

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：83904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640075

研究課題名(和文) RNAスプライシング分子異常における標的分子の探索

研究課題名(英文) Identification of mutated splicing factor target genes

研究代表者

真田 昌 (SANADA, MASASHI)

独立行政法人国立病院機構(名古屋医療センター臨床研究センター)・その他部局等・その他

研究者番号：20529044

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)：RNAスプライシング関連遺伝子変異は、骨髄異形成症候群(MDS)の分子病態に関わると推測されるが、病型により変異遺伝子に特異性があり、病型を規定していると考えられる。MDS患者由来の造血細胞を用いてRNAシーケンスによるスプライシング異常の標的分子の探索を行った。SF3B1変異例においては、3'側のスプライシングサイトが5'側にずれる特徴的な変化が様々な遺伝子に観察され、遺伝性環状鉄芽球性貧血の原因遺伝子が含まれていた。一方、SRSF2変異例においては、通常観察されないエクソンを含む転写産物が検出され、変異例で観察される遺伝子特異的な変化が表現型の形成に関与すると推測された。

研究成果の概要(英文)：Although splicing factor mutations are the most important genetic alterations in MDS, little is known about exact gene targets whose abnormal splicing is responsible for the pathogenesis of MDS. SF3B1 and SRSF2 mutations were associated with distinct clinical phenotypes and outcomes together with RNA splicing. To explore the molecular basis of these distinct features in terms of splicing alterations, RNA sequencing data from SF3B1-mutated and SRSF2-mutated bone marrow hematopoietic cells were compared with those without known splicing factor mutations to detect splicing events significantly enriched in splicing factor mutated cases. SF3B1 mutations caused misrecognition of 3' splice sites of several genes, which included one of the causative genes for congenital sideroblastic anemia. On the other hand, SRSF2 mutations were characterized by modest but more widespread alterations in exon usage of genes. Our results provide insights into the pathogenesis of splicing factor mutated MDS.

研究分野：血液腫瘍学

キーワード：骨髄異形成症候群 MDS RNAスプライシング RNAシーケンス

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群(MDS)は高齢者に多い難治性造血器腫瘍であるが、治癒が期待できる治療法は造血幹細胞移植のみであり、高齢者にも投与可能な治療法の開発が望まれるが、開発の基盤となる分子病態の理解が乏しかった。申請者ならびに欧米のグループによるMDSの全エクソンシーケンス解析研究を通じて、mRNA スプライシングに関わる分子群に後天的遺伝子変異が高頻度に生じていることが明らかとなった(Yoshida, Sanada, et al. Nature 2011 他)。これまでにMDSで同定されてきた遺伝子異常は、他の骨髄系腫瘍においても認められるが、RNA スプライシング分子変異はMDSに特徴的であり、MDS病態を説明しうる遺伝子異常として注目されている。MDSにおいて観察されるRNA スプライシング遺伝子変異は、mRNA スプライシングの過程で3'側を認識する*SF3B1*、*U2AF1*、*SRSF2*および*ZRSR2*に集中し、かつ排他的に観察されるため、機能異常がMDSの分子病態に関与していると推測され、従来型の抗白血病薬が無効なMDSに対する新たな治療戦略の開発が期待される。RNA スプライシング分子異常を標的とした治療法の実現に際しては、本異常に導かれるMDS病態に関与する標的遺伝子の探索を含めた分子メカニズムの解明が重要であると考えられるが、知見は乏しい。

2. 研究の目的

RNA スプライシング関連遺伝子の変異は、MDSの病態形成に重要な遺伝子異常と示唆されるが、その分子機序は明らかではない。RNA スプライシング分子としての共通する機能がMDS病態に関わっていると推測されるが、病型により変異遺伝子に特異性があり、病型を規定している可能性が考えられる。*SF3B1*変異は、環状鉄芽球を有する病型に高頻度かつ特徴的に観察され、環状鉄芽球形成に関わる分子のRNA スプライシングに異常が生じ、環状鉄芽球が出現するとの仮説のもと、RNA シーケンスを用いたスプライシング異常の標的分子の探索を行った。MDS病態形成の標的となっている分子異常を同定することにより、MDSの分子病態のより本質的な理解を進め、新規治療薬の開発に寄与することを目的とする。

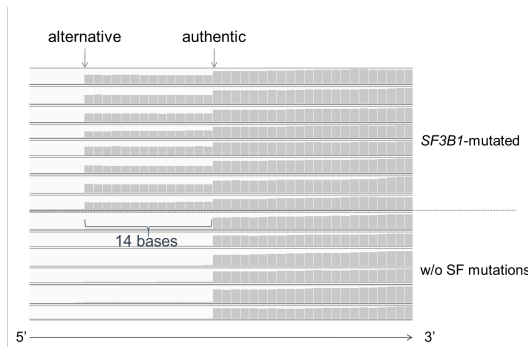
3. 研究の方法

*SF3B1*変異例ならびに*SRSF2*変異例を含む、MDS症例の骨髄由来の造血細胞を用いて、次世代シーケンサーによる、RNA シーケンス解析を行い、RNA スプライシング関連分子変異のスプライシングに対する影響を評価した。さらにはcycloheximide添加下に短期培養した造血細胞を、RNA シーケンスを行うことにより、NMD(Nonsense-mediated decay)による異常なスプライシング産物の生理的な除去により、発現レベルが低下して

いる転写産物も合わせて解析を行った。

4. 研究成果

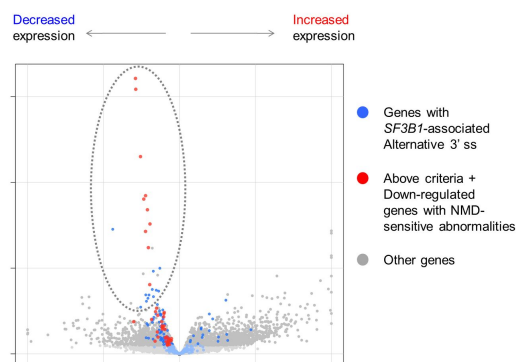
50例のMDS患者由来のCD34陽性造血細胞からtotal RNAを抽出し、RNAシーケンスを行った。18例に*SF3B1*変異を、15例に*SRSF2*変異を認め、既知のスプライシング分子変異が同定されなかった16例をコントロールに解析を行った。*SF3B1*変異例においては、3'側のスプライシングサイト(SS)が5'側に14塩基ずれる特徴的な変化が様々な遺伝子において観察された(図1)。このスプライシング異常によりframe shiftを生じると推測され、同様の変化は骨髄単核球を用いた214例での解析でも再現された。



【図1】*SF3B1*変異例に特徴的に観察されたスプライシング異常の1例

一般的に観察される(authentic)3'側のスプライシングサイトとくらべ、5'側に14bpずれた場所でスプライシングが*SF3B1*変異例においては生じていた。スプライシングサイトがずれることにより、転写産物にはフレームシフトが生じると推測される。

最終エクソンより、手前で終止コドンが生じた場合には、多くの場合、短縮型のタンパクは合成されずに、NMDによりRNAが分解されるため、解析の検出感度が落ちていた可能性が懸念された。そこで、タンパクの翻訳を阻害し、NMDを抑制するcycloheximide(CHX)を*in vitro*で投与し、投与細胞と投与なし細胞で、RNAシーケンスを行うことにより、NMDにより分解される転写産物も評価した。その結果、CHX処理により、異常なトランスクリプトが増加し、NMDを受けていると考えられた遺伝子が検出された。

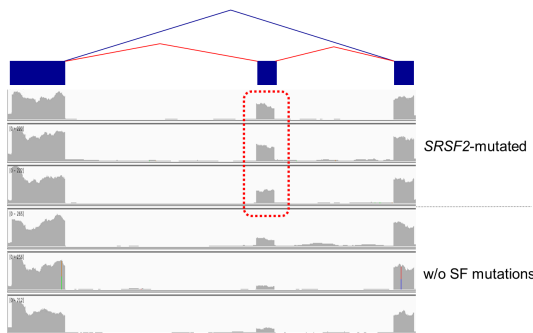


【図2】SF3B1変異細胞における cycloheximide 添加に伴う遺伝子発現比較

右側にプロットされたポイントが発現増加していた遺伝子、左側が発現低下した遺伝子を示し、縦軸は有意差を表す。青で示すのが、SF3B1変異に特徴的なスプライシング変化が観察された遺伝子を示し、赤で示すのが、同変化が観察され、かつ有意に発現変化を生じていた遺伝子を示す。

さらに、この遺伝子の中には、遺伝性鉄芽性貧血の原因遺伝子である ABCB7 などが含まれており、SF3B1 変異例における環状鉄芽球の発生に関与していることが示唆された(図2)。

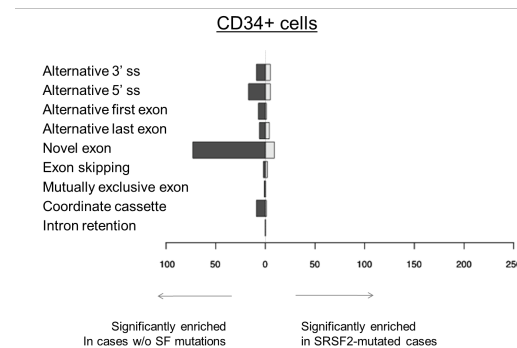
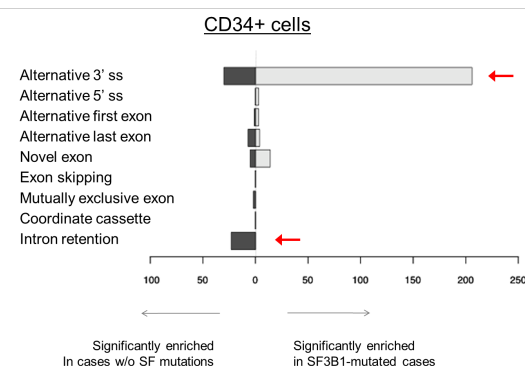
一方、SRSF2 変異例においては、同様の変化は稀であったが、通常観察されないエクソンを含む転写産物が検出される(図3)。並行して進めている変異体のノックインマウスにも同様のスプライシング変化が確認されている。



【図3】SRSF2変異例に特徴的に観察をされたスプライシング異常の1例

スプライシング変異を伴わない症例の RNA においては、わずかにしか観察をされないエクソンが、SRSF2 変異例においては転写産物の多くで認められることが明らかとなった。

SRSF2 は SF3B1 同様に 3' SS の認識に関わるが、エクソン上に存在する exon splicing enhancer と呼ばれる領域に結合することが知られているが、各々の変異遺伝子により、観察されるスプライシング変化は大きく異なる(図4)。



【図4】SF3B1変異例(上段)、SRSF2変異例(下段)で特徴的に観察されるスプライシング変化

データベースに登録のある通常の転写産物で生じる RNA スプライシングとは異なるスプライシングが観察される。

変異遺伝子に特徴的に観察されるスプライシング変化の違いが、環状鉄芽球の出現などの表現型の形成に関与していると推測された。

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2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, Koefler HP. Aberrant splicing of U12-type introns is the hallmark of ZRSR2 mutant myelodysplastic syndrome. *Nature Commun.* 6:6042, 2015

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

〔学会発表〕(計2件)

真田 昌 クローン解析に基づく造血器腫瘍の病態理解 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月9日

Y. Shiozawa, L. Malcovati, AS. Otsubo, A. Gall, K. Yoshida, T. Yoshizato, Y. Sato, K. Kataoka, M. Sanada, H. Makishima, Y. Shiraishi, K. Chiba, S. Miyano, EH Lindberg, S. Ogawa and M. Cazzola Different Mutant Splicing Factors Cause Distinct Missplicing Events and Give Rise to Different Clinical Phenotypes in Myelodysplastic Syndromes 57th Annual meeting of American Society of Hematology, 2015/12/5

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 なし

取得状況 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)

独立行政法人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