

氏名	タケダ ケンゴ 武田 健吾
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士甲 第 号
学位授与の日付	2025 年 3 月 10 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	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
論文審査委員	(主査) 教 授 多胡 めぐみ (博士 (薬学)) (副査) 教 授 齋藤 義正 (博士 (医学)) 教 授 柴田 淳史 (博士 (医学))
慶應義塾大学学位規程第 11 条に基づく審査委員会実施日： 2025 年 2 月 6 日	

論文内容の要旨

【背景】

慢性骨髄増殖性腫瘍 (Myeloproliferative neoplasm: MPN) は、造血幹細胞に遺伝子異常が生じ、赤血球、血小板、顆粒球の過剰増殖が誘導され、最終的に急性白血病に移行することで致命的となる。MPN は、遺伝子異常や病型に基づき、真性赤血球増加症 (Polycythemia vera: PV)、本態性血小板血症 (Essential thrombocythemia: ET)、原発性骨髄線維症 (Primary Myelofibrosis: PMF)、慢性骨髄性白血病 (Chronic Myeloid Leukemia: CML) に分類される。これまでに、PV、ET、PMF の共通した原因遺伝子産物として、非受容体型チロシンキナーゼ Janus kinase (JAK2) の点変異体 (JAK2V617F) が同定されている。また、CML では、染色体転座 t(9;22)(q34;q11) が生じ、フィラデルフィア染色体 (Ph) が形成される。これにより、原因遺伝子産物 BCR-ABL が発現する。JAK2V617F および BCR-ABL は、恒常的に活性化したチロシンキナーゼであり、転写因子 STAT5 や MEK-ERK 経路、Akt-mTOR 経路の活性化を介して、細胞増殖や腫瘍形成を誘導する。

現在、MPN の治療薬として選択的 JAK1/2 阻害剤 Ruxolitinib が適用されている。Ruxolitinib は脾腫の改善など一定の効果が認められるが、JAK2V617F だけでなく、野生型 JAK1/2 も阻害するため、骨髄抑制など重篤な副作用が問題となっている。また、BCR-ABL 阻害剤が開発され、CML の治療効果は劇的に改善されたが、治療中に BCR-ABL 遺伝子に変異が出現し、薬剤耐性が獲得されることが問題となっている。特に、ゲートキーパー変異 (T315I) を有する BCR-ABL 変異体は、第一世代、第二世代の BCR-ABL 阻害剤に耐性を示す。したがって、MPN 治療において、JAK2V617F による発がん誘導シグナル経路を標的とした新たな治療戦略の確立、および薬剤耐性を克服できる新規 CML 治療法の開発が課題である。

DEAD-box protein 5 (DDX5) は、DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) -box を有する RNA ヘリカーゼである。DDX5 は、ATP 依存的に二本鎖 RNA を一本鎖 RNA に乖離させるヘリカーゼ活性を持ち、様々な RNA 代謝プロセスに関与する。近年、DDX5 は、大腸がんや前立腺がん、乳がんなどの固形がんで高発現しており、これらのがんの進行や悪性化に関与することが報告されている。したがって、DDX5 は有力ながん標的分子であると期待されるが、MPN や CML における DDX5 の発現状態や役割は不明である。また、2022 年に、Topoisomerase I (Topo I) 阻害剤である Camptothecin (CPT) の誘導体 FL118 が、DDX5 と結合し、DDX5 のプロテアソーム分解を誘導することが報告された。

本研究では、JAK2V617F や BCR-ABL による発がん誘導シグナルにおける DDX5 の関与を検討し、MPN における DDX5 を介した発がん誘導機構を解明することを目的とした。また、MPN および薬剤耐性を示す CML に対する DDX5 阻害剤 FL118 の抗腫瘍活性を解析し、DDX5 を標的とした MPN 治療の有効性を検討した。

【実験方法】

1. 細胞株の作製：マウス ProB 細胞 Ba/F3、JAK2V617F 陽性 MPN 患者由来 HEL 細胞、BCR-ABL 陽性 CML 患者由来 K562 細胞を用いた。レトロウイルス感染により、空ベクター (-)、野生型 JAK2、あるいは JAK2V617F と EpoR を共発現させたマウス ProB 細胞 Ba/F3 (-/EpoR 細胞、WT/EpoR 細胞、V617F/EpoR 細胞)、および BCR-ABL や BCR-ABL T315I 変異体を発現させた Ba/F3 細胞を作製した。V617F/EpoR 細胞あるいは HEL 細胞に、sh-scramble (sh-SCR) あるいは sh-DDX5 を発現させた。さらに、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞に、野生型 DDX5 あるいは RNA ヘリカーゼ活性を欠損させた DDX5 変異体 (K144N) を再構成した。レンチウイルス感染により、CRISPR-Cas9 システムを用いて、DDX5 をノックアウトした K562 細胞、BCR-ABL 発現細胞、BCR-ABL T315I 変異体発現細胞を作製した。

2. 細胞増殖能、細胞生存率、アポトーシス細胞の測定：WST アッセイにより細胞増殖能を測定し、トリパンブルー染色法により細胞生存率を測定した。Annexin V-PE/7-AAD 法および Annexin V-FITC/PI 染色法により、アポトーシス細胞を検出した。

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

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

5. RT-PCR:細胞から RNA を抽出し、oligo (dT)20 プライマー、RevaerTra Ace (TOYOBO) を用いて、逆転写反応を行った後、定量的 PCR を行った。

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

【結果・考察】

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

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

2. JAK2V617F による DDX5 を介した発がん誘導機構

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

3. RNA ヘリカーゼ活性非依存的な DDX5 を介した発がん誘導機構

MPN における DDX5 を介した発がん誘導機構を解析するため、JAK2V617F による発がん誘導における DDX5 の RNA ヘリカーゼ活性の必要性を検討した。sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞に、野生型 DDX5、あるいは RNA ヘリカーゼ活性を欠損させ

た DDX5 変異体 (K144N) を再構成した。DDX5 のノックダウンによる V617F/EpoR 細胞の増殖抑制や生存率低下は、野生型 DDX5 および DDX5 変異体 (K144N) の再構成により、同程度に回復した。野生型 DDX5 および DDX5 変異体 (K144N) の再構成は、DDX5 のノックダウンによる Survivin や Bcl-XL の発現低下や mTOR 経路の抑制を回復し、DDX5 のノックダウンによる Caspase-3 の活性化やアポトーシス細胞の割合の増加を抑制した。さらに、sh-DDX5 を発現させた V617F/EpoR 細胞を移植したヌードマウスで観察された腫瘍形成や肝脾腫の抑制も、野生型 DDX5 や DDX5 変異体 (K144N) の再構成により回復した。したがって、DDX5 は、JAK2V617F による発がん誘導に不可欠であるが、その RNA ヘリカーゼ活性は必要ないことが明らかになった。

4. MPN に対する FL118 の抗腫瘍効果

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

5. BCR-ABL による DDX5 を介した発がん誘導機構

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

6. 薬剤耐性 CML に対する FL118 の抗腫瘍効果

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

論文審査結果の要旨

2025 年 2 月 6 日に実施された審査委員会では、まず申請者が研究内容に関して約 25 分間のプレゼンテーションを行い、その後、約 40 分間の副査 2 名による口頭試問が行われた。最後に、申請者が退出して、審査委員による協議を行った。

審査委員より、本研究において細胞内シグナル伝達経路を詳細に解析し、MPN における DDX5 の発がん誘導メカニズムを解明できた点、および発表資料が建設的で理解しやすくまとめられている点が高く評価された。

質疑応答では、まず、MPN の病態や分類に関する質問がされた。申請者は、MPN は造血幹細胞における遺伝子異常が原因で発症し、血中に正常な赤血球、血小板、顆粒球などの血球細胞が異常に増加することを特徴とする疾患であることを説明した。その点で、PV、ET、PMFに加えて、白血病の一種である CML も MPN に分類されることを述べた。また、審査委員より、血液がんにおける DDX5 の発現や機能についてどこまで解明されているのか、という質問がされた。さらに、患者データベースを利用した DDX5 の解析の重要性についても助言があった。それに対して、申請者は、急性リンパ芽球性白血病（Acute lymphoblastic leukemia、ALL）において DDX5 が高発現しており、Notch1 シグナルを制御することが報告されていることを説明した。また、急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia : AML）においても悪性度と DDX5 の発現が相関することが示されていることを述べた。MPN ががんの前段階の病態であることもあり、一般的には MPN 患者データを利用できないことを説明し、MPN 患者のデータベースを利用した解析は実施していない旨を答えた。

実験系に関して、使用している Ba/F3 細胞の適切性について質問がされた。申請者は、Ba/F3 細胞が IL-3 依存的増殖を示す細胞であり、がん遺伝子産物のシグナル経路や形質転換能の解析において有用であることを説明した。さらに、ヒト MPN 患者由来の HEL 細胞およびヒト CML 患者由来の K562 細胞においても実験を行い、JAK2V617F や BCR-ABL を強制的に発現させた Ba/F3 細胞で得られた結果と同じ結果を得たことを説明した。これらの審査委員からの質問および助言を踏まえ、公聴会での発表資料では、患者由来細胞で得られた結果も含めてわかりやすく示すように改善した。

審査委員からは、今回の研究において、DDX ファミリーが多数存在する中で DDX5 に着目した理由について質問がされた。申請者は、他のがん種においても DDX5 ががん細胞の増殖や悪性化に関与することが報告されている例を挙げ、MPN においても DDX5 が関与する可能性を考え、DDX5 の発現を検討した経緯を説明した。また、申請者はこれまでに DDX5 と機能が類似した DDX17 の MPN 細胞における発現を検討しており、JAK2V617F はキナーゼ活性に依存して DDX5 の発現を誘導するが、DDX17 の発現には影響を及ぼさない結果を得ていることを述べた。これに関して、申請者は、おおよそ内容を回答したが、より正確に回答できるよう、DDX17 に関する解析結果と共に、RNA シークエンス解析により JAK2V617F/EpoR 細胞における 37 種類の DDX ファミリーの発現を解析した結果を発表資料の予備スライドとして準備することとした。

加えて、MPN における STAT5 を介した DDX5 の発現制御機構および DDX5 が発がん性を示す分子メカニズムについて質問がされた。申請者は、DDX5 遺伝子プロモーター領域には STAT5 結合部位が存在しないが、E2F 結合部位が存在していることを述べた。また、E2F は STAT5 の標的遺伝子であることを説明し、JAK2V617F が STAT5 の活性化を介して、E2F などの転写因子の発現誘導を介して、DDX5 mRNA の発現を誘導する分子機構が存在する可能性について答えた。さらに、申請者は DDX5 が増殖や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という結果を踏まえ、DDX5 が足場タンパク質として機能する可能性を考えていることを述べ、DDX5 の欠失変異体を作成し、DDX5 の mTOR 活性や細胞増殖に必要な領域を同定することが重要であるという考えを回答した。

2名の審査委員から、FL118に関して、開発された経緯、標的特異性、正常細胞への毒性、およびMPN治療薬としての応用性について質問がなされた。申請者は、FL118が元々、抗アポトーシス因子 Survivin の遺伝子発現を抑制する化合物スクリーニングの結果として発見された化合物であることを説明した。その後、Xenograft モデルを用いた動物実験により抗腫瘍活性が認められ、FL118がDDX5と直接結合し、DDX5のプロテアソーム分解を誘導する活性があることが報告されたことを答えた。また、FL118のDDX5およびTopoisomerase Iとの結合定数を測定した論文を引用し、

FL118 の DDX5 との結合が Topoisomerase I との結合よりも 10 倍程度強いことが報告されていることを説明し、DDX5 のみを標的とした阻害剤ではないが、DDX5 に特異性が高い化合物であることを回答した。これまでに FL118 の正常細胞に対する影響は検討していないが、イヌ、マウスを用いた FL118 の毒性試験が実施された結果について説明し、動物の生存に関わる毒性は見られていないことを述べた。さらに、MPN の治療では現在の治療薬である Ruxolitinib が遺伝子異常を持つ造血幹細胞に無効である問題を説明し、FL118 が肺がん幹細胞にも抗腫瘍活性を示した報告を考慮し、MPN に効果的である可能性を述べた。MPN の病態の悪性度によっては、Ruxolitinib と FL118 の併用投与で治療効果の改善が期待できる可能性があるという考えを述べた。

以上の審査委員会における指摘事項を踏まえて、申請者は論文および口頭発表資料の修正を行った。

令和 7 年 2 月 18 日に実施された学位論文公聴会において、申請者は論文の内容を発表した。公聴会では、DDX5 が mTOR を活性化する分子機構に関して質問がされた。申請者は、DDX5 のノックダウンにより mTOR の上流シグナル分子である Akt の活性化は変化しないことから、DDX5 が mTOR の活性化を制御している可能性があるが、現時点ではその分子機構は未解明であると回答した。さらに、今後、DDX5 の複合体を精製し、結合分子を同定することで mTOR 活性化経路を解明する必要があると述べた。また、審査委員から、DDX5 阻害剤 FL118 に比べて、既に臨床応用されている mTOR 阻害剤の方が MPN 治療に有効ではないかとの意見があった。それに対して、申請者は、MPN 治療薬である Ruxolitinib が分化した赤血球や血小板には効果があるものの、遺伝子変異を有する造血幹細胞には無効であり、MPN を根治できない課題があることを説明した。さらに、FL118 は肺がん幹細胞に対して抗腫瘍活性を示すことが報告されており、JAK2V617F 遺伝子変異を有する造血幹細胞にも抗腫瘍活性を示すと期待されることを回答した。

本研究において、申請者は、MPN の原因遺伝子産物である JAK2V617F および CML の原因遺伝子産物である BCR-ABL により DDX5 の発現が誘導されることを見出し、DDX5 が細胞の生存・増殖に必須の役割を果たす mTOR の活性化に寄与し、MPN 細胞および CML 細胞の増殖に必須の役割を果たすことを明らかにした。さらに、DDX5 の分解を誘導する FL118 の MPN に対する抗腫瘍活性を in vitro および in vivo において立証し、MPN の発症機序の理解および新たな治療戦略の構築に貢献した。

申請者は、審査委員の質問やコメントに対して、丁寧かつ適切に回答しており、本研究及びその関連領域に対して十分な知識と理解を有していた。

以上より、申請者は博士（薬科学）の学位に十分値するものと評価された。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

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

【参考論文】

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