

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18804

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌を高悪性化させるRNAスプライシングバリエーションの同定

研究課題名(英文) Identification of RNA splicing variants that cause head and neck squamous cell carcinoma to highly malignancy.

研究代表者

北村 公二 (Kitamura, Koji)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：40804365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：スプライシング制御因子であるSF3B2が頭頸部扁平上皮癌を高悪性化させるメカニズムについてその一端を明らかにした。SF3B2はその発現量の変化によってミトコンドリア電子伝達系や転写調節領域の遺伝子発現変化に関与することが分かった。さらにSF3B2はmRNA前駆体に結合しスプライシング制御に関わるだけでなく、クロマチン領域にも結合し転写制御に関与することでこれらの遺伝子発現を調整することが明らかとなった。SF3B2の高発現によってこれらの分子メカニズムが頭頸部扁平上皮癌の高悪性化に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭頸部扁平上皮癌は喫煙、飲酒が原因となり発生する予後不良な疾患である。近年、ゲノムワイド関連解析が行われるようになり、がん抑制遺伝子p53などの遺伝子変異がHNSCCの発癌に関連することが明らかにされつつある。しかし、HNSCCの悪性度を規定する分子メカニズムについてはまだ不明である。そのため、HNSCCの治療はその解剖学的進展度に基づいて行われ、分子生物学的な悪性度に応じた治療法は確立されていない。本研究ではHNSCCを高悪性化させる分子メカニズムの一端を明らかにしたことで新たな治療法の開発につながる意義ある研究であったと考える。

研究成果の概要(英文)：We demonstrated that the splicing regulator SF3B2 is involved in the regulation of gene expression in mitochondrial electron transport pathways and transcriptional regulatory regions by altering its expression level. In addition, SF3B2 regulates gene expression not only by binding to mRNA precursors and regulating splicing, but also by binding to chromatin regions and regulating transcription, suggesting that these molecular mechanisms are involved in the progression of squamous cell carcinoma of the head and neck. These results suggest that these molecular mechanisms through high expression of SF3B2 are involved in the progression of squamous cell carcinoma of head and neck.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部扁平上皮癌 RNAスプライシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) は喫煙、飲酒が原因となり発生する予後不良な疾患である。頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) の発癌の分子メカニズムの解明は進んでいるが、その悪性度を規定する分子メカニズムは分かっていない。我々は RNA スプライシング制御因子 SF3B2 の高発現によって HNSCC を高悪性化させることを見出した。そこで本研究では、RNA スプライシングによって HNSCC を高悪性化させる分子メカニズムの一端を解明し、新たな治療法開発の基盤を構築することを目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は SF3B2 が HNSCC のどの遺伝子のスプライシング制御に関与し、どのような RNA スプライシングの変化をもたらし、その結果どのように癌が高悪性化するのか、その分子メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) SF3B2 スプライシング制御する遺伝子をゲノムワイドに解析する。SF3B2 は mRNA 前駆体の様々な部位に結合しスプライシング制御因子として働いていることが考えられる。まずは SF3B2 の強制発現によるゲノムワイドな遺伝子発現変化、スプライシングパターンを明らかにするために、SF3B2 を強制発現または機能抑制した HNSCC 細胞を用いて RNA seq を行い、遺伝子発現変化やスプライシング変化を解析する。

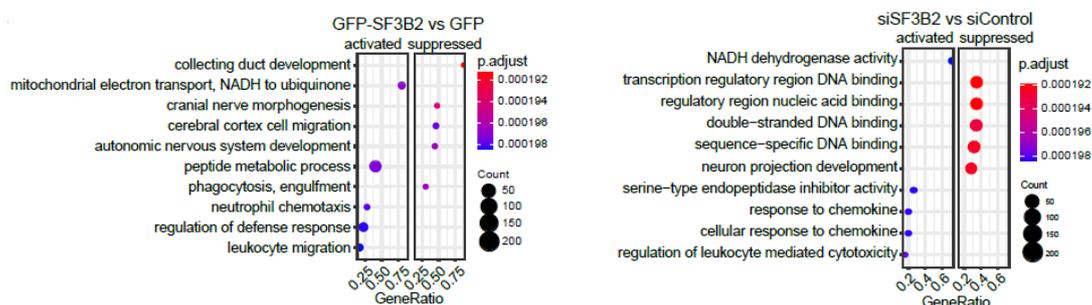
(2) mRNA 前駆体における SF3B2 のスプライシング制御部位の網羅的解析を行う。SF3B2 が HNSCC 細胞の mRNA 前駆体のどの部位に結合しスプライシング制御を行っているかを確認する必要がある。SF3B2 を強制発現した HNSCC 細胞株を用いて、SF3B2 タンパク質が mRNA 前駆体のどの部位に結合するのか同定できる PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) を用いて解析する。

(3) SF3B2 によって HNSCC を高悪性化するスプライシングバリエーションを同定する。SF3B2 の強制発現または機能抑制発現細胞の RNA seq 解析の結果から、SF3B2 によって有意に発現が増加、または減少するスプライシングバリエーションを同定する。

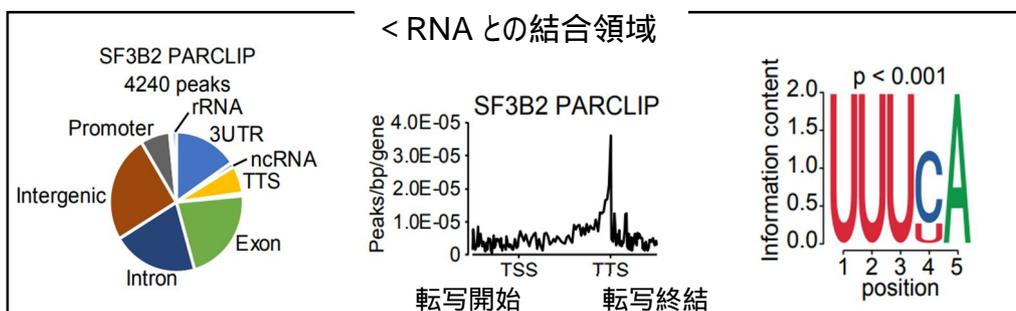
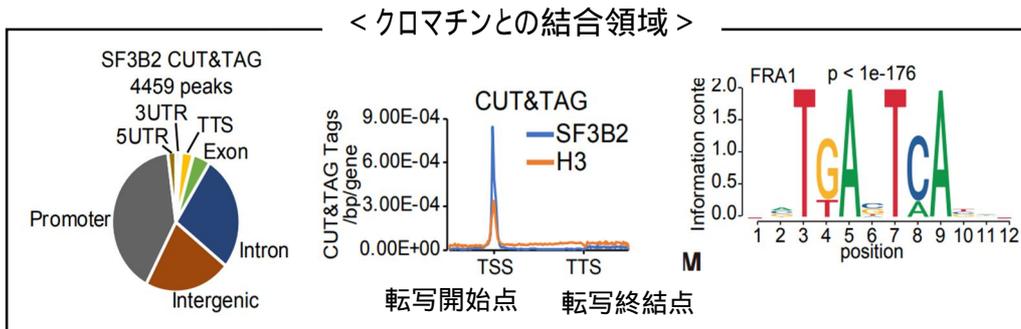
(4) 核内に存在する SF3B2 がクロマチンのどの領域に結合しているのかを評価する。そのために CUT&TAG (Cleavage Under Targets and Tagmentation) を行う。また、RNA ポリメラーゼ 2 によって合成された直後の新生転写産物を解析する PRO-seq を用いて、SF3B2 の転写調節への関連性について検討する。

4. 研究成果

(1) 頭頸部癌細胞株 (Fadu, Detroit562) を用いて SF3B2 強制発現細胞株を作成し、in vitro、in vivo で細胞、腫瘍の増殖能を評価したところ、SF3B2 強制発現細胞株で有意に腫瘍増殖能が亢進した。また、SF3B2 強制発現細胞株とノックダウンした細胞を用いて RNA seq を行い、遺伝子発現プロファイル解析した。Gene ontology (GO) 解析の結果、SF3B2 強制発現細胞では、ミトコンドリアの電子輸送に関連する遺伝子の発現が増加していることがわかった。逆に、SF3B2 をノックダウンさせた細胞では、転写調節領域の DNA 結合に関連する遺伝子の発現が減少していたことから、SF3B2 の高発現は、遺伝子発現プロファイルを変化させて腫瘍細胞の増殖を促進していることが考えられた。

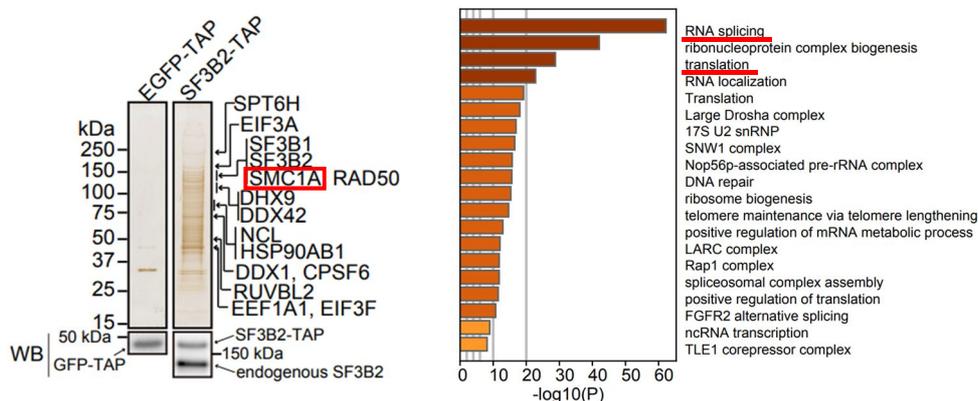


(2) PAR-CLIPの結果、SF3B2のRNAへの結合領域は3UTRとエクソンでより多くのピークを認めた。しかし、HNSCCを高悪性化させるスプライシングバリエントを同定することは出来なかった。また、CUT&TAGの結果、SF3B2のクロマチンへの結合領域はmRNA前駆体領域への結合とは異なり、プロモーター、遺伝子間、イントロン領域でピークを認めた。また、SF3B2結合するゲノム領域にはFRA1という転写因子が認識するDNAモチーフを含むことが分かった。一方、SF3B2と結合するRNA領域はUUUCAというモチーフが濃縮されており、SF3B2はクロマチンとRNAの橋



的領域で異なる結合様式を示すことから、SF3B2が遺伝子発現制御因子とRNAに対する2つの機能を持つと考えられた。さらにPro-seqの結果、SF3B2の機能抑制により新生転写産物の密度が変化することから、SF3B2がRNAスプライシングに加えて、転写の制御にも関与していることが示唆された。

(3) SF3B2と関連するタンパクの中でも、コヒーシンの構成因子であるSMC1Aが関連していることが明らかとなった。SMC1AとCTCFのChIP-seqの結果と、SF3B2発現細胞株から得られたCUT&Tagの結果を比較検討したところ、SMC1AとCTCFの結合領域は、SF3B2の結合領域とかなり重なっていることがわかった。SF3B2を高発現すると、SF3B2結合クロマチン領域におけるSMC1A結合量が増加したが、CTCF結合量は有意な影響を受けなかった。これらの結果は、SF3B2がSF3B2結合クロマチン領域にコヒーシンをリクルートする役割を担っていることが考えられた。



当初本研究の目的としていたHNSCCを高悪性化させるスプライシングバリエントを同定することは出来なかったが、SF3B2がスプライシング制御だけでなく転写制御に関連しHNSCCの高悪性化に寄与することが示唆され、HNSCC増悪化の分子メカニズムの一端を明らかにすることが出来た。今後はこれらのメカニズムをさらに解明し、メカニズムに基づいた新たな治療法開発が望まれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitamura Koji, Suzuki Hidefumi, Abe Ryota, Inohara Hidenori, Kaneda Yasufumi, Takahashi Hidehisa, Nimura Keisuke	4. 巻 12
2. 論文標題 Dual function of SF3B2 on chromatin and RNA to regulate transcription in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell & Bioscience	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13578-022-00812-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------