

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19413

研究課題名（和文）がん抗原の発現増強の新技术としてのmRNA監視機構阻害

研究課題名（英文）Analysis of the inhibition of mRNA surveillance

研究代表者

山下 暁朗（YAMASHITA, AKIO）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：20405020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がん免疫を賦活化する方法として、mRNA監視機構を抑制により、がん細胞に特異的ながん抗原の元となるフレームシフト変異遺伝子由来のmRNAがコードする非天然ペプチドの発現を増強する手法の開発が期待されている。本研究では、mRNA監視機構を阻害する新たな手法の開発に向けて、mRNA監視機構の新規の阻害因子の同定と解析を目的とした。本研究により、特定の細胞ストレスにより、mRNA監視機構を抑制し、がん抗原を発現させる新技术の開発に成功した。さらに、ストレスによるmRNA監視機構の抑制に、新規に合成されるタンパク質の存在を明らかとした。今後の分子同定による新たな研究展開も期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で明らかとした、mRNA監視機構を阻害する複数の細胞ストレスは、これまで、NMDとの関わりがわかっていなかった。がん免疫療法による治療奏功は、フレームシフト変異の頻度と強く相関するが、NMDにより分解されるmRNAがコードする以上ペプチドがなぜ発現するのかについては謎のままである。本研究により、細胞ストレスによるNMD阻害が解明されたことにより、今後、免疫チェックポイント阻害剤の治療奏功予測が正確となるだけでなく、新たながん免疫賦活化薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) is an mRNA surveillance mechanism that eliminates aberrant mRNAs containing premature termination codons (PTCs). Recent studies revealed that frame-shift mutation gene products encode tumor antigens. Since frame-shifted transcript containing PTCs, these mRNA degraded through NMD. We have newly established methods in which inhibit NMD via specific cellular stress. We also defined the requirement of newly synthesized protein for stress-mediated inhibition of NMD.

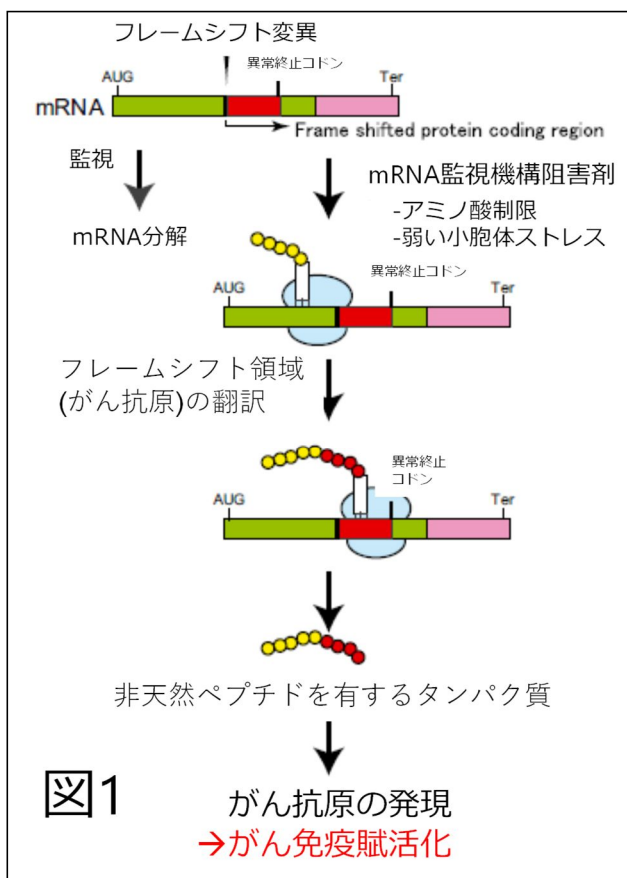
研究分野：分子細胞生物学

キーワード：がん抗原 フレームシフト変異 mRNA分解 ナンセンスコドン 細胞ストレス応答 mRNA翻訳

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常な蛋白質が発現し機能するために、生体にはゲノム情報の伝達、発現の過程で様々な品質管理機構が備わっている。そのシステムの一つが nonsense-mediated mRNA decay (NMD) で、本来の終止コドンよりも 5 側上流の位置に存在する異常な早期終止コドン (premature termination codon : PTC) を有する mRNA (ナンセンス mRNA) を積極的に分解、排除する mRNA 監視機構である。PTC は、ナンセンス変異、塩基挿入や欠損によるフレームシフト変異、スプライシング部位の変異による異常スプライシングに起因して生じる。このうち、がん細胞におけるフレームシフト変異遺伝子由来の mRNA がコードする非天然ペプチドが、がん抗原となる事が分かってきた (Turajlic ら Lancet Oncology, 2017)。我々は 2001 年に、蛋白質リン酸化酵素 SMG1 の同定とそのヒト NMD における必須な役割を報告して以降、NMD の制御機構 (Yamashita ら, 2001; Ohnishi, Yamashita ら, 2003; Fernández, Yamashita ら, 2011; Melero, Yamashita ら, 2014) と mRNA 分解機構 (Yamashita ら, 2005; Okada-Katsuhata, Yamashita ら, 2012; Nicholson, Yamashita ら, 2014; Melero R, Yamashita A ら Nat Commun, 2016) を解明し、長い間謎であった、細胞が PTC を認識する分子装置の実態とそのメカニズム明らかとしてきた (Kashima, Yamashita ら, 2006; Yamashita ら, 2009; Izumi, Yamashita ら, 2010; 総説 Yamashita ら, 2013)。これらの分子機構解明に基づき、NMD 抑制剤を開発することで、がん抗原の発現を促進する方法が求められていた。



2. 研究の目的

がん抗原を発現することで、がん免疫を賦活化する方法として、NMD を抑制することで、がん細胞に特異的ながん抗原の元となる異常タンパク質を強制発現させる新手法の可能性が指摘されている。本研究では、既知の NMD 制御因子に直接作用しない、mRNA 監視機構を阻害する新手法として、新規 mRNA 監視機構阻害剤の同定し、その標的分子に基づく新しい NMD 阻害分子機序解明を目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者は mRNA 監視機構の分子機構解析において、世界のトップランナーであるだけでなく本研究に必要な cDNA、抗体などを含むほとんどの実験材料、基礎データ、技術シーズを有している。本研究では、我々が開発したシーズ技術である (1) 高精度 mRNA 監視機構モニタリングシ

システム（特許出願中）（２）新規 SMG1 阻害剤（特許出願中） 既報 SMG1 阻害剤（独自合成）
 （３）動物培養細胞を用いた難精製タンパク質精製系を用い独自性の高い研究を実施した。具体的には以下の二つの研究を推進した。

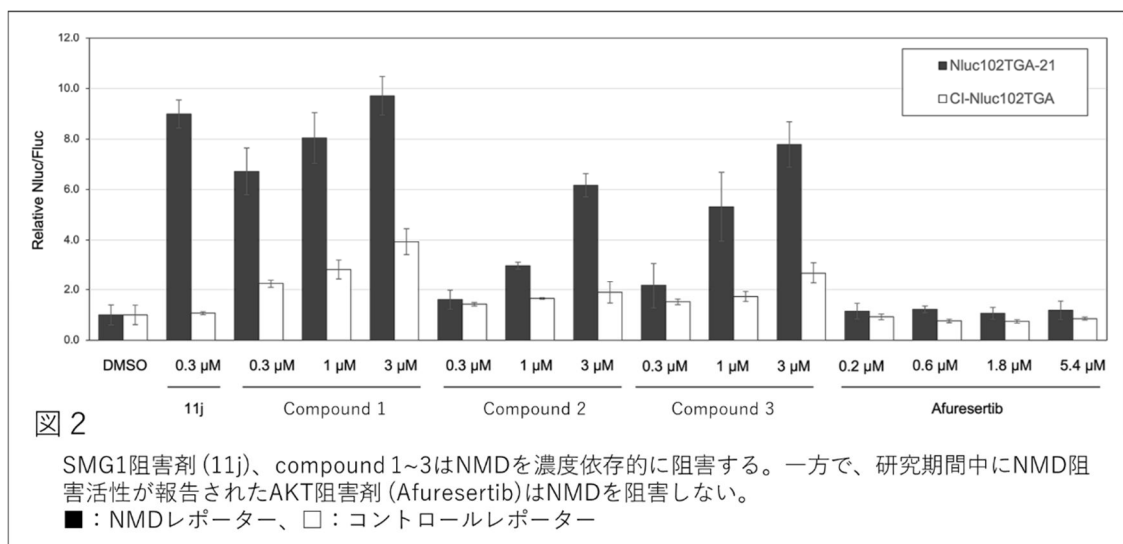
（１） mRNA 監視機構を阻害する新手法として、新規 mRNA 監視機構阻害剤の同定：
 細胞ストレスを誘導する化合物を中心に、NMD 阻害活性を有する化合物を 高精度 mRNA 監視機構モニタリングシステムを用いて同定を試みた。また、同定された化合物についてその標的の siRNA によるノックダウンを試行した。さらに、新規同定化合物による NMD 阻害を次世代シーケンズ解析により、ゲノムワイドに解析した。

（２）新規同定化合物によるマウス固体レベルでの NMD 阻害活性証明：
 （１）の解析で同定した、新規 NMD 阻害化合物投与により、マウス固体レベルでの NMD 阻害を次世代シーケンズを用い、ゲノムワイドに解析した。

4. 研究成果

（１） mRNA 監視機構を阻害する新手法として、新規 mRNA 監視機構阻害剤の同定：
 新たに NMD 阻害活性を有する 3 つの化合物を同定した（図 2）。さらに、研究期間中に NMD 阻害活性が報告された AKT 阻害剤について、 高精度 mRNA 監視機構モニタリングシステムを用いて我々自身で再解析を行い、報告と異なり AKT 阻害剤が NMD 阻害活性を示さないことを明らかとした。また、3 つの化合物の標的の一部について siRNA によるノックダウンを試行し、標的遺伝子のノックダウンが NMD を阻害することを解明した。さらに、培養細胞を用いて新規同定化合物による NMD 阻害を次世代シーケンズを用いたゲノムワイド解析により証明した。

（２）新規同定化合物によるマウス固体レベルでの NMD 阻害活性証明：
 （１）の解析で同定した、新規 NMD 阻害化合物投与により、マウス固体レベルでの NMD 阻害を次世代シーケンズを用いたゲノムワイド解析により証明した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Haruhara Kotaro, Suzuki Toru, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Kurotaki Daisuke, Kawase Wataru, Uneda Kazushi, Kobayashi Ryu, Ohki Kohji, Kinguchi Sho, Yamaji Takahiro, Kato Ikuma, Ohashi Kenichi, Yamashita Akio, Tamura Tomohiko, Tsuboi Nobuo, Yokoo Takashi, Tamura Kouichi	4. 巻 101
2. 論文標題 Deficiency of the kidney tubular angiotensin II type1 receptor-associated protein ATRAP exacerbates streptozotocin-induced diabetic glomerular injury via reducing protective macrophage polarization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney International	6. 最初と最後の頁 912~928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.kint.2022.01.031	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 Taguchi Shinya, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Urate Shingo, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Tsukamoto Shunichiro, Kamimura Daisuke, Kinguchi Sho, Yamashita Akio, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Effects of tumor necrosis factor- inhibition on kidney fibrosis and inflammation in a mouse model of aristolochic acid nephropathy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23587
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-02864-1	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 -
1. 著者名 Mannen Taro, Goto Masato, Yoshizawa Takuya, Yamashita Akio, Hirose Tetsuro, Hayano Toshiya	4. 巻 32
2. 論文標題 Distinct RNA polymerase transcripts direct the assembly of phase-separated DBC1 nuclear bodies in different cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 ar33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-02-0081	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 -

1. 著者名 Tsukamoto Shunichiro, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Urate Shingo, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Yamada Takayuki, Kinguchi Sho, Kamimura Daisuke, Yamashita Akio, Sano Daisuke, Nakano Masayuki, Hashimoto Tatsuo, Tamura Kouichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Tissue-specific expression of the SARS-CoV-2 receptor, angiotensin-converting enzyme 2, in mouse models of chronic kidney disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96294-8	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Miyatake Satoko, Matsumoto Naomichi et al	4. 巻 7
2. 論文標題 De novo ATP1A3 variants cause polymicrogyria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd2368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abd2368	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 -

1. 著者名 Urate Shingo, Wakui Hiromichi, Azushima Kengo, Yamaji Takahiro, Suzuki Toru, Abe Eriko, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Tsukamoto Shunichiro, Kinguchi Sho, Uneda Kazushi, Kanaoka Tomohiko, Atohe Yoshitoshi, Funakoshi Kengo, Yamashita Akio, Tamura Kouichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Aristolochic Acid Induces Renal Fibrosis and Senescence in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12432 ~ 12432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms222212432	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 -

1. 著者名 Abe Eriko, Yamashita Akio, Hirota Keigo, Yamaji Takahiro, Azushima Kengo, Urate Shingo, Suzuki Toru, Tanaka Shohei, Taguchi Shinya, Tsukamoto Shunichiro, Uehara Tatsuki, Wakui Hiromichi, Tamura Kouichi, Takahashi Hidehisa	4. 巻 12
2. 論文標題 Angiotensin II type-1 receptor-associated protein interacts with transferrin receptor-1 and promotes its internalization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17376
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22343-5	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 -

1. 著者名 Johnson Jared L., Yaron Tomer M., Huntsman Emily M., Yamashita A., Cantley Lewis C.ら	4. 巻 613
2. 論文標題 An atlas of substrate specificities for the human serine/threonine kinome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 759 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-022-05575-3	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

[学会発表] 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 山下 暁朗、藤原 俊伸
2. 発表標題 mRNA翻訳による生命現象制御の新展開
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 山下 暁朗
2. 発表標題 mRNA監視機構制御因子SMG1キナーゼによる酸化ストレス応答制御機構
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 山下 暁朗、藤原 俊伸
2. 発表標題 真核生物翻訳
3. 学会等名 第45回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今井大達, 内海大介, 高橋健造, 山下暁朗
2. 発表標題 Single-step purification of endogenous ribosome-bound mRNAs using monoclonal antibody against ribosomal P-stalk.
3. 学会等名 第23回日本RNA学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 水口真理子, 高橋良明, 田中礼子, 今泉直樹, 山下暁朗, 福島卓也, 田中勇悦
2. 発表標題 ATLにおけるOX40/OX40Lの役割
3. 学会等名 第8回日本HTLV-1学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 藤本明洋ら 86人	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用～エピゲノム、トランスクリプトーム、マルチオミクス、オープンデータベースの利活用～	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 転写後制御のスクリーニング方法及びシステム	発明者 山下暁朗、大野茂男	権利者 横浜市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、2022-114033	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

琉球大学 先進医療創成科学 山下暁朗 研究室
<https://yamashita-lab.labby.jp/>

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		
米国	Weill Cornell Medicine		