

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860730

研究課題名(和文)造血システムにおけるU2AF1遺伝子変異の役割および分子機序の解明

研究課題名(英文)The role of U2AF1 mutations in the hematopoietic system

研究代表者

片岡 圭亮(Kataoka, Keisuke)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・特定助教

研究者番号：90631383

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)：骨髄異形成症候群で高頻度に認められるU2AF1 S34F変異の機能を検討するために、U2af1 S34F変異条件的ノックインマウスの解析を行った。当初、FLEXスイッチによる条件的ノックインマウスを作成したが、Vav1-cre・Mx-creマウスとの交配で、十分な当該遺伝子座の組換えおよびU2af1変異アレルの発現が認められなかった。また、造血組織における各造血細胞系列における表現型の違いも認めなかった。そのため、U2af1変異アレル発現を改善するために、変異を入れたエクソンの5'側にloxPに挟まれたSTOP配列を挿入した条件的ノックインマウスを新たに作成した。現在、本マウスの解析中である。

研究成果の概要(英文)：To examine the role of U2AF1 S34F mutations, which are frequently observed in myelodysplastic syndrome, I analyzed U2af1 S34F mutation conditional knock-in mice. At first, I created a conditional knock-in mouse model using FLEX switch system. After being crossed with Vav1-cre or Mx-cre mice, this mouse model did not show sufficient Cre-mediated recombination nor expression of U2af1-mutated allele. In addition, I did not find any differences in phenotypes of hematopoietic cells between wild-type and knock-in mice. Therefore, next, I created another conditional knock-in mouse model harboring loxP-STOP cassette-loxP U2af1 S34F allele. These mice are currently under investigation.

研究分野：血液内科学

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 U2AF1

## 1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome: MDS) は、形態異常を伴う異常な血球の産生と急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) への進展傾向を特徴とする治療困難な骨髄性腫瘍である。近年のゲノムシーケンスの進歩により MDS の病態の理解は急速に進んでおり、MDS やその類縁疾患において RAS や FLT3、CBL などのシグナル伝達分子や RUNX1 や ETV6、CEBPA などの造血系転写因子、TP53 などのがん抑制遺伝子などの遺伝子変異が高頻度に認められることが見出されている。さらに、DNMT3A や TET2、IDH1/2 などの DNA メチル化に関するエピジェネティック制御因子や ASXL1 や EZH2 などのヒストン修飾因子などの遺伝子変異が MDS において高頻度に認められ、その病態形成において中心的な役割を果たすことが明らかにされている (Shih et al., Nat Rev Genet, 2012)。これらの遺伝子変異の多くは、AML や他の骨髄増殖性腫瘍においても高頻度に認められ、骨髄性腫瘍に共通した分子異常と考えられる。

最近、申請者の所属する研究グループより MDS において RNA スプライシングに関する遺伝子の変異が高頻度に認められることが明らかになった (Yoshida et al., Nature, 2011)。RNA スプライシングは、遺伝情報を発現するための細胞の基本的なメカニズムであり、すべての真核生物は選択的スプライシングを利用して限られた数の遺伝子から極めて多様なタンパク質を産み出している。RNA スプライシングは、転写された pre-mRNA 上に複数の snRNP 複合体と様々なタンパクが結合することにより引き起こされる過程である。それらの RNA-タンパク質複合体がエクソン-イントロン境界を認識してイントロン配列を除去することにより成熟 mRNA が産生される。RNA スプライシングは U1 snRNP が 5' スプライス部位を認識することにより開始され (E 複合体)、その後 U2AF1/2、ZRSR2、SRSF1/2 などの SR タンパク質などから構成される複合体がリクルートされて 3' スプライス部位を認識する。最後に、SF3B1 を含む U2 snRNP が分岐点配列に結合し、A 複合体を形成する (Wahl et al., Cell, 2009)。興味深いことに、MDS において高頻度に変異が認められる RNA スプライシング経路の遺伝子は、ほとんどが A 複合体に含まれており、大部分がお互いに排他的に生じることが示されている。この結果は、3' スプライス部位に共通の標的部位があることを示唆している。

この中でも、U2AF1 遺伝子変異は、MDS の約 5~10% に認められ、ほとんどが S34 と Q157 という N 末端または C 末端の zinc finger ドメインに含まれる生物種間でよく保存されたアミノ酸部位のミスセンス変異として起こ

る (Yoshida et al., Nature, 2011; Graubert et al., Nat Genet, 2011)。ミスセンス変異の好発部位が存在し、ナンセンス変異やフレームシフト変異がないという事実は、この U2AF1 変異が機能喪失型変異ではなく、何らかの機能獲得型変異である可能性を強く示唆している。

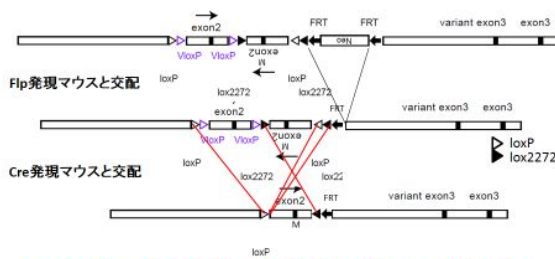
MDS において U2AF1 変異は予後不良因子の一つであり、U2AF1 変異を有する MDS 患者は AML へ進展する可能性が高いと報告されている。このように U2AF1 変異は MDS 発症や病態進展に重要な役割を果たしていると考えられるが、その造血系における機能的な意義はほとんど検証されていない。U2AF1 S34F 変異を HeLa 細胞に発現させた場合、スプライシングを受けていないイントロン配列を含む mRNA が増加し、ナンセンス変異依存性 mRNA 分解機構が活性化されることが報告されている。その結果、*in vitro* において細胞周期の G2/M 期停止およびアポトーシスの増加を引き起こし、細胞増殖を抑制する。さらに、同変異を導入したマウス造血幹細胞 (CD34<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, CD34<sup>+</sup>KSL) は *in vivo* において骨髄再構築能の低下を示すことが示されている (Yoshida et al., Nature, 2011)。一方、同変異を 293T 細胞に導入した場合に *in vitro* におけるスプライシング効率の増加や exon skipping の促進が認められることが報告されている (Graubert et al., Nat Genet, 2011)。さらに、MDS 臨床検体における RNA シーケンシングにより、U2AF1 変異陽性例は、細胞周期や RNA プロセッシングに関する遺伝子の選択的スプライシング異常を認め、それらの遺伝子のほとんどは様々な悪性腫瘍において体細胞変異や欠失を認めることが示されている。さらに、U2AF1 変異による選択的スプライシングパターンの変化にはスプライス部位における特定の配列と関係があることが認められている (Przychodzen., Blood, 2013)。このように U2AF1 変異がスプライシング効率や選択的スプライシングパターンに影響を及ぼす可能性が示唆されているが、実際に U2AF1 変異が造血系にどのような影響を及ぼすかは未解明のままである。

## 2. 研究の目的

記のような学術的背景を踏まえて、申請者らは U2af1 遺伝子変異を生理的なプロモーター下にて発現可能な U2af1 変異条件的ノックインマウスを作製していた。本マウスでは、Cre リコンビナーゼによる組換え前は野生型 U2af1 アレルを発現し、組換え後は U2af1 変異ノックインアレルを発現可能であると考えられた (図)。本研究の目的は、この U2af1 変異条件的ノックインマウスを用いることにより、造血系における U2AF1 遺伝子変異の

役割を in vivo において明らかにすることである。特に U2af1 変異が MDS や AML などの造血器腫瘍の発症に及ぼす影響に着目する。さらに、造血系に変化が認められた場合、その細胞系列において RNA シーケンスやエクソアレイを行い、選択的スプライシングパターンに与える影響を解析することにより、U2af1 が造血系に変化を及ぼす分子機構を明らかにする。

### U2af1 変異条件的ノックインマウスの作成



Creリコンビナーゼにより野生型U2af1が欠失し、変異型U2af1が発現する

図：FLEX スイッチを用いた U2af1 遺伝子変異ノックインアレル作成ストラテジー

### 3. 研究の方法

本研究では、U2af1 変異条件的ノックインマウスを用いることにより、造血システムにおける U2af1 遺伝子変異の役割を in vivo において解明することを目的とした。

#### (1) FLEX スイッチを用いた U2af1 変異条件的ノックインマウスの解析

申請者の所属するグループがすでに U2af1 変異条件的ノックインマウスを作成している(未発表)。そのマウスを用いて、内在性プロモーターにより発現させた U2af1 遺伝子変異が造血系に与える影響を解析した。具体的には本マウスと Vav1-Cre マウスまたは Mx-Cre マウスと交配させて、当該遺伝子座の組換えおよび U2af1 変異アレルの発現を PCR およびシーケンスにて確認した。

さらに、U2af1 遺伝子変異が各造血細胞分画に及ぼす効果を検討するために、末梢血や骨髄・脾臓・胸腺などの造血組織における各造血細胞系列の評価し、同腹仔の野生型マウスと比較した。具体的には、末梢血における血球数計測、大腿骨・脛骨における骨髄細胞数計測、各造血組織におけるフローサイトメトリーによる造血細胞分画の評価を行った。分化細胞は、Ter119/CD71 などを用いて赤芽球系細胞の評価、Gr-1/Mac-1 などを用いて骨髄系細胞の評価、B220/CD3/CD4/CD8 などを用いて B 細胞・T 細胞の評価を行う。さらに、Lin/Sca-1/c-kit/CD34/CD16/32 などを用いて common myeloid progenitor、granulocyte-monocyte progenitor、megakaryocyte-erythrocyte progenitor などの骨髄系前駆細胞、Lin/Sca-1/c-kit/IL-7R

などを用いて common lymphoid progenitor などのリンパ系前駆細胞などの評価を行った。さらに、CD34 や Flk-2、SLAM マーカーを用いて造血幹細胞分画を評価し、特に長期造血幹細胞 (Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>Flk-2<sup>+</sup>CD34<sup>-</sup> または Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-kit<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>) の割合を解析した。

#### (2) LSL カセットを用いた U2af1 変異条件的ノックインマウスの作成

FLEX スイッチは、loxP 部位の向きにより Cre リコンビナーゼが DNA 断片を切り出した後、反転したりする性質を利用して、野生型 loxP と変異型 loxP を導入することにより、Cre 非存在下では野生型アレルを発現するが、Cre 存在下では野生型アレルは消失し、変異型アレルが発現する方法である。このシステムは、条件的ノックインマウスの遺伝子ターゲティング戦略としては、最も生理的な条件で実験可能なモデルであるが、Cre による遺伝子組み換え効率が低く、変異アレルの発現が不十分になる可能性がある。

その欠点を克服するために、U2af1 変異が存在するエクソン 2 の 5' 側に loxP に挟まれた STOP 配列 (LSL カセット) を挿入し、その 3' 側に変異アレルを挿入したエクソン 2 を導入した U2af1 変異条件的ノックインマウスを作成した。このマウスでは、Cre 非存在下では遺伝子改変アレルは U2af1 を発現せず、Cre 存在下では変異型アレルを発現する。この方法では、FLEX スイッチと比較して、Cre 非存在下で U2af1 を発現しないという欠点を持つが、loxP に挟まれた領域の組換え効率は高くなることが期待でき、より高率な U2af1 発現が得られることが望まれる。

### 4. 研究成果

#### (1) FLEX スイッチを用いた U2af1 変異条件的ノックインマウスの解析

FLEX スイッチを用いた U2af1 変異条件的ノックインマウスと Vav1-cre マウスと交配させた場合、当該遺伝子座の組換えおよび U2af1 変異アレルの発現が確認出来なかった。

同様に Mx-cre マウスとの交配では、10-20% 程度の当該遺伝子座の組換えと U2af1 変異アレルの発現を認めただけであった。このマウスを用いて末梢血や骨髄・脾臓などの造血組織における各造血細胞系列の評価をフローサイトメトリーにより用いて行ったが、表現型に違いを認めなかった。この原因として、S34F 変異アレルの発現が低いために表現型を検出できなかった可能性が考えられた。

#### (2) LSL カセットを用いた U2af1 変異条件的ノックインマウスの作成

(1) の欠点を克服するために、上記の方法の通り、LSL カセットを用いた U2af1 変異条件的ノックインマウスを作成した。



図：LSL カセットを用いた U2af1 遺伝子変異  
ノックインアレル作成ストラテジー

現在、作成済みのマウスのキメラマウスが得られており、今後 Cre 発現マウスと交配予定である。



図：LSL カセットを用いた U2af1 遺伝子変異  
ノックインベクターを導入して得られたキ  
メラマウス

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)  
発表準備中

〔学会発表〕(計0件)  
発表準備中

〔図書〕(計0件)  
なし

〔産業財産権〕  
なし

〔その他〕  
ホームページ  
[http://plaza.umin.ac.jp/kyoto\\_tumorpatho/](http://plaza.umin.ac.jp/kyoto_tumorpatho/)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者  
片岡 圭亮 (Keisuke Kataoka)  
京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学  
特定助教  
研究者番号：90631383

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし