

JAK2 変異体による発がんシグナルの解析

慶應義塾大学大学院薬学研究科修士 2 年 上四元 純

免疫学の講義を受けた際、サイトカインという微量の分泌タンパク質を介した細胞間の情報交換により免疫システムが精密に制御されていることに驚き、サイトカインのシグナル伝達研究に興味を持った。私は現在、サイトカインシグナル系に重要なチロシンキナーゼ Janus kinase 2 (JAK2) に関する研究を行っている。

造血性サイトカインであるエリスロポエチン (Epo) は、赤血球前駆細胞に発現している Epo 受容体 (EpoR) に結合し、細胞内シグナル伝達経路を活性化することにより、赤血球の分化、増殖を誘導する。EpoR には、非受容体型チロシンキナーゼである JAK2 が会合しており、Epo が EpoR に会合すると、JAK2 は自己リン酸化により活性化され、下流のシグナル分子をリン酸化する。

2005 年に慢性骨髄増殖性腫瘍 (MPN) 患者において、JAK2 の 617 番目の Val が Phe へ置換した点変異 (V617F) が認められることが複数の研究グループより報告された (Fig.1)。JAK2 は、JAK ファミリーに保存された 7 個の JH ドメインを持ち、通常、C 末端のキナーゼドメインである JH1 と偽キナーゼドメインである JH2 が相互作用することにより不活性化を維持している。JH2 ドメインに V617F 点変異が存在することにより、JH1 との相互作用が抑制され、JAK2 V617F 変異体は活性化型になると推測されている。真性赤血球増加症では 95%以上で、また、本態性血小板血症や原発性骨髄線維症では 50%以上の高頻度で、JAK2 V617F 変異が認められており、MPN 患者は白血病への移行リスクが高いとされるが、JAK2 V617F 変異体による発がん機構は不明である。

当研究室ではこれまでに、JAK2 V617F 変異体の活性化には EpoR の共発現が必要であり、サイトカイン依存性細胞株 Ba/F3 に JAK2 V617F 変異体と EpoR を導入すると、サイトカイン非依存的な細胞増殖を誘導し、アポトーシスに抵抗性を示すことなどを報告した。また、この細胞株をヌードマウスに移植すると、顕著な腫瘍形成を誘導することから、JAK2 V617F 変異体が強力ながん遺伝子であることを明らかにしてきた (文献 1, 2)。JAK2 V617F 変異体のシグナル伝達に関わる遺伝子群を網羅的に解析して興味ある遺伝子を同定しているが、私はとくに生存や増殖において重要な役割を担うセリン/スレオニンキナーゼ Akt の活性化に着目した。Epo のシグナル経路において、EpoR の 479 番目の Tyr 残基 (Y479) のリン酸化が PI3-キナーゼ (PI3-K) による Akt の活性化に重要である。そこで、非リン酸化型 EpoR 変異体 (Y479F) と JAK2 V617F 変異体を発現した細胞 (V617F/EpoR-Y479F) を用いて、JAK2 V617F 変異体の発がんシグナルにおける Akt の役割を解析した。興味深いことに、野生型 EpoR を共発現した V617F/EpoR-WT 細胞では、Akt の基質である CREB や GSK3 β のリン酸化され、抗アポトーシス因子 Bcl-XL の発現も誘導された。一方、V617F/EpoR-Y479F 細胞では CREB や GSK3 β のリン酸化もみられず、Bcl-XL mRNA

の発現はほとんど認められず、アポトーシスが誘導された。同様に、抗アポトーシス因子 Mcl-1 の発現が顕著に低かった。

以上の結果より、JAK2 V617F 変異体は EpoR の Y479 のリン酸化を介した Akt の活性化により、Bcl-XL、Mcl-1 の発現を上昇し、アポトーシス耐性を示すことが示された (Fig. 2)。さらに、V617F/EpoR-Y479F 細胞をヌードマウスへ移植した際にも腫瘍形成が有意に抑制され、生存日数が延長した。したがって、JAK2 V617F 変異体の腫瘍形成能においても、Akt の活性化が強く寄与していることが示唆された(文献 3)。

卒論時からこれらの研究を進めてきた中で、私が最も苦勞した作業は EpoR 変異体の construct vector の作製である。Y479F 変異体の他に、40 種類以上の EpoR 変異体を作製した。construct vector の作製は研究の土台となる大切な準備だが、周りの院生が次々と結果を出していく中、この作業は実験結果として表れないため、不安と焦りを感じる毎日だった。しかし、その中から顕著な表現型を示す Y479F 変異体を見出すことができて以降、結果も伴ってきた。苦勞を経験した分、結果を出すことができた時の喜びも格別だと感じることもできた。

最後に、御指導御鞭撻を賜りました笠原忠教授、多胡めぐみ講師に深謝致します。また、研究に協力していただいた卒論生の村上はるかさんに感謝致します。

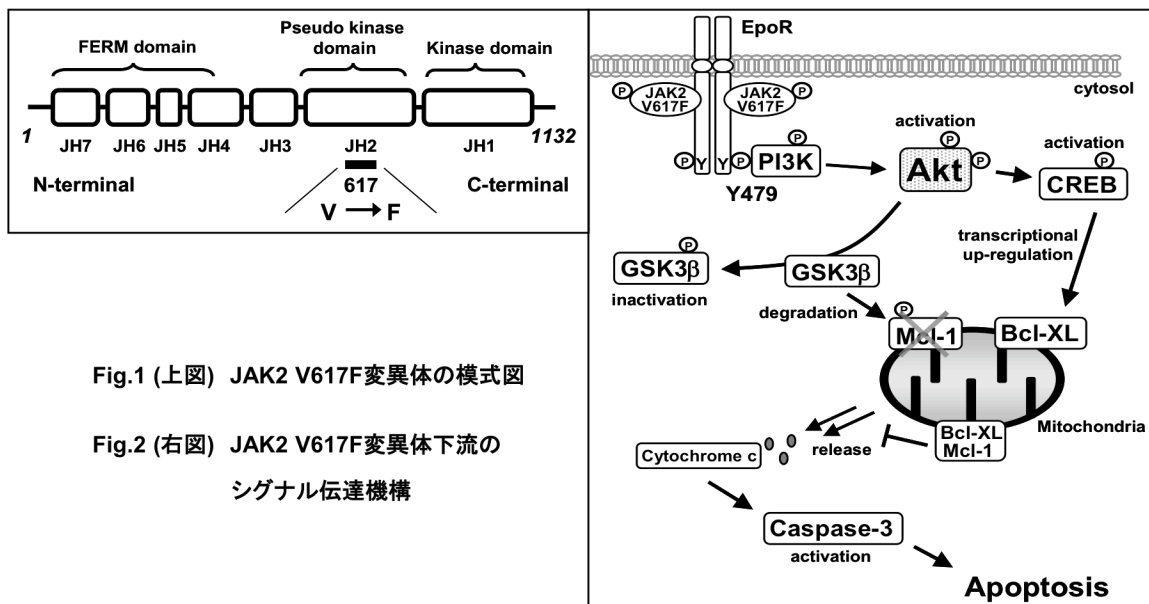


Fig.1 (上図) JAK2 V617F変異体の模式図

Fig.2 (右図) JAK2 V617F変異体下流のシグナル伝達機構

(文献) 1. 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 9(7-8):870-7.

2. Funakoshi-Tago M, Tago K, Abe M, Sonoda Y, Kasahara T. STAT5 activation is critical for the transformation mediated by myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant. *J Biol Chem.* 2010 19:285(8):5296-307.

3. Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal.* (2011, in press; Available online 19 January 2011)