

JAK2 変異体のシグナル伝達解析による真性赤血球増加症発症機構の解明

多胡(船越)めぐみ

Analysis of the Mechanism of Polycythemia Vera by Studying
JAK2 Mutant-induced Signaling Pathway

Megumi FUNAKOSHI-TAGO

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmacy, Keio University,
1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan

(Received April 1, 2011)

It has been well established that disruption of JAK2 signaling regulation is involved in various hematopoietic disorders; however, the detailed mechanism by which abnormal activation of JAK2 exhibits transforming activity remains to be elucidated. The somatic JAK2 mutation (V617F) was identified in most patients with *polycythemia vera* (PV). Here, we show that JAK2 V617F mutant was constitutively active and exhibited tumorigenesis activity as a potent oncogene when erythropoietin receptor (EpoR) was co-expressed. To clarify the signaling pathway of JAK2 V617F mutant, we investigated the functional role of downstream transcription factor STAT5 in its induced cellular transformation and tumorigenesis in nude mice. Interestingly, JAK2 V617F mutant failed to exhibit transforming activity when STAT5 activation was inhibited utilizing EpoR mutant (HM). Furthermore, the expression of constitutively active STAT5 mutant (I*6) exhibited transforming activity. Taking these observations together, it is concluded STAT5 plays an essential role in EpoR-JAK2 V617F mutant-induced hematopoietic disorder and would be a good target for the treatment of PV.

Key words—Janus kinase 2 (JAK2); V617F mutation; *polycythemia vera*; STAT5

1. はじめに

エリスロポエチン (Epo) は赤血球の分化及び増殖を誘導する造血系サイトカインである。Epo 受容体 (EpoR) にはチロシンキナーゼ活性がないが、細胞膜直下で会合したチロシンキナーゼである JAK2 (Janus kinase 2) を介し、シグナルを伝達する。Epo が赤血球前駆細胞表面に発現する EpoR に結合すると、EpoR はホモ二量体を形成する。二量体化に伴い、EpoR に会合している JAK2 同士が接近し、互いを自己リン酸化する。活性化ループ内の 1007 番目のチロシン (Y1007) がリン酸化されると JAK2 は活性化され、EpoR の細胞内ドメインのチロシン残基をリン酸化する。^{1,2)} その結果、様々なシグナル伝達分子が SH2 (Src homology) ドメ

インや PTB (phosphotyrosine binding) ドメインを介して EpoR に会合し、細胞内シグナル伝達経路が活性化される。³⁾

Figure 1 に示すように、JAK2 には JAK キナーゼファミリーに相同的な領域 (Janus homology 1-7: JH1-7) が存在する。^{4,5)} このうち JH1 は C 末端部位に存在し、チロシンキナーゼ活性を有する。JH2 は JH1 と高い相同性を示すアミノ酸配列を持つが、チロシンキナーゼ活性を欠失しており、pseudokinase ドメインと呼ばれる。JH2 は JH1 と

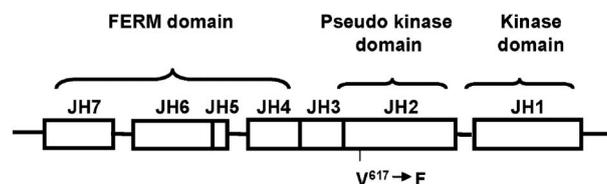


Fig. 1. Scheme of JAK2 V617F Mutant

JAK2 V617F mutant is identified in the majority of *polycythemia vera* (PV) patients. V617F mutation is located in JH2 domain of JAK2.

慶應義塾大学薬学部生化学講座 (〒105-8512 東京都港区芝公園 1-5-30)

e-mail: tago-mg@pha.keio.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会関東支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

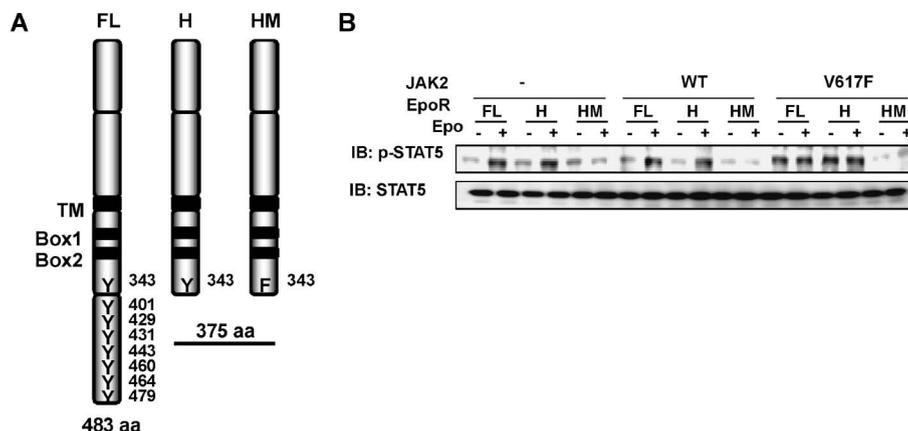


Fig. 2. Phosphorylation at Y343 in EpoR Is Required for Constitutive Activation of STAT5 Induced by JAK2 V617F Mutant

(A) Schematic diagram of full-length EpoR (FL), and deletion mutants of EpoR (H and HM). The relative positions of tyrosine residues are marked. EpoR-HM mutant harbors Y343F substitution. TM indicates the transmembrane region. JAK2 interacts with EpoR through Box1 region. (B) Ba/F3 cell lines were infected with empty virus (-) or retrovirus encoding wild-type JAK2 c-HA (WT) or JAK2 mutant c-HA (V617F) with EpoR c-Flag (FL), EpoR-H c-Flag (H) or EpoR-HM c-Flag (HM). Wild-type JAK2, JAK2 V617F mutant, full-length EpoR, EpoR-H mutant and EpoR-HM mutant were written as WT, V617F, FL, H and HM, respectively. Whole cell lysates were immunoblotted with anti-phospho-STAT5 antibody (Y694) or anti-STAT5 antibody.

分子内で会合し、JAKのキナーゼ活性を負に制御すると考えられている。⁶⁻⁸⁾ さらにN末端部位には、サイトカインレセプターとの相互作用を仲介するprotein 4.1 (Four-point-one) and ezrin/radixin/moesin (FERM) ドメイン (JH4-JH7) が存在する。

2005年に、真性赤血球増加症 (*polycythemia vera*) 患者において、JAK2のJH2ドメインに点変異 (V617F) が高頻度に認められることが報告された (Fig. 1).⁹⁾ 真性赤血球増加症は、造血幹細胞の異常により特に赤血球が著しく増加する疾患であり、稀に白血病へと病型が移行することが知られている。これまでに、V617F点変異によりJAK2分子内のJH1-JH2相互作用が抑制されることにより、JAK2点変異体は恒常的に活性化すると考えられている。実際、JAK2点変異体 (V617F) が、EpoR存在下において恒常的な活性化型を呈することを観察しているが、¹⁰⁾ JAK2の点変異が真性赤血球増加症の発症へとつながる分子機構はいまだ不明である。本研究では、JAK2点変異体 (V617F) の細胞内シグナル伝達経路を解析することにより、JAK2点変異による真性赤血球増加症発症の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. JAK2点変異体 (V617F) によるSTAT5の恒常的な活性化誘導

EpoRとの共発現により、恒常的な活性化を示すようになったJAK2点変異体 (V617F) は、転写因子STAT5の活性化を誘導することが明らかになっ

た。¹⁰⁾ Figure 2(A)に示すように、最もN末端側に位置する343番目のチロシン残基 (Y343) のリン酸化は、STAT5の結合に必要であることが報告されている。¹¹⁾ 私達は、JAK2点変異体 (V617F) のシグナル伝達経路におけるSTAT5の役割を検討するために、野生型EpoR (FL)に加えて、Y343以外のチロシン残基を含むC末側を欠失したEpoR欠損変異体 (H) とHのY343をフェニルアラニンに置換した (Y343F) EpoR欠損変異体 (HM) の発現ウイルスベクターを作製した。マウスproBであるBa/F3細胞は、IL-3依存的に増殖する性質を持つ。続いて、これらのEpoRのFLあるいは変異体 (H, HM) と、Mock, 野生型JAK2 (WT) あるいはJAK2変異体 (V617F) を発現した9種類のBa/F3細胞株 (-/FL, -/H, -/HM, WT/FL, WT/H, WT/HM, V617F/FL, V617F/H, V617F/HM) を作製した (Table 1)。-/FL細胞株, -/H細胞株, WT/FL細胞株及びWT/H細胞株において、Epo刺激によりSTAT5の活性化が観察された。一方、-/HM細胞株及びWT/HM細胞株では、EpoによるSTAT5の活性化が阻害された。また、野生型EpoR (FL) と同様に、EpoR欠損変異体 (H) の



多胡(船越)めぐみ

慶應義塾大学薬学部生化学講座・講師。
2003年共立薬科大学大学院薬学研究科
博士課程修了, 博士(薬学)。研究テーマ:
サイトカインのシグナル伝達機構の解析。

Table 1. Cell Strains Analyzed in This Study and Their Characteristics

Cell strains	JAK2	EpoR ¹⁾	STAT5 activation ³⁾	Anti-apoptosis without Epo	Tumorigenesis in nude mice
1 —/—	None	None	N.D. ²⁾	N.D.	N.D.
2 —/FL	None	Full length	N.D.	N.D.	N.D.
3 —/H	None	EpoR-H	N.D.	N.D.	N.D.
4 —/HM	None	EpoR-HM	N.D.	N.D.	N.D.
5 WT/—	Wild type	None	N.D.	N.D.	N.D.
6 WT/FL	Wild type	Full length	N.D.	N.D.	N.D.
7 WT/H	Wild type	EpoR-H	N.D.	N.D.	N.D.
8 WT/HM	Wild type	EpoR-HM	N.D.	N.D.	N.D.
9 V617F/—	V617F	None	N.D.	N.D.	N.D.
10 V617F/FL	V617F	Full length	##	##	##
11 V617F/H	V617F	EpoR-H	##	##	##
12 V617F/HM	V617F	EpoR-HM	N.D.	N.D.	+

¹⁾ Figure 5 shows structures of EpoR mutants, EpoR-H and EpoR-HM. ²⁾ “N.D.” means “Not detected”. ³⁾ STAT5 activation was tested in the absence of Epo stimulation.

共発現は、JAK2 点変異体 (V617F) による恒常的な STAT5 の活性化を誘導したが、EpoR 欠損変異体 (HM) の発現下では、Epo 存在下、非存在下ともに、JAK2 点変異体 (V617F) による STAT5 の活性化は阻害された [Fig. 2(B)].

3. JAK2 点変異体 (V617F) による抗アポトーシス作用に及ぼす STAT5 の役割

IL-3 依存性増殖を示す Ba/F3 細胞は、サイトカイン除去によりアポトーシスを誘導することが知られている。これまでに、EpoR (FL) と JAK2 点変異体 (V617F) を共発現した Ba/F3 細胞は、IL-3 非存在下においても細胞死を誘導しないことを観察している。¹²⁾ したがって、EpoR 欠損変異体を発現した Ba/F3 細胞を用いることにより、JAK2 点変異体 (V617F) による抗アポトーシス作用に及ぼす STAT5 の役割を検討した。V617F/H 細胞株では、Epo 非存在下においても細胞死は誘導されなかったのに対し、V617F/HM 細胞では顕著なアポトーシス誘導が確認された。したがって、Epo 非存在下においては、JAK2 点変異体 (V617F) による STAT5 の活性化が抗アポトーシス作用に重要であると示唆された。一方、Epo 存在下では、9 種類のすべての Ba/F3 細胞株はアポトーシスを誘導せず、高い生存率を示した。これらの結果は、Epo 刺激による抗アポトーシス作用には STAT5 の活性は必要でなく、それ以外のシグナル分子が関与している可能性が考えられた (Fig. 3)。

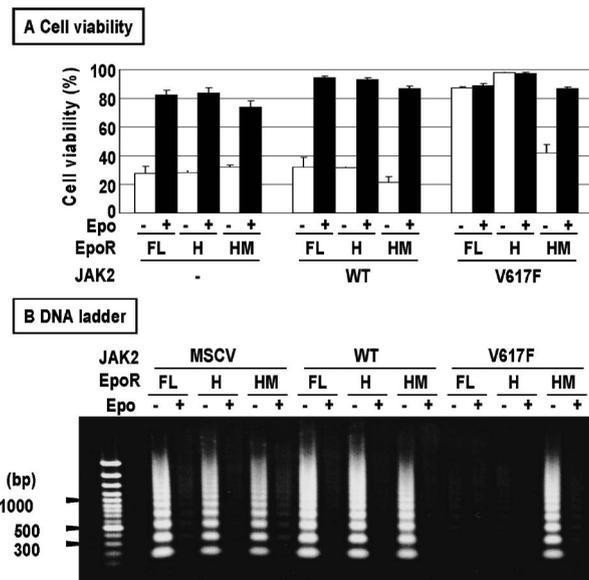


Fig. 3. STAT5 Activation Is Required for Cytokine-independent Cell Survival Induced by JAK2 V617F Mutant

Transduced Ba/F3 cells were left untreated or stimulated with Epo (5 U/ml) for 24 h. (A) The viability of these cells was determined by the trypan blue exclusion method. (B) DNA was isolated from cells and subjected to agarose gel electrophoresis.

4. JAK2 点変異体 (V617F) による腫瘍形成に及ぼす STAT5 の役割

続いて、JAK2 点変異体 (V617F) による腫瘍形成に及ぼす STAT5 の役割を検討するために、先ほどの 9 種類の Ba/F3 細胞株 (Table 1) をヌードマウスに皮下注射し、腫瘍形成を検討した。細胞移植後 12 日目に、V617F/FL 細胞株及び V617F/H 細胞株を移植したマウスでは、移植部位に大きな腫瘍

が形成されていたのに対し、V617F/HM 細胞株を移植したマウスでは、腫瘍形成が有意に抑制された [Fig. 4(A)]. 他の細胞株を移植しても腫瘍形成は認められなかった。真性赤血球増加症や白血病では、代表的な理学的所見として、肝腫や脾腫が認められる。V617F/FL 細胞株あるいは V617F/H 細胞株を移植したマウスでは、顕著な肝臓や脾臓の肥大化が認められた。一方、V617F/HM 細胞株を移植したマウスでは、肝臓や脾臓の肥大化が有意に抑制されていた [Fig. 4(B)]. 最終的には、V617F/HM 細胞株を移植したマウスも腫瘍を形成し死亡した。しかしながら、その生存日数は、V617F/FL 細胞株及び V617F/HM 細胞株を移植したヌードマウスに比べて有意に延長された [Fig. 4(C)]. したがって、JAK2 点変異体 (V617F) による腫瘍形成において、STAT5 の活性化が重要な役割を果たしていると考えられた。

5. 恒常的活性化型 STAT5 による抗アポトーシス作用及び腫瘍形成

抗アポトーシス作用及び腫瘍形成における STAT5 の機能を明らかにするために、Ba/F3 細胞に、野生型 STAT5 (WT) 及び恒常的活性化型 STAT5 変異体 (1*6) をレトロウイルスにより発現させた [Fig. 5(A)]. 恒常的活性化型 STAT5 (1*6) を発現した Ba/F3 細胞は、サイトカイン除去によるアポトーシスに抵抗性を示し、ヌードマウスにおける腫瘍形成を誘導した [Figs. 5(B) and (C)]. また、恒常的活性化型 STAT5 変異体 (1*6) を発現した細胞を移植したマウスは、顕著な腫瘍形成を誘導し、生存日数が有意に短縮された [Fig. 5(D)]. 以上の結果より、Epo 非存在下で観察された JAK2 点変異体 (V617F) による腫瘍形成には、STAT5 の活性化が重要な役割を果たしていることが明らかになった。^{13,14)}

6. おわりに

本研究を通して、私達は、JAK2 の点変異 (V617F) による腫瘍形成誘導において、転写因子 STAT5 の活性化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。^{13,14)} STAT5 は、白血病でしばしば恒常的に活性化されていることが報告されており、細胞増殖の実行因子の 1 つであると推測される。¹⁵⁾ これまでに、JAK2 変異体 (V617F) の下流で STAT5 の活性化を介して発現が誘導される遺伝子群を同定する

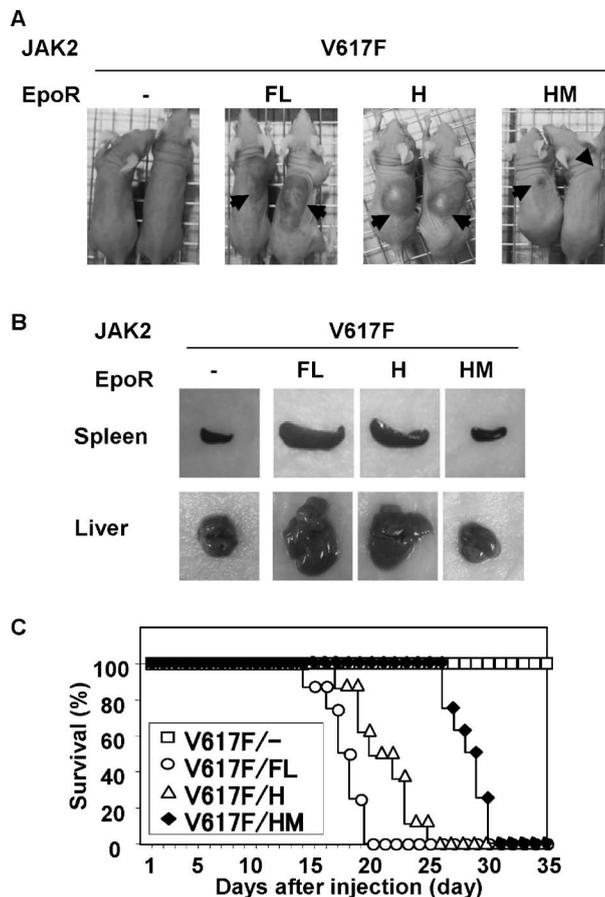


Fig. 4. STAT5 Activation Is Required for JAK2 V617F Mutant-induced Tumor Formation in Nude Mice

1×10^7 cells of transduced Ba/F3 cells were s.c. injected into nude mice. (A) Nude mice were photographed at 12 days post-inoculation. Arrows indicate tumors in nude mice. (B) 12 days post-inoculation, morphological changes of the spleen and liver were photographed. (C) For 35 days post-inoculation, mouse survival was monitored daily.

ために、本研究で作製した WT/FL 細胞, V617F/FL 細胞, V617F/H 細胞, V617F/HM 細胞を用いて DNA アレイ法を行った。その結果、がん原遺伝子である c-Myc や Pim1 や分裂期キナーゼ Aurora kinase A が、JAK2 変異体により顕著に発現誘導されることを見出している。c-Myc や Pim1 は、JAK2 変異体 (V617F) による細胞増殖及び腫瘍形成において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。一方、Aurora kinase A は細胞増殖や生存には関与しないが、JAK2 変異体 (V617F) 発現細胞が有する抗がん剤シスプラチンによる DNA 傷害に対する耐性に寄与していることを見出している。今後、EpoR-JAK2 変異体-STAT5 のシグナル経路の解析を進めることにより、真性赤血球増加症の発症に関与する異常なシグナル伝達機構の解明だけでなく、重要なシグナル分子を標的とし

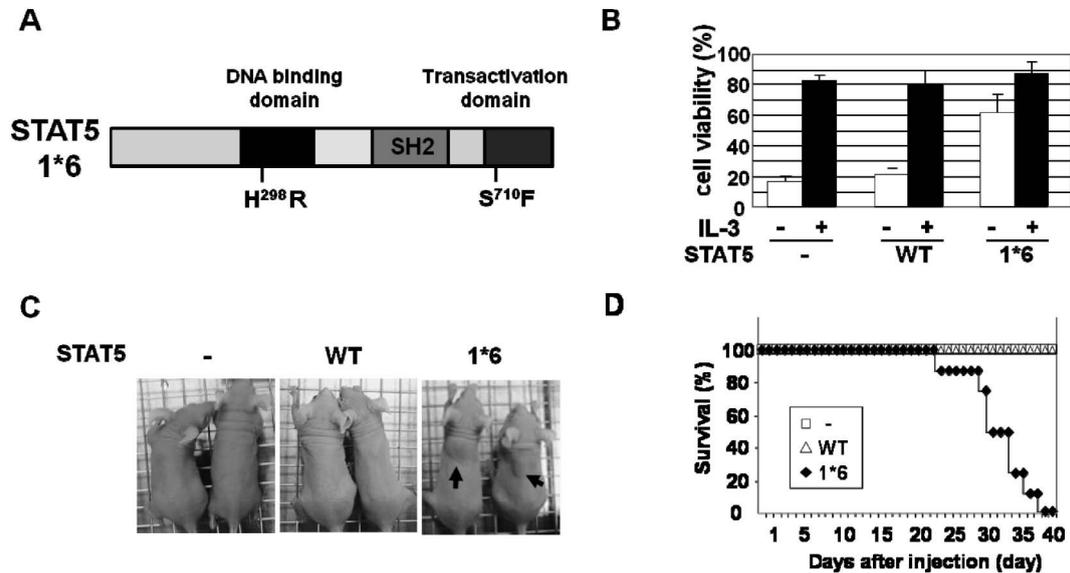


Fig. 5. Constitutively Active Mutant of STAT5 (1*6) Induced Tumor Formation of Ba/F3 Cells in Nude Mice

Ba/F3 cells were infected with empty virus (-), retrovirus encoding wild-type STAT5 (WT) or constitutively active mutant of STAT5 (1*6). (A) Structure of constitutively active mutant of STAT5 (1*6) (B) Transduced Ba/F3 cells were left untreated or stimulated with Epo (5 U/ml) for 24 h. The viability of these cells was determined by the trypan blue exclusion method. (C, D) 1×10^7 cells of transduced Ba/F3 cells were s.c. injected into nude mice.

た新たな治療法の開発へつながることが期待される。

謝辞 本研究の遂行にあたり、ご指導を賜りました笠原 忠教授、園田よし子教授に感謝いたします。また、本研究の遂行にあたり、ともに研究を行いました阿部美雪修士、上四元 純修士、鷲見和也修士、長田達明修士、並びに実験材料、技術、情報をご供与、ご教授下さいました多胡憲治博士（奈良先端大）に深く感謝致します。

REFERENCES

- Ihle J. N., *Nature*, **377**, 591–594 (1995).
- Feng J., Witthuhn B. A., Matsuda T., Kohhuber F., Kerr I. M., Ihle J. N., *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2497–2501 (1997).
- Ihle J. N., Kerr I. M., *Trends Genet.*, **11**, 69–74 (1995).
- Yamaoka K., Saharinen P., Pesu M., Holt V. E. 3rd., Silvennoinen O., O’Shea J. J., *Genome Biol.*, **5**, 253 (2004).
- Harpur A. G., Andres A. C., Ziemiecki A., Aston R. R., Wilks A. F., *Oncogene*, **7**, 1347–1353 (1992).
- Lindauer K., Loerting T., Liedl K. R., Kroemer R. T., *Protein Eng.*, **14**, 27–37 (2001).
- Saharinen P., Silvennoinen O., *J. Biol. Chem.*, **277**, 47954–47963 (2002).
- Saharinen P., Vihinen M., Silvennoinen O., *Mol. Biol. Cell*, **14**, 1448–1459 (2003).
- James C., Ugo V., Le Couédic J. P., Staerk J., Delhommeau F., Lacout C., Garçon L., Raslova H., Berger R., Bennaceur-Griscelli A., Villeval J. L., Constantinescu S. N., Casadevall N., Vainchenker W., *Nature*, **434**, 1144–1148 (2005).
- Funakoshi-Tago M., Pelletier S., Moritake H., Parganas E., Ihle J. N., *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 1792–1801 (2007).
- Collins M. K., Marvel J., Malde P., Lopez-Rivas A., *J. Exp. Med.*, **176**, 1043–1051 (1992).
- Abe M., Funakoshi-Tago M., Tago K., Kamishimoto J., Aizu-Yokota E., Sonoda Y., Kasahara T., *Int. Immunopharmacol.*, **9**, 870–877 (2009).
- Funakoshi-Tago M., Tago K., Sumi K., Abe M., Aizu-Yokota E., Oshio T., Sonoda Y., Kasahara T., *J. Biol. Chem.*, **284**, 12680–12690 (2009).
- Funakoshi-Tago M., Tago K., Abe M., Sonoda Y., Kasahara T., *J. Biol. Chem.*, **285**, 5296–5307 (2010).
- Chai S. K., Nichols G. L., Rothman P., *J. Immunol.*, **159**, 4720–4728 (1997).