

# 日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

## I 基本情報

研究開発課題名：大規模がんゲノム情報に基づく異常スプライシングに対する新たな創薬標的の開発

Development of novel druggable targets for aberrant RNA splicing based on large-scale cancer genome data

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日 ～ 令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：中奥 敬史

Takashi Nakaoku

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 ゲノム生物学研究分野 ユニット長

Section Head, Division of Genome Biology, National Cancer Center Research Institute

## II 研究開発の概要

### 1. 研究開発の背景と目的

RNA スプライシング異常は造血器腫瘍のみならず固形がんにおいても腫瘍形成に深く関与しており、その制御因子の機能異常を標的とする創薬が複数の分子クラスで進展している。本研究開発課題では、大規模ながんゲノムおよびトランスクリプトーム情報をもとに、RNA スプライシング異常を本態とするがんの分子基盤を明らかにし、その治療標的としての脆弱性を探索することを目的とした。具体的には、(1) 異常スプライシングを引き起こす遺伝子異常を網羅的に同定し、(2) その腫瘍原性メカニズムを実験モデルで解明し、(3) 治療標的としての成立性を動物実験レベルで実証するという3つの研究開発項目を設定した。

### 2. 研究開発の成果

#### (1) 大規模ゲノム解析による新規ドライバー遺伝子異常の同定

国立がん研究センターが保有する肺がんゲノムコホート (1,017 例) および TCGA コホート (519 例) の計 1,536 例について、全エクソームシーケンス (WES)・RNA シーケンスデータと臨床病理情報を統合した解析基盤を構築した。本解析基盤の構築にあたっては、生データのリファレンス配列へのマッピング、発現量およびスプライシング定量、メタデータ統合までを一貫して取り扱える解析パイプラインを整備し、後続の研究開発項目において繰り返し利用可能な共通プラットフォームとして整えた。

有意変異集積の検出にあたっては、申請者らが先行研究において構築・確立してきた、進化的に正選択された変異クラスターを統計的に検出するアルゴリズム (Tabata, Nakaoku\* et al., Cancer Res 2022) を中核に据えつつ、コーディング領域における点変異・短挿入欠失を対象とした古典的なドライバー変異検出ロジック、機能ドメイン単位での変異集積を評価するクラスター型検出、ならびにイントロン領域・スプライス部位近傍に生じる cis 変異の検出を組み合わせ、複数の有意変異検出パイプラインを階層的に適用した。これにより、RNA プロセッシング因子の遺伝子変異 (trans 因子) に加え、cis 因子としてのイントロン領域変異についても同一の解析基盤上で評価可能とした。

スプライシング異常の検出には、エクソンスキッピング、選択的 5' / 3' スプライス部位使用、イントロン保持、相互排他的エクソン使用などのイベント単位で定量可能な rMATS-turbo を主軸として採用した。一方で、検出感度・特異度およびイベント定義の堅牢性を確保するため、ジャンクション計数ベースの定量手法やイベント非依存型のスプライシング解析手法など複数の代替的スプライシング検出ツールについても並行して検討・比較し、各手法の出力の整合性を確認したうえで、本研究では最も検出感度が高く、再現性が担保された rMATS-turbo ベースの定量結果を主要なアウトプットとして採用した。検出されたスプライシングプロファイルに対し t-SNE による次元圧縮を組み合わせたクラスタリング解析を実施した結果、肺腺がんの約 3.8%において、これまでがんにおける機能意義が報告されていなかった mRNA Cap 構造メチル化酵素 CMTR2 (Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase 2) 遺伝子の機能喪失型 (truncating) 変異を同定した。CMTR2 変異群は、EGFR、KRAS、ALK 等の既知ドライバー変異とは異なる独自のスプライシング異常プロファイルを形成しており、肺腺がんにおける新規分子サブタイプを規定する候補ドライバー変異として位置付けられた。本解析基盤および検出パイプラインは、CMTR2 以外の候補 RNA プロセッシング因子の同定にも継続的に活用されている。

さらに、上記 rMATS-turbo+t-SNE ベースの主解析を独立に検証する目的で、STAR アラインメントによる再マッピングを行った TCGA-LUAD RNA-seq データに対し、UMAP による次元圧縮と Leiden コミュニティ検出を用いたスプライシングプロファイルのサブクラスタリング、ならびに各コミュニティに対する遺伝子変異・パスウェイ情報のオッズ比ベースのエンリッチメント解析を組み合わせた独立解析パイプラインを構築・適用した。本独立パイプラインにおいても、エクソンスキッピングの事象について、CMTR2 変異群が独立したコミュニティを形成する一方、U2AF1 変異群が別の独立コミュニティを形成することが再現性をもって確認され、本研究で同定した CMTR2 サブタイプの実在性とその新規性が解析手法非依存に裏付けられた。

## (2) 実験モデルの構築と分子表現型の解析

CMTR2 変異の分子機能を解明するため、CRISPR/Cas9 システムを用いてヒトおよびマウス肺がん細胞株 (NCI-H2122、A549、LLC、B16-F10 等) における CMTR2 ノックアウト株を樹立した。加えて、内因性に CMTR2 が欠失しているヒト肺がん細胞株 (NCI-H1373、NCI-H1915) に対する CMTR2 再導入レスキュー細胞株、Doxycycline 誘導型の CMTR2 発現株 (野生型およびメチル化活性失活型変異体 K117N)、ならびに CMTR2 変異および野生型の臨床検体から樹立した患者由来オルガノイド (PDO) を整備し、in vitro および ex vivo 双方を網羅する一連の実験基盤を構築した。

これらモデルにおいて RNA-seq 解析を行った結果、患者検体で観察されたスプライシング異常プロファイルが実験モデル上でも忠実に再現されることを確認した。特に、SPPL2A、SMARCA1 等のエクソンスキッピング/イントロン保持に関わるスプライシング変化は、CMTR2 失活に高度に特異的なイベントとして再現性をもって観察され、CMTR2 機能を判定する分子表現型マーカーとして利用可能であることが示された。さらに、レスキュー実験により、これらのスプライシング異常が外来 CMTR2 導入によって部分的に回復することを確認し、CMTR2 機能喪失と異常スプライシングの因果関係を担保した。

## (3) 分子機構の解明と脆弱性の同定

Doxycycline 誘導型発現系を用いたプルダウンアッセイによるタンパク質相互作用解析の結果、CMTR2 が、これまで報告されていなかったスプライソソーム構成因子 (snRNP 複合体) と相互作用すること、および失活型変異体 K117N ではこの snRNP 相互作用が喪失していることを世界で初めて見出した。これにより、CMTR2 は Cap2 構造を形成するメチル化酵素としての触媒機能を担うのみならず、snRNP との直接相互作用を介してスプライシング機構の正常な動作維持に関与する分子であることが明らかとなった。

上記の知見をもとに、snRNP 相互作用の破綻によりスプライシング機構の予備能が低下した CMTR2 欠損/変異細胞では、スプライシング機構を薬理的に擾乱する薬剤に対する感受性が選択的に上昇するとの仮説を立てた。

創薬標的化合物の選定にあたっては、CMTR2 KO モデル細胞群に対する化合物応答性に加え、Cancer Dependency Map (DepMap) に登録されている数百種類の肺がん細胞株を対象とした網羅的薬剤・遺伝子依存性プロファイル (CRISPR/RNAi ノックアウトスクリーンおよび PRISM 化合物スクリーン) を統合的に参照した。CMTR2 機能喪失と相関する依存性プロファイルを示す化合物・標的を抽出した結果、RNA スプライシング関連因子 RBM39 タンパク質を標的とするスルホンアミド系の RNA スプライシングモジュレーター (Indisulam) が、CMTR2 欠損/変異細胞において選択的に高い感受性を示す候補として同定された。

実際に、CMTR2 ノックアウト株および内因性 CMTR2 失活臨床細胞株に対する用量応答試験において、Indisulam および E7820 (同じスプライソソーム構成因子を標的とする類縁化合物) は、CMTR2 発現が保たれている対照細胞と比較して有意に低い濃度域で増殖抑制効果を示した。本効果は siRNA による標的因子ノックダウンによっても再現され、CMTR2 欠損/変異細胞におけるスプライシング機構の予備能低下が、これらスプライシングモジュレーターに対する選択的脆弱性の分子基盤であることが裏付けられた。

#### (4) 免疫チェックポイント阻害剤 (ICI) の有効性に関する新規知見

本研究開発の進捗過程において、CMTR2 失活により蓄積するスプライシング異常産物が、免疫活性化を誘導することを見出した。この知見に基づき、ICI に対する応答性が乏しいことが知られるマウス肺がん同種移植モデル (LLC) 等を用いて、CMTR2 機能喪失が ICI 感受性に与える影響を体系的に検証した。

その結果、CMTR2 ノックアウト腫瘍では、本来 ICI への応答性が乏しい腫瘍が抗 PD-1 抗体単剤に対して明瞭な感受性を獲得すること、さらにスプライシングモジュレーター (Indisulam) との併用により抗腫瘍効果がさらに増強されることを示した。腫瘍浸潤免疫細胞解析および遺伝子発現解析からは、CMTR2 欠損腫瘍において、抗原提示関連経路およびインターフェロン応答経路を含む免疫活性化シグニチャの顕著な上昇が認められ、Cap 構造異常 RNA→自然免疫応答→獲得免疫賦活化→ICI 感受性獲得という一連の機序を支持する所見を得た。

さらに、国立がん研究センター登録患者のゲノム情報および臨床経過情報を統合した後方視的解析の結果、CMTR2 機能失活変異を有する肺がん患者において、ICI 単剤治療に対する応答性および無増悪生存期間の延長傾向が示唆された。これらの結果は、CMTR2 機能失活が、ICI による治療効果を予測する分子バイオマーカーとして臨床的に有用となり得る可能性を強く示唆するものである。

### 3. 成果の意義と今後の展開

本研究開発課題により、肺腺がんの約 3.8% に存在する CMTR2 機能喪失変異が、(i) Cap2 構造異常を伴う特異的なスプライシング異常を惹起すること、(ii) スプライシングモジュレーターへの感受性を高めること、(iii) 免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を増強すること、という治療標的性を併せ持つことを明らかにした。これらの成果は、当初計画における「合成致死性」を出口戦略とする創薬コンセプトを超え、がん免疫療法の新たな患者層別化バイオマーカーおよび併用療法戦略を提示するものである。本成果は学術論文 (Nukaga S, Shiraishi K, …, Kohno T, Nakaoku T\*. Nat Commun 16:9754, 2025; DOI: 10.1038/s41467-025-64821-0) として公表するとともに、関連する治療応答予測技術に関する国内特許出願を完了した。今後は、本研究で構築したゲノム・トランスクリプトーム解析基盤および独自の RNA 修飾解析技術を拡張し、RNA スプライシング異常を起点とする新規創薬・診断シーズの創出に向けた研究を継続する予定である。

## 1. Background and Objectives

Aberrant RNA splicing drives both hematologic and solid tumors, and splicing-modulating agents are in clinical development. This project integrated large-scale cancer genome and transcriptome data to define the molecular basis of splicing-driven tumors and identify therapeutic vulnerabilities.

## 2. Outcomes

(1) Genomic platform and novel driver alteration: We integrated WES, RNA-seq, and clinical data from 1,536 lung cancers (1,017 institutional, 519 TCGA) and applied multiple significant-mutation-detection pipelines in parallel—our positive-selection variant-cluster algorithm (Tabata, Nakaoku\* et al., Cancer Res 2022), domain-based clustering, and intronic cis-variant detection—covering trans- and cis-acting alterations. rMATS-turbo was selected for splicing after benchmarking, combined with t-SNE clustering. This identified loss-of-function (truncating) mutations in CMTR2, encoding Cap-specific mRNA (nucleoside-2'-O-)-methyltransferase 2, in ~3.8% of lung adenocarcinomas—a novel subtype distinct from EGFR, KRAS, and ALK. An independent pipeline (STAR/UMAP/Leiden with OR enrichment) confirmed CMTR2 and U2AF1 cases as distinct splicing communities.

(2) Experimental models and molecular phenotype: We established CRISPR/Cas9 CMTR2-knockout clones (NCI-H2122, A549, LLC, B16-F10), rescue lines in endogenously deficient cells (NCI-H1373, H1915), doxycycline-inducible wild-type and methylation-dead K117N expression systems, and patient-derived organoids. RNA-seq confirmed recapitulation of patient splicing aberrations; SPPL2A and SMARCA1 events emerged as specific CMTR2-inactivation markers, partially reversed by CMTR2 re-introduction.

(3) Molecular mechanism and vulnerability: Pull-down assays showed wild-type CMTR2 interacts with the spliceosomal snRNP complex—an interaction abolished by K117N—revealing a role of CMTR2 in splicing regulation beyond Cap2-methyltransferase activity, explaining the reduced spliceosomal reserve of CMTR2-deficient cells.

Candidate compounds were prioritized by integrating drug response in CMTR2-knockout models with DepMap dependency profiles (CRISPR/RNAi and PRISM screens) across hundreds of lung cancer lines, nominating the sulfonamide-class splicing modulator Indisulam (acting on RBM39) as the lead candidate. Indisulam and the analog E7820 selectively suppressed CMTR2-deficient cells in dose-response assays, with siRNA knockdown reproducing the effect—establishing the splicing-reserve deficit as the basis of the vulnerability.

(4) Proof-of-concept with immune checkpoint inhibitors: Aberrant splice products from CMTR2 inactivation induced immune activation. In ICI-refractory syngeneic mouse models (LLC), CMTR2 knockout conferred responsiveness to anti-PD-1 monotherapy, with Indisulam combination further enhancing efficacy. Antigen-presentation and interferon-response signatures were upregulated in CMTR2-deficient tumors, consistent with a cap-aberrant-RNA → innate-sensing → adaptive-immune cascade. Retrospective analysis of National Cancer Center patients suggested favorable ICI response and prolonged PFS in CMTR2 loss-of-function cases, supporting CMTR2 as a predictive biomarker.

## 3. Significance and Future Directions

CMTR2 loss-of-function mutations in ~3.8% of lung adenocarcinomas drive aberrant splicing with Cap2 defects, confer sensitivity to splicing modulators, and potentiate ICI efficacy—defining a subtype with paired biomarker and combination strategy (Nukaga S et al., Nat Commun 16:9754, 2025). Future work will extend the platform pan-cancer for new RNA-splicing-based therapeutic and diagnostic seeds.