

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390242

研究課題名(和文) スプライシング関連遺伝子異常による骨髄異形成症候群の分子病態の解明

研究課題名(英文) Molecular pathogenesis of spliceosome mutations in MDS

研究代表者

真田 昌 (Masashi, Sanada)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20529044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群において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な変異が認められるが、MDS発症における分子病態は不明である。そこで、本研究では、本遺伝子異常のモデルマウスの作成ならびに造血系への影響を解析した。Sf3b1ヘテロ欠失マウスおよびSrsf2変異マウスを用いた造血系の解析では、造血幹細胞数が減少し、造血再構築能が低下していること、さらにはSrsf2変異マウスにおいて特徴的なRNAスプライシング変化が観察された。

研究成果の概要(英文)：Frequent mutation in RNA splicing factors is a cardinal feature of myelodysplastic syndromes. To understand their molecular mechanisms, we constructed model mice for these alterations in this study. In Sf3b1 hetero knockout mice and Srsf2 mutant conditional knock-in mice the number of hematopoietic stem cells are lower than those in wild type mice, and these repopulation capacities are also reduced. And RNA sequencing of hematopoietic stem/progenitor cells from Srsf2 mutated mice showed abnormal exon usages in many genes. Thus, in conclusion, these findings suggest that RNA spliceosome mutations lead to deregulated hematopoietic stem cell functions likely due to abnormal RNA splicing.

研究分野：血液腫瘍学・分子遺伝学

キーワード：骨髄異形成症候群 RNAスプライシング 造血幹細胞

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndromes, MDS) を対象とした全エクソン解析研究により、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な体細胞変異が生じてことが明らかとなった。遺伝学的な観察結果などからは、MDS の分子病態において重要な分子異常であると認識をされているが、MDS の発症・進展などの病態形成に如何に関わっているのかは、不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、よりゲノム病態に則したマウスモデルを構築し、さらには次世代シーケンサーを活用したトランスクリプトーム解析を通じて、スプライシング異常と MDS を結ぶ分子メカニズムを正確かつ詳細に解明することを目指す。

3. 研究の方法

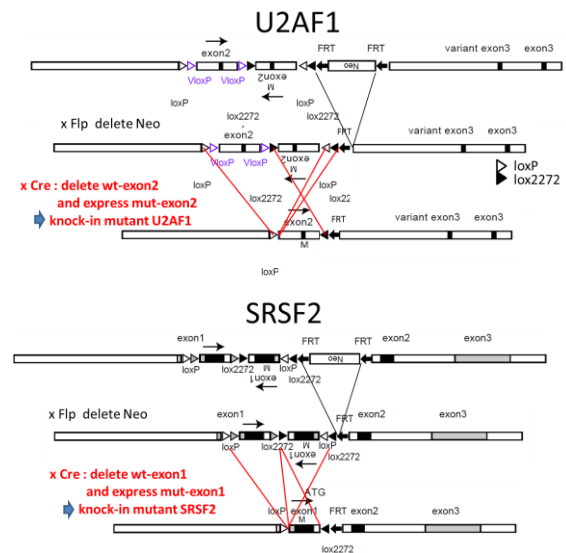
先行して行ったウイルスベクターを用いた強制過剰発現系による検討 (*Nature* 2011) では、広範な遺伝子の RNA スプライシングに異常が生じていることが明らかとなった。しかし、変異体導入細胞では細胞増殖が阻害され、如何にして本変異を獲得した造血幹細胞 HSC もしくは前駆細胞がクローナルに増殖し、MDS 病態を形成していくのかについては、不明であった。

臨床検体において、RNA スプライシング分子変異は、*ZRSR2* 変異を除き、全例でアレルが保たれたヘテロ変異として観察されることから、過剰発現系では、MDS 症例における分子病態を再現されない可能性が推測された。そこで、本研究では生理的な発現量での評価を行うために、変異体のコンディショナル・ノックイン (cKI) マウスまたはコンディショナル・ノックアウトマウスの構築を行った。同マウスおよび *Sf3b1* 欠失マウスを用いた造血系の解析並びに次世代シーケンス技術を用いた網羅的なトランスクリプトーム解析による RNA スプライシングへの影響を検討した。

4. 研究成果

本研究では内因性の発現制御による生理的な発現量での評価を行うために、*U2AF1_S34F* 変異および *SRSF2_P95H* 変異においては Cre-loxP システムによる変異体のコンディショナル・ノックイン (cKI) マウス (図 1)、不活化変異が大半を占める *ZRSR2* についてはコンディショナル・ノックアウトマウスの作成を行った。

図 1 (右上) Cre-loxP システムを用いたコンディショナル・ノックイン・アレルの構築。Cre 発現に伴い、野生型のエクソンが欠落し、逆位に挿入をされていた変異を有するエクソンが読まれる。



新規遺伝子操作マウスの構築と並行して、遺伝子変異が最も多く認められる *Sf3b1* を欠失させたマウスの造血系の解析を行った。*Sf3b1* をホモ欠失させた個体は胎生致死であるが、ヘテロ欠失マウスは軽度の骨格異常を認めることが報告されているが、これまで造血系に関する評価はされていない。末梢血所見においては、ヘテロ欠失マウスの野生型マウスと有意な差は認められなかったが、骨髄において HSC 分画が減少していることが明らかとなった。純化した HSC を用いた競合移植実験では、野生型マウスの HSC を用いた実験結果に比し、造血再構築能が低下していることから、HSC において重要な役割を担っていることが明らかとなった (図 2)。(Leukemia. 28:1844-50, 2014)

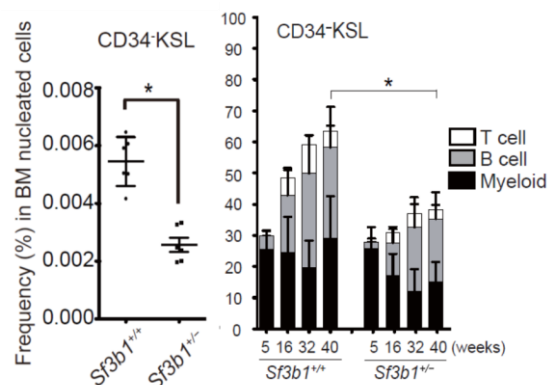


図 2 左: *Sf3b1* ヘテロ欠失マウスでは HSC(CD34-KSL)数が野生型マウスに比し減少している。右: 純化した HSC を用いた競合移植後の末梢血キメリズム

ただし、*SF3B1* 変異例に特徴的な環状鉄芽球や血球の異形成など MDS 様の病態は観察されず、変異アレル特有の効果が必要であると考えられた。

U2AF1 および *SRSF2*-cKI マウス作成において genotyping 上、目的のマウスが得られたため、Mx-Cre マウスとの交配を行った。同

マウスに pIpC を投与し、造血細胞特異的に変異アレルが誘導発現することが確認された。そこで、バッククロスが進んでいる Srsf2-P95HcKI マウスを用いた造血系の解析ならびに RNA 解析を重点的に進めた。P95H 変異は SRSF2 変異の中で最も高頻度に、特に CMML 例に多く認められる異常である。造血細胞系列に特異的に発現する vav1-Cre アレルを持つ遺伝子改変マウスと交配をさせ、造血細胞特異的に SRSF2 変異体を発現させたマウスを用いることで、野生型アレルとほぼ近似した変異アレル発現量となる、MDS 患者で観察される遺伝子異常を再現した。12~15 週齢のマウスの解析において、末梢血には有意な所見は観察されなかったが、骨髄中の HSC 数が、同腹の野生型マウスと比し少なく、本観察結果は非競合移植実験においても再現された (図 3 上)。野生型マウスとの競合移植実験では、変異体マウス由来のキメリズムは低く (図 3 下)、先に行ったレトロウイルスベクターを用いた強制発現実験 (*Nature* 2011) と類似した観察結果であった。

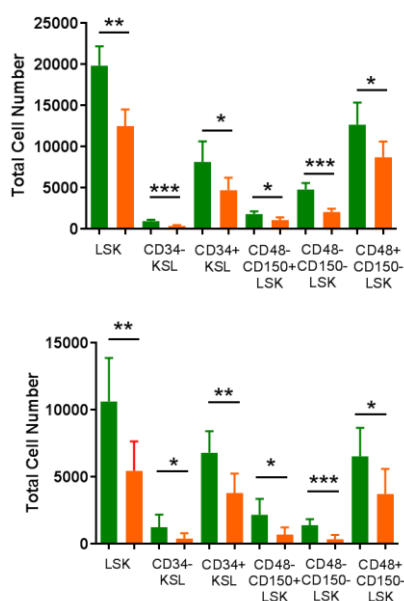


図 3 Srsf2-P95HcKI マウスにおいて HSC 数が有意に少ない (緑: 野生型アレルマウス、橙: 変異アレルマウス) 上: HSC 数、下: 全骨髄を用いた非競合移植後マウスの骨髄解析結果

すなわち、SRSF2 変異による造血系への影響は認められたが、クローン性増殖に代表される MDS 病態への寄与は本マウスにも再現されていない。一方で、HSC を含む造血前駆細胞由来の RNA のシーケンス解析では、exon usage に特徴的な変化が認められ、別研究で検討中の SRSF2 変異陽性 MDS 例の RNA シーケンス解析においても同様に観察されており、SRSF2 変異により生じたスプライシング変化であると考えられた。今後、スプライシング変化を生じている遺伝

子群の中で、MDS 病態に寄与する標的分子の同定を進めるとともに、U2AF1 ならびに ZRSR2 の遺伝子操作マウスの解析を順次行っていく。また、MDS 患者において、何故、RNA スプライシング関連分子変異を有する細胞がクローナルに増殖しうるのか、共存する遺伝子異常や老化の影響なども含めて、検討を進める予定である。

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 Madan V, Kanojia D, Li J, Okamoto R, Sato-Otsubo A, Kohlmann A, Sanada M, Grossmann V, Sundaresan J, Shiraishi Y, Satoru M, Thol F, Ganser A, Yang H, Haferlach T, Ogawa S, Koeffler HP. Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome. *Nature Commun.* 6:6042, 2015 doi: 10.1038/ncomms7042
- ② 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.* 28:1844-50, 2014 (*equal contribution) doi: 10.1038/leu.2014.73
- ③ 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.* 28(2):241-7,2014 doi: 10.1038/leu.2013.336
- ④ 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.

- ⑤ 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, Shiraiishi 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.
- ⑥ Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Oki K, Igarashi T, Hayashi Y, Ogawa S. Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia. *Leukemia.* 26:1879-1881,2012 doi: 10.1038/leu.2012.45.
- ⑦ Sanada M and Ogawa S. Genome-wide analysis of myelodysplastic syndromes. *Curr. Pharm. Des.* 18:3163-3169, 2012 doi: 10.2174/1381612811209023163

[学会発表] (計 6 件)

- ① Shiozawa Y, Sato-Otsubo A, Galli A, Yoshida K, Yoshizato T, Sato Y, Kataoka K, Sanada M, Shiraiishi Y, Chiba K, Miyano S, Malcovati L, Cazzola M, and Ogawa S. Comprehensive Analysis of Alternative RNA Splicing in Myelodysplastic Syndrome. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2014/12/9, San Francisco (USA)
- ② Madan V, Kanojia D, Jia L, Okamoto R, Sato-Otsubo A, Kohlmann A, Sanada M, Grossmann V, Sundaresan J, Shiraiishi Y, Miyano S, Thol F, Ganser A, Yang H, Haferlach T, Ogawa S, and Koeffler HP. *ZRSR2* mutations cause dysregulated RNA splicing in MDS. 56th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2014/12/8, San Francisco (USA)
- ③ Matsunawa M, Yamamoto R, Sanada M, Kon A, Sato A, Shiozawa Y, Yoshida K, Nagata Y, Yoshizato T, Otsu M, Isono K, Koseki H, Nakauchi H, and Ogawa S. Sf3b1 plays an important role in the regulation of hematopoietic stems cells, but haploinsufficiency of Sf3b1 may not be solely responsible for myelodysplasia. The 19th Congress of European Hematology Association, 2014/6/14, Milan (Italy)
- ④ 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, and Ogawa S. Role of Sf3b1 On Hematopoiesis. 55th Annual Meeting of American Society of Hematology, 2013/12/9, New Orleans (USA)

- ⑤ 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, and Ogawa S. Role of Sf3b1 On Hematopoiesis. 第 75 回日本血液学会学術集会 2013/10/11, 札幌市
- ⑥ 眞田 昌, Novel pathway mutations in myelodysplasia revealed by high-throughput sequencing technology. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、大阪市

[図書] (計 1 件)

眞田 昌：医学のあゆみ Vol. 249 No. 10 特集がんゲノム研究の進歩-網羅的解析からの知見 医歯薬出版 「造血器腫瘍におけるゲノム解析と臨床への展開」

[産業財産権]

なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞田 昌 (SANADA, Masashi)

京都大学・医学研究科・腫瘍生物学講座

(現) 国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センター・高度診断研究部長

研究者番号：20529044