様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　３０　年　　６　月　２６　日現在

機関番号：　１４３０１
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2016～2017
課題番号：　１６Ｋ１９５７４

研究課題名（和文）新規DDX41遺伝子変異による骨髄系腫瘍の発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Biological characterization of DDX41 germline and somatic mutations in myeloid neoplasms

研究代表者

昆　彩奈（Kon, Ayana）

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：２０７７２４０３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：近年、成人発症の家族性骨髄異形成症候群／急性骨髄性白血病の新規遺伝子変異として、RNAヘリケースであるDDX41遺伝子の胚細胞・体細胞変異が同定された。本研究では、Ddx41遺伝子のノックアウトマウス、およびホットスポット体細胞変異(p.R525H)に関する条件的ノックインマウスの解析を通じて、DDX41遺伝子変異が骨髄系腫瘍の病態において果たす機能的意義を検討した。Ddx41ヘテロノックアウトマウスおよびDdx41変異ノックインマウスはともに、骨髄非競合移植下で進行性の白血球減少を示した。これらのマウスモデルから純化した造血幹前駆細胞のRNAシーケンスにて複数の候補標的遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：DDX41 is a newly identified leukemia predisposition gene encoding an RNA helicase, whose germline mutations are tightly associated with late-onset myeloid malignancies. In typical cases, a germline loss-of-function allele is compounded by a somatic missense mutation affecting the helicase domain in the remaining allele (p.R525H). To clarify the role of these DDX41 alleles, we generated Ddx41 heterozygous knock-out mice, as well as mice carrying the conditional R525H missense allele. In noncompetitive transplantation experiments, the recipient mice transplanted with Ddx41 R525H BM cells or Ddx41 heterozygous knock-out BM cells showed significant and progressive leukopenia compared with wild-type controls. Further, we identified several candidate targets of Ddx41 mutations through RNA sequencing of Ddx41 mutated hematopoietic stem and progenitor cells.

研究分野：　血液腫瘍病態学

キーワード：　骨髄異形成症候群　急性骨髄性白血病　遺伝子改変マウス

１．研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS; myelodysplastic syndromes)の原因遺伝子変異に関しては、近年の我々およびその他の研究グループによる RNA スプライシング因子の変異の発見と(Yoshida et al., Nature. 2011, Papaemmanuil. et al., NEJM. 2011)、これに続く、*SETBP1* 遺伝子変異(Makishima et al, Nat Genet. 2013, Sakaguchi et al, Nat Genet. 2013)や、申請者らによるコヒーシン遺伝子変異の発見(Kon et al., Nat Genet. 2013, Yoshida et al., Nature Genet. 2013)により急速に理解が進んでいる。一方で、その機能的側面については多くが未解明であり、in vivo での検討を含めた詳細な機能的解析により MDS 発症の分子メカニズムを解明することが、MDS を含む骨髄系腫瘍の病態の理解、さらには分子診断・治療法の改善のために強く望まれている。

近年、成人発症の家族性骨髄異形成症候群(MDS)／急性骨髄性白血病(AML)の新規遺伝子変異として、*DDX41* 遺伝子の胚細胞・体細胞変異が同定された (Polprasert et al., Cancer Cell, 2015)。従来、家族性 MDS/AML の原因遺伝子としては、*RUNX1*, *CEBPA*, *GATA2* の胚細胞変異が知られていたが、これらは全て若年発症で、より頻度が高い晩発性の MDS/AML の原因遺伝子については知られていなかった。興味深いことに、約半数の症例では、胚細胞変異を有するアリルの対側アリルに *DDX41* の体細胞変異を認めることが報告されたことから、*DDX41* 遺伝子が癌抑制遺伝子として機能することが示唆された。さらに、孤発例の MDS でも *DDX41* 遺伝子変異が同定され、その半数は胚細胞変異であったことから、遺伝子スクリーニングを行うことで最善の治療法選択につながる可能性も想定された(Polprasert et al., Cancer Cell, 2015)。*DDX41* 遺伝子変異は DEAD-box ファミリーの RNA ヘリケースをコードし、スプライソソームと相互作用することで RNA スプライシングにおいて機能を果たすことが報告されており、MDS において最も高頻度に遺伝子変異を認める RNA スプライシング遺伝子変異と同様に、RNA スプライシングパスウェイの破綻を介して骨髄系腫瘍の発症に関与している可能性も想定され、その分子病態の解明には大変興味がもたれるところである。しかし、どのような機序を介して骨髄系腫瘍の発症に寄与するのかについては未知の新しいクラスの遺伝子変異であり、その詳細な生物学的検討は、病態の理解とそれに基づいた最適な治療法の選択のうえで重要な課題であると考えられた。

２．研究の目的

上記の研究背景をふまえ、申請者らは、*Ddx41* 遺伝子の条件的ノックアウトマウスを入手するとともに、条件的変異アリルノックインマウスの作成を進めていた。本研究の目的は、これらの *Ddx41* 変異マウスモデルを用いて、家族性 MDS/AML の新規 *DDX41* 遺伝子が骨髄系腫瘍の発症において果たす生物学的役割を *in vivo* において明らかにすることである。造血系に変異に起因する表現型が認められた場合、その細胞系列を対象とした RNA シーケンス解析による発現解析および RNA スプライシング異常の探索等を通じて *Ddx41* 変異の標的遺伝子を明らかにし、MDS の病態の理解、治療戦略の改善に資するような研究を展開することを目指す。

３．研究の方法

<u>１）*Ddx41* 遺伝子変異マウスモデルの作成</u>

家族性 MDS/AML および孤発性 MDS にて同定された *DDX41* 遺伝子変異についての遺伝子改変マウスの入手・作成を行った。*Ddx41* 遺伝子の条件的欠失マウスについては、米国マウスバンク Knockout Mouse Project(KOMP)より入手した。患者検体のシーケンス解析により

同定された *DDX41* 体細胞変異の 90%以上は、525 番目のアルギニン残基にホットスポット変異として生じており、種間で高度に保存されている。この体細胞変異の機能を調べる目的で、*Ddx41 R525H* 変異条件的ノックインマウス(C57BL/6 背景)を構築した(理化学研究所・古関博士、かずさ DNA 研究所・中山博士との共同研究)。そこで、上述の 2 系統のマウスをまず造血組織特異的 Cre リコンビナーゼ発現マウス（*Vav1-Cre* および *Mx-Cre*)と交配させた。さらに、得られた *Ddx41* 条件的欠失マウスと *Ddx41 R525H* 変異条件的ノックインマウスとを交配させることにより、患者で観察される遺伝子異常をモデリングしたマウスを得た。

２）*Ddx41* 遺伝子変異マウスの造血組織における表現型の探索

上述の *Ddx41* 変異マウスを用いて、末梢血および骨髄の組織学的評価、フローサイトメトリーによる表現マーカー解析による造血幹/前駆細胞分画の頻度や細胞数等の詳細なプロファイルの解析を行い、骨髄異形成、芽球の出現、血算の異常、分化異常、髄外造血等の MDS や AML に特徴的な表現型を呈するかどうかを観察した。また、野生型および変異型マウスモデル双方から摘出した骨髄細胞を等量ずつ混合し、致死的放射線照射を行ったレシピエントマウスに移植して、経時的に末梢血でのドナーキメリズムを評価することによって、*Ddx41* 変異骨髄細胞の骨髄再構築能について評価した。

３）ヒト由来細胞株での *DDX41* 遺伝子変異の機能解析

変異 *DDX41* の造血細胞に対する効果には種依存性が存在する可能性がある。ヒト白血病細胞株および臍帯血造血幹細胞において、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術により *DDX41* 遺伝子をノックアウトした細胞株を作成し、増殖能の評価および分子生物学的・生化学的検討を行った。

４）*DDX41* 遺伝子変異の遺伝子標的の探索

DDX41 は RNA ヘリケースをコードする遺伝子の一つであり、ATPase 活性を利用して、二本鎖 RNA や RNA-蛋白質複合体の解体・形成を行い、RNA スプライシングや転写に関与している。スプライソソームと相互作用することで RNA スプライシングにおいて機能を果たすことが報告されているため(Polprasert et al., Cancer Cell, 2015)、*DDX41* 変異による病態の少なくとも一部には、RNA スプライシングの異常が関与していると予想された。そこで、*Ddx41* 変異マウスモデルから FACS Aria III により純化した各血球前駆細胞分画を用いて、RNA シーケンス解析による発現解析および RNA スプライシング異常の探索を行った。さらに、*Ddx41* 変異マウスモデルで観察された RNA スプライシング異常や遺伝子発現の異常が、ヒト検体において認められるかを検討するために、*DDX41* 遺伝子変異を有するヒト患者検体の RNA シーケンス解析を行った。

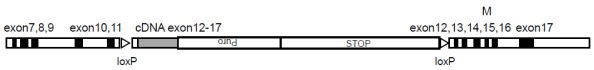
４．研究成果

１）*Ddx41* 遺伝子変異マウスモデルの作成

Ddx41 遺伝子の条件的欠失マウスを米国マウスバンク Knockout Mouse Project(KOMP)より入手した。本マウスは、loxP 配列で挟まれたエキソン７～９が、Cre レコンビナーゼ存在下で欠失するコンストラクトになっている。まず CAG-FLPe マウスと交配させてネオマイシンカセットを除去したのちに、造血細胞特異的な Cre 発現マウスである、*Vav1-Cre* マウスまたは *Mx-Cre* マウスと交配させた。*Vav1-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* flox/wt マウスと *Vav1-Cre*$^{-/-}$ *Ddx41* flox/wt マウスを交配させたところ、*Vav1-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* flox/flox マウスは生まれなかったことから（胎生致死)、Ddx41 は造血系の正常な発生過程において必

須の役割を果たすことが明らかになった。

さらに、申請者らは、*DDX41* 遺伝子にホットスポット体細胞変異として生じる R525H 変異の機能を調べる目的で、*Ddx41* R525H 変異条件的ノックインマウス(C57BL/6 背景)を構築し、*Mx-Cre* マウスと交配させた。本マウスのコンストラクトは、下図に示すとおり、変異アリルを含むエキソン前に、残りの野生型 cDNA および loxP-STOP-loxP カセットを挿入しており、Cre 非存在下で野生型アリル、Cre 存在下で変異アリルを発現するように工夫した。*Mx-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* floxR525H/wt マウスに pIpC を投与した後に、RNA シーケンスを行い、R525H アリルの発現を確認した。



このようにして得られた *Ddx41* 条件的欠失マウスと *Ddx41 R525H* 変異条件的ノックインマウスとを交配させることにより、患者で観察される遺伝子異常をマウスでモデリングを進めている。

<u>２）*Ddx41* 遺伝子変異マウスの造血組織における表現型の探索</u>

上述の *Ddx41* 変異マウスを用いて、末梢血および骨髄の組織学的評価、フローサイトメトリーによる表現マーカー解析による造血幹/前駆細胞分画の頻度や細胞数等の詳細なプロファイルの解析を行った。

まず、Mx-Cre+/- *Ddx41* floxR525H/wt マウスと同腹子の Mx-Cre+/- *Ddx41* wt/wt マウスの骨髄細胞を、致死量放射線照射したレシピエントマウスに非競合的に骨髄移植した。移植後１か月後に pIpC を投与し、さらに１か月毎に末梢血の血算を経時的に観察したところ、*Mx-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* floxR525H/wt マウス由来の骨髄細胞で再構築されたレシピエントマウスは、野生型コントロールと比較して、有意な白血球減少を認めた。一方で、長期造血幹細胞分画 (Lin-Sca-1+c-Kit+CD48-CD150+)、Lin, Sca-1, c-Kit, CD34, CD16/32 を用いて評価した common myeloid progenitor, granulocyte-monocyte progenitor, megakaryocyte-erythrocyte progenitor, さらに Lin, Sca-1, c-Kit, IL7-R, Flt3/Flk2 を用いて評価した common lymphoid progenitor の各分画の頻度や細胞数は、変異型と野生型で有意差を認めなかった。したがって、*Ddx41* 変異は、より分化した細胞分画において造血に影響を及ぼすと考えられた。

次に、*Vav1-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* flox/wt マウスと同腹子の *Vav1-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* wt/wt マウスの骨髄細胞を、致死量放射線照射したレシピエントマウスに非競合的に骨髄移植した。１か月毎に末梢血の血算を経時的に観察したところ、*Vav1-Cre*$^{+/-}$ *Ddx41* flox/wt マウス由来の骨髄細胞で再構築されたレシピエントマウスは、野生型コントロールと比較して、有意な白血球減少を認めた。一方で、長期造血幹細胞分画，骨髄系前駆細胞、リンパ系前駆細胞の頻度や細胞数は、変異型と野生型で有意差を認めなかった。

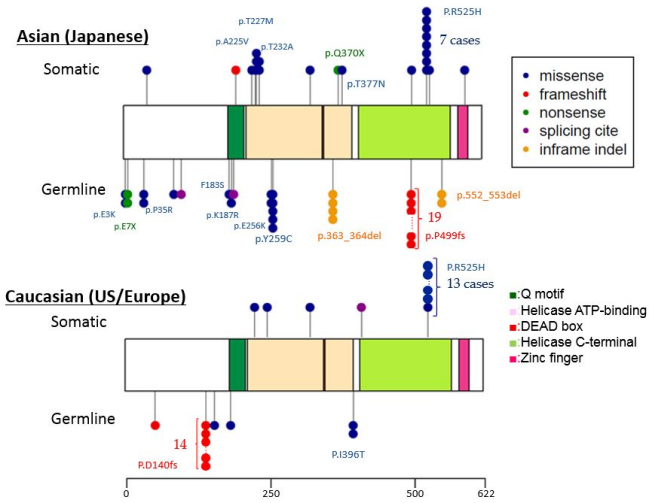
以上の結果より、*Ddx41* のヘテロノックアウトマウスと、R525H 変異ヘテロノックインマウスは類似した表現型を示すことが明らかになり、*DDX41* R525H 変異はドミナントネガティブに作用する可能性があると考えられた。

さらに、野生型および変異型(ヘテロノックアウト、またはヘテロノックイン) マウスモデル双方から摘出した骨髄細胞を等量ずつ混合し、致死的放射線照射を行ったレシピエントマウスに移植して、末梢血でのドナーキメリズムを経時的に評価したが、野生型と変異型で骨髄再構築能には有意差を認めなかった。したがって、*Ddx41* 変異を有する造血幹細胞がクローン選択をうけるのには、追

加の遺伝子変異の獲得が必要であると推測された。

<u>３）ヒト由来細胞株での *DDX41* 遺伝子変異の機能解析</u>

本研究課題と並行して、我々は、本邦およびアジア諸国の MDS 患者における標的シーケンスを通じて、アジア人種に共通して認められる胚細胞変異を新たに発見している（下図参照）。興味深いことに、これらの胚細胞変異は、欧米より報告されたものとは独立のものであり、*DDX41* の変異が白色人種と黄色人種が分離した後に獲得されたものであると確認された。また、多くの胚細胞変異はフレームシフト変異であり、機能喪失をもたらすと考えられた。



患者検体において高頻度に認められた *DDX41* 変異に関して、HeLa 細胞に変異体を強制発現させたのちに、共免疫沈降を行うことにより、p.D140fs 変異では STING との結合性が失われるものの、黄色人種に特徴的に胚細胞変異として認められる p.A500fs 変異や、両人種に共通して体細胞変異として高頻度に生じる p.R525H 変異では STING との結合性は失われず、異なる遺伝子変異が別の機能をもつ可能性も示唆された。

次に、ヒト白血病細胞株（K562）において、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術により *DDX41* 遺伝子をノックアウトした細胞株を作成した。ホモ接合性のノックアウト細胞株は得られず、ヘテロ接合性のノックアウト細胞株を得ることができた。今後、増殖・分化能などの表現型を探索する予定である。

<u>４）*DDX41* 遺伝子変異の遺伝子標的の探索</u>

Ddx41 変異マウスモデルから FACS Aria III により純化した造血幹前駆細胞分画(LSK)を用いて、発現解析および RNA スプライシング異常を探索し、*Ddx41* 変異の候補標的遺伝子を複数同定した。今後、*DDX41* 遺伝子変異を有するヒト検体においても、*Ddx41* 変異マウスモデルで観察された RNA スプライシング異常や遺伝子発現の異常が認められるかを検討し、さらに候補標的遺伝子に関する機能解析を通じて、*DDX41* 遺伝子変異による骨髄系腫瘍発症の分子メカニズムを明らかにすることを目指す。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計１件）

<u>Kon A</u>, Yamazaki S, Nannya Y, Kataoka K, Ota Y, Nakagawa MM, Yoshida K, Shiozawa Y, Morita M, Yoshizato T, Sanada M, Nakayama M, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Physiological *Srsf2* P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. ***Blood***, 131(6), 621-635, 2018 DOI: 10.1182/blood-2017-01-762393. 査読あり

〔学会発表〕（計２件）

①<u>Kon A</u>, Kataoka K, Takeda J, Yoshizato T, Nakagawa MM, Kogure Y, Yoshida K, Nakayama M, Koseki H, Makishima H, Ogawa S. Biological characterization of *DDX41*

germline and somatic mutations in myeloid neoplasms. 日本血液学会学術集会 2017 年

②Kon A, Kataoka K, Takeda J, Yoshizato T, Nakagawa MM, Kogure Y, Yoshida K, Nakayama M, Koseki H, Makishima H, Ogawa S. Biological characterization of *DDX41* germline and somatic mutations in myeloid neoplasms. 日本癌学会学術総会 2017 年

〔図書〕（計０件）
なし

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
ホームページ等
http://plaza.umin.ac.jp/kyoto_tumorpatho/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
昆　彩奈（KON, Ayana）
京都大学・大学院医学研究科・特定助教
研究者番号：20772403

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
小川　誠司　（OGAWA, Seishi）
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：60292900
古関　明彦　（KOSEKI, Haruhiko）
国立研究開発法人理化学研究所，生命医科学研究センター，チームリーダー
研究者番号：40225446
中山　学　（NAKAYAMA, Manabu）
公益財団法人かずさＤＮＡ研究所，先端研究開発部，主任研究員
研究者番号：30370927