

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07218

研究課題名（和文）急性骨髄性白血病のエクソン・スキップ治療に向けた基盤的研究

研究課題名（英文）Fundamental Research Toward Exon Skipping Therapy for Acute Myeloid Leukemia

研究代表者

坂下 暁介（Sakashita, Gyosuke）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・助教

研究者番号：00397457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：NPM1のExon7-12（約11kb）から構成されるmini gene ベクターを構築した。mini gene由来および内在性のNPM1.1とNPM1.3を個別に検出可能なプライマーセットを設計し、定量する実験系を確立した。スプライシングにおいてExon10の取り込みを抑制する領域を同定した。この領域に対するアンチセンスモルフォリノオリゴを導入すると、NPM1.3の発現が上昇したが、NPM1.1の発現は低下しなかった。次に、intron10を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドを用い、NPM1.1型スプライシングを物理的に阻害できるか検討した。しかしこれまでのところ切断には至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、NPM1.1遺伝子に変異を有するタイプの急性骨髄性白血病（AML）を対象とした、新たな治療法の開発につながるものである。このタイプのAML細胞の生存は、変異型NPMタンパク質の細胞質への局在に依存するとの知見から、核外輸送タンパク質の阻害剤を治療に用いる方法が試みられている。一方で本研究は、変異型NPM1.1のスプライシングに介入し、内在性NPM1.3に置換する試みである。核外輸送タンパク質阻害剤は、多くのタンパク質の細胞内局在に影響を与える上、低分子化合物によくみられる薬剤耐性の問題を伴う。一方、本研究の方法はNPMのみが標的となり、これらの問題を回避できると期待される。

研究成果の概要（英文）：A mini gene vector which consists of NPM Exon7-12 (approx. 11 kb) was constructed. An experimental system was established to design and quantify primer sets that can detect mini gene-derived and endogenous NPM1.1 and NPM1.3 separately. A region that suppresses Exon10 uptake in splicing was identified. Introduction of antisense morpholino oligos against this region increased expression of NPM1.3 but not NPM1.1. Next, we examined whether antisense oligonucleotides targeting intron10 could be used to physically inhibit NPM1.1-type splicing. However, so far no cleavage has been achieved.

研究分野：細胞生物学

キーワード：急性骨髄性白血病 エクソンスキップ療法

1. 研究開始当初の背景

(1) NPM1.1は、核小体に局在する多機能タンパク質で、リボソームの生合成や細胞の増殖、中心体の複製などに関与することが知られている。急性骨髄性白血病 (AML) 患者の約 30%は、NPM1.1 遺伝子の最終 Exon である Exon12 内にフレームシフト変異を有することが知られている。この結果、NPM1.1 タンパク質の C 末端領域に核外移行シグナルが出現するため、変異型 NPM1.1 は細胞質に局在する。(2) 変異型 NPM1.1 を発現する AML 細胞に対し、核外輸送タンパク質 Exportin1 に対する阻害剤を処理すると、変異型 NPM1.1 が核内に留まり細胞死が誘導された [①]。この結果から、NPM1.1 遺伝子にフレームシフト変異を有する AML 細胞の生存にとって、変異型 NPM1.1 の細胞質への局在が重要であることが示唆された。このため、現在、Exportin1 阻害剤を治療薬として用いる試みが進められている。

2. 研究の目的

(1) 低分子化合物を用いる治療法には常に薬剤耐性の問題が付きまとう。また、Exportin1 の阻害は他の多くのタンパク質の細胞内局在にも影響を及ぼすことが考えられる。本研究では Exportin1 阻害剤とは異なるアプローチをとり、フレームシフト型 NPM1.1 を発現する AML に対し、新たな治療法を開発することを目的とした。NPM1 遺伝子のスプライシングバリエーションには、最終 Exon として Exon12 を利用するものと、Exon10 を利用するものが存在する。前者の代表が NPM1.1 で、後者の代表が NPM1.3 である。本研究では、NPM1.1 の選択的スプライシングに介入し、最終 Exon として、変異を有する Exon12 (NPM1.1 型スプライシング) から変異のない Exon10 (NPM1.3 型スプライシング) への切り替えを促す。これにより変異型 NPM1.1 タンパク質の発現レベルを低下させ、治療効果を得られるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) ヒト NPM1 遺伝子領域全長を含む BAC クローンをもとに、NPM1 遺伝子の特定の範囲を含む断片をクローニングした。クローニングした遺伝子断片を、G196 [②]-HA-EmGFP (GHG) 融合発現ベクターに組み、mini gene ベクターを構築した。Mini gene ベクターを 293T 細胞に導入し、発現した GHG-NPM1.1 および GHG-NPM1.3 をウェスタンブロットにより検出し、また RNA を抽出し qPCR をおこない、GHG-NPM1.1 と GHG-NPM1.3 のスプライシング比率を算出した。

4. 研究成果

(1) NPM1 ゲノムの Exon9-Exon12 (5.6kb)、Exon8-Exon12 (11kb)、Exon7-Exon12 (12kb) 領域を組み込んだ mini gene を 293T 細胞に導入したところ、いずれの mini gene からでも GHG-NPM1.1 タンパク質が検出された。これに対し、GHG-NPM1.3 タンパク質は、Exon7-Exon12 mini gene を導入した細胞からは比較的強いシグナルが検出されたものの、Exon8-Exon12 mini gene ではシグナルが顕著に低下し、Exon9-Exon12 mini gene からは検出できなかった (図 1 A)。このため、Exon7 から intron7 の領域が NPM1.3 の発現に大きな役割を担っていることが示唆された。qPCR のデータもタンパク質レベルの傾向を裏付けるものであった。また、qPCR にて内在性の NPM 比 (Endo NPM1.3/Endo NPM1.1) および GHG-NPM 比 (GHG-NPM1.3/GHG-NPM1.1) を検討したところ、GHG-NPM1.3 タンパク質のシグナルが比較的強く検出された Exon7-Exon12 mini gene においても、内在性の NPM 比の半分程度にとどまっていた (図 1 B)。これらの結果から、最終 Exon として Exon10 を利用する NPM1.3 型のスプライシングは、Exon10 から 5kb 以上離れた上流からの制御を強く受けることが示唆された。

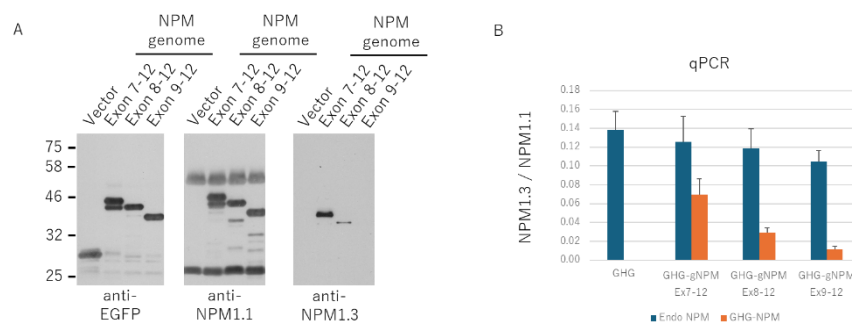


図1 NPM mini gene の293T細胞への導入によるNPM1.1とNPM1.3の発現

(2) NPM1 Exon7-Exon12 を組み込んだ mini gene において、Exon10 の一部を欠損した変異体を作成し、Exon10 の取り込みに及ぼす影響を検討した結果、Exon10 (331bp) のうち 70bp からなる領域を欠損すると NPM1.3 型のスプライシングが起きなくなることがわかった (図 2 A)。この 70bp をさらに分割して解析を進めたところ、d10 と命名した 17bp を欠損すると NPM1.3 の発現

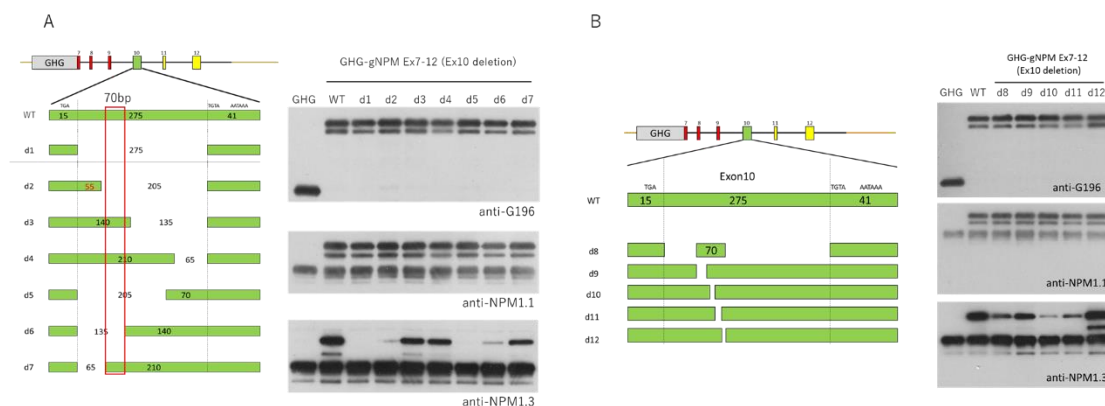


図2 Exon10の欠損変異体を用いたNPM1.3の発現解析

が顕著に低下した。一方、d12 と命名した 25bp を欠損すると NPM1.3 の発現レベルが上昇した (図 2 B)。この結果から、d12 を構成する 25bp からなる塩基配列は、スプライシング時に Exon10 の取り込みを抑制することが予想された。

(3) d12 を構成する 25bp の配列に対してアンチセンスモルフォリノオリゴを設計した。このアンチセンスモルフォリノオリゴを 293T に導入すると、NPM1.3 タンパク質の発現レベルがやや上昇した。qPCR においても NPM1.3 の発現レベルの上昇が認められた (図 3)。一方で、NPM1.3 の発現レベルが上昇すれば、NPM1.1 の発現レベルは低下することが予想されたが、NPM1.1 のタンパク質レベル、RNA レベルはいずれも軽微な低下を示すにとどまった。このため、アンチセンスモルフォリノオリゴを使用し、NPM1.3 型スプライシングを促進することは困難と考えられた。

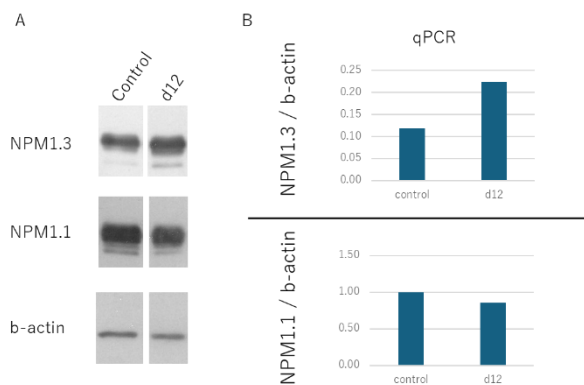


図3 アンチセンスモルフォリノオリゴを用いたNPM1.3の発現制御

(4) NPM1 遺伝子の Exon7-intron10 のゲノム領域を組み込んだ mini gene ベクターを 293T 細胞に導入すると、Exon7-Exon12 を組み込んだ mini gene に比べて NPM1.3 の発現レベルが顕著に上昇した (図 4 A)。そこで、NPM1 遺伝子の intron10 に対して、アンチセンスオリゴヌクレオチドを設計し、mRNA 前駆体の intron10 において物理的に切断することにより、Exon12 の取り込みを阻害し、Exon10 の利用を促すことができるかを検討した。2 種類のアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO-1、ASO-2) を HeLa 細胞に導入し、qPCR により NPM1.3 の RNA レベルを検討したが、NPM1.3 の発現レベルはむしろ低下していた (図 4 B)。これは導入したアンチセンスオリゴヌクレオチドが高濃度であることが原因と考えられた。

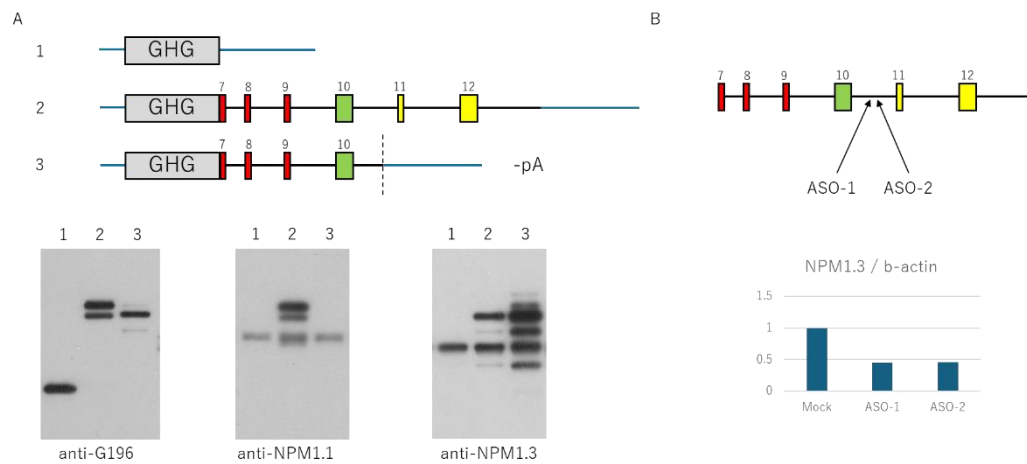


図4 アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたNPM1.3の発現制御

<引用文献>

- ① Lorenzo Brunetti, Michael C Gundry, Daniele Sorcini, Anna G Guzman, Yung-Hsin Huang, Raghav Ramabadran, Ilaria Gionfriddo, Federica Mezzasoma, Francesca Milano, Behnam Nabet, Dennis L Buckley, Steven M Kornblau, Charles Y Lin, Paolo Sportoletti, Maria Paola Martelli, Brunangelo Falini, Margaret A Goodell. *Cancer Cell*, 34, 2018, 499-512
- ② Kasumi Tatsumi, Gyosuke Sakashita, Yuko Nariai, Kosuke Okazaki, Hiroaki Kato, Eiji Obayashi, Hisashi Yoshida, Kanako Sugiyama, Sam-Yong Park, Joji Sekine, Takeshi Urano. *Sci Rep.* 7, 2017, 43480, <http://dx.doi.org/10.1038/srep43480>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	浦野 健 (Urano Takeshi) (70293701)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授 (15201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関