

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：84503

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19475

研究課題名（和文）進化と発癌の神秘 希少なマイナーイントロンが制御する発現調節機構

研究課題名（英文）Clarifying Regulatory System of Minor Introns through Evolution and Cancer Development

研究代表者

井上 大地（Inoue, Daichi）

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員（副センター長・部長クラス）

研究者番号：80735746

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：全イントロンのわずか0.3%は、進化的に保存された特徴的な分岐点配列や5'配列を有しており、興味深いことに、それらは細胞の生存や恒常性の維持において不可欠な遺伝子のみ通常一つ含まれている。このような特殊イントロンは数の少なさから「マイナーイントロン（U12タイプ）」と呼ばれ、通常のイントロンとは異なる機構で除去される。本研究では、マイナーイントロンとがんとの関連や、進化的に保存されてきた意義についての探索を行い、その存在意義を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイナーイントロンの制御破綻は血液がんを中心に認められているが、そのような特殊なスプライシング機構がなぜ進化の過程で保存されてきたのかは全く明らかになっていなかった。そこで、Pten遺伝子のマイナーイントロンをゲノムから除去したマウスモデルを作成し、造血幹細胞の機能を評価したところ、ストレス下において幹細胞性の維持が困難となることが明らかとなり、進化的保存の意義の一端を明らかとした。この研究はマイナーイントロンの制御破綻と発がんや老化をつなぐ上で、土台となる成果と言える。

研究成果の概要（英文）：Only 0.3% of all introns have characteristic evolutionarily conserved branch point or 5' sequences, and interestingly, they are usually found in genes essential for cell survival or homeostasis. Such specific introns are called "minor introns (U12 type)" due to their small number, and are removed by a different mechanism than normal introns. In this study, we explored the relationship between minor introns and cancer and the significance of their evolutionary conservation.

研究分野：血液内科学

キーワード：マイナーイントロン RNAスプライシング PTEN

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム上には2万を超える遺伝子に、合計すると20万個以上のイントロンが含まれている。正常細胞では各遺伝子の **pre-mRNA** スプライシングの過程で選択的にイントロン配列が除去されるが、エクソン領域に比して種間での保存性に乏しいことが知られている。しかし、全イントロンのわずか0.3% (700個程度) は、進化的に保存された極めて特徴的な分岐点配列や5'配列を有しており、興味深いことに、それらは細胞の生存や恒常性の維持において不可欠な遺伝子のみ通常一つ含まれている。このような特殊イントロンは数の少なさから「マイナーイントロン (U12タイプイントロン)」と呼ばれ、通常イントロンとは異なる機構で除去される。これらの脱制御が発がんに寄与していることが示唆されていたが、そのメカニズムやマイナーイントロンの存在意義などは全く明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

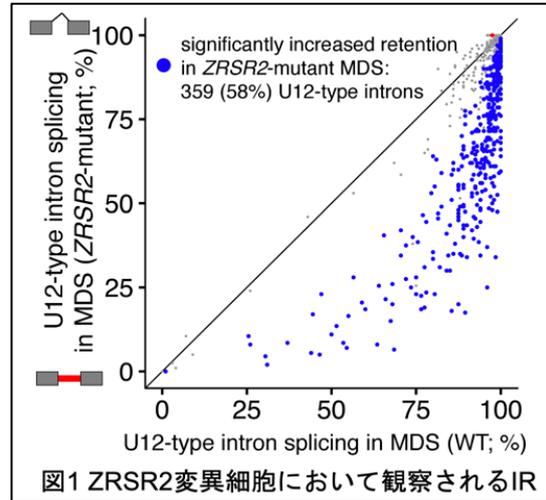
本研究では、マイナーイントロンとがんとの関連や、進化的に保存されてきた意義について探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

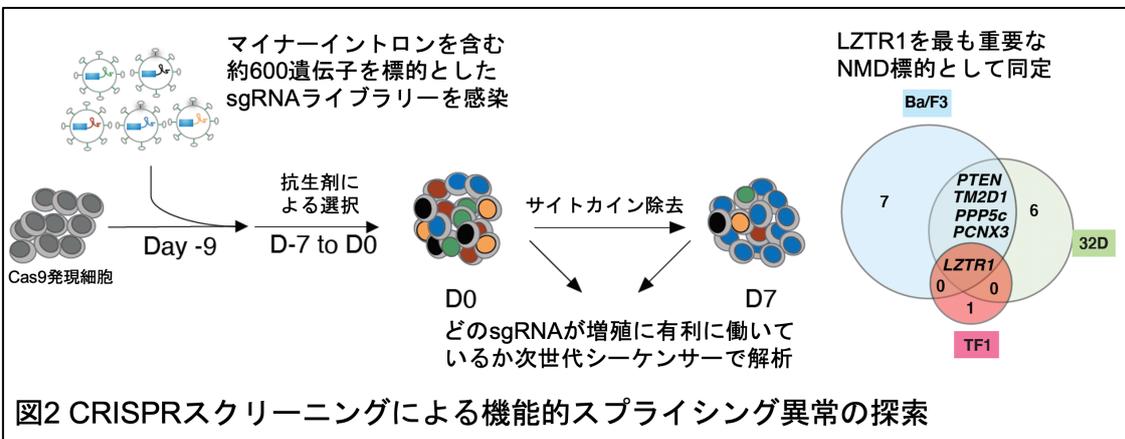
血液がんにおいて、この希少イントロンの除去に必要なRNA結合タンパクである **ZRSR2** 遺伝子には男性患者に限って変異が認められ、その変異細胞においては、マイナーイントロンが mRNA に残存し、Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) によって発現低下すると予想された。そこで、本研究においては、マイナーイントロンの脱制御機構と発がんとの関連をゲノム、RNA レベルで **CRISPR** スクリーニング技術を用いて検討した。さらに、マイナーイントロンの制御機構として、*cis*、*trans* ともにどのような機序が存在するのか、とりわけ **ZRSR2** 以外の制御機構の存在について評価した。最後に、がん抑制遺伝子として研究が進められてきた **Pten** 遺伝子のマイナーイントロンをゲノムから除去したマウスモデルを作成し、造血幹細胞の機能を評価することで、マイナーイントロンの存在意義を探索した。

#### 4. 研究成果

X 染色体にコードされ男性患者にのみ機能喪失型変異が認められる *ZRSR2* 遺伝子は、このマイナーイントロンの的確な除去に不可欠である。しかし、これらの希少イントロンと発癌との関連については全く解明されていなかった。マイナーイントロンは圧倒的多数を占める U2 タイプのイントロンよりも長く、高確率で終始コドン配列を含むことから、マイナーイントロンがスプライシングされない、すなわちイントロン

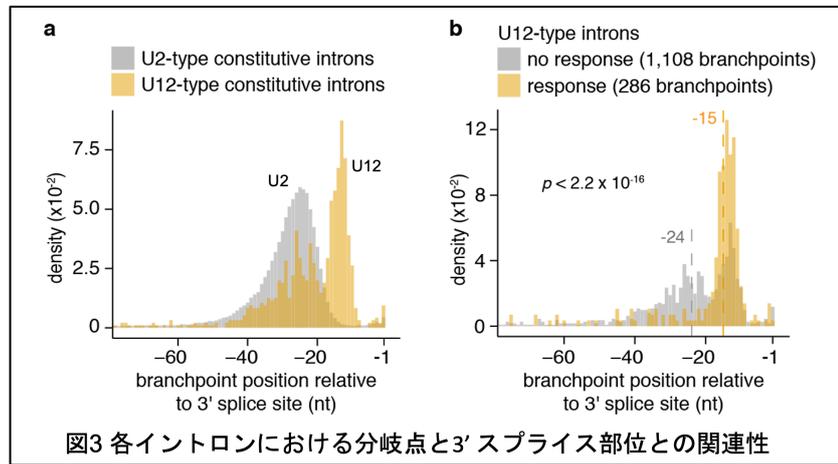


リテンション (IR, Intron Retention) を来した転写産物では NMD によって mRNA レベルで分解されることが予想された。実際に、我々が作成した *Zrsr2* ノックアウトマウスの造血幹細胞や *ZRSR2* 変異を有する MDS (骨髄異形成症候群) 患者検体で RNA シーケンスを行うと、これらマイナーイントロン含有遺伝子の発現が有意に低下していた。そこで、これらの遺伝子群を標的としたカスタム sgRNA ライブラリーを作成し、その喪失がクローン拡大にとって有利となる遺伝子を探索する CRISPR エンリッチメントスクリーンを行った。興味深いことに、*CUL3 E3* ユビキチンキナーゼのアダプタータンパクとして機能することで、RAS 経路を負に制御する *LZTR1* 遺伝子内のマイナーイントロンのスプライシング異常による NMD イベントを見出した。すなわち、スプライシング異常によって RAS 経路を活性化させ、クローン優位性に寄与させるという新しい機構を見出した。この発見は、新規 RAS 活性化機構の同定だけでなく、希少イントロンと発がんとの関連を初めて示唆する成果となった。



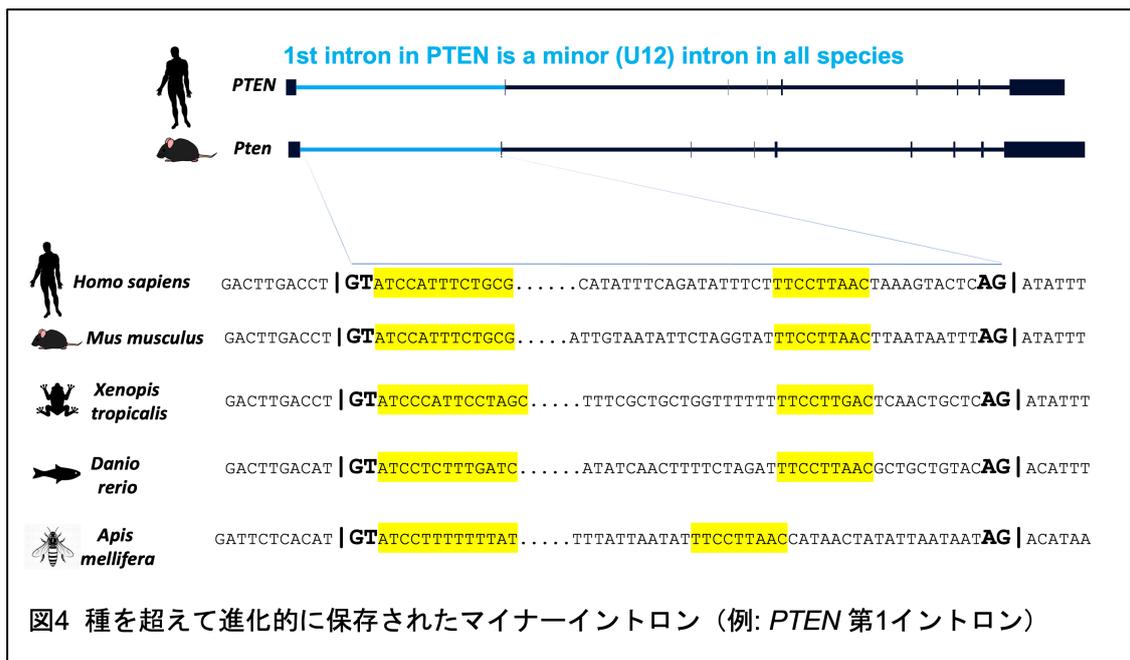
上述の発がんにおける研究の過程で、The Cancer Genome Atlas (TCGA) に登録された *ZRSR2* 変異を有さない 23 種類のがん mRNA 検体の一部においても、*LZTR1* mRNA 内にマイナーイントロンの残存が観察された。このような検体の一部では、マイナーイントロン内部で進化的に保存された配列内に一塩基置換が生じていることを、がん横断的に発見した。マイナーイントロンがスプライシングにより除去される際に、イントロン内の分岐点配列「TCCTTAAC」を基点としてリアット RNA 構造体が形成され、両側のエキソンが結合する。この配列に 1 塩基でも多型や変異があるとスプライシングが実行されないことを、分岐点配列に変異を導入した *in vitro* スプライシング実験により明らかにした。また、全イントロンの 99.7% を占める U2 タイプのイントロンでは、3'スプライス部位から分岐点配列までの距離は -25 塩基をピークとして一峰性の分布をとる。一方、マイナー (U12 タイプ) イントロンでは -25 塩基と -15 塩基に二峰性の分布を呈

し、この中でも *ZRSR2* 変異の有無により影響を受けるマイナーイントロンは-15 塩基とよりスプライス部位に近接した分岐点をもつマイナーイントロンであることが非常に強い有意性をもって示されている。この点は、マイナー



イントロンもスプライシング因子 *ZRSR2* に対する反応性によって、さらに2つの集団に分けることができ、未知の制御機構の存在が示唆された。

生命の進化的系譜の観点から考えれば、マイナーイントロンは圧倒的多数を占める U2 タイプのメジャーイントロンと異なり、種間で高度に保存されていることが分かっている。例えば、がん抑制遺伝子として知られる *PTEN* 遺伝子の第一イントロンは哺乳類から魚類、両生類、昆虫に至るまで、種を超えてマイナーイントロンとして保存されてきた。しかし、この特殊イントロンがなぜ必要であったのか、その理由は未解明のままであった。そこで、マウス胚において CRISPR 技術を用いて *Pten* 第一イントロンの欠失を生じさせ、*Pten* エキソン 1 とエキソン 2 がゲノム上で直接的に結合した新規モデルマウスを作成した。全身性に同イントロンが欠失したモデルであるものの、胎生期の異常は認めず、メンデルの法則に従って産仔が得られた。SPF (specific-pathogen-free) 環境下での飼育では、発育にも異常を認めず、1年以上にわたり生存し、自然発がんなどは認めなかった。我々は、体性幹細胞の中で最も分化ヒエラルキーの理解が確立し移植による再構築能の評価が可能な、造血幹細胞のフェノタイプに着眼した。定常状態では全く異常を来さなかったものの、対照群と比較して、体外増幅時には造血幹細胞性を保つことができず前駆細胞への分化が認められた。また、致死的放射線照射を施した野生型レシピエントマウ



スに対して、骨髓細胞を移植して造血再構築能を評価する生体モデルにおいて、対照群に比してドナー由来キメラの低下を認めるなど、顕著な障害が確認された。体外培養時や移植後は造

血幹細胞が強いストレスに晒されており、そのような環境下では幹細胞性を維持できないことを示唆する所見が得られた。すなわち、マイナーイントロンの存在はストレス存在下での幹細胞性の維持、という進化において不可欠な現象を制御している、と考えられる。我々は、マイナーイントロンの進化的保存の理由として、わずか一つのマイナーイントロンが pre-mRNA から除去されずに残存することで、mRNA 全体の NMD が誘導され遺伝子ごと分解される、ON/OFF 調節機能が不可欠であったと仮説を立てている。実際に、移植後 *Pten* イントロン欠失モデル由来の造血細胞では、ストレス環境下で *Pten* 遺伝子の発現亢進を認め、幹細胞性の喪失に繋がっているものと予想された。

上記のように、マイナーイントロンの制御機構は発がんや幹細胞性に極めて重要な役割を果たしており、進化や寿命に至るまで未知の機能を担っている可能性が示され、今後の腫瘍生物学、進化学、分子生物学における融合的な発展が期待される。現在、成果発表に向けた準備を進めており、また、さまざまな研究者に向けて問題提起するために、二つの総説を出版済みである。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Nishimura Koutarou, Yamazaki Hiromi, Zang Weijia, Inoue Daichi	4. 巻 113
2. 論文標題 Dysregulated minor intron splicing in cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2934 ~ 2942
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15476	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Koutarou, Saika Wataru, Inoue Daichi	4. 巻 132
2. 論文標題 Minor introns impact on hematopoietic malignancies	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 104173 ~ 104173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2024.104173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Daichi Inoue
2. 発表標題 Deciphering the Mechanisms of Cancer Development Driven by Aberrant Splicing Events
3. 学会等名 SECOND JCA-AACR PRECISION CANCER MEDICINE INTERNATIONAL CONFERENCE (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Daichi Inoue
2. 発表標題 第82回日本癌学会学術総会
3. 学会等名 Unraveling the Mechanisms of Aberrant Post-Transcriptional Regulation in Cancer: Implications for Therapeutic Strategies (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上大地
2. 発表標題 スプライシング異常と血液悪性腫瘍
3. 学会等名 第85回日本血液学会学術集会（招待講演）
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