

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07202

研究課題名(和文) 抗がん剤耐性を打破するmRNAスプライシング制御ペプチドの開発

研究課題名(英文) Development of mRNA splicing modulators to overcome anticancer drug resistance

研究代表者

福村 和宏 (Fukumura, Kazuhiro)

藤田医科大学・医科学研究センター・講師

研究者番号：80622117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトSPF45遺伝子は、がん細胞で過剰発現することによって抗がん剤耐性を獲得することが報告されている。しかし、そのメカニズムは解明されていなかった。研究代表者はSPF45がヒトの遺伝子に存在する非常に短いイントロンのmRNAスプライシングに必須な新規制御因子であることを明らかにし、2報の国際誌に成果を発表した[Fukumura et al. Nat. Commun. 12, 4910 (2021)] [Fukumura et al. Cell Rep. 42, 113534 (2023)]。がん細胞では、SPF45が過剰発現することで異常なmRNAスプライシングが引き起こされると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者の研究成果から、SPF45過剰発現による抗がん剤耐性獲得機構の一端を理解することができた。これまで、スプライシング制御因子の異常に着目した抗がん剤耐性の獲得機構という研究は前例がなく新しい取り組みと言えるであろう。本研究成果により、抗がん剤耐性獲得メカニズムの研究において新しい領域を開拓できたのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：The human SPF45 gene has been reported to be overexpressed in cancer cells, conferring resistance to anticancer drugs. However, the mechanism of this phenomenon has not been elucidated. In this study, I showed that SPF45 is a novel regulator essential for mRNA splicing of very short introns in human genes and published their results in two international journals [Fukumura et al. Nat. Commun. 12, 4910 (2021)] et al. Cell Rep. 42, 113534 (2023)]. In cancer cells, overexpression of SPF45 is thought to cause abnormal mRNA splicing.

研究分野：腫瘍診断および治療学関連

キーワード：RNAスプライシング SPF45 抗がん剤耐性

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤治療は、がん治療の重要な柱の一つである。しかしながら、がん細胞が抗がん剤に対して効果的に反応しなくなる状態、すなわち抗がん剤耐性を獲得することが治療を非常に困難にし、がんの進行や再発のリスクを高める。それゆえ抗がん剤耐性は、がん治療における重要な課題であり、耐性獲得メカニズムの解明や新規治療薬の開発が望まれている。

mRNA スプライシング(以下スプライシング)は、真核生物の遺伝子発現において必須であり、RNA とタンパク質から構成されるスプライソソームと呼ばれる巨大複合体によって遂行される。しかし、ヒトのイントロンの長さは 43 塩基~100 万塩基以上(平均 5,849 塩基)と様々な長さのイントロンが散在しており、同一のメカニズムでスプライシングされているとは考えられない(図 1A)。

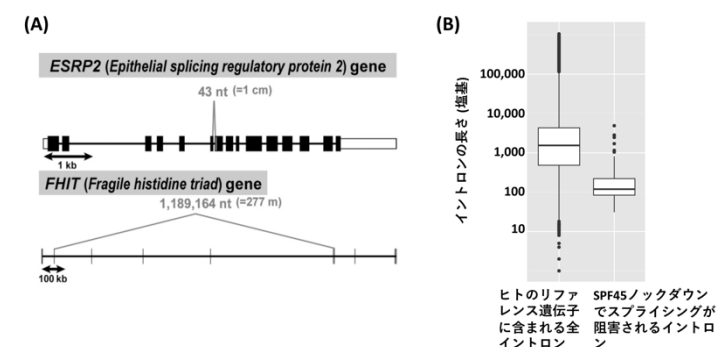


図 1 短いイントロンを識別する制御因子 SPF45 の同定

(A) ヒトにおける短いイントロンと長いイントロンの例
(B) SPF45 ノックダウンによりスプライシング阻害されるイントロンの長さ

申請者は、これまでヒトの極端に短いイントロン(~100 塩基)のスプライシングに着目し、解析を行ってきた。siRNA ライブラリスクリーニングと RNA-Seq 解析から、短いイントロンのスプライシングに特異的に必要とされる新規スプライシング必須因子 SPF45 を同定した(図 1B)。さらに、その分子メカニズムも併せて解明することに成功していた。

非常に興味深いことに、SPF45 は抗がん剤耐性を獲得したがん細胞で過剰発現しているということが報告されている[*Am. J. Physiol.* 163, 1781 (2003); *Cancer Res.* 65, 6593 (2005)]。さらに、抗がん剤耐性を持つがん細胞において SPF45 のノックダウンを行うことで、抗がん剤耐性を消失させることができること、逆に SPF45 を人為的に過剰発現させると抗がん剤耐性を獲得することが報告されている。加えて、SPF45 が過剰発現したがん細胞は、ピンクリスチン、ゲムシタピン、ペメトレキセドなどの多種類の抗がん剤に対して耐性を持つ[*Cancer Res.* 65, 6593 (2005)]。しかし、この抗がん剤耐性獲得のメカニズムは未だ解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、SPF45 による mRNA スプライシング制御機構の解明と、その知見を元にした抗がん剤耐性獲得機構を理解することを目的とした。結果的にその成果が SPF45 依存的スプライシング制御機構に作用する抗がん剤耐性抑制ペプチドの開発につながると考えられる。

抗がん剤耐性がんの出現は化学療法が始まって以来、つきまとう難問である。抗がん剤の耐性獲得機序の一つとしてよく知られているのは、様々な抗がん剤を細胞外に排出するポンプ作用を持つ ABC トランスポーターと呼ばれる細胞膜タンパク質の過剰発現である。これらの膜タンパク質を過剰発現するがん細胞は、抗がん剤を細胞外に排出することによって抗がん剤耐性を獲得する。しかし、このメカニズムで説明できる抗がん剤耐性は一部分でしかない。本研究は、スプライシング制御異常に起因する抗がん剤耐性の獲得機構の解明というこれまでにない独自の観点から進める。この研究が遂行され、成果を得ることができれば、抗がん剤耐性獲得メカニズムの研究において、新しい領域を開拓できるのではないかと考えている。加えて、SPF45 の UHM ドメインに結合して抗がん剤耐性を抑制する人工ペプチドの創出も、過去に例を見ない斬新な挑戦である。この人工ペプチドは、抗がん剤と併用することで、抗がん剤の効果を長期間維持させることができるのではないだろうか。

3. 研究の方法

(1)SPF45 によるスプライシング制御を受けるがん遺伝子群を同定することで、抗がん剤耐性獲得のメカニズムを明らかにする

申請者は、これまで SPF45 ノックダウン HeLa 細胞の RNA-Seq 解析を行い、スプライシングの変化にのみ着目してきたが、遺伝子自体の発現変動には着目していなかった。

ヒトを含めた真核生物では、mRNA スプライシングが阻害された場合、ナンセンスコドン依存的分解(Nonsense Mediated Decay; NMD)と呼ばれる機構が働き、異常な mRNA を積極的に分解する。そのため、SPF45 のノックダウンにより、スプライシング阻害された mRNA の大部分は、この NMD によって分解を受けており、発現が大きく低下していると推測される。そこで申請者は、SPF45 ノックダウン HeLa 細胞の RNA-Seq データから、発現低下が誘導される遺伝子群の予備的解析を行った。その結果、SPF45 のノックダウンにより、MYCをはじめとする、がん関連遺伝子群の発現が著しく低下していることを発見した(未発表データ&図 2)。MYC は、高発現することにより、がん幹細胞が増加し、結果的に抗がん剤耐性を獲得するという知見がすでにあり、申請者の仮説を強く支持している。[Br. J. Cancer. 63, 237 (1991); Cell Metab. 26, 633 (2017)]。

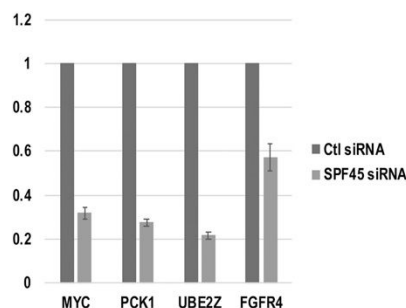


図 2 SPF45 ノックダウン細胞で癌関連遺伝子群の発現が減少する

SPF45 ノックダウン HeLa 細胞の RNA-Seq のデータから発現低下したがん関連遺伝子群の一部を qPCR により

そこで、まずは、SPF45 のスプライシング制御を受ける「真の」がん関連遺伝子群を同定する。シクロヘキシミドにより NMD を阻害した条件下で、SPF45 ノックダウン HeLa 細胞の RNA-Seq を行い、スプライシングパターンの変化を解析する。この解析により、NMD により積極的に分解されて検出できなかった遺伝子のスプライシング変化を検出できる。この解析結果を申請者が、今回行った発現変動解析の結果と合わせ、共通する遺伝子群を SPF45 がスプライシング制御する「真の」遺伝子とする。それらの遺伝子群をデータベース[The Cancer Genome Atlas (<https://portal.gdc.cancer.gov/>)]を用いて解析し、がん細胞で高発現している遺伝子だけに絞り込む。

次に、SPF45 依存的な抗がん剤耐性獲得に寄与する責任遺伝子を明らかにする。前述した RNA-Seq 解析で同定された SPF45 のスプライシング制御を受ける「真の」がん関連遺伝子の cDNA クローンをそれぞれ HeLa 細胞に過剰発現させ、複数の抗がん剤(ビンクリスチン、ゲムシタピン、ペメトレキセド等)に対する生存率を調べていく。それによって、どの責任遺伝子が、どの抗がん剤の耐性に寄与しているのか明らかにすることができる。

(2)SPF45 の機能阻害ペプチドによって、がん細胞の抗がん剤耐性を抑え込む

SPF45 の UHM ドメインは、U2snRNP の ULM ドメインと結合し、短いイントロンのスプライシングを促進する(図 3)。そこで、SPF45-UHM と特異的に結合する人工 ULM ペプチドを、がん細胞に導入し、SPF45 の機能を阻害する。

まず、SPF45 と強力に結合する人工 ULM ペプチドを構築する。SPF45 が結合する U2 snRNP の ULM 領域のペプチド(13 アミノ酸)を人工合成し、SPF45 のリコンビナントタンパク質との結合を *in vitro* binding assay により確認する。その相互作用構造を核磁気共鳴装置(NMR)によって詳細に解析する。その知見から、アミノ酸置換を行い、より特異的に SPF45 の UHM に結合すると推測されるペプチドをデザインしていく。実際にデザインしたペプチドを合成し、等温滴定型カロリメトリー(ITC)を用いて結合の特異性と強度を測定していき、最も SPF45 の UHM と特異的かつ安定的に結合するペプチドを選択する。

次に、構築した人工 ULM ペプチドによる抗がん剤耐性抑制効果を培養細胞を用いて実証する。人工 ULM ペプチドを HeLa 細胞に導入し、SPF45 によって制御されるがん関連遺伝子群のスプライシングが阻害されるか RT-PCR を用いて解析する。細胞内でのペプチドの安定性等に問題が生じた場合には、直鎖状の ULM ペプチドを環状化して環状ペプチドを合成する。一般的に環状ペプチドは環状骨格であるために分子全体のコンフォメーション変化が大きく制限されるためにしっかりした形になり、鎖状ペプチドよりも標的タンパク質に結合しやすく安定である。この人工 ULM ペプチドを導入した HeLa 細胞を抗がん剤で処理し、生存率、増殖率、浸潤も解析し、実際に抗がん剤耐性を低下させることを実証する。このペプチドが、抗がん剤耐性を低下さ

せることができれば、将来的に初代がん細胞やヒト由来がん培養細胞を免疫不全マウスに移植したゼノクラフトモデルでの解析も行いたい。

4. 研究成果

(1) SPF45 による異常スプライシングを受ける遺伝子を同定し、抗癌剤耐性獲得のメカニズムを解明

これまで、抗がん剤耐性を獲得したがん細胞での SPF45 の発現量について、臨床検体では全く解析されていない。そこで、本研究の共同研究者である八代正和准教授(大阪公立大学)とともに、SPF45 抗体を用いた免疫染色を用い、抗がん剤治療後に切除された多くのがん組織切片の発現解析を進めている。これまでに、大腸がん、肺がん、膵臓がんの患者検体において、抗がん剤治療を受けた後に再発した患者の癌組織では、SPF45 が有意に過剰発現していることを明らかにした[Nagamine *et al. Anticancer research*, 43(10) 4663-4672 (2023)]。これらのデータは、実際のがん患者の細胞でも過剰発現した SPF45 が、抗がん剤耐性獲得に寄与することを強く支持する。そこで、SPF45 を過剰発現する培養細胞株を樹立し、その耐性細胞株のトランスクリプトーム解析を行い、SPF45 により異常スプライシングを受ける遺伝子群を同定する予定である。

(2) SPF45 依存的スプライシング制御機構の解明

実際に SPF45 が短いイントロンの一部において、スプライシング必須因子であることを明らかにした[Fukumura *et al. (2021) Nat. Commun.* 12, 4910]。ヒト遺伝子のイントロンの長さは、43~100 万塩基以上に分布しており、その差は 1 万倍を優に超えるが、一寸の狂いもなくスプライシングされる。正確なスプライシングにはイントロンとエクソン境界を認識する必要があり、その不可欠な目印がシグナル配列、すなわち、5'スプライス部位、ブランチ部位、ポリピリミジン配列 (PPT) と 3'スプライス部位である。これらのシグナル配列には、それぞれスプライシング必須因子である U1 snRNP、U2 snRNP、そして U2AF 二量体が結合し、スプライソソーム A 複合体を形成することでイントロンが認識される。しかし、A 複合体は、ヒトゲノムに存在する短いイントロンをはみ出すほど大きい。我々は、短いイントロンのスプライシング必須因子として SPF45 を同定した。多くの短いイントロンにおいて、U2AF 二量体ではなく、SPF45 に依存するスプライシングが起こっていた。SPF45 依存的にスプライシングされる短いイントロンの PPT 配列は非常に短く、U2AF 二量体が結合していなかった。さらに、SPF45 は U2AF 二量体に置き換わって U2 snRNP と、その構成タンパク質である SF3b155 (SF3B1) を介して結合することで、スプライシングが引き起こされることが判明した。U2AF 二量体は、スプライシングの必須因子として知られていたため、U2AF 二量体の代わりに SPF45 を利用する新しいスプライシング機構は、まさに常識を覆す発見となった。

さらに、SPF45 の相互作用因子を探索し、その結果 SAP30BP という因子を同定した。SAP30BP は、元々 HSV1 (Herpes Simplex virus 1) に感染した際に発現上昇する遺伝子として同定された(文献 5)。SAP30BP は、スプライシング反応を触媒するスプライソソームに含まれていることがわかっているが、その機能はわかっていない。我々は HeLa 細胞を用いて、siRNA による SAP30BP ノックダウンを行なった。SAP30BP 遺伝子の発現抑制を行なった HeLa 細胞と SPF45 遺伝子の発現抑制を行なった HeLa 細胞の RNA-seq を行ない、スプライシングが阻害されるイントロンを比較すると、そのほとんどが共通であった。このことから、SAP30BP は SPF45 と協調して、短いイントロンのスプライシングを制御していると考えられる。さらに、SAP30BP と SPF45 のリコンビナントタンパク質を精製し、相互作用を調べて結果、SPF45 の UHM ドメインと SAP30BP の ULM ドメインで直接結合する事、その構造を NMR よって明らかにした。 [Fukumura *et al. Cell Rep.* 42, 113534 (2023)]。今後、SAP30BP の ULM ドメインと同じペプチドを人工合成し、細胞に導入することによって SPF45 依存的スプライシングを阻害できるか検討していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 福村 和宏、前田 明	4. 巻 94
2. 論文標題 「イントロンの長さ」の不可思議に端を発する新しいスプライシング機構の発見	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 806～813
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940806	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Daisuke Hoshino, Kato Hisamori, Fukumura Kazuhiro, Mayeda Akila, Miyagi Yohei, Seiki Motoharu, Koshikawa Naohiko	4. 巻 112
2. 論文標題 Novel LAMC2 fusion protein has tumor promoting properties in ovarian carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4957～4967
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fukumura Kazuhiro, Yoshimoto Rei, Sperotto Luca, Kang Hyun-Seo, Hirose Tetsuro, Inoue Kunio, Sattler Michael, Mayeda Akila	4. 巻 12
2. 論文標題 SPF45/RBM17-dependent, but not U2AF-dependent, splicing in a distinct subset of human short introns	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-24879-y	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 該当する
1. 著者名 Fukumura Kazuhiro, Venables Julian P., Mayeda Akila	4. 巻 8
2. 論文標題 SPF45/RBM17-dependent splicing and multidrug resistance to cancer chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/23723556.2021.1996318	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 該当する

1. 著者名 Fukumura Kazuhiro, Sperotto Luca, Seu? Stefanie, Kang Hyun-Seo, Yoshimoto Rei, Sattler Michael, Mayeda Akila	4. 巻 42
2. 論文標題 SAP30BP interacts with RBM17/SPF45 to promote splicing in a subset of human short introns	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 113534 ~ 113534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2023.113534	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 該当する

1. 著者名 NAGAMINE HIROAKI, YASHIRO MASAKAZU, YOSHIMOTO NAOKI, IZUMI MOTOHIRO, SUGIMOTO AKIRA, NAKAHAMA KENJI, OGAWA KOICHI, MATSUMOTO YOSHIYA, SAWA KENJI, TANI YOKO, KANEDA HIROYASU, MITSUOKA SHIGEKI, YAMADA KAZUHIRO, WATANABE TETSUYA, AASAI KAZUHISA, FUKUMURA KAZUHIRO, MAYEDA AKILA, KAWAGUCHI TOMOYA	4. 巻 43
2. 論文標題 RBM17 Expression Is Associated With the Efficacy of ICI Monotherapy in NSCLC With Low PD-L1 Expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4663 ~ 4672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Fukumura K., Takeda J., Masuda A., Ohno M. & Mayeda A.
2. 発表標題 RNPS1 in PSAP complex controls precise pre-mRNA splicing with periodicity during cell cycle
3. 学会等名 第 23 回日本 RNA 学会年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Fukumura K. & Mayeda A.
2. 発表標題 RNPS1 in PSAP Complex Controls Pre-mRNA splicing with Periodicity during Cell Cycle
3. 学会等名 Gordon Research Conference PostTranscriptional Gene Regulation&Integrating (2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuhiro Fukumura, Rei Yoshimoto, Tetsuro Hirose, Kunio Inoue, Akila Mayeda
2. 発表標題 新しい分子機構によってスプライシングされるヒトの短いイントロン群
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Fukumura, L. Sperotto, H-S. Kang, M. R. Yoshimoto, M. Sattler, A. Mayeda
2. 発表標題 SAP30BP and RBM17 interaction is an essential process to splice out a subset of human short introns
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 執筆者：73名、技術情報協会	4. 発行年 2023年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 411
3. 書名 mRNAの制御機構の解明と治療薬・ワクチンへの活用	

〔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