

研究題目 RNA ヘリカーゼ DDX5 を介した慢性骨髄増殖性腫瘍の発症

機序の解明

研究組織

研究代表者：多胡 めぐみ（慶應義塾大学薬学部衛生化学講座）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：青山 和正（慶應義塾大学薬学部衛生化学講座）

武田 健吾（慶應義塾大学薬学部衛生化学講座）

向來 朗（慶應義塾大学薬学部衛生化学講座）

【1】研究の概要

[1-1] 本研究の目的・概要

慢性骨髄増殖性腫瘍 (MPN) は、チロシンキナーゼ JAK2 の遺伝子変異 (V617F) が原因であることが知られている血液腫瘍である。これまでに、JAK2 阻害剤 Ruxolitinib が開発され、MPN 治療薬として適用されている。しかし、その治療効果は低く、MPN は未だ難治疾患の一つであると言える。したがって、MPN の新規治療標的の同定を基盤とした MPN 治療薬の開発が求められる。

我々はこれまでに、JAK2V617F 変異体により発現が誘導される RNA ヘリカーゼ DDX5 が、Akt-mTOR 経路の活性化に関与し、細胞増殖や腫瘍形成に必須の役割を果たすことを明らかにしている。したがって、DDX5 は MPN の発症に重要な分子であり、新規 MPN の治療標的となることが期待される。しかし、JAK2V617F 変異体による DDX5 の発現誘導機構および DDX5 を介した発がん誘導の分子メカニズムは不明である。

したがって、本研究では、近位依存性ビオチン化酵素 TurboID を用いて、DDX5 と相互作用するタンパク質を同定することにより、JAK2V617F 変異体による DDX5 を介した発がん誘導機構の解明を目指した。

[1-2] 研究の方法・経過

1. TurboID-DDX5 のレンチウイルス発現ベクターの作製

TurboID-DDX5 を PCR により増幅し、レンチウイルス発現ベクターにクローニングした。

作製した発現ベクターを HEL293T 細胞に導入し、一過性に発現させた後、免疫ブロット法により、TurboID-DDX5 の発現を確認した。

2. JAK2V617F 変異体発現 Ba/F3 細胞および MPN 患者由来 HEL 細胞における TurboID-DDX5 の発現

レンチウイルス感染により、JAK2V617F 変異体発現 Ba/F3 細胞および MPN 患者由来 HEL 細胞に、TurboID-DDX5 を発現させた。感染細胞を選択するため、レンチウイルス感染を行った細胞を Puromycin 添加培地で 3 日間培養した。しかし、全ての細胞が死滅してしまうという結果が得られた。ビオチン量が低い培地を用いた際も、同様に TurboID-DDX5 を発現した目的の細胞を得ることができなかった。以上より、理由が定かではないが、本研究で用いることを計画していた Ba/F3 細胞や HEL 細胞では、TurboID-DDX5 を発現させることができないことが明らかになった。現在、HEK293T 細胞など、TurboID-DDX5 を発現させることができる細胞を用いて、JAK2V617F 変異体のシグナル伝達経路の解析が可能かどうかを検討している。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

当初、目的としていた JAK2V617F 変異体発現 Ba/F3 細胞や HEL 細胞において、TurboID-DDX5 を発現させ、DDX5 の相互作用分子を同定する実験は遂行することができなかった。しかし、MPN

だけでなく、DDX5は慢性骨髄白血病細胞の生存や増殖に必須の役割を果たすことを見出している。本研究を遂行している青山は、これまでに小迫教授との共同研究において、CML由来K562細胞において、TurboID-EZH2の相互作用分子を同定した実績をもつ。今後、K562細胞に、TurboID-DDX5を発現させた後に、同様の方法を用いて、CML細胞におけるDDX5の相互作用分子を同定し、血液腫瘍におけるDDX5の生理機能を解明することを計画している。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

申請者らはこれまでに、MPNだけでなく、CMLの病態形成におけるDDX5の重要性を実証している。しかし、DDX5がAkt-mTOR経路の活性化を誘導する分子機構およびMPNやCMLの病態形成に関与する分子メカニズムは不明である。DDX5はRNAヘリカーゼとしてRNA代謝を制御するだけでなく、転写因子c-Mycやp53と結合し、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。しかしながら、MPN細胞やK562細胞において、DDX5と既知の転写因子との結合は確認されなかった。したがって、本共同研究を継続して、TurboIDを用いた近位依存性標識法によりDDX5の相互作用分子を同定することにより、DDX5を介した発がん誘導機構を解明する必要がある。本研究をさらに発展させることにより、MPNやCMLの発症機序が解明されることが期待される。また、本研究で同定するDDX5の相互作用分子は、血液腫瘍において発がんシグナルの本質を担う因子であると期待され、新規MPNやCML治療薬の開発を目指した創薬研究において貢献できると期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

Takeda K, Ohta S, Nagao M, Kobayashi E, Tago K and 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;

<https://doi.org/10.3390/ijms25073693>

[3-2]学会発表

武田 健吾、長尾 美宇、多胡 憲治、青山 和正、中澤 洋介、多胡 めぐみ

「CML細胞におけるCamptothecin誘導体FL118の抗腫瘍効果」

日本薬学会 第144年会 (横浜)

2024年3月29日 発表予定

[3-3]成果資料等

作製したTurboID-DDX5が計画していたMPN細胞に発現させることができないことが判明し、本研究計画を遂行することができなかった。

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今後、本研究の目的の達成のために使用できる細胞を探索することが必要である。TurboID-DDX5を安定して発現することができ、MPNやCMLの原因となるJAK2V617FやBCR-ALの発がんシグナルを解析できる細胞を作製し、使用することを目指す。

また、Flag tagを付加したDDX5を発現したJAK2V617F発現Ba/F3細胞やHEL細胞を作製している。今後は、Flag抗体を用いたDDX5の複合体の精製に取り組み、DDX5の相互作用分子の同定を目指す。