

SPF45 依存的スプライシングを標的とした抗がん剤耐性抑制戦略

藤田医科大学 腫瘍医学研究センター
講師 福村 和宏

1. 研究の背景・目的

mRNA 前駆体から正確にイントロンを取り除く mRNA 前駆体スプライシング(以下スプライシング)は、正常な遺伝子発現に必須な過程である。さらに高等真核生物では、特定のエクソンを選択し、スプライシングのパターンを発生段階や組織特異的に変化させる『選択的スプライシング』を駆使する。これにより正常細胞では、スプライシングを制御することによって1つの遺伝子から多種類のタンパク質を作り出し、プロテオームの多様性、ひいては生物としての高次性を生み出す(図1)。実際、ヒトでは22,000程度の遺伝子の90%が選択的スプライシングを受け、120,000種類以上のタンパク質を作り出す。

このスプライシング制御の破綻は、がんやその他の遺伝性疾患を引き起こす。実際、全遺伝性疾患の15%はスプライシング異常が原因である[Scotti et al., *Nat. Rev. Genet.*, 17, 19-32 (2016)]。このような知見から、申請者はがん細胞において、スプライシング制御の破綻によって異常なプロテオームが生成され、抗がん剤耐性獲得に寄与するのではないかと考えている。この仮説の証明のための鍵となるのが、スプライシング制御因子 RBM17/SPF45 である。ヒト *RBM17/SPF45* 遺伝子は、がん細胞で過剰発現することで抗がん剤耐性獲得に寄与することが知られている[Cancer Res.65(15),6593-6600 (2005)]。実際、申請者らは、大腸癌再発後の化学療法施行症例において、再発後無増悪生存期間は、RBM17/SPF45 発現陽性例が有意に不良であることを見出した[Nagamine et al. *Anticancer research*, 43(10) 4663-4672 (2023) & 未発表データ](図2)。しかしながら、そのメカニズムは解明されていない。これまで、申請者は RBM17/SPF45 とその相互作用因子である SAP30BP が新規 RNA スプライシング制御因子であることを明らかにしてきた[Fukumura et al. *Nat. Commun.* 12, 4910 (2021)] [Fukumura et al. *Cell Rep.* 42, 113534 (2023)]。

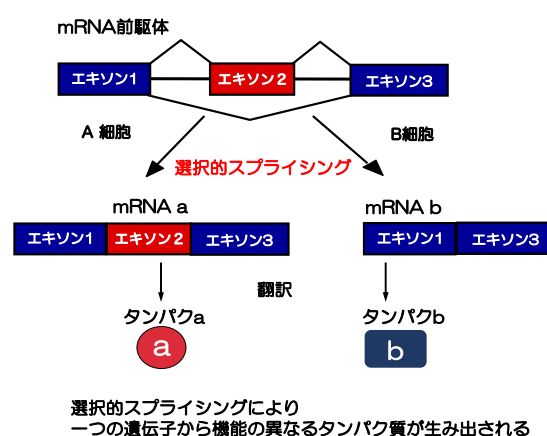


図1. 選択的スプライシング制御機構

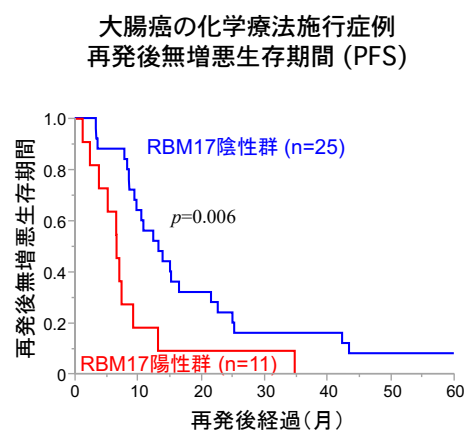


図2. 大腸癌の化学療法施行症例 RBM17 陰性群と RBM17 陽性群の再発後無増悪生存期間(PFS) (未発表)

申請者は、RBM17/SPF45 による抗がん剤耐性獲得と RBM17/SPF45 依存的スプライシング制御機構を矛盾なく解明することこそ、抗がん剤耐性の未解決問題を解決する鍵になると考えている。すなわち

『がん細胞で過剰発現した RBM17/SPF45 が、多種類の原因遺伝子の異常スプライシングを引き起こし、発現量変化や異常なプロテオームの生成を誘導する。その結果として抗がん剤耐性を獲得するのではないか』そして、『RBM17/SPF45 依存的スプライシング分子機構の全貌を明らかにできれば、その機能阻害剤を構築することが可能となり、抗がん剤耐性を抑える創薬につながるのではないか』と考えた。

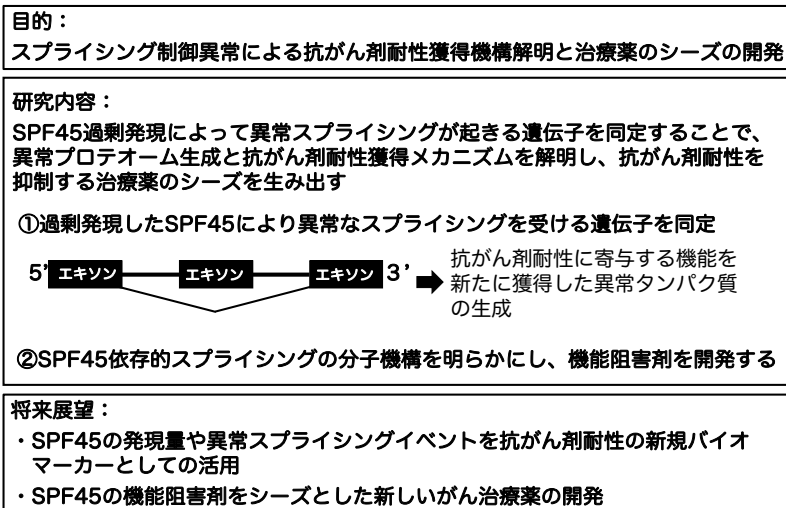


図3 本研究の目的、研究内容、将来展望

2. 研究の対象並びに方法

RBM17/SPF45 依存的スプライシングを受ける抗がん剤耐性獲得責任遺伝子の同定

培養細胞を用いて、RBM17/SPF45、SAP30BP の発現阻害を行い、大規模トランスクリプトーム配列解析 (RNA-Seq) を遂行する。SPF45 の発現抑制細胞と SAP30BP 発現抑制細胞に共通してスプライシングパターンが変化する遺伝子も選り出す。これらの同定した遺伝子群は、パスウェイ解析ソフトウェアを用いて抗がん剤耐性に寄与するかどうかを調査し、抗がん剤耐性獲得に機能しうる遺伝子を絞り込む。さらに、これらの遺伝子群の cDNA をクローニングし、それぞれ HeLa 細胞を使って過剰発現させ、複数の抗がん剤（ビンクリスチン、ゲムシタビン、ペメトレキセド等）に対する生存率を調べる計画である。抗がん剤耐性を示す新しいスプライシングアイソフォームを発見できた場合、そのアイソフォームがコードするタンパク質のドメインの欠失や獲得が生じているか、その影響によって相互作用するタンパク質が変化するかどうか解析し、より詳細なメカニズムを解明していく。また、培養細胞レベルで抗がん剤耐性に寄与することが明らかになった異常タンパク質については特異的に認識する抗体を作成し、臨床検体サンプルにおける発現を免疫染色によって解析する。

3. 研究結果

申請者が行なった RBM17/SPF45KD 細胞と SAP30BP KD 細胞の RNA-Seq データから、DNA 修

復に関与する RECQL4 や FANCA が RBM17/SPF45 のスプライシング制御を受け、DNA 修復能を促進して治療抵抗性を獲得することが示唆された (図 4)。さらに、RBM17/SPF45 の発現量は DNA 修復関連遺伝子の発現量と強い相関を示した (図 5)。これらの解析結果をもとに、抗がん剤耐性に関与する責任遺伝子や異常タンパク質の同定を進め、さらに臨床検体での確認を行うことで、臨床的な意義を強化する。

現在、これらの遺伝子群の cDNA をクローニングし、HeLa 細胞に過剰発現させ、複数の抗がん剤 (ビンクリスチン、ゲムシタビン、ペメトレキセド等) に対する生存率が増加するか検討中である。今後、藤田医科大学腫瘍医学研究センターが保有する臨床検体を用いて発現を免疫染色によって確認し、RBM17/SPF45 過剰発現と相関関係があるかどうか解析する。さらに、化学療法に不応になったがん組織の RNA-Seq データと培養細胞レベルで行った RNA-Seq を比較するという計画も現在進行中である。実際に抗がん剤耐性化したヒトのがん組織でも in vitro で確認した現象が起こることを確認する。

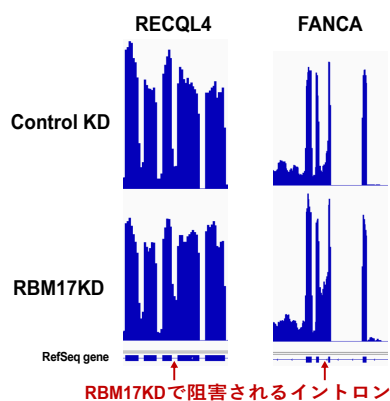


図 4 RBM17/SPF45KD 細胞の RNA-Seq RECQL4 遺伝子と FANCA 遺伝子の特定のイントロンのスプライシングが阻害される。(未発表)

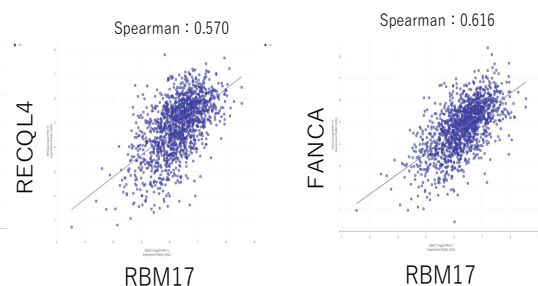


図 5 RBM17/SPF45 の発現量は DNA 修復関連遺伝子の発現量と強い相関を示す (未発表) (Cancer Cell Line Encyclopedia を用いた全細胞株の遺伝子相関解析)

4. 考察

がん細胞で過剰発現した SPF45 が、下流の短いイントロンを持つ DNA 修復関連遺伝子のスプライシングを亢進することで、多種類の抗がん剤耐性を獲得するのではないかと考えられる。さらに、詳細な解析を進めることによって、抗がん剤耐性に寄与する責任遺伝子の同定を行いたい。さらに、臨床検体を用いて発現を免疫染色によって確認を行い、RBM17/SPF45 過剰発現と相関関係があるかどうか解析を行なっていきたい。さらに、SPF45 の相互作用因子 SAP30BP が同様に抗がん剤耐性に寄与する可能性について実験計画中である。

5. 文献

1. Sampath J, Long PR, Shepard RL, Xia X, Devanarayan V, Sandusky GE, Perry WL, III,

Dantzig AH, Williamson M, Rolfe M, Moore RE. Human SPF45, a splicing factor, has limited expression in normal tissues, is overexpressed in many tumors, and can confer a multidrug-resistant phenotype to cells. *Am J Pathol.* 2003; 163: 1781-1790.

2. Perry WL, III, Shepard RL, Sampath J, Yaden B, Chin WW, Iversen PW, Jin S, Lesoon A, O'Brien KA, Peek VL, Rolfe M, Shyjan A, Tighe M, Williamson M, Krishnan V, Moore RE, Dantzig AH. Human splicing factor SPF45 (RBM17) confers broad multidrug resistance to anticancer drugs when overexpressed—a phenotype partially reversed by selective estrogen receptor modulators. *Cancer Res.* 2005; 65: 6593-6600.

3. **Fukumura K**, Yoshimoto R, Sperotto L, Kang HS, Hirose T, Inoue K, Sattler M, Mayeda A. SPF45/RBM17-dependent, but not U2AF-dependent, splicing in a distinct subset of human short introns. *Nat Commun.* 12: 4910(2021).

4. **Fukumura K**, Venables J, Mayeda A. SPF45/RBM17-dependent splicing and multidrug resistance to cancer chemotherapy. *Molecular & Cellular Oncology*, 8:6, 1996318 (2021).

5. **Fukumura K**, Sperotto L, Seuß S, Kang H, Yoshimoto R, Sattler M, Mayeda A. SAP30BP interacts with RBM17/SPF45 to promote splicing in a subset of human short introns. *Cell reports*, 42, 113534 (2023)

6. 論文出版・学会発表

Fukumura K*, Masuda A, Takeda J, Nagano O, Saya H, Ohno K and Mayeda A. RNPS1 in PSAP complex controls periodic pre-mRNA splicing over the cell cycle. *iScience*, 27, 12, 111400