

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16831

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌を高悪性化させるスプライシング異常を標的とする治療法の開発

研究課題名(英文) Developing therapies that target splicing abnormalities that make squamous cell carcinoma of the head and neck highly malignant.

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：PAR-CLIP(photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation)を用いて頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)に特異的なSF3B2の結合配列を同定し、その配列をもったデコイを作成しHNSCC細胞株に導入した。しかし、コントロール、特異的配列をもったデコイともに導入した細胞株において細胞死を認めた。これはデコイの不安定性のため修飾した物質による細胞毒性が強かったことが原因と考えられた。さらに修飾の条件を検討したが、状況は改善せず現時点で技術的にデコイを用いた治療法の開発は困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬によるスプライシング制御の治療法が開発されれば、従来の低分子医薬や抗体医薬とは異なり、癌の高悪性化に関わる選択的スプライシング異常をRNAのレベルで特異的に制御できるため、新たなアプローチで、特異性が高く、また副作用が少ない新たな治療法への発展が期待できる。本研究ではSF3B2の結合配列は同定でき、安全で腫瘍への送達可能な核酸医薬が開発されれば治療法として急速に普及することが予想されることから、その一歩として意義ある研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Using PAR-CLIP(photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation), we identified the binding sequence of SF3B2 specific for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Decoys with the sequence were generated and introduced into HNSCC cell lines. However, cell death was observed in both control and decoys with the specific sequence in the transfected cell lines. The result was attributed to cytotoxicity of the modifier due to the instability of the decoys. Further modification conditions were investigated, but the situation did not improve and it was technically difficult to develop a decoy-based therapy at this time.

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 核酸医薬

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) の治療は解剖学的進展度に基づいて行われるが、悪性度を規定する分子メカニズムはまだ明らかになっておらず、またそれを標的にした治療法はまだ存在しない。我々は RNA スプライシング制御因子 SF3B2 の高発現が HNSCC に発現する RNA スプライシングパターンを変化させ HNSCC の悪性度を増大することを見出した。そこで本研究では、核酸医薬の一つであるデコイを用いて HNSCC を高悪性化に導く選択的スプライシング異常を特異的に制御する手法を開発する。デコイは HNSCC の高悪性化に関わる選択的スプライシング異常を特異的に狙った制御が可能で、またスプライシング全体には作用しないため副作用を回避できる点で本研究の目的に適していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、配列特異的に阻害するデコイを用いて HNSCC を高悪性化する SF3B2 による選択的スプライシング異常を標的として制御する治療法を開発することである。

3. 研究の方法

(1) SF3B2が選択的スプライシング異常を誘導しHNSCCを高悪性化するメカニズム

HNSCC 細胞内の SF3B2 高発現により細胞増殖能が亢進し、NOTCH のようながん関連シグナル伝達経路が活性化する結果を得た。SF3B2 高発現により選択的スプライシング異常が誘導され HNSCC が高悪性化したことが予測されることから、SF3B2 がどの遺伝子の mRNA 前駆体に直接結合しスプライシングを制御するか同定する。そのために、RNA 結合タンパク質がどの RNA 領域に直接結合するのかを検出できる PAR-CLIP (photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) を行い、SF3B2 が結合する RNA 領域を解析することで、HNSCC の高悪性化に関与する遺伝子とその配列を同定する。

(2) SF3B2が親和性をもつ結合配列を同定する

SF3B2 が高親和性を持つ RNA 配列を、タンパク質が認識する核酸配列を同定する SELEX 法によって同定する。SELEX 法によって様々な RNA 配列パターンをもった RNA ライブラリーから SF3B2 タンパク質に結合する RNA を同定することができる。SF3B2 タンパク質は浮遊細胞 Expi293 細胞で大量に発現させ、AKTA FPLC システムによって高純度に精製する。また RNA ライブラリーは核酸の受託業者で合成する。これによって SF3B2 の選択的 RNA スプライシングを強く阻害する配列を同定することが期待できる。

(3) SF3B2 誘導性選択的スプライシング異常に対する核酸医薬の抗腫瘍効果メカニズム

SF3B2 の前立腺癌の AR への結合配列を基に作製した核酸医薬は HNSCC 細胞においても細胞増殖抑制効果を示したことから、核酸医薬が細胞内で作用し選択的スプライシングが制御されたことが予測された。同定した SF3B2 が結合する配列を基にデコイを作製、細胞株に導入し、デコイによって抗腫瘍効果が得られるか検証する。

4. 研究成果

PAR-CLIP を用いて HNSCC に特異的な SF3B2 の結合配列を同定した。(図 1 , 2) 特異的な配列をもったデコイを作成し HNSCC 細胞株に導入した。しかし、特異的な配列をもったデコイ、コントロールのデコイともに導入した細胞株において細胞死を認めた(図 3、 図 4)。これはデコイの不安定性のため修飾した物質の細胞毒性が強かったことが原因と考えられた。さらに修飾の条件を検討したが、状況は改善せず現時点で技術的にデコイを用いた治療法の開発は困難であった。今後はデコイの細胞毒性を抑えた安定性の確保について検討していく必要があると考えられた。

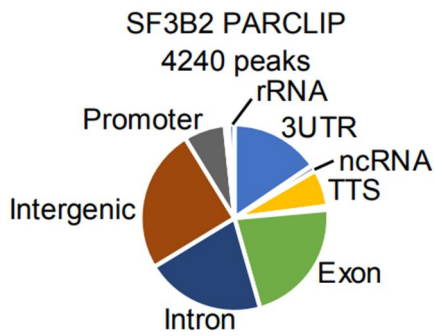


図 1

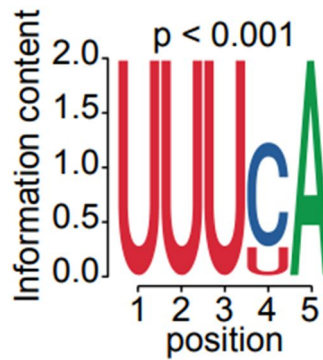


図 2

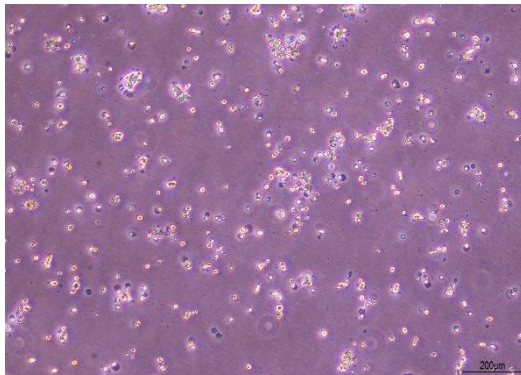


図 3 .Control デコイ

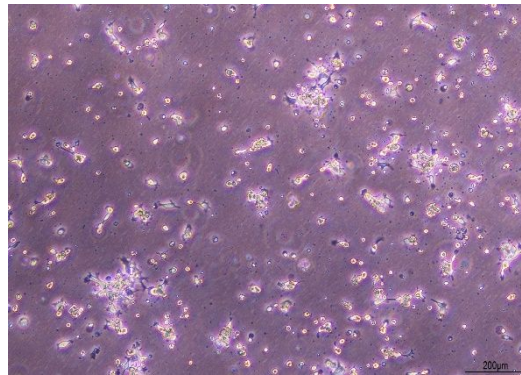


図 4 .SF3B2 デコイ

本研究で新規手法が開発されれば、従来の低分子医薬や抗体医薬とは異なり、癌の高悪性化に関わる選択的スプライシング異常を RNA のレベルで特異的に制御できるため、新たなアプローチで、特異性が高く、また副作用が少ない新たな治療法への発展が期待できる。本研究では SF3B2 の結合配列は同定できており安全で腫瘍への送達可能な核酸医薬が開発されれば治療法として普及することが考えられる。

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