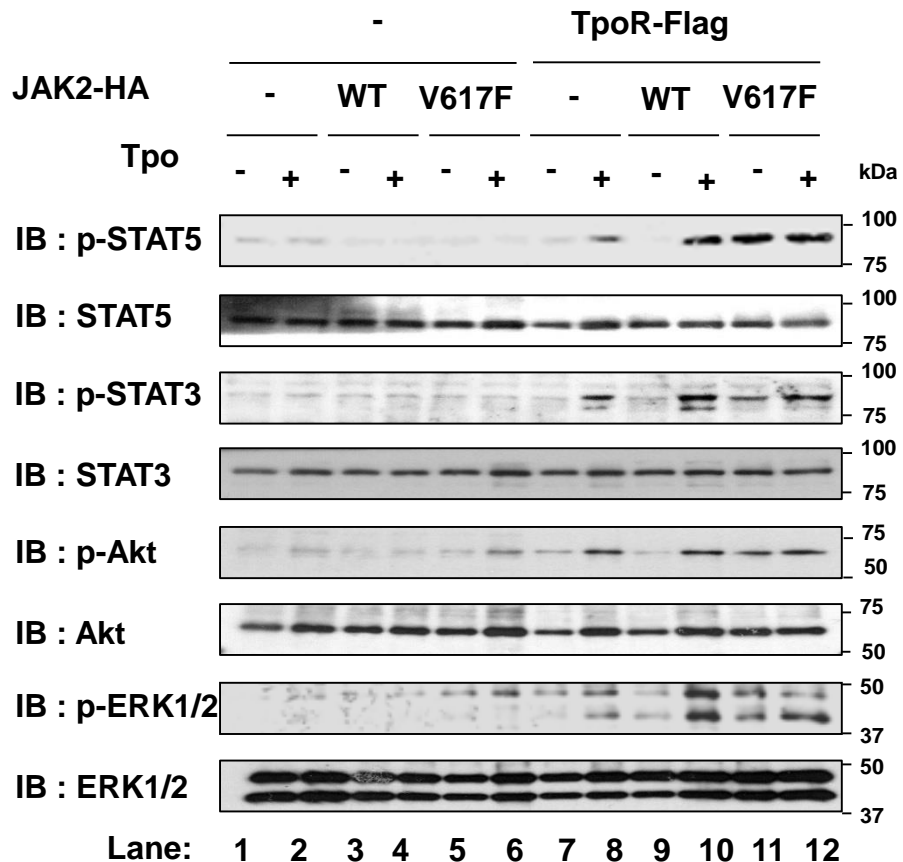
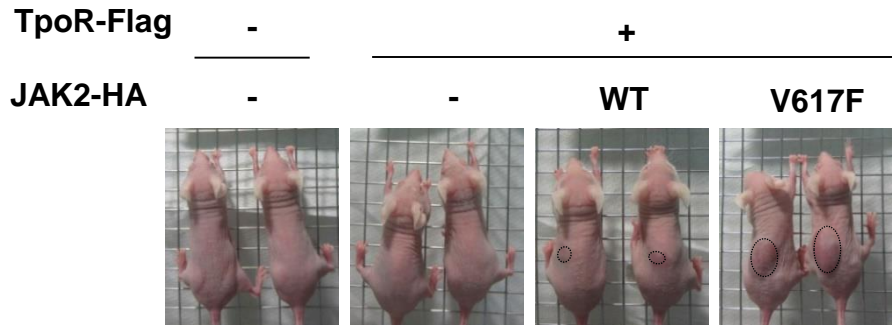


Figure 30. Tpo刺激、あるいはJAK2V617F変異体によるSTAT5, STAT3, Akt, ERKの活性化
 Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、野生型JAK2 (WT)、またはJAK2V617F変異体 (V617F) を発現させた後、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag を発現させた。Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIを用いて、Tpo (5 ng/mL) 存在下、非存在下で24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗リン酸化STAT5 (Y694) 抗体、抗STAT5抗体、抗リン酸化STAT3 (Y705) 抗体、抗STAT3 抗体、抗リン酸化Akt (S473) 抗体、抗Akt抗体、抗リン酸化ERK1/2 (T202/Y204) 抗体あるいは抗ERK1/2抗体を用いて免疫ブロット法を行った。

A



B

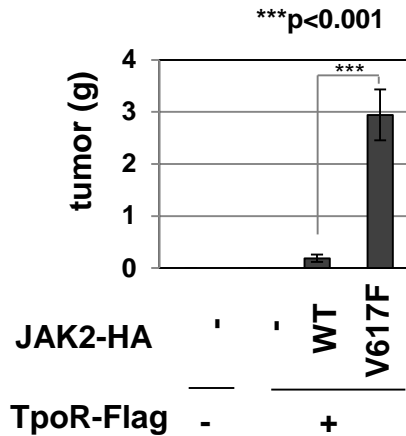


Figure 31. JAK2V617F変異体とTpoRを共発現したBa/F3細胞の移植による腫瘍形成

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、野生型JAK2 (WT)、またはJAK2V617F変異体 (V617F) を発現させた後、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。(A) 移植20日後のヌードマウスの写真を撮影した。(B) 移植21日後にヌードマウスに形成された腫瘍を摘出し、重量を測定した。(n=3, ***p<0.001)

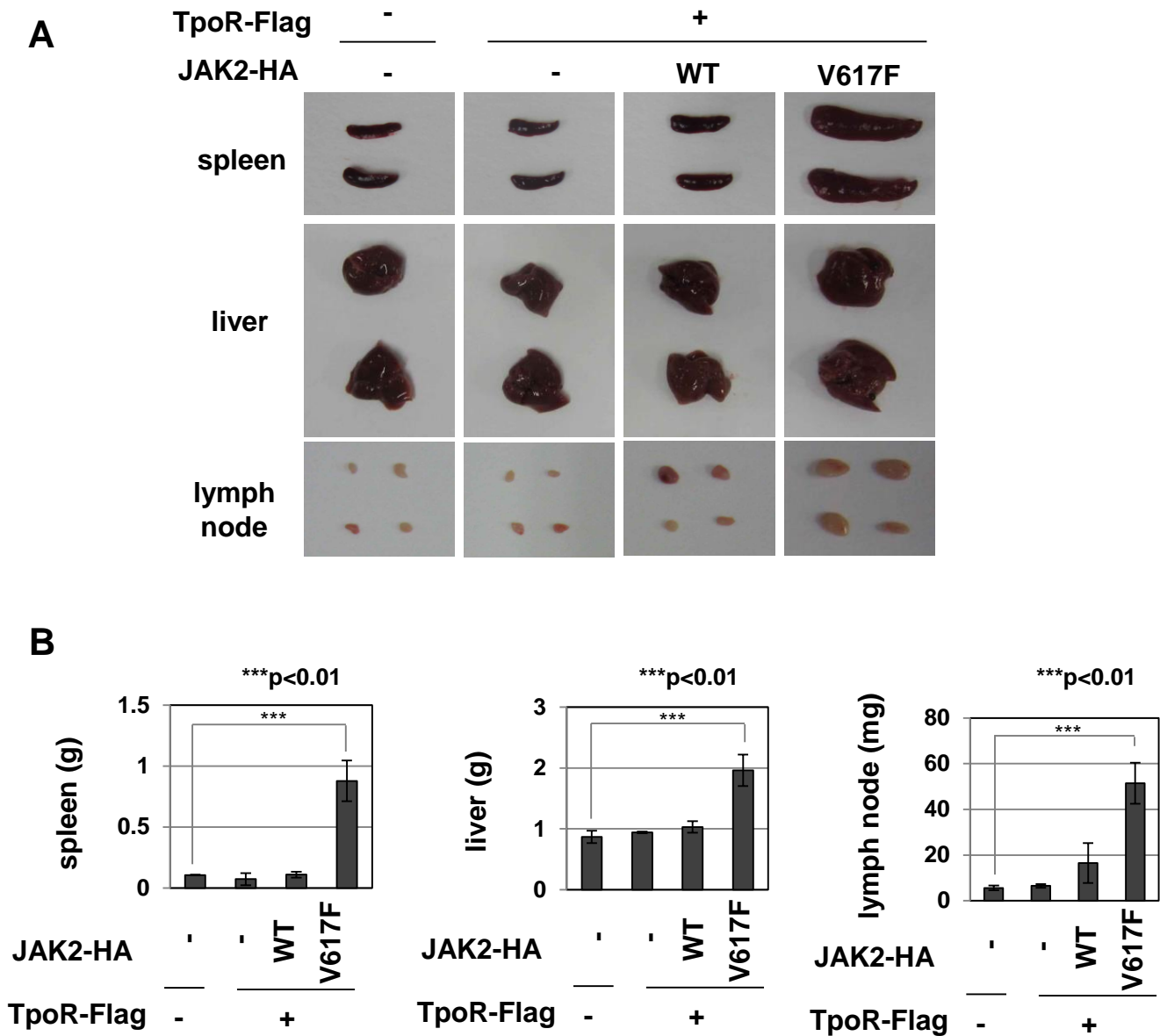


Figure 32. JAK2V617F変異体とTpoRを共発現したBa/F3細胞の移植による脾臓、肝臓、リンパ節の肥大化

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、野生型JAK2 (WT)、またはJAK2V617F変異体 (V617F) を発現させた後、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。移植21日後にヌードマウスの脾臓、肝臓、リンパ節を摘出した。(A) 各臓器の写真を撮影した。(B) 各臓器の重量を測定した。(n=3, ***p<0.001)

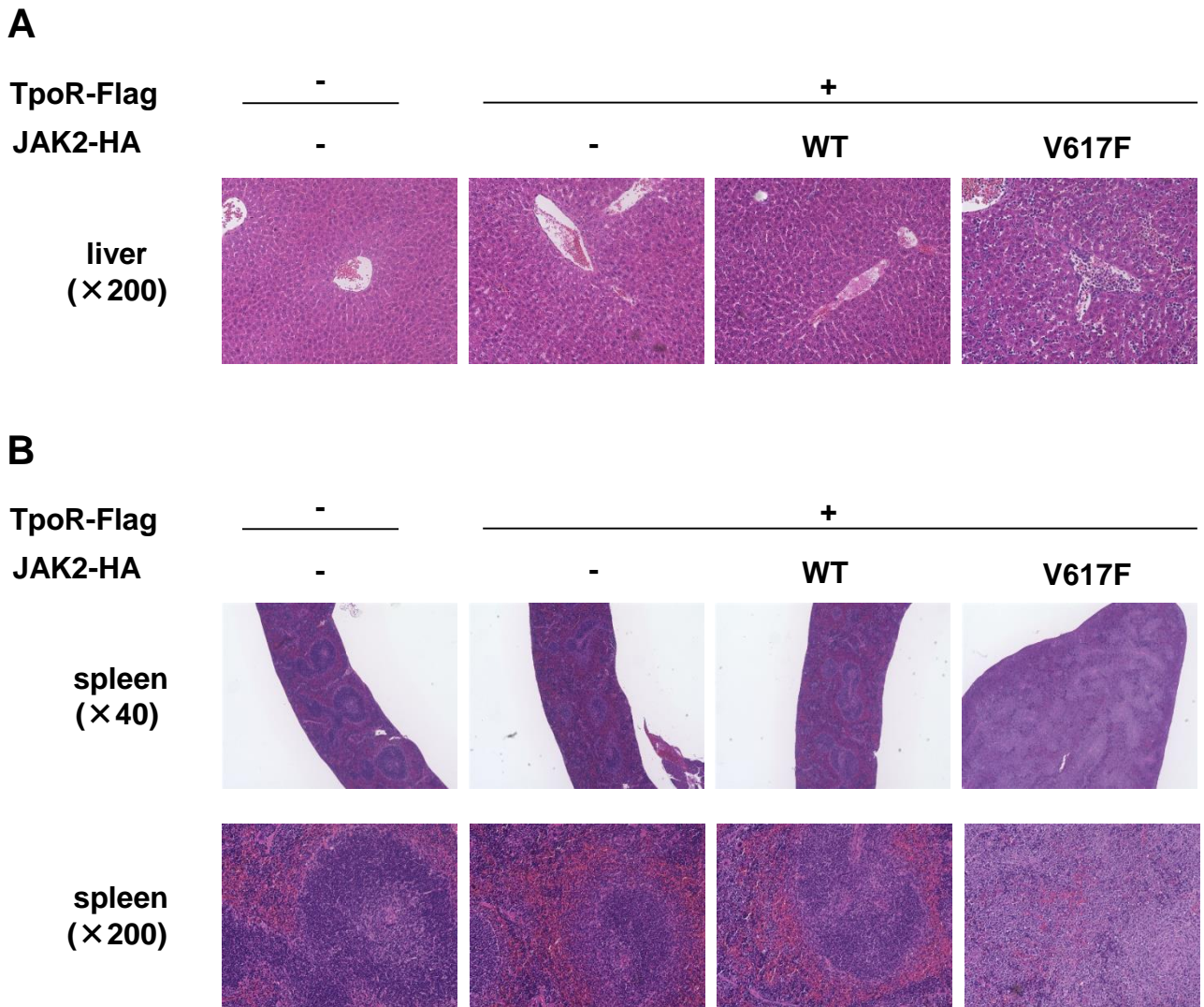


Figure 33. JAK2V617F変異体とTpoRを共発現したBa/F3細胞の移植による脾臓、肝臓の組織の変化
 Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、野生型JAK2 (WT)、またはJAK2V617F変異体 (V617F) を発現させた後、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。移植21日後にヌードマウスの脾臓および肝臓を摘出した。組織切片を作製後、Hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行った。(A, B) All-in-One Fluorescence Microscope (BZ-X710) で、肝臓および脾臓の組織切片を観察した。

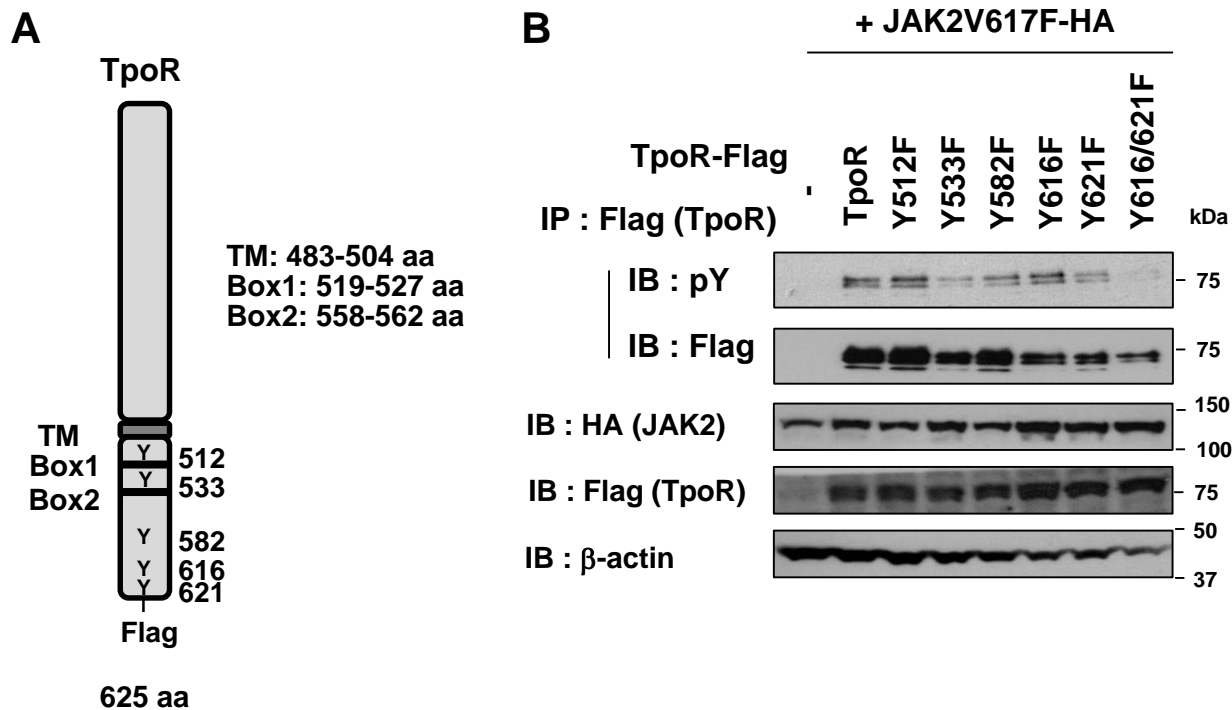


Figure 34. JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞におけるTpoR、TpoR-YF変異体の発現およびリン酸化

(A) TpoR c-Flagの模式図。TpoRの細胞内ドメインには、存在する5個のチロシン残基(Y512, Y533, Y582, Y616, Y621)が存在する。TMは膜貫通ドメインを表している。JAK2はEpoRのBox 1およびBox 2を介して結合する。(B) JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoR c-FlagあるいはTpoR-YF変異体 c-Flag (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F)を発現させた。Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIで24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗Flag抗体で免疫沈降後(IP: Flagと表記)、抗リン酸化チロシン(pY)抗体あるいは抗Flag抗体を用いてイムノブロット法を行った。細胞溶解液を作成し、抗リン酸化JAK2(Y1007/1008)抗体、抗HA抗体、抗Flag抗体、あるいは抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。

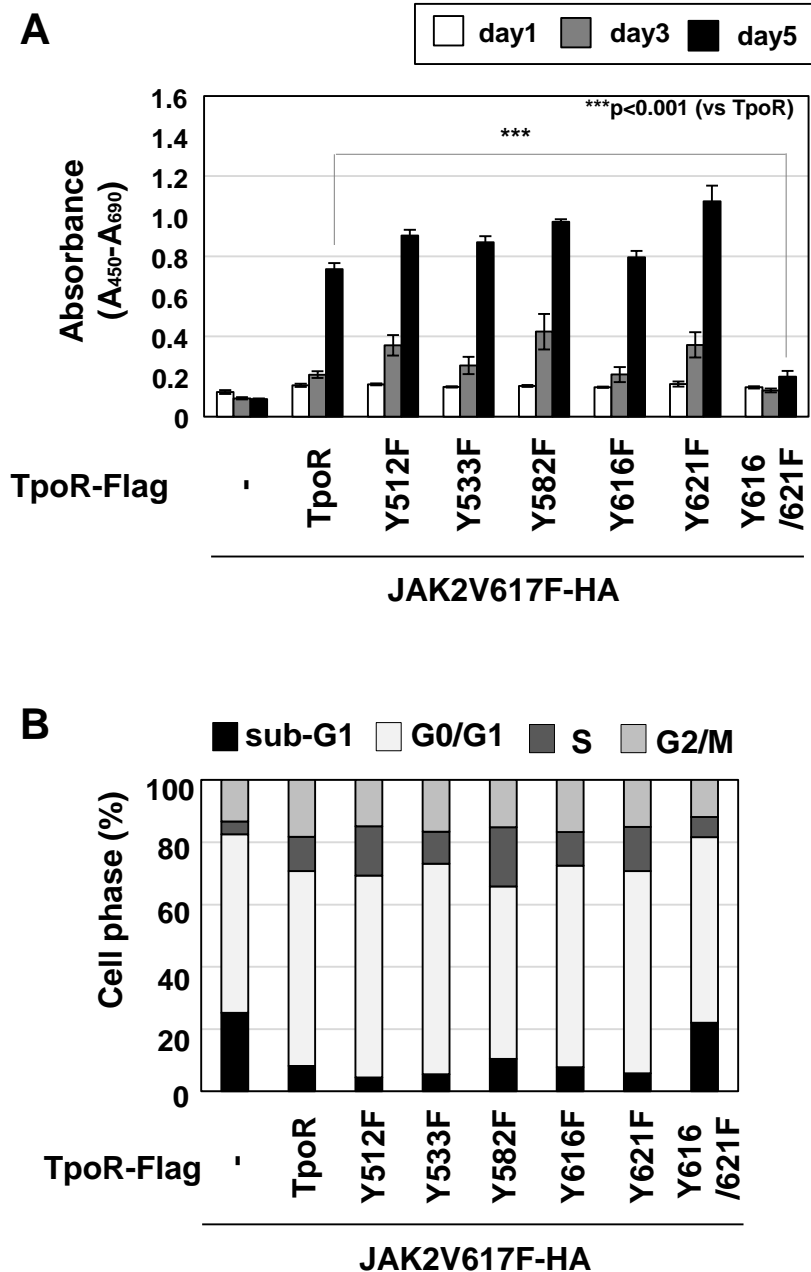


Figure 35. JAK2V617F変異体による細胞増殖および細胞生存におけるTpoR-YF変異体の役割
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoRあるいはTpoR-YF変異体 (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F) を発現させた。(A) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIを用いて、5日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, ***p<0.001 vs TpoR) (B) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIを用いて、48時間培養した。細胞を固定し、propidium iodide (PI) で染色後、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。

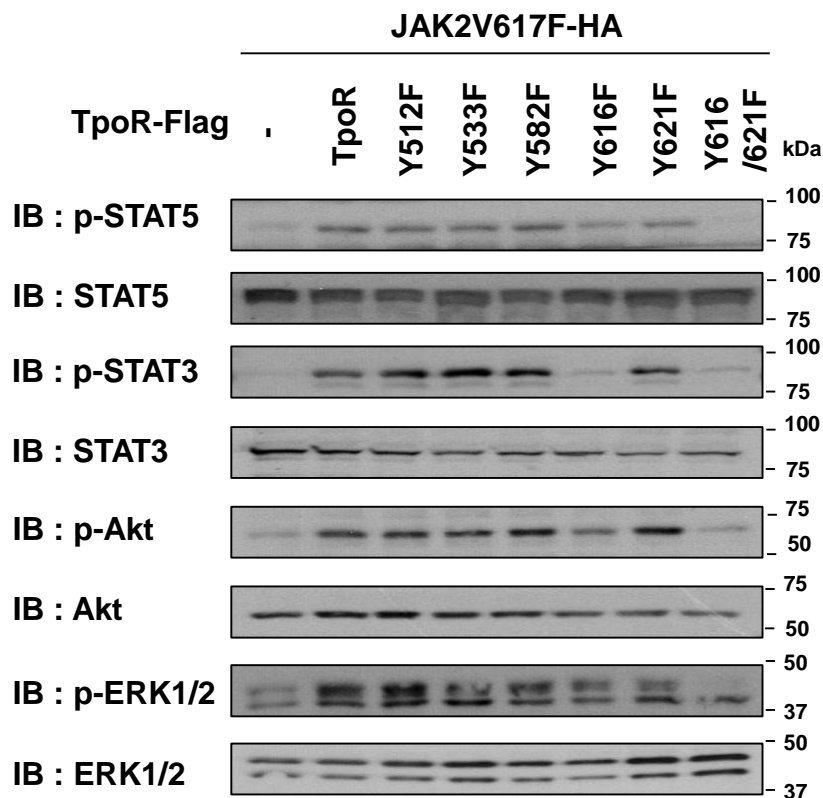


Figure 36. JAK2V617F変異体によるSTAT5, STAT3, Akt, ERKの活性化におけるTpoR-YF変異体の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoRあるいはTpoR-YF変異体(Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F)を発現させた。(A) Ba/F3細胞株を1% FBS含有RPMIを用いて、24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗リン酸化STAT5 (Y694) 抗体、抗STAT5抗体、抗リン酸化STAT3 (Y705) 抗体、抗STAT3 抗体、抗リン酸化Akt (S473) 抗体、抗Akt抗体、抗リン酸化ERK1/2 (T202/Y204) 抗体、あるいは抗ERK1/2抗体を用いて免疫ブロット法を行った。

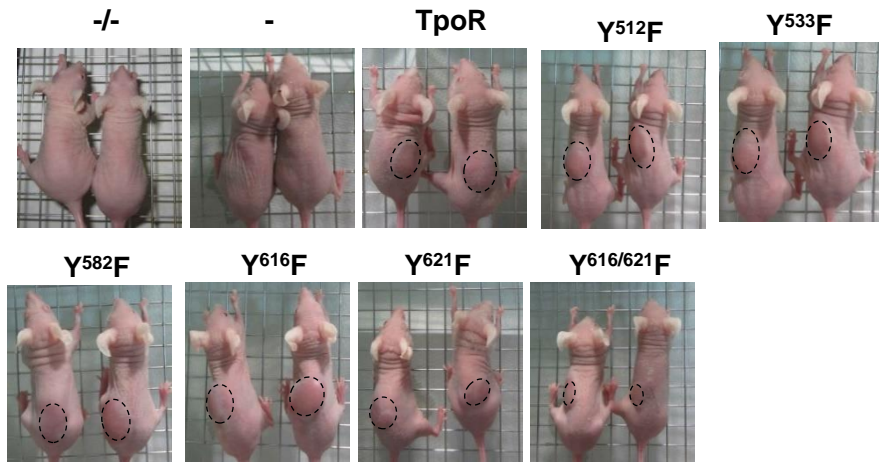
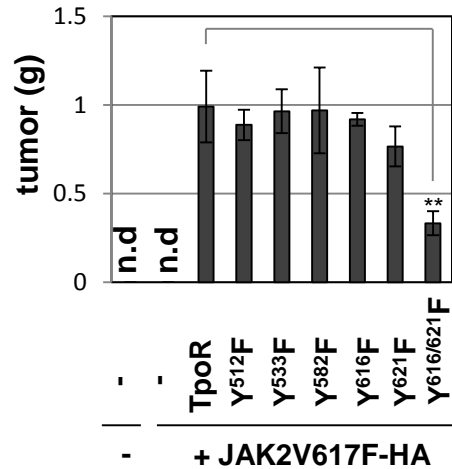
A**B**

Figure 37. JAK2V617F変異体による腫瘍形成におけるTpoR-YF変異体の役割

JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoRあるいはTpoR-YF変異体(Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F)を発現させた。Ba/F3細胞株(1×10^7)をヌードマウスに皮下注射した。(A) 移植20日後のヌードマウスの写真を撮影した。(B) 移植21日後にヌードマウスに形成された腫瘍を摘出し、重量を測定した。(n=3, **p<0.01)

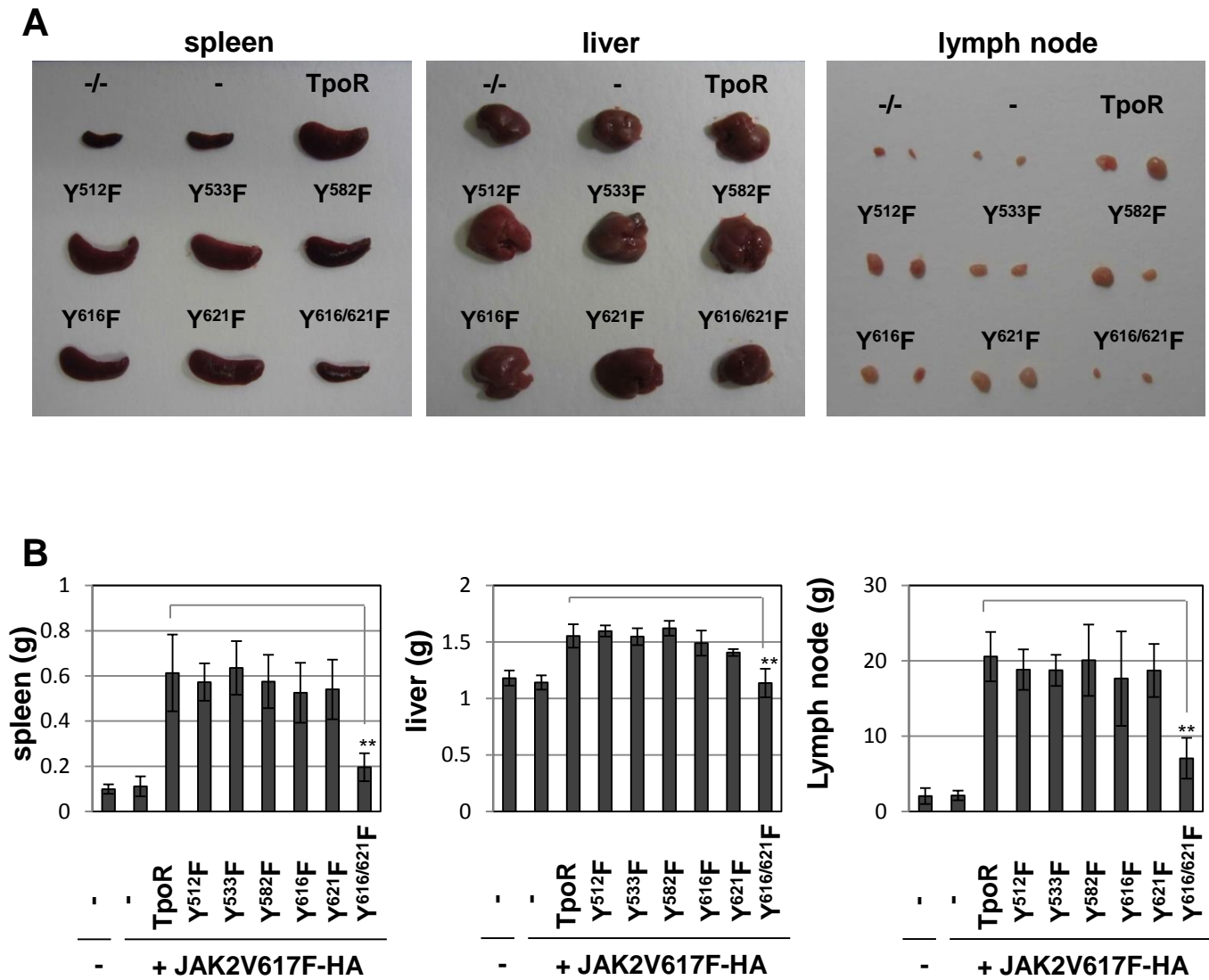


Figure 38. JAK2V617F変異体による脾臓、肝臓、リンパ節の肥大化におけるTpoR-YF変異体の役割
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoRあるいはTpoR-YF変異体 (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F) を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。移植21日後にヌードマウスの脾臓、肝臓、リンパ節を摘出した。(A) 各臓器の写真を撮影した。(B) 各臓器の重量を測定した。(n=3, **p<0.01)

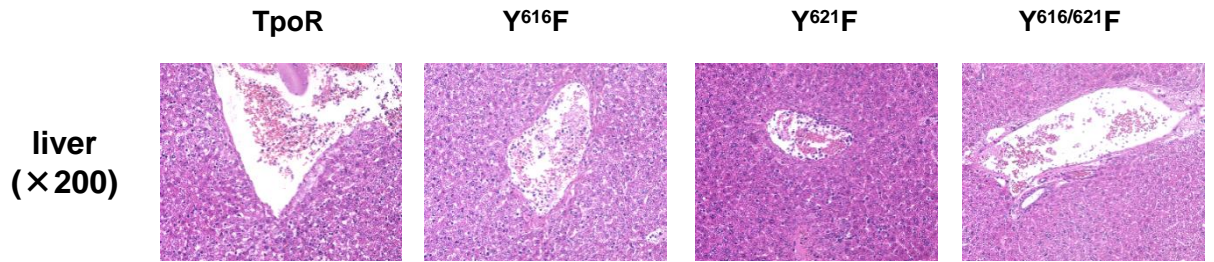
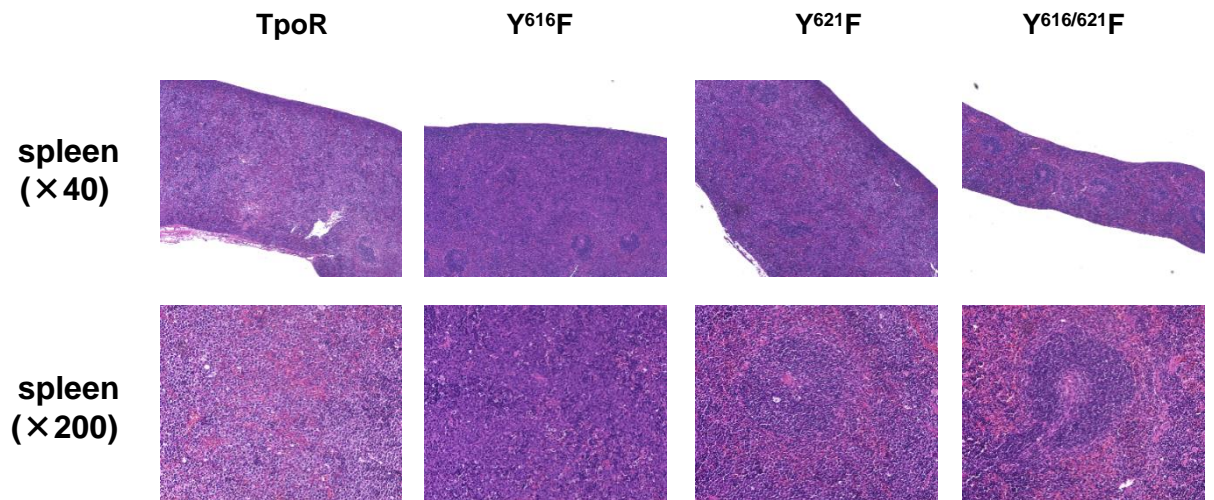
A**+ JAK2V617F-HA****B****+ JAK2V617F-HA**

Figure 39. JAK2V617F変異体による肝臓および脾臓の組織変化におけるTpoR-YF変異体の役割
 JAK2V617F変異体発現Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoR、Y616F変異体、Y621F変異体あるいはY616/621F変異体を発現させた。Ba/F3細胞株 (1×10^7) をヌードマウスに皮下注射した。移植21日後にヌードマウスの脾臓および肝臓を摘出した。組織切片を作製後、Hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行った。(A, B) All-in-One Fluorescence Microscope (BZ-X710)で、肝臓および脾臓の組織切片を観察した。

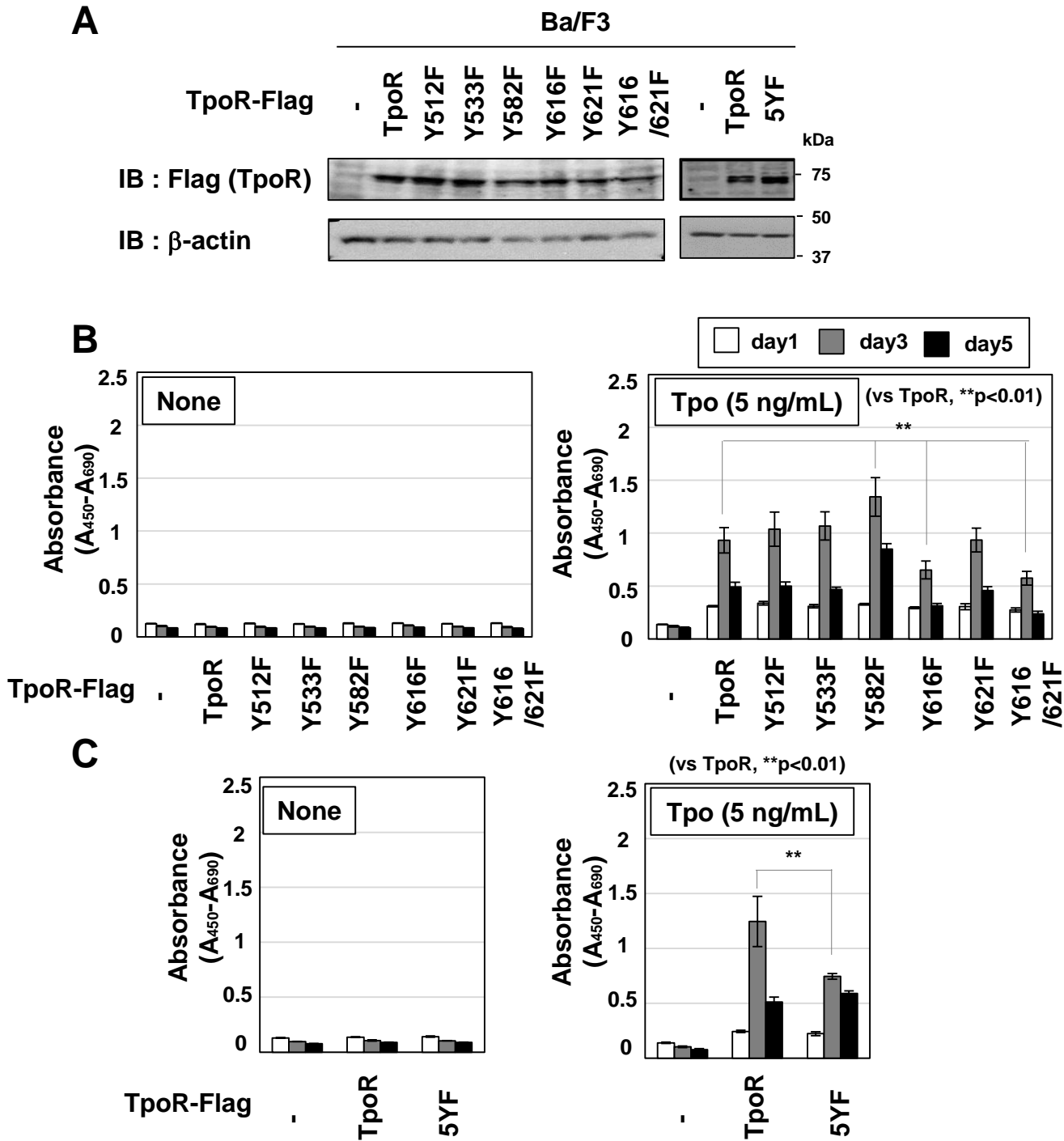


Figure 40. Tpo刺激による細胞増殖におけるTpoR-YF変異体の役割

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag、TpoR-YF変異体 c-Flag (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F, 5YF) を発現させた。(A) 細胞溶解液を作成し、抗Flag抗体、あるいは抗 β -actin抗体を用いてイムノブロット法を行った。(B, C) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をTpo (5 ng/mL) 存在下、非存在下で5日間培養した。WST-1 assayにより細胞増殖能を測定した。(n=4, **p<0.01 (vs TpoR))

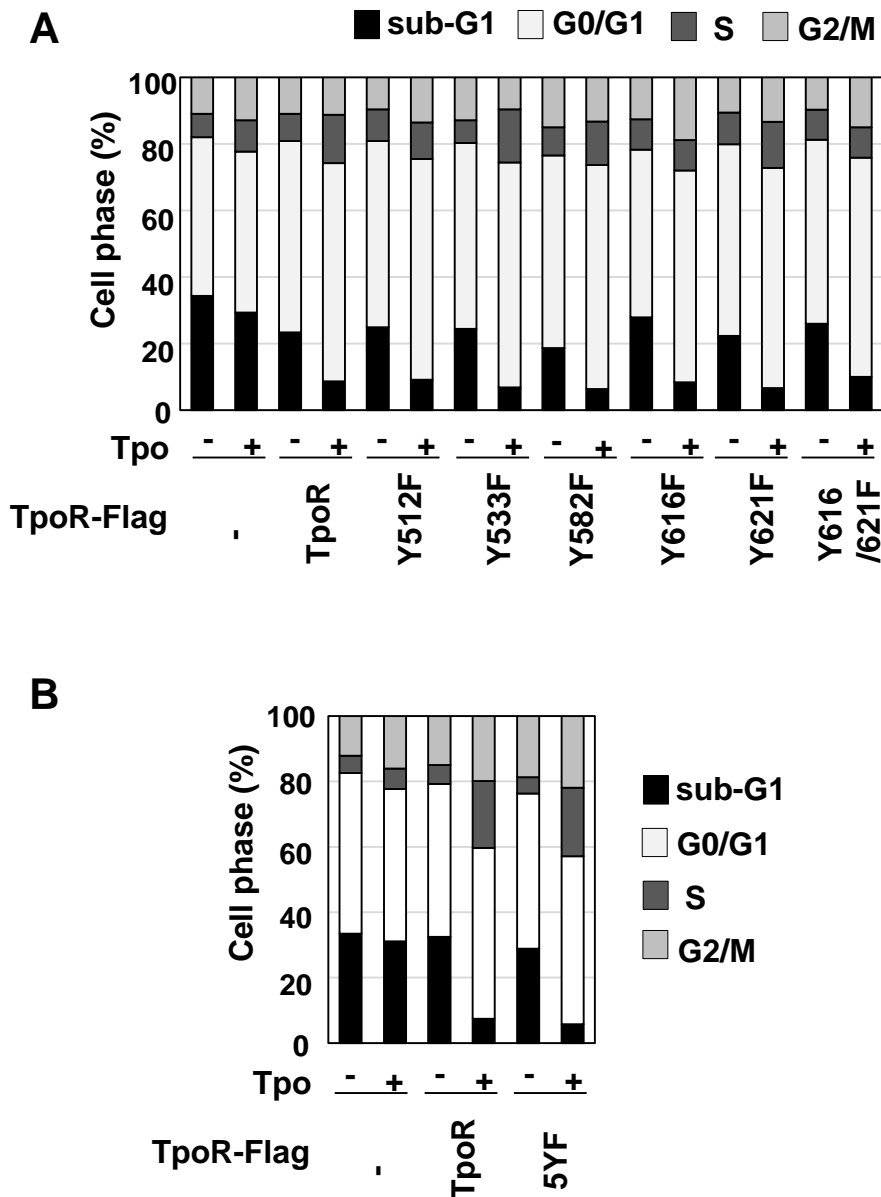


Figure 41. Tpo刺激による細胞周期の変化におけるTpoR-YF変異体の役割

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag、TpoR-YF変異体 c-Flag (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F, 5YF) を発現させた。(A, B) 1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をTpo (5 ng/mL) 存在下、非存在下で48時間培養した。細胞を固定し、propidium iodide (PI) で染色後、フローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。

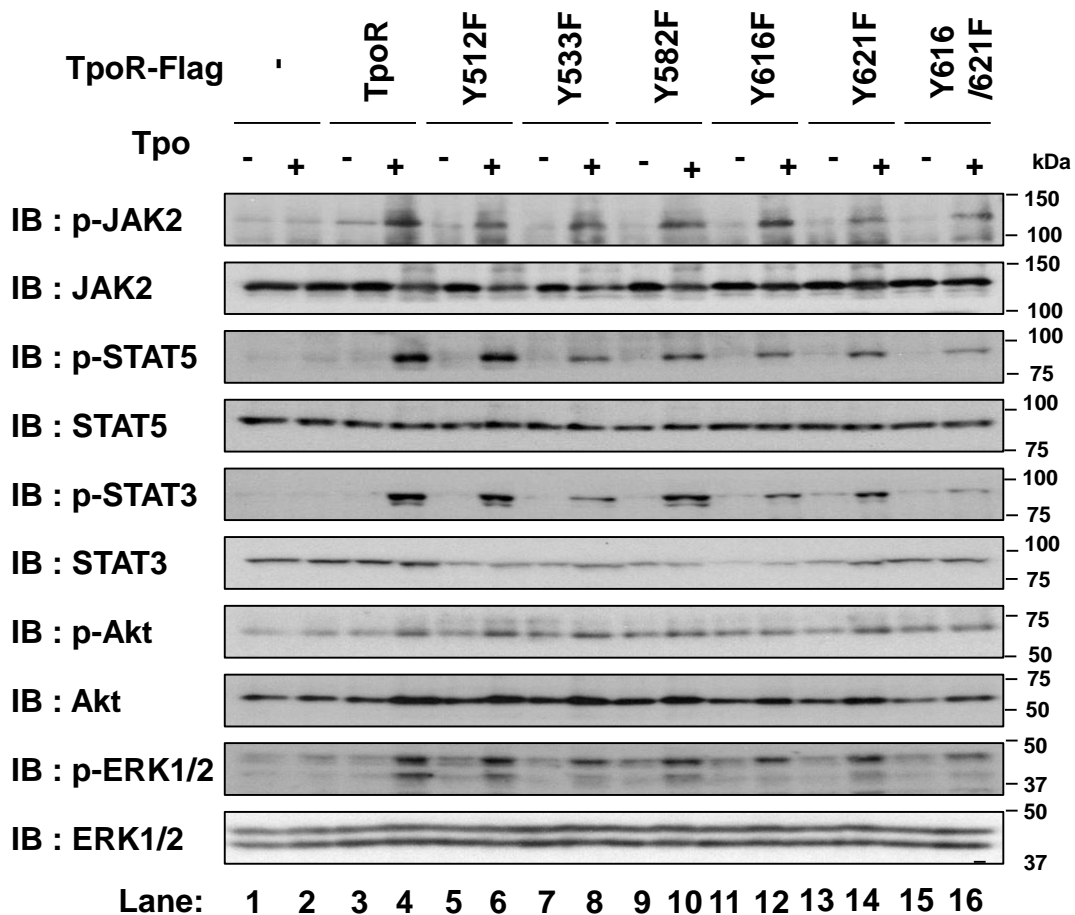


Figure 42. Tpo刺激によるJAK2、STAT5、STAT3、Akt、ERK1/2の活性化におけるTpoR-YF変異体の役割

Ba/F3細胞に、レトロウイルス感染により、TpoR c-Flag、TpoR-YF変異体 c-Flag (Y512F, Y533F, Y582F, Y616F, Y621F, Y616/621F) を発現させた。1% FBS含有RPMIを用いて、Ba/F3細胞株をTpo (5 ng/mL) 存在下、非存在下で24時間培養した。細胞溶解液を作成し、抗リン酸化JAK2 (Y1007/1008) 抗体、抗JAK2抗体、抗リン酸化STAT5 (Y694) 抗体、抗STAT5抗体、抗リン酸化STAT3 (Y705) 抗体、抗STAT3抗体、抗リン酸化Akt (S473) 抗体、抗Akt抗体、抗リン酸化ERK1/2 (T202/Y204) 抗体、あるいは抗ERK1/2抗体を用いてイムノブロット法を行った。

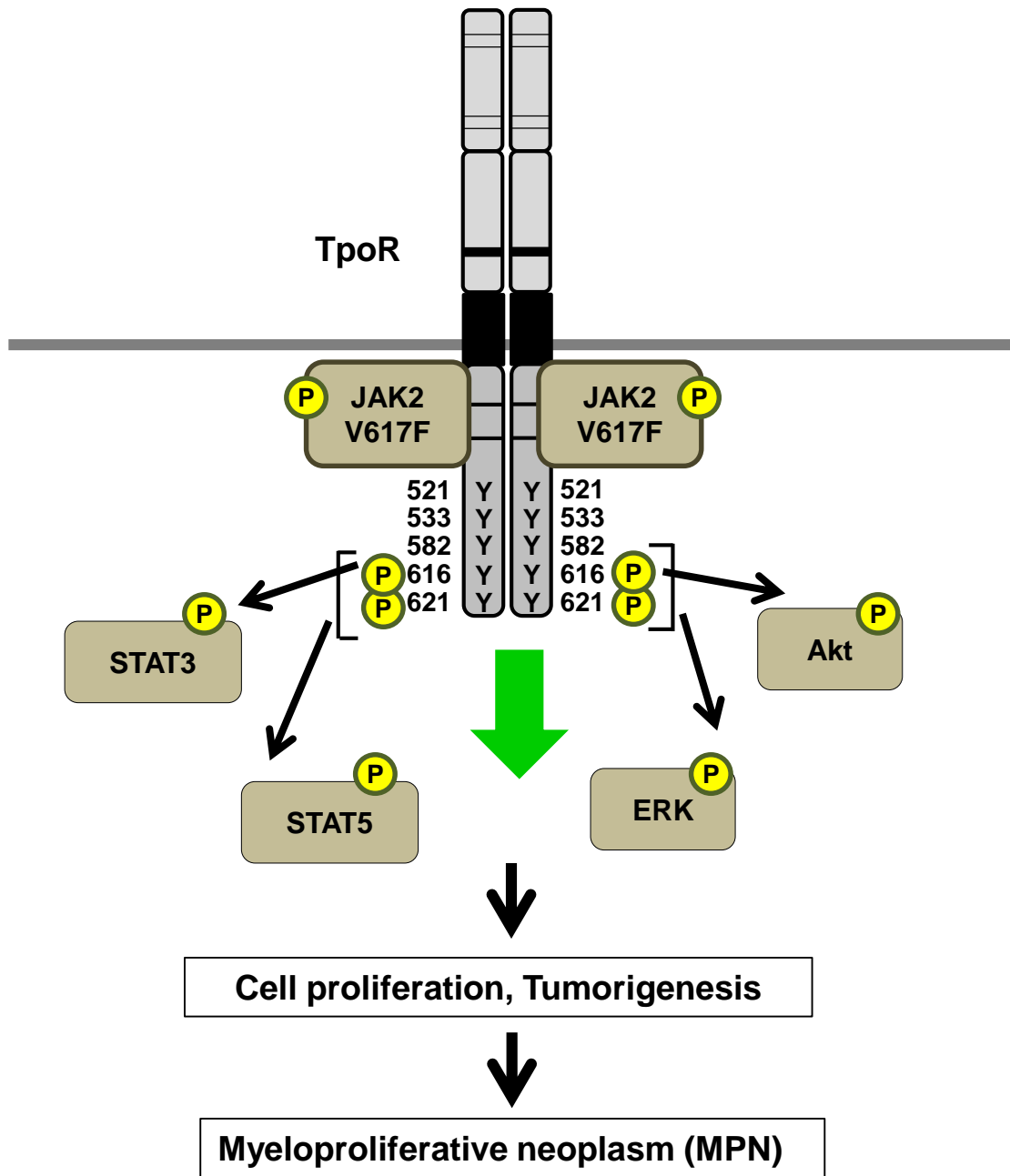


Figure 43. JAK2V617F変異体が示す形質転換におけるTpoR のY616, 621のリン酸化の役割
 JAK2V617F変異体は、TpoRと結合した際に恒常的な活性化を示した。活性化したJAK2V617F変異体はTpoRの細胞内ドメインに存在する2個のチロシン残基(Y616, Y621)をリン酸化した。JAK2V617F変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖や腫瘍形成には、TpoRのY616とY621のリン酸化が必要であった。TpoRのY616のリン酸化を介して、STAT3やAktの活性化が誘導されたのに対し、リン酸化されたY616, Y621がSTAT5やERKの活性化に関与すると考えられた。

5. 考察

これまでにいくつかの研究グループから、JAK2V617F 変異体の恒常的な活性化やそれに伴う形質転換に、EpoR や TpoR をはじめとするホモダイマーを形成する I 型サイトカイン受容体が必要であることが報告されている [11, 12, 36, 43]。JAK2 の FERM ドメインは、サイトカイン受容体との結合に重要な領域であるが [44, 45]、これまでに、JAK2 の FERM ドメインに存在する Y119 が自己リン酸化されると、EpoR との結合能が低下し、活性が阻害されることが明らかになっている [46]。実際、JAK2V617F 変異体の Y119 をグルタミン酸に置換したリン酸化を模倣した変異体 (JAK2V617F/Y119E) は、EpoR を共発現しても、活性化されず、形質転換能も欠失する [43]。さらに、Wernig らは、JAK2V617F 変異体に、FERM ドメインの機能を欠損する Y114A という別の変異を導入した際にも、EpoR との共発現による活性化が誘導されないことを報告しており [47]、JAK2V617F 変異体の恒常的な活性化には、サイトカイン受容体との結合が不可欠であると考えられた。

本研究では、JAK2V617F 変異体によるサイトカイン非依存的な細胞増殖に、EpoR や TpoR のリン酸化が必要であることを初めて明らかにした。しかしながら、JAK2V617F 変異体と共に、リン酸化されない EpoR-8YF や TpoR-Y616/621F を共発現した細胞をヌードマウスに移植した際、わずかながら腫瘍の形成が観察された。また、Lu らはこれまでに、JAK2V617F 変異体と EpoR-8YF 変異体を共発現させた Ba/F3 細胞が、わずかに増殖能を示すことを報告している [11]。今回、私達は、1% FBS 含有培地を用いて、各 Ba/F3 細胞株の増殖能を検討したが、Lu らは 10% FBS 含有培地の条件で実験を行っている。用いた血清の濃度の違いが、得られた結果に違いを生じた可能性が考えられる。一方、Fig. 4 および Fig. 42 に示すように、EpoR-8YF 変異体や TpoR-Y616/621F 変異体は、Epo や Tpo 刺激による細胞増殖を部分的に抑制しただけであった。このことから、EpoR や TpoR のリン酸化は、JAK2V617F 変異体による細胞増殖に必須であるが、サイトカイン刺激による細胞増殖には必要ではないと

考えられた。また、EpoR-8YF 変異体を発現した Ba/F3 細胞では、Epo 刺激による STAT5 の Y694 のリン酸化がほぼ完全に抑制されることを見出しており (data not shown)、Epo 刺激による細胞増殖には、STAT5 以外の別のシグナル分子が関与していることが示唆された。これまでに、Halupa らは、EpoR を発現した Ba/F3 細胞と比較して、8YF 変異体を発現した Ba/F3 細胞では、Epo 刺激による ERK1/2 のリン酸化が、遅延して誘導されることを報告している [48]。よって、ERK の活性化が、Epo 刺激による細胞増殖に関与している可能性がある。TpoR-Y616/621F 変異体を発現した Ba/F3 細胞においても、Tpo 存在下では、弱いながらも、ERK1/2 のリン酸化が誘導されており、TpoR のリン酸化を介さずに誘導される細胞増殖においても、ERK の活性化が関与する可能性が考えられた。

今回、EpoR の 3 個のチロシン残基、Y343、Y460、Y464 のリン酸化や TpoR の 2 個のチロシン残基 Y616、Y621 のリン酸化が、JAK2V617F 変異体による形質転換に重要であることを示した。しかしながら、EpoR や TpoR のリン酸化状態は、JAK2V617F 変異体の活性化には必要ではなかった。したがって、JAK2V617F 変異体は、EpoR や TpoR と結合することで活性化し、EpoR や TpoR のリン酸化を誘導することにより、発がんシグナルを活性化することが明らかになった (Fig. 27, 43)。Fig. 2 において、JAK2V617F 変異体は、JAK2^{-/-}MEF に発現しただけでリン酸化され、EpoR の発現により、JAK2V617F 変異体のリン酸化が亢進した。一方、JAK2V617F 変異体は、Ba/F3 細胞に発現しただけではリン酸化されなかった (Fig. 3C)。ホモダイマーを形成する I 型サイトカイン受容体には、EpoR や TpoR 以外に、成長ホルモン受容体 (growth hormone receptor :GR) が含まれる。GR は広範な組織や細胞に発現が認められ、JAK2 と会合することが知られている。したがって、JAK2^{-/-}MEF において観察された JAK2V617F 変異体のリン酸化は、内在性の GR との結合を介して生じている可能性が考えられた。

本研究を通して、EpoR の Y343、Y460、Y464 のリン酸化は、STAT5 の full activation に必要であることを明らかにした (Fig. 16, 17, 21, 22)。これまでに、shRNA により、STAT5 の発

現を抑制すると、JAK2V617F 変異体と EpoR を共発現した Ba/F3 細胞の増殖能や腫瘍形成能が顕著に抑制されることを見出している。また、STAT5 の恒常的活性化型変異体を過剰発現させた Ba/F3 細胞は、サイトカイン非依存的な細胞増殖を誘導し、顕著な腫瘍形成能を示すことを明らかにしており、JAK2V617F 変異体による形質転換に、STAT5 が重要な役割を果たすと考えられている [36]。EpoR の Y343、Y460、Y464 の中でも、Y343 や Y460 のリン酸化には、STAT5 を EpoR へリクルートする役割があったが (Fig. 15)、Y343 や Y460 のリン酸化だけでは、STAT5 の full activation を誘導することはできなかった。また、JAK2V617F 変異体と共に、6YF-Y460/464 変異体を発現しても、STAT5 の標的遺伝子を発現しなかったが、6YF-Y343/460 変異体や 6YF-Y343/464 変異体を共発現した細胞では、STAT5 の標的遺伝子の発現が部分的に誘導された。したがって、STAT5 の活性化には、EpoR の Y343、Y460、Y464 すべてのリン酸化が必要であるが、これら 3 個のチロシン残基の中で、Y343 のリン酸化が、STAT5 の活性化に最も寄与していると推察された。

一方、EpoR の Y464 は、Grb2 が結合するコンセンサス配列 (YXNX) に位置し、これまでに、Epo 刺激によってリン酸化された EpoR の Y464 に、Grb2 が結合することが報告されている [16]。しかしながら、今回、JAK2V617F 変異体によって形質転換した細胞において、Grb2 は、Y464 ではなく Y460 と結合することが分かった (Fig. 15)。また、EpoR-Y460F 変異体は Grb2 と結合できないことを確認している (data not shown)。EpoR の Y464 単独のリン酸化では、JAK2V617F 変異体による ERK の活性化を誘導するのに不十分であったが (Fig. 16)、JAK2V617F 変異体と共に、6YF-Y343/464 変異体や 6YF-Y460/464 変異体を発現した細胞では、ERK1/2 の活性化が誘導された。したがって、EpoR の 3 個のチロシン残基の中で、Y464 のリン酸化は、ERK の活性化に最も重要であると考えられた。これらの結果から、EpoR の下流で活性化される STAT5 や ERK が、JAK2V617F 変異体による形質転換に重要である可能性が考えられた。また、JAK2V617F 変異体と共に、TpoR-Y616F 変異体を発現すると、STAT3 や Akt の活性化は抑制されたが、細胞増殖は抑制されなかった。さらに、

JAK2V617F 変異体と TpoR-Y616/621F 変異体を共発現すると、STAT5 や ERK の活性化が抑制され、細胞増殖も抑制された。以上の結果より、特に、EpoR や TpoR を介して誘導される STAT5 や ERK の活性化が、JAK2V617F 変異体による形質転換に重要であることが強く示唆された。これまでに、JAK2V617F 変異体発現細胞において、STAT3 を siRNA によりノックダウンしても、細胞増殖が抑制されないことが報告されている [49]。また、JAK2V617F 変異体のノックインマウスにおいて STAT3 を欠損させると、血中の好中球の数や骨髄および脾臓における造血幹細胞の数が増加し、マウスの生存率が著しく減少するなど、MPN 様の症状が悪化することが報告されている [50]。したがって、STAT3 の活性化が、JAK2V617F 変異体による形質転換に必要なではない可能性が考えられた。今後、RNA 干渉法や阻害剤を用いて、JAK2V617F 変異体と EpoR や TpoR を発現した Ba/F3 細胞における STAT5、STAT3、Akt、ERK の役割を検証することが重要である。

また、これまでに、EpoR の 8 個のチロシン残基のうち、Y343 以外のチロシン残基を含む細胞内ドメインを欠損した EpoR-H 変異体は、JAK2V617F 変異体による腫瘍形成や STAT5 の活性化を誘導することを報告している [36]。また、この EpoR-H 変異体の Y343 をフェニルアラニンに置換した EpoR-HM 変異体は、JAK2V617F 変異体による STAT5 の活性化や細胞増殖を抑制することを示している。これらの知見は、JAK2V617F 変異体の下流で、EpoR の Y343、Y460、Y464 や TpoR の Y616、Y621 のリン酸化を介して誘導される様々なシグナル分子の中でも、STAT5 が発がん誘導機構において最も重要な役割を果たすことを示唆するものである。

Fig. 17, 22 に示すように、STAT5 のそれぞれの標的遺伝子に対して、EpoR の各リン酸化チロシン残基は別の役割を持ち、それぞれのチロシン残基のリン酸化の組み合わせによって、異なる遺伝子発現誘導のパターンを示すことが明らかになった。現時点では、STAT5 標的遺伝子の発現誘導機構における EpoR のリン酸化の詳細な役割は明らかになっていないが、1 つの仮説として、標的遺伝子ごとに異なる STAT5 複合体が形成され、各標的遺伝子の

発現を制御している可能性が考えられる。これまでに、活性化した STAT5 は、ダイマーを形成するだけでなく、N 末端側領域を介してテトラマーを形成し、DNA に結合し遺伝子発現を制御することが知られている [51, 52]。多くの白血病患者由来の骨髄や末梢血から採取した白血病芽細胞では、ダイマーを形成した STAT5 よりも、テトラマーを形成した STAT5 が多く存在することが報告されており、STAT5 のテトラマー形成と白血病発症との関連性が示唆されている [53, 54]。現在までに、STAT5 の N 末端側領域に変異を導入することにより、STAT5 のテトラマー形成を阻害した STAT5A-STAT5B のダブルノックインマウスが作成されている。このマウス由来の T 細胞を用いた実験により、IL-2 刺激後、テトラマーを形成した STAT5 により特異的に発現が誘導される遺伝子群が同定され、その代表的な遺伝子として IL-2R α が見出された [55]。今回、解析した STAT5 の標的遺伝子の中で、JAK2V617F 変異体と EpoR 変異体を発現した各細胞の IL-2R α の mRNA の発現誘導能と、細胞増殖能や腫瘍形成能には、高い相関が認められた (Fig. 11, 13, 17, 22)。したがって、JAK2V617F 変異体発現細胞において、EpoR の Y343, Y460, Y464 のリン酸化を介して、STAT5 のテトラマー形成が誘導されている可能性が考えられた。また、STAT5 は、チロシン残基がリン酸化されるだけでなく、セリン残基もリン酸化されることが知られている。STAT5 のチロシンリン酸化がダイマー形成や DNA 結合活性に重要であるのに対し、セリン残基のリン酸化は転写活性の増強に関与すると考えられている [56, 57]。Pircher らは、ERK が直接 STAT5a に結合し、STAT5a の S780 をリン酸化することを証明している [38]。しかしながら、本研究では STAT5 の S780 のリン酸化は恒常的に観察され、JAK2V617F 変異体や EpoR 変異体の発現によって、STAT5 の S780 のリン酸化レベルは変化しなかった (Fig. 16, 21)。よって、ERK 以外の分子が STAT5 の S780 のリン酸化を制御しているのではないかと考えられた。また、Friedbichler らは、白血病細胞では、STAT5 のセリン残基 (S725 in STAT5A, S779 in STAT5B) がリン酸化されることを報告している [58]。他にも、白血病の原因として知られる BCR-ABL 融合遺伝子によって形質転換した細胞において、p21-activated kinase (PAK) が STAT5

のセリン残基をリン酸化することが報告されている [59]。したがって、今後、STAT5 のテトラマー形成やSTAT5のS780以外のセリン残基のリン酸化に及ぼす、EpoRのY343、Y460、Y464のリン酸化、およびTpoRのY616、Y621のリン酸化の役割を解析することが重要である。

本研究により新たに得られた知見により、MPNの治療標的として、発がんの誘導に必須な役割を果たすEpoRやTpoRのリン酸化部位をターゲットとすることは大変合理的である。また、JAK2V617F変異体を発現したBa/F3細胞に、EpoRまたはTpoRを共発現させると、受容体ごとに活性化されるシグナル分子が異なることが明らかになった。今後は、JAK2V617F変異体発現細胞におけるEpoRおよびTpoRの複合体を精製し、構成タンパク質を解析することにより、JAK2V617F変異体による発がんシグナルの全貌が解明されると期待できる。

6. 参考文献

1. Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol.* 2000 May;20(10):3387-95.
2. Saharinen P, Vihinen M, Silvennoinen O. Autoinhibition of Jak2 tyrosine kinase is dependent on specific regions in its pseudokinase domain. *Mol Biol Cell.* 2003 Apr;14(4):1448-59.
3. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem.* 2002 Dec 6;277(49):47954-63.
4. Hilkens CM, Is'harc H, Lillemeier BF, Strobl B, Bates PA, Behrmann I, Kerr IM. A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130. *FEBS Lett.* 2001 Sep 7;505(1):87-91.
5. Zhou YJ, Chen M, Cusack NA, Kimmel LH, Magnuson KS, Boyd JG, Lin W, Roberts JL, Lengi A, Buckley RH, Geahlen RL, Candotti F, Gadina M, Changelian PS, O'Shea JJ. Unexpected effects of FERM domain mutations on catalytic activity of Jak3: structural implication for Janus kinases. *Mol Cell.* 2001 Nov;8(5):959-69.
6. 吉村昭彦, 金森光広, サイトカインシグナルと免疫制御, 実験医学, Vol.33-No.10, p150-157, 2015
7. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 2005 Apr 28;352(17):1779-90.

8. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garcon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.
9. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010 Apr 29;115(17):3589-97.
10. Tefferi A. JAK inhibitors for myeloproliferative neoplasms: clarifying facts from myths. *Blood*. 2012 Mar 22;119(12):2721-30.
11. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, Gilliland DG, Lodish H. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 27;102(52):18962-7.
12. 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*. 2009 Jul;9(7-8):870-7.
13. Li, K., Miller, C., Hegde, S., Wojchowski, D. Roles for an Epo receptor Tyr-343 Stat5 pathway in proliferative co-signaling with kit. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):40702-40709.
14. Chin, H., Nakamura, N., Kamiyama, R., Miyasaka, N., Ihle, J.N., Miura, O. Physical and functional interactions between Stat5 and the tyrosine-phosphorylated receptors for erythropoietin and interleukin-3. *Blood*. 1996 Dec 15;88(12):4415-4425.
15. Kirito, K., Nakajima, K., Watanabe, T., Uchida, M., Tanaka, M., Ozawa, K., Komatsu, N.

- Identification of the human erythropoietin receptor region required for Stat1 and Stat3 activation. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):102-110
16. Wu, H., Klingmüller, U., Acurio, A., Hsiao, J.G., Lodish, H.F. Functional interaction of erythropoietin and stem cell factor receptors is essential for erythroid colony formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Mar 4;94(5):1806-1810.
 17. Klingmüller, U., Wu, H., Hsiao, J.G., Toker, A., Duckworth, B.C., Cantley, L.C., Lodish, H.F. Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 4;94(7):3016-3021.
 18. Ravichandran, K.S., Lorenz, U., Shoelson, S.E., Burakoff, S.J. Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSOS. *Mol Cell Biol*. 1995 Feb;15(2):593-600.
 19. Uddin, S., Kottegoda, S., Stigger, D., Platanias, L.C., Wickrema, A. Activation of the Akt/FKHRL1 pathway mediates the antiapoptotic effects of erythropoietin in primary human erythroid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Aug;18(1):16-19
 20. Kashii, Y., Uchida, M., Kirito, K., Tanaka, M., Nishijima, K., Toshima, M., Ando, T., Koizumi, K., Endoh, T., Sawada, K., Momoi, M., Miura, Y., Ozawa, K., Komatsu, N. A member of Forkhead family transcription factor, FKHRL1, is one of the downstream molecules of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt activation pathway in erythropoietin signal transduction. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):941-949
 21. Ketteler, R., Moghraby, C.S., Hsiao, J.G., Sandra, O., Lodish, H.F., Klingmüller, U. The cytokine-inducible Src homology domain-containing protein negatively regulates signaling by promoting apoptosis in erythroid progenitor cells. *J Biol Chem*. 2003 Jan 23;278(4):2654-2660

22. Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I., Yoshimura A. CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J Biol Chem.* 2000 Sep 22;275(38):29338-29347
23. Hörtnner, M., Nielsch, U., Mayr, L.M., Heinrich, P.C., Haan, S. A new high affinity binding site for suppressor of cytokine signaling-3 on the erythropoietin receptor. *Eur J Biochem.* 2002 May;269(10):2516-2526
24. Mason, J.M., Beattie, B.K., Liu, Q., Dumont, D.J., Barber, D.L. The SH2 inositol 5-phosphatase Ship1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor. *J Biol Chem.* 2000 Feb 11;275(6):4398-406
25. Tauchi, T., Damen, J.E., Toyama, K., Feng, G.S., Broxmeyer, H.E., Krystal, G. Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis. *Blood.* 1996 Jun 1;87(11):4495-4501.
26. Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G., Lodish, H.F. Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell.* 1995 Mar 10;80(5):729-738
27. Sangkhae V, Etheridge SL, Kaushansky K, Hitchcock IS. The thrombopoietin receptor, MPL, is critical for development of a JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. *Blood.* 2014 Dec 18;124(26):3956-63.
28. Drachman JG, Kaushansky K. Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Mar 18;94(6):2350-5.

29. Challier C, Cocault L, Flon M, Pauchard M, Porteu F, Gisselbrecht S, Souyri M. A new feature of Mpl receptor: ligand-induced transforming activity in FRE rat fibroblasts. *Oncogene*. 2000 Apr 13;19(16):2033-42.
30. Bouscary D, Lecoq-Lafon C, Chrétien S, Zompi S, Fichelson S, Muller O, Porteu F, Dusanter-Fourt I, Gisselbrecht S, Mayeux P, Lacombe C. Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation by thrombopoietin (Tpo). *Oncogene*. 2001 Apr 26;20(18):2197-204.
31. Lannutti BJ, Drachman JG. Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3736-43.
32. Sangkhae V, Saur SJ, Kaushansky A, Kaushansky K, Hitchcock IS. Phosphorylated c-Mpl tyrosine 591 regulates thrombopoietin-induced signaling. *Exp Hematol*. 2014 Jun;42(6):477-86.
33. Yoshimura A, Lodish HF. In vitro phosphorylation of the erythropoietin receptor and an associated protein, pp130. *Mol Cell Biol*. 1992 Feb;12(2):706-15.
34. Damen JE, Cutler RL, Jiao H, Yi T, Krystal G. Phosphorylation of tyrosine 503 in the erythropoietin receptor (EpR) is essential for binding the P85 subunit of phosphatidylinositol (PI) 3-kinase and for EpR-associated PI 3-kinase activity. *J Biol Chem*. 1995 Oct 6;270(40):23402-8.
35. Miura O, D'Andrea A, Kabat D, Ihle JN. Induction of tyrosine phosphorylation by the erythropoietin receptor correlates with mitogenesis. *Mol Cell Biol*. 1991 Oct;11(10):4895-902.

36. 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.* 2010 Feb 19;285(8):5296-307.
37. Arai A, Kanda E, Nosaka Y, Miyasaka N, Miura O. CrkL is recruited through its SH2 domain to the erythropoietin receptor and plays a role in Lyn-mediated receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001 Aug 31;276(35):33282-90.
38. Pircher, T.J., Petersen, H., Gustafsson, J.A., Haldosén, L.A. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Mol Endocrinol.* 1999 Apr;13(4):555-565.
39. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science.* 1995 Jul 7;269(5220):81-3.
40. Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, Leonard WJ. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science.* 1995 Jul 7;269(5220):79-81.
41. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse JF, Capiod JC, Delobel J, Weber-Nordt R, Dusanter-Fourt I, Dreyfus F, Groner B, Prin L. STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood.* 1996 Mar 1;87(5):1692-7.

42. Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M., Hirano, T. STAT3 is required for the gp130-mediated full activation of the c-myc gene. *J Exp Med.* 1999 Jan 4;189(1):63-73.
43. Funakoshi-Tago M, Pelletier S, Moritake H, Parganas E, Ihle JN. Jak2 FERM domain interaction with the erythropoietin receptor regulates Jak2 kinase activity. *Mol Cell Biol.* 2008 Mar;28(5):1792-801.
44. Giordanetto, F., Kroemer, R.T. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng.* 2002 Sep;15(9):727-737
45. Haan, C., Kreis, S., Margue, C., Behrmann, I. Jaks and cytokine receptors—an intimate relationship. *Biochem Pharmacol.* 2006 Nov 30;72(1):1538-1546
46. Funakoshi-Tago, M., Pelletier, S., Matsuda, T., Parganas, E., Ihle, J.N. Receptor specific downregulation of cytokine signaling by autophosphorylation in the FERM domain of Jak2. *EMBO J.* 2006 Oct;18;25(20):4763-4772
47. Wernig, G., Gonneville, J.R., Crowley, B.J., Rodrigues, M.S., Reddy, M.M., Hudon, H.E., Walz, C., Reiter, A., Podar, K., Royer, Y., Constantinescu, S.N., Tomasson, M.H., Griffin, J.D., Gilliland, D.G., Sattler, M. The Jak2V617F oncogene associated with myeloproliferative diseases requires a functional FERM domain for transformation and for expression of the Myc and Pim proto-oncogenes. *Blood.* 2008 Apr 1;111(7):3751-3759
48. Halupa, A., Chohan, M., Stickle, N.H., Beattie, B.K., Miller, B.A., Barber, D.L. Erythropoietin receptor Y479 couples to ERK1/2 activation via recruitment of phospholipase C gamma. *Exp Cell Res.* 2005 Sep 10;309(10):1-11.

49. Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, Shide K, Kumano T, Kikushige Y, Urata S, Yamauchi T, Iwamoto C, Shimoda HK, Miyamoto T, Nagafuji K, Kishimoto J, Shimoda K, Akashi K. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *Br J Haematol*. 2010 Aug;150(3):334-44.
50. Yan D, Jobe F, Hutchison RE, Mohi G. Deletion of Stat3 enhances myeloid cell expansion and increases the severity of myeloproliferative neoplasms in Jak2V617F knock-in mice. *Leukemia*. 2015 Oct;29(10):2050-61.
51. Soldaini, E., John, S., Moro, S., Bollenbacher, J., Schindler, U., Leonard, W.J. DNA binding site selection of dimeric and tetrameric Stat5 proteins reveals a large repertoire of divergent tetrameric Stat5a binding sites. *Mol Cell Biol*. 2000 Jan;20(1):389-401
52. Meyer, W.K., Reichenbach, P., Schindler, U., Soldaini, E., Nabholz, M. Interaction of STAT5 dimers on two low affinity binding sites mediates interleukin 2 (IL-2) stimulation of IL-2 receptor alpha gene transcription. *J Biol Chem*. 1997 Dec 12;272(50):31821-31828
53. Moriggl, R., Sexl, V., Kenner, L., Duntsch, C., Stangl, K., Gingras, S., Hoffmeyer, A., Bauer, A., Piekorz, R., Wang, D., Bunting, K.D., Wagner, E.F., Sonneck, K., Valent, P., Ihle, J.N., Beug, H. Stat5 tetramer formation is associated with leukemogenesis. *Cancer Cell*. 2005 Jan;7(1):87-99
54. Lin, T.S., Mahajan, S., Frank, D.A. STAT signaling in the pathogenesis and treatment of leukemias. *Oncogene*. 2000 May 15;19(21):2496-2504
55. Lin, J.X., Li, P., Liu, D., Jin, H.T., He, J., Ata Ur Rasheed, M., Rochman, Y., Wang, L., Cui, K., Liu, C., Kelsall, B.L., Ahmed, R., Leonard, W.J. Critical Role of STAT5 transcription factor tetramerization for cytokine responses and normal immune function. *Immunity*. 2012 Apr

20;36(4)586-99

56. Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M., Groner, B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J.* 1994 Sep 15;13(18):4361-4369
57. Ram, P.A., Park, S.H., Choi, H.K., Waxman, D.J. Growth hormone activation of Stat 1, Stat3, and Stat 5 in rat liver. Differential kinetics of hormone desensitization and growth hormone stimulation of both tyrosine phosphorylation and serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 1996 Mar 8;271(10):5929-5940
58. Friedbichler, K., Kerenyi, M.A., Kovacic, B., Li, G., Hoelbl, A., Yahiaoui, S., Sexl, V., Müllner, E.W., Fajmann, S., Cerny-Reiterer, S., Valent, P., Beug, H., Gouilleux, F., Bunting, K.D., Moriggl, R. Stat5a serine 725 and 779 phosphorylation is a prerequisite for hematopoietic transformation. *Blood.* 2010 Sep 2;116(9):1548-1558
59. Berger, A., Hoelbl-Kovacic, A., Bourgeais, J., Hoefling, L., Warsch, W., Grundschober, E., Uras, I.Z., Menzl, I., Putz, E.M., Hoermann, G., Schuster, C., Fajmann, S., Leitner, E., Kubicek, S., Moriggl, R., Gouilleux, F., Sexl, V. PAK-dependent STAT5 serine phosphorylation is required for BCR-ABL-induced leukemogenesis. *Leukemia.* 2014 Mar;28(3):29-41

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜りました本学衛生化学講座の田村 悦臣教授、多胡 めぐみ准教授、清水 美貴子講師、中澤 洋介助教に深く御礼申し上げます。また、ディスカッションや飲み会などを通して、研究の方向性や私自身の将来について相談させて頂きました多胡 憲治先生をはじめ、細胞ネットワーク研究会の先生方に深く御礼申し上げます。また、衛生化学講座で切磋琢磨し、プライベートでも仲良くして下さった先輩、後輩、同期の皆様に感謝申し上げます。

最後に、博士課程進学にあたり、心配や迷惑をかけつつも最後まで支えてくださった家族に心より感謝いたします。

平成 29 年 1 月 14 日

上田 史仁