

61. スプライシング制御因子の基盤研究

国立がん研究センター研究所分子病理分野 研究員 小林 祥久

概要

最も頻度の高い発がん機構である KRAS、NRAS、HRAS 遺伝子の変異はすべてのがんの約 3 割で生じるが、これまで特異的阻害剤が承認されたのは KRAS G12C 変異に限られる。我々は、KRAS、NRAS、HRAS のコドン Q61 周辺はスプライシングに対して脆弱であることを発見し、その機序を応用した核酸医薬による新規治療法を開発した。本研究では、複数のアルゴリズムによるインシリコ解析によってより詳細にスプライシング関連モチーフ配列を抽出し、標的候補を探索した。細胞実験によって個々の SR 蛋白の阻害とスプライシング異常との相関を検証した上で、現在、個々の SR 蛋白に結合する配列のシーケンスを実施中である。これらのデータを統合解析することで、大規模臨床データ解析による膨大な候補の中から創薬標的を見出すための基盤につながることを期待される。

【謝辞】 先行研究でのセレンディピティをさらに他の遺伝子に応用するための基盤作りという萌芽的な段階の本研究に対してご支援いただいたことに厚くお礼申し上げます。

背景および目的

KRAS、NRAS、HRAS はすべてのがんの約 3 割で変異が生じる最多の発がん遺伝子ファミリーである。これらの遺伝子の発見から約 40 年経ち、KRAS 蛋白を不活性型の GDP 結合状態でロックする KRAS G12C 変異阻害剤が 2021 年に承認された。しかし、その他の変異に対する治療薬は未承認であり、さらに、がんはあらゆる薬剤に対して次第に耐性を獲得してしまうため、新しい観点からの治療薬開発が求められる。

我々は、薬剤耐性の研究を実施中に KRAS/NRAS/HRAS の Q61 周辺はスプライシング異常が起こりやすい脆弱な領域であることを偶然発見した。これらのがんは、スプライシング制御因子 exonic splicing enhancer (ESE) に依存して正常なスプライシングを維持することで発がん性を保っていた。そこで、がん細胞特異的に設計した核酸医薬によってスプライシング異常を誘導して自滅させる新しい治療法を開発した (文献 1)。

本研究では、この新規治療戦略の標的となり得る RAS Q61 以外の部位をゲノムワイドに探索するための手がかりを細胞実験によって見出すことを目指す。

方法

KRAS Q61 周辺に限らず KRAS/NRAS/HRAS 遺伝子の mRNA 全長の ESE モチーフを異なるアルゴリズムにもとづくインシリコ解析 (コンピューター解析による予測シミュレーション) で網羅的に抽出した。スプライシング機構に必須の SR 蛋白は、pre-mRNA の ESE と結合して RNA・蛋白複合体を形成することでスプライシング機構を開始するため、siRNA による網羅的なノックダウンによって生じるスプライシングの変化を評価した。さらに、実際に SR 蛋白が結合している RNA 領域を免疫沈降で抽出して、その領域を次世代シーケンサーで解析する CLIP-seq を実施した。

結果および考察

インシリコ解析から、KRAS Q61 周辺の局所には確かに ESE が集中していることがわかったが、KRAS 全長の ESE を俯瞰的に見ると Q61 周辺だけに突出して集中しているわけではなく、むしろ他により多くの ESE が集積している部位も散見された。また、別のアルゴリズムからインシリコ解析で ESE モチーフを抽出し、結果を validate した。これらの結果から、インシリコで多数検出される ESE の情報だけでは Q61 周辺のように治療標的となり得る領域を探すことは困難であることがわかった。そこで、新たなアルゴリズムを構築して ESE が標的となりうる遺伝子のエクソンの網羅的抽出を試みた。

SR 蛋白には多数の種類があるため、SRSF1~SRSF12 を標的とする各 siRNA によって個別にノックダウンすることでスプライシングの変化を評価し、KRAS Q61 モデル細胞において SR 蛋白とスプライシングの変化の関連性を見出した。多数検出される ESE モチーフのうちどの ESE が実際に SR 蛋白と結合してスプライシング異常の回避に必須であるかを細胞実験で明らかにするために、現在、CLIP-seq を実施中である。

これらのデータを統合解析することで、大規模臨床データ解析による膨大な候補の中から創薬標的を見出すための基盤につながることを期待される。

(完)

発表論文

- 1) なし

引用文献

- 1) Kobayashi, Y. et al. Silent mutations reveal therapeutic vulnerability in RAS Q61 cancers. Nature 603, 335-342 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04451-4>