

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	武田 健吾
主 論 文 題 名：慢性骨髄増殖性腫瘍における RNA ヘリカーゼ DDX5 を介した 発がん誘導機構の解明				
(内容の要旨)				
【背景】 慢性骨髄増殖性腫瘍 (Myeloproliferative neoplasm: MPN) は、造血幹細胞に遺伝子異常が生じ、骨髄細胞の過剰増殖や骨髄の線維化が誘導され、最終的に急性白血病に移行することで致死的となる。MPN は、遺伝子異常や病型に基づき、真性赤血球増加症 (Polycythemia vera: PV)、本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia: ET)、原発性骨髄線維症 (Primary Myelofibrosis: PMF)、慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia: CML) に分類される。これまでに、PV、ET、PMF の共通した原因遺伝子産物として、非受容体型チロシンキナーゼ Janus kinase (JAK2) の点変異体 (JAK2V617F) が同定されている (Kralovics R <i>et al. N Engl J Med.</i> 2005.)。また、CML では、染色体転座 t(9;22)(q34;q11) が生じ、フィラデルフィア染色体 (Ph) が形成される。これにより、原因遺伝子産物 BCR-ABL が発現する。JAK2V617F および BCR-ABL は、恒常的に活性化したチロシンキナーゼであり、転写因子 STAT5 や MEK-ERK 経路、Akt-mTOR 経路の活性化を介して、細胞増殖や腫瘍形成を誘導する。現在、MPN の治療薬として選択的 JAK1/2 阻害剤 Ruxolitinib が適用されている。Ruxolitinib は脾腫の改善など一定の効果が認められるが、JAK2V617F だけでなく、野生型 JAK1/2 も阻害するため、骨髄抑制など重篤な副作用が問題となっている (Tefferi A. <i>Am J Hematol.</i> 2023.)。また、BCR-ABL 阻害剤が開発され、CML の治療効果は劇的に改善された。しかし、治療中に BCR-ABL 遺伝子に変異が出現し、薬剤耐性が獲得されることが問題となっている。特に、ゲートキーパー変異 (T315I) を有する BCR-ABL 変異体は、第一世代、第二世代の BCR-ABL 阻害剤に耐性を示す (O'Hare T. <i>et al. Blood.</i> 2007.)。したがって、MPN 治療において、JAK2V617F による発がん誘導シグナル経路を標的とした新たな治療戦略の確立、および薬剤耐性を克服できる新規 CML 治療法の開発が課題である。 DEAD-box protein 5 (DDX5) は、Asp-Glu-Ala-Asp からなる DEAD-box を有する RNA ヘリカーゼである。DDX5 は、ATP 依存的に二本鎖 RNA を一本鎖 RNA に乖離させるヘリカーゼ活性を持ち、様々な RNA 代謝プロセスに関与する。近年、DDX5 は、大腸がんや前立腺がん、乳がんなどの固形がんで高発現しており、これらのがんの進行や悪性化に関与することが報告されている。したがって、DDX5 は有力ながん標的分子であると期待されるが、MPN や CML における DDX5 の発現状態や役割は不明である。また、2022 年に、Ling らは、Topoisomerase I (Topo I) 阻害剤である Camptothecin (CPT) の誘導体 FL118 が、DDX5 と結合し、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導することを報告した (Ling X <i>et al. Clin Transl Med.</i> 2022.)。 本研究では、JAK2V617F や BCR-ABL による発がん誘導シグナルにおける DDX5 の関与を検討し、MPN における DDX5 を介した発がん誘導機構を解明することを目的とした。また、MPN および薬剤耐性を示す CML に対する DDX5 阻害剤 FL118 の抗腫瘍活性を解析し、DDX5 を標的とした MPN 治療の有効性を検討した。				
【実験方法】 1. 細胞株の作製 ：マウス ProB 細胞 Ba/F3、JAK2V617F 陽性 MPN 患者由来 HEL 細胞、BCR-ABL 陽性 CML 患者由来 K562 細胞を用いた。レトロウイルス感染により、空ベクター (-)、野生型 JAK2、あるいは JAK2V617F と EpoR を共発現させた Ba/F3 細胞 (-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞、V617F/EpoR 細胞)、および BCR-ABL や BCR-ABL T315I 変異体を発現させた Ba/F3 細胞を作製した。V617F/EpoR 細胞あるいは HEL 細胞に、sh-scramble (sh-SCR) あるいは sh-DDX5 を発現させた。さらに、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞に、野生型 DDX5				

(3)

あるいはDDX5 変異体 (K144N) を再構成した。レンチウイルス感染により、CRISPR-Cas9 システムを用いて、DDX5 をノックアウトした K562 細胞、BCR-ABL 発現細胞、BCR-ABL T315I 変異体発現細胞を作製した。

2. 細胞増殖能、細胞生存率、アポトーシス細胞の測定 : WST assay (Nacalai tesque) により細胞増殖能を測定し、トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した。Annexin V-PE/7-AAD 染色キット (eBioscience) および Annexin V-FITC/PI 染色キット (Nacalai tesque) を用いて、アポトーシス細胞を検出した。

3. Topo I 活性の測定 : Topoisomerase I assay kit (TopoGEN) を用いた。スーパーコイル型 DNA (pHOT1) と recombinant murine TopoI を混和し、37°C で 30 分間反応させた後、1% アガロースゲルで電気泳動を行い、TopoI 活性を評価した。また、CPT または FL118 (125、250、500、1000 nM) を添加し、それらの阻害効果を検討した。

4. Immunoblotting : 細胞溶解液を調製後、SDS-PAGE を行い、タンパク質を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜をブロッキング後、一次抗体 (1:1000 希釈) および HRP 標識二次抗体 (1:3000 希釈) と反応させた。ECL™ Western Blotting Detection Reagents によりタンパク質を可視化した。

5. RT-PCR : Sepazol (Nacalai tesque) を用いて、細胞から RNA を抽出し、oligo (dT)₂₀ プライマー、RevaerTra Ace (TOYOBO) を用いて、逆転写反応を行った。Luna Universal qPCR Master Mix (NEW ENGLAND Biolabs) を用いて、定量的 PCR を行った。

6. ノードマウスを用いた腫瘍形成能の評価 : ノードマウス (4 週齢雌) に、各細胞を皮下移植した。移植後 5 日目、7 日目、9 日目に、マウスに FL118 (2.5 mg/kg) を経口投与した。腫瘍、脾臓、肝臓を摘出し、重量を測定した。脾臓、肝臓の組織切片を作製し、HE 染色を行った。

【結果・考察】

1. JAK2V617F による STAT5 の活性化を介した DDX5 の発現誘導

-/EpoR 細胞や WT/EpoR 細胞に比べて、V617F/EpoR 細胞では、DDX5 および DDX5 mRNA の発現が増強された。V617F/EpoR 細胞における DDX5 および DDX5 mRNA の発現は、JAK2 阻害剤 Ruxolitinib や STAT5 阻害剤 Pimozide により抑制された。また、タンパク合成阻害剤 Cycloheximide (CHX) を用いた実験を行った結果、V617F/EpoR 細胞において、Ruxolitinib および Pimozide は、DDX5 の分解を誘導することが確認された。さらに、V617F/EpoR 細胞における Ruxolitinib および Pimozide による DDX5 の発現低下は、プロテアソーム阻害剤 MG132 の添加により回復した。したがって、JAK2V617F は、STAT5 の活性化を介して、DDX5 mRNA の発現を誘導すると同時に、DDX5 タンパク質の安定化を促進することにより、DDX5 の発現を増強することが明らかになった。しかし、DDX5 遺伝子プロモーター領域には、STAT5 結合ドメインは存在しないため、JAK2V617F の下流では、STAT5 を介して活性化される他の転写因子が DDX5 mRNA の発現を制御する可能性がある。

2. JAK2V617F による DDX5 を介した発がん誘導機構

V617F/EpoR 細胞における DDX5 の機能を解析するために、V617F/EpoR 細胞および HEL 細胞に、sh-SCR あるいは sh-DDX5 を発現させた。DDX5 のノックダウンは、V617F/EpoR 細胞および HEL 細胞の増殖能を抑制し、生存率を低下させた。また、DDX5 のノックダウンは、JAK2、STAT5、ERK、Akt のリン酸化には影響を及ぼさなかったが、mTOR およびその基質である p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を抑制した。さらに、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したノードマウスでは、顕著な腫瘍形成や肝脾腫が認められ、細胞移植後、18 日で全数が死亡した。一方、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したノードマウスでは、腫瘍形成や肝脾腫が抑制され、生存日数が延長された。したがって、DDX5 は mTOR の活性化を介して、JAK2V617F による細胞増殖や腫瘍形成に必須の役割を果たすことが明らかになった。

3. RNA ヘリカーゼ活性非依存的な DDX5 を介した発がん誘導機構

MPN における DDX5 を介した発がん誘導機構を解析するため、JAK2V617F による発がん誘導における DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性の必要性を検討した。sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞に、野生型 DDX5、あるいは RNA ヘリカーゼ活性を欠損させた DDX5 変異体 (K144N) を再構成した。DDX5 のノックダウンによる V617F/EpoR 細胞の増殖抑制や生存率低下は、野生型 DDX5 や DDX5 変異体 (K144N) の再構成により、同程度に回復した。野生型 DDX5 や DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、DDX5 のノックダウンによる Survivin や Bcl-XL の発現低下や mTOR 経路の抑制を回復し、DDX5 のノックダウンによる Caspase-3 の活性化やアポトーシス細胞

の割合の増加を抑制した。さらに、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したヌードマウスで観察された腫瘍形成や肝脾腫の抑制も、野生型 DDX5 や DDX5 変異体 (K144N) の再構成により回復した。したがって、DDX5 は、JAK2V617F による発がん誘導に不可欠であるが、その RNA ヘリカーゼ活性は必要ないことが明らかになった。

4. MPN に対する FL118 の抗腫瘍効果

DDX5 を標的とした MPN 治療の有効性を検討するため、CPT および FL118 の抗腫瘍活性を検討した。まず、CPT と FL118 の *in vitro* での Topo I 阻害活性を検討した結果、FL118 は CPT と同程度の Topo I 阻害活性を持つことが明らかになった。次に、V617F/EpoR 細胞および HEL 細胞を CPT または FL118 で処理し、DDX5 の発現を検討した。これらの細胞において、CPT は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかったが、FL118 は濃度依存的に DDX5 の発現を抑制した。さらに、FL118 による DDX5 の発現抑制は、MG132 処理により阻害されたことから、FL118 は特異的に DDX5 のプロテアソーム分解を誘導することが確認された。FL118 は、CPT と比較してより低濃度で、V617F/EpoR 細胞および HEL 細胞の増殖能を抑制し、生存率を低下させた。また、これらの細胞において、CPT は Survivin および Bcl-XL の発現に影響を及ぼさなかったが、FL118 は Survivin および Bcl-XL の発現を低下させ、Caspase-3 の断片化を誘導し、アポトーシス細胞の割合を増加させた。さらに、V617F/EpoR 細胞を移植したヌードマウスに、FL118 を経口投与すると、腫瘍形成や肝脾腫、肝臓および脾臓の組織構造の破壊が抑制された。これらの結果より、FL118 を用いた DDX5 の分解誘導は、MPN に対して有効な治療戦略になると期待される。

5. BCR-ABL による DDX5 を介した発がん誘導機構

CML における DDX5 の発現を検討するため、K562 細胞、BCR-ABL 発現細胞または BCR-ABL T315I 変異体発現細胞を BCR-ABL 阻害剤 Imatinib で処理し、DDX5 の発現を検討した。K562 細胞および BCR-ABL 発現細胞では、Imatinib 処理により、DDX5 の発現が低下したが、Imatinib に耐性を示す BCR-ABL T315I 変異体発現細胞では DDX5 の発現は変化しなかった。したがって、BCR-ABL はそのキナーゼ活性に依存して DDX5 の発現を誘導することが明らかになった。また、CRISPR-Cas9 システムを用いて、DDX5 をノックアウトした K562 細胞、BCR-ABL 発現細胞または BCR-ABL T315I 変異体発現細胞を作製した。DDX5 のノックアウトにより、これらの細胞における Survivin mRNA および Survivin の発現が低下し、増殖能は抑制され、生存率は低下した。したがって、DDX5 は CML 細胞において高発現しており、細胞増殖や生存を誘導することが示唆された。

6. 薬剤耐性 CML に対する FL118 の抗腫瘍効果

CPT および FL118 を用いて、DDX5 を標的とした CML 治療の有効性を評価した。K562 細胞、BCR-ABL 発現細胞および BCR-ABL T315I 変異体発現細胞において、CPT は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかった。それに対して、FL118 は DDX5 の発現を抑制した。また、FL118 による DDX5 の発現抑制が MG132 処理により阻害されることを確認した。FL118 は、CPT と比較して低濃度で、K562 細胞、BCR-ABL 発現細胞および BCR-ABL T315I 変異体発現細胞の増殖能を抑制し、生存率を低下させた。また、これらの細胞において、FL118 は、Survivin および Bcl-XL の発現を低下させ、Caspase-3 の断片化を誘導した。以上の結果より、DDX5 は CML においても重要な治療標的分子であり、FL118 を用いた DDX5 の発現抑制は、薬剤耐性を克服できる新規 CML 治療法として有効であると期待される。

【主論文に関する原著論文】

Takeda K, Ohta S, Nagao M, Kobayashi E, Tago K, Funakoshi-Tago M. FL118 Is a Potent Therapeutic Agent against Chronic Myeloid Leukemia Resistant to BCR-ABL Inhibitors through Targeting RNA Helicase DDX5. *Int J Mol Sci.* 2024;25(7):3693.

【参考論文】

Takeda K, Tago K, Funakoshi-Tago M.

The indispensable role of the RNA helicase DDX5 in tumorigenesis induced by the myeloproliferative neoplasm-associated JAK2V617F mutant. *Cell Signal.* 2023;102:110537