130

白血病治療耐性に関わるRNA-蛋白質高次構造体の解析

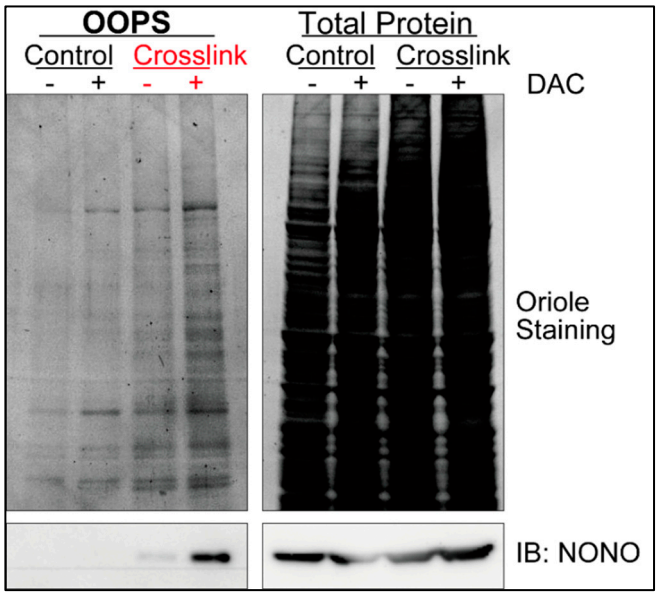
東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命専攻 先進分子腫瘍学分野　　山本　圭太

【目的】白血病は、化学療法の発展に伴い治療成績が大きく向上した病気の一つではあるが、未だ多くの患者がこの疾患に生命を脅かされている。特に再発・治療抵抗性の白血病（relapsed or refractory leukemia）は予後不良であることが知られている。再発・治療抵抗性白血病は、どのようにして化学療法に対する抵抗性を獲得しているのだろうか。新しい治療法を確立するためには、そのメカニズムを明らかにすることが重要である。細胞内で形成される一部の高次構造体は、外的ストレスによって形成されることが知られている。これらの高次構造体は蛋白質や核酸など多分子の相分離によって形成されるポリマーであり、RNA-蛋白質相互作用（RNA-Protein Interaction：RPI）がその形成に重要な役割を担っている。本研究では、薬剤ストレスによって誘導されるRPIやRNA-蛋白質複合体に着目し治療耐性機序を解明することを目的とした。

【方法】白血病細胞株MDSL2007にデシタビン（Decitabine：DAC）を投与し、形成されるRNA-蛋白質複合体をAcid Guanidinium Phenol Chloroformによる RNA抽出法を応用した抽出手法「OOPS」を用いて網羅的に回収した。回収された蛋白質を LC-MS/MS を用いて解析し、DAC 投与下で形成される高次構造体を構成する RNA 結合蛋白質を同定した。薬剤耐性に寄与する遺伝子を同定するため、RBPを標的としたCRISPR/Cas9 sgRNAサブライブラリーを設計し、ノックアウトスクリーニングを行った。また、薬剤ストレスによって誘導される RPI のダイナミクスを評価するため、CRISPR/Cas13とNanoBiTを組み合わせた新たな解析手法「NanoBiT-dCas13」を確立した。

【結果】薬剤ストレスを加えたMDSL2007では、定常状態に比してより多くのRNA-蛋白質複合体が形成されていることが明らかになった（図）。Enrichされた蛋白質の中にはスプライシング因子を含む様々なRBPが含まれていた。Cas9を用いたノックアウトスクリーニングでは、ストレス顆粒の形成に関わる遺伝子がDAC抵抗性に関与していた。NanoBiT-dCas13を用いた解析では、薬剤ストレスを加えることで短期間のうちに細胞内に形成されるRPIの変化が発光シグナルとして検出可能であり、RPIに介入する様々な薬剤のスクリーニングに有用であることが示された。

【考察】DACによる薬剤ストレスにより、細胞内で形成されるRNA-蛋白質複合体を同定した。薬剤ストレスにより相分離が誘導される蛋白質の中には、既知の DAC 耐性因子なども含まれていた。細胞が薬剤ストレスに抗するメカニズムとして、RPIや相分離が重要な働きを担っている可能性が示唆された。今後、OOPS法で同定された遺伝子に対して個別にノックアウト実験を行い、新しい治療標的の同定を行っていく予定である。



DACによる薬剤刺激でMDSL2007細胞内に形成されたRNA-蛋白質複合体