

博士学位論文 2024 年度

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

慶應義塾大学大学院薬学研究科

薬科学専攻

武田 健吾

目次

第1章 序論.....	1
第2章 実験方法と材料.....	7
第3章 結果	
1部 MPNにおけるDDX5の発現誘導機構およびDDX5の機能の解析.....	18
2部 Ph陰性MPNにおける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およびFL118の抗腫瘍効果の検討.....	25
3部 CMLにおけるDDX5の機能解析およびDDX5を標的とした 治療戦略の効性の検討.....	34
第4章 図表.....	39
第5章 考察.....	89
第6章 結語.....	97
第7章 参考文献.....	98
第8章 謝辞.....	111

第1章 序論

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ることで引き起こされる疾患であり、成熟骨髄細胞の過剰増殖や骨髄の線維化が誘導される。MPN は、臨床的特徴、骨髄形態および遺伝子変異に基づき、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) の4つの主要な病型に分類される。PV では赤血球の過剰増殖が見られ、ET では血小板の過剰増殖が認められる。PMF では、過剰増殖した巨核球が放出するサイトカインにより、骨髄中の線維芽細胞が過剰増殖し、骨髄の線維化が誘導される。CML では顆粒球の過剰増殖が見られる。これらの MPN では、線維化された骨髄において造血障害が起こり、造血幹細胞が脾臓に移動することによる髄外造血が発生し、貧血や脾腫が形成される。また、進行に伴い、分化能を失った異常造血幹細胞が出現することで、末梢血中において幼若な芽球が増殖し、最終的に急性白血病に移行することで致死的となる [1-4]。

2005 年に、PV、ET、PMF に共通する MPN の原因遺伝子として、非受容体型チロシンキナーゼ Janus kinase 2 (JAK2) 遺伝子の 1849 番目の塩基がチミンからグアニンへの置換による、617 番目のアミノ酸がバリンからフェニルアラニンへと変化した点変異体 (JAK2V617F) が同定された [5, 6]。JAK2V617F 変異は、PV 患者の約 90%、ET および PMF 患者の約 50% で認められる [7]。JAK2 は、Janus kinase (JAK) ファミリーに属し、酵素活性を持たないサイトカイン受容体に結合し、サイトカインのシグナル伝達分子として機能する [8, 9]。JAK2 は、JAK ファミリーに共通して保存された 7 つの Janus homology (JH) domain で構成されている。N 末端領域に位置する JH4-JH7 は、Four-point-one, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain であり、サイトカイン受容体との結合に寄与する [10]。C 末端領域に位置する JH1 は、キナーゼドメインである。また、JH1 に隣接した JH2 は、JH1 と高いアミノ酸相同性を示す

が、キナーゼ活性を持たない偽キナーゼドメイン (pseudokinase domain) である。JAK2 のキナーゼ活性は、JH2 が JH1 と相互作用する立体構造をとることで抑制されている [11]。その後、JH3 に存在する SH2 ドメインと JH2 のリンカー領域 (SH2-JH2 linker) も、JH1 の活性制御に関与することが報告された。SH2-JH2 linker に存在する S523 がリン酸化されることで、JAK2 の JH1 に存在する Activation loop の Y1007/Y1008 のリン酸化が抑制されることが示され、SH2-JH2 linker が、JH2 と JH1 の相互作用を安定化すると推定されている [12-14]。MPN では、SH2-JH2 linker に近接する 617 番目のバリンがかさ高いフェニルアラニンに置換されることで、SH2-JH2 linker による JH2 domain と JH1 domain の結合が阻害され、JAK2V617F は恒常的に活性化すると考えられている [14]。

JAK2 は、赤血球の分化・増殖を誘導するエリスロポエチン (Erythropoietin: Epo) や血小板の分化・増殖を誘導するトロンボポエチン (Thrombopoietin: Tpo) のシグナル伝達経路に関与する。Epo や Tpo は、それぞれ、エリスロポエチン受容体 (Erythropoietin receptor : EpoR) やトロンボポエチン受容体 (Thrombopoietin receptor : TpoR) に結合する。それにより、EpoR や TpoR が二量体化し、JAK2 の Y1007/Y1008 がリン酸化され、JAK2 は活性化する [7, 8, 15]。JAK2 は、EpoR、TpoR の細胞内ドメインに存在するチロシン残基をリン酸化する。これらのリン酸化されたチロシン残基に、下流のシグナル伝達分子が SH2 ドメインを介して結合する [16, 17]。転写因子 STAT5 は、SH2 ドメインを介して EpoR や TpoR のリン酸化チロシン残基に結合すると、JAK2 により Y694 がリン酸化される。SH2 ドメインとリン酸化 Y694 を介して、STAT5 同士が互いに結合し二量体を形成すると、核内に移行して標的遺伝子の発現を誘導する [17, 18]。また、Growth factor receptor bound protein 2 (Grb2) や Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) p85 α subunit が、リン酸化 EpoR や TpoR に結合し、それぞれ Ras-Raf-Mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)-Extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路や Akt-mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の活性化を誘導する [19-22]。mTOR は、Raptor、Rictor をそれぞれ構成因子とする mTORC1 および mTORC2 の 2 種類の複合体

を形成する。mTORC1 の活性化は、Rheb GTPase によって誘導され、Raptor は、下流のシグナル分子である p70S6 Kinase (p70S6K)、4E-binding protein 1 (4E-BP1) の活性化を誘導する [23, 24]。mTORC2 の活性化は、Phosphatidylinositol のリン酸化を介して誘導され、Rictor が Akt の活性化を誘導する [25]。通常、Epo や Tpo によって JAK2 が活性化されると、これらのシグナル伝達経路が活性化され、赤血球や血小板の分化や増殖が誘導される。しかし、JAK2V617F は、恒常的に、STAT5、MEK-ERK 経路、Akt-mTOR 経路を活性化し、骨髄細胞の過剰増殖を引き起こす [6, 26]。JAK2V617F を発現させたノックインマウスでは、赤血球や血小板の過剰増殖、脾腫形成、骨髄の線維化、生存日数の減少など MPN と同様の症状が認められ、JAK2V617F は MPN の原因遺伝子産物であることが実証されている [27, 28]。

MPN の治療として、血液中の赤血球や血小板数を減少させるために、瀉血やリボヌクレオチドレダクターゼ阻害剤である Hydroxyurea の投与が行われる [29, 30]。2011 年に、JAK1 および JAK2 の選択的阻害剤である Ruxolitinib が FDA で承認されて以降、PMF 患者や Hydroxyurea に耐性を示す PV 患者に適用されている [31-33]。Ruxolitinib の投与は、脾腫形成の抑制や骨髄の線維化進行の遅延など一定の効果を示すが、骨髄の機能を正常な状態に回復させることはできない。また、Ruxolitinib は、JAK2V617F だけでなく、野生型 JAK2 も阻害するため、骨髄抑制による造血障害などの重篤な副作用が問題となっている [34]。したがって、JAK2V617F による発がん誘導経路を解明し、MPN に特異的に関与する分子を標的とする治療法の開発が望まれている。現在、MPN の新規治療法を確立するために、STAT5 の標的遺伝子産物としても知られる抗アポトーシス因子 Bcl-XL や BCL2 の阻害剤 Navitoclax と Ruxolitinib を併用した臨床試験が行われており、治療効果の改善が認められている [35-38]。

CML の約 95%において、9 番染色体と 22 番染色体の相互転座 t(9;22) (q34; q11) が生じ、フィラデルフィア染色体 (Philadelphia Chromosome : Ph) が形成される。それにより、22 番染色体上に位置するグアニンヌクレオチド交換因子 Breakpoint cluster region (Bcr) 遺伝子の

オリゴマー化ドメインをコードする領域と 9 番染色体上に位置する非受容体型チロシンキナーゼ Abelson tyrosine kinase (Abl) 遺伝子のキナーゼドメインをコードする領域が融合した Bcr-Abl 遺伝子が発現する [39-41]。BCR-ABL は融合型チロシンキナーゼであり、二量体化し、自己リン酸化を介して恒常的に活性化する [42]。BCR-ABL は、STAT5 の Y694 を直接リン酸化し、STAT5 の活性化を誘導する。また、BCR-ABL のリン酸化 Y177 にアダプター分子 Grb2 がリクルートされ、MEK-ERK 経路や、PI3K-Akt 経路が活性化される [43-49]。この BCR-ABL による増殖シグナルの活性化により、CML では顆粒球の過剰増殖が引き起こされる。

2001 年に FDA および日本で承認された第一世代の BCR-ABL 阻害剤である Imatinib は、BCR-ABL の ATP Binding domain に競合的に結合して活性を阻害する薬剤である [50, 51]。Imatinib の開発により、CML 患者の予後は大きく改善された [52]。しかし、長期に渡る治療中に、BCR-ABL 遺伝子のキナーゼドメインにおいて、Y253E、E255K/V、T315I、F317、M351T、F359V、M396P/R などの突然変異が出現し、Imatinib に対する耐性が獲得されることが明らかになった [53, 54]。第二世代の BCR-ABL 阻害剤として開発された Dasatinib や Nilotinib は、Imatinib に耐性を示す遺伝子変異を有する BCR-ABL のほとんどを克服できる薬剤である [55-57]。しかし、ゲートキーパー変異と呼ばれる T315I 変異を持つ BCR-ABL は、立体障害により Dasatinib や Nilotinib と結合できず、阻害されない [55-58]。その後、T315I 変異を有する BCR-ABL と結合し、活性を阻害できる第三世代の BCR-ABL 阻害剤である Ponatinib が開発された [59, 60]。しかし、Ponatinib は、血管閉塞や心不全などの重篤な副作用の発現が問題となっている。また、同一の Bcr-Abl 遺伝子内に、T315I 変異に加えて E255V、M351T、F359V などの複合変異が出現すると、Ponatinib に耐性を示すことも明らかになってきた [61, 62]。近年、BCR-ABL のアロステリック阻害剤である Asciminib が開発された。Asciminib は、BCR-ABL のミリストイル部位に結合し、不活性型の BCR-ABL の立体構造を安定化することで、その活性を阻害する [63]。Asciminib による T315I 変

異を獲得した CML 患者に対する良好な治療効果が報告されているが [64]、同様に BCR-ABL を標的とする薬剤であるため、Asciminib に対する耐性の獲得が懸念されている。そのため、BCR-ABL による発がん誘導シグナル経路の解明を通して、CML の有力な治療標的を同定することにより、薬剤耐性を克服できる新規治療薬を開発することが重要である。

DEAD-box protein 5 (DDX5) は、Asp-Glu-Ala-Asp からなる DEAD-box を持つ RNA ヘリカーゼであり、ATP 依存的に二本鎖 RNA を一本鎖 RNA に乖離する [65, 66]。DDX5 は、様々な RNA 代謝に関与し、pre-mRNA の選択的スプライシングでは、U1 snRNA を 5'スプライス部位から解離することでプレプライソソームからスプライソソームへの移行を誘導する [67]。また、DDX5 は、rRNA の生合成過程では、32S rRNA から 28S rRNA へのプロセッシングを誘導し、miRNA の生合成過程では、Drosha と共に、Pri-miRNA から Pre-miRNA の移行を誘導する [68, 69]。さらに、DDX5 は、DNA 複製の阻害やゲノムの不安定化による細胞死を誘導する DNA:RNA の三重らせん構造である R-loop を解消し、細胞死を抑制する働きも有する [70]。

DDX5 は、様々ながん種で高発現しており、がんの進行や悪性化に関与することが報告されている [71-74]。DDX5 は、大腸がんや前立腺がん、乳がんなどの固形がんの進行や悪性化に関与する。大腸がんでは、DDX5 は β -catenin や c-Myc などの転写因子のコアクチベーターとして機能する [71, 75]。また、前立腺がん、乳がんでは、それぞれ DDX5 が Androgen Receptor (AR) や Estrogen Receptor (ER) のコアクチベーターとして機能し、これらの転写因子の標的遺伝子の発現誘導を介して、がん細胞の増殖・生存を誘導する [73, 76]。さらに、白血病の一種である T 細胞急性リンパ芽球性白血病 (T-cell Acute lymphoblastic leukaemia: T-ALL) では、DDX5 が Mastermind like transcriptional coactivator 1 (MAML1) と共に NOTCH1 と複合体を形成することで、その転写を活性化することが示された [77]。また、急性骨髄性白血病 (Acute myeloid Leukemia: AML) では、DDX5 をノックダウンすることにより、活性酸素種 (ROS) の産生が誘導され、AML 細胞のアポトーシスが誘導されることが報告されて

いる [78]。一方、肝がんでは DDX5 の発現が抑制されており、DDX5 の発現が低い患者ほど予後が不良であることが報告されている [79]。肝がん細胞に DDX5 を過剰発現させると、細胞増殖が抑制されることが観察されており、DDX5 は肝がんの進行や悪性化に対して抑制的に機能すると考えられる。これらの報告により、DDX5 は発がん制御分子として注目されているが、現在まで、MPN や CML における DDX5 の発現状態やその機能は不明である。

2022 年に、Ling らは、Topoisomerase I (Topo I) の阻害剤である Camptothecin (CPT) に、メチレンジオキシ基を付加した化合物である FL118 は、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 [80]。それ以前に、FL118 は、Survivin のリポーター遺伝子アッセイを用いた化合物ライブラリーのスクリーニングにより、Survivin の発現阻害剤として同定されていた。また、FL118 は、大腸がん細胞や膵臓がん細胞の増殖を顕著に抑制するだけでなく、膵臓がんのヒト腫瘍異種移植モデルにおいて、週 1 回の FL118 (5 mg/kg) の経口投与が優れた抗腫瘍活性を示すことが報告されている [81]。

本研究では、MPN における DDX5 を介した発がん誘導機構を解明し、DDX5 を標的とした治療戦略の有効性を検討することを目指した。はじめに、(1) JAK2V617F による DDX5 の発現誘導機構および MPN 細胞の増殖や腫瘍形成における DDX5 の役割を検討した。次に、(2) 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、MPN に対する DDX5 阻害剤 FL118 の抗腫瘍活性を検討した。最後に、(3) CML 細胞の増殖、生存における DDX5 の機能を解析し、BCR-ABL 阻害剤に耐性を持つ CML 細胞に対する FL118 の抗腫瘍活性を検討した。

第2章 実験方法と材料

1. 試薬

Recombinant murine interleukin-3 (IL-3)、Recombinant human Epo は、それぞれ PEPROTECH、協和キリンより購入した。Puromycin, Hygromycin および Blasticidin は、InVivoGen より購入した。Ruxolitinib、Cycloheximide、MG132 は、Nacalai tesque より購入した。Camptothecin (CPT)、FL118 は、それぞれ MedChemExpress、Adooq Bioscience LLC から購入した。Ipatasertib、Rapamycin、Imatinib は、Cayman Chemical より購入した。Pimozide、Trametinib は、それぞれ Merck Millipore、Selleck より購入した。

2. 抗体

抗 Flag (M2) 抗体は、Sigma-Aldrich より購入した。抗 DDX5 抗体は、Merck Millipore より購入した。抗 HA 抗体は、Roche Applied Science より購入した。抗リン酸化 JAK2 (Y1007/Y1008) 抗体、抗リン酸化 STAT5 (Y694) 抗体、抗リン酸化 ERK (T202/Y204) 抗体、抗リン酸化 Akt (S473) 抗体、抗リン酸化 mTOR (S2448) 抗体、抗リン酸化 p70 S6 K (T389) 抗体、抗リン酸化 4E-BP1 (T37/46) 抗体、抗リン酸化 Abl (Y245) 抗体、抗 ERK 抗体、抗 mTOR 抗体、抗 p70 S6 K 抗体、抗 4E-BP1 抗体、抗 c-Abl 抗体および抗 cleaved-caspase-3 抗体、HRP 標識抗ラット二次抗体は、Cell Signaling Technology より購入した。抗 EpoR 抗体、抗 JAK2 抗体、抗 STAT5 抗体、抗 Akt 抗体、抗 Bcl-XL 抗体、抗 Survivin 抗体、抗 caspase-3 (p17) 抗体および抗 β -actin 抗体は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。HRP 標識抗マウス二次抗体、HRP 標識抗ウサギ二次抗体は Nacalai tesque より購入した。

3. 細胞培養

マウス Pro-B 細胞 (Ba/F3 細胞) は、10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS) (Biosera)、100 U/mL

Penicillin、100 µg/mL Streptomycin (Nacalai tesque) および 2 ng/mL IL-3 を含有した RPMI-1640 (Nacalai tesque) を用いて培養した。空ベクターまたは JAK2 と EpoR を共発現させた Ba/F3 細胞 (-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞) は、10% FBS、100 U/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin、5 U/mL Epo を含有した RPMI 培地で培養した。JAK2V617F および EpoR を共発現させた Ba/F3 細胞 (V617F/EpoR 細胞)、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞、BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞、ヒト JAK2V617F 陽性 MPN 患者由来 HEL 細胞、ヒト CML 患者由来 K562 細胞は、10% FBS、100 U/mL Penicillin、100 µg/mL Streptomycin 含有 RPMI 培地で培養した。HEK293T 細胞は、10% FBS 含有 DMEM (Nacalai tesque) を用いて培養した。各細胞は、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

4. プラスミド

2 種類の EpoR 発現ベクターである MSCV-IRES-GFP-EpoR、MSCV-puro-EpoR-c-Flag および MSCV-Hygro-JAK2-c-HA、MSCV-Hygro-JAK2V617F-c-HA、MSCV-IRES-GFP-BCR-ABL、MSCV-IRES-GFP-BCR-ABL T315I を使用した [26,82-84]。MSCV-Puro-N-Flag-DDX5 および MSCV-Puro-N-Flag-DDX5 K144N [85] をテンプレートとして、HotStarTaq® DNA Polymerase (QIAGEN)を用いた PCR を行い、Flag タグを付加した DDX5 および Flag タグを付加した DDX5 K144N をコードする cDNA を増幅した。PCR 産物を制限酵素 BamH I および Sal I で処理した。その後、Ligation High (TOYOBO) を用いて、制限酵素 BamH I および Xho I で切断したレトロウイルス発現ベクターMSCV-Blastに挿入し、MSCV-Blast-N-Flag-DDX5 および MSCV-Blast-N-Flag-DDX5K144N を作製した。

Horizon Discovery Ltd. の siDESIGN Center (<https://horizondiscovery.com/en/ordering-and-calculation-tools/sidesign-center>) を利用し、マウスおよびヒト DDX5 に対する shRNA の配列を設計した。以下に示す配列のオリゴヌクレオチドを合成した (Eurofins Japan)。下線部はマウス DDX5、ヒト DDX5 の塩基配列である。

shRNA against murine DDX5:

5'-GATCCCCGTAGATACATACAGAAGAATTCAAGAGATTCTTCTGTATGTATCTAC

TTTTTA-3'および

5'-AGCTTAAAAAGTAGATACATACAGAAGAATCTCTTGAATTCTTCTGTATGTATCTAC

GGG-3'.

shRNA against human DDX5:

5'-GATCCCCCACAAGAGGTGGAAACATATTCAAGAGATATGTTTCCACCTCTTG

TTTTTA-3'および

5'-AGCTTAAAAAACAAGAGGTGGAAACATATCTCTTGAATATGTTTCCACCTCTTG

GGG-3'.

100 μ M の各オリゴヌクレオチド 4 μ L、10 $\times$ Annealing buffer (200 mM Tris-HCL pH7.5, 100 mM MgCl₂, 500 mM NaCl) 2 μ L、滅菌水 10 μ L を 0.6 mL マイクロチューブ内で混和後、ヒートブロックを用いて 95°C で 3 分間加熱し、室温で一晩放冷することでアニーリング反応を行った。Hind III および Bgl II で切断した pSuper-retro-puro (Ologoengine) に、Ligation High (TOYOBO) を用いて、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを挿入した。

マウス DDX5 およびヒト DDX5 に対する sgRNA は、CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp>) を用いて設計し、以下に示す配列のオリゴヌクレオチドを合成した (Eurofins Japan)。下線部は、マウス DDX5、ヒト DDX5 の塩基配列である。

sgRNA against murine DDX5

5'-CACCGTCACTCGAATAACCCGACA-3'および 5'-AAACTGTCGGGTATTCGAGTGAC-3'

shRNA against human DDX5:

5'-CACCGAGACCGCGGCCGGGATCGA-3'および 5'-AAACTCGATCCCGGCCGCGGTCTC-3'

shRNA 発現ベクターの作製と同様の方法で、アニーリングしたオリゴヌクレオチドを制限酵素 BsmBI で切断した lentiCRISPR v2 (Addgene) にクローニングした。

5. レトロウイルス・レンチウイルスの調製および感染

2 種類のレトロウイルスヘルパーベクター (pE-Eco helper vector あるいは VSVG helper vector および pGP helper vector) と各レトロウイルス発現ベクターをそれぞれ 1 μ g ずつ混和した。また、2 種類のレンチウイルスヘルパーベクター (psPAX2 helper vector および pMD2.G helper vector) と各 gRNA を挿入した lentiCRISPR v2 をそれぞれ 1 μ g ずつ混和した。9 μ L の FUGENE6 Transfection Reagent (Roche) を 250 μ L の Opti-MEMTM (GibcoTM) に加えた後、混和したベクター (計 3 μ g) を加え、15 分室温でインキュベートした。その後、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。16 時間後、培地を除き、10% FBS、100 U/mL Penicillin、100 μ g/mL Streptomycin 含有 DMEM を 2 mL 加えた。4~6 時間おきに、ウイルスを含む培地を回収し、新たに 2 mL の培地を加える操作を 2 日間繰り返した。回収したウイルス溶液は、0.45 μ m フィルターを用いてろ過し、使用するまで -80°C に保存した。

レトロウイルス、レンチウイルスの感染には、RetroNectin® (TAKARA) を用いた。Non-treat タイプの 24 well プレートに、50 μ g/mL となるように PBS で希釈した RetroNectin® (TAKARA) を 500 μ L 加え、4°C で一晩インキュベートし、プレートをコーティングした。翌日、24 well プレートから、RetroNectin® を除き、2% BSA/PBS 溶液を 1 mL 加え、30 分間室温でインキュベートすることで、ブロッキングを行った。2% BSA/PBS 溶液を除いた後、プレートを 2 mL の PBS で洗浄した。2 mL のレトロウイルス溶液またはレンチウイルス溶液を加え、37°C で 6 時間インキュベートした。6 時間後、ウイルス溶液を除き、各細胞を 2 mL ずつ播種し、37°C で 3 日間インキュベートした。ウイルス感染後、細胞をそれぞれ 2 μ g/mL Puromycin、400 μ g/mL Hygromycin あるいは 7 μ g/ml の Blastcidin を添加した培地で培養し、感染細胞を選択した。

6. Topoisomerase I (Topo I) 活性の測定

Topoisomerase I assay kit (TopoGEN) を用いて、*in vitro* における Topo I 活性の測定した。

スーパーコイル型 DNA である pHOT1 DNA (250 ng) と Recombinant murine Topo I (1.67 U) に、CPT (125、250、500、1000 nM) または FL118 (125、250、500、1000 nM) を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。Stop Buffer を加えて反応を停止した後、各サンプルを 1% アガロースゲルで電気泳動した。ゲルを 0.5 µg/mL Ethidium Bromide で染色し、UV 照射下で観察した。

7. WST assay

sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR 細胞および sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 5×10^3 cells/100 µL になるように調整した。sh-scramble (sh-SCR) を発現させた HEL 細胞および sh-DDX5 を発現させた HEL 細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 2×10^4 cells/100 µL になるように調整した。これらの細胞を 96 well プレートに 100 µL ずつ播種し、24 時間、48 時間、72 時間培養した。また、sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞に、空ベクター、野生型 DDX5 (WT)、DDX5 変異体 (K144N) を再構成した細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 5×10^3 cells/100 µL になるように調整し、96 well プレートに 100 µL ずつ播種し、24 時間、48 時間培養した。さらに、V617F/EpoR 細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 1×10^4 cells/100 µL になるように調整後、CPT または FL118 (12.5, 25, 50 nM) で処理した。同様に、HEL 細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 2×10^4 cells/100 µL になるように調整後、CPT または、FL118 (2.5, 5, 10 nM) で処理した。これらの薬剤処理を行った細胞を 96 well プレートに 100 µL ずつ播種し、24 時間培養した。K562 細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 2×10^4 cells /100 µL になるように調整後、Imatinib (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 µM)、CPT (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 nM) または FL118 (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 nM) で処理し、96 well プレートに 100 µL ずつ播種し、48 時間培養した。また、コントロール K562 細胞および DDX5-KO K562 細胞、コントロール BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞、コントロール BCR-ABL T315I 発現

Ba/F3 細胞、DDX5-KO BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および DDX5-KO BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞は、1% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 1×10^4 cells /100 μ L になるように調製後、96 well プレートに 100 μ L ずつ播種し、24 時間培養した。BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞または BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 2×10^4 cells /100 μ L になるように調整後、Imatinib (0.06, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M)、CPT (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 nM)、または FL118 (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 nM) で処理し、96 well プレートに 100 μ L ずつ播種し、24 時間培養した。各細胞に、10 μ L の WST 試薬 (Nacalai tesque) を加え、37°C で、1.5~2 時間インキュベートし、波長 450 nm (対照波長:690 nm) で吸光度を測定した。

8. 細胞生存率の測定

sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR 細胞および sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞、また、sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞に空ベクター (-)、野生型 DDX5 (WT)、DDX5 変異体 (K144N) を再構成した細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 1×10^5 cells/1mL になるように調整し、24 well プレートに 1 mL ずつ播種し、48 時間培養した。V617F/EpoR 細胞 (1×10^5 cells/1mL) を CPT または FL118 (12.5, 25, 50 nM) で処理し、24 well プレートに 1 mL ずつ播種し、24 時間培養した。HEL 細胞 (2×10^5 cells/1mL) を CPT あるいは FL118 (2.5, 5, 10 nM) で処理し、24 well プレートに 1 mL ずつ播種し、24 時間培養した。K562 細胞 (4×10^6 cells/4 mL) を Imatinib (1, 2 μ M)、CPT (125, 250, 500 nM) あるいは FL118 (125, 250, 500 nM) で処理し、6 cm dish に 4 mL ずつ播種し、48 時間処理した。さらに、コントロール K562 細胞および DDX5-KO 細胞は、1% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 1×10^5 cells /1mL になるように調整し、1 mL ずつ 24 well plate に播種し、24 時間培養した。BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞または BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞は、1% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 5×10^5 cells/1 mL になるように調整した。その後、Imatinib (2 μ M)、CPT (50, 100

nM)、あるいは FL118 (50, 100 nM) で処理し、24 well プレートに 1 mL ずつ播種し、18 時間培養した。コントロール BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞、コントロール BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞、DDX5-KO BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および DDX5-KO BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞は、1% FBS 含有 RPMI 培地を用いて 1×10^5 cells/1 mL に調整した後、24 well plate に 1 mL ずつ播種し、24 時間培養した。Beckman Coulter Vi-Cell (Beckman Coulter) を用いたトリパンブルー染色法により、各細胞の生存率を測定した。

9. Annexin V-PE/7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) 染色および Annexin V-FITC/PI 染色

Annexin V-PE/7-AAD 染色キットは eBioscience から購入し、Annexin V-FITC/PI 染色キットは Nacalai tesque から購入した。sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR 細胞および sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞、また、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞に空ベクター (-)、野生型 DDX5 (WT)、DDX5 変異体 (K144N) を再構成した細胞は、10% FBS 含有 RPMI 培地で 24 時間培養した。これらの細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、 1×10^6 cells/mL となるように Annexin 結合液に懸濁した。100 μ L の細胞懸濁液に、5 μ L の Annexin V-PE と 5 μ L の 7-AAD を加え、暗所で 15 分間インキュベートした。15 分後、Annexin 結合液をさらに 400 μ L 加え、BD FACS Symphony™ A5 (BD Biosciences) を使用し、Annexin V-PE および 7-AAD の陽性割合を測定した。また、V617F/EpoR 細胞を CPT または FL118 (12.5, 25, 50 nM) で処理し、48 時間培養した。HEL 細胞を CPT または FL118 (2.5, 5, 10 nM) で処理し、24 時間培養した。薬剤処理後、これらの細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄後、 1×10^6 cells/mL となるように Annexin 結合液に懸濁した。100 μ L の細胞懸濁液に、5 μ L の Annexin V-FITC と 5 μ L の PI を加え、暗所で 15 分間インキュベートした。15 分後、Annexin 結合液をさらに 400 μ L 加え、同様にフローサイトメーターを用いて解析を行った。FlowJo™ (BD Biosciences) を用いてデータ解析を行い、Annexin V が陽性であり、かつ 7-AAD あるいは PI が陰性である細胞を初期アポトーシス細胞とし、Annexin V が陽性であり、かつ 7-AAD あ

るいは PI が陽性である細胞を後期アポトーシス細胞とした。

10. Immunoblotting

各細胞を回収し、PBS で 1 回洗浄した。細胞に、EBC Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、120 mM NaCl、1 mM EDTA (pH 8.0)、0.5% NP-40、10 mM β -glycerophosphate、2.5 mM NaF、0.1 mM Na_3VO_4 、2 $\mu\text{g/mL}$ Aprotinin、2 $\mu\text{g/mL}$ Leupeptin) を加えて溶解し、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心した。細胞溶解液のタンパク質濃度を Bradford 試薬により定量し、各サンプルのタンパク質濃度を一定に揃えた後、SDS 化した。SDS 化したサンプルを 10% または 15% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、480 mA で 90~120 分間通電し、PDVF 膜 (Merck Milipore) に転写した。PDVF 膜を 5% スキムミルク/0.05% of Tween20 含有 PBS (T-PBS) または 1% BSA/T-PBS で 1 時間ブロッキングした。各一次抗体を 5% ブロッキングワシ (Nacalai tesque) /T-PBS で 1:1000 に希釈し、PDVF 膜と室温で 2 時間または 4°C で一晩反応させた。次に、PDVF 膜を T-PBS で 5 分間洗浄し、これを 3 回繰り返した。その後、PDVF 膜と 5% ブロッキングワシ/T-PBS で 1:3000 に希釈した HRP 標識二次抗体を室温で 1~1.5 時間反応させた。その後、T-PBS を用いて、PDVF 膜の洗浄を 30 秒間 1 回、5 分間 2 回、20 分間 2 回行った。ECLTM Western Blotting Detection Reagents (Cytiva) と反応させ、Amersham Imager 600 によりタンパク質を可視化した。ImageJ により、各バンドを定量し、各タンパク質量を算出した。

11. RNA 抽出および RT-PCR

各細胞を回収し、PBS で 1 回洗浄した後、Sepazol (Nacalai tesque) を 1 mL 加え、懸濁した。200 μL のクロロホルムを加えた後、Vortex を用いてよく混和し、室温で 5 分間インキュベートした。その後、4°C、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上層 400~500 μL を新しい 1.5 mL チューブに移した。同量の 2-プロパノールを加え、Vortex を用いてよく混和後、4°C、15,000 rpm で 15 分間遠心した。溶液を除いた後、500 μL 70% エタノールを加え、4°C、15,000 rpm

で 5 分間遠心した。溶液を除き、沈殿した RNA に RNase 不含滅菌水 (Nacalai tesque) を加え、溶解した。1 μ g の RNA、1 μ L の oligo (dT)₂₀ プライマー (TOYOBO) 、RNase 不含滅菌水を合計 5.8 μ L となるように混和し、70°C で 10 分間加熱した後、急冷した。その後、サンプルに 1 μ L の RevaerTra Ace® (TOYOBO)、4 μ L の 5 $\times$ RT Buffer、8 μ L の 2.5 mM dNTP、0.2 μ L の 40 U RNase inhibitor (TOYOBO) を混和し、42°C で 60 分間逆転写反応を行い、70°C で 10 分間加熱した。Luna Universal qPCR Master Mix (NEW ENGLAND Biolabs) を用いて、リアルタイム PCR を行った。PCR 反応は 95°C 60 秒を 1 サイクル、95°C 15 秒の後 60°C 30 秒を 45 サイクルで行った。DDX5 mRNA、Survivin mRNA、BCL-XL mRNA の発現量を β 2-microglobulin の mRNA の発現量で補正し、相対的な各 mRNA の発現量を算出した。

使用したプライマーの塩基配列を以下に示した。

Murine DDX5

Forward: 5'-GCCAGTTGCTCTGAGTGCAT-3' Reverse: 5'-AGTTCTCGAGTTGGTGCCAG-3'

Murine Survivin

Forward: 5'-CCAGATCTGGCAGCTGTACC-3' Reverse: 5'-TGGCTCTCTGTCTGTCCAGT-3'

Murine Bcl-XL:

Forward: 5'-TGGTGGTCGACTTTCTCTCC-3' Reverse: 5'-CTCCATCCCGAAAGAGTTCA-3'

Murine β 2-microglobulin:

Forward: 5'-CTGACCGGCCTGTATGCTAT-3' Reverse: 5'-TCACATGTCTCGATCCCAGT-3'

Human DDX5

Forward: 5'-TGACCTCACACGAAGAATGC-3' Reverse: 5'-ATCCGTGGCAATGAGGATAG-3'

Human Survivin:

Forward: 5'-TTCTCAAGGACCACCGCATC-3' Reverse: 5'-AAGACATTGCTAAGGGGCCC-3'

Human Bcl-XL:

Forward: 5'-GGTCGCATTGTGGCCTTTTT-3' Reverse: 5'-GGTAAGTGGCCATCCAAGCT-3'

Human β 2-microglobulin

Forward: 5'-CTCACGTCATCCAGCAGAGA-3' Reverse: 5'-CGGCAGGCATACTCATCTTT-3'

12. ノードマウスを用いた腫瘍形成能の評価

コントロールの空ベクター発現 Ba/F3 細胞 (-)、sh-scramble (sh-SCR) を発現させた

V617F/EpoR 細胞、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞 (1×10^7 cells) を 4 週齢雌の BALB/c ノードマウス (三協ラボサービス) に皮下移植した (コントロール群は $n=12$ 、他は $n=16$)。移植後 13 日目に、マウスを解剖し、腫瘍、脾臓、肝臓を摘出し、重量を測定した。また、移植後 25 日間、マウスの生存日数を測定した。

コントロール Ba/F3 細胞 (-)、sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR 細胞、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞に空ベクター (-)、野生型 DDX5 (WT)、DDX5 変異体 (K144N) を再構成した細胞 (3×10^6 cells) を 4 週齢雌の BALB/c ノードマウスに皮下移植した (コントロール群は $n=3$ 、他は $n=6$)。移植後 15 日目に、マウスを解剖し、腫瘍、脾臓、肝臓を摘出し、重量を測定した。さらに、コントロール Ba/F3 細胞 (-) または V617F/EpoR 細胞 (1×10^7 cells) を 4 週齢雌の BALB/c ノードマウスに皮下移植した (コントロール群は $n=3$ 、他は $n=12$)。Ling らの報告に従い、1.5 mg の FL118 を 1% v/v DMSO、0.1% w/v hydroxypropyl- β -cyclodextrin、2.5% propylene glycol、2.5% PEG400 を含有した生理食塩水 6 mL に溶解した [80]。移植後 5 日目、7 日目、9 日目に、各マウスに FL118 (2.5 mg/kg) を経口投与した。移植後 11 日目にマウスを解剖し、腫瘍、脾臓、肝臓を摘出し、重量を測定した。これらの動物実験は、慶應義塾大学実験動物委員会の承認を受けている (A2022-298)。

13. Hematoxylin-Eosin (HE) 染色法

マウスから摘出した脾臓および肝臓は、4% パラホルムアルデヒドで保存した。脾臓および肝臓を PBS 溶液で洗浄し、切断後、カルノア固定液 (Wako) を用いて 4°C で一晩攪拌し脱水した。LEICA TP 1020 (Leica Biosystems) を使用し、組織内水分をエタノールに置換後、キシレンを用いて脱エタノールし、パラフィン固定を行った。パラフィン包埋装置を用いて、脾臓および肝臓をパラフィンで包埋し、4°C で一晩インキュベートした。パラフィンブロックを 10 μ m の厚さで切り、パラフィン切片を作製した。パラフィン切

片を Hematoxylin (Merck) で 5 分間処理し、精製水で 10 分間洗浄後、Eosin (Nacalai tesque) で 5 分間処理した。精製水で 10 分間洗浄後、Ethanol で 40 秒間処理し、Xylene で 10 分間処理した。切片をよく風乾してマリノールで封入後、オールインワン顕微鏡 BZ-X700 (Keyence) で脾臓および肝臓の組織構造を観察した。

14. 統計解析

平均値±標準偏差 (standard deviation: SD) で示した。統計学的解析は、Prism 8.0.1 (GraphPad) により、A one-way analysis of variance (ANOVA) を用いて行った。P 値が 0.05 以下を有意差があるとした。

第3章. 結果

1 部 MPN における DDX5 の発現誘導機構および DDX5 の機能の解析

1. V617F/EpoR 細胞における JAK2V617F の活性に依存した DDX5 の発現誘導

MPN と DDX5 の関連性を検討するため、まず、MPN の原因遺伝子産物である JAK2V617F が DDX5 の発現に及ぼす影響を解析した。レトロウイルス感染により、マウス ProB 細胞である Ba/F3 細胞に、空ベクター (-)、野生型 JAK2 (WT) あるいは JAK2V617F を EpoR と共発現させた 3 種類の細胞 (-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞、V617F/EpoR 細胞) を作製した。Immunoblotting を行った結果、Epo 非存在化において、-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞では JAK2 のリン酸化は認められなかったが、V617F/EpoR 細胞では JAK2 がリン酸化された。また、Epo 非存在化において、-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞では、DDX5 はわずかに発現が検出されただけであったが、V617F/EpoR 細胞では DDX5 が高発現していた (Fig. 1A)。また、RT-PCR により DDX5 mRNA の発現を調べた結果、-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞と比較して、V617F/EpoR 細胞では、DDX5 mRNA の発現量が有意に増加した (Fig. 1B)。したがって、JAK2V617F により、DDX5 の発現はタンパク質レベルおよび mRNA レベルで誘導されることが明らかになった。

次に、V617F/EpoR 細胞を JAK2 阻害剤 Ruxolitinib (1, 2 μ M) で処理し、JAK2V617F による DDX5 の発現誘導に及ぼす JAK2 のキナーゼ活性の影響を検討した。Type I JAK2 阻害剤である Ruxolitinib は、活性化された JAK2 の ATP 結合部位に ATP と競合して結合する。Ruxolitinib により、JAK2 および下流シグナル経路の活性化は抑制される一方で、JAK2 の activation loop の Y1007/Y1008 のリン酸化は増強されることが報告されている [86]。Immunoblotting を行った結果、Ruxolitinib で処理した V617F/EpoR 細胞では、V617F のリン酸化が増強され、JAK2 の下流シグナル分子である STAT5、ERK、Akt のリン酸化が抑制された。また、この条件下において、DDX5 タンパク質の発現が顕著に抑制された (Fig. 2A)。

さらに、RT-PCR を行った結果、V617F/EpoR 細胞における DDX5 mRNA の発現は Ruxolitinib 処理により有意に抑制された (Fig. 2B)。以上の結果より、JAK2 V617F のキナーゼ活性に依存して、DDX5 mRNA および DDX5 タンパク質の発現が誘導されることが明らかになった。

2. V617F/EpoR 細胞における STAT5 の活性化による DDX5 の発現誘導

JAK2V617F は、STAT5、MEK-ERK 経路、Akt-mTOR 経路の活性化を誘導する [6, 27]。JAK2V617F による DDX5 の発現誘導機構を解析するために、V617F/EpoR 細胞を STAT5 阻害剤 Pimozide (10 μ M)、MEK 阻害剤 Trametinib (1 μ M)、Akt 阻害剤 Ipatasertib (2.5 μ M) で処理し、Immunoblotting および RT-PCR により、DDX5、DDX5 mRNA の発現を検討した。Pimozide、Trametinib の処理により、それぞれ STAT5、ERK の活性化が抑制された (Fig. 3A, C)。Ipatasertib は活性化された Akt の ATP 結合部位に ATP と競合して結合することで、活性を阻害する。その際に、Akt の立体構造を変化させ、ホスファターゼによる脱リン酸化が阻害されるため、Akt の S473 のリン酸化が増強する [87]。Ipatasertib 処理により、V617F/EpoR 細胞において Akt のリン酸化が増強された (Fig. 3E)。Pimozide 処理により DDX5 の発現が有意に減少したが、Trametinib 処理や Ipatasertib 処理は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 3A, C, E)。また、Pimozide 処理により DDX5 mRNA の発現が有意に抑制されたのに対し、Trametinib 処理や Ipatasertib 処理は DDX5 mRNA の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 3B, D, F)。以上の結果より、JAK2V617F は、STAT5 の活性化を介して、DDX5 の発現を誘導することが明らかになった。

3. V617F/EpoR 細胞における JAK2V617F-STAT5 経路の活性化を介した DDX5 タンパク質の安定化

Fig. 1-3 より、JAK2V617F の発現や Ruxolitinib、Pimozide 処理による DDX5 mRNA の発現の変動に比べて、DDX5 タンパク質の発現の変動が顕著であったことから、JAK2V617F-

STAT5 経路が DDX5 タンパク質の安定化を制御する可能性が示唆された。そこで、V617F/EpoR 細胞をコントロールの DMSO、Ruxolitinib、あるいは Pimozide で 12 時間処理し、その後、タンパク質合成阻害剤 Cycloheximide (CHX) (100 μ g/mL) を添加し、経時的に細胞溶解液を調製することにより、DDX5 タンパク質の安定性を評価した。Immunoblotting を行った結果、DMSO で処理した細胞では、CHX 添加後 6 時間まで DDX5 の発現量は変化しなかったが、Ruxolitinib や Pimozide で処理した細胞では、CHX 添加後、それぞれ 4 時間、2 時間から DDX5 の分解が誘導された (Fig. 4)。したがって、JAK2 V617F-STAT5 経路の活性化は、DDX5 タンパク質の安定化に寄与することが明らかになった。

次に、Ruxolitinib、Pimozide 処理による DDX5 の分解誘導がプロテアソームを介しているかを検討するために、V617F/EpoR 細胞を Ruxolitinib あるいは Pimozide で 12 時間処理後、プロテアソーム阻害剤 MG132 (10 μ M) を 5 時間添加し、Immunoblotting により DDX5 の発現を検討した。その結果、Ruxolitinib、Pimozide 処理による DDX5 の発現抑制は、MG132 処理により有意に阻害された (Fig. 5A, B, C, D)。以上の結果より、JAK2V617F は、STAT5 の活性化を介して、DDX5 mRNA の発現を誘導すると共に、DDX5 のプロテアソームによる分解を抑制し、DDX5 タンパク質の安定化を促進することが明らかになった。

4. HEL 細胞における JAK2V617F の活性化を介した DDX5 の発現誘導

次に、JAK2V617F 変異を有する MPN 患者由来の HEL 細胞を用いて、JAK2V617F による DDX5 発現誘導機構を解析した。HEL 細胞を JAK2 阻害剤 Ruxolitinib (2 μ M) で処理し、Immunoblotting を行った結果、JAK2 のリン酸化の増強、STAT5、ERK、Akt のリン酸化の抑制および DDX5 の発現低下が認められた (Fig. 6A)。また、RT-PCR を行った結果、DDX5 mRNA の発現は、Ruxolitinib 処理により有意に低下した (Fig. 6B)。次に、HEL 細胞を Pimozide (20 μ M)、Trametinib (1 μ M)、Ipatasertib (5 μ M) で処理し、Immunoblotting、RT-PCR により、DDX5 および DDX5 mRNA の発現を検討した。Pimozide、Trametinib の処理により、それぞ

れ STAT5、ERK のリン酸化の抑制が確認された。また、Ipatasertib 処理により、Akt のリン酸化亢進が観察された。この条件下において、Pimozide 処理は DDX5 の発現を抑制したが、Trametinib 処理や Ipatasertib 処理は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 7A, C, E)。さらに、HEL 細胞において、Pimozide 処理は DDX5 mRNA の発現を有意に低下させたが、Trametinib 処理や Ipatasertib 処理は DDX5 mRNA の発現に影響を及ぼさなかった (Fig. 7B, D, F)。以上の結果より、HEL 細胞においても、JAK2V617F は、STAT5 の活性化を介して DDX5 の発現を誘導することが明らかになった。

5. HEL 細胞における JAK2V617F-STAT5 経路の活性化を介した DDX5 タンパク質の安定化

HEL 細胞においても、JAK2V617F や STAT5 の活性化が DDX5 タンパク質の安定化に寄与しているかどうかを検討するため、HEL 細胞を DMSO、Ruxolitinib あるいは Pimozide で 12 時間処理した後に、CHX (100 µg/mL) を添加し、Immunoblotting により、DDX5 の安定性を評価した。DMSO で処理した細胞では、CHX 添加後 6 時間まで DDX5 の発現量は変化しなかったが、Ruxolitinib や Pimozide で処理した細胞では、CHX 添加後 2 時後より、DDX5 の発現量が顕著に減少し、DDX5 の分解が誘導された (Fig. 8)。

次に、HEL 細胞を Ruxolitinib あるいは Pimozide で 12 時間処理後、プロテアソーム阻害剤 MG132 (10 µM) を 5 時間添加し、Immunoblotting により DDX5 の発現を検討した。その結果、Ruxolitinib 処理や Pimozide 処理による DDX5 の発現抑制は、MG132 処理により有意に阻害された (Fig. 9A, B)。以上の結果より、HEL 細胞においても、JAK2V617F-STAT5 経路の活性化は、DDX5 mRNA の発現を誘導するだけでなく、DDX5 のプロテアソームによる分解を抑制し、DDX5 タンパク質の安定化を促進することが明らかになった。

6. V617F/EpoR 細胞における DDX5 による mTOR 経路の活性化を介した細胞増殖誘導

V617F/EpoR 細胞における DDX5 の機能を解析するために、レトロウイルス感染により、shRNA を用いて DDX5 の発現を抑制した。Immunoblotting により、sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR 細胞に比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞では、DDX5 の発現が有意に減少したことが確認された (Fig. 10A)。WST assay により、これらの細胞の増殖能を検討した結果、V617F/EpoR 細胞の増殖能は DDX5 のノックダウンにより有意に抑制された (Fig. 10B)。

次に、DDX5 のノックダウンが、JAK2/V617F のシグナル経路の活性化に及ぼす影響を検討した。Immunoblotting を行った結果、DDX5 のノックダウンは、V617F/EpoR 細胞における JAK2、STAT5、ERK、Akt の活性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 (Fig.11)。そこで、V617F/EpoR 細胞の増殖能における mTOR 経路の重要性を検討するために、V617F/EpoR 細胞を mTOR 阻害剤 Rapamycin (5 μ M) で処理した。Immunoblotting により、Rapamycin 処理により V617F/EpoR 細胞における mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化が抑制されたことを確認した (Fig. 12A)。WST assay を行った結果、Rapamycin 処理により V617F/EpoR 細胞の増殖能は有意に抑制された (Fig. 12B)。したがって、mTOR 経路の活性化は V617F/EpoR 細胞の増殖能に必須であることが示された。以上の結果より、DDX5 は、mTOR 経路の活性化を介して細胞増殖を誘導することが明らかになった。

7. HEL 細胞における DDX5 による mTOR 経路の活性化を介した細胞増殖誘導

HEL 細胞における DDX5 の機能を解析するために、レトロウイルス感染により、HEL 細胞に sh-scramble (sh-SCR) あるいは sh-DDX5 を発現させた。Immunoblotting を行った結果、sh-DDX5 の発現により、HEL 細胞における DDX5 の発現が有意に抑制されることが確認された。また、DDX5 のノックダウンは、JAK2、STAT5、ERK、Akt の活性化には影響を及ぼ

さなかったのに対し、mTOR およびその基質である p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を抑制した (Fig. 13A)。WST assay により、これらの細胞の増殖能を検討したところ、sh-SCR を発現させた HEL 細胞に比べて、sh-DDX5 を発現させた HEL 細胞の増殖能は顕著に低下した (Fig. 13B)。

さらに、HEL 細胞を Rapamycin (5 μ M) で処理し、HEL 細胞の増殖能に及ぼす mTOR の役割を検討した。Imunoblotting により、Rapamycin で処理した HEL 細胞では、mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化が抑制されることを確認した (Fig. 14A)。WST assay を行った結果、Rapamycin 処理は HEL 細胞の増殖能を有意に抑制した (Fig. 14B)。したがって、mTOR 経路の活性化は、HEL 細胞の増殖においても必要であることが示された。以上の結果より、HEL 細胞においても、DDX5 は、mTOR 経路の活性化を介して細胞増殖を誘導することが明らかになった。

8. JAK2V617F による DDX5 を介した腫瘍形成

JAK2V617F による腫瘍形成における DDX5 の役割を検討するために、4 週齢雌のヌードマウスに、空ベクターを発現させた Ba/F3 細胞 (-)、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞および sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を皮下移植した。移植後 13 日目において、コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスでは腫瘍形成が認められなかったのに対して、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは顕著な腫瘍形成が認められた。また、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスに比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、腫瘍形成が抑制された (Fig. 15A)。腫瘍を摘出し、重量を測定したところ、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスに比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、腫瘍の重量が有意に減少した (Fig. 15 C)。また、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、脾臓と肝臓の肥大化が認められたが、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞

を移植したマウスでは、脾臓と肝臓の肥大化が抑制された (Fig. 15B)。脾臓、肝臓の重量を測定した結果、コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスに比べて、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、脾臓と肝臓の重量が有意に増加した。一方で、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスに比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、脾臓と肝臓の重量が有意に減少した (Fig. 15C)。

さらに、各細胞を移植したヌードマウスの生存日数を 25 日間測定した。その結果、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスは、細胞移植後 18 日で全数が死亡したのに対して、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの生存日数は延長された (Fig. 15D)。以上の結果より、JAK2V617F による腫瘍形成において、DDX5 が重要な役割を果たすことが明らかになった。

これまでの研究を通して得られた結果より、MPN において、JAK2V617F は、STAT5 の活性化を介して、DDX5 mRNA の発現を誘導すると共に、DDX5 のプロテアソーム分解を抑制し、DDX5 タンパク質の安定化にも寄与することが示された。また、DDX5 は、JAK2 V617F の下流で mTOR 経路の活性化を介して、細胞増殖および腫瘍形成を誘導することが明らかになった (Fig. 16)

2 部 JAK2V617F による発がん誘導における DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性の 必要性および FL118 の抗腫瘍効果の検討

1. V617F/EpoR 細胞における RNA ヘリカーゼ活性非依存的な DDX5 による細胞増殖誘導

DDX5 は JAK2V617F による細胞増殖や腫瘍形成において重要な役割を果たすことが明らかになったが、MPN における DDX5 を介した発がん誘導の分子機構は未だ不明である。そこで、JAK2V617F による発がん誘導シグナルにおける DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性の必要性を検討するため、DDX5 のヘリカーゼコアに存在する ATP 結合部位である 144 番目のリシン残基をアスパラギンに置換した、RNA ヘリカーゼ活性を欠損した DDX5 変異体 (K144N) を用いた (Fig. 17A)。まず、DDX5 をノックダウンするために、レトロウイルス感染により、V617F/EpoR 細胞に sh-scramble (sh-SCR) および sh-DDX5 を導入した (Fig. 17B)。さらに、レトロウイルス感染により、sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞に、空ベクター (-)、野生型 DDX5 (WT)、DDX5 変異体 (K144N) を発現させた (Fig. 17C)。Immunoblotting を行い、sh-DDX5 の導入による DDX5 の発現抑制および野生型 DDX5 (WT)、DDX5 変異体 (K144N) の再構成を確認した (Fig. 17B, C)。次に、各細胞の増殖能を WST アッセイにより検討した。その結果、DDX5 のノックダウンにより、V617F/EpoR 細胞の増殖能は低下したが、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成により、sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞の増殖能は同程度に回復した (Fig. 18A, B)。また、トリパンプブルー染色法により各細胞の生存率を測定した結果、DDX5 のノックダウンにより、V617F/EpoR 細胞の生存率は有意に低下したが、この生存率の低下は、野生型 DDX5 (WT) あるいは DDX5 変異体 (K144N) の再構成により同程度に回復した (Fig. 16B)。以上の結果より、DDX5 は V617F/EpoR 細胞の生存や増殖に必須であるが、その RNA ヘリカーゼ活性は必要でないことが明らかになった。

2. V617F/EpoR 細胞における RNA ヘリカーゼ活性非依存的な DDX5 による抗アポトーシス作用

次に、V617F/EpoR 細胞におけるアポトーシス関連分子の発現に及ぼす DDX5 とその RNA ヘリカーゼ活性の影響を検討した。Immunoblotting を行った結果、V617F/EpoR 細胞では、DDX5 のノックダウンにより、抗アポトーシス因子である Survivin や Bcl-XL の発現が抑制され、Caspase-3 の断片化が誘導された (Fig. 19A)。また、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞で見られた Survivin や Bcl-XL の発現抑制を回復し、Caspase-3 の断片化を抑制した (Fig. 19B)。RT-PCR により、Survivin mRNA や Bcl-XL mRNA の発現を検討した結果、V617F/EpoR 細胞では、DDX5 のノックダウンにより、これらの発現が有意に抑制された。また、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞で見られた Survivin mRNA や Bcl-XL mRNA の発現抑制を回復した (Fig. 20A, B)。

次に、Annexin V-PE/7-AAD 染色により、DDX5 のノックダウンによる V617F/EpoR 細胞のアポトーシス誘導を検討したところ、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞に比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞では、初期アポトーシス細胞および後期アポトーシス細胞の割合が有意に増加した (Fig. 21A)。また、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞で見られた初期アポトーシス細胞および後期アポトーシス細胞の増加が抑制された (Fig. 21B)。以上の結果より、V617F/EpoR 細胞の抗アポトーシス作用に、DDX5 の発現は不可欠であるが、DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性は必要ないことが明らかになった。

3. V617F/EpoR 細胞における RNA ヘリカーゼ活性非依存的な DDX5 による mTOR シグナル経路の活性化

これまでに、DDX5 は JAK2V617F のシグナル伝達経路において、mTOR 経路の活性化に関

与することが明らかになった。そこで、V617F/EpoR 細胞における mTOR 経路の活性化に及ぼす DDX5 およびその RNA ヘリカーゼ活性の影響を検討した。sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞に比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞では、mTOR およびその基質である p70S6K、4E-BP1 のリン酸化が抑制された (Fig. 22A)。また、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞で見られた mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を回復した (Fig. 22B)。以上の結果より、DDX5 は、RNA ヘリカーゼ活性非依存的に mTOR 経路の活性化を誘導し、V617F/EpoR 細胞の増殖・生存に寄与することが明らかになった。

4. JAK2V617F による腫瘍形成における DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性非依存的な役割

JAK2V617F による腫瘍形成における DDX5 およびその RNA ヘリカーゼ活性の役割を検討するために、4 週齢雌のヌードマウスに、コントロール Ba/F3 細胞 (-)、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞、sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞および sh-DDX5 を発現した V617F/EpoR 細胞に野生型 DDX5 (WT) あるいは DDX5 変異体 (K144N) を再構成した細胞を皮下移植し、腫瘍形成を観察した。移植後 15 日目に、ヌードマウスを解剖し、腫瘍、脾臓、肝臓を摘出した。コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスでは、腫瘍形成が認められなかったのに対し、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、腫瘍形成が誘導された。また、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスに比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、腫瘍形成が有意に抑制された。また、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞で見られた腫瘍形成の抑制を回復した (Fig. 23A, B)。

また、コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスに比べて、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、脾臓と肝臓の肥大化が認められた。sh-SCR を発現

させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスに比べて、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、脾臓と肝臓の肥大化は抑制されたが、野生型 DDX5 (WT) と DDX5 変異体 (K144N) の再構成により、この脾臓と肝臓の肥大化の抑制は回復した (Fig. 24A, B, C, D)。

次に、各細胞を移植したマウスの脾臓と肝臓の組織切片を作製し、HE 染色を行った。コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスの脾臓では白髄と赤髄の境界が明瞭であったのに対し、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの脾臓では、白髄と赤髄の境界が不明瞭であった。それに対して、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの脾臓では、白髄と赤髄の境界区分が部分的に回復した。さらに、野生型 DDX5 (WT) あるいは DDX5 変異体 (K144N) を再構成した sh-DDX5 を発現する V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、白髄と赤髄の境界が乱れ、脾臓の組織構造が破壊されていた (Fig. 25)。また、コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスの肝臓と比較すると、sh-SCR を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの肝臓では、小葉内の肝細胞の配列が乱れていた。それに対して、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの肝臓では、肝細胞の配列が部分的に回復した。さらに、野生型 DDX5 (WT) あるいは DDX5 変異体 (K144N) を再構成した sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの肝臓では、肝細胞の配列が著しく乱れていた (Fig. 25)。以上の結果より、DDX5 は JAK2V617F の腫瘍形成に必須であるが、その機能には RNA ヘリカーゼ活性は必要ないことが明らかになった。

5. CPT、FL118 による Topo I 阻害効果

FL118 は、Topo I 阻害活性を有する Camptothecin (CPT) にメチレンジオキシ基を付加した誘導体である (Fig. 26 A)。これまでに、FL118 は DDX5 と結合し、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導することが報告された [82]。まず、スーパーコイル型 DNA である pHOT1 DNA

とリコンビナント Topo I を用いて、CPT と FL118 の *in vitro* Topo I 阻害活性を検討した。pHOT1 DNA にリコンビナント Topo I を混和すると、pHOT1 DNA は、スーパーコイル型からリラックス型に変化した。さらに、CPT (250, 500, 1000 nM) または FL118 (250, 500, 1000 nM) を添加すると、濃度依存的にスーパーコイル型 pHOT1 DNA の蓄積が認められたが、この蓄積の程度は CPT 処理と FL118 処理で同程度であった (Fig. 26B)。以上の結果より、*in vitro* において CPT と FL118 は同程度の Topo I 阻害活性を示すことが明らかになった。

6. V617F/EpoR 細胞における FL118 による DDX5 のプロテアソーム分解誘導

次に、V617F/EpoR 細胞を CPT または FL118 (12.5, 25, 50 nM) で処理し、DDX5 の発現を Immunoblotting により検討した。V617F/EpoR 細胞において、50 nM までの CPT 処理は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかったのに対して、12.5 nM 以上の FL118 処理は、DDX5 の発現を有意に低下させた (Fig. 27A)。また、V617F/EpoR 細胞における FL118 処理による DDX5 の発現抑制は、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により阻害された (Fig. 27B)。したがって、V617F/EpoR 細胞において、FL118 は DDX5 のプロテアソーム分解を特異的に誘導することが確認された。

7. FL118 による V617F/EpoR 細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導

V617F/EpoR 細胞を CPT または FL118 (12.5, 25, 50 nM) で処理し、V617F/EpoR 細胞の増殖・生存に及ぼす影響を WST assay およびトリパンブルー染色法により検討した。FL118 は、CPT と比較してより低濃度で、V617F/EpoR 細胞の増殖能を抑制した (Fig. 27C)。また、FL118 は、CPT と比較して低濃度で、V617F/EpoR 細胞の細胞死を誘導した (Fig. 27D)。

次に、V617F/EpoR 細胞のアポトーシス関連分子の発現に及ぼす CPT および FL118 の影響を検討した。Immunoblotting を行った結果、50 nM までの CPT 処理は、Survivin および Bcl-XL の発現に影響を及ぼさず、Caspase-3 の断片化をわずかに誘導した。それに対して、12.5

nM 以上の FL118 処理は、Survivin および Bcl-XL の発現を低下させ、顕著な Caspase-3 の断片化を誘導した (Fig. 28A)。RT-PCR により、Survivin mRNA および Bcl-XL mRNA の発現を検討した。V617F/EpoR 細胞において、50 nM までの CPT 処理はこれらの発現に影響を及ぼさなかったが、12.5 nM 以上の FL118 処理は、Survivin mRNA および Bcl-XL mRNA の発現を有意に低下させた (Fig. 28B)。

さらに、Annexin V-FITC/PI 染色を行い、CPT、FL118 による V617F/EpoR 細胞のアポトーシス誘導を検討した。その結果、CPT 処理では、初期アポトーシス細胞の割合の増加が観察されたが、後期アポトーシス細胞の割合は変化しなかった。それと比較して、FL118 処理は、V617F/EpoR 細胞の初期アポトーシス細胞、後期アポトーシス細胞の割合を顕著に増加させた (Fig. 29)。以上の結果より、FL118 は、CPT と比較して低濃度で、V617F/EpoR 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

8. V617F/EpoR 細胞における FL118 による mTOR 経路の活性化抑制

V617F/EpoR 細胞における mTOR 経路の活性化に及ぼす CPT および FL118 の影響を Immunoblotting により検討した。50 nM までの CPT 処理は、mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。それに対して、12.5 nM 以上の FL118 処理は、mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を有意に抑制した (Fig. 30)。以上の結果より、V617F/EpoR 細胞において、FL118 は DDX5 のプロテアソーム分解を誘導することにより、mTOR 経路の活性化を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

9. HEL 細胞における FL118 による DDX5 のプロテアソーム分解

次に、HEL 細胞に対する FL118 の抗腫瘍活性を検討した。まず、HEL 細胞を CPT または FL118 (2.5, 5, 10 nM) で処理し、DDX5 の発現変化を Immunoblotting により検討した。10 nM までの CPT 処理は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかったのに対して、2.5 nM 以上の FL118

処理は、DDX5 の発現を有意に抑制した (Fig. 31A)。また、HEL 細胞における FL118 処理による DDX5 の発現抑制は、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により阻害された (Fig. 31B)。したがって、FL118 は、HEL 細胞においても DDX5 のプロテアソーム分解を特異的に誘導することが確認された。

10. FL118 による HEL 細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導

HEL 細胞を CPT または FL118 (2.5, 5, 10 nM) で処理し、WST assay およびトリパンブルー染色法により、増殖能や生存率に及ぼす CPT、FL118 の影響を検討した。FL118 は、CPT と比較してより低濃度で、HEL 細胞の増殖能を抑制し、生存率を低下させた (Fig. 31C, D)。さらに、HEL 細胞のアポトーシス関連分子の発現に及ぼす CPT および FL118 の影響を Immunoblotting により検討した。10 nM までの CPT 処理は、Survivin および Bcl-XL の発現に影響を及ぼさず、Caspase-3 の断片化もわずかに誘導しただけであった。それに対して、2.5 nM 以上の FL118 処理は、Survivin および Bcl-XL の発現を有意に抑制し、顕著な Caspase-3 の断片化を誘導した (Fig. 32A)。RT-PCR により、Survivin mRNA および Bcl-XL mRNA の発現に及ぼす CPT や FL118 の影響を検討した。その結果、10 nM までの CPT 処理はこれらの発現に影響を及ぼさなかったのに対し、2.5 nM 以上の FL118 処理は、Survivin mRNA および Bcl-XL mRNA の発現を有意に抑制した (Fig. 32B)。

次に、Annexin V-FITC/PI 染色を行い、CPT、FL118 による HEL 細胞のアポトーシス誘導を検討した。10 nM までの CPT で処理しても、HEL 細胞のアポトーシス誘導は観察されなかったが、FL118 処理により、初期アポトーシス細胞および後期アポトーシス細胞の割合が有意に増加した (Fig. 33)。以上の結果より、FL118 は、CPT と比較して、低濃度で HEL 細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

11. HEL 細胞における FL118 による mTOR 経路の活性化抑制

HEL 細胞を CPT または FL118 で処理し、mTOR 経路の活性化に及ぼす CPT、FL118 の影響を Immunoblotting により検討した。10 nM までの CPT 処理は、HEL 細胞における mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化に影響を及ぼさなかったのに対し、2.5 nM 以上の FL118 処理は、mTOR、p70S6K、4E-BP1 のリン酸化を抑制した (Fig. 34)。以上の結果より、FL118 は、HEL 細胞においても、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導し、mTOR 経路の活性化を抑制することにより、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

12. JAK2V617F による腫瘍形成に及ぼす FL118 投与による抑制効果

最後に、*in vivo* における JAK2V617F による腫瘍形成に及ぼす FL118 の抗腫瘍効果を検討した。4 週齢雌のヌードマウスに、コントロール Ba/F3 細胞 (-) あるいは V617F/EpoR 細胞を皮下移植した (n=6 or n=12)。移植後 5 日目、7 日目、9 日目に、V617F/EpoR 細胞を移植したマウスに、Vehicle または FL118 (2.5 mg/kg) を経口投与した。移植後 11 日間、各マウスの体重を測定したが、各マウス群において体重変化に有意な差は認められなかった (Fig. 35A)。また、移植後 11 日目に、マウスを解剖し、腫瘍、脾臓、肝臓を摘出した。コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスでは腫瘍形成が認められなかった。V617F/EpoR 細胞を移植したマウスでは、Vehicle 投与群では顕著な腫瘍形成が認められたのに対して、FL118 投与群では、腫瘍形成が有意に抑制された (Fig. 35B, C)。また、コントロール Ba/F3 細胞 (-) を移植したマウスに比べて、V617F/EpoR 細胞を移植したマウスの Vehicle 投与群では、脾臓と肝臓の肥大化が認められた。さらに、この Vehicle 投与群に比べて、FL118 投与群では、脾臓と肝臓の肥大化が抑制された (Fig. 36A, B, C, D)。各マウスの脾臓と肝臓の組織切片を作製し、HE 染色を行った。V617F/EpoR 細胞の移植により、脾臓の赤髄と白髄の境界が不明瞭になり、肝細胞組織の構造変化が誘発されたが、これらの組織構造変化は FL118 投与により回復した (Fig. 37)。したがって、FL118 の経口投与は、JAK2V617F によ

る腫瘍形成を抑制することが明らかになった。

本研究を通して得られた結果より、MPNにおいて、DDX5はJAK2V617FによるmTOR経路の活性化や細胞増殖および腫瘍形成に必須であるが、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。また、FL118は、DDX5のプロテアソーム分解を誘導することにより、JAK2V617FによるmTOR経路の活性を阻害し、MPNに対して高い抗腫瘍活性を示した (Fig. 38)。

3 部 CML における DDX5 の機能解析および DDX5 を標的とした治療戦略の

有効性の検討

1. K562 細胞における Imatinib による DDX5 の発現抑制

CML における DDX5 の発現を調べるために、CML 患者由来 K562 細胞を Imatinib (1, 2 μ M) で処理した。Immunoblotting を行った結果、Imatinib 処理により、BCR-ABL およびその基質である STAT5 のリン酸化が抑制された (Fig. 39A)。Survivin は、アポトーシス実行因子 Caspase-3 の断片化を抑制する抗アポトーシス因子であり、STAT5 の活性化により、発現が誘導される [88]。Imatinib 処理により、Survivin の発現が抑制され、Caspase-3 の断片化が誘導された (Fig. 39A)。WST assay により細胞増殖能を検討した結果、Imatinib 処理により K562 細胞の増殖能は有意に抑制された (Fig. 39B)。トリパンプルー染色法を用いて細胞生存率を測定したところ、Imatinib 処理により濃度依存的に K562 細胞の生存率は減少した (Fig. 39C)。さらに、RT-PCR を行った結果、Imatinib 処理により、DDX5 mRNA および Survivin mRNA の発現が有意に抑制された (Fig. 40A)。また、Immunoblotting を行った結果、Imatinib 処理により、K562 細胞における DDX5 タンパク質の発現が有意に抑制された (Fig. 40B)。以上の結果より、K562 細胞では、BCR-ABL の活性に依存して、DDX5 mRNA および DDX5 タンパク質の発現が誘導されることが明らかになった。

2. DDX5 ノックアウトによる K562 細胞の生存・増殖の抑制

K562 細胞における DDX5 の機能を解析するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて DDX5 をノックアウトした (Fig. 41A)。DDX5 のノックアウトは、K562 細胞における Survivin の発現を抑制し、Caspase-3 の断片化を誘導した (Fig. 41A)。また、DDX5 のノックアウトは、Survivin mRNA の発現も抑制した (Fig. 41B)。さらに、WST assay およびトリパンプルー染色法を行った結果、DDX5 のノックアウトは、K562 細胞の増殖を有意に抑制し、細胞生存

率を減少させた (Fig. 41C, D)。以上の結果より、DDX5 のノックアウトにより K562 細胞のアポトーシスが誘導されたことから、BCR-ABL の下流で発現が誘導される DDX5 は、CML 細胞の増殖や生存に必要であることが示唆された。

3. K562 細胞における FL118 による DDX5 のプロテアソーム分解

次に、DDX5 阻害剤である FL118 の K562 細胞に対する抗腫瘍活性を検討し、DDX5 を標的とした CML 治療法の有効性を検証することを目指した。まず、K562 細胞を CPT または FL118 で処理し、DDX5 の発現を Immunoblotting により検討した。K562 細胞において、500 nM までの CPT は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかったが、125 nM 以上の FL118 処理は、DDX5 の発現を有意に抑制した (Fig. 42A)。また、K562 細胞における FL118 処理による DDX5 の発現抑制は、MG132 処理により阻害された (Fig. 42B)。したがって、FL118 は、K562 細胞において DDX5 のプロテアソーム分解を特異的に誘導することが確認された。

4. FL118 による K562 細胞のアポトーシス誘導

K562 細胞を CPT または FL118 で処理し、Immunoblotting により Survivin の発現や Caspase-3 の断片化を検討した。FL118 は、CPT と比較して低濃度で、Survivin および Survivin mRNA の発現を抑制し、Caspase-3 の断片化を誘導した (Fig. 43A, B)。また、WST assay、トリパンブルー染色法を行った結果、FL118 は、CPT と比較して低濃度で、K562 細胞の増殖能を抑制し、細胞生存率を低下させた (Fig. 44 A, B)。以上の結果より、CPT 処理に比べて、FL118 処理が低濃度で K562 細胞のアポトーシスを誘導したことから、FL118 による DDX5 の発現抑制が CML 治療に有効であることが示唆された。

5. BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞における Imatinib による DDX5 の発現抑制阻害

T315I 変異を有する BCR-ABL (Fig. 45A) は、第一世代、第二世代の BCR-ABL 阻害剤に

耐性を示し、薬剤耐性の克服が CML 治療の課題である [55-58]。したがって、薬剤耐性を獲得した CML における DDX5 を標的とした治療戦略の有効性を検討することを目指した。まず、レトロウイルス感染により、Ba/F3 細胞に、BCR-ABL および BCR-ABL T315I を発現させた細胞を作製した。Immunoblotting により、BCR-ABL だけでなく BCR-ABL T315I の発現により、DDX5 の発現が誘導されることを確認した (Fig. 45B)。次に、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞、BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞を 2 μ M の Imatinib で処理した。Immunoblotting を行った結果、Imatinib 処理により、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞では、BCR-ABL および STAT5 のリン酸化が抑制された。また、Imatinib 処理により、Survivin および Survivin mRNA の発現が有意に抑制され、Caspase-3 の断片化が誘導された。さらに、Imatinib 処理により DDX5 の発現が有意に抑制された (Fig. 46A)。一方、BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞では、Imatinib 処理後も、BCR-ABL T315I および STAT5 のリン酸化は変化しなかった。また、Imatinib 処理は、Survivin や DDX5 の発現に影響を及ぼさず、Caspase-3 の断片化も誘導しなかった (Fig. 46A)。WST assay により細胞増殖能を検討した結果、Imatinib 処理は、濃度依存的に BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞の増殖能を抑制し、IC₅₀ は 0.62 μ M であった。それに対して、Imatinib 処理は、BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の増殖能には影響を及ぼさなかった (Fig. 46B)。さらに、トリパンブルー染色法を行った結果、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞の生存率は Imatinib 処理により有意に低下したが、BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の生存率は Imatinib 処理により変化しなかった (Fig. 46C)。以上の結果より、Imatinib に耐性を示す BCR-ABL T315I を発現した CML においても、DDX5 は高発現していることが明らかになった。

6. DDX5 ノックアウトによる BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の生存・増殖の抑制

次に、CRISPR-Cas9 システムを用いて、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞において DDX5 をノックアウトした。Immunoblotting, RT-PCR を行った結果、DDX5 のノックアウトにより、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および BCR-ABL T315I 発現

Ba/F3 細胞における Survivin および Survivin mRNA の発現が減少した (Fig.47A,B)。さらに、WST assay、トリパンブルー染色法を行った結果、DDX5 のノックアウトにより、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の増殖能が有意に減少し、生存率が低下した (Fig. 47C, D)。以上の結果より、DDX5 は、薬剤耐性を示す CML においても有効な治療標的となりうることが明らかになった。

7. FL118 による BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞のアポトーシス誘導

最後に、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞に対する CPT および FL118 の抗腫瘍活性を検討した。これらの細胞において、100 nM までの CPT は、DDX5 の発現に影響を及ぼさなかったが、50 nM、100 nM の FL118 は、DDX5 の発現を有意に抑制した (Fig. 48A)。また、100 nM の CPT は Survivin の発現には影響しなかったが、Survivin mRNA の発現をわずかに抑制した (Fig.48A, B)。一方で、50 nM、100 nM の FL118 は、Survivin や Survivin mRNA の発現を顕著に抑制した。さらに、50 nM、100 nM の CPT は、Caspase-3 の断片化をわずかに誘導しただけであったが、同濃度の FL118 は、顕著な Caspase-3 の断片化を誘導した (Fig.48A)。

WST assay を行った結果、CPT に比べて、FL118 は低濃度で、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の増殖を抑制した。BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞の増殖に及ぼす CPT の IC_{50} は 122.0 nM であり、FL118 の IC_{50} は 5.97 nM であった。また、BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の増殖に及ぼす CPT の IC_{50} は 98.3 nM であり、FL118 の IC_{50} は 6.23 nM であった (Fig. 49A)。また、トリパンブルー染色法を行った結果、FL118 は、同濃度の CPT と比較して、BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞および BCR-ABL T315I 発現 Ba/F3 細胞の生存率をより強く低下させた (Fig. 49B)。したがって、FL118 は、薬剤耐性を示す CML においても、DDX5 の発現を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかになった。

本研究を通して得られた結果より、BCR-ABL および BCR-ABL T315I 変異体は、DDX5 の

発現誘導を介して、CML 細胞の増殖や生存を誘導することが明らかになった。また、FL118 は CPT と同程度の Topo I 阻害活性を示すだけでなく、DDX5 のプロテアソーム分解を特異的に誘導することにより、BCR-ABL 陽性 CML だけでなく、薬剤耐性を示す CML 細胞においても顕著なアポトーシスを誘導することが明らかになった (Fig. 50)。

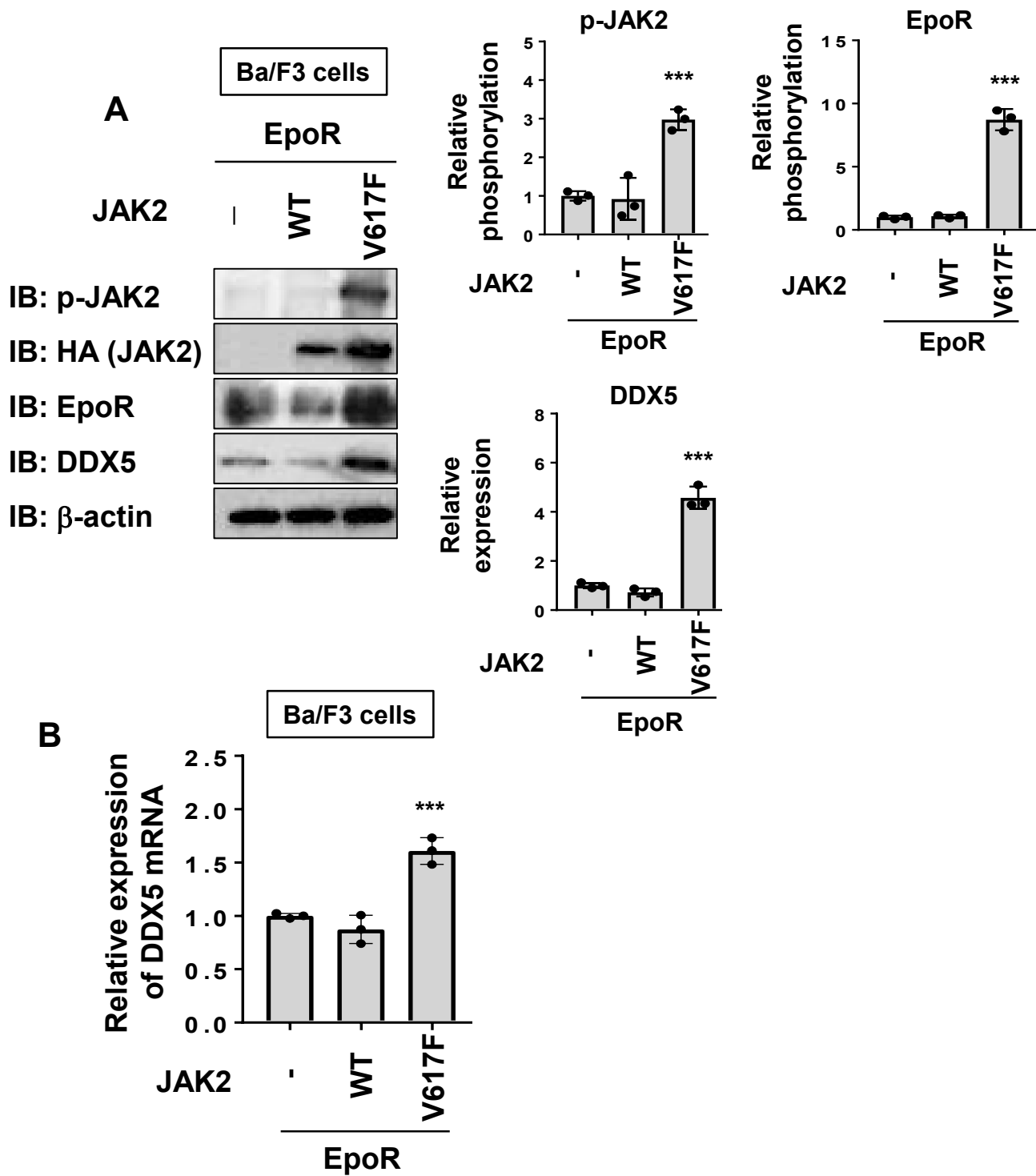


Fig. 1 JAK2V617FによるDDX5の発現誘導

(A, B) レトロウイルス感染により、Ba/F3細胞に、空ベクター (-)、野生型JAK2 (WT)、JAK2V617FおよびEpoRを発現させた。(A) Immunoblottingにより、JAK2のリン酸化および、JAK2、EpoR、DDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。(B) DDX5 mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。DDX5 mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、**p<0.01)。

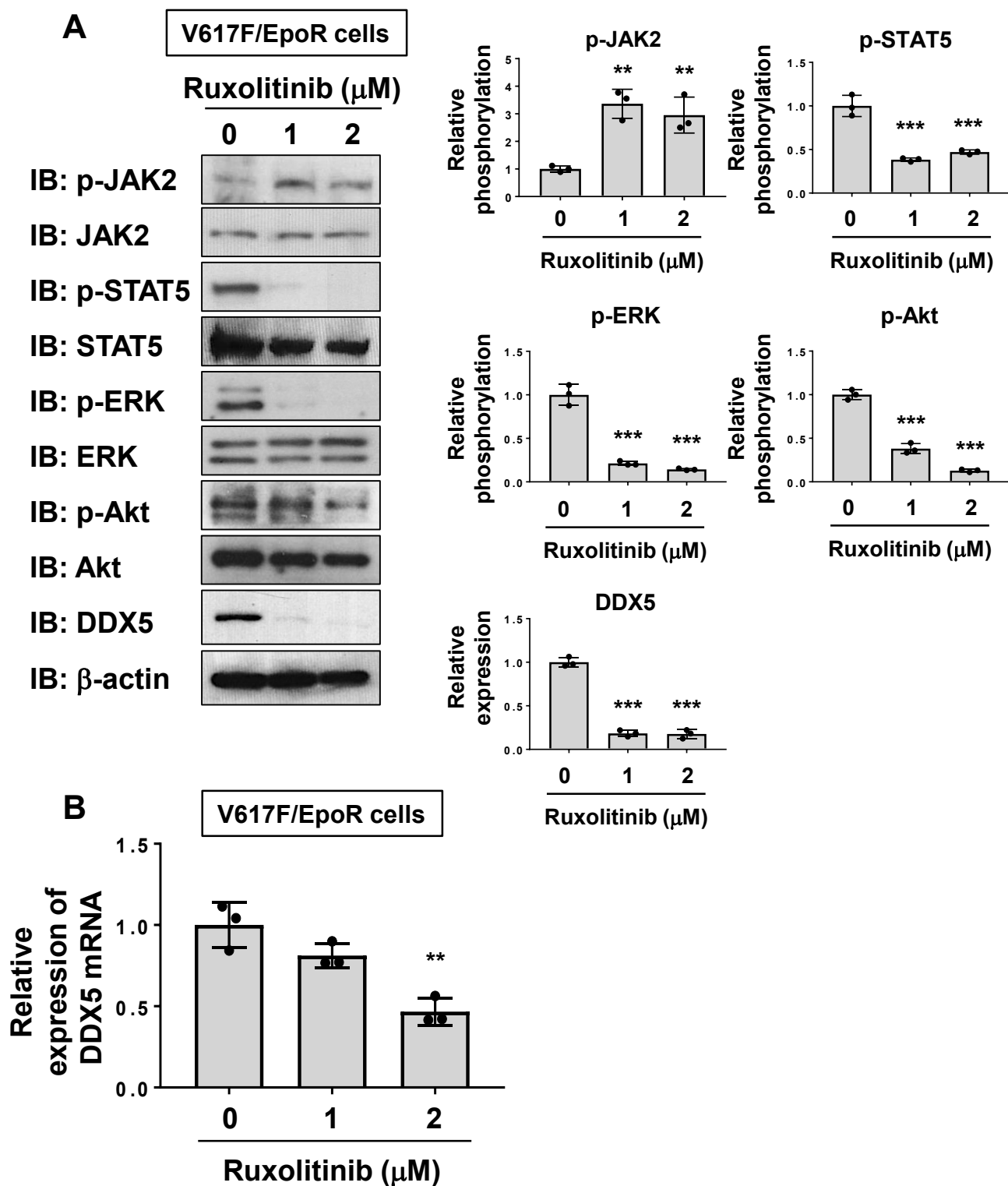


Fig. 2 V617F/EpoR細胞におけるDDX5の発現に及ぼすJAK2阻害剤Ruxolitinibの影響
JAK2V617FおよびEpoRを発現させたBa/F3細胞 (V617F/EpoR細胞) をRuxolitinib (1, 2 μM) で24時間処理した。(A) Immunoblottingにより、JAK2、STAT5、ERK、Aktのリン酸化およびDDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した ($n=3$ 、** $p<0.01$, *** $p<0.001$)。(B) DDX5 mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。DDX5 mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した ($n=3$ 、** $p<0.01$)。

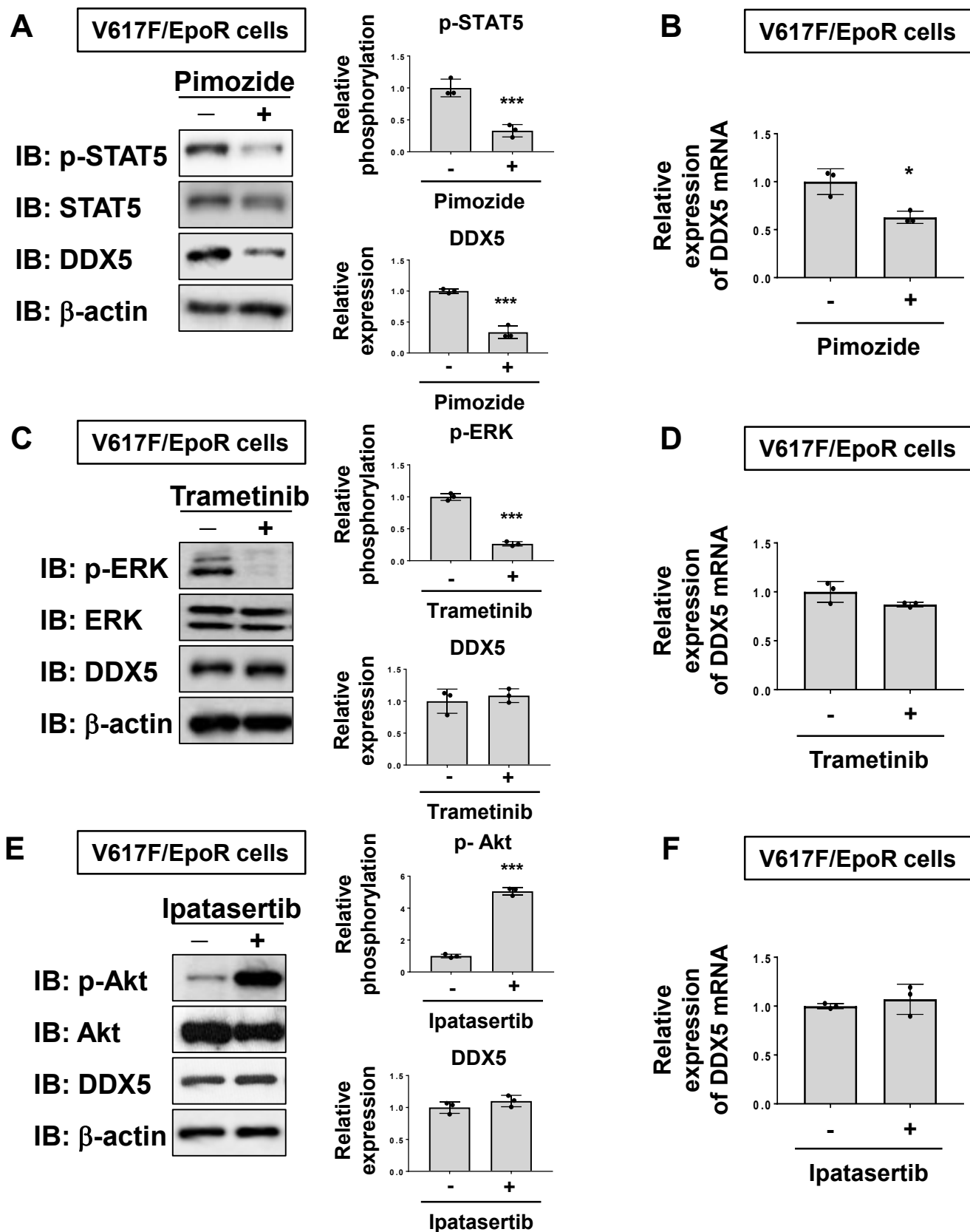
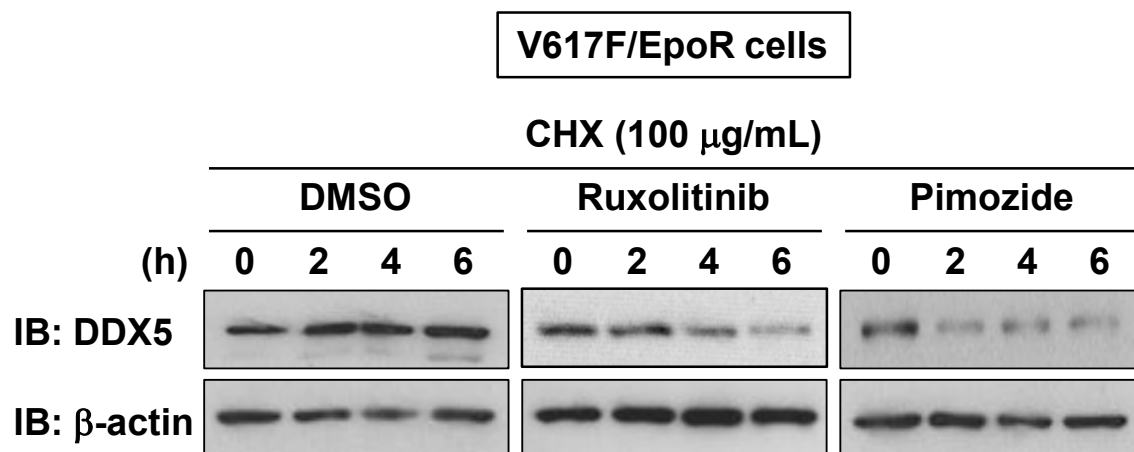


Fig. 3 V617F/EpoR細胞におけるDDX5の発現に及ぼすSTAT5阻害剤Pimoizide、MEK阻害剤Trameinib、Akt阻害剤Ipatasertibの影響

V617F/EpoR細胞を (A, B) Pimoizide (10 μ M)、(C, D) Trametinib (1 μ M)、(E, F) Ipatasertib (2.5 μ M) で24時間処理した。(A, C, E) Immunoblottingにより、STAT5、ERK、Aktのリン酸化およびDDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。(B, D, F) DDX5 mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。DDX5 mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、*p<0.05)。

A



B

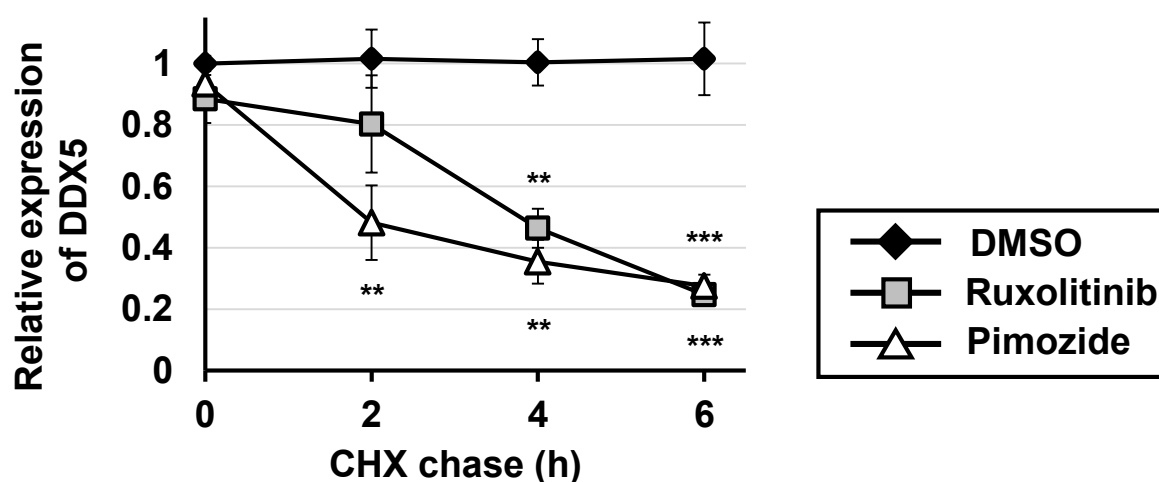
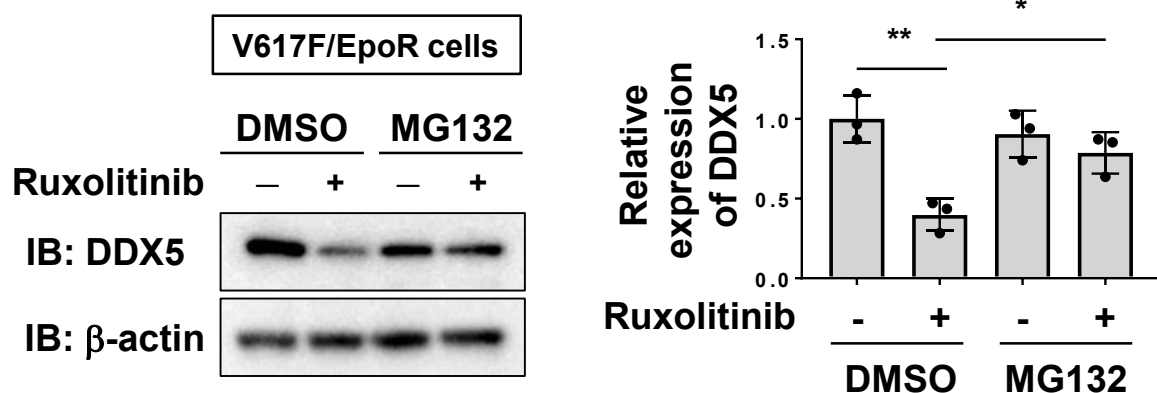


Fig. 4 V617F/EpoR細胞におけるDDX5タンパク質の安定性に及ぼすRuxolitinibおよびPimozideの影響

V617F/EpoR細胞を、DMSO (0.1%)、Ruxolitinib (2 μ M)、Pimozide (10 μ M) で12時間処理後、CHX (100 μ g/mL) を添加し、2時間毎に細胞を回収した。(A) Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。(B) 各バンドをImage Jにより、定量化し、グラフ化した (n=3、**p<0.01, ***p<0.01)。

A



B

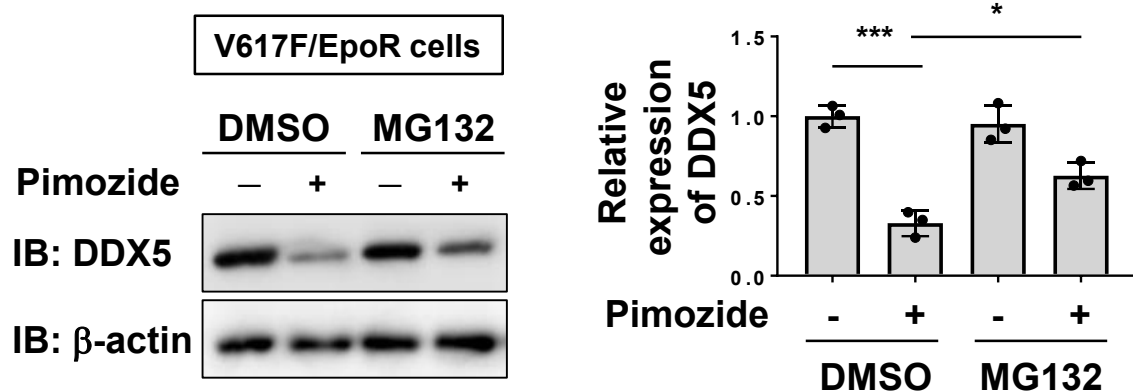


Fig. 5 V617F/EpoR細胞におけるRuxolitinib、PimozideによるDDX5の発現低下に及ぼすプロテアソーム阻害剤MG132の影響

V617F/EpoR細胞を、(A) Ruxolitinib (2 μ M)、(B) Pimozide (10 μ M) で12時間処理後、DMSO (0.1%) またはMG132 (10 μ M) を添加し、5時間培養した。Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量した (n=3、* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001)。

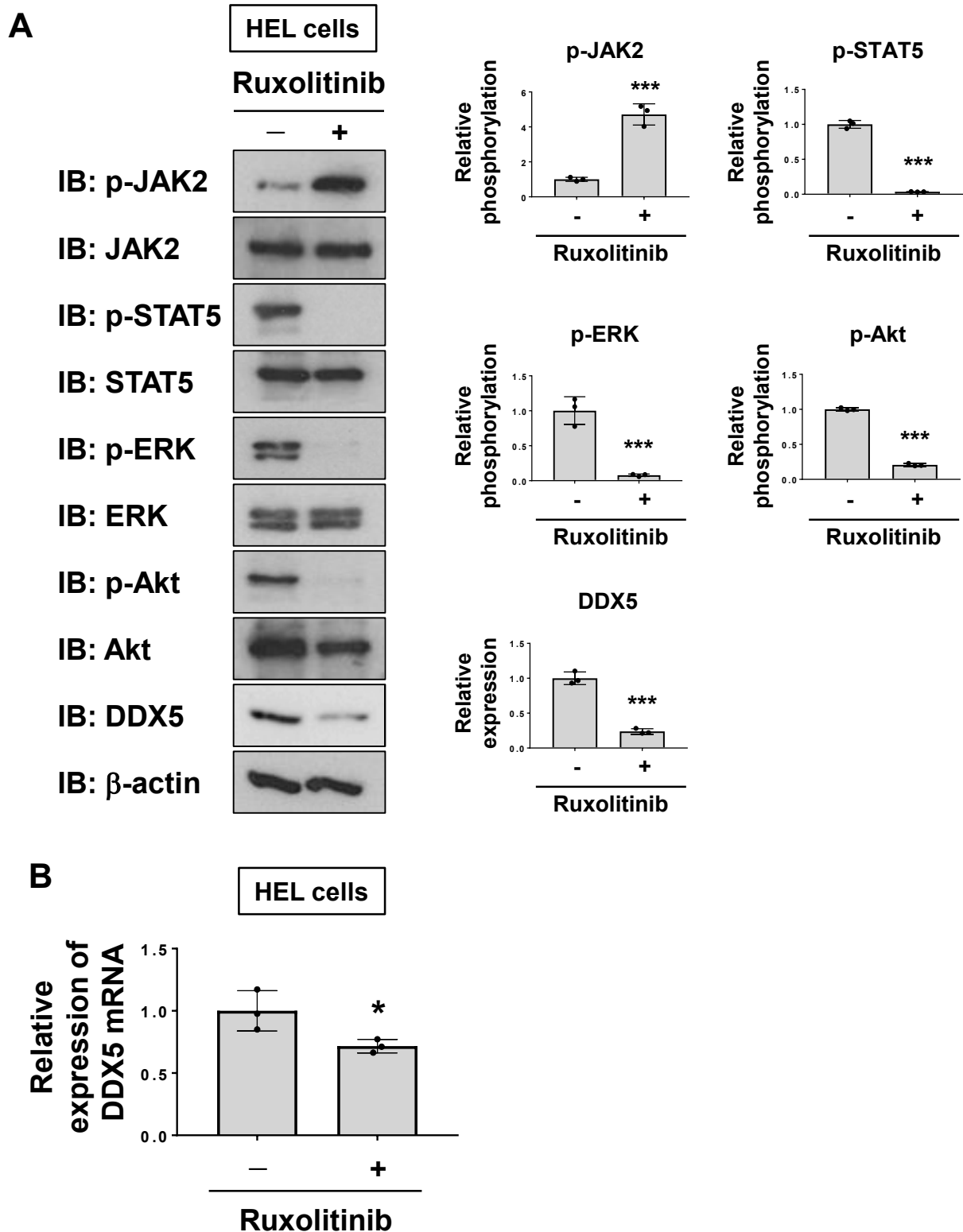


Fig. 6 HEL細胞におけるDDX5の発現に及ぼすRuxolitinibの影響

HEL細胞をRuxolitinib (2 μ M) で24時間処理した。(A) Immunoblottingにより、JAK2、STAT5、ERK、Aktのリン酸化およびDDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。(B) DDX5 mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。DDX5 mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、*p<0.05)

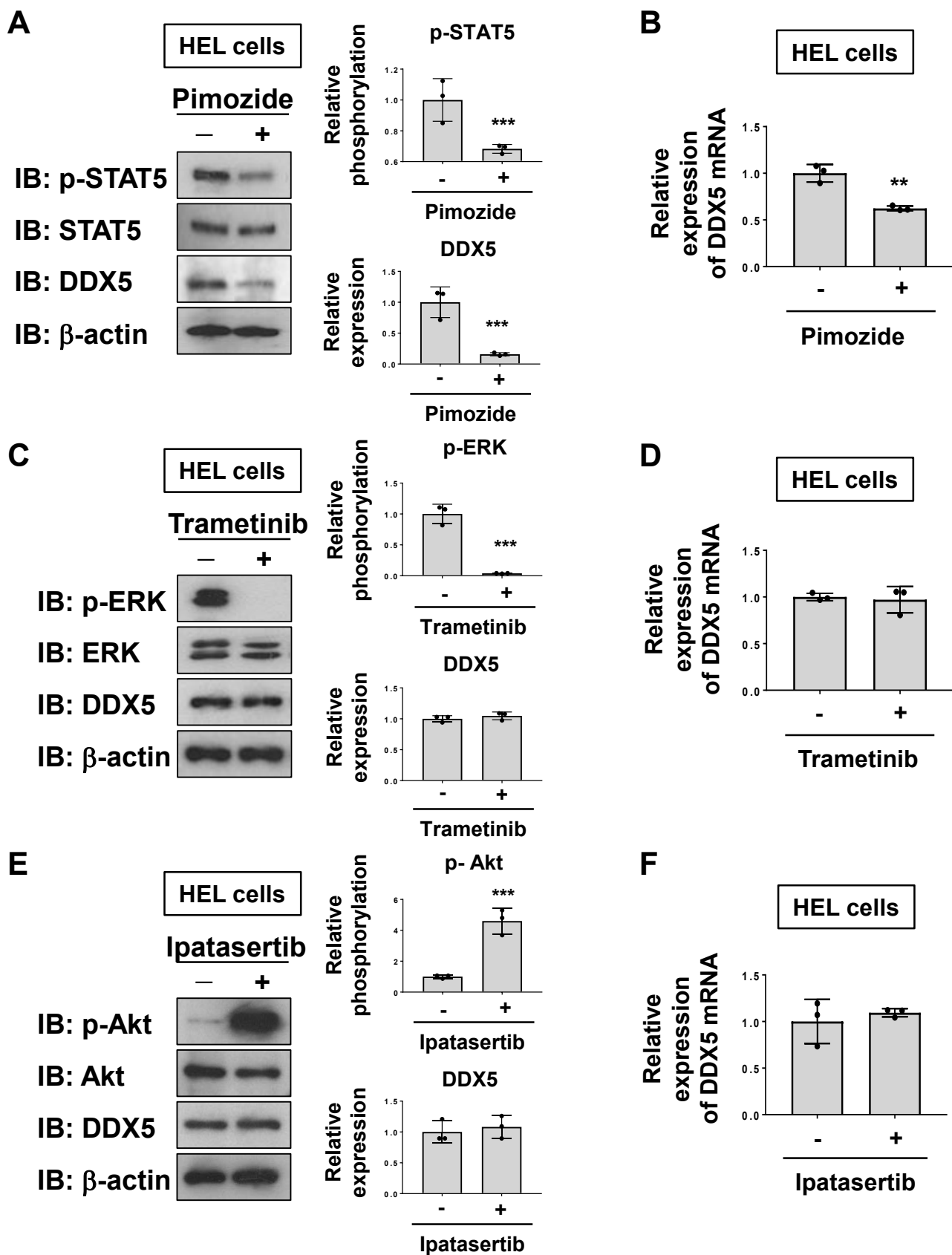


Fig. 7 HEL細胞におけるDDX5の発現に及ぼすPimozide、Trametinib、Ipatasertibの影響
HEL細胞を (A, B) Pimozide (20 μ M)、(C, D) Trametinib (1 μ M)、(E, F) Ipatasertib (5 μ M) で24時間処理した。(A, C, E) Immunoblottingにより、STAT5、ERK、Aktのリン酸化およびDDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.01)。(B, D, F) DDX5 mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。DDX5 mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、**p<0.01)。

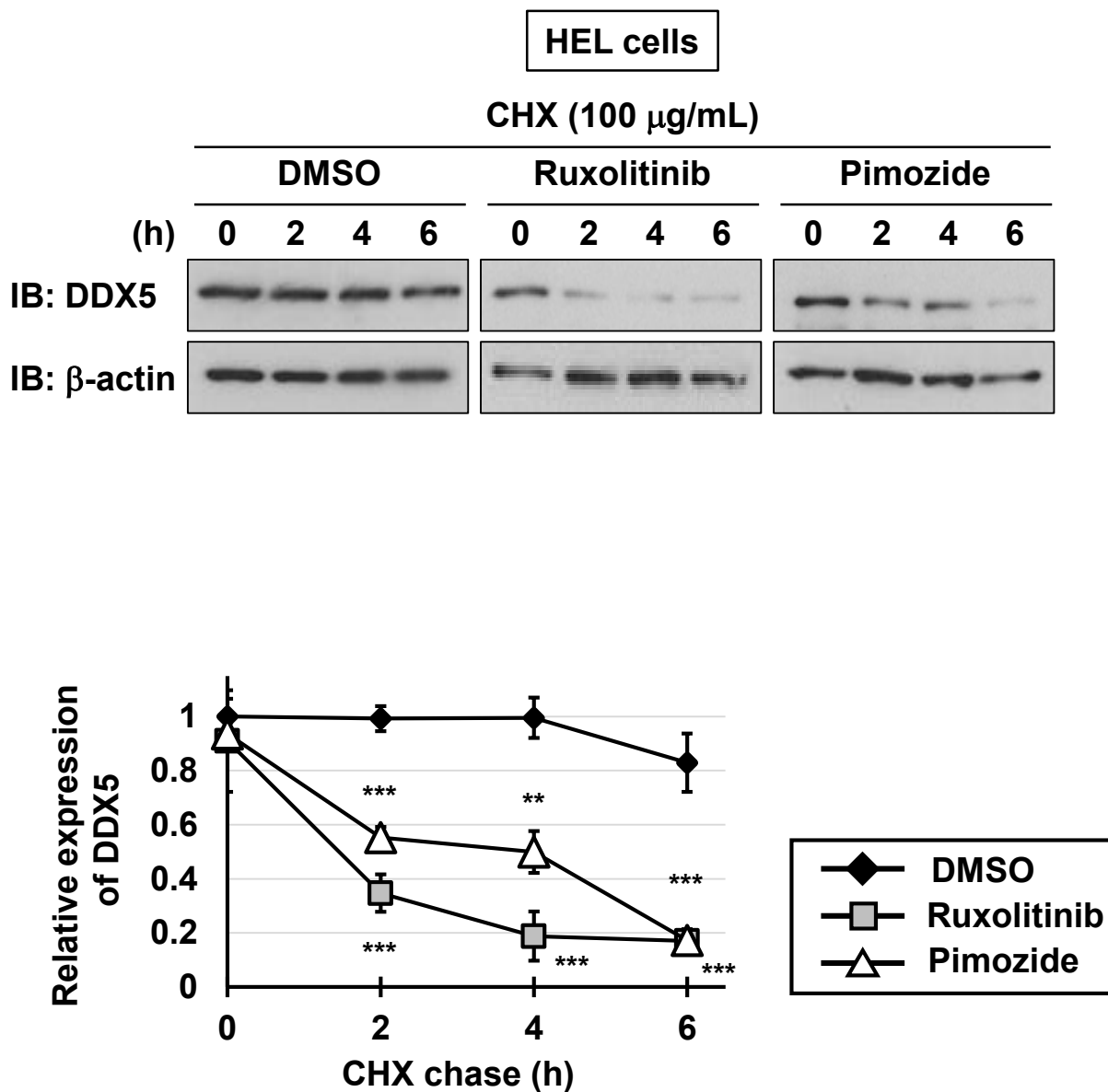
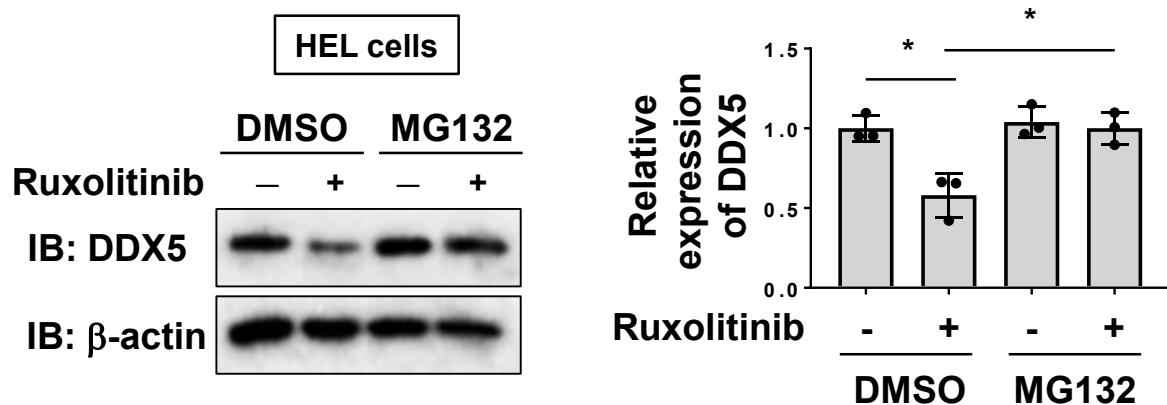


Fig. 8 HEL細胞におけるDDX5タンパク質の安定性に及ぼすRuxolitinib、Pimozideの影響

HEL細胞をDMSO (0.1%)、Ruxolitinib (2 μM)、Pimozide (20 μM) で12時間処理後、CHX (100 $\mu\text{g/mL}$) を添加し、2時間毎に細胞を回収した。(A) Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。(B) 各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、**p<0.01)。

A



B

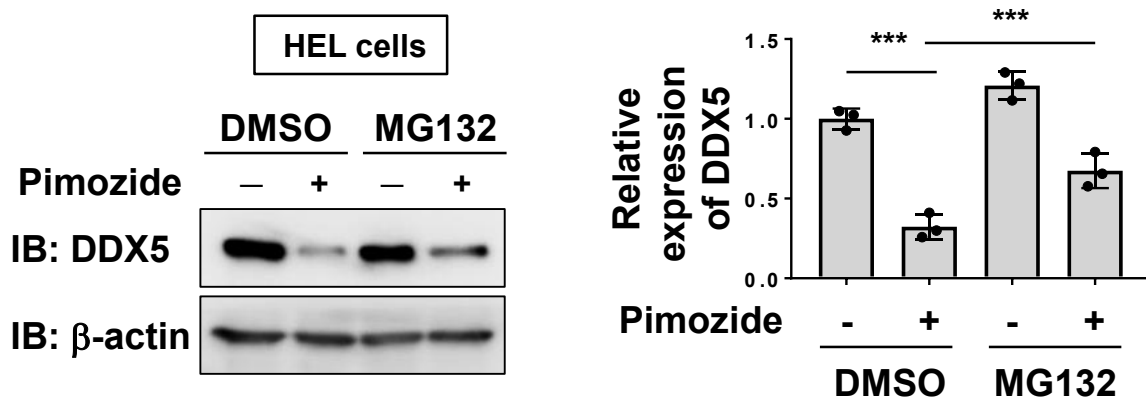


Fig. 9 HEL細胞におけるRuxolitinib、PimozideによるDDX5の発現低下に及ぼすMG132の影響

HEL細胞を (A) Ruxolitinib (2 μ M)、(B) Pimozide (20 μ M) で12時間処理後、DMSO (0.1%) またはMG132 (10 μ M)を添加し、5時間培養した。(A,B) Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, ***p<0.001)。

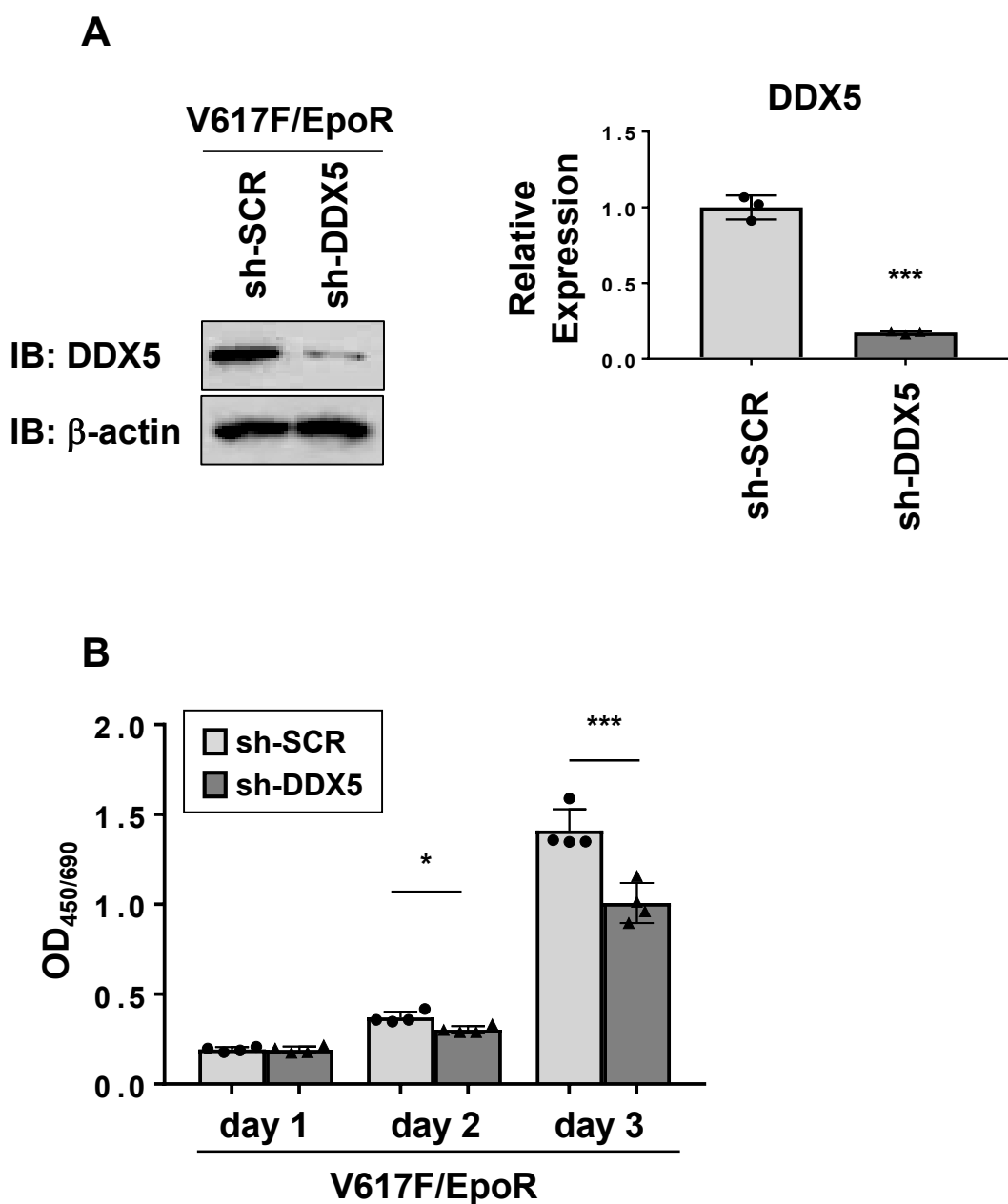


Fig. 10 V617F/EpoR細胞の増殖に及ぼすDDX5のノックダウンの影響

V617F/EpoR細胞に、sh-scramble (sh-SCR) およびDDX5に対するsh-RNA (sh-DDX5) をレトロウイルス感染により発現させた。(A) Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。(B) WST assayにより細胞増殖能を検討した (n=4、*p<0.05, ***p<0.001)

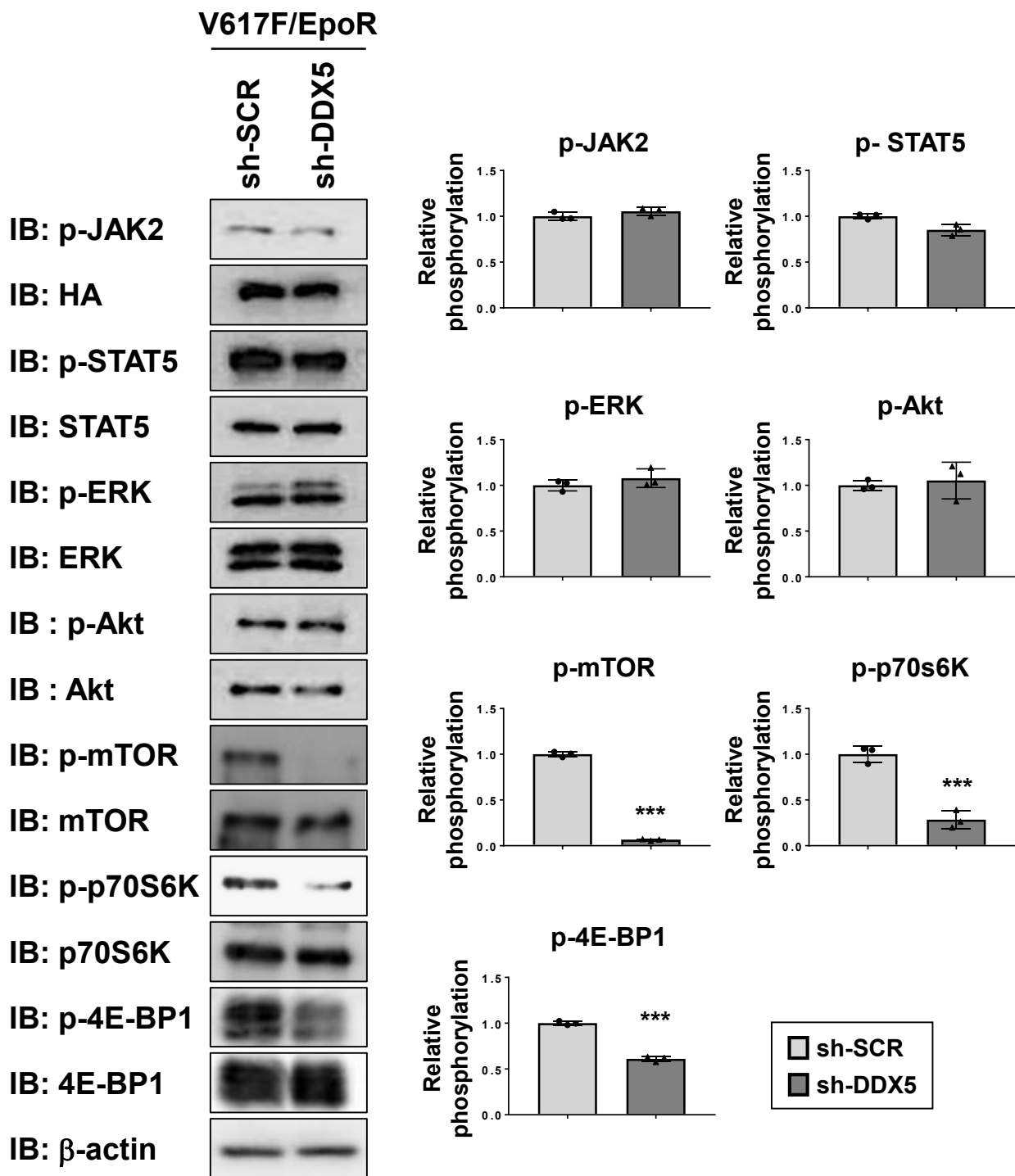


Fig. 11 JAK2V617Fの下流シグナル経路の活性化に及ぼすDDX5のノックダウンの影響
V617F/EpoR細胞に、sh-scramble (sh-SCR) およびDDX5に対するsh-RNA (sh-DDX5) をレトロウイルス感染により発現させた。Immunoblottingにより、JAK2、STAT5、ERK、Akt、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。

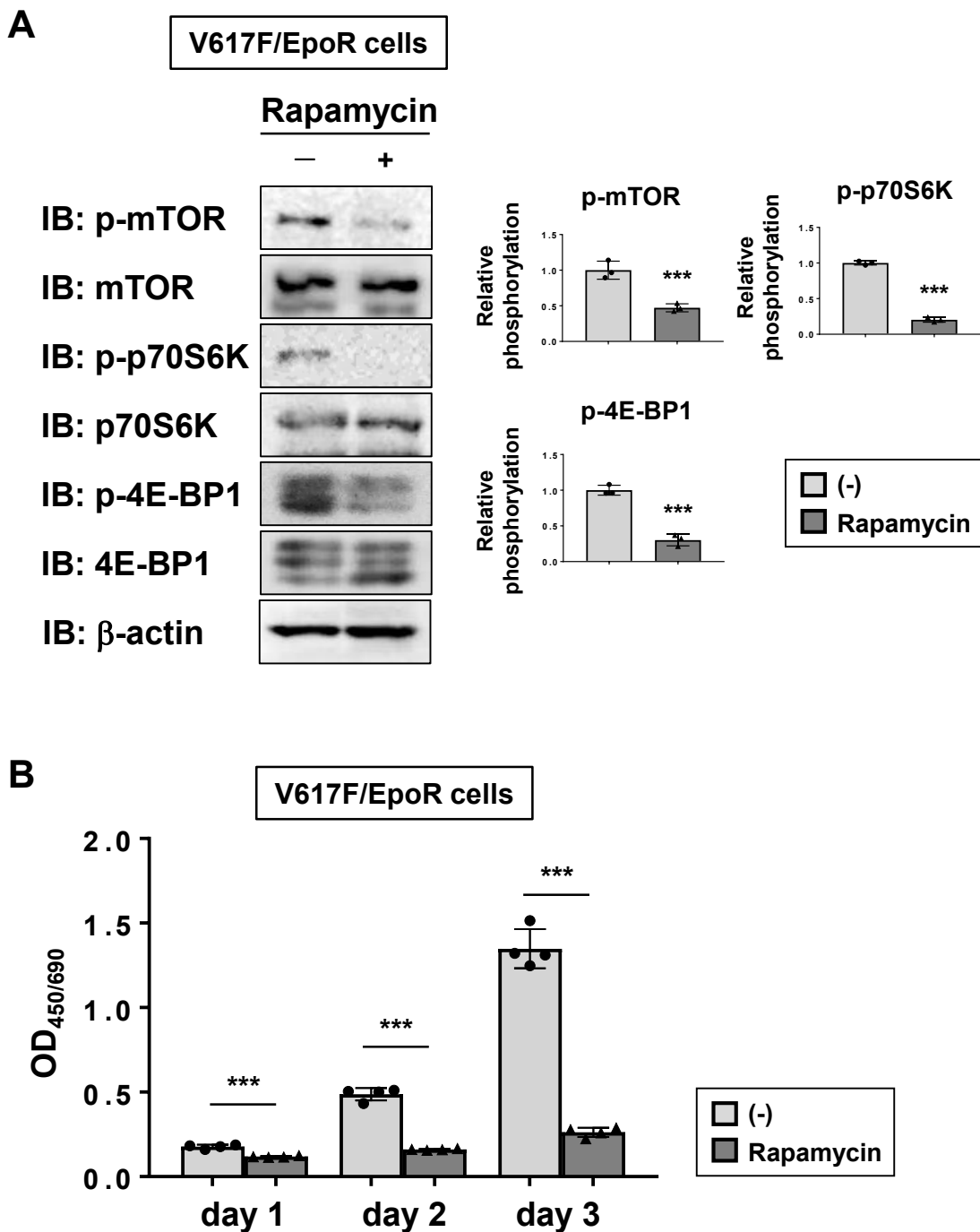


Fig. 12 V617F/EpoR細胞の増殖に及ぼすmTOR阻害剤Rapamycinの影響
 (A) V617F/EpoR細胞をRapamycin (5 μ M) で24時間処理した。Immunoblottingにより、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。 (B) V617F/EpoR細胞をRapamycin (5 μ M) で24時間、48時間、72時間処理した。WST assayにより細胞増殖能を検討した (n=4、***p<0.001)。

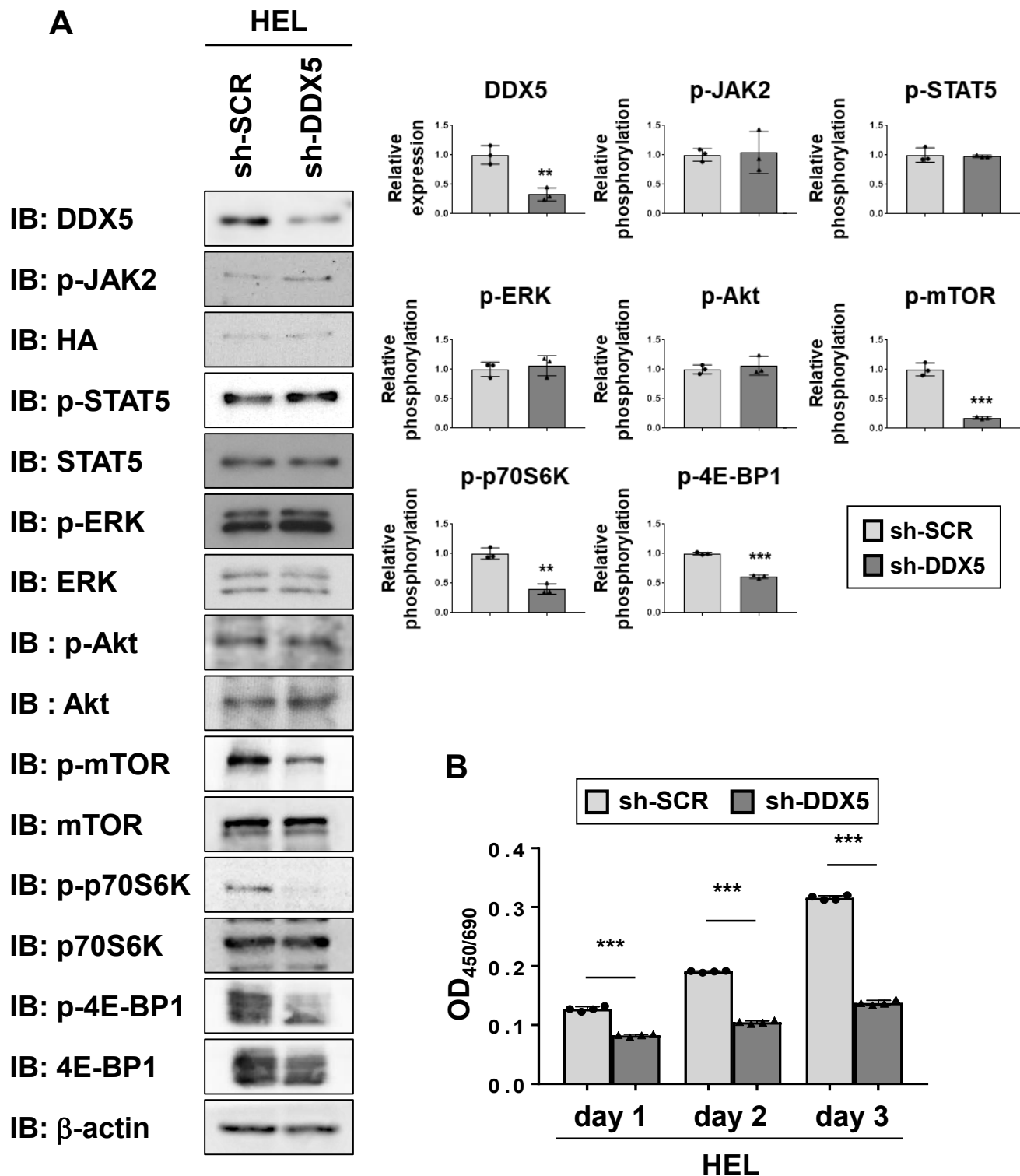


Fig. 13 HEL細胞の増殖に及ぼすDDX5のノックダウンの影響

HEL細胞に、sh-scramble (sh-SCR) およびDDX5に対するsh-RNA (sh-DDX5) をレトロウイルス感染により発現させた。(A) Immunoblottingにより、DDX5の発現およびJAK2、STAT5、ERK、Akt、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3, ***p<0.001)。(B) WST assayにより細胞増殖能を検討した (n=4, *p<0.05, **p<0.05, ***p<0.001)

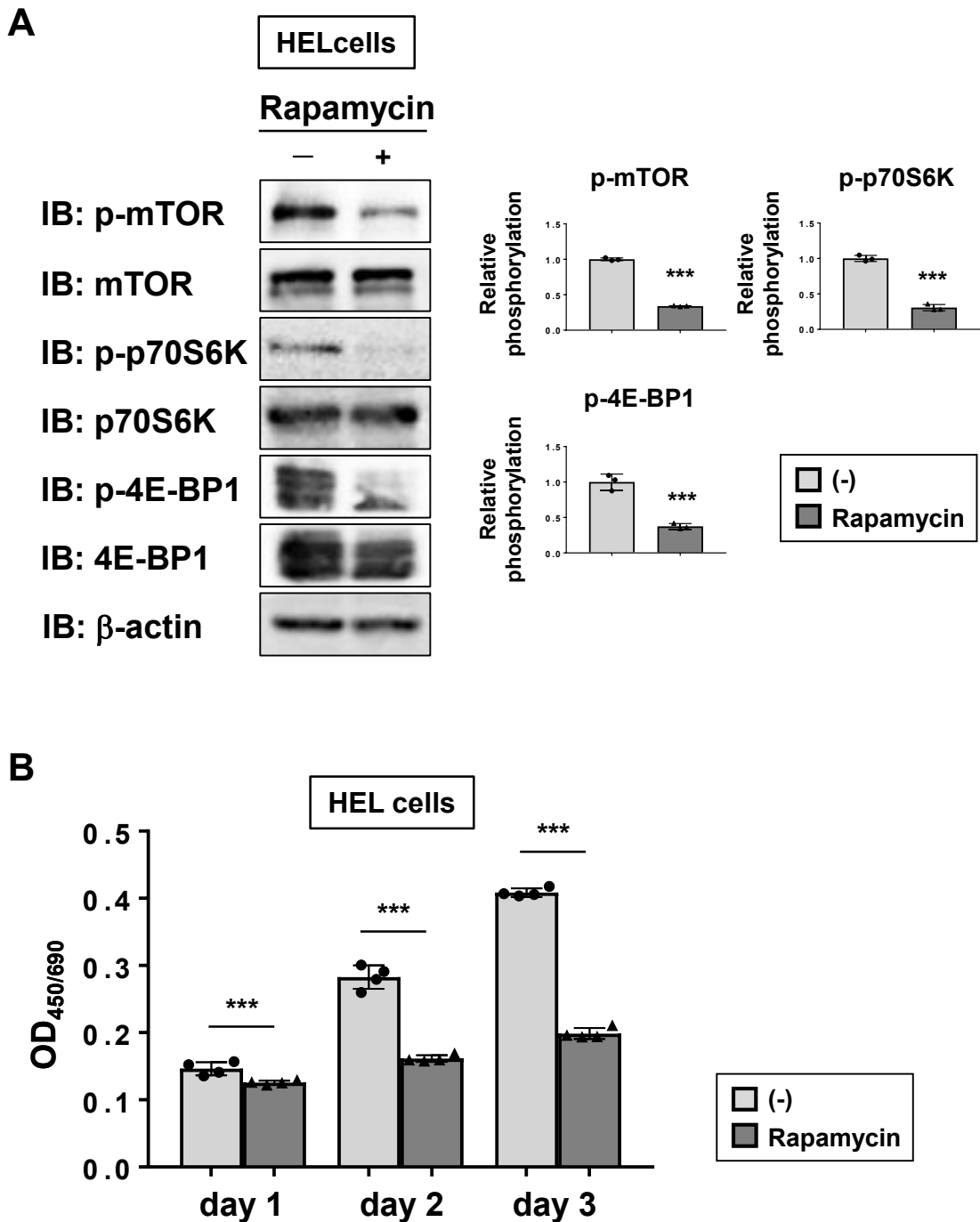


Fig. 14 HEL細胞の増殖に及ぼすRapamycinの影響

(A) HEL細胞をRapamycin (5 μ M) で24時間処理した。Immunoblottingにより、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。 (B) HEL細胞をRapamycin (5 μ M) で24時間、48時間、72時間処理した。WST assayにより細胞増殖能を検討した (n=4、***p<0.001)。

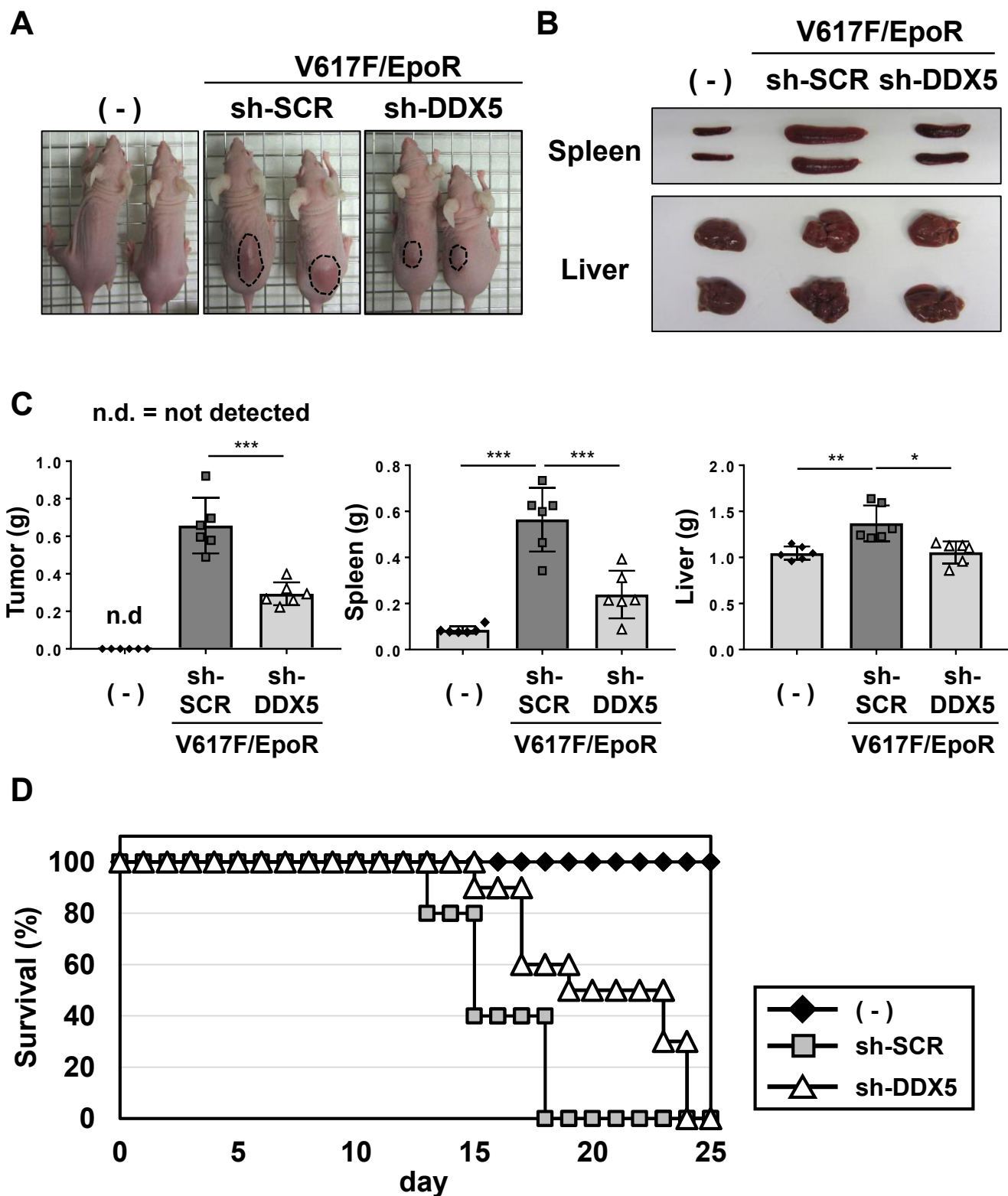


Fig. 15 JAK2V617Fによる腫瘍形成に及ぼすDDX5ノックダウンの影響

空ベクター発現Ba/F3細胞 (-)、sh-scrambleあるいはDDX5に対するshRNA (sh-DDX5) を発現させたV617F/EpoR細胞 (1×10^7 cells)を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した (n=6)。(A) 移植後13日目に、腫瘍形成を観察した。(B) 移植後13日目に、脾臓および肝臓を摘出した。(C) 腫瘍、脾臓、肝臓の重量を測定した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。(D) 移植後25日間、各マウスの生存日数を観察した (-/- n=6, コントロールのV617F/EpoR細胞移植群、DDX5をノックダウンしたV617F/EpoR細胞移植群 n=10)。

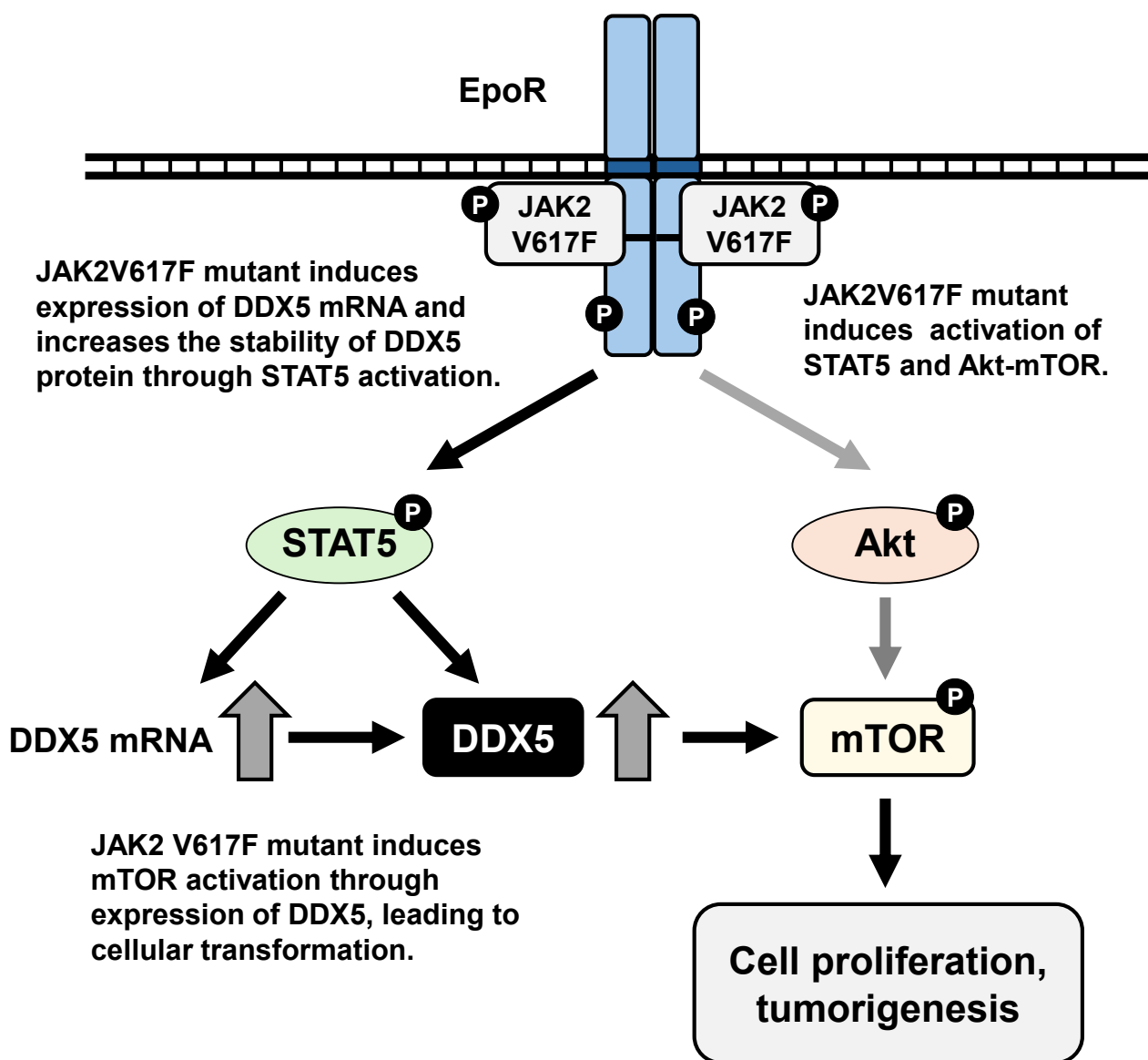
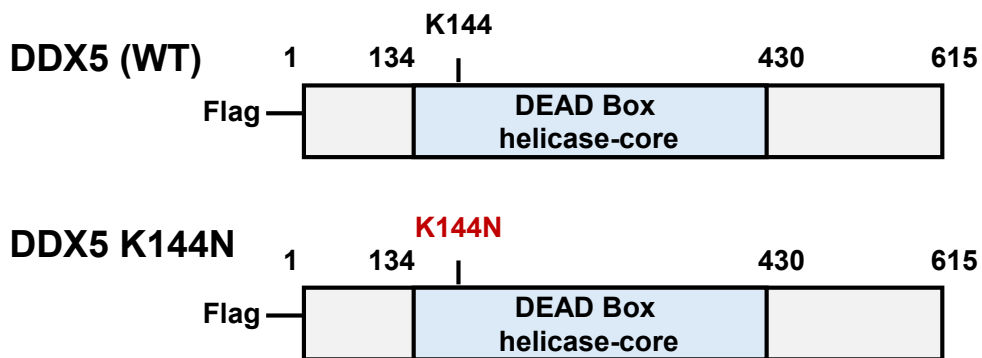
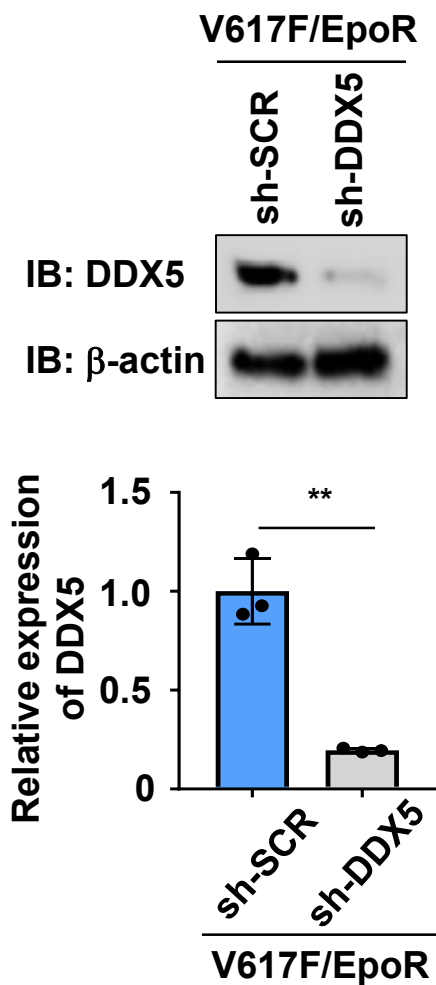


Fig. 16 JAK2V617FによるDDX5の発現誘導を介した発がん誘導シグナル経路
 JAK2V617Fは、STAT5の活性化を介して、DDX5 mRNAの発現を誘導すると共に、DDX5タンパク質の安定性も増強する。また、DDX5は、JAK2V617FによるmTOR経路の活性化、細胞増殖や腫瘍形成に必須の役割を果たす。

A



B



C

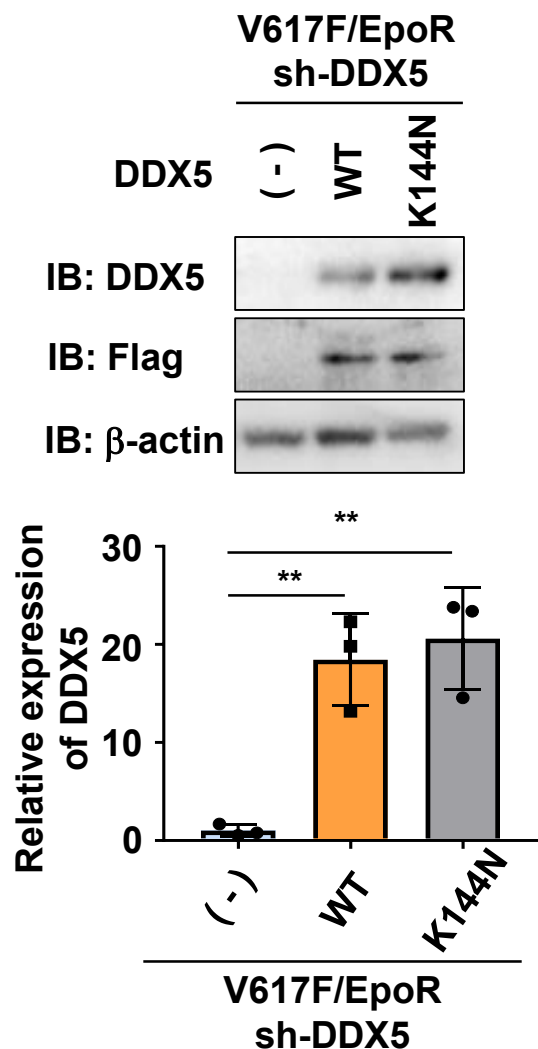


Fig.17 DDX5をノックダウンしたV617F/EpoR細胞における野生型DDX5およびRNAヘリカーゼ活性を欠損させたDDX5変異体 (K144N) の再構成

(A) N末にFlag tagを付加した野生型DDX5 (WT) およびRNAヘリカーゼ活性を欠損させたDDX5変異体 (K144N) の構造を示した。(B) レトロウイルス感染により、V617F/EpoR細胞に、sh-scramble (sh-SCR) およびDDX5に対するsh-RNA (sh-DDX5) を発現させた。(C) レトロウイルス感染により、sh-DDX5を発現したV617F/EpoR細胞に、空ベクター(-)、野生型DDX5 (WT)、 DDX5変異体 (K144N) を発現させた。(B, C) Immunoblottingにより、DDX5、β-actinの発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、**p<0.01)

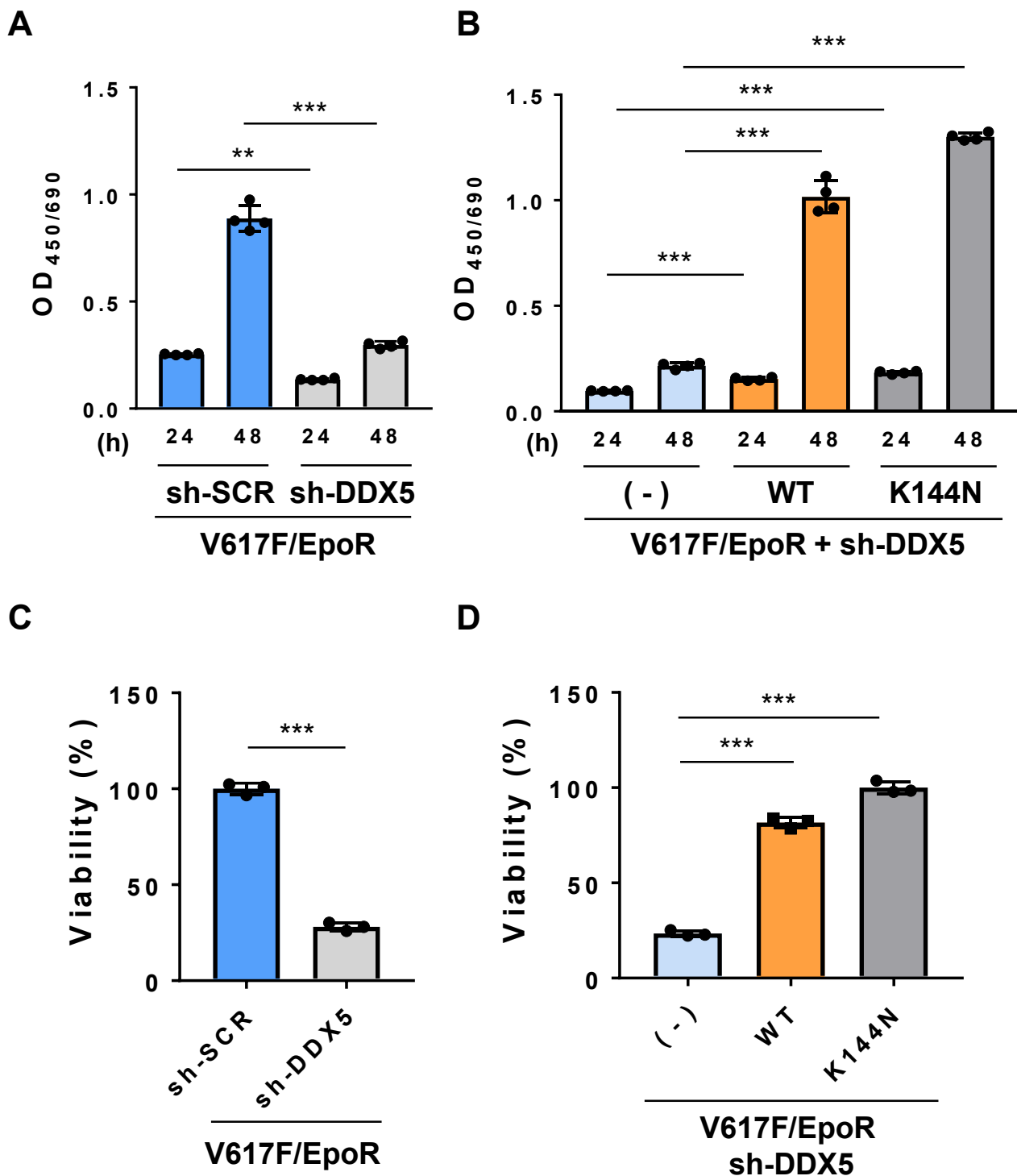


Fig.18 V617F/EpoR細胞の増殖・生存に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響
 (A) 各細胞を10%FBS含有RPMI培地で24時間、48時間培養した。WST assayにより細胞増殖能を検討した (n=4, **p<0.01, ***P<0.001)。 (D) 各細胞を10%FBS含有RPMI培地で48時間培養した。Trypan Blue染色により、細胞生存率を測定した (n=3, ***p<0.001)

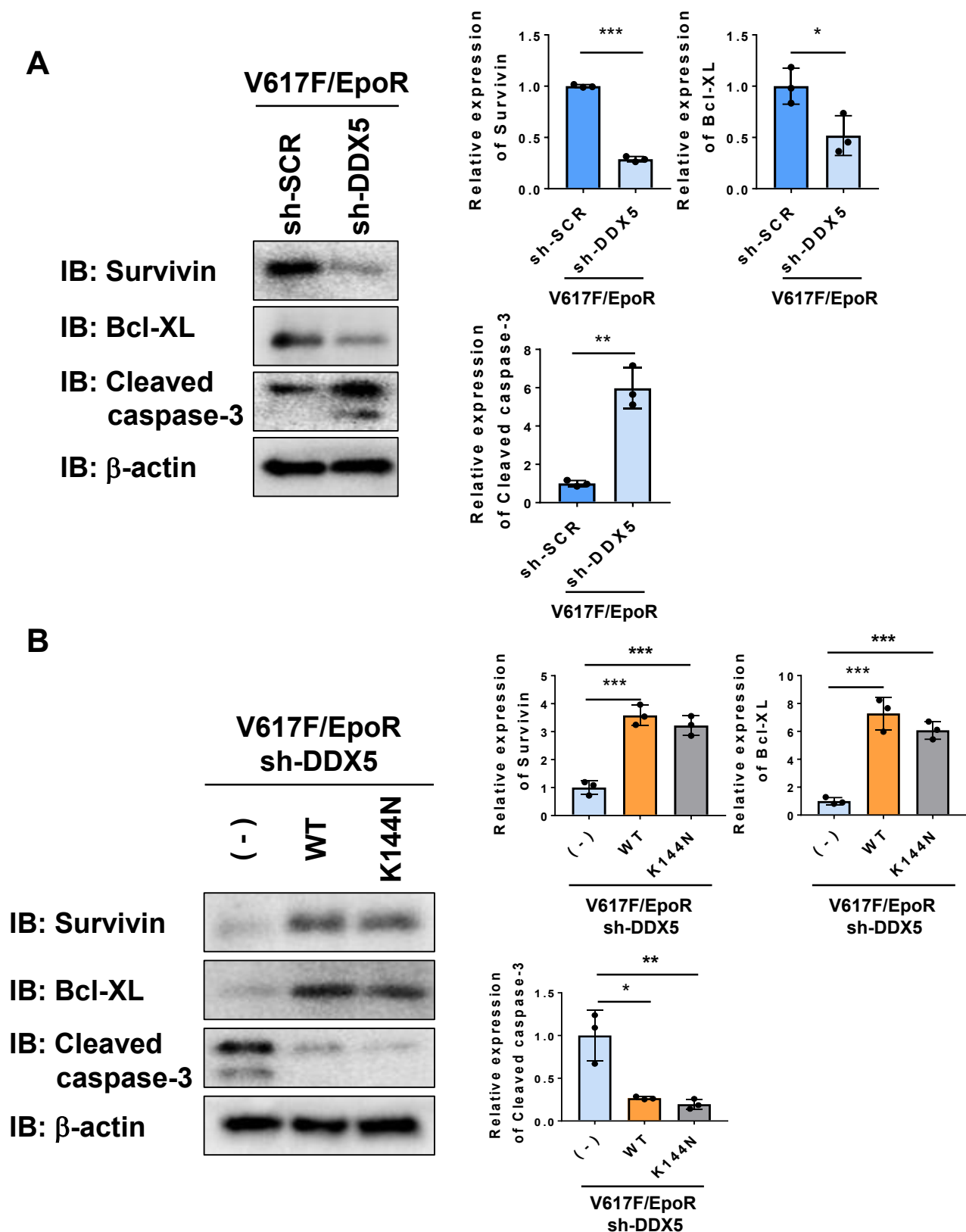


Fig. 19 V617F/EpoR細胞におけるアポトーシス関連分子の発現に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響

(A, B) 各細胞を10%FBS含有RPMI培地で24時間培養した。Immunoblottingにより、Survivin、Bcl-XLの発現、caspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***P<0.001)

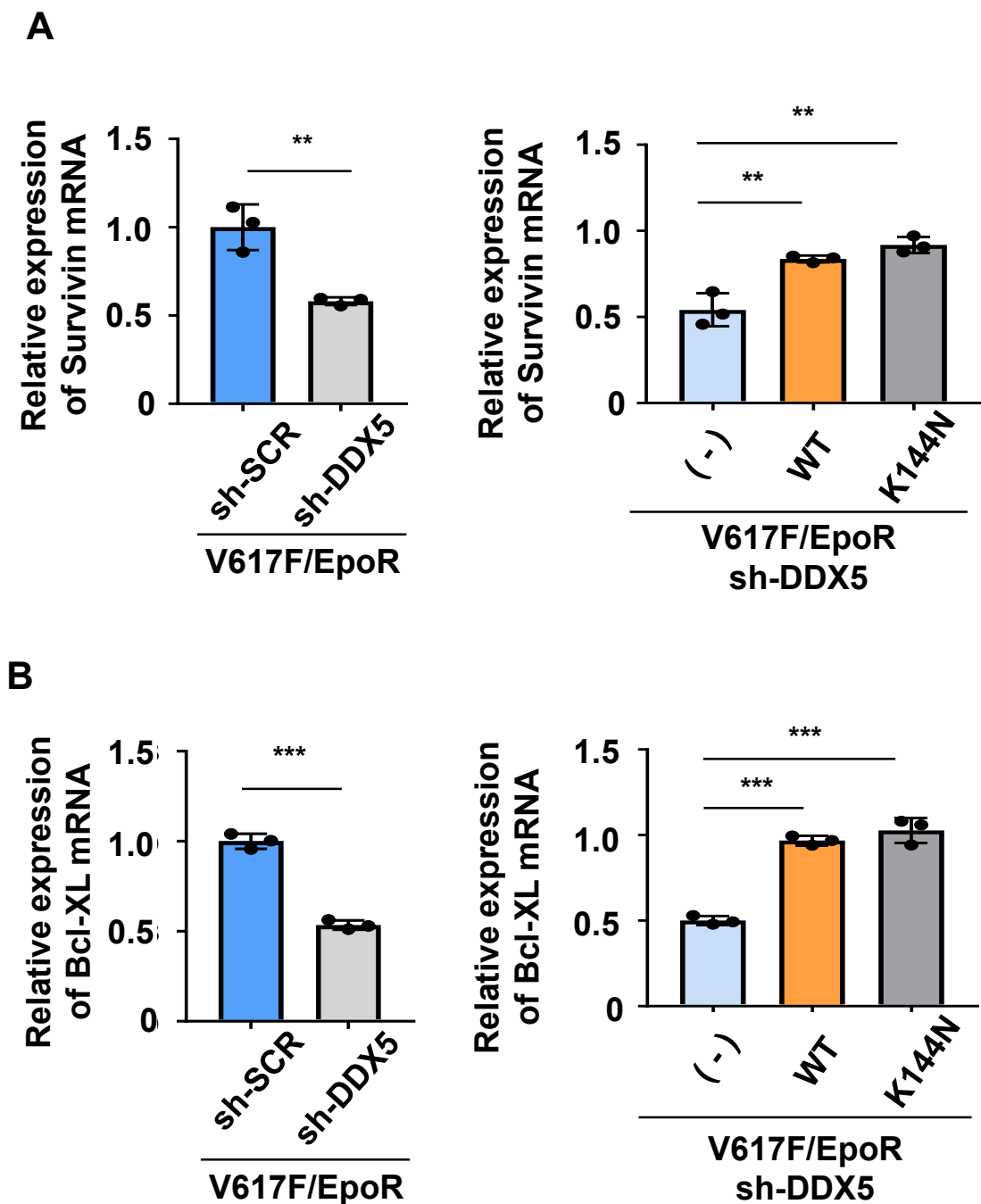


Fig. 20 V617F/EpoR細胞におけるアポトーシス関連分子のmRNA発現に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響

(A, B) 各細胞を10%FBS含有RPMI培地で24時間培養した。RT-PCRにより、Survivin mRNA、Bcl-XL mRNAの発現量を検討した。Survivin mRNA、Bcl-XL mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した。(** $p < 0.01$, *** $P < 0.001$)。

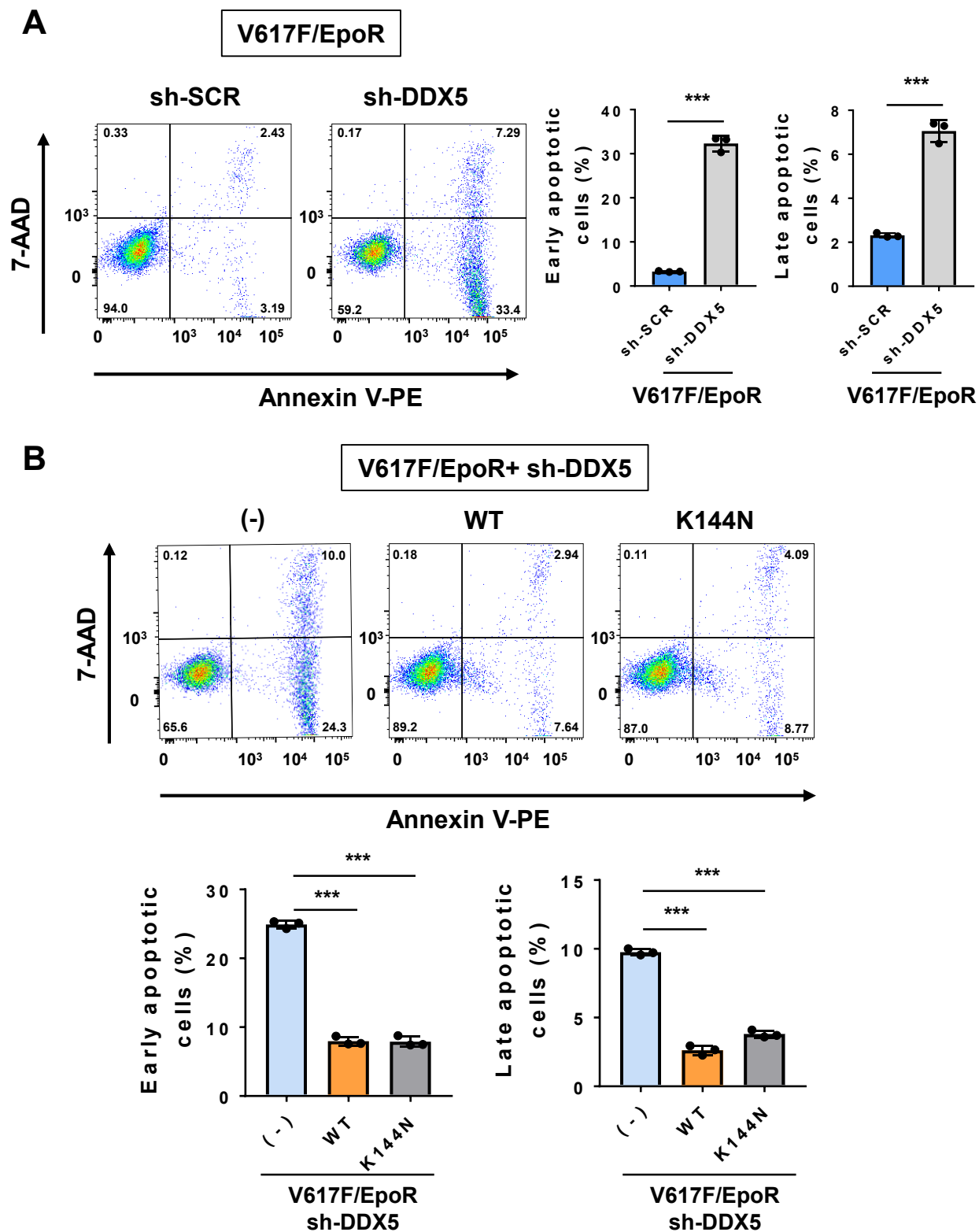


Fig. 21 V617F/EpoR細胞の抗アポトーシス作用に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響

(A, B) 各細胞を10%FBS含有RPMI培地で24時間培養した。Annexin V-PE/7-AAD染色により、アポトーシス細胞の割合を解析した (n=3)。Annexin V-PE陽性かつ7-AAD陰性の細胞を前期アポトーシス細胞、Annexin V-PE陽性かつ7-AAD陽性の細胞を後期アポトーシス細胞とした (**P<0.001)

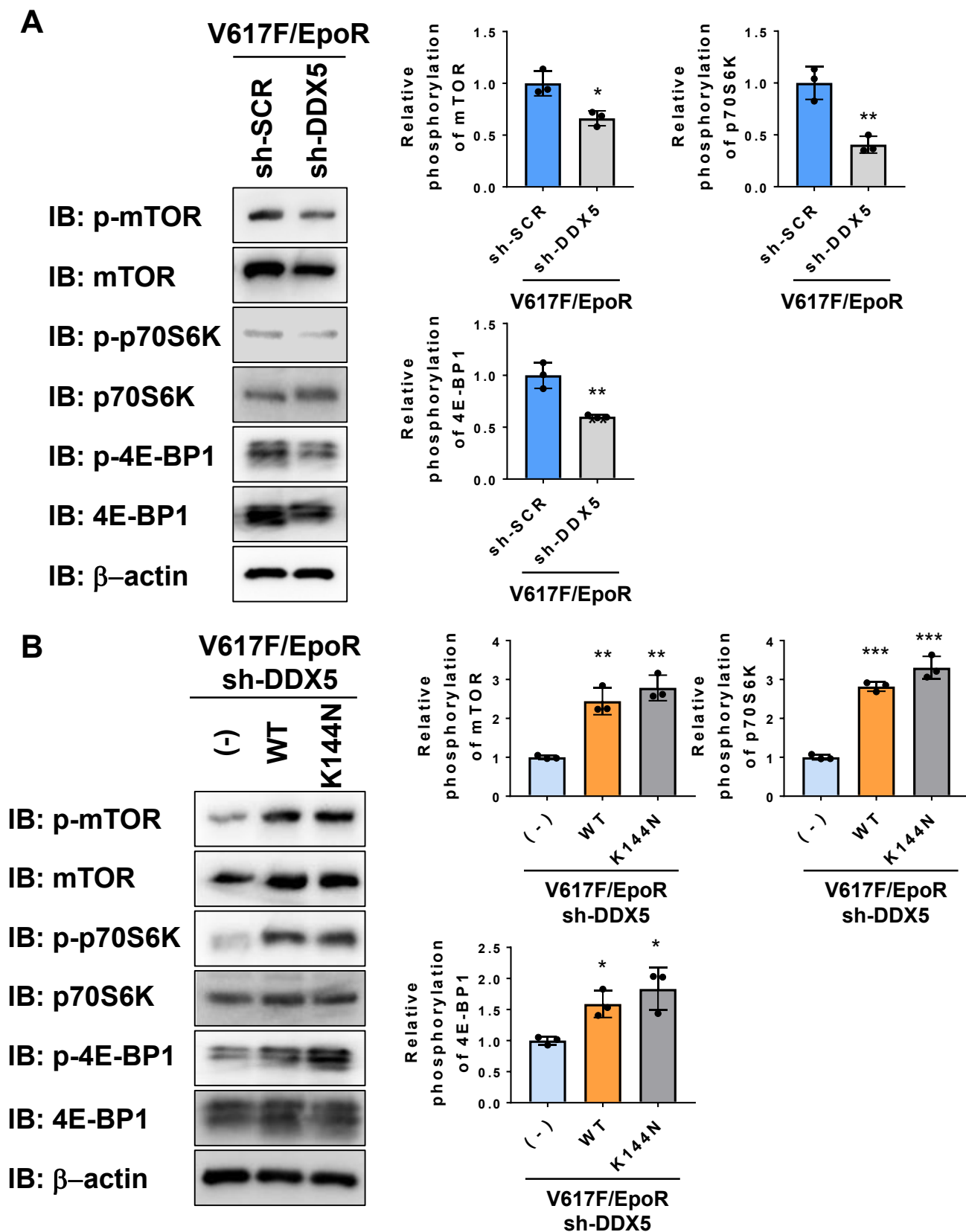
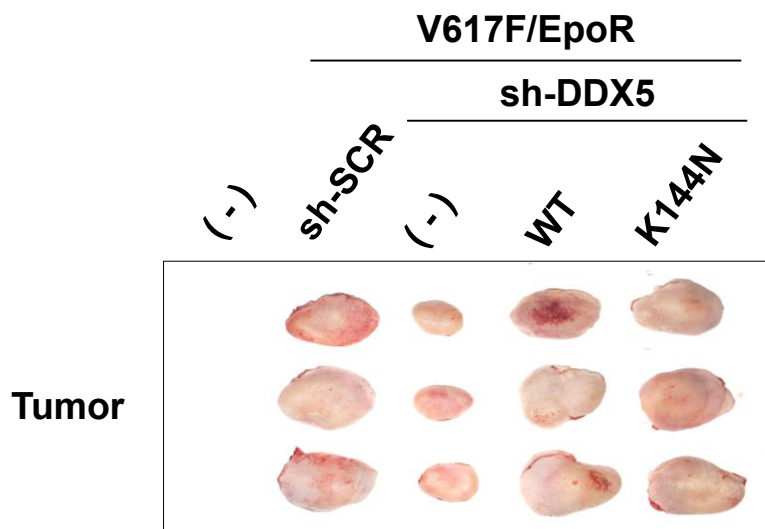


Fig. 22 V617F/EpoR細胞におけるmTOR経路の活性化に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響

(A, B) 各細胞を10%FBS含有RPMI培地で24時間培養した。Immunoblottingにより、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)。

A



B

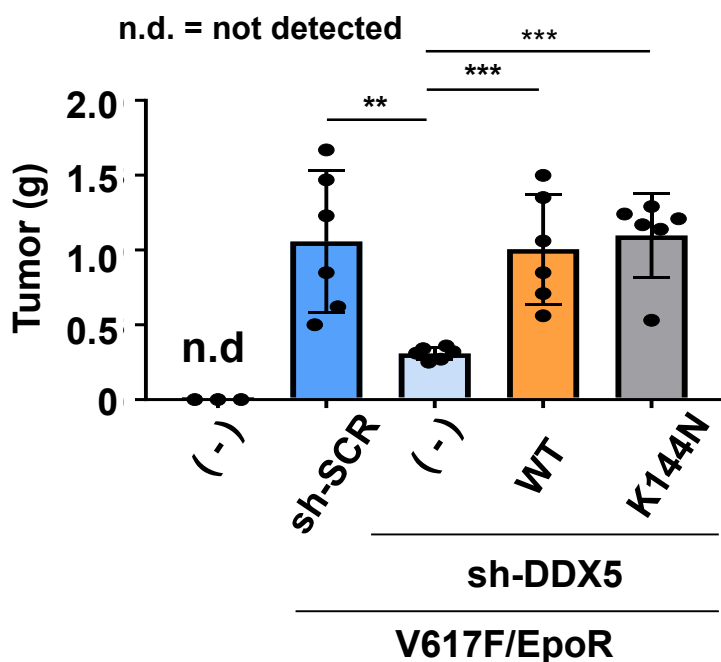


Fig. 23 JAK2V617Fによる腫瘍形成に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響
 コントロールの空ベクター発現Ba/F3細胞 (-)、sh-scramble (sh-SCR)を発現させたV617F/EpoR細胞、DDX5に対するsh-RNA (sh-DDX5)を発現させたV617F/EpoR細胞に、空ベクター (-)、野生型DDX5 (WT)、あるいはDDX5変異体 (K144N)を再構成した細胞 (3×10^6 cells)を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した (コントロール群はn=3, 他はn=6)。(A) 移植後15日に、腫瘍を摘出した。(B) 腫瘍の重量を測定した (**p<0.01, ***p<0.001)。

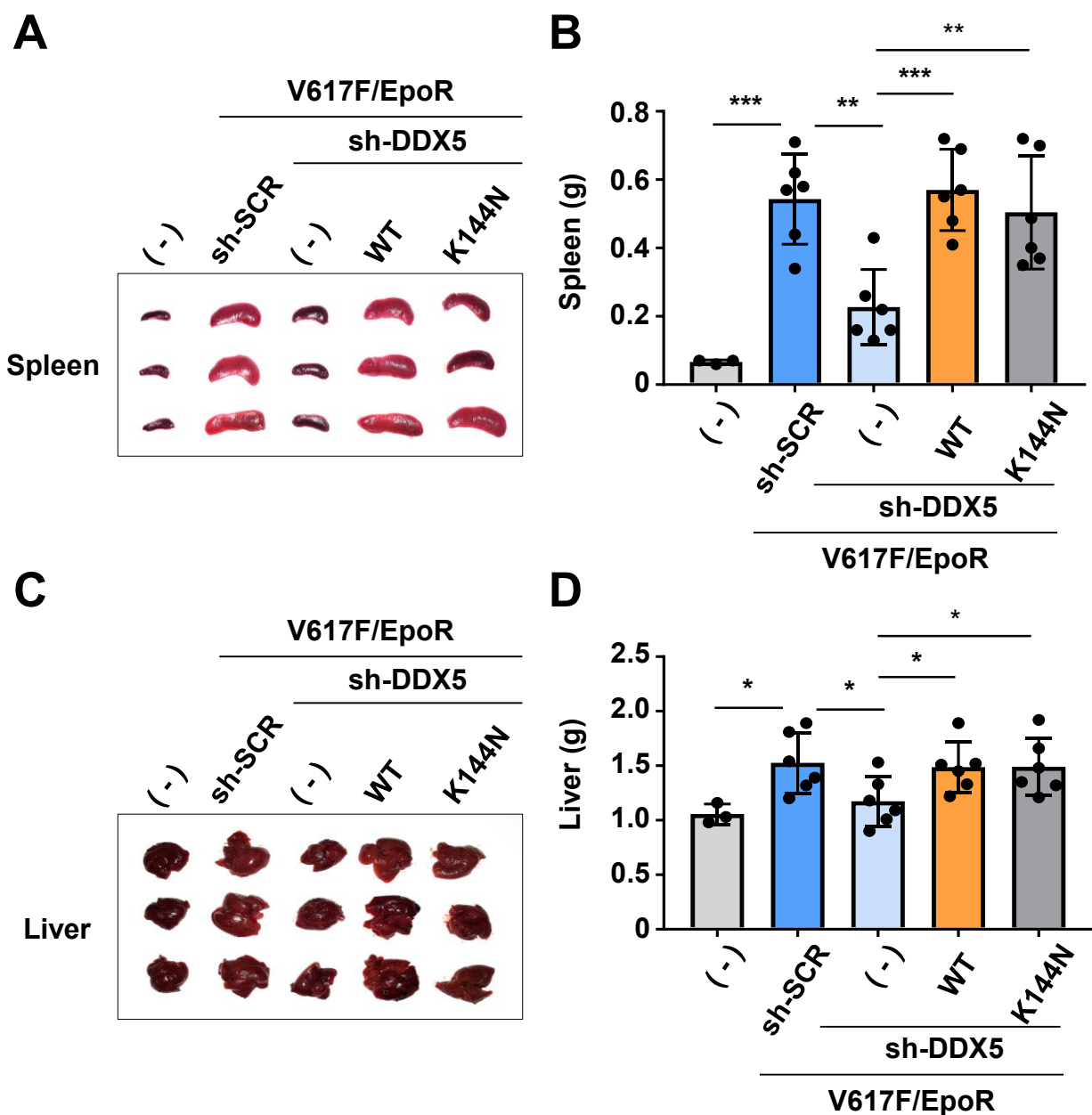


Fig. 24 JAK2V617Fによる脾臓、肝臓の肥大化に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響

コントロールの空ベクター発現Ba/F3細胞 (-)、sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR細胞、さらに、DDX5に対するsh-RNA (sh-DDX5) を発現させたV617F/EpoR細胞に、空ベクター (-)、野生型DDX5 (WT)、あるいはDDX5変異体 (K144N) を再構成した細胞 (3×10^6 cells) を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した (コントロール群はn=3, 他はn=6)。 (A, B) 移植後15日に、脾臓を摘出し、重量を測定した (**p<0.01, ***p<0.001)。 (C, D) 移植後15日に、肝臓を摘出し、重量を測定した (*p<0.05)。

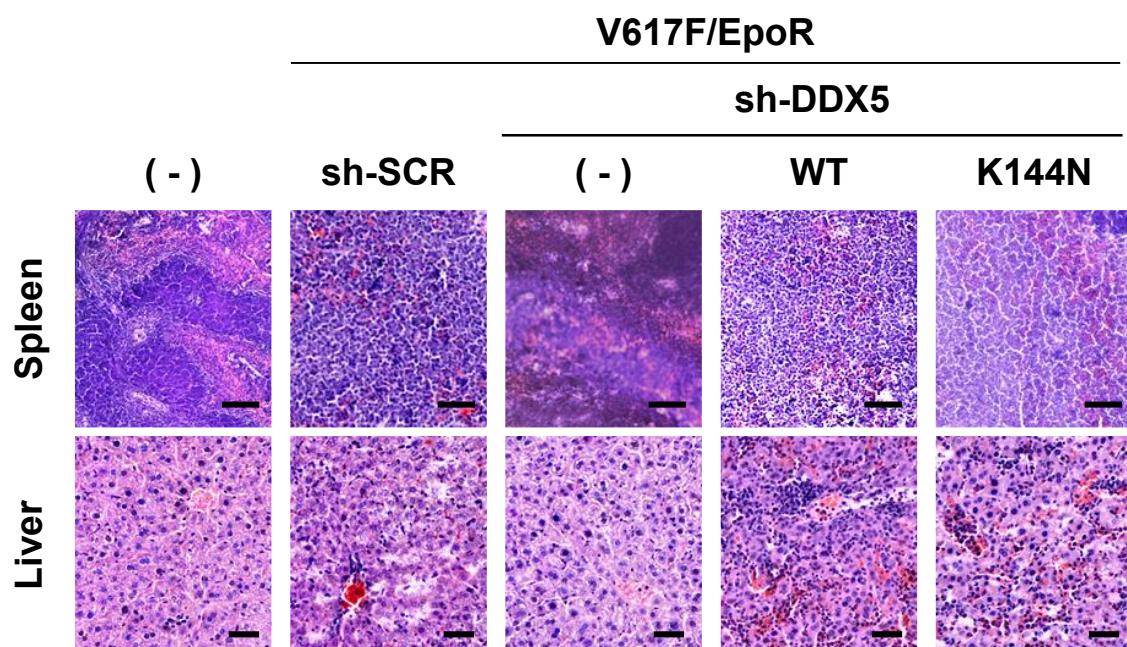
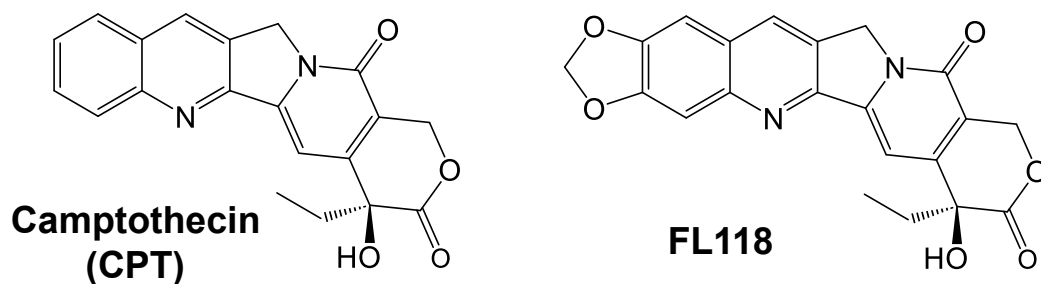


Fig. 25 JAK2V617Fによる脾臓、肝臓の組織構造変化に及ぼすDDX5のRNAヘリカーゼ活性の影響

コントロールの空ベクター発現Ba/F3細胞 (-), sh-scramble (sh-SCR) を発現させた V617F/EpoR細胞、さらに、DDX5に対するshRNA (sh-DDX5) を発現させたV617F/EpoR細胞に、空ベクター (-), 野生型DDX5 (WT)、あるいはDDX5変異体(K144N) を再構成した細胞 (3×10^6 cells) を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した (コントロール群は $n=3$, 他は $n=6$)。移植後15日に、脾臓や肝臓を摘出し、パラフィン切片を作製した。HE染色を行い、脾臓、肝臓の組織構造を観察した (Scale bar=100 μ m)。

A



B

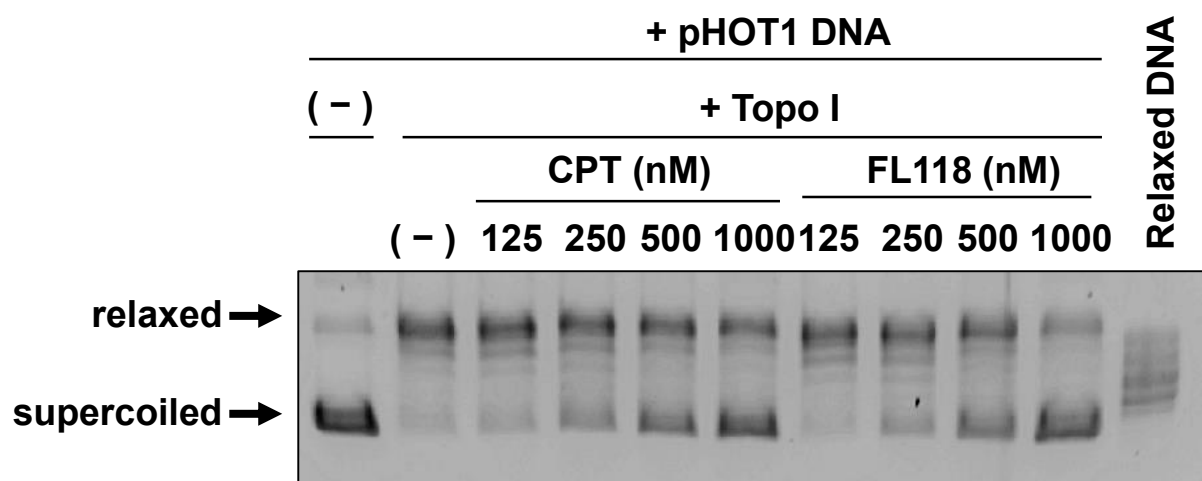
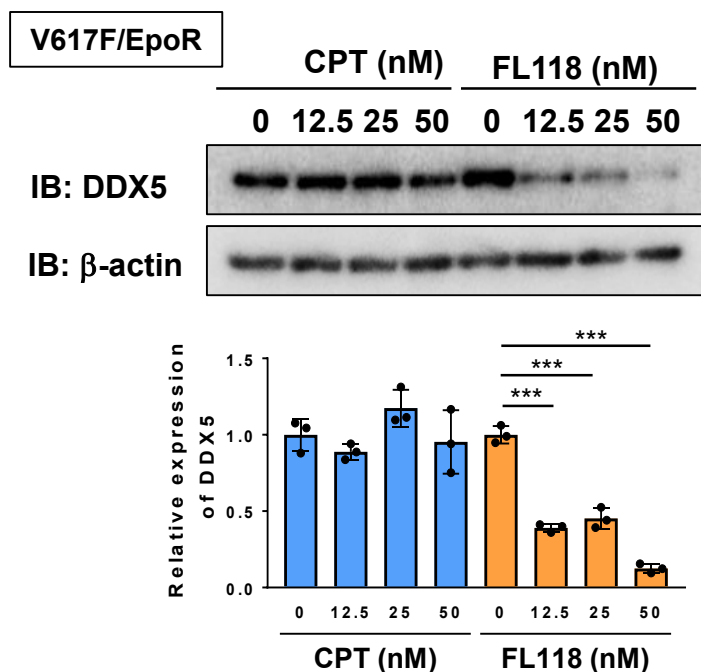


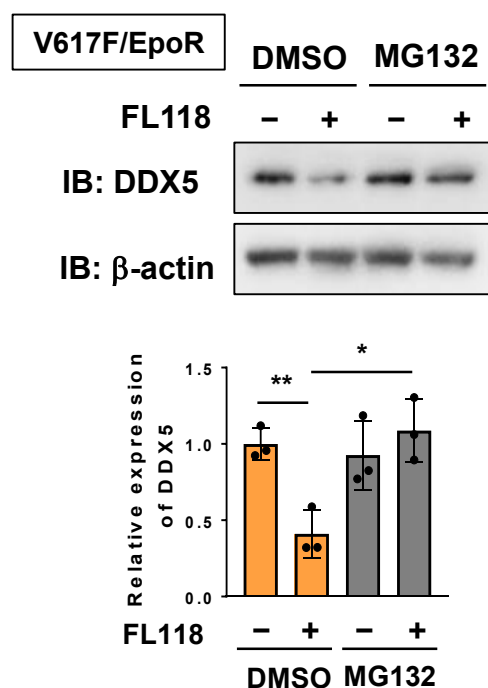
Fig. 26 *in vitro*におけるCPT、FL118のTopoI阻害効果

(A) Camptothecin (CPT) およびFL118の構造を示した。(B) Recombinant Topo Iとスーパーコイル型DNA (pHOT1 DNA) に、CPTあるいはFL118 (125, 250, 500, 1000 nM) を添加し、37°Cで30分間反応させた。1%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、TopoI阻害活性を検討した。コントロールとして、リラックス型DNAを用いた (右端)。

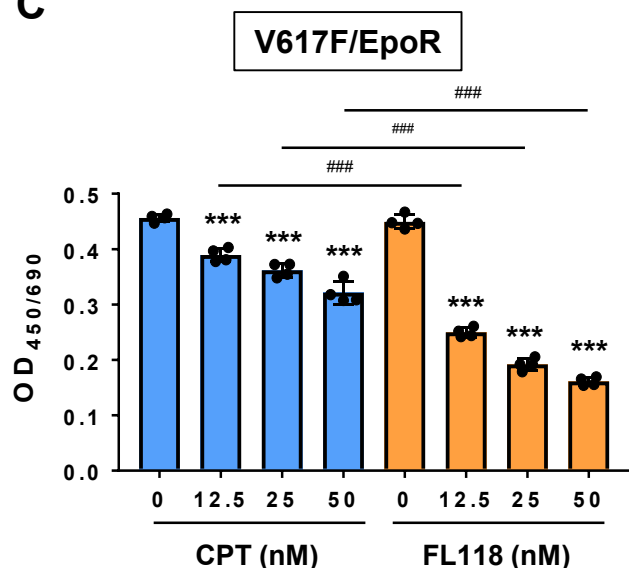
A



B



C



D

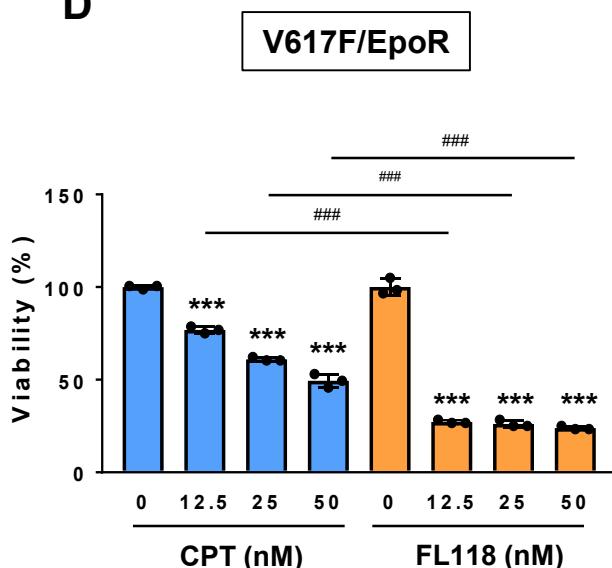


Fig 27. V617F/EpoR細胞におけるFL118によるDDX5のプロテアソーム分解誘導および増殖抑制、細胞死誘導

(A) V617F/EpoR細胞をCPTまたはFL118 (12.5, 25, 50 nM) で12時間処理した。(B) V617F/EpoR細胞に、DMSO (0.1%) またはMG132 (1 μ M) とFL118 (50 nM) を添加し、12時間培養した。(A, B) Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した ($n=3$, * $p<0.05$, *** $p<0.001$)。 (C, D) V617F/EpoR細胞をCPTまたはFL118 (12.5, 25, 50 nM) で24時間処理した。(C) WST assayにより細胞増殖能を測定した ($n=4$, *** $p<0.001$ vs コントロール群, ### $p<0.001$ vs CPT処理群)。(D) トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した ($n=3$, *** $p<0.001$ vs コントロール群, ### $p<0.001$ vs CPT処理群)。

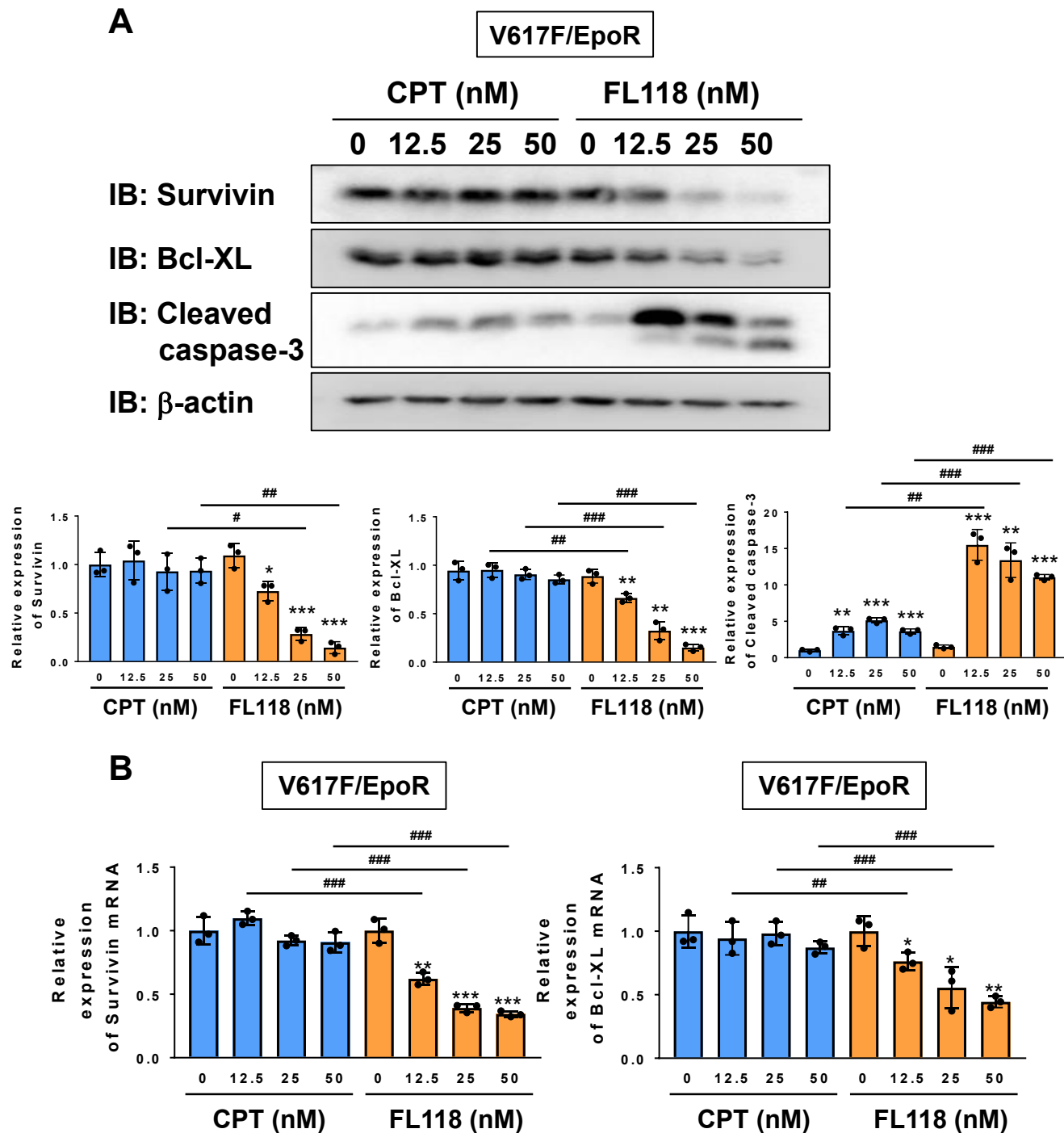


Fig 28. V617F/EpoR細胞におけるFL118による Survivin、BCL-XLの発現低下および Caspase-3の断片化

(A, B) V617F/EpoR細胞をCPTまたはFL118 (12.5, 25, 50 nM) で24時間処理した。(A) Immunoblottingにより、Survivin、Bcl-XLの発現およびcaspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。(B) RT-PCRにより、Survivin mRNAおよびBcl-XL mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。Survivin mRNAおよびBcl-XL mRNAの発現量は、β₂-microglobulinの発現量で補正し、算出した (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

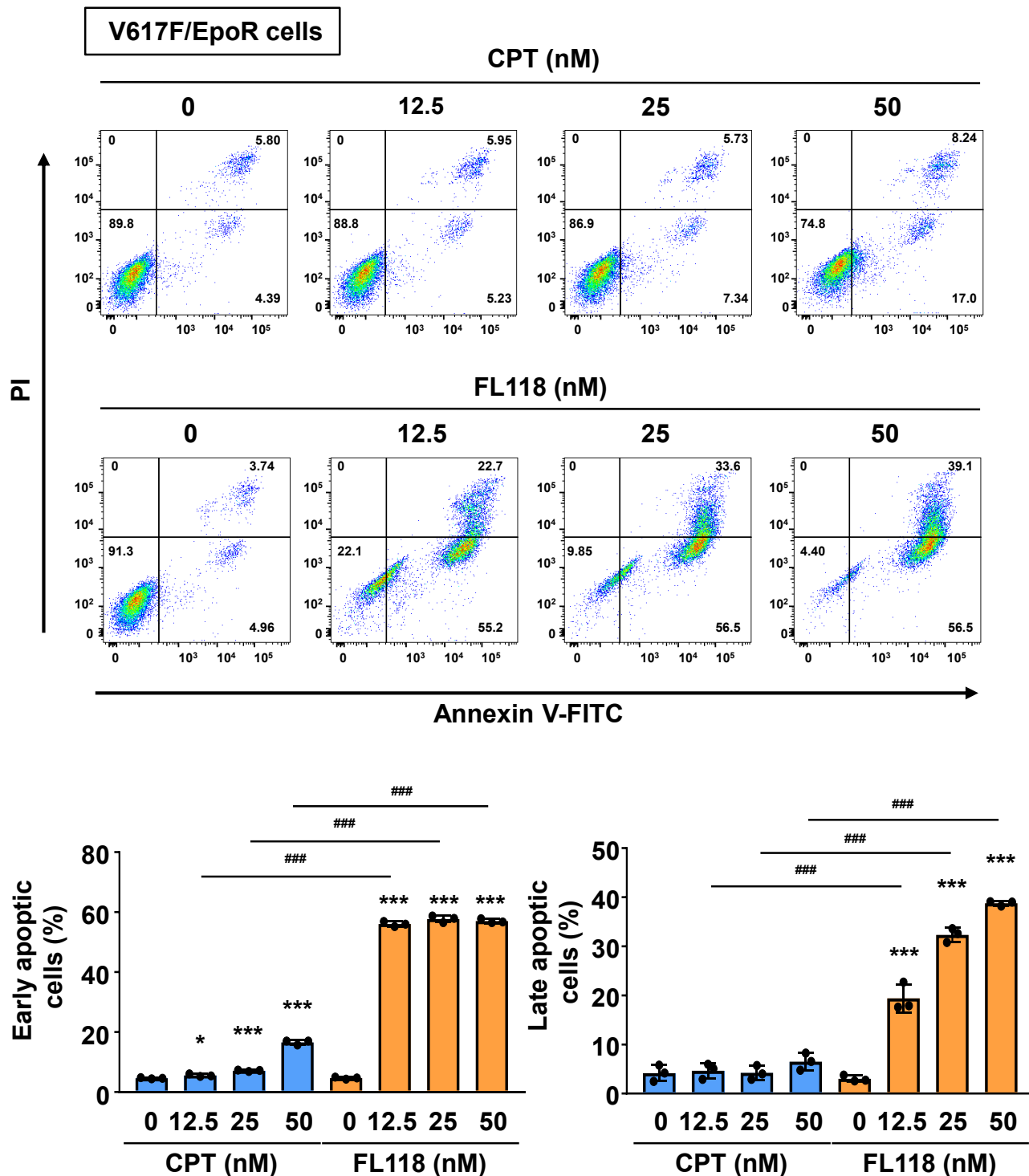


Fig. 29 CPT、FL118によるV617F/EpoR細胞のアポトーシス誘導

V617F/EpoR細胞をCPTまたはFL118 (12.5, 25, 50 nM) で48時間処理した。Annexin V-FITC/PI染色により、アポトーシス細胞の割合を解析した。Annexin V-FITC陽性かつPI陰性の細胞を初期アポトーシス細胞、Annexin V-FITC陽性かつPI陽性の細胞を後期アポトーシス細胞とした (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs コントロール群、### $p < 0.001$ vs CPT処理群)。

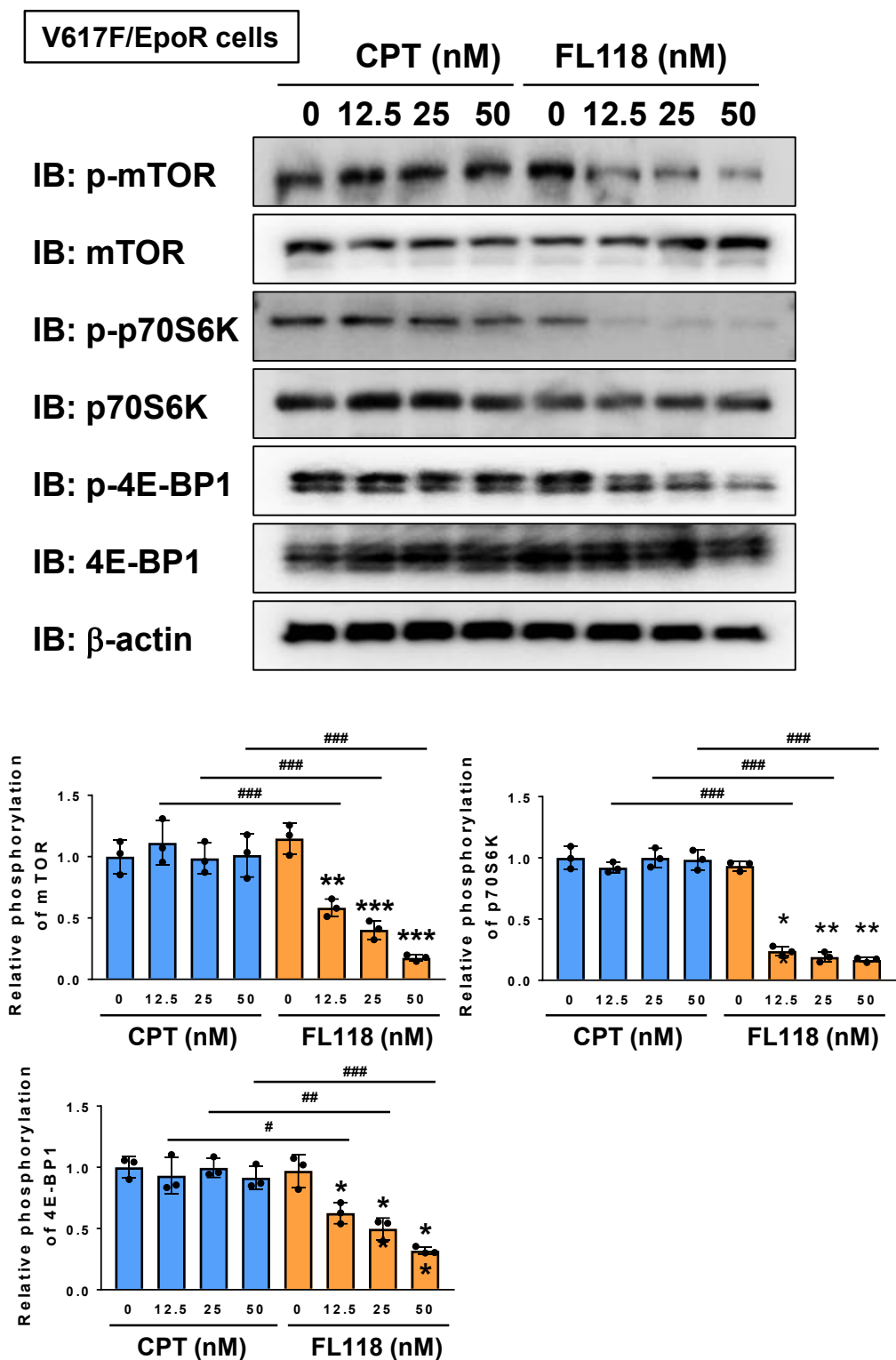


Fig. 30 V617F/EpoR細胞におけるFL118によるmTOR経路の活性抑制

V617F/EpoR細胞をCPTまたはFL118 (12.5, 25, 50 nM) で12時間処理した。Immunoblottingにより、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***P<0.001 vs コントロール群、#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

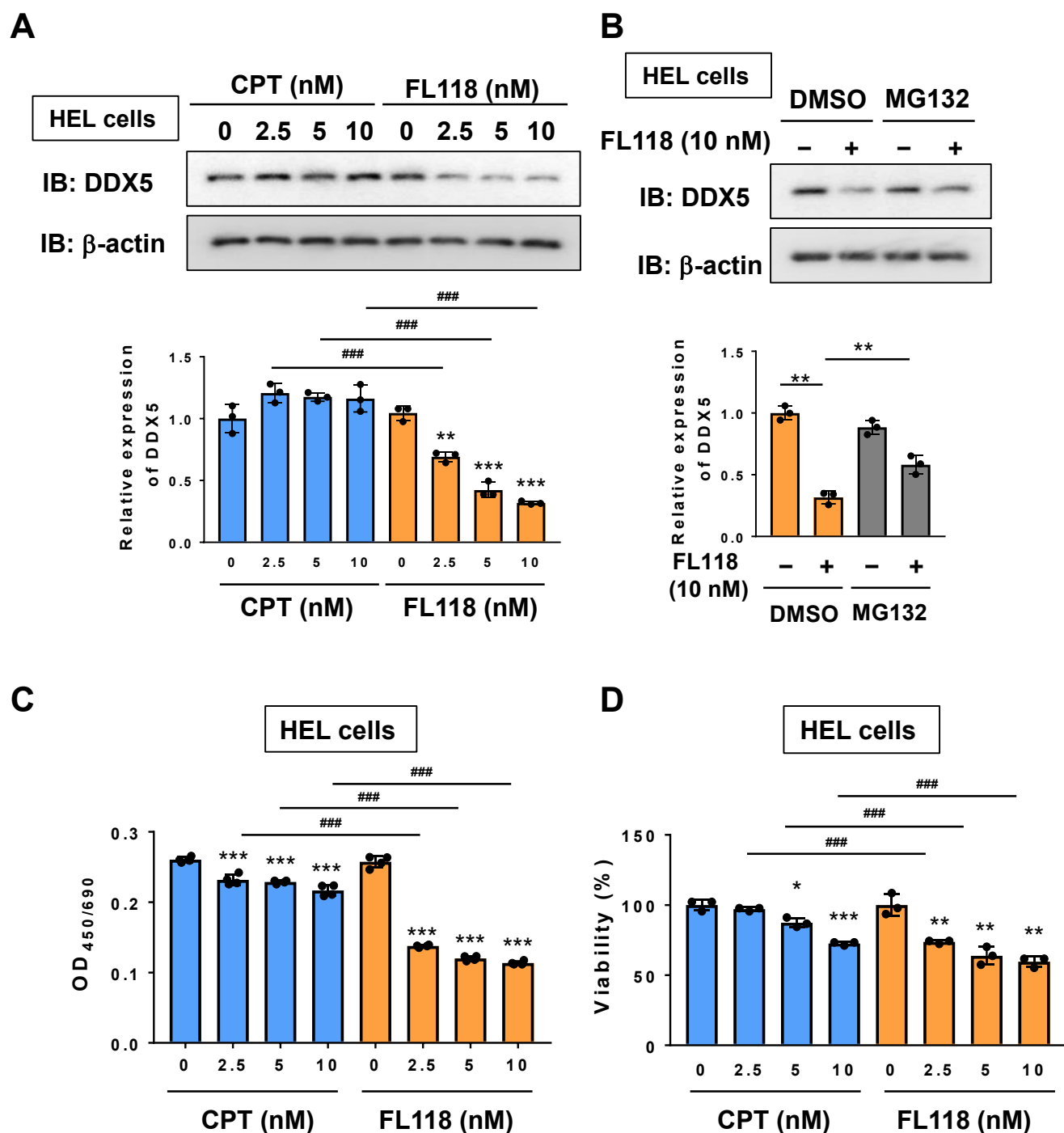
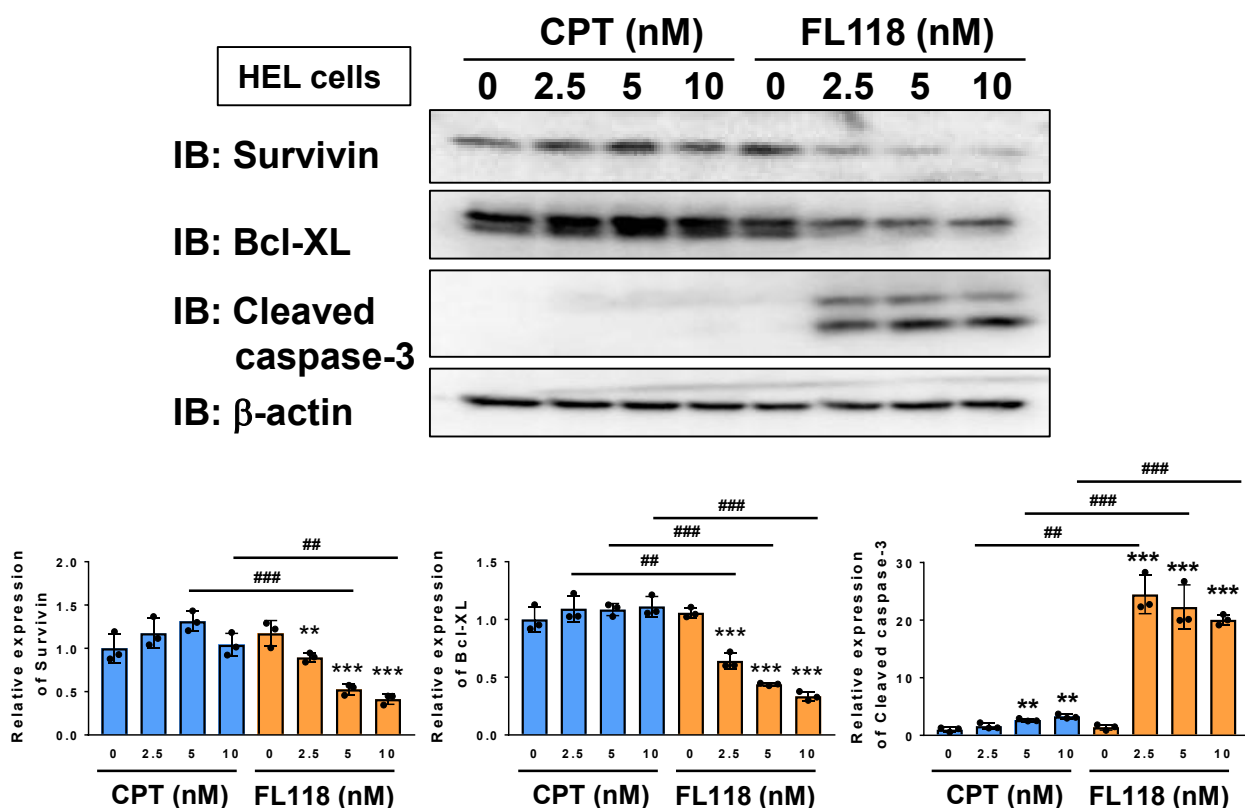


Fig 31. HEL細胞におけるFL118によるDDX5のプロテアソーム分解誘導および増殖抑制、細胞死誘導

(A) HEL細胞をCPTまたはFL118 (2.5, 5, 10 nM) で12時間処理した。(B) HEL細胞に、DMSO (0.1%) またはMG132 (1 μM) とFL118 (10 nM) を添加し、12時間培養した。(A, B) Immunoblottingにより、DDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、###p<0.001 vs CPT処理群)。(C, D) HEL細胞をCPT またはFL118 (2.5, 5, 10 nM) で24時間処理した。(C) WST assayにより細胞増殖能を測定した (n=4, ***p<0.001 vs コントロール群、###p<0.001 vs CPT処理群)。(D) トリパンプブルー染色法により細胞生存率を測定した (n=3, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、###p<0.001 vs CPT処理群)。

A



B

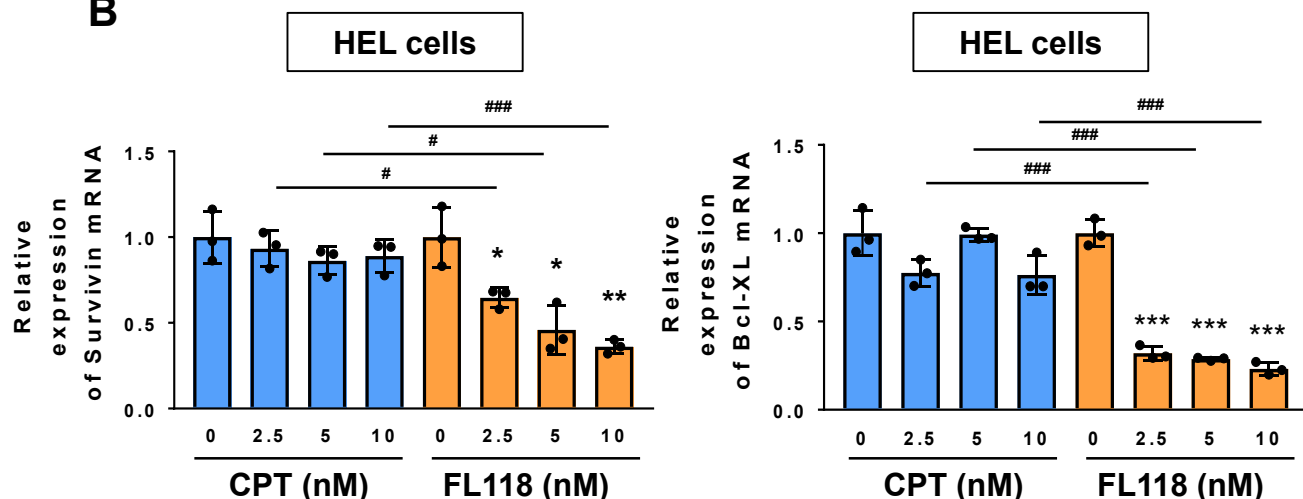


Fig 32. HEL細胞におけるFL118による Survivin、BCL-XLの発現低下およびCaspase-3の断片化

HEL細胞をCPTまたはFL118 (2.5, 5, 10 nM) で24時間処理した。(A) Immunoblottingにより、SurvivinおよびBcl-XLの発現、caspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。(B) RT-PCRにより、Survivin mRNAおよびBcl-XL mRNAの発現を検討した。Survivin mRNAおよびBcl-XL mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、#p<0.05, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

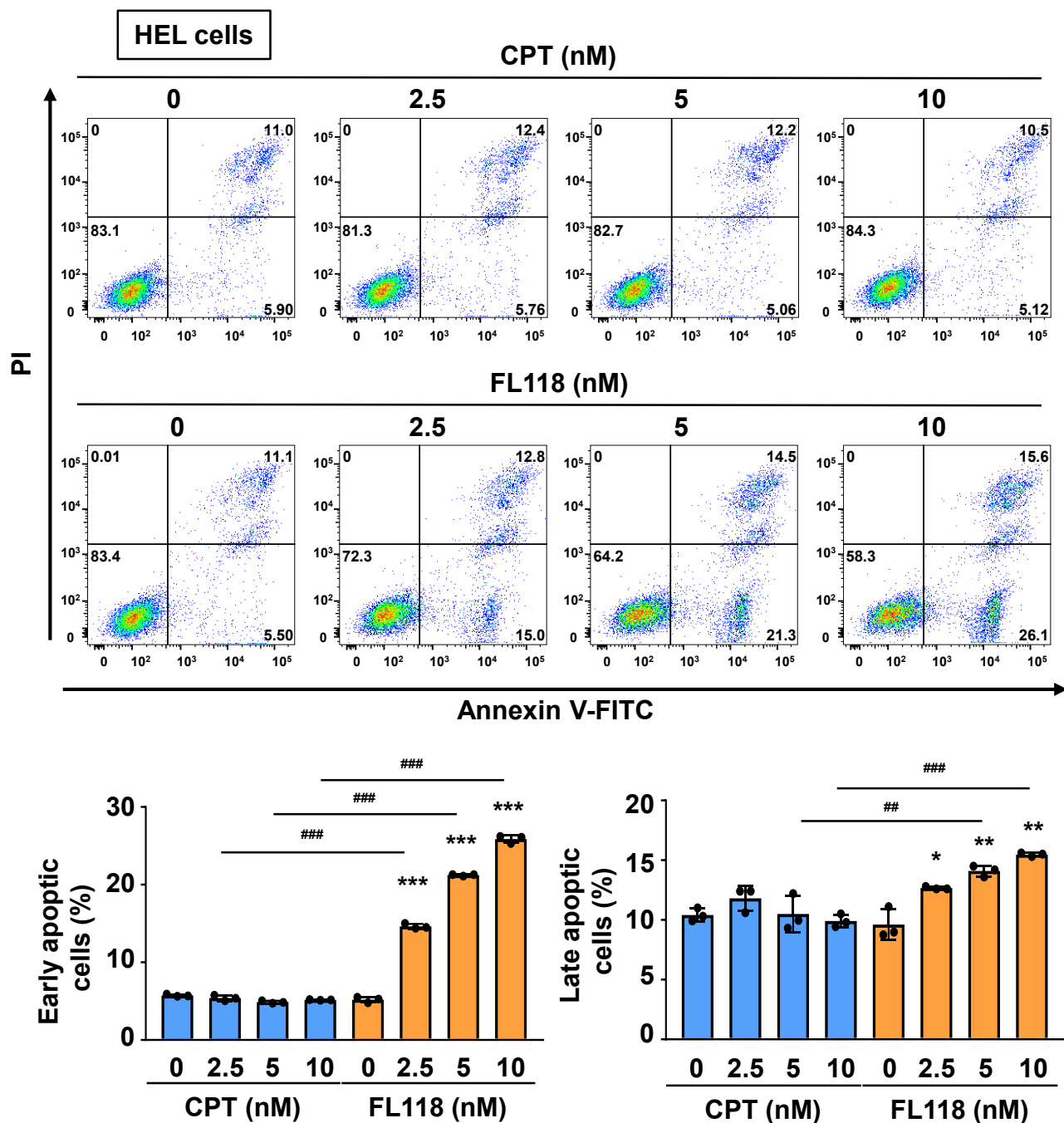


Fig. 33 CPT、FL118によるHEL細胞のアポトーシス誘導

HEL細胞をCPTまたはFL118 (2.5, 5, 10 nM) で24時間処理した。Annexin V-FITC/PI染色により、アポトーシス細胞の割合を解析した。Annexin V-FITC陽性かつPI陰性の細胞を初期アポトーシス細胞、Annexin V-FITC陽性かつPI陽性の細胞を後期アポトーシス細胞とした (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

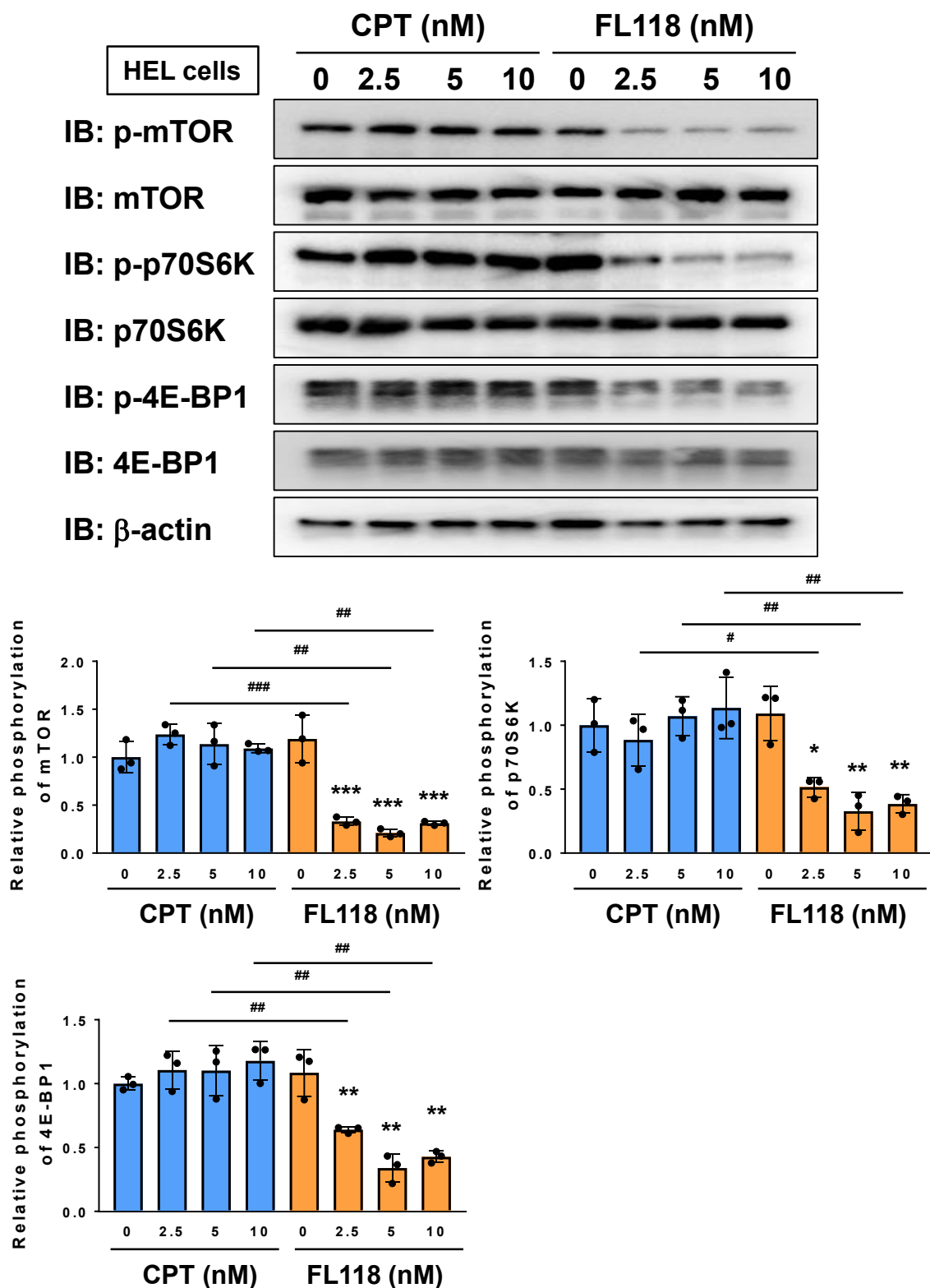


Fig. 34 HEL細胞におけるFL118によるmTOR経路の活性抑制

HEL細胞をCPTまたはFL118 (2.5, 5, 10 nM) で12時間処理した。Immunoblottingにより、mTOR、p70S6K、4E-BP1のリン酸化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***P<0.001 vs コントロール群、#p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

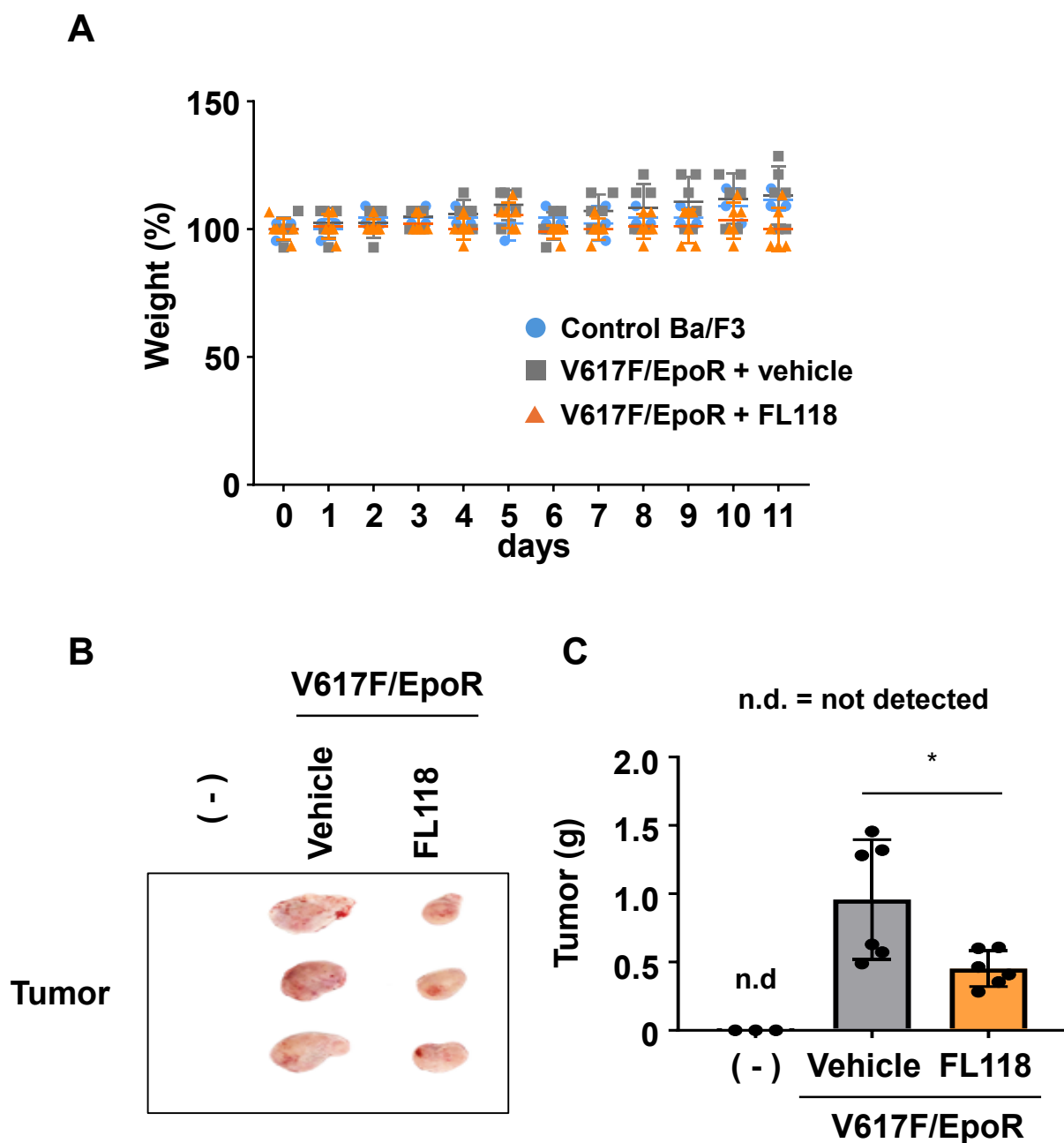


Fig. 35 JAK2V617Fによる腫瘍形成に及ぼすFL118の抑制効果

コントロールの空ベクター発現Ba/F3細胞 (-) あるいはV617F/EpoR細胞 (1×10^7 cells) を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した。移植後5日、7日、9日目にvehicleまたはFL118 (2.5 mg/kg) を経口投与し、11日目に解剖した。(コントロール群はn=3, 他はn=6)。(A) 11日間、各マウスの体重を測定し、体重増加率をグラフに示した。(B, C) 移植後11日目に腫瘍を摘出し、重量を測定した (*p<0.05)。

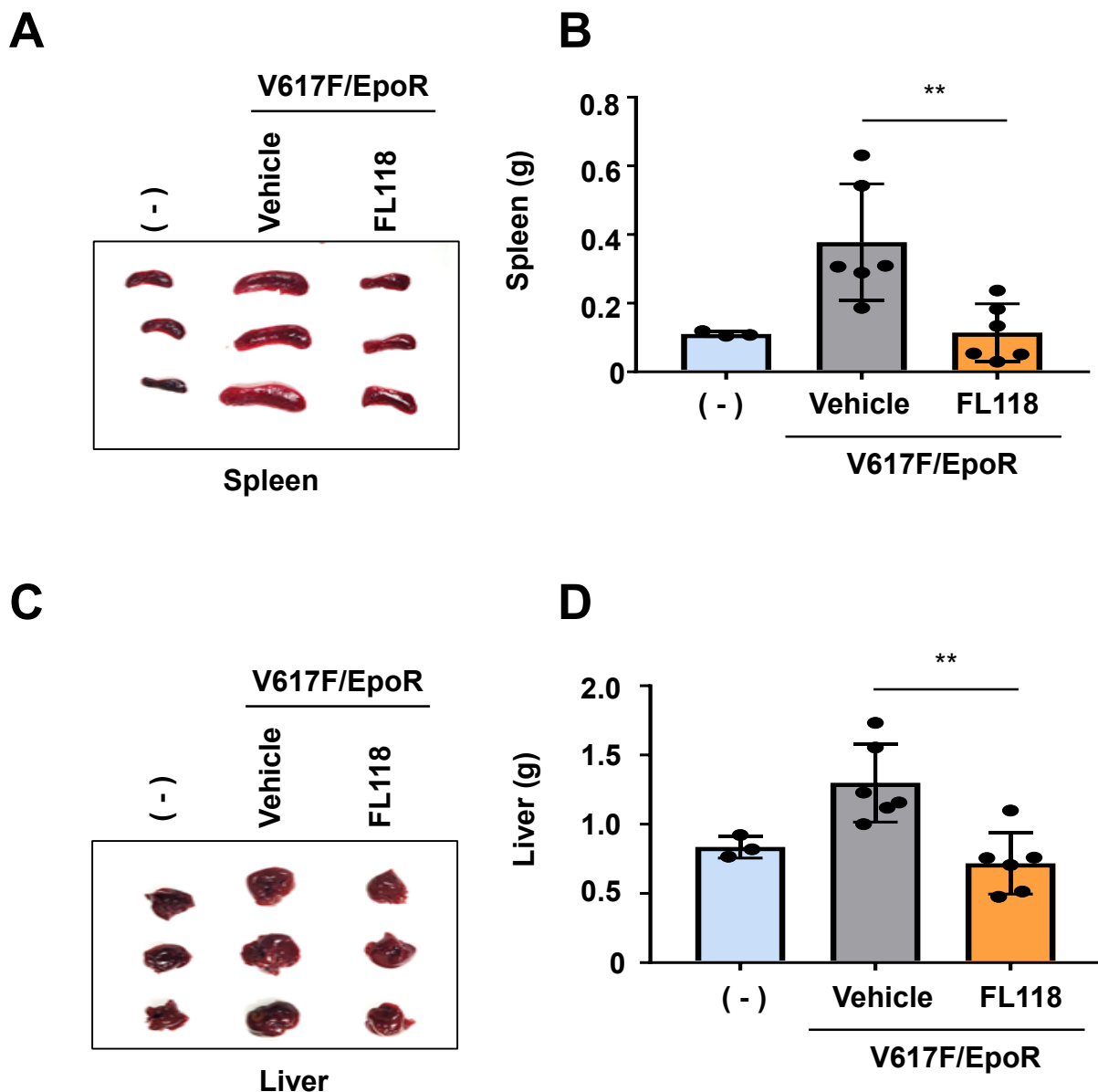


Fig. 36 JAK2V617Fによる脾臓、肝臓の肥大化に及ぼすFL118の抑制効果
 コントロールの空ベクター発現Ba/F3細胞 (-) あるいはV617F/EpoR細胞 (1×10^7 cells) を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した。移植後5日、7日、9日目にvehicleまたはFL118 (2.5 mg/kg) を経口投与し、11日目に解剖した。(コントロール群はn=3, 他はn=6)。(A, B) 移植後11日に、脾臓を摘出し、重量を測定した (**p<0.01)。(C, D) 移植後11日に、肝臓を摘出し、重量を測定した。 (**p<0.01)

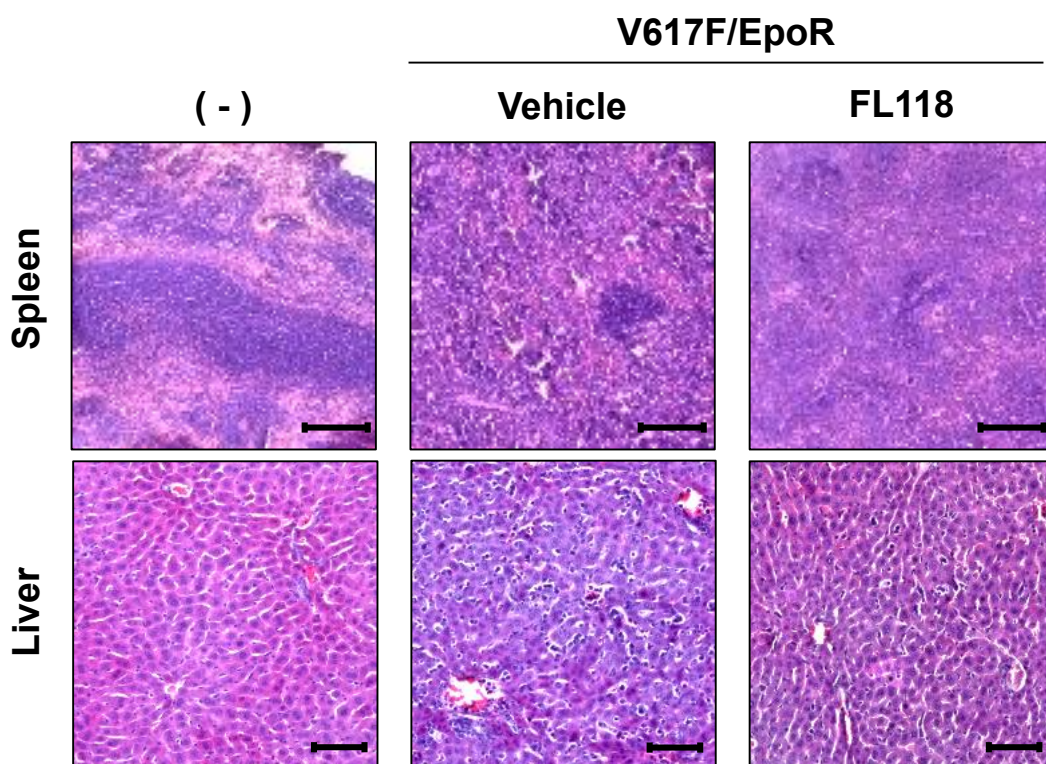


Fig. 37 JAK2V617Fによる脾臓、肝臓の組織構造の変化に及ぼすFL118の抑制効果
 コントロールの空ベクター発現Ba/F3細胞 (-) あるいはV617F/EpoR細胞 (1×10^7 cells) を4週齢雌のヌードマウスに皮下移植した。移植後5日、7日、9日目にvehicleまたはFL118 (2.5 mg/kg) を経口投与し、11日目に解剖した。(コントロール群はn=3, 他はn=6)。(A, B) 移植後15日に、脾臓や肝臓を摘出し、パラフィン切片を作製した。HE染色を行い、脾臓、肝臓の組織構造を観察した。(Scale bar=100 μ m)。

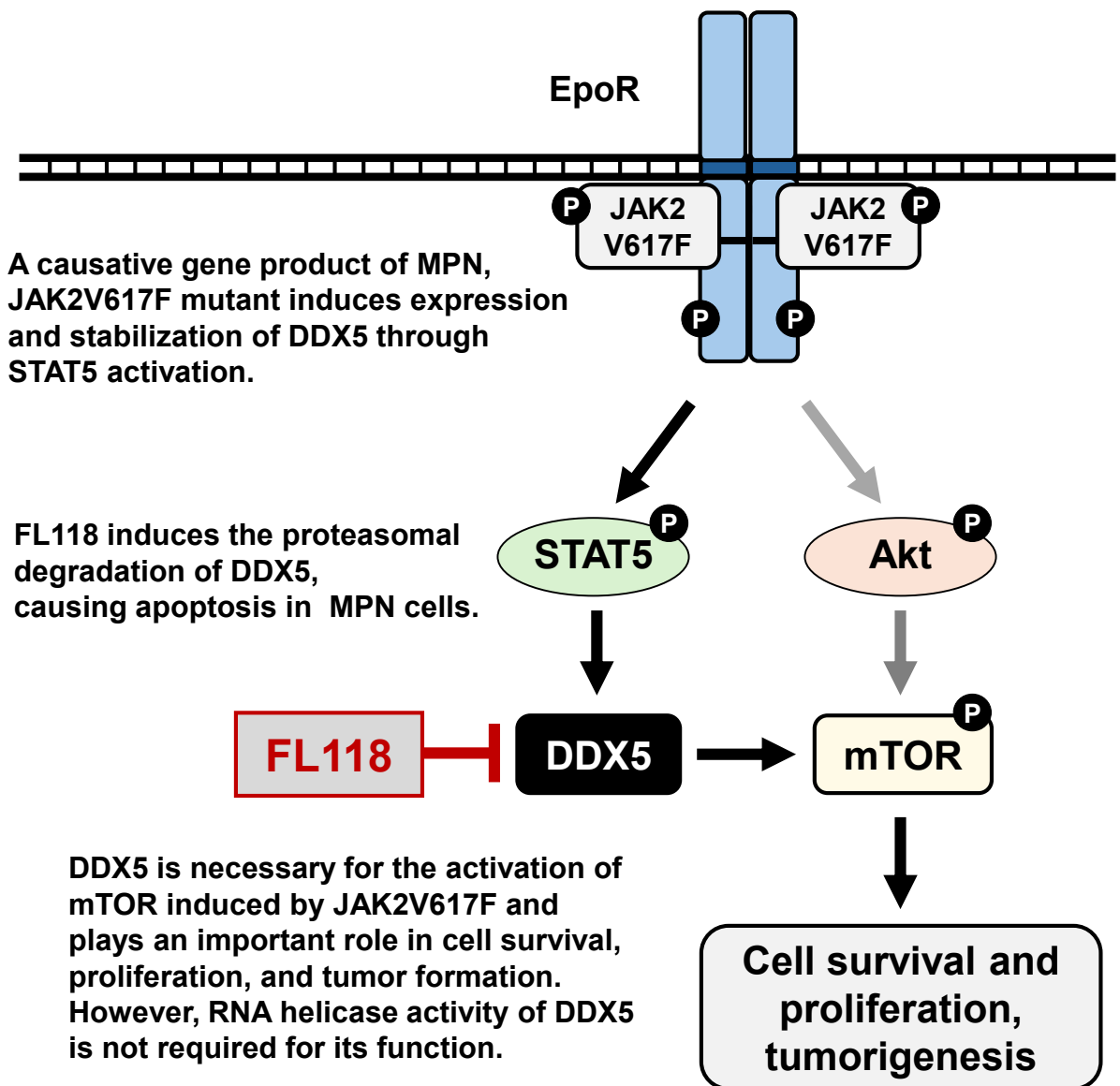


Fig. 38 FL118を用いたDDX5の分解誘導を介したMPN治療戦略の有用性

JAK2V617FによりSTAT5を介して発現が誘導されるDDX5は、mTORの活性化に必要であり、細胞増殖や腫瘍形成に重要な役割を果たす。しかし、そのDDX5の機能にRNAヘリカーゼ活性は必要ない。したがって、FL118によるDDX5のプロテアソーム分解誘導は、MPNの有効な治療戦略であると期待される。

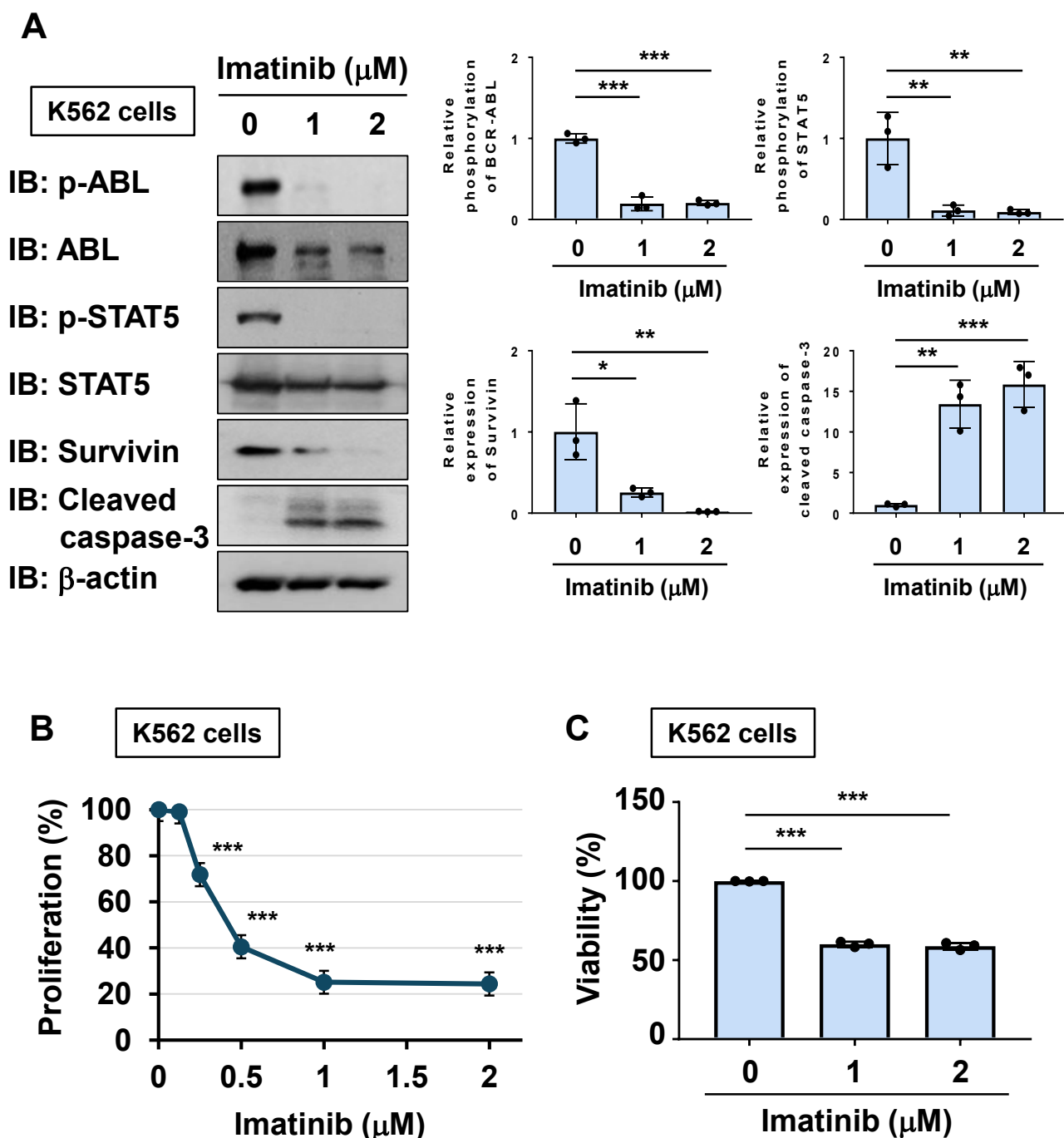
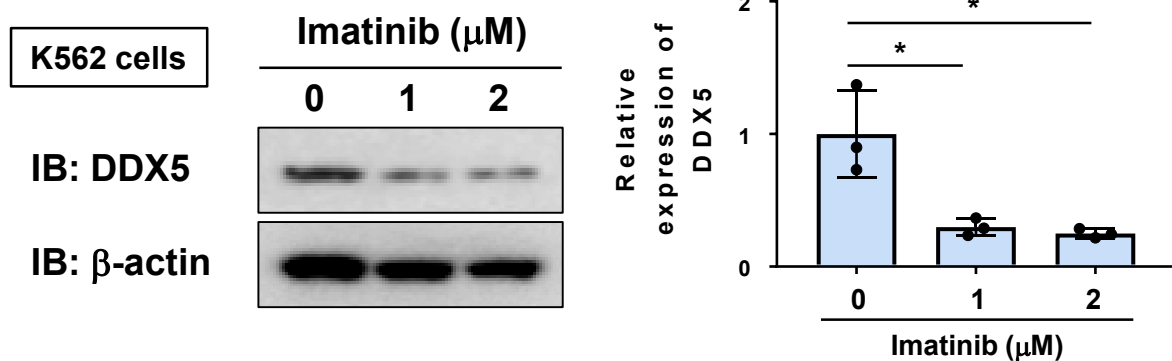


Fig. 39 K562細胞におけるImatinibによるBCR-ABL活性化の阻害

(A) K562細胞をImatinib (1, 2 μM) で24時間処理した。Immunoblottingにより、BCR-ABL、STAT5のリン酸化、Survivin の発現、caspase-3の断片化を検出した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.01$)。 (B) K562細胞をImatinib (0.125, 0.25, 0.5, 1および2 μM) で48時間処理した。WST assayにより 細胞増殖能を測定した (n=4、*** $p<0.01$ vs コントロール群)。 (C) K562細胞をImatinib (1, 2 μM) で48時間処理した。トリパンブルー染色法により 細胞生存率を測定した。 (n=3、*** $p<0.01$)。

A



B

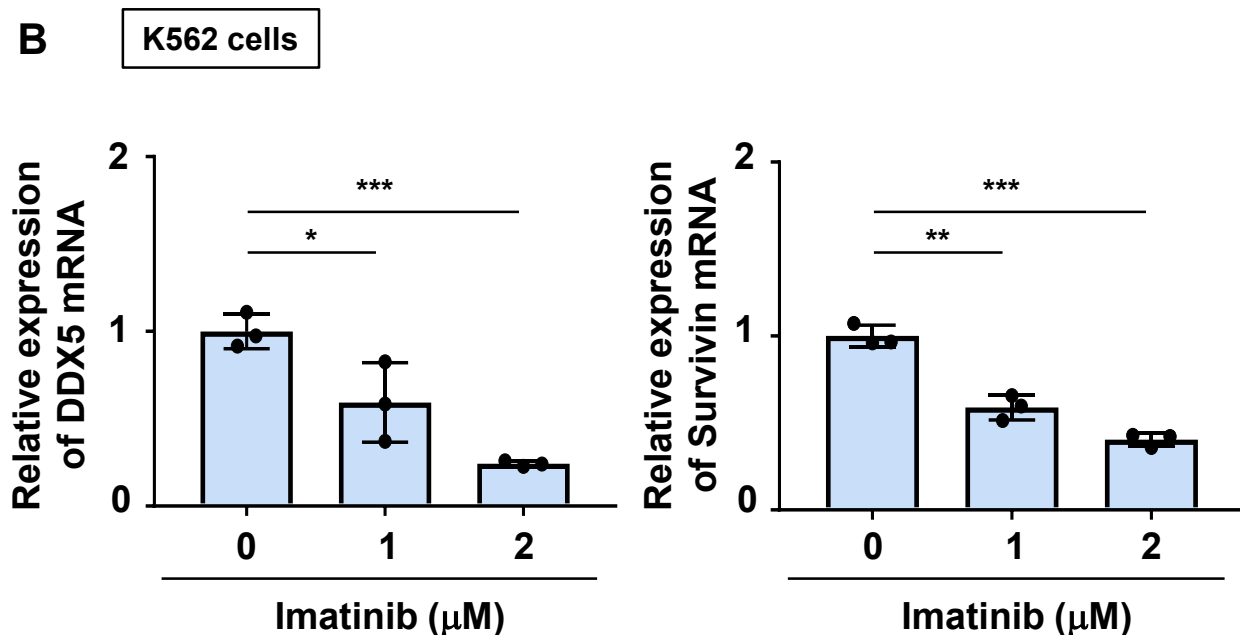


Fig. 40 K562細胞におけるImatinibによるDDX5の発現抑制

K562細胞をImatinib (1, 2 μ M) で24時間処理した。(A) ImmunoblottingによりDDX5、 β -actinの発現を検出した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05)。(B) DDX5 mRNA、Survivin mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。DDX5 mRNA、Survivin mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)。

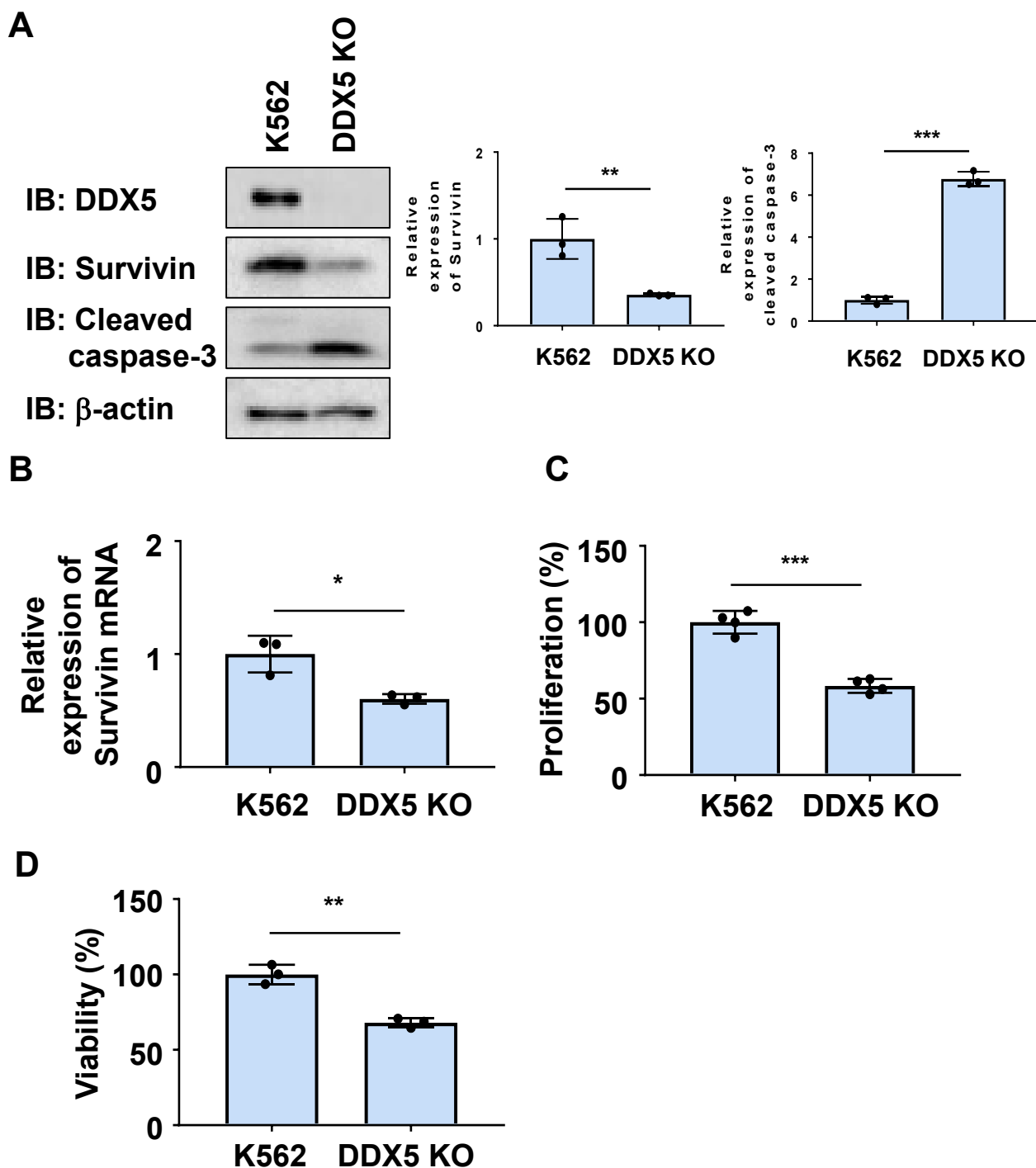
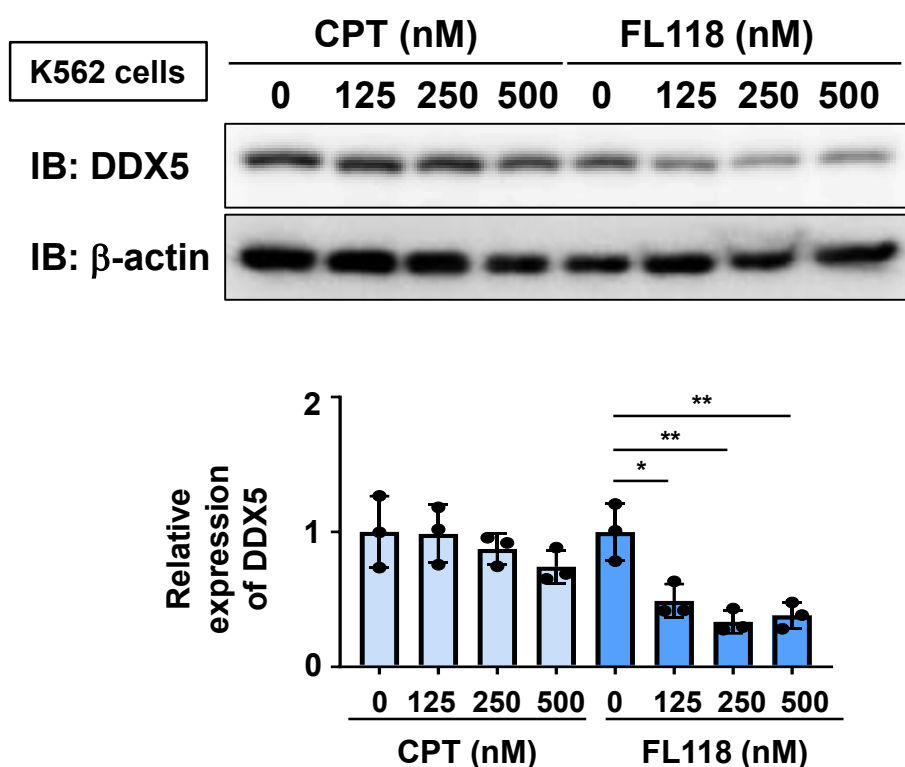


Fig. 41 K562細胞におけるDDX5のノックアウト

CRISPR-cas9システムを用いて、DDX5をノックアウトしたK562細胞（DDX5 KO細胞）を作製した。K562細胞、DDX5 KO細胞を1% FBS含有RPMI培地で24時間培養した。

(A) Immunoblottingにより、DDX5、Survivinの発現およびcaspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した ($n=3$, $**p<0.01$, $***p<0.001$)。 (B) RT-PCRにより、Survivin mRNAの発現量を検討した。Survivin mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した ($*p<0.05$)。 (C) WST assayにより細胞生存率を測定した ($n=4$, $***p<0.001$)。 (D) トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した ($**p<0.01$)。

A



B

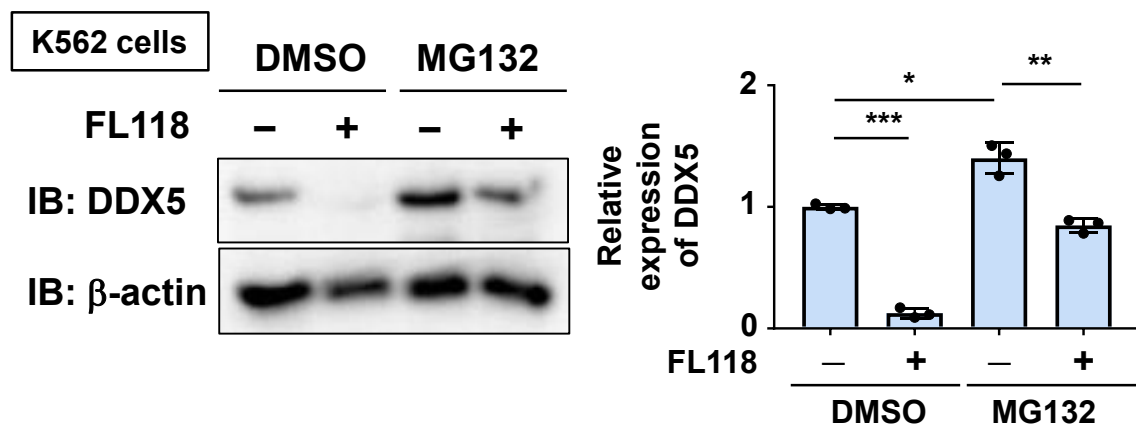


Fig. 42 K562細胞におけるFL118によるDDX5のプロテアソーム分解誘導

(A) K562細胞をCPTまたはFL118 (125, 250, 500nM) で24時間処理した。Immunoblottingにより、DDX5、β-actinの発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)。 (B) K562細胞をDMSO (0.1%) またはMG132 (5 μM) とFL118 (500 nM) で12時間処理した。Immunoblottingにより、DDX5、β-actinの発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001)。

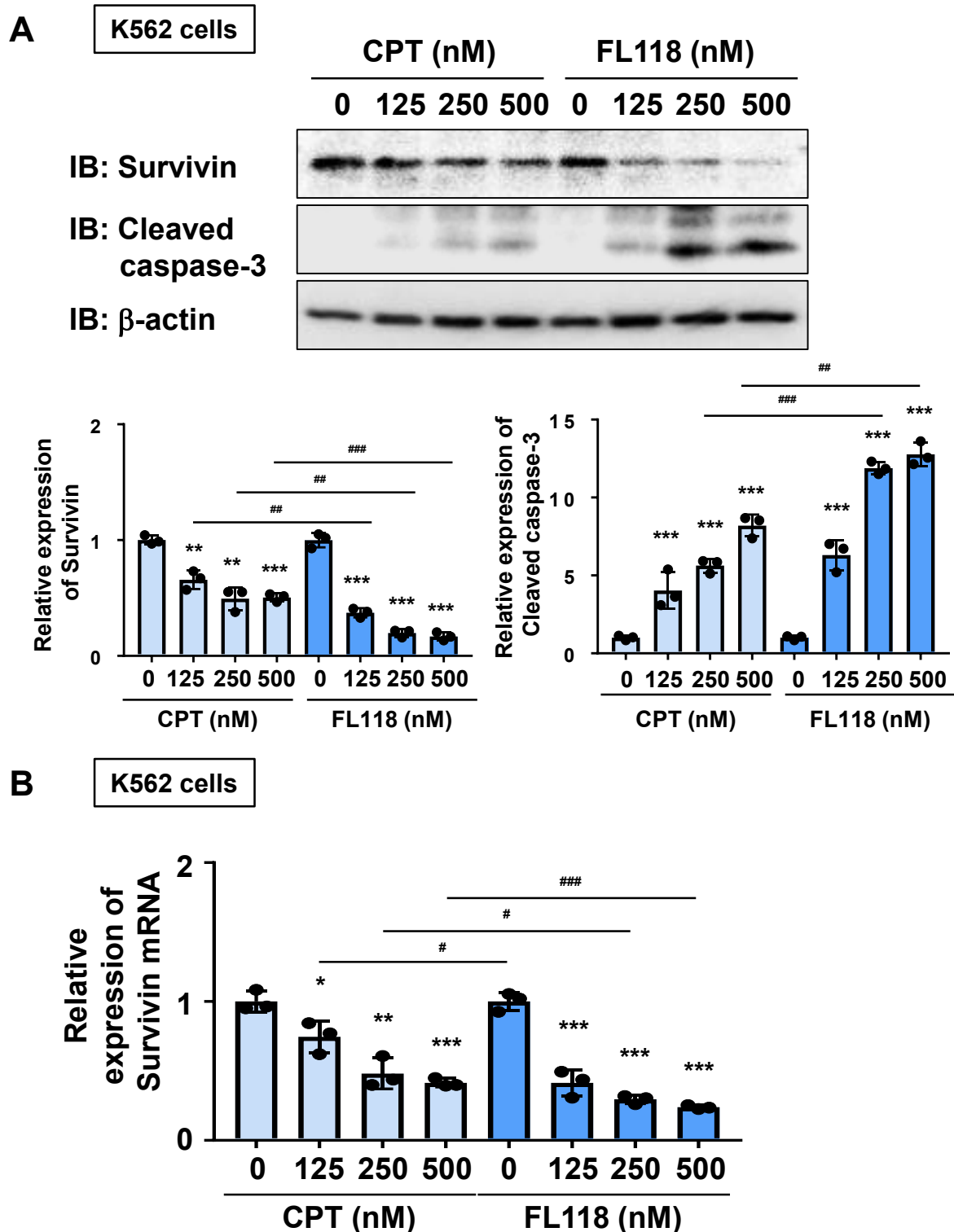


Fig. 43 K562細胞におけるSurvivinの発現、caspase-3の断片化に及ぼすCPT、FL118の影響

K562細胞をCPTまたはFL118 (125, 250, 500 nM) で24時間処理した。(A) Immunoblottingにより、Survivinの発現、caspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、**p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。(B) RT-PCRにより、Survivin mRNAの発現量を検討した。Survivin mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、#p<0.05, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

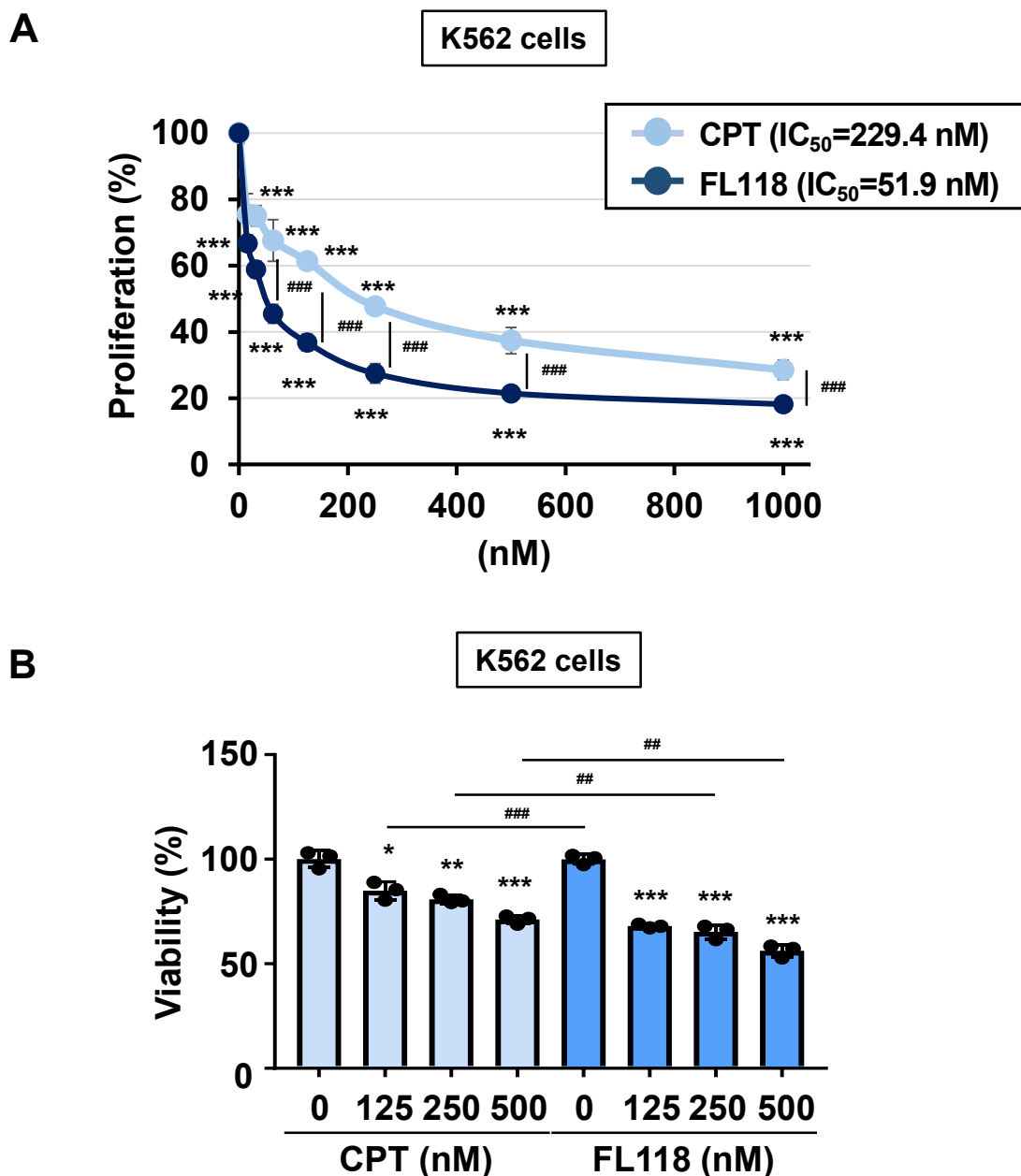


Fig. 44 K562細胞の増殖・生存に及ぼすCPT、FL118の影響

(A) K562細胞 (2×10^4 cells/100 μ L) をCPTまたはFL118 (15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000 nM) で48時間処理した。WST assayにより細胞増殖能を測定した ($n=4$, *** $p<0.001$ vs コントロール、#### $p<0.001$ vs CPT処理群)。(B) K562細胞をCPTまたはFL118 (125, 250, 500 nM) で48時間処理した。トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した ($n=3$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs コントロール群、## $p<0.01$, ### $p<0.001$ vs CPT処理群)。

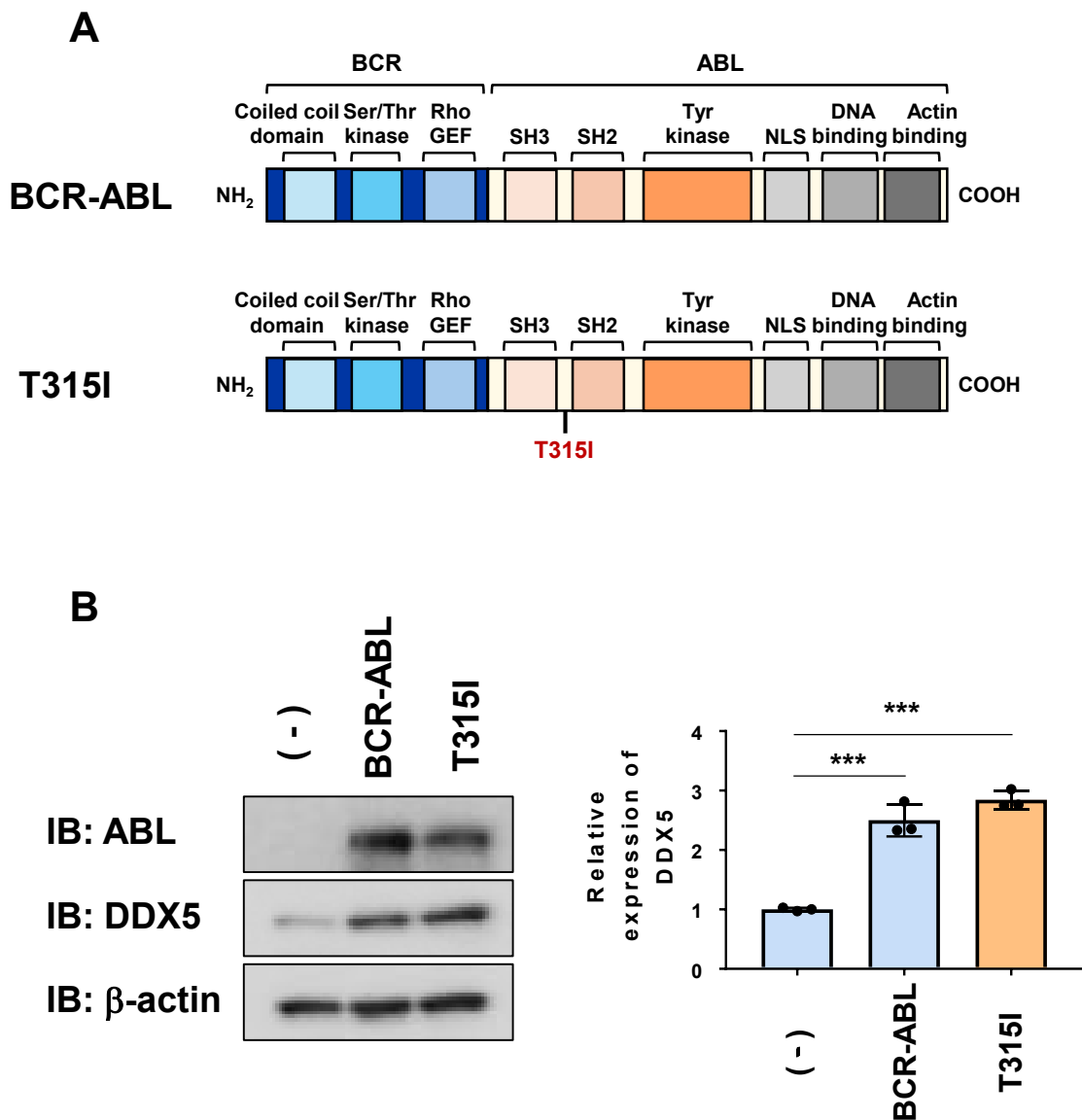


Fig. 45 BCR-ABL発現細胞およびT315I変異体発現細胞の作製

(A) BCR-ABLおよびT315I変異を有するBCR-ABLの構造を示した。(B) レトロウイルス感染により、Ba/F3細胞に空ベクター(-)、BCR-ABL、BCR-ABL T315I変異体を発現させた。Immunoblottingにより、BCR-ABLおよびDDX5の発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、***p<0.001)。

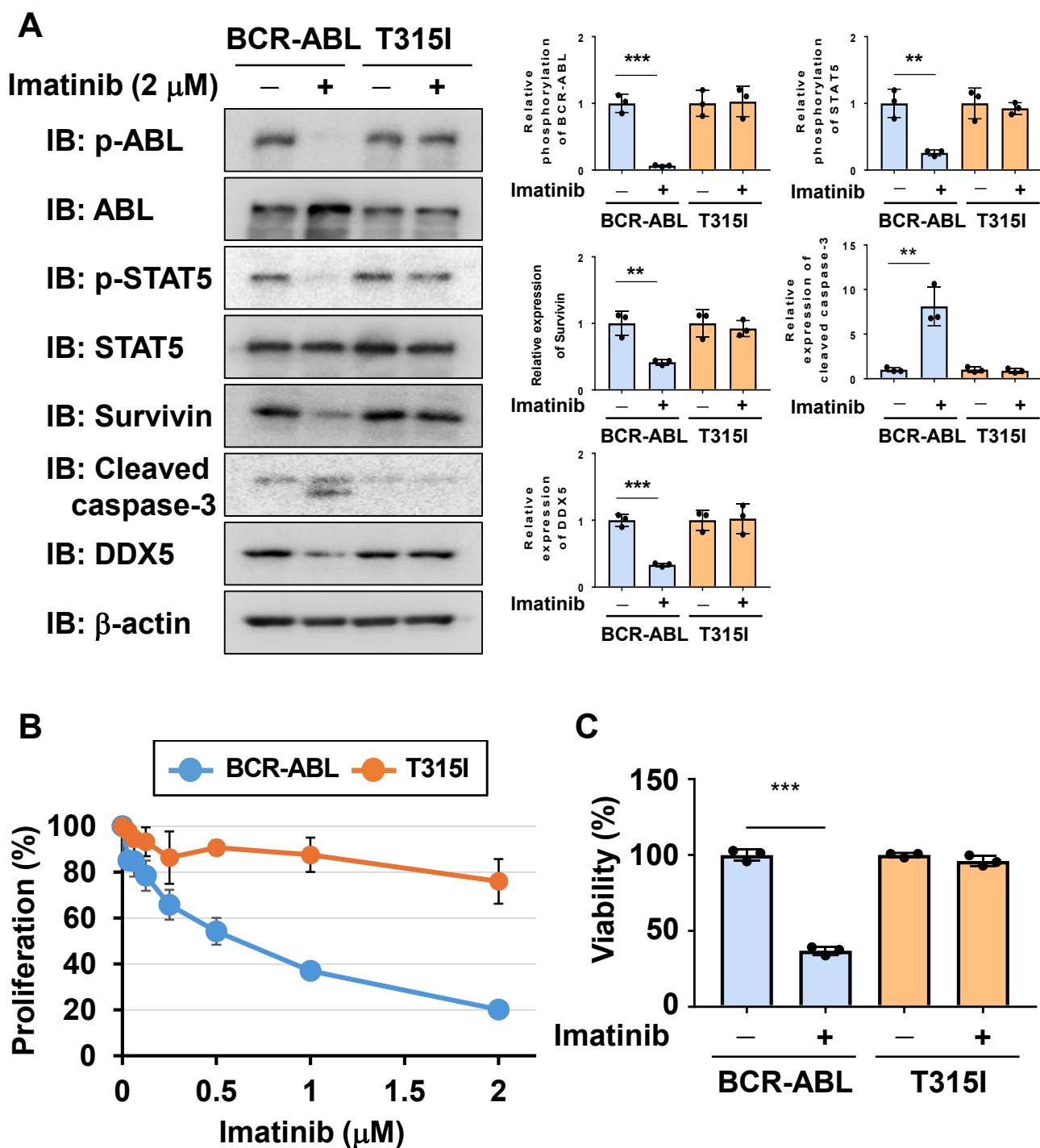


Fig. 46 BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびT315I発現Ba/F3細胞に対するImatinibの抗腫瘍活性

(A) BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびBCR-ABL T315I変異体発現Ba/F3細胞をImatinib (2 μ M) で24時間処理した。Immunoblottingにより、BCR-ABL、STAT5のリン酸化、Survivin、DDX5の発現、Caspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、**p<0.01、***p<0.001)。(B) BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびBCR-ABL T315I変異体発現Ba/F3細胞をImatinib (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M) で24時間処理した。WST assayにより細胞増殖能を測定した (n=4)。(C) BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびBCR-ABL T315I変異体発現Ba/F3細胞をImatinib (2 μ M) で18時間処理した。トリパンプブルー染色法により、細胞生存率を測定した (n=3、***p<0.001)。

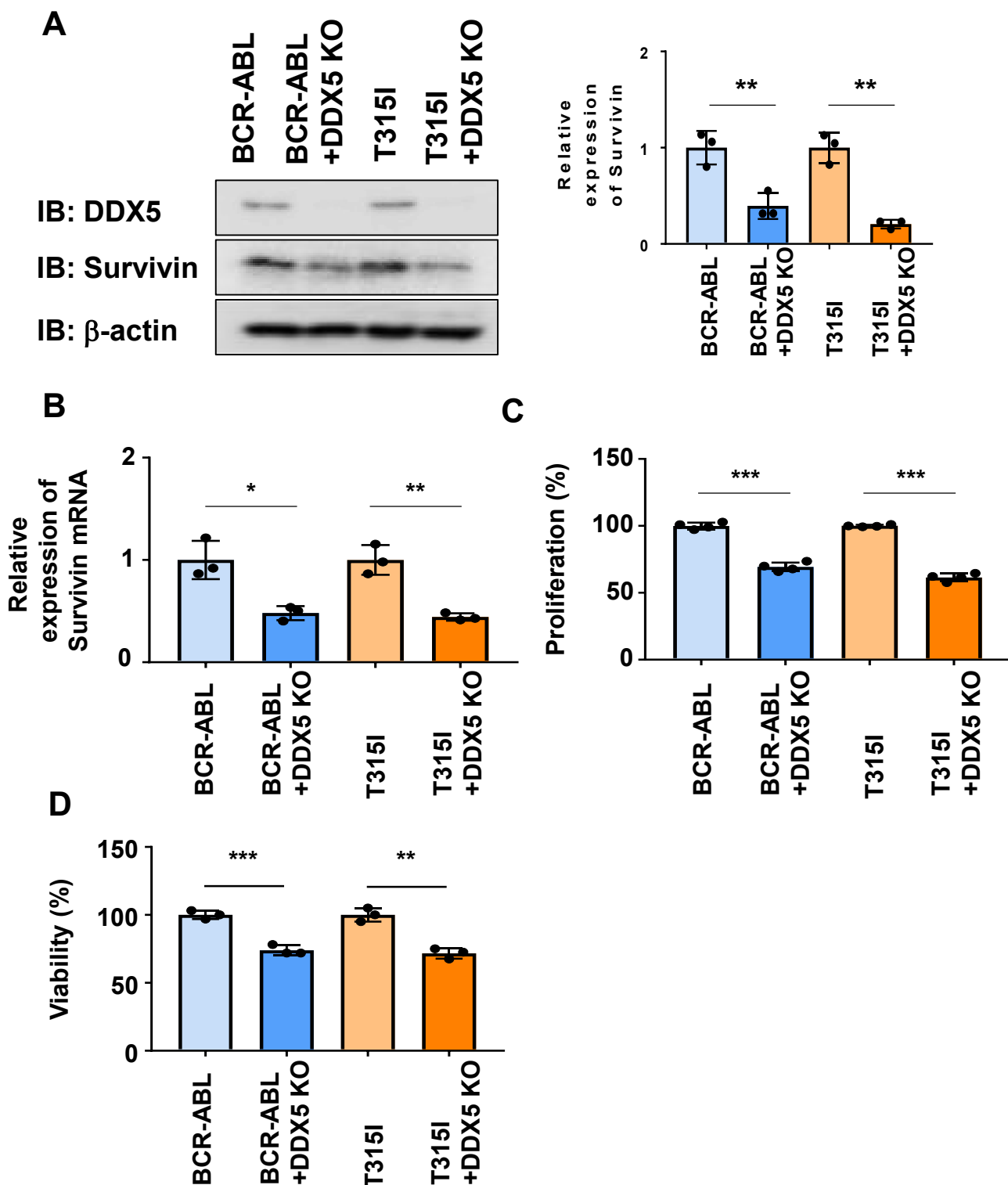


Fig. 47 BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびT315I変異体発現Ba/F3細胞の増殖・生存に及ぼすDDX5ノックアウトの影響

CRISPR-cas9システムを用いて、BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびBCR-ABL T315I変異体発現Ba/F3細胞においてDDX5をノックアウトした。(A) Immunoblottingにより、DDX5、Survivinの発現を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (** $p < 0.01$)。 (B) RT-PCRにより、Survivin mRNAの発現量を検討した。Survivin mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)。 (C) 各細胞を1%FBS含有RPMI培地で24時間培養した。WST assayにより細胞増殖能を測定した ($n = 4$, *** $p < 0.001$)。 (D) 各細胞を1%FBS含有RPMI培地で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測定した ($n = 3$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)。

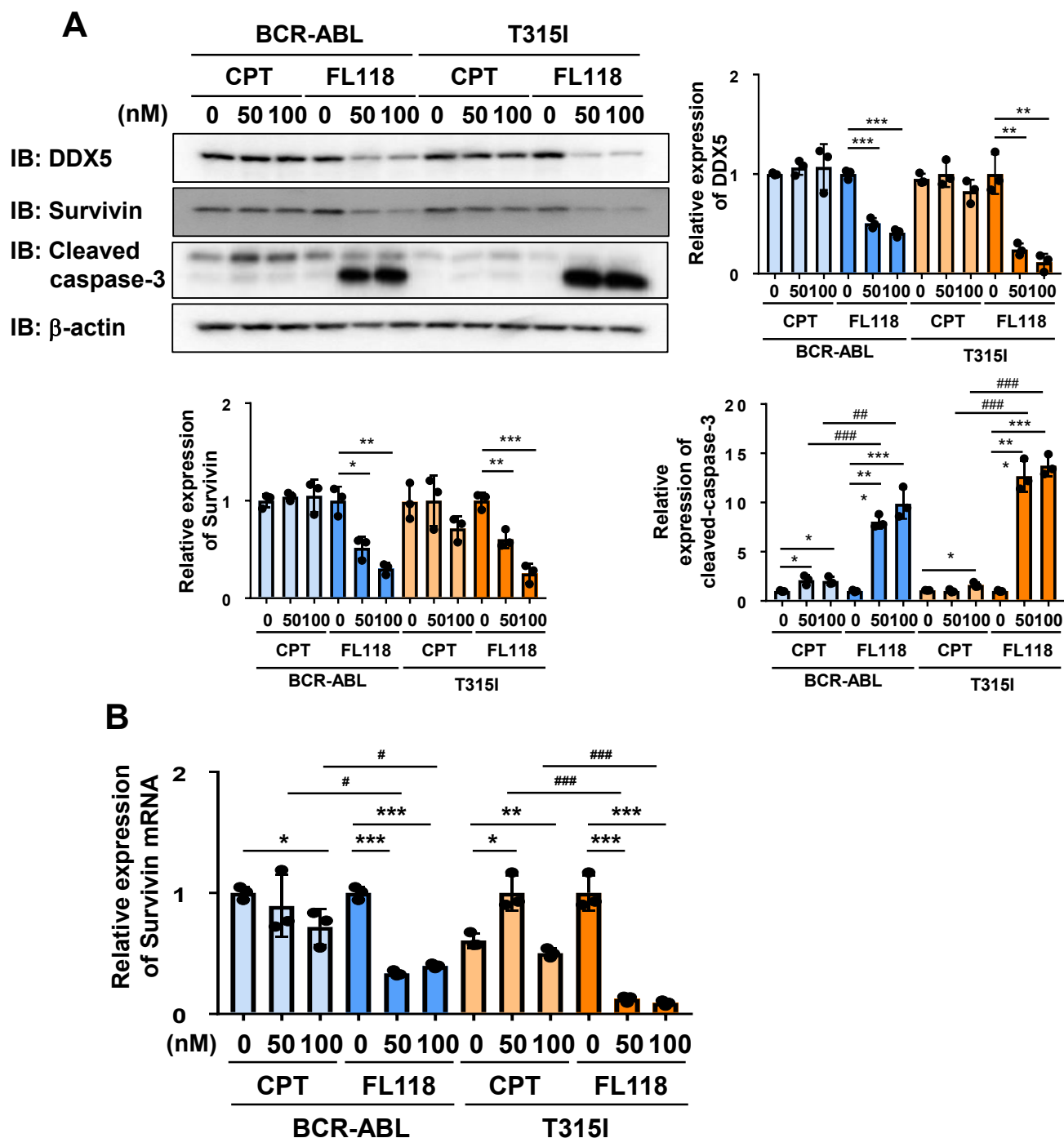


Fig. 48 BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびT315I変異体発現Ba/F3細胞におけるDDX5、Survivinの発現、Caspase-3の断片化に及ぼすCPT、FL118の影響
 BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびBCR-ABL T315I変異体発現Ba/F3細胞をCPT またはFL118 (50, 100 nM) で24時間処理した。(A) ImmunoblottingによりDDX5、Survivinの発現およびCaspase-3の断片化を検討した。各バンドをImage Jにより定量化した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、##p<0.01, ###p<0.001 vs CPT処理群)。(B) RT-PCRにより、Survivin mRNAの発現量をRT-PCRで検討した。Survivin mRNAの発現量は、 β_2 -microglobulinの発現量で補正し、算出した (n=3、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs コントロール群、#p<0.05, ###p<0.001 vs CPT処理群)。

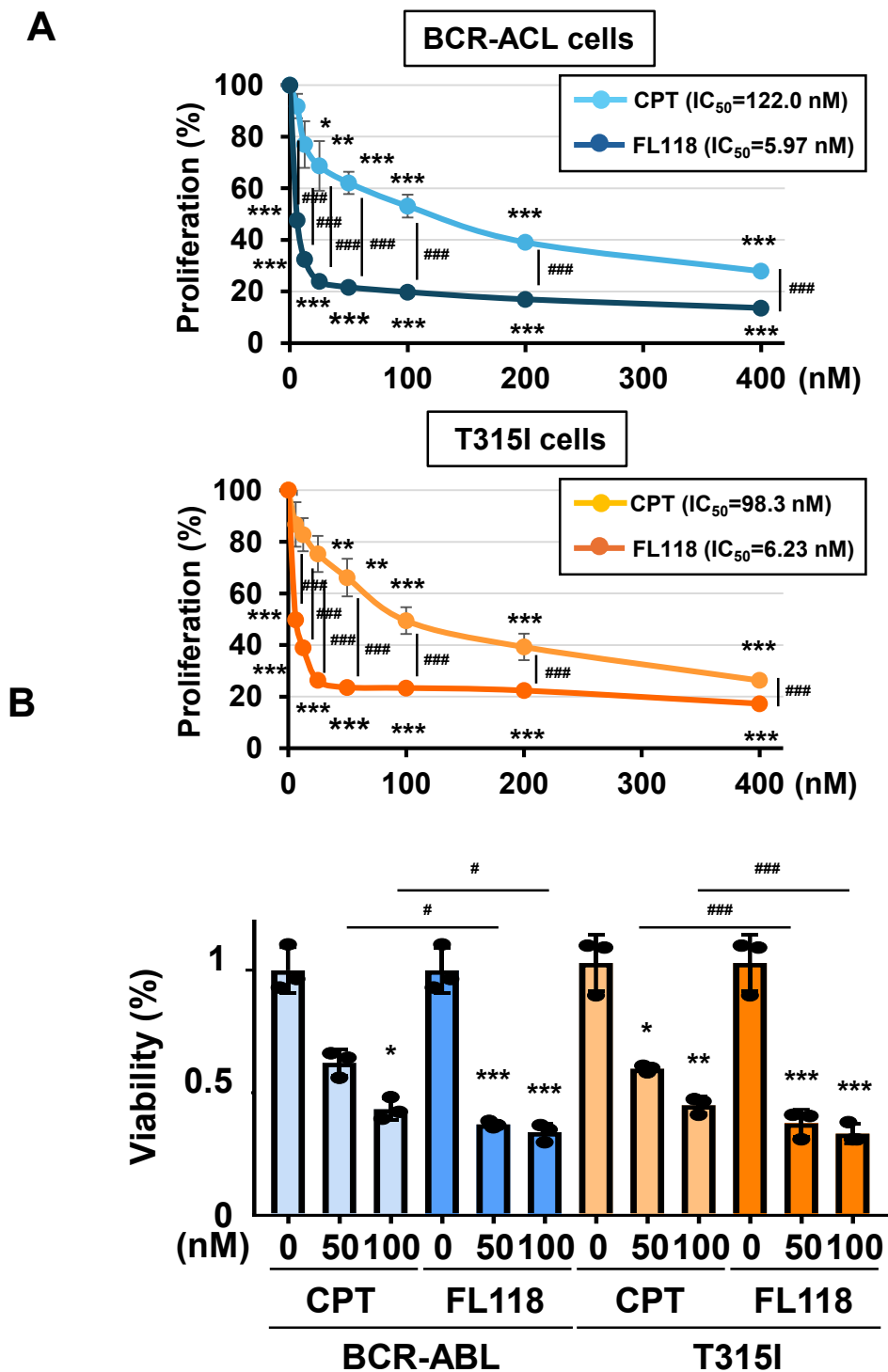


Fig. 49 BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびT315I変異体発現Ba/F3細胞の増殖・生存に及ぼすCPT、FL118の影響

(A) BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびBCR-ABL T315I変異体発現Ba/F3細胞をCPTまたはFL118 (6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 400 nM) で24時間処理した。WST assayにより細胞生存率を測定した (n=4、* $p<0.01$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs コントロール群、### $p<0.001$ vs CPT処理群)。(B) BCR-ABL発現Ba/F3細胞およびT315I変異体発現Ba/F3細胞をCPTまたはFL118 (50, 100 nM) で18時間処理した。トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した (n=3、* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ vs コントロール群、# $p<0.05$, ### $p<0.001$ vs CPT処理群)。

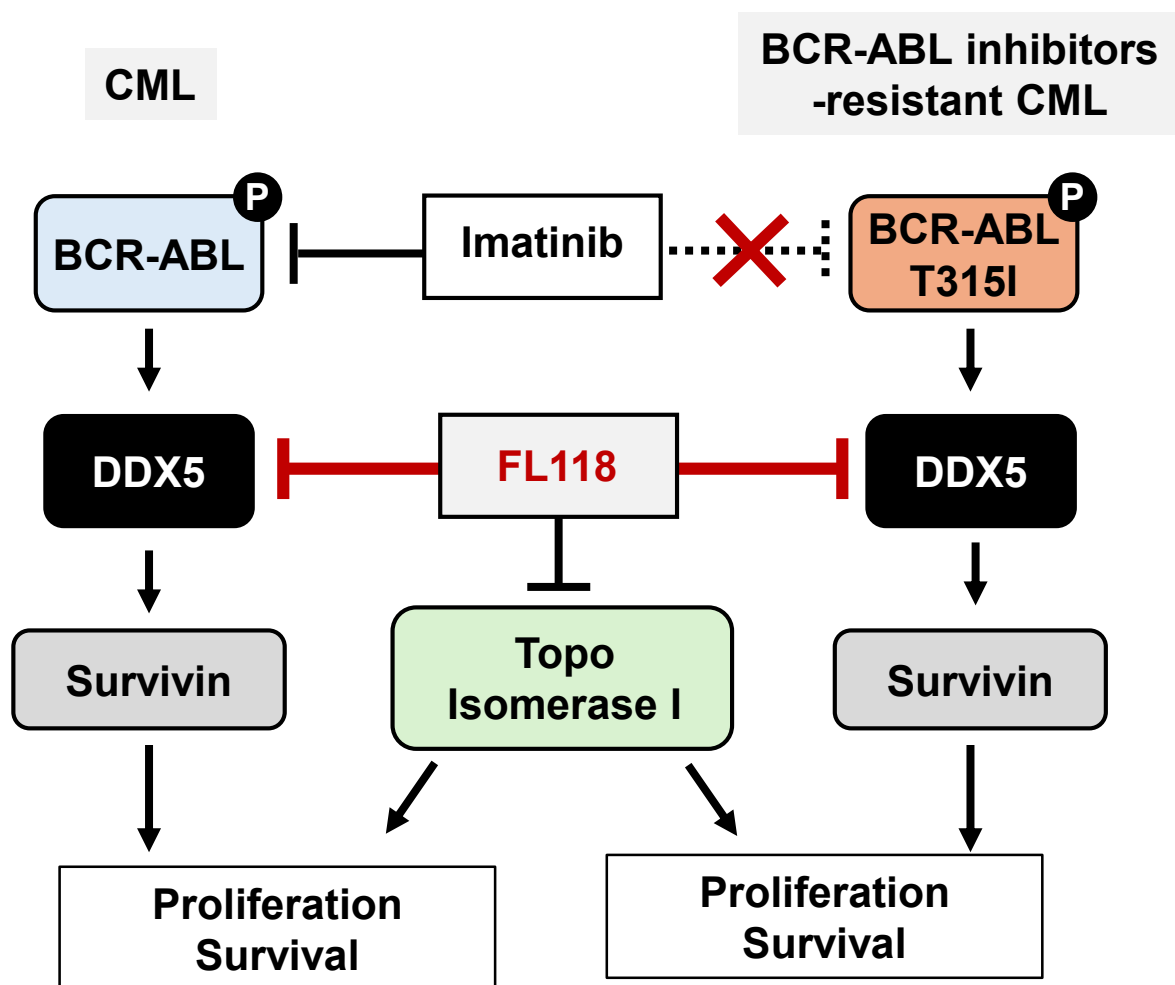


Fig. 50 BCR-ABL阻害剤に耐性を示すCMLに対するFL118を用いたDDX5の分解誘導による治療戦略の有用性

BCR-ABLは、DDX5の発現誘導を介して、抗アポトーシス因子Survivinの発現やCML細胞の増殖、生存を誘導する。T315I変異を有するBCR-ABLは、BCR-ABL阻害剤に対して耐性を示す。FL118はTopo I阻害活性に加えて、DDX5のプロテアソーム分解を誘導する活性を持ち、BCR-ABL T315I変異体を発現したCML細胞においてもアポトーシスを誘導する。したがって、FL118は、薬剤耐性を克服できる新たなCML治療薬となる可能性が示された。

第5章 考察

本研究では、第3章1部において、DDX5がMPNにおいても高発現していることを見出し、DDX5がMPNの病態形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。MPNの原因遺伝子産物であるJAK2V617FがDDX5 mRNAの発現を誘導すると共に、DDX5タンパク質の安定性を促進することにより、DDX5の発現を誘導することを見出した。また、DDX5はmTOR経路の活性化を介して、JAK2V617Fによる細胞増殖・腫瘍形成を誘導することを明らかにし、DDX5がMPNの新規治療標的候補分子であることを示した (Fig. 16)。

V617F/EpoR細胞およびHEL細胞におけるDDX5 mRNAの発現は、RuxolitinibおよびPimozideの処理により有意に抑制されたことから、DDX5 mRNAの発現にはJAK2V617FおよびSTAT5の活性が必要であることが示唆された (Fig. 2, 3, 6, 7)。しかし、JAK2V617FによるDDX5 mRNAの発現誘導機構は未だ不明である。DDX5遺伝子のプロモーター領域にはSTAT5 responsive elementsが存在しない。したがって、STAT5により発現が制御される他の転写因子を介して、DDX5の発現が誘導される可能性がある。DDX5遺伝子プロモーターには、CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α) やE2Fなどの転写因子の結合部位が存在する。C/EBP α は主に骨髄分化に関与しており、C/EBP α の遺伝子変異により、C/EBP α の活性化が阻害され、AMLの発症が誘導される [89]。しかし、これまでにC/EBP α とMPNとの関係はほとんど報告されていない。一方、E2Fは、細胞周期の制御とDNA合成に関与する転写因子であり、Cyclin dependent kinase 4/6 (CDK4/6) 複合体により活性化される。STAT5の活性化により、Cyclin Dの発現が上昇し、これがCDK4/6と結合して複合体を形成し、E2Fの活性化を誘導することが報告されている [90, 91]。したがって、JAK2V617F-STAT5経路とE2F経路のクロストークにより、DDX5 mRNAの発現が誘導される可能性がある。また、DDX5遺伝子の発現は、前駆脂肪細胞の3T3-L1細胞における脂肪生成誘導過程において、Ten-eleven

translocation methyl-cytosine dioxygenase 2 (TET2) を介したエピジェネティック制御を受けることが報告されている [92]。MPN 患者では、TET2 の欠失や不活性化の変異が認められるため、MPN では TET2 を介した DDX5 の発現制御機構が存在する可能性がある [93, 94]。今後、JAK2V617F が DDX5 の遺伝子発現を誘導するメカニズムを解明することで、MPN の発症機序の理解へと繋がることが期待される。

また、本研究では、V617F/EpoR 細胞および HEL 細胞において、Ruxolitinib および Pimozide による処理が DDX5 のプロテアソーム分解を誘導したことから、JAK2V617F は、STAT5 の活性化に依存して、DDX5 タンパク質の安定化を制御することが示唆された (Fig.4, 5, 8, 9)。しかし、JAK2V617F-STAT5 経路が DDX5 タンパク質の安定性を誘導する分子メカニズムは解明されていない。これまでに、long-non coding RNA (lncRNA) である NHEG1 が DDX5 に結合し、神経芽腫における DDX5 の分解を抑制することが報告されている [95]。lncRNA NEAT1 は、大腸がんで高発現しており、DDX5 と直接結合し、DDX5 の安定化を誘導することで、Wnt シグナル経路を活性化することが示された [71]。また、O-GlcNAc transferase (OGT) が DDX5 を O-GlcNAc 化することで、DDX5 の安定化が誘導されることが明らかになっている [96]。これまでに DDX5 のプロテアソーム分解を誘導する E3-ユビキチンリガーゼとして、Tripartite motif-containing protein 5 (Trim5) や Trim25 が同定されている [97, 98]。今後、V617F/EpoR 細胞や HEL 細胞において、lncRNA や OGT との相互作用が DDX5 の安定性に関与しているかどうかを明らかにすると共に、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導するユビキチンリガーゼを同定することが重要である。

第3章2部では、MPN における DDX5 を介した発がんシグナルの分子メカニズムを解明するために、shRNA により DDX5 の発現を抑制した V617F/EpoR 細胞に、野生型 DDX5 (WT) あるいは RNA ヘリカーゼ活性を欠損した DDX5 変異体 (K144N) を再構

成し、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。DDX5 のノックダウンにより、V617F/EpoR 細胞における mTOR 経路の活性化が抑制されるが、野生型 DDX5 (WT) だけでなく、DDX5 変異体 (K144N) の再構成により、DDX5 のノックダウンによる mTOR 経路の活性抑制や、細胞増殖の抑制は解除され、アポトーシス誘導は抑制された (Fig. 22A, B)。また、ヌードマウスを用いた細胞移植実験により、DDX5 のノックダウンによる JAK2V617F による腫瘍形成の抑制は、野生型 DDX5 (WT) および DDX5 変異体 (K144N) の再構成により回復することが観察された (Fig. 23-25)。したがって、DDX5 は JAK2V617F が示す発がん誘導能に不可欠であるが、その RNA ヘリカーゼ活性は必要でないことが明らかになった。さらに、*in vitro*、*in vivo* の実験の遂行を通して、DDX5 阻害剤 FL118 による DDX5 のプロテアソーム分解誘導が、MPN の治療に有効であることを示した (Fig. 38)。

DDX5 の ATP 依存的に二本鎖 RNA を一本鎖 RNA に乖離する RNA ヘリカーゼ活性は、mRNA の選択的スプライシングの制御をはじめとする RNA 代謝に必要である [65-67]。また、DDX5 は、RNA ヘリカーゼ活性依存的に、DNA の二本鎖切断やゲノムの不安定性の原因となる RNA:DNA Hybrid (R-loop) 構造を解消する [70]。さらに、DDX5 は、RNA ヘリカーゼ活性依存的に、 β -catenin や glucocorticoid receptor (GR) のコアクチベーターとして働き、これらの核内移行と転写活性化を誘導することが報告されている [99, 85]。一方、DDX5 は Nucleophosmin (NPM) と相互作用し、RNA ヘリカーゼ活性非依存的に 47S-pre rRNA の転写を誘導する [100]。また、DDX5 は RNA ヘリカーゼ活性非依存的に転写因子 AR、ER、Myoblast determination protein (MyoD) のコアクチベーターとして機能することが報告されている [73, 76, 101]。さらに、DDX5 と同じ RNA ヘリカーゼファミリーである DDX3 は、Wnt シグナル伝達において、RNA ヘリカーゼ活性非依存的に Casein kinase 1 (CK1) の制御因子として機能することが報告されている [102]。したがって、MPN において、DDX5 は足場タンパク質 (scaffolding protein) として機能

することにより、mTOR 経路の活性化を誘導し、JAK2V617F による細胞増殖や腫瘍形成に關与する可能性が示唆された。

Fig. 11, 13 において、DDX5 のノックダウンは、JAK2V617F、STAT5、ERK や Akt のリン酸化には影響を及ぼさず、mTOR のリン酸化のみを抑制することを示した。したがって、DDX5 は JAK2 V617F の下流で、mTOR の活性化に特異的に寄与することが示唆された。しかし、本研究では、DDX5 が RNA ヘリカーゼ活性とは独立してどのように mTOR 活性化に關与しているかは解明されていない。これまでに、胃がん細胞や前立腺がん細胞において、DDX5 の発現抑制が mTOR 経路を阻害することが報告されている [103, 104]。しかし、これらの研究においても、DDX5 の発現抑制が mTOR 経路を阻害する分子メカニズムは解明されていない。DDX5 は mTORC1 の阻害因子である Tuberous sclerosis complex (TSC) 1/2 複合体と相互作用し、TSC1/2 複合体を mTORC1 にリクルートして mTOR シグナルの活性化を抑制することが報告されている [105]。したがって、DDX5 は mTOR の活性を制御する分子群をリクルートする足場タンパク質として機能している可能性がある。

本研究で、*in vitro* における FL118 と CPT の Topo I 阻害活性は同程度であることを示した (Fig. 26)。これまでに、FL118 は、他の CPT 誘導体である SN-38 と比較して、Topo I 阻害活性は低い、Survivin の発現抑制を介して、がん抑制遺伝子産物 p53 の変異状態に關係なく、様々ながん細胞の増殖をより強力に阻害し、顕著なアポトーシスを誘導することが報告されている [82]。また、FL118 はヒト腫瘍異種移植モデルにおいて、他の Topo I 阻害剤である Irinotecan (SN-38) や Topotecan だけでなく、Topo II 阻害剤である Doxorubicin、プラチナ製剤である Cisplatin や Oxaliplatin、微小管阻害剤である Docetaxel、DNA 合成阻害剤である Gemcitabine や 5-FU、アルキル化剤である Cytosan などの抗がん剤と比較して、優れた抗腫瘍活性を示すことが知られている。さらに FL118 は、Irinotecan (SN-38) や Topotecan に耐性を示すヒト腫瘍異種移植モデルに対し

ても、高い抗腫瘍活性を示す [82, 106]。FL118 は、V617F/EpoR 細胞、HEL 細胞において、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導し、mTOR 経路の活性化を抑制したが、同濃度の CPT にはこれらの活性は認められなかった (Fig. 27, 30, 31, 34)。さらに、FL118 は、同濃度の CPT と比較して、V617F/EpoR 細胞、HEL 細胞の増殖を有意に抑制し、アポトーシスを誘導した (Fig. 27-29, 31-33)。したがって、FL118 は Topo I 阻害活性に加えて、特異的に DDX5 の分解を誘導する活性により、高い抗腫瘍活性を示すことが示唆された。また、FL118 を投与したヌードマウスでは、体重減少を認めずに、JAK2 V617F による腫瘍形成、脾臓・肝臓の肥大化が有意に抑制されたことから (Fig. 35-37)、FL118 は MPN に対する有効な治療薬となりうると期待される。

現在までに、Ruxolitinib に加えて、Fedratinib、Pacritinib などの JAK2 阻害薬が開発され、高リスクの MPN 患者に適用されている [31-34, 107, 108]。これらの JAK2 阻害剤は、赤血球の過剰増殖、脾腫形成を抑制し、MPN の症状を改善するが、MPN の完治へと導く奏功性の高い薬剤ではない。MPN では、変異を獲得した造血幹細胞がクローン性に増殖するが、これらの造血幹細胞は静止状態にあり、JAK2 阻害剤に対して抵抗性を示すためである [109, 110]。また、がん細胞は、薬剤排出ポンプである ATP-binding cassette transporter subfamily G, member 2 (ABCG2) が抗がん剤を細胞外に排出することで薬剤耐性を獲得する。SN-38 は ABCG2 による薬剤排出を受けるが、FL118 は ABCG2 の薬物排出を受けにくい性質を持ち、それにより、ABCG2 が機能する結腸がん細胞や肺がん細胞に対しても高い抗腫瘍活性を示すことが報告されている [111]。さらに、FL118 は、がん幹細胞マーカーである Aldehyde dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1)、Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) や薬剤耐性タンパク質 P-glycoprotein (P-gp)、Excision repair cross-complementation group 1 (ERCC1) の発現を低下させる活性があり、肺がん幹細胞に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている [112]。したがって、FL118 はがん幹細胞に対しても抗腫瘍活性を示すと期待され、MPN 治療薬として有効であると示

唆される。今後は、JAK2 V617F のトランスジェニックマウスやノックインマウスを用いた FL118 投与の影響を検証し、赤血球や血小板などの血球増加や骨髄線維化などの MPN 症状の改善効果が認められるかを検討する必要がある。

第3章3部では、CML において、DDX5 は、BCR-ABL の活性に依存して発現が誘導され、CML 細胞の増殖、生存に必須の役割を果たすことを明らかにした (Fig. 39, 40, 45, 46)。また、DDX5 のノックアウトや FL118 を用いた DDX5 の分解誘導は、K562 細胞や BCR-ABL を発現した Ba/F3 細胞だけでなく、BCR-ABL 阻害剤に耐性を示す BCR-ABL T315I 変異体を発現した Ba/F3 細胞においても、増殖能を抑制し、アポトーシスを誘導することを見出した (Fig. 43, 44, 48, 49)。以上の研究を通して、FL118 による DDX5 を標的とした治療戦略が薬剤耐性を獲得した CML の治療に有効である可能性を示した (Fig.50)。

STAT5 は JAK2 だけでなく、BCR-ABL の基質でもある [43-45]。よって、Fig. 1-9 で示したように、BCR-ABL の下流においても、STAT5 の活性化を介して、DDX5 mRNA の発現が誘導されるだけでなく、DDX5 タンパク質の安定化が促進されることにより、DDX5 が高発現している可能性が高い。Yang らは、肺がん、大腸がん、肝臓がん、乳がん、子宮頸がん細胞および K562 細胞において、DDX5 の Y593 がリン酸化されることを報告した [99]。さらに、platelet derived growth factor (PDGF) により、c-ABL を介して DDX5 の Y593 がリン酸化されることで、Wnt シグナル経路非依存的に転写因子 β -catenin の核移行が促進され、上皮間葉転換 (EMT) が誘導されることが報告されている [113]。したがって、BCR-ABL が DDX5 Y593 のリン酸化を誘導する可能性が考えられるが、本研究では、BCR-ABL の下流における DDX5 Y593 のリン酸化状態を明らかにできていない。現在、K562 細胞において、DDX5 のノックアウトにより、STAT5 のリン酸化が抑制されることを観察している。Survivin は、STAT5 の標的遺伝子の一つであること

が報告されているため、K562 細胞では、DDX5 のノックダウンにより STAT5 の活性化が阻害され、Survivin mRNA の発現が低下した可能性がある。DDX5 のノックダウンは、JAK2V617F による STAT5 のリン酸化に影響を及ぼさなかったことから (Fig. 11, 13)、JAK2V617F と BCR-ABL の発がん誘導シグナルにおける DDX5 の機能は異なる可能性がある。今後、BCR-ABL の下流シグナル経路の活性化における DDX5 の Y593 のリン酸化の生理的意義、および DDX5 が STAT5 やその他のシグナル経路の活性化に及ぼす影響を明らかにすることで、CML における DDX5 の機能解明に繋がると期待される。

K562 細胞において、CPT は DDX5 の発現に影響を及ぼさなかった。一方、FL118 は DDX5 のプロテアソーム分解を誘導し、CPT よりも低濃度でこれらの細胞の増殖を抑制し、生存率を低下させた。これまでの研究から、JAK2V617F による細胞増殖や腫瘍形成には DDX5 が必須であるが、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 (Fig. 17-25)。しかし、BCR-ABL による細胞増殖や生存における DDX5 の RNA ヘリカーゼの必要性は不明である。FL118 は DDX5 の活性を阻害するのではなく、DDX5 の発現を抑制する DDX5 阻害剤である。したがって、BCR-ABL による発がんシグナルにおいて、DDX5 の RNA ヘリカーゼが必要でない場合においても、FL118 は高い抗腫瘍活性を示す有力な CML 治療薬となることが期待される。

現在、CML 治療において、BCR-ABL 阻害剤に対する薬剤耐性の獲得が問題となっている [54-59]。BCR-ABL 阻害剤に対する耐性の獲得には、多くの分子メカニズムが関与している。Hochhaus らは、66 人の Imatinib 抵抗性 CML 患者に対して、BCR-ABL 遺伝子の発現量、BCR-ABL のゲノム増幅、その他の遺伝子変異、BCR-ABL チロシンキナーゼドメインの変異を評価した [114]。その結果、Imatinib 抵抗性 CML 患者の 12%では、BCR-ABL 遺伝子の発現量が 10 倍以上上昇しており、6%で BCR-ABL のゲノム増幅が観察された。Imatinib 抵抗性 CML 患者の 53%では、BCR-ABL 以外の遺伝子変異が観察され、35%では、BCR-ABL のキナーゼドメインに点突然変異が検出された。BCR-ABL

の T315I 変異の出現は、CML 治療の最大の問題であり、Imatinib だけでなく、第二世代の Nilotinib や Dasatinib にも耐性を示す。新規の BCR-ABL 阻害剤として開発された Asciminib は、既存の BCR-ABL 阻害薬と異なり、ABL のミリストイルポケットに結合してキナーゼ活性をアロステリックに阻害するため、BCR-ABL T315I 変異体に対しても有効である [63, 64]。このように、BCR-ABL 阻害剤に対する耐性を克服するための治療薬開発は進展しているが、BCR-ABL を標的としている限り、CML 細胞における新規 BCR-ABL 阻害剤に対して耐性を獲得する変異がさらに出現する可能性は避けられない。したがって、BCR-ABL 以外の CML 治療に有効な標的分子の同定は重要である。

本研究では、K562 細胞や BCR-ABL 発現 Ba/F3 細胞だけでなく、BCR-ABL T315I 変異体発現 Ba/F3 細胞においても、DDX5 のノックアウトや FL118 による DDX5 の分解が、増殖抑制やアポトーシスを誘導することを示した。本研究により、DDX5 を標的とする治療は、薬剤耐性を示す CML に対する有効な治療戦略となる可能性が示唆された。今後、CML や薬剤耐性を獲得した CML のモデルマウスを用いて、*in vivo* における FL118 の抗腫瘍活性を検討することが必要である。

第6章 結語

本研究では、DDX5 は、JAK2V617F や BCR-ABL により発現が誘導され、mTOR 経路の活性化を介して、MPN の病態形成に寄与することが示された。しかし、DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性は、JAK2V617F による発がん誘導に必要でないことも明らかになった。さらに、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導する FL118 は、Ph 陰性 MPN 細胞や BCR-ABL 阻害剤に耐性を示す CML 細胞に対して高い抗腫瘍活性を示すことが確認された。これらの結果より、DDX5 は MPN 治療標的分子であり、FL118 を用いた DDX5 の分解誘導による MPN 治療の有効性が期待される。

第 7 章 参考文献

- [1] Paz D Luque., R Kralovics., RC Skoda., Genetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms. *Blood*.2023;141:1909-1921. doi:10.1182/blood.2022017578.
- [2] Padda J., Khalid K., Yadav J., Almanie A.H., Mehta K.A., Al Hennawi H., Boddeti N.L., Campos V.Y.M., Jean-Charles G., JAK2 and TET2 Mutation in Polycythemia Vera. *Cureus*. 2021;13:e17854. doi: doi:10.7759/cureus.17854.
- [3] Lundberg P., Karow A., Nienhold R., Looser R., Hao-Shen H., Nissen I., Girsberger S., Lehmann T., Passweg J., Stern M., Beisel C., Kralovics R., Skoda R.C., Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2014;123:2220-2228. doi:10.1182/blood-2013-11-537167.
- [4] Arber D.A., Orazi A., Hasserjian R., Thiele J., Borowitz M.J., Le Beau M.M., Bloomfield C.D., Cazzola M., Vardiman J.W. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127:2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
- [5] Kralovics R., Passamonti F., Buser A.S., Teo S.S., Tiedt R., Passweg J.R., Tichelli A., Cazzola M., Skoda R.C. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352:1779-1790. doi: 10.1056/NEJMoa051113.
- [6] James C., Ugo V., Le Couédic J.P., Staerk J., Delhommeau F, Lacout C, Garçon 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. doi: 10.1038/nature03546.
- [7] Edahiro Y., Morishita S., Takahashi K., Hironaka Y., Yahata Y., Sunami Y., Shirane S., Tsutsui M., Noguchi M., Koike M., Imai K., Kirito K., Noda N., Sekiguchi Y., Tsuneda S., Ohsaka A., Araki M., Komatsu N. JAK2V617F mutation status and allele burden in classical Ph-negative myeloproliferative neoplasms in Japan. *Int J Hematol*. 2014;99:625-634.
- [8] Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Yi T., Tang B., Miura O., Ihle J.N. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993;74:227-236. doi: 10.1016/0092-8674(93)90414-1.
- [9] Drachman J.G., Griffin J.D., Kaushansky K. The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J Biol Chem*. 1995;270:4979-4982. doi:

10.1074/jbc.270.10.4979.

- [10] He K., Wang X., Jiang J., Guan R., Bernstein K.E., Sayeski P.P., Frank S.J. Janus kinase 2 determinants for growth hormone receptor association, surface assembly, and signaling. *Mol Endocrinol.* 2003;17:2211-2227. doi: 10.1210/me.2003-0256.
- [11] Saharinen P., Takaluoma K., Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain. *Mol Cell Biol.* 2000;20:3387-3395. doi: 10.1128/MCB.20.10.3387-3395.2000.
- [12] Ishida-Takahashi R., Rosario F., Gong Y., Kopp K., Stancheva Z., Chen X., Feener E.P., Myers M.G. Jr. Phosphorylation of Jak2 on Ser(523) inhibits Jak2-dependent leptin receptor signaling. *Mol Cell Biol.* 2006;26:4063-4073. doi: 10.1128/MCB.01589-05. Erratum in: *Mol Cell Biol.* 2006;26:6309.
- [13] Zhao L., Dong H., Zhang C.C., Kinch L., Osawa M., Iacovino M., Grishin N.V., Kyba M., Huang L.J. A JAK2 interdomain linker relays Epo receptor engagement signals to kinase activation. *J Biol Chem.* 2009;284:26988-98. doi: 10.1074/jbc.M109.011387.
- [14] Shan Y., Gnanasambandan K., Ungureanu D., Kim E.T., Hammarén H., Yamashita K., Silvennoinen O., Shaw D.E., Hubbard S.R. Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21:579-584. doi: 10.1038/nsmb.2849.
- [15] Feng J., Witthuhn B.A., Matsuda T., Kohlhuber F., Kerr I.M., Ihle J.N. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol.* 1997;17:2497-2501. doi: 10.1128/MCB.17.5.2497.
- [16] Damen J.E., Liu L., Wakao H., Miyajima A., Rosten P., Jefferson A.B., Majerus P.W., Krosi J., Humphries R.K., Krystal G. The role of erythropoietin receptor tyrosine phosphorylation in erythropoietin-induced proliferation. *Leukemia.* 1997;11 Suppl 3:423-425.
- [17] Drachman J.G., Kaushansky K. Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2350-2355. doi: 10.1073/pnas.94.6.2350.
- [18] 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;278:40702-40709. doi: 10.1074/jbc.M307182200.
- [19] 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;94:3016-3021. doi: 10.1073/pnas.94.7.3016.

- [20] Bouscary D., Pene F., Claessens Y.E., Muller O., Chrétien S., Fontenay-Roupie M., Gisselbrecht S., Mayeux P., Lacombe C. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood*. 2003;101:3436-3443. doi: 10.1182/blood-2002-07-2332.
- [21] Rouyez M.C., Boucheron C., Gisselbrecht S., Dusanter-Fourt I., Porteu F. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 1997;17:4991-5000. doi: 10.1128/MCB.17.9.4991.
- [22] 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;20:2197-2204. doi: 10.1038/sj.onc.1204317.
- [23] Garami A., Zwartkuis F.J., Nobukuni T., Joaquin M., Roccio M., Stocker H., Kozma S.C., Hafen E., Bos J.L., Thomas G. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Mol Cell*. 2003;11:1457-1466. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00220-x.
- [24] Fingar D.C., Richardson C.J., Tee A.R., Cheatham L., Tsou C., Blenis J. mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol*. 2004;24:200-216. doi: 10.1128/MCB.24.1.200-216.2004.
- [25] Gan X., Wang J., Su B., Wu D. Evidence for direct activation of mTORC2 kinase activity by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem*. 2011;286:10998-11002. doi: 10.1074/jbc.M110.195016.
- [26] 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;285:5296-5307. doi: 10.1074/jbc.M109.040733.
- [27] Akada H., Yan D., Zou H., Fiering S., Hutchison R.E., Mohi M.G. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. *Blood*. 2010;115:3589-3597. doi: 10.1182/blood-2009-04-215848.
- [28] Mullally A., Lane S.W., Ball B., Megerdichian C., Okabe R., Al-Shahrour F., Paktinat M., Haydu J.E., Housman E., Lord A.M., Wernig G., Kharas M.G., Mercher T., Kutok J.L., Gilliland D.G., Ebert B.L. Physiological Jak2V617F expression causes a lethal myeloproliferative neoplasm with differential effects on hematopoietic stem and progenitor cells. *Cancer Cell*. 2010;17:584-596. doi: 10.1016/j.ccr.2010.05.015.
- [29] Fruchtmann S.M., Mack K., Kaplan M.E., Peterson P., Berk P.D., Wasserman L.R. From efficacy

- to safety: a Polycythemia Vera Study group report on hydroxyurea in patients with polycythemia vera. *Semin Hematol.* 1997;34:17-23.
- [30] Cortelazzo S., Finazzi G., Ruggeri M., Vestri O., Galli M., Rodeghiero F., Barbui T. Hydroxyurea for patients with essential thrombocythemia and a high risk of thrombosis. *N Engl J Med.* 1995;332:1132-1136. doi: 10.1056/NEJM199504273321704.
- [31] Quintás-Cardama A., Vaddi K., Liu P., Manshour T., Li J., Scherle P.A., Caulder E., Wen X., Li Y., Waeltz P., Rupar M., Burn T., Lo Y., Kelley J., Covington M., Shepard S., Rodgers J.D., Haley P., Kantarjian H., Fridman J.S., Verstovsek S. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2010;115:3109-3117. doi: 10.1182/blood-2009-04-214957.
- [32] Harrison C., Kiladjian J.J., Al-Ali H.K., Gisslinger H., Waltzman R., Stalbovskaya V., McQuitty M., Hunter D.S., Levy R., Knoops L., Cervantes F., Vannucchi A.M., Barbui T., Barosi G. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *N Engl J Med.* 2012;366:787-798. doi: 10.1056/NEJMoa1110556.
- [33] Vannucchi A.M., Kiladjian J.J., Griesshammer M., Masszi T., Durrant S., Passamonti F., Harrison C.N., Pane F., Zachee P., Mesa R., He S., Jones M.M., Garrett W., Li J., Pirron U., Habr D., Verstovsek S. Ruxolitinib versus standard therapy for the treatment of polycythemia vera. *N Engl J Med.* 2015;372:426-435. doi: 10.1056/NEJMoa1409002.
- [34] Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023;98:801-821. doi: 10.1002/ajh.26857.
- [35] Silva M, Benito A, Sanz C, Prosper F, Ekhterae D, Nuñez G, Fernandez-Luna JL. Erythropoietin can induce the expression of bcl-x(L) through Stat5 in erythropoietin-dependent progenitor cell lines. *J Biol Chem.* 1999 Aug 6;274(32):22165-9. doi: 10.1074/jbc.274.32.22165. PMID: 10428780.
- [36] Du W., Wang Y.C., Hong J., Su W.-Y., Lin Y.-W., Lu R., Xiong H., Fang J.-Y. STAT5 isoforms regulate colorectal cancer cell apoptosis via reduction of mitochondrial membrane potential and generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol.* 2012;227:2421-2429. doi: 10.1002/jcp.22977.
- [37] Zeuner A., Pedini F., Francescangeli F., Signore M., Girelli G., Tafuri A., De Maria R. Activity of the BH3 mimetic ABT-737 on polycythemia vera erythroid precursor cells. *Blood.* 2009;113:1522-1525. doi: 10.1182/blood-2008-03-143321.
- [38] Pemmaraju N., Garcia J.S., Potluri J., Harb J.G., Sun Y., Jung P., Qin Q.Q., Tantravahi S.K., Verstovsek S., Harrison C. Addition of navitoclax to ongoing ruxolitinib treatment in patients with

- myelofibrosis (REFINE): a post-hoc analysis of molecular biomarkers in a phase 2 study. *Lancet Haematol.* 2022;9:e434-e444. doi: 10.1016/S2352-3026(22)00116-8.
- [39] Rowley J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1973;243:290–293. doi: 10.1038/243290a0.
- [40] de Klein A., van Kessel A.G., Grosveld G., Bartram C.R., Hagemeijer A., Bootsma D., Spurr N.K., Heisterkamp N., Groffen J., Stephenson J.R. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 1982;300:765-767. doi: 10.1038/300765a0.
- [41] Pane F., Intrieri M., Quintarelli C., Izzo B., Muccioli G.C., Salvatore F. BCR/ABL genes and leukemic phenotype: From molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene.* 2002;21:8652-8667. doi: 10.1038/sj.onc.1206094.
- [42] Zhao X., Ghaffari S., Lodish H., Malashkevich V.N., Kim P.S. Structure of the Bcr-Abl oncoprotein oligomerization domain. *Nat Struct Biol.* 2002;9:117-120. doi: 10.1038/nsb747.
- [43] Sonoyama J., Matsumura I., Ezoe S., Satoh Y., Zhang X., Kataoka Y., Takai E., Mizuki M., Machii T., Wakao H., et al. Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. *J Biol Chem.* 2002;277:8076-8082. doi: 10.1074/jbc.M111501200.
- [44] Shuai K., Halpern J., ten Hoeve J., Rao X., Sawyers C.L. Constitutive activation of STAT5 by the BCR-ABL oncogene in chronic myelogenous leukemia. *Oncogene.* 1996;13:247-254.
- [45] Nieborowska-Skorska M., Wasik M.A., Slupianek A., Salomoni P., Kitamura T., Calabretta B., Skorski T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)5 activation by BCR/ABL is dependent on intact Src homology (SH)3 and SH2 domains of BCR/ABL and is required for leukemogenesis. *J Exp Med.* 1999;189:1229-1242. doi: 10.1084/jem.189.8.1229.
- [46] Puil L., Liu J., Gish G., Mbamalu G., Bowtell D., Pelicci P.G., Arlinghaus R., Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 1994;13:764-773. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06319.x.
- [47] Chu S., Li L., Singh H., Bhatia R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res.* 2007;67:7045-7753. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4312.
- [48] Peng Z., Luo H.W., Yuan Y., Shi J., Huang S.F., Li C.L., Cao W.X., Huang Z.G., Feng W.L.

Growth of chronic myeloid leukemia cells is inhibited by infection with Ad-SH2-HA adenovirus that disrupts Grb2-Bcr-Abl complexes. *Oncol Rep.* 2011;25:1381-1388. doi: 10.3892/or.2011.1197.

[49] Hazlehurst L.A., Bewry N.N., Nair R.R., Pinilla-Ibarz J. Signaling networks associated with BCR-ABL-dependent transformation. *Cancer Control.* 2009;16:100-107. doi: 10.1177/107327480901600202.

[50] Druker B.J., Tamura S., Buchdunger E., Ohno S., Segal G.M., Fanning S., Zimmermann J., Lydon N.B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med.* 1996;2:561-566. doi: 10.1038/nm0596-561.

[51] Zimmermann J., Buchdunger E., Mett H., Meyer T., Lydon N.B. Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: Phenylaminopyrimidine (PAP) derivatives. *Bioorganic Med Chem Lett.* 1997;7:187-192. doi: 10.1016/S0960-894X(96)00601-4.

[52] Kantarjian H., O'Brien S., Jabbour E., Garcia-Manero G., Quintas-Cardama A., Shan J., Rios M.B., Ravandi F., Faderl S., Kadia T., Borthakur G., Huang X., Champlin R., Talpaz M., Cortes J. Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood.* 2012;119:1981-1987. doi: 10.1182/blood-2011-08-358135.

[53] Gorre M.E., Mohammed M., Ellwood K., Hsu N., Paquette R., Rao P.N., Sawyers C.L. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science.* 2001;293:876-880. doi: 10.1126/science.1062538.

[54] Hughes T., Deininger M., Hochhaus A., Branford S., Radich J., Kaeda J., Baccarani M., Cortes J., Cross N.C., Druker B.J., Gabert J., Grimwade D., Hehlmann R., Kamel-Reid S., Lipton J.H., Longtine J., Martinelli G., Saglio G., Soverini S., Stock W., Goldman J.M. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood.* 2006;108:28-37. doi: 10.1182/blood-2006-01-0092.

[55] Talpaz M., Shah N.P., Kantarjian H., Donato N., Nicoll J., Paquette R., Cortes J., O'Brien S., Nicaise C., Bleickardt E., et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2006;354:2531-2541. doi: 10.1056/NEJMoa055229.

[56] Kantarjian H., Giles F., Wunderle L., Bhatta K., O'Brien S., Wassmann B., Tanaka C., Manley P., Rae P., Mietlowski W., Bochinski K., Hochhaus A., Griffin J.D., Hoelzer D., Albitar M., Dugan M., Cortes J., Alland L., Ottmann O.G. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 2006;354:2542-2551. doi: 10.1056/NEJMoa055104.

- [57] Bradeen H.A., Eide C.A., O'Hare T., Johnson K.J., Willis S.G., Lee F.Y., Druker B.J., Deininger M.W. Comparison of imatinib mesylate, dasatinib (BMS-354825), and nilotinib (AMN107) in an N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-based mutagenesis screen: High efficacy of drug combinations. *Blood*. 2006;108:2332-2338. doi: 10.1182/blood-2006-02-004580.
- [58] O'Hare T., Eide C.A., Deininger M.W. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110:2242-2249. doi: 10.1182/blood-2007-03-066936.
- [59] Anagnostou T., Litzow M.R. Spotlight on ponatinib in the treatment of chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Patient selection and perspectives. *Blood Lymphat Cancer*. 2017;8:1-9. doi: 10.2147/BLCTT.S169529. Erratum in: *Blood Lymphat. Cancer* 2018, 8, 11.
- [60] Singh A.P., Glennon M.S., Umbarkar P., Gupte M., Galindo C.L., Zhang Q., Force T., Becker J.R., Lal H. Ponatinib-induced cardiotoxicity: Delineating the signalling mechanisms and potential rescue strategies. *Cardiovasc Res*. 2019;115:966-977. doi: 10.1093/cvr/cvz006.
- [61] Zabriskie M.S., Eide C.A., Tantravahi S.K., Vellore N.A., Estrada J., Nicolini F.E., Khoury H.J., Larson R.A., Konopleva M., Cortes J.E., Kantarjian H., Jabbour E.J., Kornblau S.M., Lipton J.H., Rea D., Stenke L., Barbany G., Lange T., Hernández-Boluda J.C., Ossenkoppele G.J., Press R.D., Chuah C., Goldberg S.L., Wetzler M., Mahon F.X., Etienne G., Baccarani M., Soverini S., Rosti G., Rousselot P., Friedman R., Deininger M., Reynolds K.R., Heaton W.L., Eiring A.M., Pomietter A.D., Khorashad J.S., Kelley T.W., Baron R., Druker B.J., Deininger M.W., O'Hare T. BCR-ABL1 compound mutations combining key kinase domain positions confer clinical resistance to ponatinib in Ph chromosome-positive leukemia. *Cancer Cell*. 2014;26:428-442. doi: 10.1016/j.ccr.2014.07.006.
- [62] Deininger M.W., Hodgson J.G., Shah N.P., Cortes J.E., Kim D.W., Nicolini F.E., Talpaz., Baccarani M., Müller M.C., Li J., Parker W.T., Lustgarten S., Clackson T., Haluska F.G., Guilhot F., Kantarjian H.M., Soverini S., Hochhaus A., Hughes T.P., Rivera V.M., Branford S. Compound mutations in BCR-ABL1 are not major drivers of primary or secondary resistance to ponatinib in CP-CML patients. *Blood*. 2016;127:703-712. doi: 10.1182/blood-2015-08-660977.
- [63] Wylie A.A., Schoepfer J., Jahnke W., Cowan-Jacob S.W., Loo A., Furet P., Marzinzik A.L., Pelle X., Donovan J., Zhu W., Buonamici S., Hassan A.Q., Lombardo F., Iyer V., Palmer M., Berellini G., Dodd S., Thohan S., Bitter H., Branford S., Ross D.M., Hughes T.P., Petruzzelli L., Vanasse K.G., Warmuth M., Hofmann F., Keen N.J., Sellers W.R. The allosteric inhibitor ABL001 enables dual

- targeting of BCR-ABL1. *Nature*. 2017;543:733-737. doi: 10.1038/nature21702.
- [64] Cortes J.E., Sasaki K., Kim D.W., Hughes T.P., Etienne G., Mauro M.J., Hochhaus A., Lang F., Heinrich M.C., Breccia M., Deininger M., Goh Y.T., Janssen J.J.W.M., Talpaz M., de Soria V.G.G., le Coutre P., DeAngelo D.J., Damon A., Cacciatore S., Polydoros F., Agrawal N., Rea D. Asciminib monotherapy in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia with the T315I mutation after ≥ 1 prior tyrosine kinase inhibitor: 2-year follow-up results. *Leukemia*. 2024;38:1522-1533. doi: 10.1038/s41375-024-02278-8.
- [65] Hirling H., Scheffner M., Restle T., Stahl H. RNA helicase activity associated with the human p68 protein. *Nature*. 1989;339:562-564. doi: 10.1038/339562a0. PMID: 2471939.
- [66] Cordin O., Banroques J., Tanner N.K., Linder P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*. 2006;367:17–37. doi: 10.1016/j.gene.2005.10.019.
- [67] Liu Z.R. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. *Mol. Cell Biol*. 2002;22:5443–5450. doi: 10.1128/MCB.22.15.5443-5450.2002.
- [68] Jalal C., Uhlmann-Schiffler H., Stahl H. Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:3590–3601. doi: 10.1093/nar/gkm058.
- [69] Davis B.N., Hilyard A.C., Lagna G., Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008;454:56-61. doi: 10.1038/nature07086.
- [70] Mersaoui S.Y., Yu Z., Coulombe Y., Karam M., Busatto F.F., Masson J.Y., Richard S. Arginine methylation of the DDX5 helicase RGG/RG motif by PRMT5 regulates resolution of RNA:DNA hybrids. *EMBO J*. 2019;38:e100986. doi: 10.15252/embj.2018100986.
- [71] Zhang M., Weng W., Zhang Q., Wu Y., Ni S., Tan C., Xu M., Sun H., Liu C., Wei P., Du X. The lncRNA NEAT1 activates Wnt/ β -catenin signaling and promotes colorectal cancer progression via interacting with DDX5. *J Hematol Oncol*. 2018;11:113. doi: 10.1186/s13045-018-0656-7.
- [72] Dai L., Pan G., Liu X., Huang J., Jiang Z., Zhu X., Gan X., Xu Q., Tan N. High expression of ALDOA and DDX5 are associated with poor prognosis in human colorectal cancer. *Cancer Manag. Res*. 2018;29:1799–1806. doi: 10.2147/CMAR.S157925.
- [73] Clark E.L., Coulson A., Dalgliesh C., Rajan P., Nicol S.M., Fleming S., Heer R., Gaughan L., Leung H.Y., Elliott D.J., Fuller-Pace F.V., Robson C.N. The RNA helicase p68 is a novel androgen receptor coactivator involved in splicing and is overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 2008;68:7938-7346. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0932.

- [74] Li K., Zhao G., Yuan H., Zhang J., Li Q., Gong D., Lin P. Upregulated expression of DDX5 predicts recurrence and poor prognosis in breast cancer. *Pathol Res Pract.* 2022;229:153736. doi: 10.1016/j.prp.2021.153736.
- [75] Tago K., Funakoshi-Tago M., Itoh H., Furukawa Y., Kikuchi J., Kato T., Suzuki K., Yanagisawa K. Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. *Oncogene.* 2015;34:314-22. doi: 10.1038/onc.2013.561.
- [76] Dutertre M., Gratadou L., Dardenne E., Germann S., Samaan S., Lidereau R., Driouch K., de la Grange P., Auboeuf D. Estrogen regulation and physiopathologic significance of alternative promoters in breast cancer. *Cancer Res.* 2010;70:3760-3770. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3988.
- [77] Lin S., Tian L., Shen H., Gu Y., Li J.L., Chen Z., Sun X., You M.J., Wu L. DDX5 is a positive regulator of oncogenic NOTCH1 signaling in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncogene.* 2013;32:4845-4853. doi: 10.1038/onc.2012.482.
- [78] Mazurek A., Park Y., Miething C., Wilkinson J.E., Gillis J., Lowe S.W., Vakoc C.R., Stillman B. Acquired dependence of acute myeloid leukemia on the DEAD-box RNA helicase DDX5. *Cell Rep.* 2014;7:1887-1899. doi: 10.1016/j.celrep.2014.05.019.
- [79] Zhang H., Zhang Y., Zhu X., Chen C., Zhang C., Xia Y., Zhao Y., Andrisani O., Kong L. DEAD Box Protein 5 Inhibits Liver Tumorigenesis by Stimulating Autophagy via Interaction with p62/SQSTM1. *Hepatology.* 2019;69:1046-1063. doi: 10.1002/hep.30300.
- [80] Ling X., Wu W., Aljahdali I.A.M., Liao J., Santha S., Fountzilas C., Boland P.M., Li F. FL118, acting as a 'molecular glue degrader', binds to dephosphorylates and degrades the oncoprotein DDX5 (p68) to control c-Myc, survivin and mutant Kras against colorectal and pancreatic cancer with high efficacy. *Clin Transl Med.* 2022;12:e881. doi: 10.1002/ctm2.881.
- [81] Ling X., Cao S., Cheng Q., Keefe J.T., Rustum Y.M., Li F. A novel small molecule FL118 that selectively inhibits survivin, Mcl-1, XIAP and cIAP2 in a p53-independent manner, shows superior antitumor activity. *PLoS One.* 2012;7:e45571. doi: 10.1371/journal.pone.0045571.
- [82] Ueda F., Tago K., Tamura H., Funakoshi-Tago M. Three Tyrosine Residues in the Erythropoietin Receptor Are Essential for Janus Kinase 2 V617F Mutant-induced Tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2017;292:1826-1846. doi: 10.1074/jbc.M116.749465.
- [83] 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;23:849-856. doi:

10.1016/j.cellsig.2011.01.009.

[84] Uchihara Y., Tago K., Taguchi H., Narukawa Y., Kiuchi F., Tamura H., Funakoshi-Tago M. Taxodione induces apoptosis in BCR-ABL-positive cells through ROS generation. *Biochem Pharmacol.* 2018;154:357-372. doi: 10.1016/j.bcp.2018.05.018.

[85] Hokimoto S., Funakoshi-Tago M., Tago K. Identification of DDX5 as an indispensable activator of the glucocorticoid receptor in adipocyte differentiation. *FEBS J.* 2023;290:988-1007. doi: 10.1111/febs.16618.

[86] Andraos R., Qian Z., Bonenfant D., Rubert J., Vangrevelinghe E., Scheufler C., Marque F., Régnier C.H., De Pover A., Ryckelynck H., Bhagwat N., Koppikar P., Goel A., Wyder L., Tavares G., Baffert F., Pissot-Soldermann C., Manley P.W., Gaul C., Voshol H., Levine R.L., Sellers W.R., Hofmann F., Radimerski T. Modulation of activation-loop phosphorylation by JAK inhibitors is binding mode dependent. *Cancer Discov.* 2012;2:512-523. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0324. Epub 2012 May 3.

[87] Lin K., Lin J., Wu W.I., Ballard J., Lee B.B., Gloor S.L., Vigers G.P., Morales T.H., Friedman L.S., Skelton N., Brandhuber B.J. An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci Signal.* 2012;5(223):ra37. doi: 10.1126/scisignal.2002618. PMID: 22569334.

[88] Tamm I., Wang Y., Sausville E., Scudiero D.A., Vigna N., Oltersdorf T., Reed J.C. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 1998;58:5315-5320.

[89] Paz-Priel I., Friedman A. C/EBP α dysregulation in AML and ALL. *Crit Rev Oncog.* 2011;16:93-102. doi: 10.1615/critrevoncog.v16.i1-2.90.

[90] Schulze A., Zerfass K., Spitkovsky D., Henglein B., Jansen-Dürr P. Activation of the E2F transcription factor by cyclin D1 is blocked by p16INK4, the product of the putative tumor suppressor gene MTS1. *Oncogene.* 1994;9:3475-3482.

[91] Matsumura I., Kitamura T., Wakao H., Tanaka H., Hashimoto K., Albanese C., Downward J., Pestell R.G., Kanakura Y. Transcriptional regulation of the cyclin D1 promoter by STAT5: its involvement in cytokine-dependent growth of hematopoietic cells. *EMBO J.* 1999;18:1367-1377. doi: 10.1093/emboj/18.5.1367.

[92] Cho M., Lee E., Shon J., Choi M.J., Park J.H., Park Y.J. Induction of DEAD Box helicase 5 in early adipogenesis is regulated by Ten-eleven translocation 2. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids.* 2020;1865:158684. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158684.

- [93] Delhommeau F., Dupont S., Della Valle V., James C., Trannoy S., Massé A., Kosmider O., Le Couedic J.P., Robert F., Alberdi A., Lécuse Y., Plo I., Dreyfus F.J., Marzac C., Casadevall N., Lacombe C., Romana S.P., Dessen P., Soulier J., Vigué F., Fontenay M., Vainchenker W., Bernard O.A. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med.* 2009;360:2289-2301. doi: 10.1056/NEJMoa0810069.
- [94] Chim C.S., Wan T.S., Fung T.K., Wong K.F. Methylation of TET2, CBL and CEBPA in Ph-negative myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol.* 2010;63:942-946. doi: 10.1136/jcp.2010.080218.
- [95] Zhao X., Li D., Yang F., Lian H., Wang J., Wang X., Fang E., Song H., Hu A., Guo Y., Liu Y., Li H., Chen Y., Huang K., Zheng L., Tong Q. Long Noncoding RNA NHEG1 Drives β -Catenin Transactivation and Neuroblastoma Progression through Interacting with DDX5. *Mol Ther.* 2020;28:946-962. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.12.013.
- [96] Wu N., Jiang M., Han Y., Liu H., Chu Y., Liu H., Cao J., Hou Q., Zhao Y., Xu B., Xie X. O-GlcNAcylation promotes colorectal cancer progression by regulating protein stability and potential catcinogenic function of DDX5. *J Cell Mol Med.* 2019;23:1354-1362. doi: 10.1111/jcmm.14038.
- [97] Wang X., Li P., Zhang Z., Wang X., Jian Q., Wang Y. N6-methyladenosine modification of linc-OIP5 confers paclitaxel resistance in breast cancer through a DDX5-dependent mechanism. *Exp Cell Res.* 2024;442:114226. doi: 10.1016/j.yexcr.2024.114226.
- [98] Yuan J., Song Y., Pan W., Li Y., Xu Y., Xie M., Shen Y., Zhang N., Liu J., Hua H., Wang B., An C., Yang M. LncRNA SLC26A4-AS1 suppresses the MRN complex-mediated DNA repair signaling and thyroid cancer metastasis by destabilizing DDX5. *Oncogene.* 2020;39:6664-6676. doi: 10.1038/s41388-020-01460-3.
- [99] Yang L., Lin C., Liu Z.R. Phosphorylations of DEAD box p68 RNA helicase are associated with cancer development and cell proliferation. *Mol. Cancer Res.* 2005;3:355-363. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-05-0022.
- [100] Saporita A.J., Chang H.C., Winkler C.L., Apicelli A.J., Kladney R.D., Wang J., Townsend R.R., Michel L.S., Weber J.D. RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. *Cancer Res.* 2011;71:6708-6717. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1472.
- [101] Caretti G., Schiltz R.L., Dilworth F.J., Di Padova M., Zhao P., Ogryzko V., Fuller-Pace F.V., Hoffman E.P., Tapscott S.J., Sartorelli V. The RNA helicases p68/p72 and the noncoding RNA SRA are coregulators of MyoD and skeletal muscle differentiation. *Dev Cell.* 2006;11:547-560. doi:

10.1016/j.devcel.2006.08.003.

[102] Cruciat C.M., Dolde C., de Groot R.E., Ohkawara B., Reinhard C., Korswagen H.C., Niehrs C. RNA helicase DDX3 is a regulatory subunit of casein kinase 1 in Wnt- β -catenin signaling. *Science*. 2013;339:1436-1441. doi: 10.1126/science.1231499.

[103] Du C., Li D.Q., Li N., Chen L., Li S.S., Yang Y., Hou M.X., Xie M.J., Zheng Z.D. DDX5 promotes gastric cancer cell proliferation in vitro and in vivo through mTOR signaling pathway. *Sci Rep*. 2017;7:42876. doi: 10.1038/srep42876.

[104] Taniguchi T., Iizumi Y., Watanabe M., Masuda M., Morita M., Aono Y., Toriyama S., Oishi M., Goi W., Sakai T. Resveratrol directly targets DDX5 resulting in suppression of the mTORC1 pathway in prostate cancer. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2211. doi: 10.1038/cddis.2016.114.

[105] Zhang Y., Ye S., Lu W., Zhong J., Leng Y., Yang T., Luo J., Xu W., Zhang H., Kong L. RNA helicase DEAD-box protein 5 alleviates nonalcoholic steatohepatitis progression via tethering TSC complex and suppressing mTORC1 signaling. *Hepatology*. 2023;77:1670-1687. doi: 10.1002/hep.32651.

[106] Ling X., Liu X., Zhong K., Smith N., Prey J., Li F. FL118, a novel camptothecin analogue, overcomes irinotecan and topotecan resistance in human tumor xenograft models. *Am J Transl Res*. 2015;7:1765-1781.

[107] Pardanani A., Harrison C., Cortes J.E., Cervantes F., Mesa R.A., Milligan D., Masszi T., Mishchenko E., Jourdan E., Vannucchi A.M., Drummond M.W., Jurgutis M., Kuliczowski K., Gheorghita E., Passamonti F., Neumann F., Patki A., Gao G., Tefferi A. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2015;1:643-651. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1590.

[108] Mascarenhas J., Hoffman R., Talpaz M., Gerds A.T., Stein B., Gupta V., Szoke A., Drummond M., Pristupa A., Granston T., Daly R., Al-Fayoumi S., Callahan J.A., Singer J.W., Gotlib J., Jamieson C., Harrison C., Mesa R., Verstovsek S. Pacritinib vs Best Available Therapy, Including Ruxolitinib, in Patients With Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol*. 2018;4:652-659. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.5818.

[109] Ishii T., Bruno E., Hoffman R., Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. *Blood*. 2006;108:3128-3134. doi: 10.1182/blood-2006-04-017392.

[110] Mullally A., Poveromo L., Schneider R.K., Al-Shahrour F., Lane S.W., Ebert B.L. Distinct roles

- for long-term hematopoietic stem cells and erythroid precursor cells in a murine model of Jak2V617F-mediated polycythemia vera. *Blood*. 2012;120:166-172. doi: 10.1182/blood-2012-01-402396.
- [111] Westover D., Ling X., Lam H., Welch J., Jin C., Gongora C., Del Rio M., Wani M., Li F. FL118, a novel camptothecin derivative, is insensitive to ABCG2 expression and shows improved efficacy in comparison with irinotecan in colon and lung cancer models with ABCG2-induced resistance. *Mol Cancer*. 2015;14:92. doi: 10.1186/s12943-015-0362-9.
- [112] Wang J., Liu Z., Zhang D., Liu R., Lin Q., Liu J., Yang Z., Ma Q., Sun D., Zhou X., Jiang G. FL118, a novel survivin inhibitor, wins the battle against drug-resistant and metastatic lung cancers through inhibition of cancer stem cell-like properties. *Am J Transl Res*. 2017;9:3676-3686.
- [113] Yang L., Lin C., Liu Z.R. P68 RNA helicase mediates PDGF-induced epithelial mesenchymal transition by displacing Axin from beta-catenin. *Cell*. 2006;127:139-155. doi: 10.1016/j.cell.2006.08.036.
- [114] Hochhaus A., Kreil S., Corbin A.S., La Rosée P., Müller M.C., Lahaye T., Hanfstein B., Schoch C., Cross N.C., Berger U., et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16:2190-2196. doi: 10.1038/sj.leu.2402741.

第 8 章 謝辞

本研究を行うにあたり、学部 3 年の時より研究者として成長するために、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました本学衛生化学講座の多胡 めぐみ教授に深く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻を賜り、時には相談に乗っていただいた本学衛生化学講座中澤 洋介講師、青山 和正助教に感謝申し上げます。また、本研究全般を通して、実験方法や研究の方向性、論文作製に関して様々な面でアドバイスをいただいた群馬大学大学院保健学研究科の多胡 憲治教授に感謝申し上げます。また、これまで研究に関してご指導いただいた本学衛生化学講座の田村 博悦名誉教授、本学衛生化学講座元助教の上田 史仁さんに感謝申し上げます。

共同研究者として、プラスミドの設計や研究発表に関してご指導、ご協力をいただいた自治医科大学医学部生化学講座の太田 聡講師に感謝申し上げます。また、FACS 解析および動物実験に関してご指導いただいた東京大学医学研究所附属幹細胞治療研究センターの岩間 厚志教授と上村 駿特任研究員に感謝申し上げます。

さらに、本研究を行うにあたり、ご協力いただいた衛生化学講座の学生の皆様にも感謝申し上げます。今後、衛生化学講座がますます発展することを祈念いたします。

また、本研究は、JST 博士後期課程学生支援プロジェクト (JPMJS2123)、慶應義塾博士課程学生研究支援プログラム、KP 会星野尚美記念薬学研究・活動助成金、JSPS 特別研究員奨励費 (24KJ1943) の支援を受け、実施されました。