

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10887

研究課題名(和文) 軟骨・血球分化とがん抑制に関わるスプライシング制御機構の研究

研究課題名(英文) Investigation of the regulatory mechanisms of alternative splicing that regulate cartilage development, hematopoietic differentiation and tumor suppression

研究代表者

池田 敏之 (IKEDA, Toshiyuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80322759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：主要血液型抗原RhDのWeakD変異のうちエクソン7のsynonymous変異 c.960G>Aによるスプライシング異常が配列特異的で、エクソニックスプライシングエンハンサー(ESE)結合分子であるSRSF3の結合に依存することを見出した。ESE結合分子のうち、SRSF1, SRSF11, TRA2Bに軟骨分化誘導作用があることを示した。内在性遺伝子の発現が少ないうp63の選択的スプライシングのアポトーシスに関する役割を、スプライシングアッセイ用プラスミドを安定導入した培養細胞を利用して検証し、アポトーシス誘導下でアイソフォームへの特異的なスイッチングが生じることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RhD遺伝子がコードするD抗原は溶血性副作用や新生児溶血性疾患の原因となる主要血液型抗原のひとつであり、その抗原性の変化に関わる選択的スプライシングの機序を初めて分子レベルで明らかにした。D抗原は同時に赤血球の分化マーカーでもあり、本研究の知見は血球分化のメカニズム解明の上でも重要と考えられる。ESE結合分子であるSRSFファミリー分子が選択的スプライシングを介して軟骨分化にも関与している可能性を示した。p63の選択的スプライシングの制御がアポトーシス誘導に重要である可能性を示唆するデータを得た。

研究成果の概要(英文)： The synonymous c.960 G>A mutation in the exon 7 of the RhD gene caused exon skipping with sequence specific manner. We found this sequence specificity was dependent on its binding ability to SRSF3 (serine arginine rich splicing family 3) that belonged to exonic splicing enhancer (ESE) binding proteins. SRSF1, SRSF11 and TRA2B also induced chondrogenic differentiation into human mesenchymal stem cells. We also found that isoform specific alternative splicing switching of the p63 gene was induced after apoptosis stimulation.

研究分野：輸血医学、骨軟骨代謝学

キーワード：選択的スプライシング 血球分化 軟骨分化 アポトーシス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム上の遺伝子配列から転写された未成熟な hnRNA はイントロン配列が切り出され、エクソンどうしが連結することで成熟 mRNA へと変化する。この過程がスプライシングであるが、エクソンの組み合わせは常に一定ではなく、ひとつの遺伝子から様々なエクソンの組み合わせを持つ複数の mRNA のアイソフォームが形成されることは珍しくない。これが選択的スプライシングであり、通常遺伝子産物の機能に大きな影響をもたらさないが、中には選択的スプライシングにより遺伝子産物の機能に大きな変化が生じることで、このオンオフ自体が発生や分化、アポトーシスなどにおけるキースイッチになっているケースが存在する。またスプライシングを受けるエクソンやその近傍のイントロンには SRSF (serine/arginine rich splicing factor) をはじめとする RNA 結合性のスプライシングの制御蛋白が結合するエンハンサー (ESE; exonic splicing enhancer, ISE; intronic splicing enhancer) やサイレンサー (ESS; exonic splicing silencer, ISS; intronic splicing enhancer) 配列が存在する。これらの配列に変異が生じることで、翻訳領域のアミノ酸配列に影響を及ぼさないサイレント変異でエクソンスキッピングが発生し、疾患の原因になるケースが神経筋疾患、アルツハイマー病、乳がんなど複数の病態において知られている (Cartegni et al, Nature Reviews 2002)。

本研究では予備検討から選択的スプライシングがその機能に大きな影響を与える 3 つの遺伝子、血液型主要抗原遺伝子 RhD、新規軟骨分化誘導転写因子 EMX2、軟骨分化誘導・がん抑制遺伝子 p63 に着目、その選択的スプライシングのメカニズムを明らかにすることで、輸血副作用制御、軟骨分化誘導、がん治療などに有用な知見を得ようと試みた。

### 2. 研究の目的

- (1) RhD エクソン 7 のスプライシング制御機構、とくに c.960G>A WeakD 変異によるエクソンスキッピングのメカニズム解明と RhD 変異データベースを利用した新規スプライシング異常変異の同定
- (2) EMX2, RhD, p63 の野生型、変異型のミニ遺伝子を導入した安定導入細胞株を作成し、それを用いた機能解析で分化誘導やアポトーシス誘導時における選択的スプライシングのメカニズムを明らかにすること
- (3) 軟骨・血球分化、がん抑制にかかわるスプライソソーム構成因子とくに SRSF ファミリー分子の同定と遺伝子治療を目標とした基礎検討

### 3. 研究の方法

- (1) スプライシングアッセイを効率的に行うため EMX2、p63 の選択的スプライシング配列を利用し、エクソン近傍の短い配列のみをクローニングすることで、スプライシングパターンを簡単に検出可能なスプライシングアッセイ用のカセットベクターを作成した。カセットベクター上に RhD の野生型エクソンおよび D 抗原の発現量が大きく減弱する WeakD/Del 変異エクソンを挿入しスプライシングパターンを比較した。変異情報は RhD 変異データベースを利用、変異エクソン配列は変異血液由来 DNA を利用または PCR mutagenesis を用いて作成した。
- (2) RhD のエクソン 7 配列の c.960 G>A 変異のメカニズムを解明するため RNA-ゲルシフトアッセイおよび RNA プルダウンアッセイを行って配列特異的にエクソン 7 を含む hnRNA に結合する SRSF 分子を同定した。
- (3) p63 の選択的スプライシングに関わるエクソン 10-14 の配列を全長または部分的に含むスプライシングアッセイ用のプラスミドを作成しがん細胞株 HeLa に安定導入して安定発現細胞株を作成した。これにより内在性の発現が低く従来評価困難であった p63 遺伝子の選択的スプライシングのパターン変化を容易に検出可能にした。この細胞にスタウロsporin 刺激によるアポトーシスを誘導し、アイソフォームからアイソフォーム (エクソン 13 がスキップ) アイソフォーム (ストップコドンを含む別のエクソン 11 を利用) への変化の有無を RT-PCR で評価した。また同じ細胞株に天然化合物のミニライブラリを作用させ p63 の選択的スプライシングに影響を与えるか検討した。
- (4) ヒト間葉系幹細胞 (hMSC) やマウス未分化軟骨細胞株に SRSF 分子の一過性導入や(3)でスクリーニングした天然化合物を作用させ、軟骨分化に与える影響を染色法やリアルタイム RT-PCR 法で評価した。

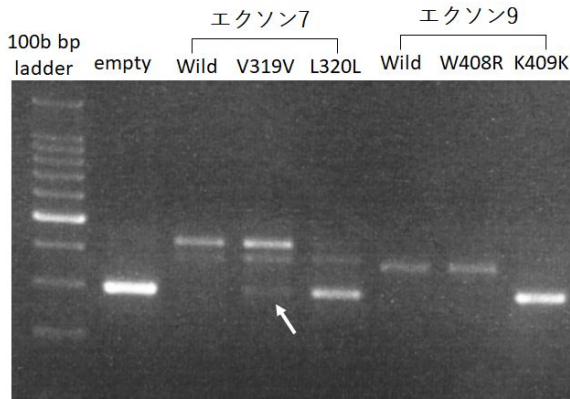
### 4. 研究成果

- (1) スプライシングアッセイ用カセットベクターの作成と RhD の WeakD/Del 変異がスプライシング異常に果たす役割の検証

最初に EMX2 のエクソン 1 とエクソン 3 に標的エクソンをはさむ形でのカセットベクターを作成したが RhD のエクソン 7 や 9 周囲の野生型配列を挿入しても正常なスプライシングは観察されなかった。そこで p63 の / アイソフォームの選択的スプライシングに関与するエクソン 12 と 14 の配列を利用し N 末 Halo-Tag のスプライシングアッセイ用カセットベクターを作成した。

このカセットベクターに RhD エクソン 7 とエクソン 9 の野生型および WeakD/Del 変異配列を挿入した RT-PCR で選択的スプライシングを評価した (図 1)。

図1

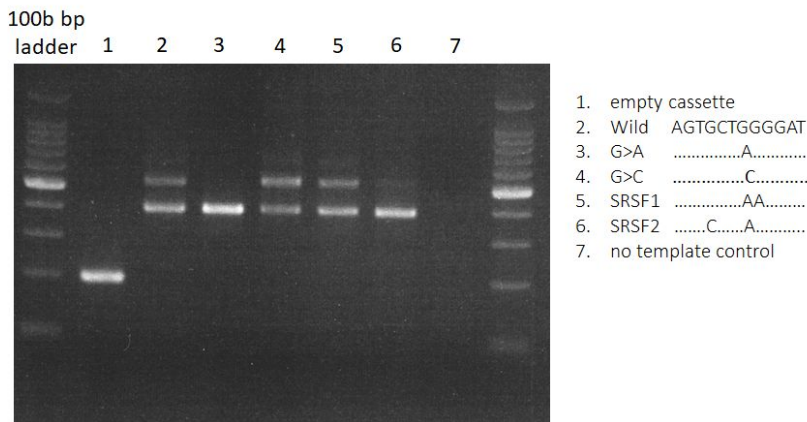


結果、野生型のエクソン7とエクソン9では正常なスプライシングが起きていること、c.960G>A (L320L)では事前の変異血液由来 mRNA の解析同様エクソンスキップが生じることが確認できた。また東洋人の Del 血液型の主要な原因変異である c.1227G>A (K409K、変異はエクソンイントロン境界に存在)でも先行研究と同様にエクソンスキッピングが発生していることが確認され、作成したカセットベクターがきちんとワークすることが明らかになった。一方 K409K の近傍にある別の Del 変異 W408R ではエクソンスキップは全く生じず、アミノ酸変異により Del の表現型を示すことが示唆された。

またエクソン7の c.957G>A (V319V) も少し異なった WeakD の表現型をきたすという報告があるが、この変異では L320L ほどではないにせよエクソンスキップが生じやすくなっていることが明らかになった(図1、白矢印)。その他西洋人に多い DEL 変異エクソン6、M295I についても同様の検討を行ったがエクソンスキップは観察されず、アミノ酸変異により Del の表現型を示すものと考えられた。

次いで RhD エクソン7にはコンピュータ検索上 SRSF1 と SRSF2 の結合モチーフが存在したため、モチーフに変化をもたらすよう変異をいれることでスプライシングパターンに変化を生じるか検討した(図2)。なおこの系ではより生理的な条件下に近い状態で解析を行う

図2



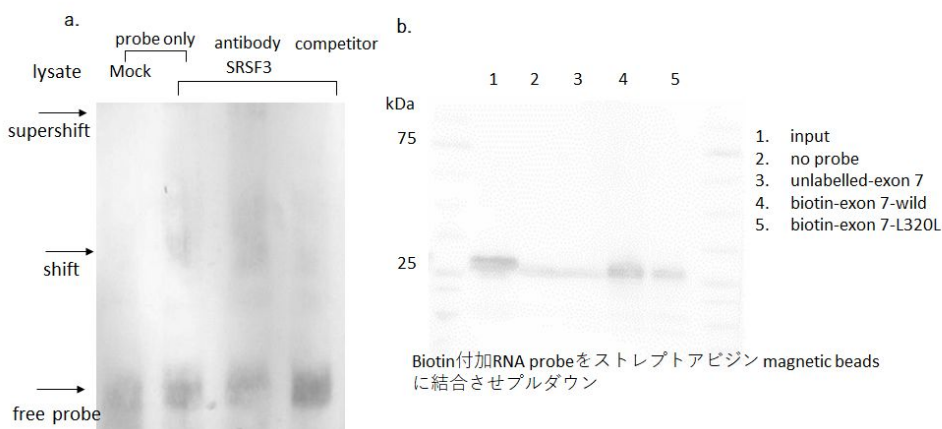
ため RhD のエクソン6から8までの配列をそのまま利用して検討を行っている。変異塩基を A から C に変更しただけでエクソン7のスプライシングが回復し(レーン4)変異が配列特異的であることがわかる。また SRSF1 および SRSF2 の結合モチーフのスコアが回復する

よう近傍に変異をいれると(レーン5,6)とくに SRSF1 の結合モチーフを回復させた時にエクソン7のスプライシングが強く回復し、この配列が SRSF1 依存性の ESE として働いていることが強く示唆された。

(2) RhD エクソン7 ESE 結合 SRSF 分子の検索

上述の知見から SRSF1/2 と RhD エクソン7 ESE 配列を含む hnRNA との結合を RNA ゲルシフトアッセイ、RNA プルダウンアッセイにて検討したが、特異的結合は証明されなかった。そこで ESE に特異的に結合する SRSF 分子を同定するため Flag-tag 付きの強制発現系を用いた RNA pull down によりスクリーニングを行った。SRSF3, 8, 9 などが結合分子の候補としてあがったが、このうち SRSF3 については配列特異的に ESE に結合することが RNA ゲルシフトと RNA プルダウンアッセイにより確認され(図3a, b) WeakD/Del の表現型や選択的スプライシングによる血球分化制御に強く関わることを示唆された。

図3



Biotin付加RNA probeをストレプトアビジン magnetic beads に結合させプルダウン

(3) p63 選択的スプライシング検討用安定細胞株の作出とアポトーシス誘導時のスプライシングパターン変化について

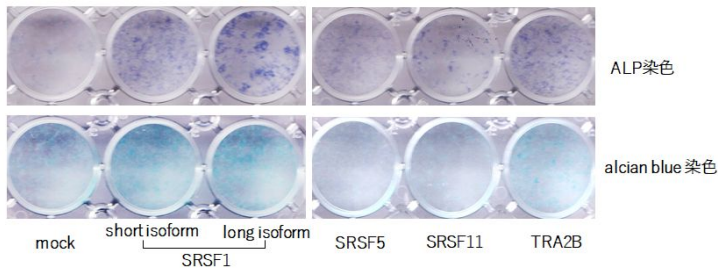
p63 のエクソン 10-14 を全長もしくはエクソン 10-12 ( / の選択的スプライシング評価 )、エクソン 12-14 ( / の選択的スプライシング評価 ) の組み合わせでクローニングし Halo/GFP のシングルまたはデュアルレポーターベクターを作成した。一過性発現の系で評価したところ、蛍光、Western blotting, RT-PCR とともに評価可能なことが確認できた。そこでデュアルレポーターベクターを HeLa 細胞に安定導入し安定発現細胞株を作出した。GFP の蛍光で高発現細胞株をスクリーニングし評価したところ、エクソン 10-14 の全長の系はやや発現が弱くなるものの、エクソン 10-12、エクソン 12-14 の系では効率よく選択的スプライシングが評価可能なことが明らかになった。

そこで作出した安定発現細胞株にスタウロスポリンを 1 $\mu$ M 作用させ、経時的に RNA を抽出して挿入遺伝子特異配列 (Halo-tag) を利用した RT-PCR で評価すると、添加後 10 分から 1 時間程度の間 アイスフォームが特異的に検出され、アイスフォームへのスプライシングスイッチがアポトーシスに重要な役割を果たすことが示唆された。また天然化合物のミニライブラリをこれら細胞株に作用させ、アイスフォームの選択的スプライシングを軽度誘導する化合物を複数同定した。

(4) SRSF 分子が軟骨分化に与える影響の検討

SRSF 分子が軟骨分化に与える影響を検討するため SRSF ファミリー分子の一過性強制発現系を未分化軟骨細胞株 ATDC5, C3H10T1/2 で作成した。軟骨分化マーカーである COL2A1 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイ系や COL2A1 mRNA レベルのリアルタイム RT-PCR による評価を行ったところ、SRSF1, SRSF5, SRSF11, TRA2B については軟骨分化誘導能があることが示唆された。そこでアデノウィルスベクターを用いた強制発現系を作成し hMSC に一過性導入、2 週間培養して軟骨分化誘導能を評価した (図 4)。とくに SRSF1, SRSF11, TRA2B については

図4



ALP, alcian blue とともに染色性が向上し軟骨様の分化が誘導されていた。また同じ系で SOX6, COL2A1 など軟骨分化マーカーの mRNA が誘導されていることも確認された。

一方前項(3)で p63 のアイスフォームへの選択的スプライシングを誘

導した天然化合物について p63 の軟骨分化誘導能から hMSC に添加して軟骨分化を誘導するか検証したが、化合物単独で明らかな軟骨分化誘導能を示すものは見いだせなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. 池田 敏之 技術講座 輸血 -step up 編-クリニカルパスと自己血輸血 検査と技術 査読なし 46 巻 2018 年 110-120 DOI <https://doi.org/10.11477/mf.1543207056>
2. Watanabe S, Ogasawara T, Tamura Y, Saito T, Ikeda T, Suzuki N, Shimosawa T, Shibata S, Chung UI, Nangaku M, Uchida S. Targeting gene expression to specific cells of kidney tubules in vivo, using adenoviral promoter fragment. PLoS One 査読有り 12 巻 2017 年 e0168638 DOI 10.1371/journal.pone.0168638. eCollection 2017
3. Yazer MH, van de Watering L, Okazaki H, Ikeda T, Nagura Y 他 Development of RBC transfusion indications and the collection of patient-specific pretransfusion information. Vox Sang. 査読有り 112 巻 2017 年 e22-e47 DOI 10.1111/vox.12509. Epub 2017 May 19
4. Morishita Y, Nomura Y, Fukui C, Kawakami T, Ikeda T, Mukai T, Yuba T, Inamura KI, Yamaoka H, Miyazaki KI, Okazaki H, Haishima Y. Pilot study on novel blood containers with alternative plasticizers for red cell concentrate storage. PLoS One 査読有り 12 巻 2017 年 e0185737 DOI 10.1371/journal.pone.0185737. eCollection 2017
5. Taniguchi Y, Kawata M, Ho Chang S, Mori D, Okada K, Kobayashi H, Sugita S, Hosaka Y, Inui H, Taketomi S, Yano F, Ikeda T, Akiyama H, Mills AA, Chung UI, Tanaka S, Kawaguchi H, Saito T. Regulation of Chondrocyte Survival in Mouse Articular Cartilage by p63. Arthritis Rheumatol. 査読有り 69 巻 2017 年 598-609 DOI 10.1002/art.39976

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 白澤 知恵 自己血貯血時のエクセルを用いた半電子式クリニカルパス導入は貯血時の貧血コントロールに有用である 第 32 回自己血輸血学会学術総会 2019 年
2. 中村 潤子 母親血清中のセルフリーDNA を用いた HPA-4b 不適合妊娠患者の出生前 DNA タイピング法の検討 第 66 回日本輸血・細胞治療学会 2018 年
3. 寺田 類 内径静脈の心拍変動は、貯血による血行動態の変化を捉え、貯血後身体症状出現リスクの予測因子となりうるか？ 第 66 回日本輸血・細胞治療学会総会 2018 年
4. 三島 由佑子 WealD/Del を引き起こすエクソンスキッピングのメカニズムと蛋白発現への影響 第 64 回日本輸血・細胞治療学会 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部附属病院輸血部ホームページ

<http://square.umin.ac.jp/traf-tky/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三島 由佑子

ローマ字氏名：(MISHIMA, Yuko)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。