

令和元年6月25日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09844

研究課題名(和文) スプライソーム遺伝子LUC7L2の機能不全に基づく骨髄悪性腫瘍発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms by which spliceosomal gene LUC7L2 defects causes myeloid neoplasms

研究代表者

細野 奈穂子 (Hosono, Naoko)

福井大学・学術研究院医学系部門(附属病院部)・講師

研究者番号：50509312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などの骨髄系腫瘍では、7番染色体の欠損がよく見られる異常であることから、7番染色体位置するスプライシング装置の構成分子であるLUC7L2の機能不全に起因する病態の解明に取り組んだ。LUC7L2の低発現の白血病細胞株では、特徴的な形態異常を認め、細胞死を誘導するタンパクの発現低下を認めた。LUC7L2の低発現細胞では、腫瘍細胞の増殖・進展に関わるBCLAF1、HMGN1、LETMD1の遺伝子のタンパク合成におけるスプライシングの段階での異常を認め、これらの分子の異常な生合成が腫瘍化に関わっているものと予想された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄系腫瘍でよくみられる異常であるLUC7L2の機能低下により、タンパク合成のステップの一つであるスプライシングの異常をきたし、その結果腫瘍の増殖に関わる多数の分子の発現が変化することが判明した。LUC7L2が介するこれらの分子の機能異常が、腫瘍化の原因および進展に関わることから、これらの分子を標的とした阻害物質の開発や、LUC7L2の機能を回復させる活性化物質の開発が、難治性骨髄系腫瘍の治療戦略になりうると期待される。

研究成果の概要(英文)：Deletions of the long arm of chromosome 7 are common karyotypic abnormalities in myeloid neoplasms and are associated with poor prognosis. LUC7L2, a putative U1 spliceosomal protein, is located in 7q34, which is deleted in 85% of -7/del17q patients. To clarify the role of LUC7L2 in myeloid neoplasms, we generated knocked down LUC7L2 in leukemic cell lines. Knockdown cells induced the formation of membrane blebs and adhere to each other. Expression analysis revealed increased expression of NOTCH3, AMIGO and ABLIM1 in knockdown cells. Skipping exon is most frequent alternative splicing event in knockdown cell, Mutually exclusive splicing event in HMGN1 were also seen in knockdown cell. Loss of function or low expression of LUC7L2 results in distinctly altered splicing patterns involving various kind of genes associated with cytoskeletal components, spliceosome, apoptosis or histone modification, and may collaborate to leukemogenesis.

研究分野：造血器腫瘍

キーワード：骨髄系腫瘍 7番染色体 LUC7L2 スプライシングの異常

1. 研究開始当初の背景

ヒト7番染色体長腕の(部分)欠失(-7/del(7q))は骨髄系悪性腫瘍で高頻度にみられる予後不良の染色体異常である。申請者らは、骨髄系悪性腫瘍患者由来の臨床検体を用いて一塩基多型アレイカリオタイピング、全エクソンシーケンスなどの網羅的な解析を行い、7番染色体上の3カ所の高頻度欠失領域(CDR)とその責任遺伝子を明らかにした。このうち、7q34に位置するLUC7L2の機能解明ははまだ不十分であり、-7/del(7q)に起因する難治性の病態の解明が今後の大きな課題である。

LUC7L2は脊椎動物以降の高等動物のみに存在し、5'末端のプレmRNAスプライシング反応を担うスプライソソーム(U1 small nuclear ribonucleoprotein particle: U1snRNP)の構成因子としてmRNAスプライシング過程の早期の段階において重要な役割を果たしている。

これまでの研究結果から、LUC7L2の機能低下がスプライシングの異常をきたし、特定遺伝子のエクソンの過スキッピングや過保持により、細胞の生存・増殖および分化制御に関するシグナル分子が影響を受けている事は明らかである。しかしながら、未分化造血幹細胞のクローナルな増殖を主病態とする難治性-7/del(7q)骨髄系悪性腫瘍において、腫瘍化に密接に関与する分子機構や、分化障害を誘導するメカニズムは未だ解明されておらず、標的となりうるシグナル経路も明らかではない。

2. 研究の目的

7番染色体上の高頻度欠失領域7q34に位置するスプライソソーム遺伝子LUC7L2のハブ口不全により、スプライシングの制御異常をきたし予後不良となる事象を踏まえ、LUC7L2の機能不全に起因するスプライシングの制御異常とそれによる造血幹細胞の腫瘍化に深く関わる分子機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、LUC7L2機能不全骨髄系悪性腫瘍の代替として骨髄性白血病細胞株を用い、LUC7L2を標的としたshRNAをレンチウイルスを用いた感染実験にて導入し、LUC7L2の発現低下によるスプライシング制御異常の同定、バリエーション解析をRNA-sequencing法を用いて行った。これらの解析にて同定される分子を介する腫瘍化の機序につき検証を行った。

4. 研究成果

(1) LUC7L2の遺伝子発現を抑制する目的で、蛋白コーディング領域と3'側の非翻訳領域を標的としたshRNAを作成した。これらのshRNAを骨髄系白血病細胞株HL60, K562にレンチウイルスを用いた感染実験を行いshRNAの導入を行った。RNA干渉により、LUC7L2の発現がそれぞれ20%、50%、70%に抑制された細胞株が得られた。これらのLUC7L2低発現細胞では細胞増殖がコントロール細胞と比べ遅く、またLUC7L2発現が低いほど、細胞増殖は遅い傾向にあった。増殖が遅くなる原因として、細胞周期の検討を行ったが、コントロール細胞とLUC7L2発現低下細胞群との間で細胞周期の変化はみられなかった。また、これらのLUC7L2低発現細胞では、細胞形態の変化が認められ、細胞間がそれぞれ接着する形態を呈した。

	doubling time	
	shLUC7L2	mock
HL60	34 hr	27 hr
K562	36 hr	23 hr

表1 doubling time

(2) 上述のLUC7L2発現低下細胞における遺伝子発現の変化を検討した。LUC7L2発現低下細胞では表1のように、遺伝子の発現変化が認められた。なかでも、NOTCH3, AMIGO, ABLIM1の発現変化が、(1)で認められたLUC7L2発現低下細胞の携帯変化に関与していることが予想された。

Gene	Official Full Name	Locus	Fold change	
			K562/sh	HL60/sh
SPDYA	Speedy/RINGO Cell Cycle Regulator Family	chr 2	>100	3.0
WT1-AS_8	WT1 antisense RNA	chr 11	>100	74.8
FSCN3	fascin actin-bundling protein 3	chr 7	>100	>100
AMIGO3	adhesion molecule with Ig like domain 3	chr 6	32.0	37.1
ZFP91-CNTF	ZFP91-CNTF readthrough	chr 11	10.9	12.8
BTBD8	BTB domain containing 8	chr 1	5.8	>100
CD101	CD101 molecule	chr 1	4.1	4.0
NOTCH3	notch 3	chr 19	3.3	3.2
ABLIM1	actin binding LIM protein 1	chr 10	3.2	2.8
SMIM24	small integral membrane protein 24	chr 19	2.9	3.0
RABGEF1	RAB guanine nucleotide exchange factor 1	chr 7	-2.0	-1.8
TOX	thymocyte selection associated high mobility group box	chr 8	-3.3	-2.2
SND1-IT1	staphylococcal nuclease and tudor domain containing 1	chr 7	-3.9	<-100
SNORA52	small nucleolar RNA, H/ACA box 52	chr 11	-5.1	<-100
NEAT1_3	nuclear paraspeckle assembly transcript 1	chr 11	-26.3	-6.6
KBTBD11-OT1	kelch repeat and BTB domain containing 11	chr 8	-30.4	-9.2

表2 LUC7L2 低発現細胞において発現変化がみとめられた遺伝子

(3) LUC7L2 発現低下細胞におけるスプライシングの異常を RNA sequencing で検討した。LUC7L2 発現低下細胞では、5' スプライスサイトの異常、3' スプライスサイトの異常、排他的なエクソン、イントロンの保持、エクソンのスキッピングなど、いずれの異常も認められた(図1)。K562 および HL60 とともに、exon skipping が高頻度に認められるスプライシングの異常であった。

なかでも、HMGN1 (high mobility group nucleosome binding domain 1)の排他的エクソンが両細胞に共通してみとめられ、HMGN1 のアイソフォームの変化が LUC7L2 低発現細胞における腫瘍化のメカニズムに関与していることが示唆された。

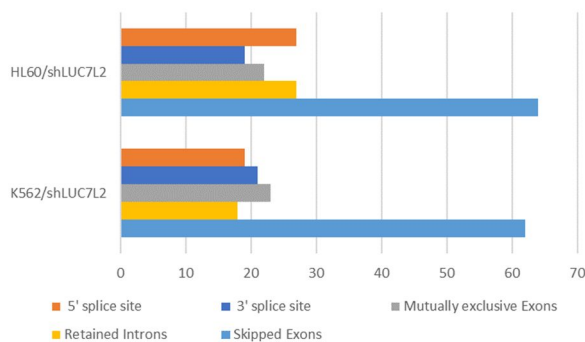


図1. LUC7L2 発現低下細胞におけるスプライシングの異常

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Genetic abnormalities and pathophysiology of MDS. Hosono N. Int J Clin Oncol. 2019 May 15. PMID: 31093808、査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Hosono Naoko, et al. Spliceosomal gene LUC7L2 defect causes alteration of NOTCH3 and BIM expression in myeloid leukemia cell lines. 第9回日本血液学会国際シンポジウム、2018年、京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年：
 国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：無し

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：無し

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。