

161. 骨髄異形成症候群における RNA スプライシング異常の解析

吉田 健一

京都大学 大学院医学研究科 腫瘍生物学講座

Key words : 骨髄異形成症候群, RNA スプライシング

緒 言

骨髄異形成症候群 (MDS) とその関連疾患は、血球形態の異常を伴った骨髄不全と急性骨髄性白血病 (AML) への移行を特徴とし、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。現時点では根治的な治療は造血幹細胞移植のみであるが、高齢者に対しては副作用の観点からその適応は制限され、副作用の少ない治療を可能にする治療標的分子の同定が求められている。また、一部の症例では azacitidine などの脱メチル化剤が有効であるが、どのような作用機序あるいは治療標的に対して作用しているのかなど、そのメカニズムも解明されていない。

2011 年に、全エクソンシーケンスにより MDS において *SF3BI*、*SRSF2*、*U2AF1*、*ZRSR2* などの RNA スプライシング因子の遺伝子変異が、高頻度 (45-85 %) かつ特異的に認められることが明らかになり¹⁾、その後 MDS の病態の理解が急速に進んでいる。スプライシング因子の変異はほぼ完全に排他的にみられ、共通のメカニズムで MDS 発症に関わっていると考えられているが、一方で *SF3BI* 変異は環状鉄芽球の増加により特徴付けられる MDS でより高頻度に見られるなど、変異がみられる遺伝子により表現型に違いがあることもわかっている。さらに、細胞株を用いた実験や少数例の患者検体の解析結果に基づいて、変異が同定された RNA スプライシング因子の一つである *U2AF1* 遺伝子の変異では 3' スプライス部位の認識などのスプライシング機能が障害され、MDS 発症に関わっていると考えられている。しかし、多数の MDS 検体を用いた網羅的な RNA スプライシングの異常についての解析は行われておらず、RNA スプライシング因子の遺伝子変異による MDS 発症の詳細なメカニズムは十分に解明されていない。

本研究では MDS で最も高頻度に見られる遺伝子異常である RNA スプライシング因子の遺伝子変異によるスプライシングの異常やそれに起因する遺伝子発現の変化などを多数の MDS 患者検体を用いて網羅的に RNA スプライシングのパターンを解析することにより、変異による MDS 発症や環状鉄芽球増加などのメカニズムを明らかにすることを目的としている。

方 法

214 症例の MDS 患者骨髄単核球あるいは CD34 陽性細胞検体から抽出した高品質な RNA 検体を用いて、RNA シーケンスを行い、異常スプライシング産物を同定した。214 症例中、これまでに MDS で変異が報告されている *SF3BI*、*SRSF2*、*U2AF1*、*ZRSR2* 遺伝子の変異はそれぞれ 28 %、18 %、5 %、7 % に認められ、それぞれの遺伝子について変異の有無によるスプライシングパターンの違いを検討した。

結 果

SF3BI 遺伝子変異を有する症例について変異のない症例と比べて、スプライシングパターンを検討したところ、554 個の *SF3BI* 変異例で特徴的に増加あるいは減少がみられるスプライシング異常が同定されたが、このうち 90 % が 3' スプライス部位の異常 (誤認識) によるものであると考えられた (図 1)²⁾。

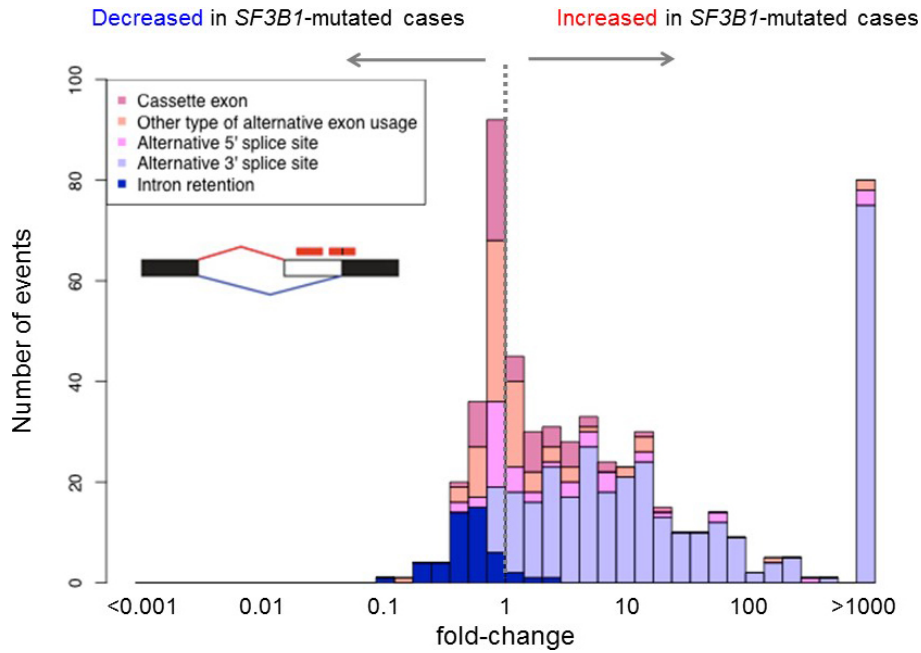


図1. *SF3B1* 変異と強い相関がみられたスプライシング異常のパターン

SF3B1 変異例で有意に増加（右側）あるいは減少（左側）していたスプライシングパターン。*SF3B1* 変異例で特徴的にみられたパターンの90%が3'スプライス部位の異常（alternative 3' splice site）によるものと考えられた

この結果は *SF3B1* が U2 snRNP complex を構成して3'イントロンの branch point sequence の認識に関わっているという従来から知られている機能と一致する結果と考えられた。また、これらの3'スプライス部位の異常の約半数はフレームシフトを起こし、この結果 *SF3B1* 変異により多くの遺伝子の機能異常が起こっていると考えられた（図2）。

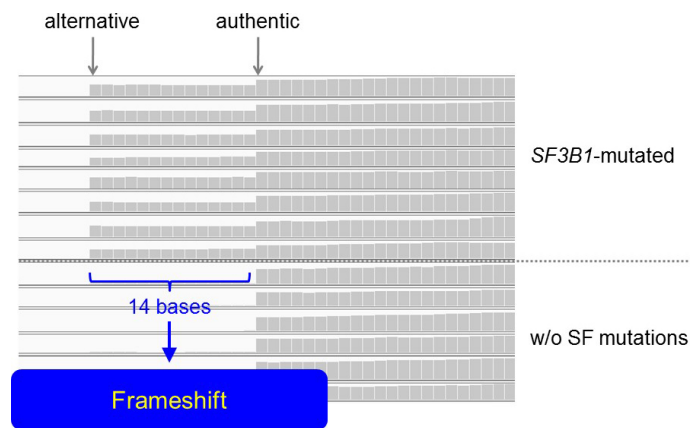


図2. *SF3B1* 変異例にみられた3'スプライス部位の異常

SF3B1 変異例でみられる3'スプライス部位の異常の約半数はフレームシフトを起こし、遺伝子の機能異常を起こしていると考えられた。

同様に、*SRSF2* 遺伝子変異を有する症例について変異のない症例と比べてスプライシングパターンを検討したところ、248個の *SRSF2* 変異例で増加あるいは減少がみられるスプライシング異常が同定され、そのうち多くがエクソンスキッピングなどエクソン単位の異常と関係していた（図3）。

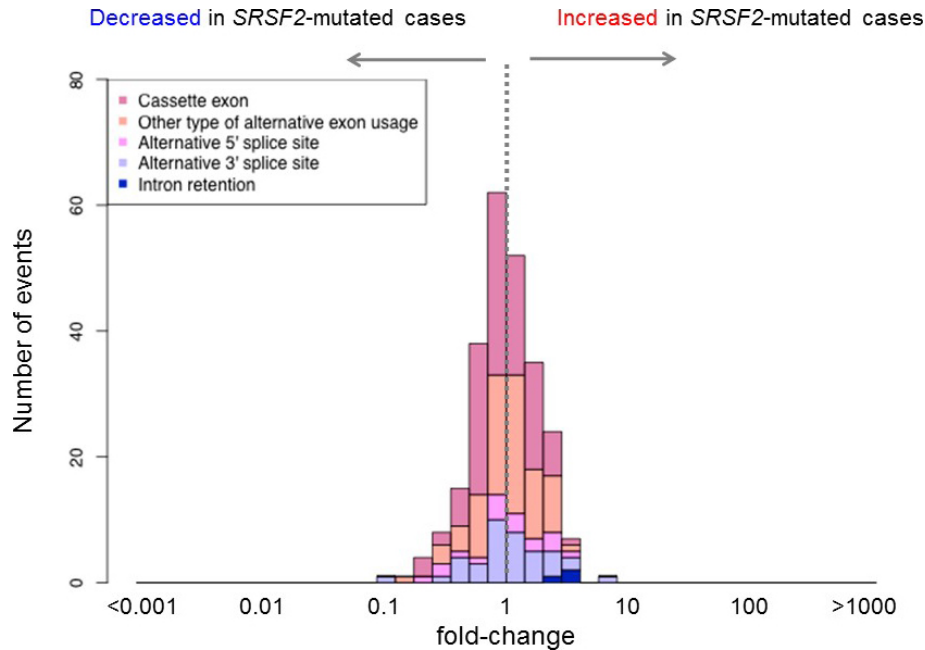


図3. *SRSF2*変異と強い相関がみられたスプライシング異常のパターン

*SRSF2*変異例で有意に増加（右側）あるいは減少（左側）していたスプライシングパターン。*SRSF2*変異例で特徴的にみられたパターンの多くはエクソン単位の異常と関係していた (cassette exon, alternative exon usage)。

この結果は、*SRSF2*がエクソン部分にあるエクソンスプライシングエンハンサーと結合してスプライシングに関わる分子を集めてスプライシングを促進する役割を持っていることに合致している。また、*U2AF1*遺伝子の変異はオルタナティブエクソンの利用および3'スプライス部位の誤認識と関係していた。*ZRSR2*はminor(U12-type)spliceosomeを構成することが知られているが、*ZRSR2*変異例は過去の報告と同様にU12タイプのイントロンリテンション（スプライスされるはずのイントロン配列が、スプライスされずに保持される）がみられていた。

上記のように各遺伝子変異によるスプライシングの異常は多くの遺伝子に起こっていると考えられたが、その中で特定の遺伝子のスプライシング異常がMDSの原因あるいは、特定の表現型と関わっている可能性も考えられている。実際に、*SF3B1*変異例でスプライシング異常が見られる遺伝子の中には、ヘム合成に関連した遺伝子が複数同定され、環状鉄芽球の増加に関わっている可能性が考えられた。また*SRSF2*変異例でスプライシング異常が見られる遺伝子にはMDSで機能喪失型の変異が認められる*EZH2*が含まれており、*SRSF2*変異で高頻度に見られるスプライシングバリエントでは早期に終止コドンが出現し、変異と同様に最終的に蛋白量が低下してMDS発症に関わっていると考えられた（図4）。

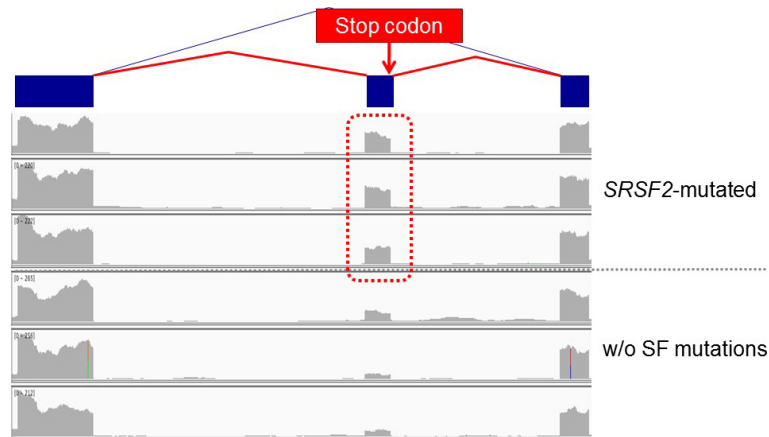


図4. *SRSF2*変異例と関係するオルタナティブエクソンの例 (*EZH2* 遺伝子)

*SRSF2*変異例 (上) で変異がない症例 (下) に比べて中央部のオルタナティブエクソンが高頻度で使用されているが、このエクソンには終止コドンが含まれて、より早期に蛋白の切断が起こると考えられる。

考 察

今回の解析で、MDSにおいては複数のRNAスプライシング因子に変異がみられるが、変異がみられるRNAスプライシング因子によりみられるスプライシング異常のパターンや、標的となっている遺伝子が異なっていることが明らかになった。スプライシングの異常は多数の遺伝子に起こっているものの、MDS発症の原因あるいは表現型の原因となっている遺伝子の候補も挙がってきた。今後、今回同定されたスプライシング異常が本当に変異によって起こっているのか、細胞株に変異を導入して確認するなどの追加の実験が必要であると考えられた。

共同研究者

本研究の共同研究者は、Pavia 大学 (イタリア) 分子医学講座 Luca Malcovati、Mario Cazzola および京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座の塩澤裕介、小川誠司である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, Sato Y, Sato-Otsubo A, Kon A, Nagasaki M, Chalkidis G, Suzuki Y, Shiosaka M, Kawahata R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Ishiyama K, Mori H, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Sugano S, Haferlach C, Koefler HP, Shih LY, Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 478(7367):64-9. doi: 10.1038/nature10496.PubMed PMID: 21909114
- 2) Shiozawa Y, Sato-Otsubo A, Galli A, Yoshida K, Yoshizato T, Sato Y, Kataoka K, Sanada M, Shiraishi Y, Chiba K, Miyano S, Malcovati L, Cazzola M, Ogawa S. Comprehensive Analysis of Aberrant RNA Splicing in Myelodysplastic Syndromes. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 124(21):826.