

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26年 3月 10日現在

機関番号 : 12601
研究種目 : 若手研究 (B)
研究期間 : 2012~2013
課題番号 : 24700970
研究課題名 (和文) 骨髄異形成症候群におけるトランスクリプトーム解析による分子病態の
解明
研究課題名 (英文) Study of molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes based
on transcriptome analysis

研究代表者 佐藤 亜以子 (SATO, Aiko)
東京大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号 : 70512573
交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,400,000 円、(間接経費) 1,020,000 円

研究成果の概要 (和文) :

MDS で特徴的かつ高頻度に認められる「スプライシングパスウェイ変異」により RNA のスプライシング機構が破綻した結果生じる異常 RNA を、高速シーケンサー技術を用いたトランスクリプトーム解析により、網羅的に検出することができた。変異遺伝子を発現させた細胞株データから異常を来す遺伝子を多数同定し、異常が広範囲にわたり生じていることがわかった。複数の MDS 実検体の解析で共通の異常が判明することで、病態の説明をし得る遺伝子・パスウェイが同定されるものと考えられる。

研究成果の概要 (英文) :

Frequent pathway mutation of RNA splicing machinery was reported recently. We comprehensively analyzed the aberrant RNA caused by the mutation using transcriptome analysis with next generation sequencing. Abnormally spliced transcripts were globally identified by the experiment of cell lines in which mutant genes were expressed. The wide-ranging abnormality of RNA was observed in each mutant. Further analysis of multiple MDS specimens will reveal the specific genes and pathways that explain the molecular pathogenesis of MDS.

研究分野 : 総合領域

科研費の分科・細目 : 腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード : トランスクリプトーム、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) は形態異常を伴った血球減少と急性骨髄性白血病 (AML) への移行を特徴とする代表的な造血器腫瘍の一つである。他の悪性腫瘍と同様、遺伝子変異が原因と考えられており、以前より *RAS*, *TP53*, *RUNX1*, *c-CBL* などの遺伝子変異が報告されているが、これらはいずれも AML など他の骨髄系腫瘍でも認められる変異であることから、本症を特徴づける遺伝子変異については長く不明であった。

近年我々は、MDS の全エクソーム解析を通じて、SF3B1, U2AF35, SRSF2, ZRSR2 をはじめとする一連の「スプライシングパスウェイ変異」が本症で高頻度かつ特異的に認められる

ことを示し、MDS の病態を特徴づける重要な変異であることを明らかにした (Nature 2011, 478:64-9)。一方、これらの「スプライシングパスウェイ変異」によるスプライシング機構の破綻により細胞内に生じる状況、及び、この異常から MDS の病態が生ずるメカニズムについては、現時点でほとんど解っていない。

2. 研究の目的

上述の通り、「スプライシングパスウェイ変異」は、従来報告されてきた他の変異と異なり、MDS 特異的な変異であることから、その病態を特徴づける重要な因子と考えられる。

本研究の目的は、高速 RNA シーケンス技術による網羅的解析を通じて、これらのスプライシングパスウェイ変異によって惹起されるスプライシング異常とその標的 RNA を同定することにより、MDS 発症の分子メカニズム明らかにすることである。本研究を通して、新規治療薬剤・診断技術開発の基盤を構築し、MDS の治療成績の向上に資することを目指す。

3. 研究の方法

上記スプライシングパスウェイ変異を述べた論文の中で、MDS で認められた変異スプライシング因子である U2AF35 を HeLa 細胞で誘導発現し、メッセンジャーRNA のスプライシング異常があることを示した。方法としては、Affymetrix 社のエクソンアレイ技術を用いてエクソン領域と一部のイントロン領域の発現を調べることで、グローバルにイントロン領域の除去不良が起きていることが証明された。また、全メッセンジャーRNA の高速シーケンス (Illumina) を行った結果、実際に上記エクソンアレイで検出されたイントロン領域等に、図 (下) に示すようなイントロン除去不良により、異常な転写産物が発現していることが確認された。

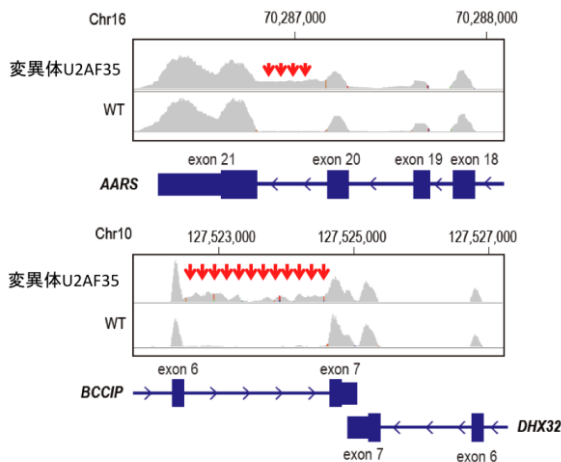


図: 変異体U2AF35の導入によるRNAスプライシングの異常

本研究では上記細胞のさらなる解析に加え、新たな試料を用いた解析により、研究を進展させるものである。

具体的には、

- (1) スプライシング異常が細胞に及ぼす影響の詳細な解析を行うために、まず MDS おいて変異が認められた 2 遺伝子について、変異を導入した細胞の全メッセンジャーRNA に対するシーケンシングを行った。U2AF35 については、HeLa に加え TF1 細胞株、SRSF2 については HeLa、Jurkat 細胞株

について変異体導入株が作製され、コントロール細胞株とともに RNA を抽出し、TruSeq RNA Sample Preparation kit (Illumina) を用いてシーケンスライブラリーを作成、高速シーケンサー (HiSeq2000) を用いて両端 100bp のシーケンスをおこなった。

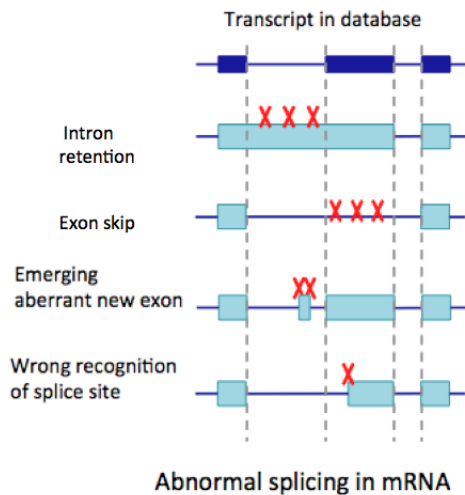
- (2) これらの解析で、網羅的にスプライシング異常を検出する方法を検討した。読まれた配列がゲノム上のどの位置の配列であるか決定する (マッピング) 際に、データベース上に存在しない異常トランスクリプトであっても効率的に位置を検出できる方法を検討した。
- (3) 上記より得られた情報から、変異発現により異常が生じる遺伝子群を検出する方法を検討、パイプラインを構築した。その上で各細胞株から異常を検出した。また、異常 RNA の構造情報から、それぞれのスプライシング異常のパターンを捉え分類した。
- (4) MDS 検体 RNA についても全メッセンジャーRNA の高速シーケンスを行った。

4. 研究成果

- (1) 変異体導入細胞シーケンシング: 各種変異体導入株とコントロール細胞株について RNA を抽出し、高速シーケンサーを使用して配列決定をおこなった。
- (2) スプライシング異常検出方法の検討: 取得されたデータを用いて異常検出方法を検討した。マッピングは、共同研究により構築された Genomon-fusion パイプライン (<http://genomon.hgc.jp/rna/>) を用いた。具体的には、読まれた両端配列をそれぞれ、マッピングツール bowtie によりデータベース上の全トランスクリプト配列に対してマッピングし、次にこの方法でマッピングができなかった配列について、改めて全ゲノム配列に対して blat を用いたマッピングを行うものである。Blat ではギャップを持つ配列へのマッピングが可能であるため、イントロン (異常正常に関わらず) を想定したマッピングに適していると考えられる。このツールを利用した結果、95%程度のマッピング率が実現された。

- (3) 異常の遺伝子群の同定：
全転写産物を対象にグローバルに異常レベル数値化し検出する方法を検討した。基本的には RefSeq データベースに基づき、既知の intron 構造をなしているリードが全発現の何割を占めるかを、各エクソン末端について計算するものである。その上で、コントロールに対して変異導入株で正常リードが有意に減っている座位を検出した。

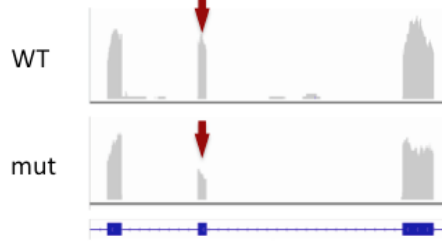
さらに、イントロン領域のカバレッジ情報や、アノテーション情報と組み合わせることにより、異常構造の分類を行った。この方法に従って、①イントロン残存に加え、②必須なエクソンが落ちてしまうパターン③イントロン内に新規エクソンが出現するパターン④エクソン末端がイントロン方向やエクソン方向へずれるパターン（下図）などを場合分けして検出することが可能となった。



この方法を用いて、それぞれの変異体導入株とコントロール株のスプライシング異常を検出した結果、変異体発現により上記に分類される異常パターンに増加を認める遺伝子が、多数同定された。各パターンの例の図を右に挙げた。特に、④のパターンにおいては、3' スプライスサイト（エクソンの 5' 末端）に偏って異常が認められており、スプライシング因子の機能欠損と異常パターンの直接的な関連が示唆された。

また、スプライシング因子 SRSF2 の変異体について Jurkat 細胞株と、HeLa 細胞株に導入したデータを比較したところ、変異体の発現により Jurkat 細胞株で有意に異常が増加した座位については、HeLa 細胞株においても異常を生じる傾向にあった。一方、HeLa 細胞株において、U2AF35 変異体の発現により異常が増加した座位と SRSF2 変異体の発現により異常が増加した座位は、一部のみが共通して

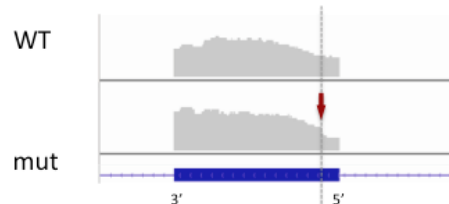
Exon skip



Emerging new exon



Wrong recognition of splice site



Induction of U2AF35 mutant in HeLa

いた。このことから SRSF2 変異体の影響は細胞が変わり遺伝子発現プロファイルが変化してもある程度保存されること、SRSF2 と U2AF35 の機能欠損による異常の生じ方には強い相関は無いものの、一部の遺伝子で共通する異常が観察されることがわかった。

実際の MDS 患者の細胞における遺伝子発現プロファイルは、これらの細胞株とは異なることが想定され、また個体差の存在も予想されたが、同じ変異体であれば一定の共通性が見いだされると考えられた。

- (4) MDS 検体の全メッセージRNA シーケンス：

MDS 患者検体のシーケンスを行い、網羅的にスプライシング異常を検出した上で、スプライシング因子に変異がある症例と、変異を有しない症例とを比較し、共通にスプライシング異常を生じる遺伝子の解析を行った。患者検体を用いた解析においても、当初の予想より広範に検体間で共通のスプライシング異常が認められており、現段階では MDS 病態との直接のつ

ながりのある遺伝子発現異常、パスウェイを同定するに至っていない。今回検討に用いた MDS 検体は、単一のスプライシング因子の遺伝子変異を有する検体と、変異を有しない検体であるが、他のスプライシング因子の変異を持つ検体を今後解析することにより、共通の異常、差が顕著に観察される異常を割り出した上で MDS 病態を説明することを目標とし、解析を継続する予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

佐藤 亜以子 (SATO, Aiko)

東京大学・医学部附属病院・特任研究員

研究者番号：70512573