

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659458

研究課題名(和文) MDSにおける異常クローン拡大メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of clonal expansion in myelodysplasia

研究代表者

真田 昌 (Sanada, Masashi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20529044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年明らかとなったスプライシング分子変異は、骨髄異形成症候群MDSにおいて重要な遺伝子異常として認識されているが、遺伝子導入実験において変異細胞の生物学的優位性は確認できない。MDSにおいて本異常が選択され、クローナルに増加するのは、MDS特有の分子病態が関与しているとの仮説の下、マウスモデルを用いて検証した。変異が高頻度に観察されるSF3B1のヘテロ欠失マウスの解析により、SF3B1は造血幹細胞において重要な役割を担っていることを示した。MDSにおいて本異常と優位に共存関係にあるTET2の欠失マウスおよび高齢マウス由来の造血幹細胞を用いた競合的移植実験において、優位性は確認できなかった。

研究成果の概要(英文)：Frequent pathway mutations involving multiple components of the RNA splicing machinery is considered one of the most important genetic events in MDS. But the molecular mechanisms of these alterations in the pathogenesis of MDS are still unknown. In this study we investigated the functional role of these mutants in hematopoiesis using mice model that focused on clonal expansion of mutated cells. We analyzed the hematological phenotype of Sf3b1 hetero mice, and SF3B1 plays an important role in the regulation of hematopoietic stem cells (HSCs), whereas SF3B1 haploinsufficiency is not associated with the MDS phenotype. Loss of function mutation of TET2 are often co-existed in MDS cases with RNA spliceosome mutation, and that we performed the competitive stem cell transplantation using spliceosome mutant transduced HSCs from TET2 knockout mice or wild type mice. But there are no evidence of growth advantage of HSCs with RNA spliceosome mutation in spite of TET2 deletion in this model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群 RNAスプライシング

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) において RNA スプライシングに関わる遺伝子群に高頻度かつ特徴的に変異が生じていることが、申請者らが行った網羅的な遺伝子変異解析研究により明らかとなった。本異常は MDS の分子病態において重要な遺伝子異常であると考えられるが、そのメカニズムは不明な点が多い。実際、MDS 患者で同定される RNA スプライシング分子変異体を細胞株もしくはマウス造血幹細胞に遺伝子導入すると、*in vitro*、*in vivo* ともに細胞増殖は抑制される。MDS 患者においては、本変異を獲得した造血細胞はクローナルに増殖をしており、なぜ対照的な結果が生じるのか不明である。

2. 研究の目的

本研究では、主にマウスモデルを用いて、一見、細胞に不利とも考えられる RNA スプライシング関連遺伝子変異を有する細胞が、何故、MDS 患者においては優位性を獲得し、MDS 発症に至るのかを明らかにすることを通じて、MDS 病態の本質的な理解に結び付けることを目指す。

3. 研究の方法

野生型 B6 マウスの造血幹細胞 (HSC) 分画を用いて先行して行った遺伝子導入実験では、変異体遺伝子発現に伴う、造腫瘍性は確認ができなかった。そこで、MDS 検体においてスプライシング変異としばしば共存する TET2 の機能欠失型変異のモデルマウス由来の HSC を用いて、変異体の導入効果を検証した。また、MDS は高齢者に多い造血器腫瘍であることから細胞老化が病態に関与している可能性を考慮し、週齢の進んだ B6 マウスから採取した HSC を用いた遺伝子導入効果を解析した。

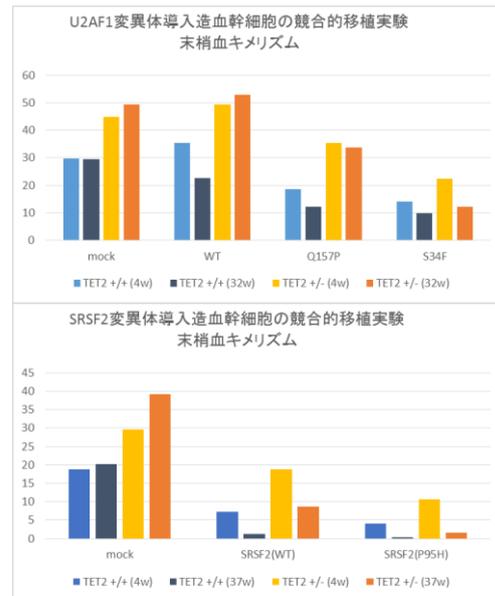
また、スプライシング分子はユビキタスに発現し、生命活動の根源に関わる重要な機能を有するが、造血系における機能は明らかではないため、*Sf3b1* 欠失マウスを用いた機能解析を行った。

機能欠失型変異が主である *ZRSR2* を除き、臨床検体で観察される変異は、正常アレルが保存されたヘテロ変異として観察をされ、LOH を伴う症例は認めない。この遺伝学的な観察結果は、正常アレルが保たれていることが重要である可能性が示唆される。この観点からは遺伝子導入実験による強制発現系では、十分な再現モデルとなり得ない可能性を考え、内因性プロモーターの下で、変異アレルを誘導発現可能なモデルマウスの構築を行った。

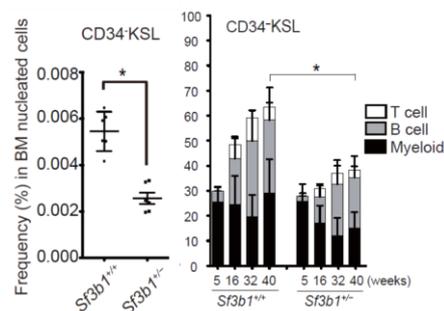
4. 研究成果

*TET2* 条件的欠失マウスを用いて、*TET2* が不活化された細胞において、代表的なスプライシング分子変異である *U2AF1* ならびに *SRSF2* 変異導入細胞が優位性を獲得するか競合的骨髄移植実験を用いて検証した。すなわち、

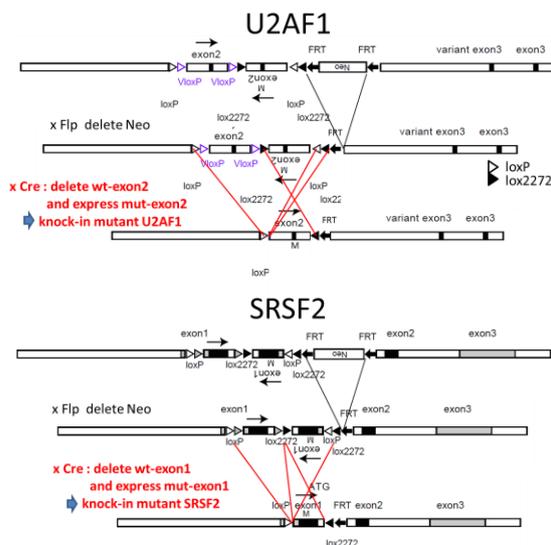
造血細胞特異的に Cre を発現させる Mx-Cre マウスと交配し、pIpC 投与により *TET2* を欠失させた後に、CD34<sup>+</sup>KSL (造血幹細胞) を採取し、レトロウィルスベクターを用いて *U2AF1* および *SRSF2* の野生型ならびに変異体を遺伝子導入し、致死量の放射線を照射したマウスに、移植を行った。野生型マウス由来に比し、*TET2* ヘテロ欠失マウスを用いた移植の末梢血キメリズム解析では、競合細胞に対するキメリズムは高くなったが、依然として野生型ならびに空ベクターに比し、キメリズムは低く、優位性は確認できなかった (下図)。



また、MDS は高齢者に多いことから、幹細胞老化の影響を考え、生後 1 年以上の高齢 B6 マウス由来の造血幹細胞を純化し、スプライシング分子変異体を導入、移植実験を行ったが、これまでの観察期間内では、若年マウスを用いた実験との差異は観察されていない。*Sf3b1* ホモ欠失マウスは胎生致死であるが、ヘテロ欠失マウスは骨形成異常が観察をされるものの大きな異常なく出生する。本マウスを用いて、造血系の詳細な解析を行った。末梢血においては、欠失マウスと野生型マウスに有意な差異は認めなかったが、骨髄において、欠失マウスの造血幹細胞数のみ有意に減少していた。また純化した造血幹細胞を用いた競合的移植実験では、欠失マウス由来の造血幹細胞では有意にキメリズムが低下し、*Sf3b1* は造血幹細胞において重要な働きを担っていることが明らかとなった (下図、*Leukemia* 2014)。長期間の観察においても MDS



様の所見は観察されず、また移植実験の結果からも、MDSで観察される *SF3B1* 変異は単なる機能欠失変異ではなく、機能獲得型変異であることが強く示唆された。本実験結果からも変異体を生理的な発現レベルで導入をした系での評価が重要であると考え、Cre-loxPシステムを用いたコンディショナル・ノックイン・マウスモデルの作成を行い、造血細胞における変異アレルの発現が *U2af1* および *Srsf2* においては確認がされており、今後、本モデルマウスを用いて解析を行う予定である。



## 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 7 件)

- ① Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato-Otsubo A, Shiozawa Y, Yoshida K, Otsu M, Shiraishi Y, Miyano S, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Haploinsufficiency of *Sf3b1* leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. *Leukemia*. 2014 in press doi: 10.1038/leu.2014.73.
- ② Haferlach T, Nagata Y, Grossmann V, Okuno Y, Bacher U, Nagae G, Schnittger S, Sanada M, Kon A, Alpermann T, Yoshida K, Roller A, Nadarajah N, Shiraishi Y, Shiozawa Y, Chiba K, Tanaka H, Koeffler HP, Klein HU, Dugas M, Aburatani H, Kohlmann A, Miyano S, Haferlach C, Kern W, Ogawa S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2014 Feb; 28(2):241-7. doi: 10.1038/leu.2013.336.
- ③ Muto T, Sashida G, Oshima M, Wendt GR, Mochizuki-Kashio M, Nagata Y, Sanada M, Miyagi S, Saraya A, Kamio A, Nagae G, Nakaseko C, Yokote K, Shimoda K, Koseki H, Suzuki Y, Sugano S, Aburatani H, Ogawa S, Iwama A. Concurrent loss of

*Ezh2* and *Tet2* cooperates in the pathogenesis of myelodysplastic disorders. *J Exp Med*. 2013 Nov 18;210(12):2627-39. doi: 10.1084/jem.20131144.

- ④ Lin TL, Nagata Y, Kao HW, Sanada M, Okuno Y, Huang CF, Liang DC, Kuo MC, Lai CL, Lee EH, Shih YS, Tanaka H, Shiraishi Y, Chiba K, Lin TH, Wu JH, Miyano S, Ogawa S, Shih LY. Clonal leukemic evolution in myelodysplastic syndromes with *TET2* and *IDH1/2* mutations. *Haematologica*. 2014 Jan; 99(1):28-36. doi: 10.3324/haematol.2013.091249.
  - ⑤ Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013 Oct; 45(10):1232-7. doi: 10.1038/ng.2731.
  - ⑥ Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 Aug; 45(8):942-6. doi: 10.1038/ng.2696.
  - ⑦ Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. *EED* mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia*. 2012 Dec;26(12):2557-60.
- [学会発表] (計 3 件)
- ① Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Sato A, Shiozawa Y, Yoshida K, Nagata Y, Kon A, Yoshizato T, Otsu M, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Role Of *Sf3b1* On Hematopoiesis. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2013/12/9, New Orleans
  - ② Kon A, Sanada M, et al. (2/20) Functional Analysis of Cohesin Mutations in Myeloid Neoplasms. 18th Congress of the European

Hematology Association, 2013/6/15,  
Stockholm

- ③ Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, et al. (3/14) Role of Sf3b1 on Hematopoiesis. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11 札幌

〔図書〕(計 1 件)

真田 昌 「全エクソーム解析による骨髄異形成症候群の原因遺伝子の探索」別冊・医学のあゆみ「エクソーム解析—成果と将来」編集 松本直通 (医歯薬出版)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)  
該当なし

○取得状況 (計 0 件)  
該当なし

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

真田 昌 (SANADA, Masashi)

研究者番号 : 20529044

(2) 研究分担者 なし  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者 なし  
( )

研究者番号 :