129　骨髄異形成症候群の治療抵抗性に関わる分子病態の解明	昆　彩奈

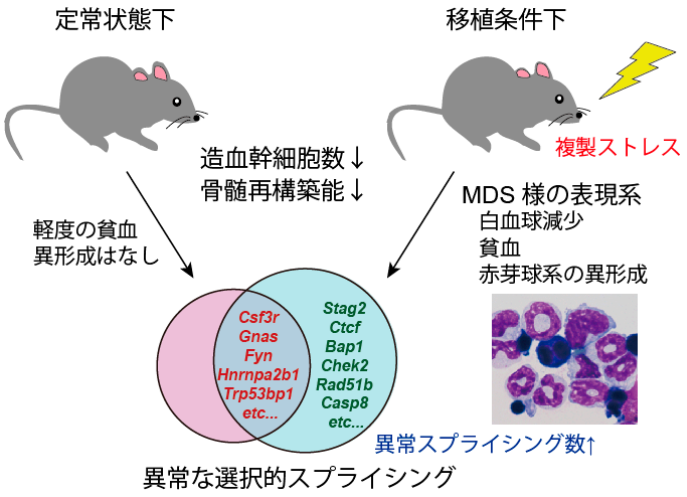
【目的】骨髄異形成症候群（MDS : myelodysplastic syndromes）とその関連疾患は、血球形態の異常を伴った骨髄不全と急性骨髄性白血病（AML : acute myeloid leukemia）への移行を特徴とし、高齢者に好発する慢性骨髄性腫瘍である。高齢者に適応可能な根治的治療手段を欠く一方で、その本質的な病因については、本症を特徴づける変異が知られておらず長く不明であった。近年、我々およびその他の研究グループにより、RNA スプライシング因子の変異が本症に高頻度かつ特異的に認められることが発見され、病態の理解に大きな突破口が認められた。一方で、その機能的側面については多くが未解明であり、新規遺伝子変異による MDS 発症の分子メカニズムを解明することが、治療抵抗性の MDS の病態の理解、さらには分子診断・治療法の改善のために強く望まれている。そこで、本研究は、スプライシング因子変異の機能解析を通じて、治療抵抗性の MDS の病態の理解とその克服に資することを目的とした。

【方法】スプライシング因子 *SRSF2* に集積するホットスポット変異（P95H）に関するコンディショナルノックインマウスモデルを作成した。造血系組織の病理組織学的評価およびフローサイトメトリーによる表現マーカー解析による造血細胞分画プロファイルの解析を行った。また、競合的骨髄移植実験により造血幹細胞の長期骨髄再構築能を評価した。さらに、RNA シーケンスにより、*Srsf2* 変異による発現異常およびスプライシング異常の標的遺伝子の探索を行った。

【結果】本研究では主に次の 5 点について明らかにすることができた。1）*Srsf2* P95H 変異マウスは大球性貧血を示すものの長期観察（～2 年）にて MDS を発症しない、2）*Srsf2* 変異マウスは造血幹前駆細胞数の減少と骨髄再構築能の低下を示す、3）致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは MDS 様の表現型、および造血不全による生存率低下を示す、4）*Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、移植のストレス下において MDS 症例に特徴的な発現異常を示す、5）*Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、多数の標的遺伝子（*Csf3r*、*Fyn*、*Gnas*、*Hnrnpa2b1*、*Trp53bp1* など）において、異常カセットエキソンを代表とするスプライシング異常を示す。

Srsf2 変異の単一の効果では MDS を発症しないものの、移植による造血ストレス下で MDS 発症が促進されるという観察結果は、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が病態に重要な役割を果たすことを示唆している。興味深いことに、移植による複製ストレス下では、定常状態下と比較しより多数の遺伝子がスプライシング異常を示しており、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が MDS の病態に重要であることが明らかとなった。

Srsf2 P95H 条件的ノックインマウス



129. 骨髄異形成症候群の治療抵抗性に関わる分子病態の解明

昆　彩奈

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，スプライシング因子変異，マウスモデル，RNA スプライシング異常，造血ストレス

緒　言

骨髄異形成症候群（MDS : myelodysplastic syndromes）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 : acute myeloid leukemia）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。高齢者に適応可能な根治的治療手段を欠く一方で、その本質的な病因については、本症を特徴づける変異が知られておらず長く不明であったが、近年の我々およびその他の研究グループによる RNA スプライシング因子の変異の発見[1, 2]により急速に理解が進んでいる。一方で、その機能的側面については多くが未解明であり、*in vivo* での検討を含めた詳細な機能的解析により MDS 発症の分子メカニズムを解明することが、治療抵抗性の MDS の病態の理解、さらには分子診断・治療法の改善のために強く望まれている。そこで、スプライシング因子 SRSF2 に集積するホットスポット変異（P95H）に関するコンディショナルノックインマウスモデルを用いた機能解析を通じて、MDS の病態の理解とその克服に資することを目的として本研究を行った。

本研究では主に次の 5 点について明らかにすることができた。1）*Srsf2* P95H 変異マウスは大球性貧血を示すものの長期観察（～2 年）にて MDS を発症しない、2）*Srsf2* 変異マウスは造血幹前駆細胞数の減少と骨髄再構築能の低下を示す、3）致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは MDS 様の表現型、および造血不全による生存率低下を示す、4）*Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、移植のストレス下において MDS 症例に特徴的な発現異常を示す、5）*Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、多数の標的遺伝子（*Csf3r*、*Fyn*、*Gnas*、*Hnrnpa2b1*、*Trp53bp1* など）において、異常カセットエキソンを代表とするスプライシング異常を示す。

Srsf2 変異の単一の効果では MDS を発症しないものの、移植による造血ストレス下で MDS 発症が促進されるという観察結果は、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が病態に重要な役割を果たすことを示唆している。興味深いことに、移植のストレス下では、定常状態下と比較しより多数の遺伝子がスプライシング異常を示しており、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が MDS の病態に重要であることが明らかとなった。本マウスモデルは、スプライシング因子変異を標的とした新規治療薬剤の薬効試験における *in vivo* モデルとしても有用であると期待される［3］。

方法および結果

1. *Srsf2* P95H 変異マウスは造血幹細胞数の減少と分化異常を示す

RNA スプライシング因子の主要な機能獲得型変異 *SRSF2* P95H 変異に関し、Flex-Switch 法をもちいたコンストラクトを用いて、条件的ノックインアレルのマウスモデルの作製を行った （図 1)。*ACT-FLPe* マウスと交配させてネオマイシン耐性遺伝子カセットを除去したのちに、*Vav1-Cre* トランスジェニックマウスと交配させた。骨髄細胞および脾臓細胞の RNA で遺伝子変異が発現していることを確認した（図 1)。

Vav1-Cre $^{+/-}$ *Srsf2* $^{floxP95H/WT}$ マウスは、長期観察（90 週齢以上）にて、MDS やその他の造血器腫瘍を発症せず、変異群と野生型群では生存率に差は認めなかった。*Vav1-Cre* $^{+/-}$ *Srsf2* $^{floxP95H/WT}$ マウスは大球性貧血を示したものの、白血球数や血小板数には異常を認めず、骨髄細胞の形態学的異常も認めなかった。

次に、FACS を用いた表現マーカー解析を行った。*Vav1-Cre* $^{+/-}$ *Srsf2* $^{floxP95H/WT}$ マウスでは、造血幹細胞分画 (CD34^{-}KSL、SLAM KSL 分画）および前駆細胞分画 （KSL 分画） が、コントロール群と比較して有意に減少しており、limiting dilution 競合的骨髄移植でも確認された。一方で、より分化した分画である骨髄系前駆細胞 （CMP 分画、GMP 分画、MEP 分画)、リンパ系前駆細胞 （CLP 分画）の数は、変異群と野生型群で有意差を認めなかった。

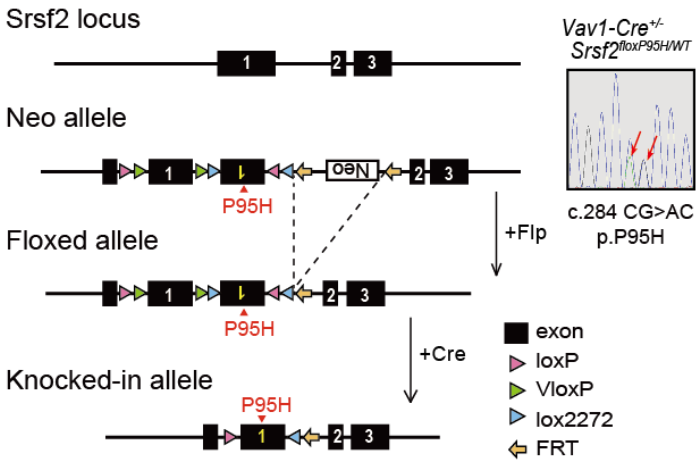


図 1. *Srsf2* P95H 条件的ノックインマウスの作製

Flex-switch システムを用いて *Srsf2* P95H 変異アレルの条件的ノックインマウスを作製した。*ACT-FLPe* マウスと交配させてネオマイシン耐性遺伝子カセットを除去したのちに、*Vav1-Cre* トランスジェニックマウスと交配させた。骨髄細胞の RNA から合成した cDNA をサンガーシーケンスすることにより、変異アレルが発現していることを確認した。

2. 致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは MDS 様の表現型を示す

次に、ストレス環境下での *Srsf2* 変異骨髄細胞の機能を調べるために、*Vav1-Cre* $^{+/-}$ *Srsf2* $^{floxP95H/WT}$ マウスおよび *Vav1-Cre* $^{+/-}$ *Srsf2* $^{WT/WT}$ マウス (CD45.2/45.2) から採取した骨髄細胞を、致死量放射線照射したマウス (CD45.1/45.1) へ経静脈的に移植した。両群において、移植後 16 週までに、末梢血ドナーキメリズムは 90%以上を達成した。なお、CFSE で染色した骨髄細胞をレシピエントマウスに移植して 16 時間後に骨髄でのドナー細胞の生着を評価すると、変異型と野生型で有意差を認めず、変異型骨髄細胞のホーミング能は保たれていることが示された。致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは白血球減少および大球性貧血（図 2A)、赤芽球系の異形成（図 2B）といった MDS 様の表現型を呈し、さらに造血不全による生存率低下を示した。また、FACS 解析を通じて、*Vav1-Cre* $^{+/-}$ *Srsf2* $^{floxP95H/WT}$ マウス由来の骨髄細胞を移植したレシピエントマウスは、造血幹前駆細胞分画（CD34^{-}KSL、SLAM KSL、KSL）に加えて、骨髄系前駆細胞（CMP 分画）の減少と、赤芽球系細胞や B リンパ球の分化異常を呈することも明らかになった（図 2C)。また、造血幹細胞分画は、細胞周期の亢進（静止期細胞の減少）（図 2D）とアポトーシスの亢進を示した。

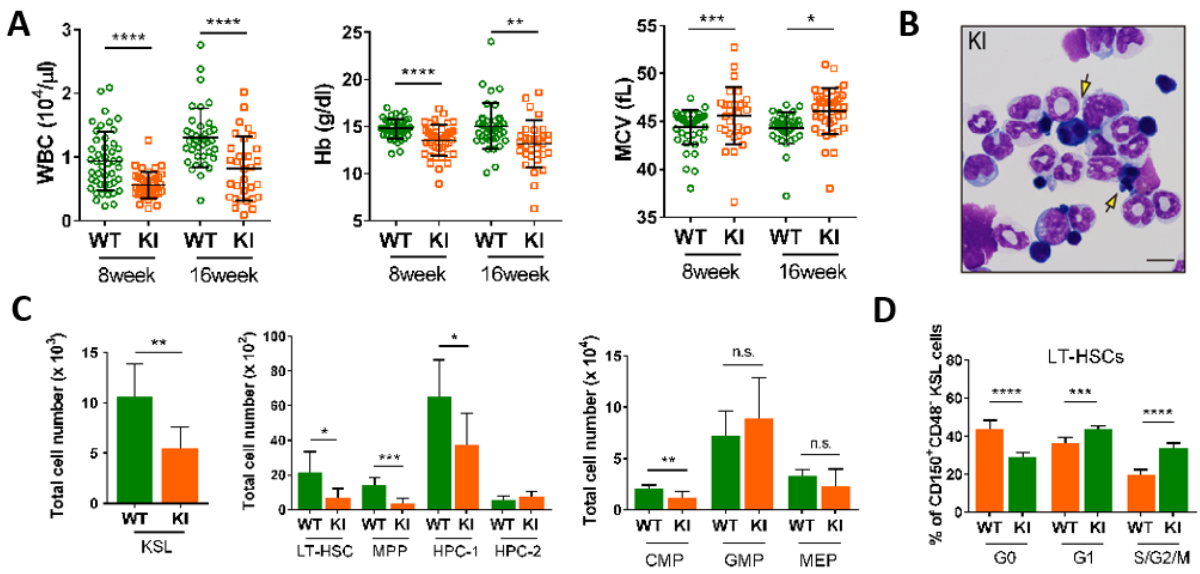


図 2. 移植後条件下における *Srsf2* P95H 変異による造血系表現型

A) *Srsf2*野生型(WT)または変異型(KI)骨髄細胞を非競合移植後の末梢血の血液データを示す(mean ± SD)。移植後8週:n = 45(WT), n = 41(KI):移植後16週:n = 38 (WT), n = 31 (KI)、**B)** 変異型(KI)骨髄細胞を移植後4ヶ月の骨髄のメイギムザ染色像。矢印は多核赤芽球を示す。スケールバー 10 μm、**C)** FACSにより評価した骨髄造血幹細胞分画数(n = 7, mean±SD)、**D)** 長期骨髄造血幹細胞における細胞周期解析(n = 6, mean±SD)。統計解析はスチューデントのt検定(両側検定)を用いた。*P < 0.05 ; ** P < 0.01 ; *** P < 0.001 ; **** P < 0.0001.

3. *Srsf2* 変異造血幹細胞は骨髄再構築能の低下を示す

次に、競合的骨髄移植により、*Srsf2* 変異造血幹細胞の骨髄再構築能を評価するために、*Vav1-Cre*$^{+/-}$ *Srsf2*$^{floxP95H/WT}$ マウスおよび *Vav1-Cre*$^{+/-}$*Srsf2*$^{WT/WT}$ マウス（CD45.2/45.2）から採取した骨髄細胞を、CD45.1/45,2 野生型 C57BL/6 マウス由来のコンペティター骨髄細胞と等量 (1×10^{6}cells) ずつ混合し、致死量放射線照射したマウス （CD45.1/45.1）へ経静脈的に移植した。*Srsf2* 変異造血幹細胞を移植したレシピエントマウスは、進行性の末梢血ドナーキメリズムの低下を示した（図 3A)。FACS により純化した CD34$^-$KSL 細胞を用いた競合的移植においても、*Srsf2* 変異造血幹細胞の骨髄再構築能が、対照細胞と比較して有意に低下することが示された（図 3B)。

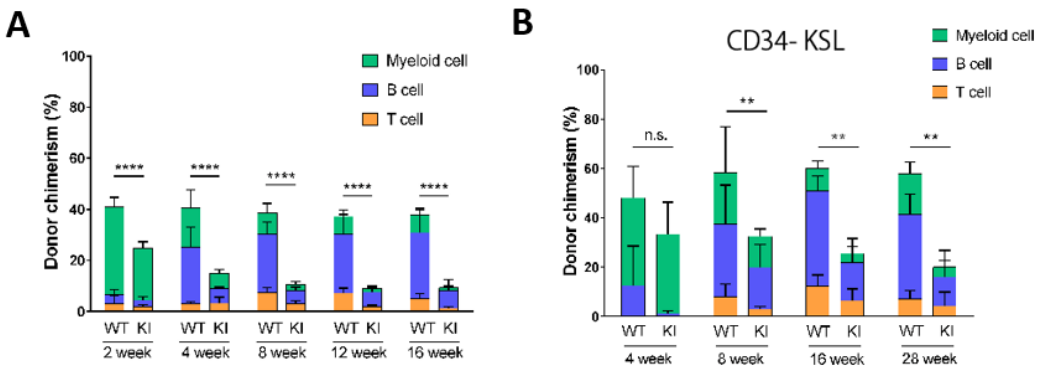


図 3. *Srsf2* P95H 変異細胞は骨髄再構築能の低下を示す

A) *Srsf2*野生型（WT）または変異型（KI）由来の全骨髄細胞を競合移植後の末梢血のドナーキメリズムを示す（n = 10, mean±SD)、**B)** *Srsf2*野生型（WT）または変異型（KI）から純化した骨髄造血幹細胞分画（CD34$^-$KSL）を競合移植後の末梢血のドナーキメリズムを示す（n = 7, mean±SD)。統計解析はスチューデントの t 検定（両側検定）を用いた。**P < 0.01 ; ****P < 0.0001.

4. *Srsf2*変異造血幹前駆細胞における RNA スプライシングおよび発現の異常

Srsf2 変異が RNA スプライシングにもたらす影響を調べるために、定常状態下および移植条件下の両条件下において、変異型および野生型のマウスから FACS によりソートした造血幹前駆細胞分画（KSL 分画および MP 分画）から、NucleoSpin RNA XS（Macherey Nagel 製）を用いて RNA を採取し、RNA シーケンスを行った。方法としては、SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing,（Clontech 製）を用いて cDNA の合成と増幅を行い、Low Input Library Prep Kit（Clontech 製）にてアダプター配列付きシーケンスライブラリを調製し、イルミナの Hiseq 2500 にてシーケンスを行った。シーケンスデータは、HISAT2 を用いてマウスレフェレンスゲノム（mm10）にマッピングしたのちに、rMATS アルゴリズムを用いて野生型と変異型で有意に異なる選択的スプライシング（alternative splicing : AS）を同定した。FDR < 0.1% および inclusion level differences が 5%以上をカットオフ値として採用することで、移植条件下の KSL 分画では 1,484 個、MP 分画では 1,087 個の異常な AS イベントを同定し、定常条件下の KSL および MP 分画では、それぞれ 927 個と 276 個の異常 AS イベントを同定した。異常 AS イベントの種類は、異常カセットエキソンが最も多く、相互排他的エキソン、選択的 3'スプライス部位、選択的 5'スプライス部位、選択的イントロン保持の順に認められた（図 4A）。異常カセットエキソンのうち、変異細胞で野生型細胞と比較してスプライシングがより保持されたエキソンでは CCNG モチーフが、よりスキップされたエキソンでは GGNG モチーフが濃縮していた（図 4B）。

定常状態下の KSL または MP 分画、移植条件下の KSL または MP 分画の 4 群の少なくとも 1 群において、計 1,189 遺伝子がスプライシング異常を認め、98 遺伝子が 3 群以上でスプライシング異常を認めた（図 4C）。この中には、Cancer Gene Census（http://cancer.sanger.ac.uk/census）にがん関連遺伝子として登録されている遺伝子が 13 個含まれていた（*Hnrnpa2b1*、*Gnas*、*Atrx*、*Csf3r*、*Mllt10* など）。興味深いことに、移植条件下の KSL または MP 分画では、定常状態下の KSL または MP 分画と比較して、より多数のスプライシング異常が認められ、白血病の発症に関与することが知られている遺伝子（*Stag2*、*Bap1*、*Ctcf* ）や、DNA 損傷修復やアポトーシスに関与する遺伝子（*Chek2*、*Fancc*、*Rad51b*、*Cdk4*、*Casp8* など）が含まれていた（図 4C）。

次に、edgeR パッケージを用いて、*Srsf2* 変異群における発現変動遺伝子を同定した。FDR < 0.05 および発現比の変化 1.2 倍以上を満たす遺伝子には、*Hnrnpa2b1*、*Gata1*（発現増加）、*Mpl*、*Irf4*、*Csf3r*、*Trp53bp1*（発現低下）などが認められた（図 4D）。Gene set enrichment analysis により、ヒト MDS 症例で発現異常を認める遺伝子セットが、移植条件下の KSL 分画では *Srsf2* 変異群で発現亢進しているものの、非移植条件下では変化を認めないことも明らかになった。さらに、*Srsf2* 変異細胞では、幹細胞性喪失, 細胞周期亢進、DNA 修復亢進、分化異常、RNA 代謝関連遺伝子発現などの遺伝子セットが有意に発現上昇していた。スプライシング異常を認めた遺伝子の中で、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構により分解されて発現低下を生じたと予想された遺伝子はごくわずかであったものの、*Hnrnpa2b1*、*Csf3r*、*Trp53bp1* などの複数の遺伝子が、RNA スプライシング異常と発現異常を認めた。

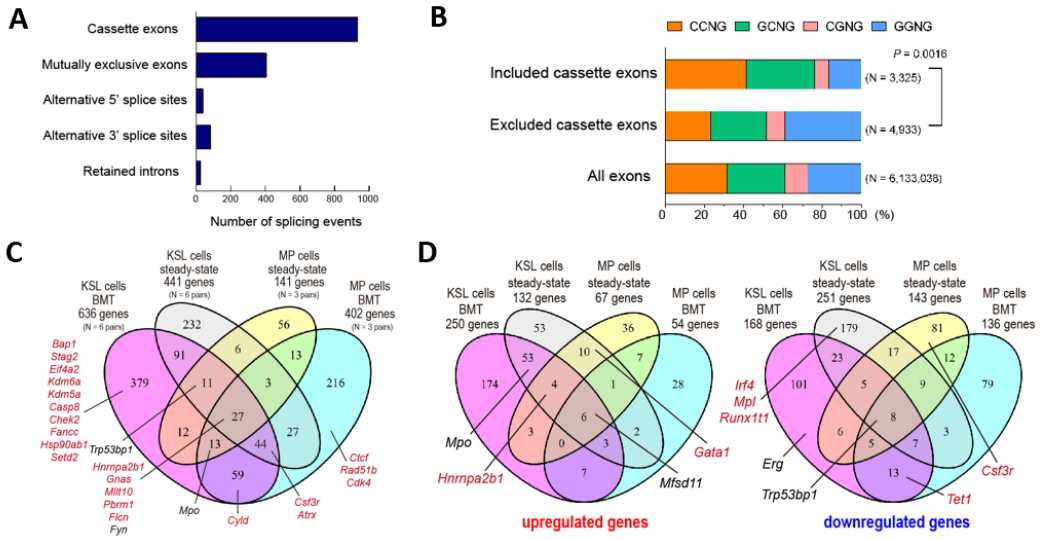


図 4. *Srsf2* 変異造血幹前駆細胞における RNA スプライシングおよび発現の異常

A) 移植条件下での *Srsf2* 変異型（KI）マウス由来 KSL 細胞で同定された RNA スプライシング異常の内訳を示す。

B) 移植条件下での *Srsf2* 変異型（KI）マウス由来 KSL 細胞において認められた異常カセットエキソンにおいて、スプライシングがより保持されたエキソン（included）およびよりスキップされたエキソン（excluded）における 4mer モチーフの内訳を示す。フィッシャー検定を行った。

C) 4 群の実験条件下で同定された異常 RNA スプライシングを認めた遺伝子数をベン図にて示す。

D) 4 群の実験条件下で同定された発現異常を認めた遺伝子数をベン図にて示す。

考　察

本研究では、スプライシング因子 *SRSF2* に集積するホットスポット変異（P95H）に関するコンディショナルノックインマウスモデルを用いて、スプライシング遺伝子変異が正常造血におよぼす影響についての生物学的検討を行った。その結果、主に次の 5 点について示すことができた。

1）*Srsf2*P95H 変異マウスは大球性貧血を示すものの、長期観察（～2 年）にて MDS を含む造血器腫瘍を発症しない。

2）*Srsf2* 変異マウスは造血幹前駆細胞数の減少と骨髄再構築能の低下を示す。

3）致死量放射線照射したマウスに *Srsf2* 変異骨髄細胞を移植すると、レシピエントマウスは MDS 様の表現型、および造血不全による生存率低下を示す。

4）*Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、移植のストレス下においてヒト MDS 症例に特徴的な発現異常を示す。

5）*Srsf2* 変異造血幹前駆細胞は、多数の標的遺伝子（*Csf3r*、*Fyn*、*Gnas*、*Hnrnpa2b1*、*Trp53bp1* など）において、異常カセットエキソンを代表とするスプライシング異常を示す。

Srsf2 変異の単一の効果では MDS を発症しないものの、移植による造血ストレス下で MDS 発症が促進されるという観察結果は、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が病態に重要な役割を果たすことを示唆している。興味深いことに、移植のストレス下では、定常状態下と比較しより多数の遺伝子がスプライシング異常を示しており、加齢による遺伝子異常の蓄積や造血環境が MDS の病態に重要であることが明らかとなった。特筆すべきことに、Srsf2 変異をもつ造血幹細胞は、対照細胞と比較して骨髄再構築能の低下を示した。スプライシング因子変異をもつマウス造血幹細胞がクローン選択において不利に働くことは、他の複数の研究室からも再現性をもって報告されているが、実際の MDS 症例で予期される現象と相反する不可思議な結果といえる。従って、スプライシング因子変異が、どのようにして造血幹細胞や前駆細胞クローンの選択と進化をもたらし、また造血環境と相互作用して MDS の発症を誘導するのか、さらに、白血病へ進展するのかという、病態の本質的な疑問については未解決であるが、今後更に検討していきたい。本マウスモデルは、スプライシング因子変異を標的とした新規治療薬剤の薬効試験における *in vivo* モデルとしても有用であると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院医学研究科・腫瘍生物学講座の小川誠司、南谷泰仁、片岡圭亮、中川正宏、吉田健一、塩澤祐介、吉里哲一、東京大学医科学研究所・幹細胞治療分野の中内啓光、山崎聡、森田麻衣子、東京大学医科学研究所付属病院病理部の大田泰徳、国立病院機構名古屋医療センター・臨床研究センターの真田昌、かずさ DNA 研究所・遺伝子応用研究室の中山学、理化学研究所・免疫器官形成研究グループの古関明彦である（敬称略）。

本研究は、上原記念生命科学財団・研究奨励金、MEXT/JSPS 科研費（JP26221308、JP26253060、JP16K19574、JP14J03784、JP26115009）、AMED（16cm0106501h0001、16ck0106073h0003）による研究費助成を受けて行った。研究遂行にご協力頂いた共同研究者、技術補佐および事務スタッフの皆様にこの場をかりて感謝申し上げます。上原記念生命科学財団による手厚い研究支援に御礼申し上げます。

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, Koeffler HP, Shih LY,Haferlach T, Chiba S, Nakauchi H, Miyano S, Ogawa S. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature 2011 Sep 11;478(7367):64-9. doi: 10.1038/nature10496.

2） Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, Godfrey AL, Rapado I, Cvejic A, Rance R, McGee C, Ellis P, Mudie LJ, Stephens PJ, McLaren S, Massie CE, Tarpey PS, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Shlien A, Jones D, Raine K, Hinton J, Butler AP, Teague JW, Baxter EJ, Score J, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Groves M, Tauro S, Munshi NC, Anderson KC, El-Naggar A, Fischer A, Mustonen V, Warren AJ, Cross NC, Green AR, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. N Engl J Med. 2011 Oct 13;365(15):1384-95. Epub 2011 Sep 26. doi: 10.1056/NEJMoa1103283.

3） Kon A, Yamazaki S, Nannya Y, Kataoka K, Ota Y, Nakagawa MM, Yoshida K, Shiozawa Y, Morita M, Yoshizato T, Sanada M, Nakayama M, Koseki H, Nakauchi H, Ogawa S. Physiological Srsf2 P95H expression causes impaired hematopoietic stem cell functions and aberrant RNA splicing in mice. Blood 2018 Feb 8;131(6):621-635. Epub 2017 Nov 16. doi: 10.1182/blood-2017-01-762393.