

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08378

研究課題名(和文) 膵臓ガンで延命を可能にする遺伝子変異：機序解析と実践への基盤提示

研究課題名(英文) Mutations for life lengthening of pancreatic cancer patients: mechanism and proposed theory for practice

研究代表者

井上 晃 (INOUE, Akira)

大阪公立大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号：50109857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究に組込む形でRBM10遺伝子についてその生物学的重要性と変異RBM10の疾病への関わりに関する知見を整理し、総説として発表した。またRBM10の新たな分子細胞生物学的特性を明らかにした。すなわち、細胞内RBM10には活性を制御する抑制性の自己調節機構が作動すること、さらに正常な細胞分裂にRBM10は必須であることを原著論文として発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RBM10の総説執筆作業は本基盤研究の論理性と課題目標の正しさを改めて確認させるものとなった。総説は好評で、23の国際会議・学会からの講演招待や20の雑誌社からの編集委員あるいはRBM10特集号のGuest Editorの就任依頼となっている。また、NCBIのデータベースPubMedではRBM10論文群の最初に本総説が示され(現時点)、遺伝子部門(ヒトRBM10遺伝子)では主要論文5編の1つが本総説、もう1つはRBM10の自己調節機構を述べた我々の論文である。更にRBM10による細胞分裂の制御を発表。これら論文の学術的意義はRBM10の分子細胞生物学的特性を新たに明らかにした点にある。

研究成果の概要(英文)：Incorporating into the scientific research, A. Inoue reviewed biological importance of RBM10 gene, and its mutations and associated diseases in the journal GENE. The work confirmed logical correctness of the research subject and the aimed goal. The review has been well received: 23 lecture invitations from international conferences/meetings and 20 inauguration requests as editor or guest editor for special issues on RBM10 from various journals have been offered (as of Apr. 15, 2023). In addition, we published two RBM10 papers, which show the molecular and cellular importance of RBM10. One demonstrates the occurrence of suppressive self-regulatory mechanism for RBM10 to control its cellular activity, and the other shows that RBM10 is essential for normal cell division. However, the research project has not gone far enough as originally planned.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：RBM10/S1-1 splicing regulator RBM10遺伝子変異と疾病 活動度の自己調節機構 S1-1 nuclear body 細胞分裂機構とRBM10 総説 RBM10 Wikipedia (英語版)全面改訂

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

本申請者は細胞核たんぱく質 RBM10 を発見し (1996 年)、RBM10 が特定の遺伝子転写体 (pre-mRNAs) に働いて mRNA に取込むべき exon を選択して生成 mRNA (遺伝子産物) に多様性を与える選択的スプライシング反応の制御因子であることを明らかにしてきた (2014 年)。一方、疾病の変異遺伝子研究により RBM10 の変異は胎生期の様々な形成異常や成人の多様なガンなどを引き起こすことが報告されてきた。この中で膵臓ガンは診断後の平均余命の短い困難なガンであるにも拘らず、RBM10 が変異した患者は生存を続けるという注目すべき論文が 2 篇報告された。一方、本申請者らは、RBM10 の選択的スプライシングの機能に必須なドメイン領域 (C2H2 ZnF) を RBM10 の分子内に明らかにしていたが、上記膵臓ガン論文の補足データは RBM10 の変異がこの狭い領域に集中する事を示していた。

## 2. 研究の目的

本研究は RBM10 変異による膵臓ガン患者延命の分子・細胞生物学的機序を明らかにし、ゲノム編集による膵臓ガン治療法への学術的基盤を提示する事を目的とした。

## 3. 研究の方法

### A. 培養細胞を用いる研究

(1) 膵臓と他の様々な臓器のガンおよび非ガン組織の培養細胞を数多く用意し、各細胞の RBM10 に C2H2 ZnF の変異や他のガンに見出される RBM10 の変異を CRISPR/Cas9 法で導入。得られた細胞を解析し、C2H2 ZnF 変異が膵臓ガン細胞の細胞死を促進するかどうか、あるいは細胞増殖を抑制するかどうかを検討・検証する。

### (2) RBM10・C2H2 ZnF の変異による延命機構の解明

上で得た細胞を用い、RBM10 の C2H2 ZnF 変異の「有」「無」の下に細胞が生成する全転写体を RNA-Seq で解析し、この C2H2 ZnF の変異で発現が変わる遺伝子群を延命機構に関わる遺伝子群候補とする。

ついでこれら候補遺伝子の中から、RBM10 による選択的スプライシング「有り」「無し」の下に、細胞死や細胞増殖、あるいは細胞分裂の過程に有意な違いを示すものを選び出し、その分子機構の解析へと入る。ここでも、膵臓と他の臓器のガン細胞で得られる (異なるであろう) 結果に注目し、RBM10 下流遺伝子のどれが、あるいはどの反応が延命に関わるかを決定する。この研究成果は、RBM10 変異で起きる細胞内変化の分子生物学的機序を明らかにするばかりでなく、RBM10 の下流遺伝子やその産物が将来、膵臓ガン治療の標的対象となる可能性があり、大切と考える。

### B. 動物を用いた研究

膵臓ガンのモデルマウス作製法は文献上すでにいくつか確立されている。

RBM10 の変異導入マウス作製には、リコンビナーゼ Cre を用いる Cre-LoxP 系を使う

(伊地知, 膵臓 25, 28-34, 2010)。まず、(1)膵臓で特異的に発現する遺伝子 *Ptf1a* のプロモーター配列とタモキシフェンで活性化する *Cre-ERT* 配列を連結した組換え体の導入マウスをつくる。ついで、(2)RBM10 遺伝子の C2H2 ZnF あるいは(変異で肺ガンの悪性化をもたらす)C4 ZnF の exon を *LoxP* で挟んだマウスを作製する。(3)これらマウスに(1)の *Cre-ERT* マウスを交配し、得られたマウスを使って、(4)マウスに膵臓ガンを発症させ、ガンの種々の進行時期にタモキシフェンを投与して膵臓 RBM10 の C2H2 ZnF あるいは C4 ZnF の欠失変異を導入。これらの変異で膵臓ガンの増殖抑制や悪性化抑制の結果を得たならば、上記 A(2)の解析法により延命の分子生物学的機構を検証する。また、C2H2 ZnF 部位の特定アミノ酸に変異を導入したマウスの作製も検討する。

#### 4. 研究成果

RBM10 の総説「RBM10: Structure, functions, and associated disease」(学術雑誌 GENE)の執筆、Wikipediaの”RBM10”(英文版)の全面改訂、さらに Genes Cells に原著論文「RBM10 regulates centriole duplication in HepG2 cells by ectopically assembling PLK4-STIL complexes in the nucleus」そして IJMS に原著論文「Sequestration of RBM10 in nuclear bodies: Targeting sequences and biological significance」の発表を行なった。目下、RBM10 が膵臓で制御する遺伝子群の同定を目的として、正常マウスと特定時期に RBM10 欠失を誘導させたマウスの膵臓を用い、RNA-Seq を基とする解析を進めている。本基盤研究は、現在も進行中。研究展開は随分と遅れた状況にあるが、本課題研究は続ける意義があると考えます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akira Inoue	4. 巻 783
2. 論文標題 RBM10: Structure, functions, and associated diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 GENE	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) 10.1016/j.gene.2021.145463	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 L.-Y. Wang, S.-J. Xiao, H. Kunimoto, K. Tokunaga, H. Kojima, M. Kimura, T. Yamamoto, N. Yamamoto, Z. Hong, K. Nishio, T. Tani, K. Nakajima, K. Sunami, and A. Inoue	4. 巻 22
2. 論文標題 Sequestration of RBM10 in Nuclear Bodies: Targeting Sequences and Biological Significance.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	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) 10.3390/ijms221910526	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 Kunimoto Hiroyuki, Inoue Akira, Kojima Hirotada, Yang Junhao, Zhao Hong, Tsuruta Daisuke, Nakajima Koichi	4. 巻 25
2. 論文標題 RBM10 regulates centriole duplication in HepG2 cells by ectopically assembling PLK4 STIL complexes in the nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 100 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12741	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國本 浩之, 井上 晃, 趙 虹, 中嶋 弘一
2. 発表標題 RBM10はHepG2において中心小体複製に関わる新規の調節因子である.
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Akira Inoue	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Wikipedia	5. 総ページ数 18
3. 書名 RBM10	

〔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	國本 浩之 (Kunimoto Hiroyuki)  (80372853)	大阪公立大学・大学院医学研究科・助教  (24405)	
研究分担者	山本 直樹 (Yamamoto Naoki)  (70312296)	国際医療福祉大学・基礎医学研究センター・教授  (32206)	
研究分担者	中嶋 弘一 (Nakajima Koichi)  (00227787)	大阪公立大学・大学院医学研究科・特別研究員  (24402)	

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
---------	---------