

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21001

研究課題名（和文）U1 snRNA変異型髄芽腫における異常ポリアデニル化の同定とその機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of abnormal polyadenylation in U1 mutant medulloblastoma

研究代表者

鈴木 啓道（Suzuki, Hiromichi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：90751024

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではU1 snRNA変異型髄芽腫における、ポリアデニル化異常の探索とその病態への関与を解明することを目的として行った。

SHH型髄芽腫細胞株に変異型U1 snRNAを含んだウイルスベクターを感染させることで、変異型U1 snRNAを発現する細胞株を樹立した。合計173症例の髄芽腫検体の提供を受け、分子分類を完了した。

ポリアデニル化領域を解析するため3'-seq手法である3' READS+原法に改良を加えることで、安定したポリアデニル化領域の解析が可能となった。シーケンスの結果、ポリアデニル化領域の定量とポリアデニル化起始部の同定が可能であった。今後、本手法を用いて解明を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

U1 snRNA変異型髄芽腫は極めて予後の悪い原発性悪性脳腫瘍である。U1 snRNA変異により髄芽腫細胞ないで広範なスプライシング異常が生じていることが明らかになったがその病態の解明は不十分である。近年、U1 snRNAが異常ポリアデニル化の抑制を行っていることが明らかとなり、U1 snRNA変異型髄芽腫においてもポリアデニル化の異常が生じていることが推測される。一般的なRNAシーケンスではポリアデニル化領域の解析は極めて困難である。本研究により、ポリアデニル化領域の解析が可能となったため、今後髄芽腫の病態解明に繋がっていくと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is the development of analysis for abnormal polyadenylation to reveal the polyadenylation defect in U1 snRNA-mutant medulloblastoma. We established SHH cell lines that express mutant U1 snRNA using a lentivirus vector and determined molecular subgroups for a total of 173 medulloblastoma specimens.

We established a modified 3' READS+ method which can analyze genome-wide polyadenylation. The sequencing analysis is able to detect exact polyadenylation sites. We will continue to analyze U1 mutant medulloblastoma using the modified 3' READS+ method.

研究分野：神経腫瘍学

キーワード：髄芽腫 ポリアデニル化 スプライシング U1 snRNA

1. 研究開始当初の背景

髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く予後が悪い疾患である。有効な分子標的治療薬の開発が望まれているが、標的となりうる遺伝子異常が少なく新規治療の開発には至っていない。

申請者は髄芽腫の全ゲノムシーケンズデータから、U1 small nuclear RNA (snRNA) 変異が好発することを発見した(図 1)^{1,2}。U1 snRNA は真核生物内に広く存在し、細胞内の RNA と結合し機能する。主な機能はスプライシングにおける 5' スプライス部位の認識とスプライシングの開始である。変異は RNA を base-pairing にて認識する配列内に存在するため、変異が生じることにより、異常なスプライスサイトが認識され広汎な異常スプライシングが引き起こされていることがわかっている。しかし、スプライシング異常のみでは病態の説明は不十分であり、U1 snRNA 変異の機能は十分に解明されていない。その理由として、U1 snRNA が 5' スプライス部位の認識以外にも様々な機能を有することがあげられる。そのため、異常スプライシング以外にも異なった機序で髄芽腫の病態に関与していることが推測されその機能の解明が必要である。近年、U1 snRNA が異常ポリアダデニル化の抑制に関与していることが報告された³。また、U1 snRNA 変異は髄芽腫以外にも慢性リンパ性白血病や肝細胞癌でも認められるが、慢性リンパ性白血病では一部の症例において異常なポリアダデニル化が生じていることが報告されている(図 1)⁴。このことから、変異型 U1 snRNA が髄芽腫細胞内でポリアダデニル化に異常を引き起こしていることが疑われる。

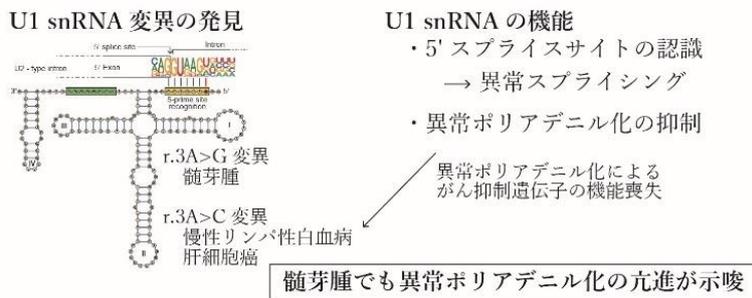


図 1:U1 snRNA 変異の同定と U1 snRNA の機能

図 1:U1 snRNA 変異の同定と U1 snRNA の機能

2. 研究の目的

本課題では髄芽腫における異常ポリアダデニル化を網羅的に解析することにより、U1 snRNA 変異により引き起こされる RNA プロセスの異常のさらなる解明を行い、髄芽腫の病態を明らかにすることを目的とする。

近年 U1 snRNA がスプライシング以外の RNA 代謝に関与することが明らかになってきた。スプライシング異常だけでは U1 snRNA 変異の病態を説明することは不十分であり、スプライシング以外の異常も髄芽腫の病態形成に寄与している可能性が十分考えられている。現在、最も普及しているショートリードシーケンサーによる RNA-seq ではポリアダデニル化部位を高感度で測定することは困難である。そのため、本研究ではポリアダデニル化領域の解析が可能なシーケンズ手法を確立し、U1 snRNA 変異型髄芽腫内で生じているポリアダデニル化異常を解明することを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 変異型 U1 snRNA 発現細胞株と髄芽腫検体の収集および分子分類の解析

U1 snRNA 変異型髄芽腫細胞株はこれまで樹立されていない。そのため、U1 snRNA 変異を導入した細胞株を作製する必要があった。髄芽腫細胞株は SHH 型髄芽腫細胞株 2 種類 (DAOY, ONS76) に変異型もしくは野生型 U1 snRNA を発現するレンチウイルスベクターを感染させ、遺伝子発現細胞株を作成した。U1 snRNA は U1 snRNA 特異的なプロモーターでのみ発現が可能である。そのためプロモーター配列および 3' に存在し転写終了点を決定する 3' Box を含めた配列をレンチウイルスベクターに挿入し、各細胞株に導入した。

ヒト髄芽腫検体は日本小児がん研究グループ(JCCG)の協力を得て収集した。髄芽腫は発現に基づいて 4 つのサブグループに分類されるが、U1 snRNA 変異は SHH 型髄芽腫に特異的に認められるため、サブグループ解析を行った。rRNA depletion 法による RNA-seq ライブラリーを作成し RNA-seq を行った。各症例における、遺伝子ごとの発現量の計測を行うと共に、サブグループがすでに決定している公開シーケンズデータでも、同様の解析を行った。自験例と公開データとを合わせて consensus clustering 法と Non-negative Matrix Factorization 法でクラスタリングを行い各症例の髄芽腫サブグループの決定を行った。U1 snRNA 変異の同定は、アレル特異的 PCR を用いた rhAmp SNP アッセイを確立し、施行した。

(2) ポリアダデニル化解析手法である 3' -seq の確立

Total RNA からポリアダデニル化部位を濃縮してシーケンズを 3' -seq の確立を行った。3'

-seq の手法として比較的引用されている手法は Mayr 法と 3' READS+法である。

Mayr 法では、ビオチン化した polyT 配列プライマーを用いてポリアデニル化領域をキャプチャーする。プライマー-poly-T 配列の中にはニックを形成するために一塩基のみウラシル塩基を組み込ませてある。Second strand を合成した後、ウラシルを除去し、ニックを導入する。このニックを基にニックトランスレーションを行い目的とする塩基長の二本鎖 cDNA を合成する。ストレプトアビジンにて回収し、シークエンスアダプターを両端にライゲーションしてライブラリーを作製する方法である。

3' READS+法は、Oligo(dT) ビーズで選択した RNA を先に目的のサイズに断片化した上で、断片化 RNA に対してアダプター配列を結合させ、最後に逆転写反応と PCR により DNA ライブラリーを作製する方法である。

Mayr 法での安定的なライブラリー作成が困難であったため、3' READS+法を改良しポリアデニル化領域の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 変異型 U1 snRNA 発現細胞株と髄芽腫検体の収集および分子分類の解析

転写開始点からプロモーター領域を含んだ 393 塩基上流の配列と転写終了点から 39 塩基下流の配列を組み込んだ野生型および変異型 U1 snRNA 発現ベクターを作成した。それぞれを、Daoy・ONS76・HEK293T 細胞に感染させた。48 時間培養したあと、細胞を採取し RNA を抽出した。5' RACE 法を用いて U1 snRNA の発現解析を行った。変異型 U1 snRNA ベクターを導入した細胞株では U1 snRNA の 3 番目の塩基に C の波形が確認でき、変異型 U1 snRNA が発現していると考えられた(図 2a)。U1 snRNA はヒトのゲノム内に複数存在し、GRCh38 リファレンスゲノムでは 4 つの U1 snRNA 遺伝子が登録されている。また、T2T リファレンスゲノムでは 7 個登録されており実際いくつの U1 snRNA 遺伝子が存在するかわかっていない。変異は複数ある U1 snRNA の一つのみが存在していることが推測されるため、発現している U1 snRNA のうち変異型の割合は 10~20%程度と推測されるため、発現量としては妥当な割合で発現していると判断された。また、ベクター感染後の増殖能を観察すると、Daoy と ONS76 の SHH 髄芽腫細胞株では、増殖率に大きな変化はなかったが、HEK293T においては変異型 U1 snRNA を発現させると、増殖能の低下が得られ最終的にすべて死滅した(図 2b)。このことから、細胞内のスプライシング変化は一般的には細胞にとって有害であり、特徴的な発現パターンを呈している細胞にのみ生存に有利な変化を与えることが示唆された。

ヒト髄芽腫検体に関しては JCCG より合計 173 例の症例のご提供を受けた。RNA-seq による髄芽腫サブグループの解析により各症例のサブグループの同定を行った(図 2c)。既報の報告と比較すると各サブグループの割合は大きな違いはない一方、U1 snRNA 変異型 SHH 髄芽腫の症例がかなり少なかった。これは JCCG に登録されている症例は原則小児の脳腫瘍症例であり、U1 snRNA 変異型 SHH 髄芽腫は思春期から成人期にかけても発症する疾患であるため、これまでの報告より割合が低い結果となったと考えられる。変異の検出は rhAmp SNP ジェノタイプピングシステムを確立して行った。プロモーター領域の一塩基多型の解析の結果、U1 snRNA の発現調整部位と推測されている element A 及び B においては一塩基多型の頻度が低く、この領域にプローブを設計することで、偽陰性が低下すると考えた。確立した手法を用いて変異解析を行ったところ、U1 snRNA 変異型腫瘍と野生型腫瘍を明瞭に判定が可能であった(図 2d)。RNA-seq の発現解析を行うことで、髄芽腫サブグループの分類を行った。以上により分子サブグループの同定が完了し、以後の解析に使用する準備が整った。

(2) ポリアデニル化解析手法である 3' -seq の確立

研究開始時、Mayr 法でのライブラリー構築手法の確立をめざした。Mayr 法原法では、single-read sequencing を対象としており、ニックトランスレーションは 50-75 塩基の断片を得ることを目標としている。これを paired-end sequence が可能な塩基長まで伸ばすため、伸長時間の調整を行った。また、両端のシークエンスアダプターは原法であるとカスタムプライマーを使用し

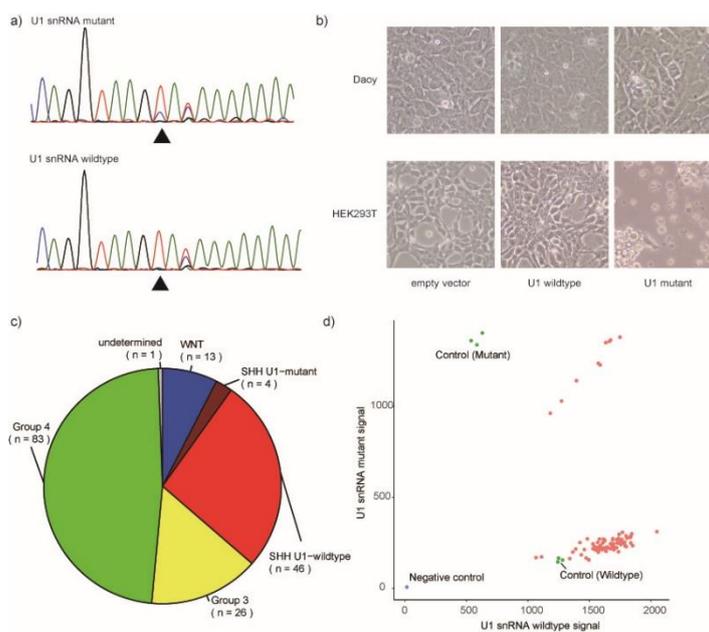


図 2：細胞株の確立と臨床検体の分子分類

ているが、一般的なライブラリー作成試薬を用いて行うこととした。改良型 Mayr 法を用いて、ライブラリーの作成は可能であったが、実験間誤差が大きく、実験毎に収量に大きなばらつきが生じた。各段階で検証したところ、ニックトランスレーションによる伸長反応が、実験間における収量の差が大きく条件検討を行っても安定的な収量を得ることができなかった。収量が少ないサンプルをシーケンスしても、目的とするポリアダデニル化領域がまったく濃縮されていない結果であったため、手法を 3' READS+法に変更することとした。

3' READS+法では RNA の断片化の際に使用する酵素が現在入手不可能となっているため、94 度の加熱処理により断片化を行い、目的のサイズとなる条件を確立した。また、アダプター配列結合過程が煩雑で結合の成功率が低く、またシングルエンドシーケンスにしか対応していないことから、本法の鍵となる RNA の 3' 末端を濃縮した RNA フラグメントは従来法に準じて作成した上で、アダプター配列の結合は既存の RNA ライブラリキット (NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina) を用いて効率的に良好なライブラリーを得ることに成功した。構築したライブラリーを用いてシーケンスを行ったところ、ポリアダデニル化起始部をカバーした配列が全体の 0.32 と濃縮が認められ、IGV 上でもポリアダデニル化領域が確認できた (図 3)。

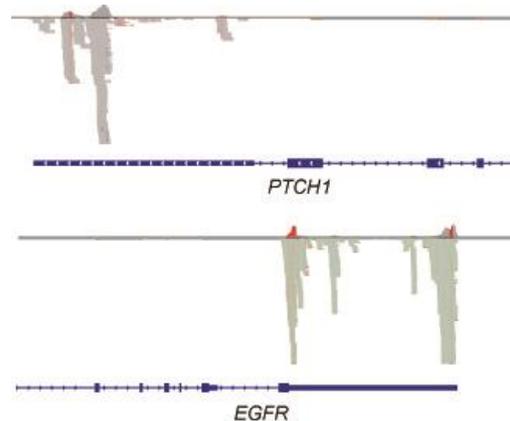


図 3: 3' READS+法によるポリアダデニル化領域の濃縮

改良型 3' READS+法によりポリアダデニル化領域を濃縮してシーケンスすることが可能となった。ポリ A 鎖を維持したままシーケンスが可能で、一塩基単位でのポリアダデニル化起始部の同定が可能である。今後、確立した細胞株と分子分類済みの髄芽腫検体を用いてシーケンスを行い、U1 snRNA 変異に特異的なポリアダデニル化領域を探索していく予定である。

<引用文献>

- 1 Suzuki, H. *et al.* Recurrent non-coding U1-snRNA mutations drive cryptic splicing in Shh medulloblastoma. *Nature*, doi:10.1038/s41586-019-1650-0 (2019).
- 2 Shuai, S. *et al.* The U1 spliceosomal RNA is recurrently mutated in multiple cancers. *Nature*, doi:10.1038/s41586-019-1651-z (2019).
- 3 Kaida, D. *et al.* U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* **468**, 664-668, doi:10.1038/nature09479 (2010).
- 4 Lee, S.-H. *et al.* Widespread intronic polyadenylation inactivates tumour suppressor genes in leukaemia. *Nature*, doi:10.1038/s41586-018-0465-8 (2018).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Funakoshi Yusuke, Sugihara Yuriko, Uneda Atsuhito, Nakashima Takuma, Suzuki Hiromichi	4. 巻 114
2. 論文標題 Recent advances in the molecular understanding of medulloblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 741 ~ 749
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15691	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hendrikse Liam D., Haldipur Parthiv, Saulnier Olivier, ...Werbowski-Ogilvie Tamra E., Suzuki Hiromichi, Millen Kathleen J., Taylor Michael D.	4. 巻 609
2. 論文標題 Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	6. 最初と最後の頁 1021 ~ 1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41586-022-05215-w	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 10件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 バイオインフォマティクスを用いて脳腫瘍に挑むBioinformatics: indispensable for the latest brain tumor research
3. 学会等名 第42回日本脳神経外科コンgres（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 大規模シーケンスデータを用いた脳腫瘍のゲノム解析
3. 学会等名 Neuro-oncology Seminar 2022 in 広島（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 脳腫瘍に対するゲノム解析の最前線
3. 学会等名 第27回北海道脳腫瘍治療研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 脳腫瘍のゲノム解析
3. 学会等名 第4回学際的がん研究夏の学校別府
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 がんゲノム解析におけるバルクシーケンスとシングルセルシーケンスの融合髄芽腫における起源細胞の同定から腫瘍発生のメカニズムを探る
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuma Nakashima, Yusuke Funakoshi, Shohei Nambu, Atsuhito Uneda, Kotoe Katayama, Ryosuke Hanaya, Seiya Imoto, Shota Tanaka, Ryuta Saito, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita, Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 Dissecting the molecular complexity underlying glioblastoma by genomic and transcriptome profiling
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Funakoshi, Takuma Nakashima, Shohei Nambu, Atsuhito Uneda, Kotoe Katayama, Seiya Imoto, Ryosuke Hanaya, Shota Tanaka, Ryuta Saito, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita, Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling of Astrocytoma, IDH-mutant
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Funakoshi, Takuma Nakashima, Shohei Nambu, Atsuhito Uneda, Kotoe Katayama, Seiya Imoto, Ryosuke Hanaya, Shota Tanaka, Ryuta Saito, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita, Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 Whole genome multi-omics landscape of Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 Nature掲載への道のり
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第81回学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 脳腫瘍のバイオインフォマティクス
3. 学会等名 第56回 慶應ニューロサイエンス研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 髄芽腫における新規遺伝子変異と起源細胞の同定
3. 学会等名 ゲノムテクノロジー研究会第2回分科会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 脳腫瘍診断に対する遺伝子検査
3. 学会等名 第40回 日本染色体遺伝子検査学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 啓道, 中島 拓真, 舟越 勇介, 畝田 篤仁, 杉原 由利子, 南部 翔平, 金森 政之, 隈部 俊宏, 鈴木 智成, 木下 学, 園田 順彦, 荒川 芳輝, 永根 基雄, 田中 将太, 石田 穰治, 齋藤 竜太, 花谷 亮典, 吉本 幸司, 成田 善孝
2. 発表標題 全ゲノムシーケンスを用いた脳腫瘍の病態解明と患者還元
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 啓道, Liam D. Hendrikse, 中島 拓真, 舟越 勇介, 隈部 俊宏, Michael D. Taylor
2. 発表標題 CBFA複合体異常が細胞分化を阻害しGroup 4髄芽腫を引き起こす Failure of differentiation induced by genetic alterations in CBFA complex constitutes Group 4 medulloblastoma
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舟越勇介、中島拓真、畝田篤仁、南部翔平、田中將太、石田穰治、齋藤竜太、花谷亮典、吉本幸司、成田善孝、鈴木啓道
2. 発表標題 全ゲノムシーケンスによるIDH変異型diffuse gliomaの変異・構造異常解析
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島拓真、舟越勇介、畝田篤仁、南部翔平、北原麻衣、柳澤俊介、大野誠、高橋雅道、宮北康二、成田善孝、鈴木啓道
2. 発表標題 脳腫瘍特化型カスタムパネルによる網羅的迅速分子診断法の確立
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島拓真、舟越勇介、畝田篤仁、南部翔平、田中將太、石田穰治、齋藤竜太、花谷亮典、吉本幸司、成田善孝、鈴木啓道
2. 発表標題 大規模全ゲノムシーケンスによるGlioblastoma, IDH-wild typeゲノム異常の統合解析
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 舟越勇介、中島拓真、畝田篤仁、吉本幸司、成田善孝、鈴木啓道
2. 発表標題 全ゲノムシーケンスによる髄芽腫の包括的ゲノム解析から明らかになる染色体構造異常
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki, Evan Wang, Chai-Jin Lee, Anders Eriksen, Jiao Zhang, Takuma Nakashima, Patryk Skowron, Raul Suarez, Craig Daniels, Michael D. Taylor
2. 発表標題 Genetic analysis of recurrent medulloblastoma
3. 学会等名 Medulloblastoma in the Mountain 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki
2. 発表標題 脳腫瘍のゲノム解析
3. 学会等名 国際がん研究シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiromichi Suzuki, Takuma Nakashima, Yusuke Funakoshi, Atsuhito Uneda, Shota Tanaka, Joji Ishida, Ryuta Saito, Ryosuke Hanaya, Koji Yoshimoto, Yoshitaka Narita
2. 発表標題 WHOLE-GENOME SEQUENCING ANALYSIS OF ADULT GLIOMAS
3. 学会等名 23rd International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------