

新規スプライシング制御因子 SPF45 から解明する抗がん剤耐性メカニズム

藤田医科大学 医科学研究センター
遺伝子発現機構学研究部門 講師 福村 和宏

1. 研究の背景・目的

抗がん剤治療は、がん治療の重要な柱の一つであるが、抗がん剤耐性となったがんの治療は依然として難しい。SPF45 は、様々ながん細胞種で過剰発現し、それにより多種類の抗がん剤に対して耐性を獲得することが報告されている(文献1, 2)。しかし、SPF45 が、いかにして抗がん剤耐性に関与するか、そのメカニズムは未だに一切知られていない。

一方、応募者は、SPF45 が短いイントロンの一部において、スプライシング必須因子であることを明らかにした(文献3, 4)。ヒト遺伝子のイントロンの長さは、43~100 万塩基以上に分布しており、その差は1 万倍を優に超えるが、一寸の狂いもなくスプライシングされる。正確なスプライシングにはイントロンとエクソン境界を認識する必要があり、その不可欠な目印がシグナル配列、すなわち、5'スプライス部位、ブランチ部位、ポリピリミジン配列 (PPT) と 3'スプライス部位である。これらのシグナル配列には、それぞれスプライシング必須因子である U1 snRNP、U2 snRNP、そして U2AF 二量体が結合し、スプライソソーム A 複合体を形成することでイントロンが認識される。しかし、A 複合体は、ヒトゲノムに存在する短いイントロンをはみ出すほど大きい。我々は、短いイントロンのスプライシング必須因子として SPF45 を同定した。多くの短いイントロンにおいて、U2AF 二量体ではなく、SPF45 に依存するスプライシングが起こっていた。SPF45 依存的にスプライシングされる短いイントロンの PPT 配列は非常に短く、U2AF 二量体が結合していなかった。さらに、SPF45 は U2AF 二量体に置き換わって U2 snRNP と、その構成タンパク質である SF3b155 (SF3B1) を介して結合することで、スプライシングを引き起こされることが判明した(図 1)。U2AF 二量体は、スプライシングの必須因子として知られていたので、U2AF 二量体の代わりに SPF45 を利用する新しいスプライシング機構は、まさに常識を覆す発見となった。

一見、無関係と思われるこの両事象の関係性を矛盾なく解明することこそが、抗がん剤耐性の未解決問題を解決する鍵になっているに違いない。すなわち「癌化によって生じた SPF45 の過剰発現が、複数のがん関連遺伝子群のスプライシングを変化させ、抗がん剤耐性に寄与するタンパク質群を作り出す」という仮説を提示し、その解明を目的とする。

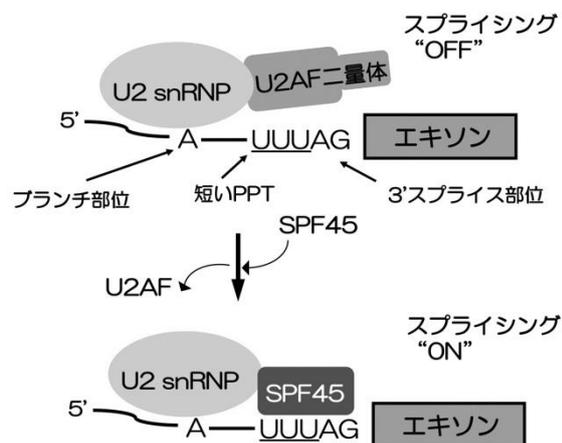


図1 短いイントロンで起こる SPF45 依存的なスプライシング

短いイントロンの短い PPT には、U2AF 二量体が結合できず、その結果 SPF45 と置き換わり、SPF45 が U2 snRNP の構成タンパク質因子(SF3b155)と結合して、スプライシングが遂行される。

2. 研究の対象並びに方法

(1) SPF45 によるスプライシング制御を受ける癌遺伝子群を同定し、抗癌剤耐性獲得のメカニズムを明らかにする

SPF45 の高発現による抗癌剤耐性獲得という新しい臨床的意義を確実にするのが重要である。SPF45 遺伝子は、癌組織で高発現している事が報告されているが、症例数が少ないことに加え、抗癌剤耐性獲得した癌細胞での発現量について臨床サンプルでは解析されていない。そこで、抗癌剤治療後に切除された多種類の癌組織切片において SPF45 の発現解析を八代正和准教授(大阪公立大学)との共同研究で行った。

さらに、SPF45 が過剰発現する抗癌剤耐性細胞株のトランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) を行うことで、SPF45 のスプライシング制御を受ける責任遺伝子群の探索を行うために、SPF45 を過剰発現する抗癌剤耐性株の単離を行った。癌細胞株(肺がん細胞株:A549, H1975, HCC827, EBC1, 大腸癌細胞:HCT-116, SW480, LoVo, DLD1, HT29, 胃癌細胞:MKN45, MKN74, NUGC3, OCUM12)に、抗癌剤処理を施し、耐性をもった細胞を単離し、実際に SPF45 を過剰発現するかどうか解析した。

(2) SPF45 依存的スプライシング制御機構の解明

一般的なスプライシング反応において、イントロン/エキソン境界である 3' スプライスサイトは U2AF と呼ばれるスプライシング因子によって認識される。しかしながら、SPF45 制御下の短いイントロンのスプライシングは、U2AF を必要としない(文献3)。申請者は、SPF45 によってスプライシング制御されるイントロンの 3' スプライスサイト認識機構も併せて明らかにする。まずは、SPF45 と相互作用するタンパク質因子 X を同定する。同定した SPF45 相互作用因子 X のノックダウン実験を行い、短いイントロンのスプライシングが阻害されるかどうか RT-PCR や RNA-Seq により検証する。

3. 研究結果

1) SPF45 によるスプライシング制御を受ける癌遺伝子群を同定し、抗癌剤耐性獲得のメカニズムを明らかにする

大腸がん、肺がん、膵臓がんの患者検体において、抗がん剤治療を受けた後に再発した患者の癌組織では、SPF45 が有意に過剰発現していた(第26回日本がん分子標的治療学会学術集会にて発表)。これらのデータは、実際のがん患者の細胞でも過剰発現した SPF45 が、抗がん剤耐性獲得に寄与することを強く支持する。この成果は、現在、共同研究者である八代正和准教授(大阪公立大学)が、Scientific Reports 雑に投稿中(under revision)であり、アクセプトを目指していきたい。

また、抗癌剤耐性細胞株を単離し、SPF45 の発現を解析していった結果、Lovo 細胞株を 5FU で処理して得られた耐性株において SPF45 の過剰発現を確認した。今後、この細胞の RNA-Seq を行うことによって、SPF45 が発現制御する抗癌剤耐性責任遺伝子の同定をするための予定である。

(2) SPF45 依存的スプライシング制御機構の解明

SPF45 の相互作用因子として SAP30BP という因子を同定した。SAP30BP は、元々 HSV1 (Herpes Simplex virus 1) に感染した際に発現上昇する遺伝子として同定された(文献5)。SAP30BP は、スプライシング反応を触媒するスプライソソームに含まれていることがわかっているが、その機能はわかっていない。我々は HeLa 細胞を用いて、siRNA による SAP30BP ノックダウンを行なった。SAP30BP 遺伝子の発現抑制を行なった HeLa 細胞と SPF45 遺伝子の発現

抑制を行なった HeLa 細胞の RNA-seq を行ない、スプライシングが阻害されるイントロンを比較すると、そのほとんどが共通であった。このことから、SAP30BP は SPF45 と協調して、短いイントロンのスプライシングを制御していると考えられる。さらに、SAP30BP と SPF45 のリコンビナントタンパク質を精製し、相互作用を調べて結果、SPF45 の UHM ドメインと SAP30BP の ULM ドメインで直接結合する事を明らかにした。現在、その構造を NMR にて解析中である。この成果は、現在、申請者が cell reports 雑に投稿中 (under revision) であり、アクセプトを目指したい。

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がん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。ようやく、SPF45 を過剰発現する抗がん剤耐性細胞株を単離することに成功したので、そのトランスクリプトーム解析によって明らかにする事ができるであろう。

さらに、本研究で同定した SPF45 の相互作用因子 SAP30BP は SPF45 と協調してスプライシング制御する新しい分子機構を明らかにした。SAP30BP も SPF45 と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.* 2021; 12: 4910.

4. K. Fukumura, J.P. Venables, A. Mayeda. SPF45/RBM17-dependent splicing implicated in multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Mol. Cell. Oncol.*, in press.

5. Jian-Feng Li 1, Long-Ding Liu, Shao-Hui Ma, Yan-Chun Che, Li-Chun Wang, Cheng-Hong Dong, Hong-Ling Zhao, Yun Liao, Qi-Han Li. HTRP--an immediate-early gene product induced by HSV1 infection in human embryo fibroblasts, is involved in cellular co-repressors. *J Biochem.* 2004

Aug;136(2):169-76.

6. 論文出版・学会発表

Kazuhiro Fukumura, Luca Sperotto, Hyun-Seo Kang, Stefanie SeuB, Rei Yoshimoto, Michael Sattler and Akila Myeda.

A novel pre-mRNA splicing mechanism with RBM17(SPF45)-SAP30BP complex for a subset of human short introns Cold Spring Harbor Asia Conference Dec5-9,2022