

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07304

研究課題名(和文)mRNAスプライシングを正確に保つ機構を逆手にとったがん抑制戦略

研究課題名(英文)The development of therapeutic antisense oligonucleotide targeted to aurora kinase B as an anti-cancer drug

研究代表者

福村 和宏 (FUKUMURA, KAZUHIRO)

藤田医科大学・総合医科学研究所・助教

研究者番号：80622117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：オーロラBは、多くのがん細胞種で過剰発現しており、ゲノム不安定性を生み出す。それゆえ、オーロラB阻害剤は抗がん性を持つ。本研究では、RNA結合タンパク質RNPS1のオーロラB mRNAへの結合を阻害する事で、異常スプライシングを誘導するアンチセンスオリゴヌクレオチド創出に成功した。このオリゴヌクレオチドによって、オーロラBの発現を低下させ、結果として抗がん効果が得られるのではないかと期待している。さらに、RNPS1がPSAPと呼ばれる複合体を形成し、機能することで、オーロラBの正確なスプライシングを保証している事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オーロラBの阻害剤は、アポトーシスを引き起こすことができるため、細胞増殖が盛んながん細胞に非常に有効であると考えられている。現在までに複数のオーロラB阻害剤が開発されているが、臨床試験を突破し、医薬品として認められたものはない。これまでの阻害剤は、低分子化合物スクリーニングにより得られたものであり、オーロラBの活性中心に直接結合することで、活性を阻害する。しかしながら、本研究で開発したオリゴヌクレオチドは、オーロラBの遺伝子発現自体を阻害する。それゆえ、これまでの研究開発に一石を投じるものになるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Aurora B is overexpressed in many cancer cell types, causing genomic instability. Therefore, Aurora B inhibitors have anti-cancer properties. In this study, we succeeded in developing an antisense oligonucleotide that induces abnormal splicing by inhibiting the binding of the RNA-binding protein RNPS1 to aurora B mRNA. It is hoped that this oligonucleotide will reduce the expression of Aurora B, resulting in an anti-cancer effect. Furthermore, it was revealed that RNPS1 forms a complex called PSAP and ensures the accurate splicing of Aurora B mRNA.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：オーロラB RNPS1 mRNAスプライシング

1. 研究開始当初の背景

オーロキナーゼ B は、細胞周期の分裂期に発現量が増加・活性化し、染色体の正常な分配に大きな役割を果たしているセリン・スレオニンリン酸化酵素であり、腫瘍形成に大きく関与する。なぜならば、ほとんどのがん細胞でオーロキナーゼ B が過剰発現していることに加え、人為的に正常細胞にオーロキナーゼ B を過剰発現させた場合でも染色体の正確な分配が阻害され、腫瘍形成が起きるためである。また、オーロキナーゼ B 阻害剤によってがん細胞の細胞分裂停止およびアポトーシスを引き起こすことができるため、抗がん剤の有効なターゲットと考えられている。しかしながら、現在までに複数のオーロキナーゼ B 阻害剤が開発されているが、臨床試験を突破し、医薬品として認められたものはない。実際、グラクソスミスクライン社の GSK1070916A、アストラゼネカ社の Barasertib (AZD1152) などオーロキナーゼ B をターゲットとした低分子化合物が存在しているが、これまで、医薬品として承認されたケースはない。本研究では、現状を打破すべく、アンチセンスオリゴヌクレオチドによるオーロキナーゼ B 阻害剤の構築を目指した。

2. 研究の目的

これまでのオーロキナーゼ B 阻害剤の作用機序は、オーロキナーゼ B に直接結合し、そのリン酸化酵素活性を阻害する低分子化合物であるが、この手法には限界があるのではないかと感じた。そこで、本研究ではオーロキナーゼ B 遺伝子の遺伝子発現自体を抑えることによって抗がん性を発揮する医薬品の開発という新しい着想に基づいている。具体的には、オーロキナーゼ B の mRNA スプライシングをアンチセンスオリゴヌクレオチドにより特異的に阻害することで、オーロキナーゼ B の発現量を低下させ、抗がん作用を発揮させることを目指した。申請者は、mRNA スプライシングを作用点としたオーロキナーゼ B 標的抗がん剤を構築するために、すでにオーロキナーゼ B 遺伝子の mRNA スプライシング機構について研究を進めている。これまでの解析から、RNA 結合タンパク質である RNPS1 がオーロキナーゼ B mRNA のスプライシングに必要とされることを明らかにしている。実際、RNPS1 を RNAi 法によりノックダウンすると、オーロキナーゼ B の正常なスプライシングが阻害され、結果として、オーロキナーゼ B の発現が著しく低下することを明らかにしていた。加えて、この RNPS1 がオーロキナーゼ B mRNA 上の第 5 エキソンに結合していることもすでに同定しており、この領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを用いることで、RNPS1 の結合を阻害し、オーロキナーゼ B の遺伝子発現の低下を誘導することが考えた。本研究では、このオーロキナーゼ B mRNA の発現抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチドを開発することを目的とした。

3. 研究の方法

RNPS1 結合配列に対するアンチセンスオリゴによって、オーロキナーゼ B のスプライシングを阻害する

オーロキナーゼ B mRNA の正確なスプライシングに必須の因子 RNPS1 の結合領域を同定しているため、その領域に相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、化学合成する。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、生体内でも RNA 分解酵素に対する安定性が高く、加えて細胞毒性も少ないモルフォリノアンチセンスオリゴを使用したい。まずは、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドを培養細胞に導入し、オーロキナーゼ B の正常なスプライシングの阻害と、それに伴うタンパク質の産生量低下が誘導できるかを確認する。加えて、一般的なオーロキナーゼ阻害剤でも観察されるような細胞周期の停止、アポトーシスが引き起こされるかも解析する。もしもアンチセンスオリゴヌクレオチドで阻害できない場合は、RNPS1 の結合配列と同じ配列を持つような RNPS1 のデコイオリゴヌクレオチドを合成し、競合阻害を試みる。

RNPS1 によるオーロキナーゼ B キナーゼの正確なスプライシングを保證する機構の詳細を明らかにする

すでに RNPS1 が、オーロキナーゼ B mRNA の正確なスプライシングを制御することを明らかにしている。しかしながら、そのメカニズムの詳細は良くかかっていない。そこで、既知の RNPS1 の相互作用因子のノックダウンを行い、オーロキナーゼ B mRNA のスプライシング制御に関与する因子群を探索していく。加えて、RNPS1 のノックダウン細胞では、トランスクリプトームの正確なスプライシングが破綻しているのではないかと想定しており、RNA-Seq 解析により明らかにする。

4. 研究成果

我々は、これまでに培養細胞を用いた解析から RNPS1 が、オーロキナーゼ B mRNA の第 5 エキシソンの特定の領域に結合し、正確なスプライシングを保證していることを明らかにしていた。実際、RNPS1 の発現阻害を行うと、オーロキナーゼ B mRNA の正確なスプライシングが阻害され、タンパク質量が著しく減少する。そこで、この領域に対するアンチセンスオリゴヌクレオチド

ドを細胞内に導入することで、オーロキナーゼ B mRNA への RNPS1 の結合を阻害し、特異的に正確なスプライシングを阻害する事ができるのではないかと考えた。3年間の研究期間を通して、RNPS1 のオーロキナーゼ B mRNA への結合を阻害し、正確なスプライシングを阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドを創出する事に成功した。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは実際、オーロキナーゼ B のタンパク質レベルも低下させた。本研究では、さらに RNPS1 によるオーロキナーゼ B mRNA の正確なスプライシング制御の詳細なメカニズムを明らかにする事にも成功した。RNPS1 は、PININ, SAP18 と共に PSAP と呼ばれる複合体を形成するが、この PSAP 構成因子のノックダウンによっても異常スプライシングが誘導された。つまり PSAP 複合体がオーロキナーゼ B mRNA の正確なスプライシングに必須である事を示す。PSAP は、これまでに我々が同定したオーロキナーゼ B の第 5 エキシソンの特定領域に結合している事も明らかにした。さらに RNPS1、PININ、SAP18、それぞれのノックダウン細胞の RNA-Seq を行った。その結果、オーロキナーゼ B 以外に、共通して異常スプライシングが生じる遺伝子も同定する事ができた。PSAP 複合体は、機能未知の複合体であり、新たな機能の発見に繋がると期待しており、さらに研究を続けていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究分担者	恵美 宣彦 (EMI NOBUHIKO) (30185144)	藤田保健衛生大学・医学部・教授 (33916)	削除:2019年5月24日

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