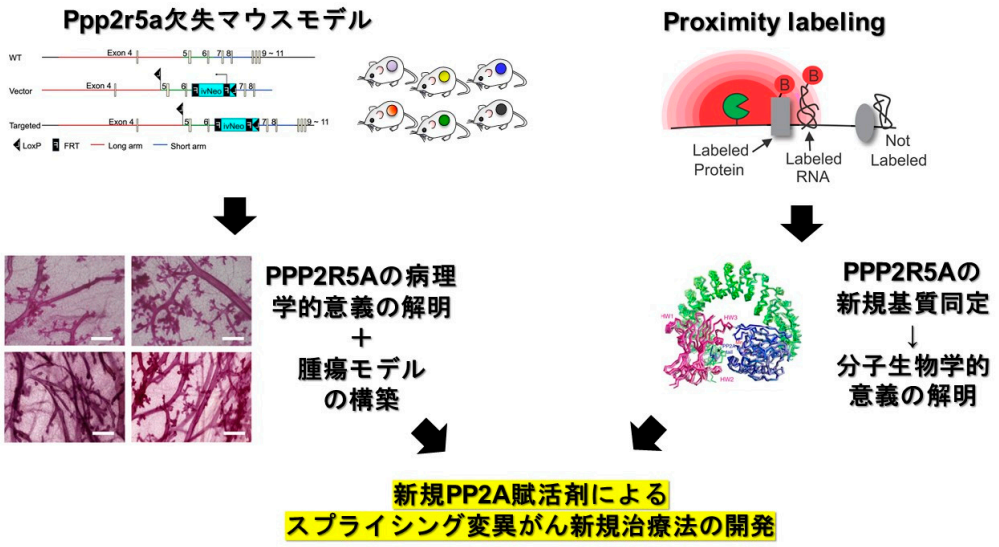
57　新規PP2A賦活剤によるスプライシング変異がん駆逐療法	吉見　昭秀

【目的】RNA splicing factor の遺伝子変異（以降 SF 変異）ががんにおいて高頻度に同定されることが発見されて以来、世界では毎年 SF 変異がんに罹患する患者が 40〜60 万人にも上ることが明らかになり、SF 変異によるがんの病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。我々は最近、がんで最も多い SF 変異である *SF3B1* 遺伝子変異が、PPP2R5A の mis-splicing を介して MYC を活性化し慢性リンパ性白血病の発症に関わることを報告した。この研究結果から、我々は *SF3B1* 変異がんにおいて PPP2R5A が病態形成の中心的役割を果たしている可能性が高いと考えた。これまでに PPP2R5A の機能喪失が各固形癌においてどのようにして発がんに関わるのか、それぞれのがん種ごとに PPP2R5A を B サブユニットとして含む PP2A 複合体の基質は何であるのか、どのようにして PPP2R5A の喪失を治療応用に結びつければよいのかはまだ明らかになっていないことから、本研究においてはこれらの疑問点の解明に取り組むこととした。具体的には、PPP2R5A 機能喪失の生物学的影響の解析および PPP2R5A の結合タンパク質（PPP2R5A を含む PP2A 複合体の基質）の同定を通じて PPP2R5A の病理学的、分子生物学的意義を明らかにするとともに、その過程で開発される PPP2R5A 喪失腫瘍モデルを用いて、新規 PP2A 賦活剤の治療効果を評価し、新規治療法の開発を目指すこととした。

【方法】*Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの解析のため、*Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの個体・組織を用いて表現形質を検討した。また、Proximity labeling 技術により PPP2R5A の新規基質の同定を試みた。

【結果】まず我々は *PPP2R5A* 遺伝子の mis-splicing に関する解析をがん横断的に実施し、*PPP2R5A* 遺伝子の mis-splicing は特に乳がんにおいて強く生じていることを突き止めた。乳腺特異的に Ppp2r5a を欠失させるために *Ppp2r5a* 条件的欠失マウスと Mmtv-cre transgenic マウスを掛け合わせたところ、4 か月齢の Mmtv-cre Ppp2r5a$^{-/-}$マウスでは、対照群と比較して Ductal Hyperplasia が認められ、発がんに関連する表現形質が既に観察された。また、APEX2 を利用した Proximity labeling 技術を導入することにより、PPP2R5A の結合蛋白質を Mass spectrometry で検出した。この中には新規 PPP2R5A 基質候補が含まれていた。

本研究の全体像



57. 新規 PP2A 賦活剤によるスプライシング変異がん駆逐療法

吉見　昭秀

*国立がん研究センター研究所 がん RNA 研究ユニット

Key words：PPP2R5A，乳がん，PP2A 賦活剤，スプライシング，SF3B1

緒　言

RNA splicing factor の遺伝子変異（以降 SF 変異）ががんにおいて高頻度に同定されることが 2011 年に初めて報告された。それ以来、世界では毎年 SF 変異がんに罹患する患者が 40～60 万人にも上ることが明らかになり、SF 変異によるがんの病態解明と治療法開発は喫緊の課題である。我々は最近、複雑な RNA splicing 異常を高感度かつ定量的に計測・解析可能なプログラムを開発して代表的な splicing 変異の一つである SRSF2 変異による白血病発症メカニズムを解明し［1］、また、がんにおいて最も高頻度に遺伝子変異が同定される splicing factor をコードする *SF3B1* 遺伝子の変異が、PPP2R5A の mis-splicing を介して MYC を活性化し慢性リンパ性白血病の発症に関わることを報告した［2］。この過程で、*SF3B1* のホットスポット変異が、臓器およびアレル特異的に splicing 異常をきたすことを見出した。注目すべきは、こうした臓器特異的 splicing パターンが存在するにもかかわらず PPP2R5A の mis-splicing は各臓器・腫瘍で非常に強く生じており、*SF3B1* 変異がんにおいて重要な病理学的役割を果たしている可能性が高い点である。この観察結果から、我々は *SF3B1* 変異がんにおいて PPP2R5A が病態形成の中心的役割を果たしている可能性が高いと考えた。

これまでに PPP2R5A の機能喪失が各固形癌においてどのようにして発がんに関わるのか、それぞれのがん種ごとに PPP2R5A を B サブユニットとして含む PP2A 複合体の基質は何であるのか、どのようにして PPP2R5A の喪失を治療応用に結びつければよいのかはまだ明らかになっていないことから、本研究においてはこれらの疑問点の解明に取り組むこととした。

本研究における目的として下記の 3 点を設定した。

1. PPP2R5A 機能喪失の生物学的影響の解析：PPP2R5A の機能喪失が病態形成に重要な役割を果たしているがん種を選定し、同がん種の組織特異的に *Ppp2r5a* を欠失させ、生物学的影響を調査する。
2. PPP2R5A の結合タンパク質（PPP2R5A を含む PP2A 複合体の基質）の同定：目的 1 で選定したがん種の細胞を用いて PPP2R5A 結合タンパク質を同定する。
3. 新規 PP2A 賦活剤の治療効果評価：新規 PP2A 賦活剤を用いて、*SF3B1* 変異細胞と野生型細胞における同薬剤の感受性を比較し、新規治療法の開発を目指す。

本研究により、乳がんにおいて Ppp2r5a の機能喪失が病理学的意義を持つこと、また新規の PPP2R5A 基質の同定に成功し、新規 PP2A 賦活剤を評価する基盤形成の準備が整った。

方　法

1. *Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの解析

本項目の目的は、*Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの個体・組織を用いて PPP2R5A の役割を明らかにすることにある。具体的には primary マウスと Mmtv-cre transgenic マウスを掛け合わせ、乳腺組織特異的に *Ppp2r5a* を欠失させることにより、その表現形質を検討した。

*現在の所属：国立がん研究センター 研究所 がんRNA研究分野

2. Proximity labeling による PPP2R5A 基質の同定

我々は PP2A complex の専門家である Michigan 大学の Dr. Goutham Narla と今まで共同研究してきたが、PPP2R5A の基質同定については通常の IP-Mass spectrometry では困難であることがわかってきた。そこで本研究では大豆蛋白質由来の APEX2 を用いた Proximity labeling 技術を導入して、PPP2R5A の結合蛋白質の同定を試みた。APEX2 はエンドウ豆の APEX（ascorbate peroxidase）を改良した変異体であり［3, 4］、その peroxidase 活性により生じた phenoxyl ラジカルを用いて周囲 10～20 nm 以内の蛋白質を biotin 化することができる。APEX2 を PPP2R5A と融合させて発現させれば、biotin 化した蛋白質を streptavidin ビーズで沈降し、回収した蛋白質を質量分析することによって、PPP2R5A の近傍にある蛋白質、すなわち PPP2R5A の基質候補の蛋白質のプロファイルを把握することが可能である。

結果および考察

1. 乳腺における PPP2R5A の病理学的意義

まず我々は *PPP2R5A* 遺伝子の mis-splicing に関する解析をがん横断的に実施した。その結果、*SF3B1* 変異はがん種によって異なる mis-splicing を誘導し、*PPP2R5A* 遺伝子の mis-splicing は特に乳がんにおいて強く生じていることを突き止めた（図 1a）。そこで、乳腺特異的に *Ppp2r5a* を欠失させるために *Ppp2r5a* 条件的欠失マウス（図 1b）と Mmtv-cre transgenic マウスを掛け合わせた。その結果、4 か月齢の Mmtv-cre Ppp2r5a$^{-/-}$マウスでは、対照群と比較して Ductal Hyperplasia が認められ（図 1c）、発がんに関連する表現形質が既に観察された。今後は同マウスモデルの予後や詳細な表現形質を解析し、細胞モデルも用いて分子生物学的検討を進めることにより、乳がん形成における Ppp2r5a の役割について明らかにする。その際、2 で同定された PPP2R5A 新規基質との関連も複合的に検討することにより、PPP2R5A の分子病理的役割のみならず、分子生物学、腫瘍生物学的意義を包括的に明らかにしていく。さらに、Mmtv-cre Ppp2r5a$^{-/-}$マウスが腫瘍を発症しない場合には、R26-Pik3caH1047R モデルなどをさらに交配することにより腫瘍モデルを構築し、今後の新規 PP2A 賦活剤を評価する基盤とする。

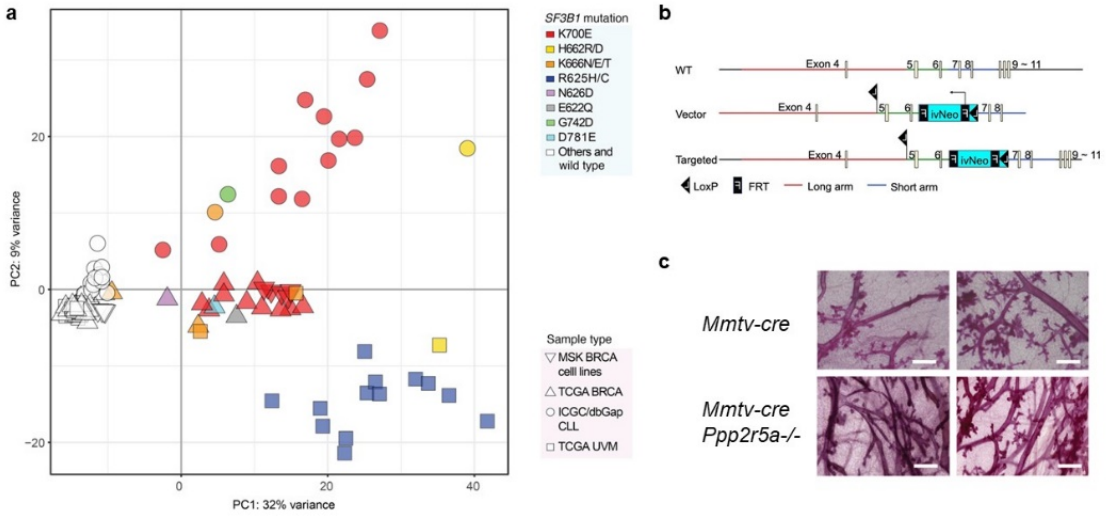


図 1. *Ppp2r5a* 欠失による Ductal Hyperplasia

a) *SF3B1* 変異による mis-splicing event の principal component analysis。

b) *Ppp2r5a* 条件的欠失マウスの概略図。

c) *Ppp2r5a* 欠失による ductal hyperplasia（スケールバー：500 μm）。

2. 新規 PPP2R5A 基質の同定

APEX2 を利用した Proximity labeling 技術を導入することにより、PPP2R5A の結合蛋白質を Mass spectrometry で検出した（表 1）。上位に同一蛋白質由来と思われる複数のペプチドが複数回検出され、Proximity labeling による PPP2R5A の基質候補が数個浮かび上がった。これらは今までの報告になく、新規の PPP2R5A 基質である可能性が高い。現在実施中の遺伝子発現解析などの結果も合わせて、新規基質候補の validation およびリン酸化状態の変化、下流シグナル等の変化につき。今後詳細な検討を加える。また得られた知見を 1 で判明した PPP2R5A の病理学的意義と照らし合わせることにより、新規基質の PPP2R5A 喪失における病理学的意義を明らかにする。

表 1. PPP2R5A 結合蛋白質

Protein Group	Score (%)	-10lgP	Coverage (%)	#Peptides	#Unique	Avg. Mass	Description
1	99.2	178.86	44	19	19	49653	Protein A
1	99.2	178.86	44	20	20	53652	Protein A
1	96.2	155.93	5	5	5	117390	Protein B
3	99.1	155.57	23	9	9	49824	Protein C
3	99.1	155.57	23	9	9	49870	Protein C
3	99.1	155.57	23	9	9	50141	Protein C
3	99.1	155.57	23	9	9	50185	Protein D
2	99.1	149.28	33	11	11	47767	Protein E
2	99.1	149.28	32	11	11	49671	Protein E
4	99.1	119.16	21	7	7	50152	Protein E
4	99.1	119.16	21	7	7	49895	Protein E
4	99.1	119.16	18	7	7	57730	Protein E
1	98.4	113.13	10	6	6	88382	Protein F
1	98.4	88.74	14	4	4	34142	Protein G
1	98.4	88.74	13	4	4	36940	Protein G
1	98.4	88.74	13	4	4	38976	Protein G
6	98.5	79.37	10	4	4	53045	Protein H
6	98.5	79.37	9	4	4	56273	Protein H
6	98.5	79.37	9	4	4	58062	Protein H
6	98.5	79.37	9	4	4	57937	Protein H
6	98.5	79.37	11	4	4	49898	Protein H

PPP2R5A の Proximity labeling および Mass spectrometry により検出された PPP2R5A 結合蛋白質およびそれらの各種統計値（第 1 列に記載）。未発表データのため蛋白質名は伏せてある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、Michigan 大学 Department of Internal Medicine, Division of genetic Medicine Chief の Goutham Narla である。また、本研究の遂行は公益財団法人上原記念生命科学財団からの研究助成により初めて可能となった。ここに深謝する。

文　献

1） Yoshimi A, Lin KT, Wiseman DH, Rahman MA, Pastore A, Wang B, Lee SC, Micol JB, Zhang XJ, de Botton S, Penard-Lacronique V, Stein EM, Cho H, Miles RE, Inoue D, Albrecht TR, Somervaille TCP, Batta K, Amaral F, Simeoni F, Wilks DP, Cargo C, Intlekofer AM, Levine RL, Dvinge H, Bradley RK, Wagner EJ, Krainer AR, Abdel-Wahab O. Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis. Nature. 2019 Oct;574(7777):273-277. PMID: 31578525. doi: 10.1038/s41586-019-1618-0.

2) Liu Z, Yoshimi A, Wang J, Cho H, Chun-Wei Lee S, Ki M, Bitner L, Chu T, Shah H, Liu B, Mato AR, Ruvolo P, Fabbri G, Pasqualucci L, Abdel-Wahab O, Rabadan R#. Mutations in the RNA Splicing Factor SF3B1 Promote Tumorigenesis through MYC Stabilization. Cancer Discov. 2020 Jun;10(6):806-821. PMID: 32188705. doi: 10.1158/2159-8290.CD-19-1330.

3) Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE, Ellisman MH, Ting AY. Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. Nat Biotechnol. 2012 Nov;30(11):1143-8. PMID: 23086203 doi: 10.1038/nbt.2375.

4) Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY. Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. Nat Methods. 2015 Jan;12(1):51-4. PMID: 25419960 doi: 10.1038/nmeth.3179.