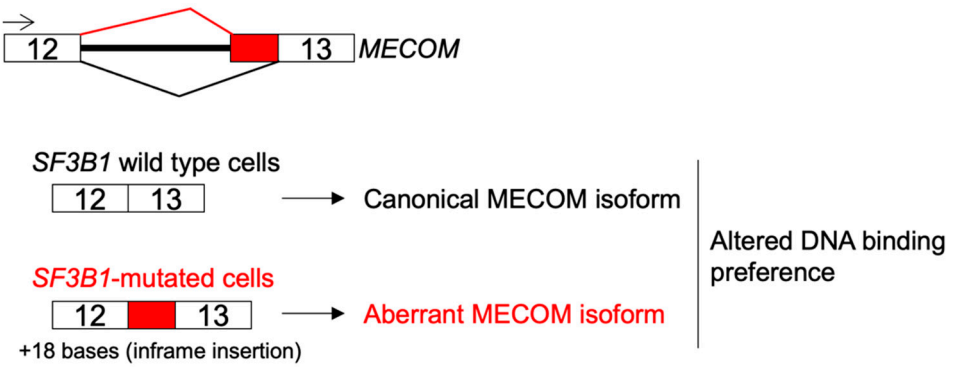
131　難治性白血病の病態解析と治療応用	井上　大地

【目的】急性骨髄性白血病（AML）の一部では、inv(3)あるいは t(3;3)などの染色体レベルでの異常により、がん遺伝子とされる *EVI1*（*MECOM*）遺伝子がエンハンサーハイジャッキングと呼ばれる現象を介して異所的に高発現しており、予後不良である。これらの特徴的な白血病では、RNA スプライシング因子である SF3B1 の変異がたびたび認められることが知られているが、その生物学的な意義は全く解明されていない。本研究では、*SF3B1* 遺伝子変異がもたらすスプライシング異常が inv(3)/t(3;3)AML とどのように協調するかについて、分子レベルで明らかとすることを目的とした。

【方法】Memorial Sloan Kettering Cancer Center の大規模 AML データベースの中から inv(3)あるいは t(3;3)を含む AML 患者を抽出し、体細胞変異の観点から SF3B1 変異が有意にオーバーラップしているか検討した。続いて、*Sf3b1* 変異ノックインマウスモデルと inv(3)モデルを交配したマウスモデルを作製し、*in vivo* での協調の有無を検討した。次に、inv(3)/t(3;3)と SF3B1 変異を同時に認める AML サンプル、どちらか一方をもつ AML サンプル、いずれも持たない AML サンプルの遺伝子発現とスプライシングについてヒト・マウス双方から解析を行った。

【結果】*SF3B1* 遺伝子変異は AML 全体では稀であるものの、63 例の inv(3)/t(3;3)AML のうち、17 例（27%）で検出され、最も高頻度に認められる体細胞変異であった。*Sf3b1* 変異ノックインマウスと inv(3)モデルマウスは、ミエロイド系列への分化誘導を伴い、協調的により早期に AML を発症させることを確認した（P=0.0021）。RNA-seq による発現解析では、遺伝子発現の変化とスプライシングの変化の大部分は、それぞれ、inv(3)と SF3B1 変異によって惹起されていた。興味深いことに、両者の異常を伴う造血幹細胞においては、MECOM の DNA 結合に関与する ZF2 ドメインに 6 アミノ酸がインフレームで挿入されるスプライシング異常が生じていた。ミニジーンアッセイの結果、SF3B1 変異体は通常とは異なる分岐点、3′スプライス部位、スプライシングエンハンサーを利用していた。ChIP-seq による解析から、この新規 MECOM バリアントは DNA への結合性を変化させており、発がんを誘導するアイソフォームと考えられた。さらに、先天性 MECOM-associated syndrome においても、同じ 3′スプライス部位の変異を有する症例が観察され、SF3B1 変異細胞と同様に 6 アミノ酸が挿入される新規のアイソフォームが形成されていた。以上より、SF3B1 変異が inv(3)/t(3;3)AML において誘導する新規アイソフォームと発がんとの関連性を示すことができた。

*SF3B1*遺伝子変異によるMECOMスプライシング異常



131. 難治性白血病の病態解析と治療応用

井上　大地

神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター 血液・腫瘍研究部

Key words：急性骨髄性白血病，骨髄異形成症候群，EVI1，SF3B1，スプライシング

緒　言

シーケンス技術の革新的進化により急性骨髄性白血病（AML）のあらゆる遺伝子変異が洗い出され、それぞれの遺伝子変異に応じた特異的な治療法が開発されている。国内外の様々な研究グループにより遺伝子発現異常・遺伝子変異の有無により予後の層別化が進んでいるが、未だに病態解明が十分でなく有効な治療が存在しない群も絞り込まれてきた。例えば、AML 全体の 6～11%で検出される *EVI1* 遺伝子の高発現は独立した予後不良因子であり、再発リスクならびに治療抵抗性と相関していることが知られている［1］。興味深いことに、*EVI1* 遺伝子をコードする 3 番染色体長腕の逆位（inv(3)）や転座（t(3;3), t(3;21)など）により、EVI1 の発現が誘導されることが知られている。そのメカニズムとして、GATA2 のエンハンサーが EVI1 の上流に組み込まれて遺伝子発現が誘導される機構が実証されている［2］。これまでに *EVI1* 遺伝子が造血幹細胞の自己複製能を亢進させ、マウスモデルで白血病を惹起することが知られているが、*EVI1* 遺伝子の下流標的を含めて治療応用につながる有効な標的や戦略は見出されておらず、多くの先行研究にもかかわらず EVI1 の異常を有する AML に対して特異的な治療法の開発には至っていない。その理由として以下の二つが克服すべき課題である。まず、EVI1 は上流の MDS1 も含めて *MECOM* 遺伝子として転写されるが、スプライシングバリアントが多数存在し、どのバリアントが AML 発症に寄与しているか十分に解明されていない。また、臨床上 EVI1 異常単独で発症することはなく、他の遺伝子変異と合併するが、協調作用を反映したマウスモデルが存在せず、研究開発における障壁となっている。

方　法

1.　大規模 AML データベースを用いた変異解析およびクロマチン構造異常解析

Memorial Sloan Kettering Cancer Center の MSK-IMPACT™ データベース等を用いて、 inv(3)あるいは t(3;3)を含む AML 患者を抽出し、造血器腫瘍において繰り返し生じている体細胞変異の検索を行った。またそれらのサンプルの遺伝子発現解析やスプライシング異常の評価を既報の手法を用いて行った［3］。

2.　マウスモデルの作製

我々のグループの山嵜らは、2 つの大腸菌人工染色体を連結する技術を用いてヒトの 3q21 領域と 3q26 領域との間の逆位を再現し、このコンストラクトをもつトランスジェニックマウスを作製した［2］。これらを、すでに骨髄異形成症候群モデルとして報告されている Mx1-Cre; $Sf3b1^{K700E/WT}$ マウス［4］と交配することによりヒト AML を模倣したマウスモデルを作出した。これらをもとに *in vivo* での協調作用の評価を行った。

3.　新規 MECOM バリアントの機能評価

DNA 結合能を評価するために 293T 細胞に HA タグを付加した cDNA を発現させ HA 抗体によりクロマチン免疫沈降および次世代シーケンスによる結合部位の評価およびモチーフ解析を行った。

4.　MECOM スプライシング機構の解明

既報の手法を用いてミニジーンプラスミドにより *MECOM* に人為的な変異を導入し［3］、分岐部位やスプライシングエンハンサーの同定を行った。また先天性の MECOM 関連症候群の患者検体からスプライシング異常を誘導する

イントロン変異の探索を試みた。

結果および考察

1. SF3B1 変異は inv(3)/t(3;3)AML に最も多い遺伝子変異である

SF3B1 遺伝子変異は 63 例の inv(3)/t(3;3)AML のうち、17 例（27%）で検出され、最も高頻度に認められる体細胞変異であった（図 1）。このほかには、NRAS、PTPN11、KRAS 変異など、RAS－MAPK シグナル伝達経路を活性化する変異が続いて高頻度に検出された。*SF3B1* 遺伝子変異は MDS の一亜型（環状鉄芽球を有する MDS、MDS with RS）では 70%程度に認められるが、AML 全体では 5%以下と稀である。すなわち、inv(3)/t(3;3)AML に特にエンリッチしていることが示されたため、その協調機構が存在するものと考えられた。RNA-seq による解析では遺伝子発現の変化とスプライシングの変化の大部分は、それぞれ、inv(3)/t(3;3)と SF3B1 変異によって惹起されていた。

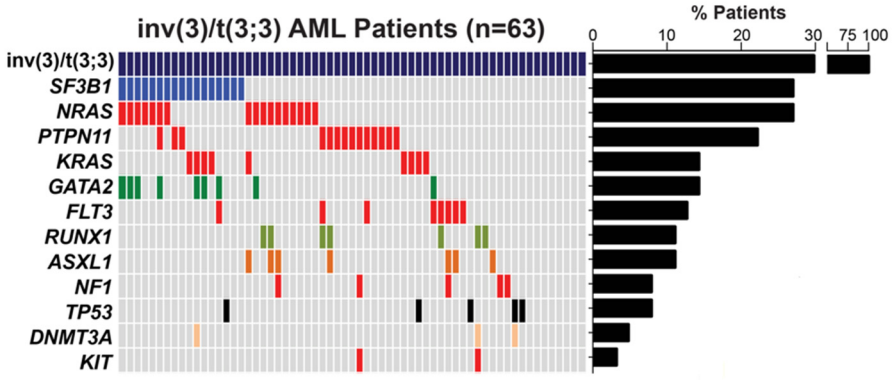


図 1. inv(3)/t(3;3)AML 患者における体細胞変異の解析結果
各遺伝子変異の患者あたりの重なり（左）と頻度（右）を示した。

2. SF3B1 変異は inv(3)と *in vivo* で協調的に形質転換を誘導し、MDS/AML を発症させる

Mx1-Cre; Sf3b1$^{K700E/WT}$ モデルと inv(3)トランスジェニックマウスを交配し、それぞれの骨髄細胞を 2×10^6 細胞ずつ、放射線照射（9.0 Gy）による前処置を施したレシピエントマウスに移植した。その結果、コントロール群と比較して明らかな myeloid skewing や B 細胞系への分化障害を認め、早期に MDS/AML を発症し、有意差をもって生存期間の短縮が確認された（図 2）。骨髄細胞内ではより多くの造血幹前駆細胞が認められ、形態的に未分化な骨髄細胞の増加や、脾臓への骨髄系細胞の浸潤が観察された。さらに、2 次移植においてもより早期に AML を発症させることから、腫瘍性造血幹細胞分画の増大や自己複製能の亢進が示唆された。

3. SF3B1 変異による新規 MECOM バリアントの発見とその機能評価

SF3B1 によるスプライシング変化のうち、驚くべきことに最も顕著に認められるものが *MECOM* 遺伝子そのもののスプライシング異常であった。MECOM の intron12 と exon13 間の 3'スプライス部位が 18 塩基 exon12 側に移動し、インフレームで 6 アミノ酸が挿入される新たなバリアントが SF3B1 変異を有する細胞にのみ確認された（図 3、4）。同部位は DNA 結合に重要な ZF2 ドメインであり、野生型と＋18 変異体を用いた ChIP-seq によりゲノムへの結合パターンが異なり、＋18 変異体ではより *HOX* 遺伝子の標的配列にエンリッチメントしていることを明らかとした（図 5）。

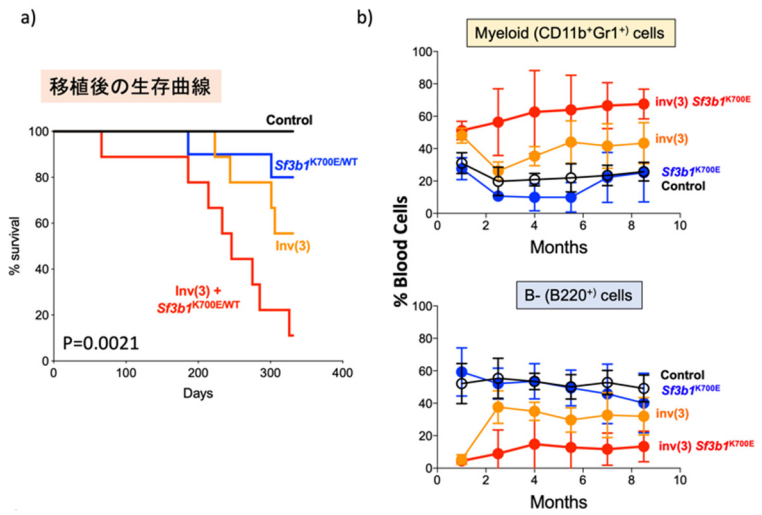


図 2. Mx1-Cre; Sf3b1$^{K700E/WT}$/inv(3)マウスを用いた移植実験

それぞれ、コントロール群、単独モデル、ダブルモデルの計 4 群で比較を行った。移植後の生存曲線（a）と末梢血中の有核細胞において Myeloid 系列および B 系列の細胞が占める割合（b）を示した。

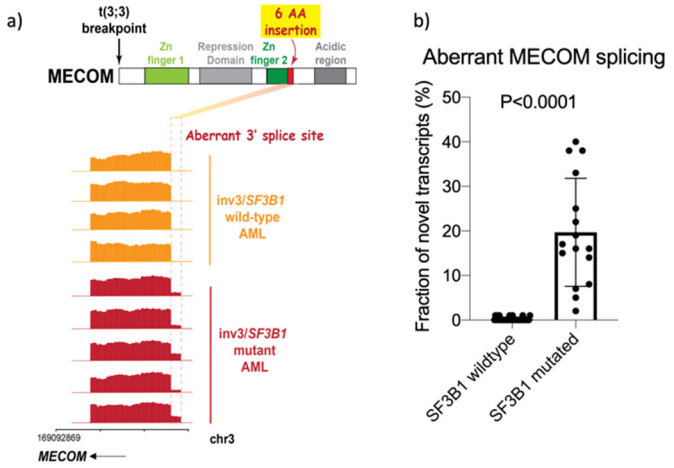


図 3. SF3B1 変異による MECOM のスプライシング異常

Zn2 domain における 6 アミノ酸の挿入が SF3B1 変異症例においてのみ認められることを RNA-seq の結果と合わせて提示した（a）。今回同定した新規バリアントの比率をプロット図として示した（b）（P<0.0001、Unpaired t test）。

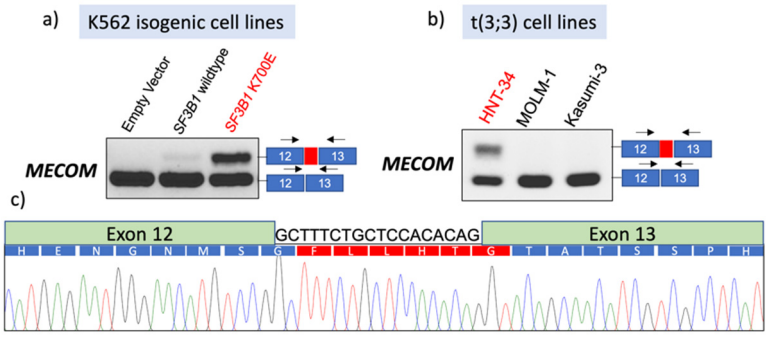


図 4. SF3B1 変異による exon12-exon13 間の 18 塩基の挿入

RT-PCR により SF3B1 変異を有する細胞（赤字）においてのみ新規バリアントが確認された（a, b）上側のバンドを抽出して Sanger 法により配列を確認し、インフレームであることを確認した（c）。

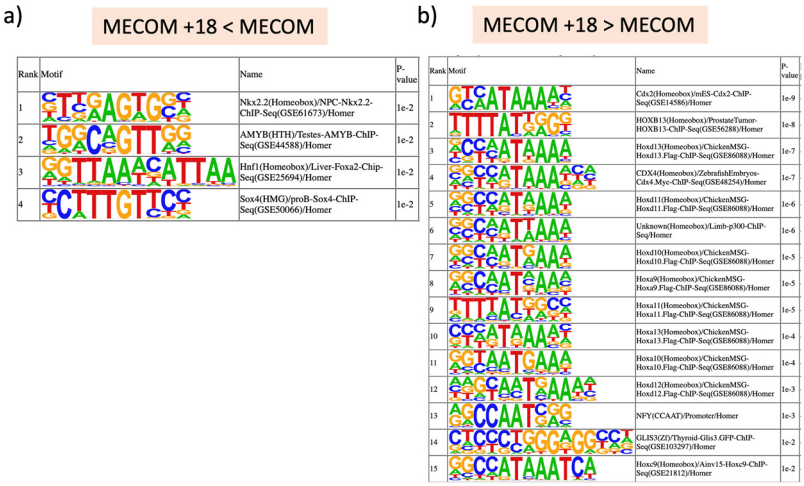


図 5. ChIP-seq におけるモチーフ解析

MECOM野生型、MECOM＋18（新規バリアント）を293Tに発現させChIP-seqにより結合部位を評価した。つづいて、両者で結合に差が認められる領域をHomer解析により結合モチーフの推測を行った。MECOM野生型と比較して新規バリアントの結合が弱い部位（a）と強い部位（b）での解析結果を示す。

4. SF3B1 変異体は通常とは異なる塩基を認識して MECOM のスプライシング異常を誘導する

exon12 から exon13 間のゲノム配列をサブクローニングしたミニジーンプラスミドを作製し、プラスミド上で MECOM に人為的な変異を多数導入することで、分岐部位やスプライシングエンハンサーの同定を行った。これにより、SF3B1 変異細胞では、通常とは異なる塩基を分岐部位として認識すること、また 18 塩基の中にはスプライシングエンハンサーが存在しており同部位を塩基置換するのみで異常なバリアントが消失することを明らかとした。また、先天性に胚細胞レベルで MECOM 変異が認められる患者の中に、我々が着眼している 3'スプライス部位が AG から AA に置換した重症例を認め、同患者では SF3B1 変異細胞と同じく 18 塩基がインフレームで挿入された新規バリアントが検出された。これらの知見は新しく同定されたアイソフォームが疾患の原因となることを強く示唆すると考えられる。

共同研究者・謝辞

Memorial Sloan Kettering Cancer Center の Omar Abdel-Wahab 医師に臨床検体の解析等においてご協力をいただきました。

文　献

1) Hinai AA, Valk PJ. Review: Aberrant EVI1 expression in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2016 Mar;172(6):870-8. Epub 2016 Jan 5. PMID: 26729571 DOI: 10.1111/bjh.13898.

2) Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, Yamamoto M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. Cancer Cell. 2014 Apr 14;25(4):415-27. Epub 2014 Apr 3. PMID: 24703906 DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.008.

3) Inoue D, Chew GL, Liu B, Michel BC, Pangallo J, D'Avino AR, Hitchman T, North K, Lee SC, Bitner L, Block A, Moore AR, Yoshimi A, Escobar-Hoyos L, Cho H, Penson A, Lu SX, Taylor J, Chen Y, Kadoch C, Abdel-Wahab O, Bradley RK. Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer. Nature. 2019 Oct;574(7778):432-436. Epub 2019 Oct 9. PMID: 31597964 DOI: 10.1038/s41586-019-1646-9.

4) Obeng EA, Chappell RJ, Seiler M, Chen MC, Campagna DR, Schmidt PJ, Schneider RK, Lord AM, Wang L, Gambe RG, McConkey ME, Ali AM, Raza A, Yu L, Buonamici S, Smith PG, Mullally A, Wu CJ, Fleming MD, Ebert BL. Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. Cancer Cell. 2016 Sep 12;30(3):404-417. PMID: 27622333 DOI: 10.1016/j.ccell.2016.08.006.