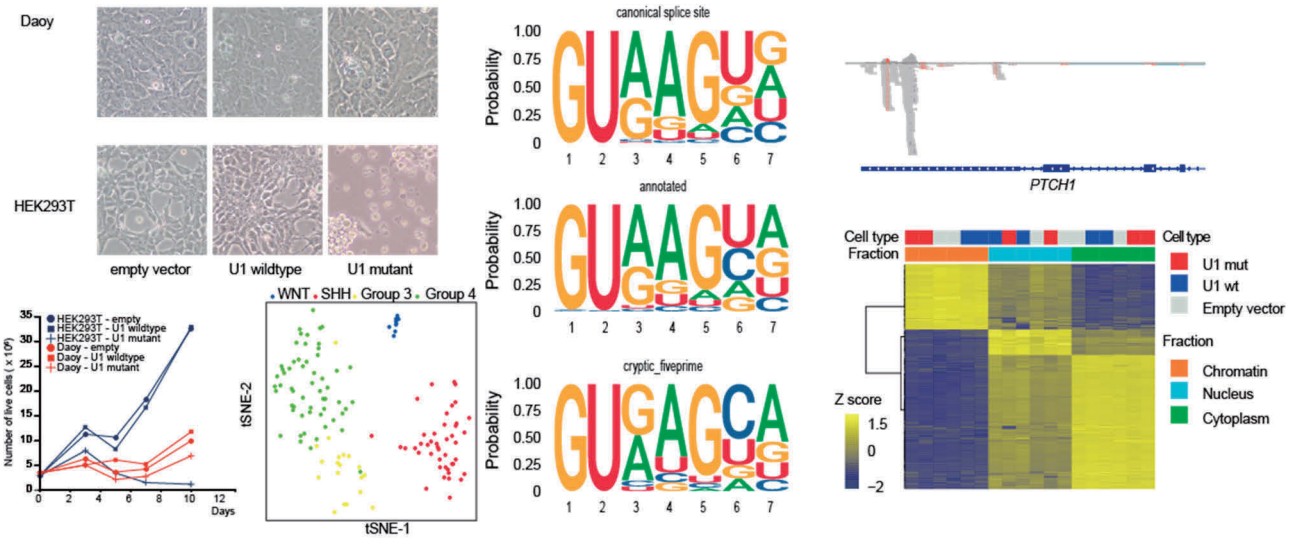
34　髄芽腫におけるスプライシング異常の解明	鈴木　啓道

【目的】髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く極めて悪性度の高い疾患である。これまでの研究で、ノンコーディング遺伝子である U1 small nuclear RNA（U1 snRNA）に変異が好発していることを発見した。U1 snRNA の主な機能はスプライスサイトの認識であり、変異が生じることにより髄芽腫細胞内ではスプライシング異常が生じていることがわかっていた。スプライシング異常は 1,000 を超える遺伝子に生じているが、有効な治療開発のための治療標的は病態の形成に不可欠なイベントを標的にする必要がある。そのため本研究では、病態の形成・維持に関与する重要な RNA スプライシング異常を同定し、具体的な治療開発につなげていくことを目的とする。

【方法】レンチウイルスベクターを用いて U1 snRNA 発現髄芽腫細胞株を作製した。日本小児がん研究グループのご協力を得て、髄芽腫 173 例に対し、アレル特異的な PCR と RNA-seq を用いて、U1 snRNA 変異の検出と髄芽腫サブグループ分類を行った。自験例 RNA-seq に加え、公開されているシークエンスデータ 221 例を用いてスプライシング異常解析を行った。また、2 例については一分子ロングリードシークエンスによる全長 RNA シークエンスデータを取得した。RNA 細胞内代謝プロセスの解明のため、ポリアデニル化領域が解析可能な 3′READS＋法の改良を行った。また、細胞内 RNA 局在を解析できる、subRNA-seq の手法を確立した。

【結果】変異型 U1 snRNA 発現細胞株は確立され、発現が確認された。173 例の臨床検体は髄芽腫の分子分類を行い、分子診断を確定し、以後の研究に使用した。スプライシング解析では 1,000 を超える遺伝子にスプライシング異常が同定された。公開データを用いた解析と比較すると、そのうちの約 30%は共通して認められていた。スプライシング異常の多くは影響がほとんどない passenger な異常であると考えらえる一方、共通の異常も生じていることからその中にドライバーイベントが存在すると考えられた。スプライシング異常はスプライスサイト配列解析の結果変異により生じていることが確認された。改良型 3′READS＋法を確立し、シークエンスリードの約 3 分の 1 がポリアデニル化領域を含んでいる効率的な濃縮が可能となり、ポリアデニル化領域の解析が可能となった。また subRNA-seq 手法の確立にて、細胞分画ごとの発現解析が可能となり、クロマチン領域では変異の導入にて 1,353 個の発現差異遺伝子が同定された。髄芽腫細胞内における RNA の代謝異常の解明が進み、今後解析を進めることでドライバーイベントの同定に繋げていく。

髄芽腫細胞株と臨床検体を使用したスプライシング異常の解析



34. 髄芽腫におけるスプライシング異常の解明

鈴木　啓道

国立がん研究センター 研究所 脳腫瘍連携研究分野

Key words：髄芽腫，U1 snRNA，スプライシング

緒　言

髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く極めて悪性度の高い疾患である。予後が非常に悪く、治療による永続的な障害も問題となっている。現在のところ、日常診療で使用可能な有効な分子標的薬は存在せず、新規の治療開発が強く望まれているが、標的となりうる遺伝子異常が乏しくその開発は不十分である。髄芽腫に対する新規の治療標的を同定するため髄芽腫の全ゲノムデータの再解析を行い、ノンコーディング遺伝子である U1 small nuclear RNA（U1 snRNA）に変異が好発していることを発見した［1，2］。U1 snRNA はゲノム内に複数存在するため解析が困難でありそれまで見逃されていた。U1 snRNA 変異は髄芽腫で最も頻度が高い異常であり、SHH 型髄芽腫の約半数に認められ、予後不良因子であることが明らかとなった。U1 snRNA の主な機能はスプライスサイトの認識だが、変異がスプライスサイトの認識を行う配列内に存在することにより、広汎な異常スプライシングを引き起こしていることを明らかにした。

U1 snRNA 変異は新規の治療開発に大きな期待がもてる。変異により生じる細胞内の異常スプライシングは他の正常細胞内で存在しないため選択毒性が高い薬剤開発が期待できる。また、U1 snRNA 変異は無数の異常タンパク質の生成を誘導するため、複数の標的を対象とすることが可能と考えられる。腫瘍細胞が標的の全てに抵抗性を獲得するのは難しいと考えられ長期的に有効な効果も期待できる。

U1 snRNA 変異型髄芽腫の細胞内でスプライシング異常は 1,000 以上の遺伝子に生じているが、実際に腫瘍の病態に関与しているのはそのうちの一部であることが予想され、残りは病態に関与しない副次的なイベントと考えられる。有効な治療開発のための治療標的は病態の形成に不可欠なイベントに設定する必要があるため、病態の形成・維持に関与する重要な異常スプライシングイベントの同定を行うことが、具体的な治療開発にむけて必要である。

従って本研究課題では、髄芽腫に生じているスプライシングを含めた RNA の異常を完全に解明することを目的とする。

方　法

1. 変異型 U1 snRNA 発現細胞株と髄芽腫検体の収集および分子分類の解析

変異型 U1 snRNA を有する細胞株はこれまでのところ樹立されていない。そのため、変異型 U1 snRNA を発現する細胞株を確立した。レンチウイルスベクターに U1 snRNA のプロモーター領域と下流の 3′end box 領域を含んだ配列をクローニングして組み込み、SHH 型髄芽腫の細胞株である Daoy および ONS76 に感染させることで、野生型および変異型 U1 snRNA を発現する細胞株を確立した。

髄芽腫症例は日本小児がん研究グループ（JCCG）のご協力を得て、合計 173 例の DNA/RNA の収集を行った。RNA-seq を行い、髄芽腫のサブグループの同定を行った。U1 snRNA 変異の状態を調べるため、rhAmp SNP ジェノタイピングシステムを使用したアレル特異的 PCR 法にて変異の有無を確認した。U1 snRNA のプロモーター領域は一塩基多型が多く存在する。そのため、公開されている 341 例の髄芽腫全ゲノムシークエンスデータを用いて、U1 snRNA 上流領域の一塩基多型の頻度を調べ、多様性が少ない領域にプローブを設計して、変異検出を行った。

2. RNA シークエンスを用いた髄芽腫におけるスプライシング解析

RNA-seq データの解析を行った。STAR aligner を用いて、マッピングをしたあと、leafcutter アルゴリズムを用いて、スプライシング異常解析を行った。また、結果の検証のために、公開されている髄芽腫の RNA-seq データ 221 例を入手し、同様の解析を行った。

全長スプライシング解析のため、一分子ロングリードシークエンスによる全長 RNA シークエンス解析の検討を行った。U1 snRNA 野生型および変異型の SHH 型髄芽腫それぞれ 1 例に対して、Nanopore シークエンサーを用いて、direct RNA-seq を行ってデータを取得した。

3. 細胞内 RNA プロセッシングの解析手法の確立

近年、U1 snRNA がスプライスサイトの認識以外にも RNA の細胞内プロセスに関連する様々な働きをしていることが報告されてきた［3, 4］。そのため、U1 変異型髄芽腫の病態の解明に向けてスプライシング以外の細胞内 RNA プロセスの解析も進めていく必要があると考えられた。そのため、様々な RNA プロセスの解析に特化した解析手法の確立を行った。

異常ポリアデニル化部位の解析のため、3′-seq の確立を行った。Mayr 法との 3′READS＋法を行った。しかし、Mayr 法ではライブラリー作製が不安定であり、安定したライブラリー構築が困難であった。そのため、3′READS＋法は改良しライブラリー構築を行い、細胞株から抽出した RNA を使用しシークエンスを行った。

細胞内 RNA 局在を解明するために、subRNA-seq の手法の確立を行った。確立した細胞株を用いて、細胞質・核・クロマチン領域に分画を行いそれぞれタンパク質と RNA を抽出した。GAPDH、snRNP70、H3 抗体でウエスタンブロッティングを行うことにより、適切な分画が得られているか確認を行った。抽出した RNA は rRNA depletion 法を用いて RNA-seq ライブラリーを構築しシークエンスを行った。

結果および考察

1. 変異型 U1 snRNA 発現細胞株と髄芽腫検体の収集および分子分類の解析

作製した野生型 U1 snRNA および変異型 U1 snRNA 発現ベクターをそれぞれ、Daoy および ONS76 細胞に感染させた。48 時間培養したあと、細胞を採取し RNA を抽出した。5′RACE 法を用いて U1 snRNA の発現解析を行った。変異型 U1 snRNA ベクターを導入した細胞株では U1 snRNA の 3 番目の塩基に C の波形が確認でき、変異型 U1 snRNA が発現していると考えられた（図 1a）。U1 snRNA はヒトリファレンスゲノム GRCh38 では少なくとも 8 コピーは存在していることから、発現量としては妥当な割合で発現していると判断された。また、ベクター感染後の増殖能を観察すると、Daoy と ONS76 の SHH 髄芽腫細胞株では、増殖率に大きな変化はなかったが、HEK293T においては変異型 U1 snRNA を発現させると、増殖能の低下が得られ最終的にすべて死滅した（図 1b）。このことからも、細胞内のスプライシング変化は一般的には細胞にとって有害であり、特徴的な発現パターンを呈している細胞にのみベネフィットを得ることが示唆された。

ヒト髄芽腫検体に関しては JCCG より合計 173 例の症例のご提供を受けた。RNA-seq および Nanostring 法による髄芽腫サブグループの解析により各症例のサブグループの同定を行った（図 1c）。既報の報告と比較すると各サブグループの割合は大きな違いはない一方、U1 mutant SHH の症例がかなり少なかった。これは JCCG に登録されている症例は原則小児の脳腫瘍症例であり、U1 mutant SHH 髄芽腫は思春期から成人期にかけても発症する疾患であるため、これまでの報告より割合が低い結果となったと考えられる。変異の検出は rhAmp SNP ジェノタイピングシステムを用いて行った。プロモーター領域の一塩基多型の解析の結果、U1 snRNA の発現調整部位と推測されている element A 及び B においては一塩基多型の頻度が低く、この領域にプローブを設計した。その結果、U1 snRNA 変異型腫瘍と野生型腫瘍を明瞭に判定が可能であった（図 1d）。RNA-seq の発現解析によっても、4 つのサブグループの分類が可能であった。RNA-seq、Nanostring、U1 snRNA 変異解析により、分子サブグループの同定が完了し、以後の解析に使用した。

安定的な分子分類が可能となっており、以後の実験に分子分類に基づいて症例選択が可能である。一方で、予想されたほど U1 snRNA 変異型髄芽腫検体が含まれておらず、検体収集は引き続き継続していく。

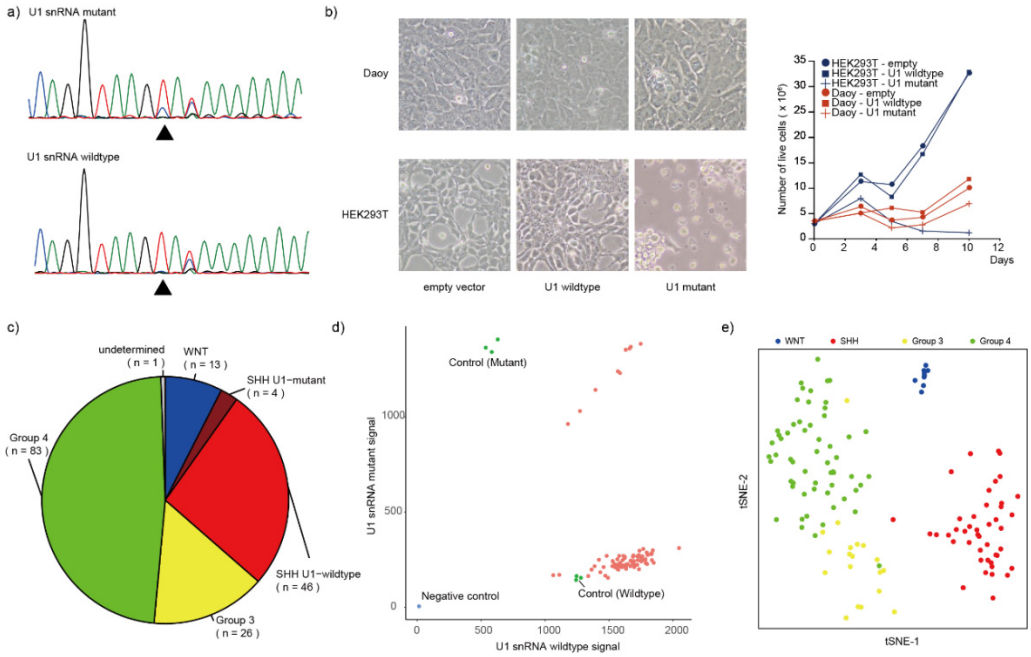


図 1. 変異型 U1 snRNA 発現細胞株の作製と髄芽腫コホートの解析

a) 野生型および変異型 U1 snRNA 発現ウイルスベクターを感染させた Daoy 細胞株に対する 5′RACE 法を用いた U1 snRNA の解析。▲印は U1 snRNA の 3 番目の塩基であり、変異のホットスポット部位を示す。3 番目の塩基に C の青色波形が確認できる。相補鎖を読んでいるため、目的としている g.3A>G の変異が導入された U1 snRNA が発現していることが確認できる。

b) 感染後の細胞の形態と増殖。変異型 U1 snRNA を導入した HEK293T 細胞株においては増殖能が著しく低下する。

c) 本髄芽腫コホートにおける髄芽腫サブグループ分類の結果。

d) rhAmp SNP ジェノタイピングシステムによる U1 snRNA 変異の検出。ピンクの丸が各症例。1 症例につき複数回検証している。

e) RNA-seq 解析による遺伝子発現による分類。プロットの点は各症例で、色はサブグループを示す。

2. RNA シークエンスを用いた髄芽腫におけるスプライシング解析

これまで、139 症例に対して RNA-seq の解析を完了した。U1 snRNA 変異型 SHH 髄芽腫 4 例と U1 snRNA 野生型 SHH 髄芽腫 44 例に対し、leafcutter アルゴリズムを用いたスプライシング異常解析を行った。予想されたように、U1 snRNA 変異型 SHH 髄芽腫では、データベースに登録されていない異常なスプライシング（cryptic splicing）が亢進しており、相対的にデータベースに登録のあるスプライシングは減少していた。各スプライシングサイトにおいて、異常スプライシングは約 10〜20%の RNA に生じていた。U1 snRNA はヒトゲノム内に複数存在しているが、変異はそのうちの一つのアレルに生じているため、変異によりわずかにスプライシングが変化している結果であった。異常スプライスサイトはこれまでの結果と同様で、変異アレルであるグアニン（G）と相補的に結合するウラシル（U）が優位となっていた。

公開されている SHH 髄芽腫の RNA-seq221 例に対しても同様の解析を行った。同様に U1 snRNA 変異型 SHH 髄芽腫では異常スプライシングが亢進していることが認められた。自験例と公開データと比較すると、自験例で同定されたスプライシングイベントの約 3 分の 1 がオーバーラップしていた。公開データを用いたコホートのほうが、症例数が多いため、同定イベント数は増えることになる。それでも、一定量の共通イベントしか検出されないことから、生じている alternative splicing イベントのほとんどは大きな影響を及ぼさない passenger なイベントであると推測された。一方で、共通で検出されるイベントに関しては driver として機能しており、腫瘍の形成・維持に必要なイベントが含まれていると考えられる。

U1 snRNA は細胞内で恒常的に発現している non-coding RNA であり、複数のゲノム内のコピーのうちの一つが変異していることから、各々のスプライシングに関する影響は小さい。U1 snRNA 変異によるスプライシング変化は、造血器腫瘍における *SF3B1* などのスプライシング因子の変異に比べて percent spliced in が小さい。U1 snRNA のゲノム内コピー数は個人間での多様性があるデータが得られており、5′RACE 法による amplicon sequence で変異型の発現量の比較も進めている。また、さらに高感度にスプライシング異常を同定するために、一分子ロングリードシークエサーを用いて direct RNA を行っている。2 症例からデータを取得しており、シークエンス条件を評価・検討し症例数を増やして解析を行う予定である。

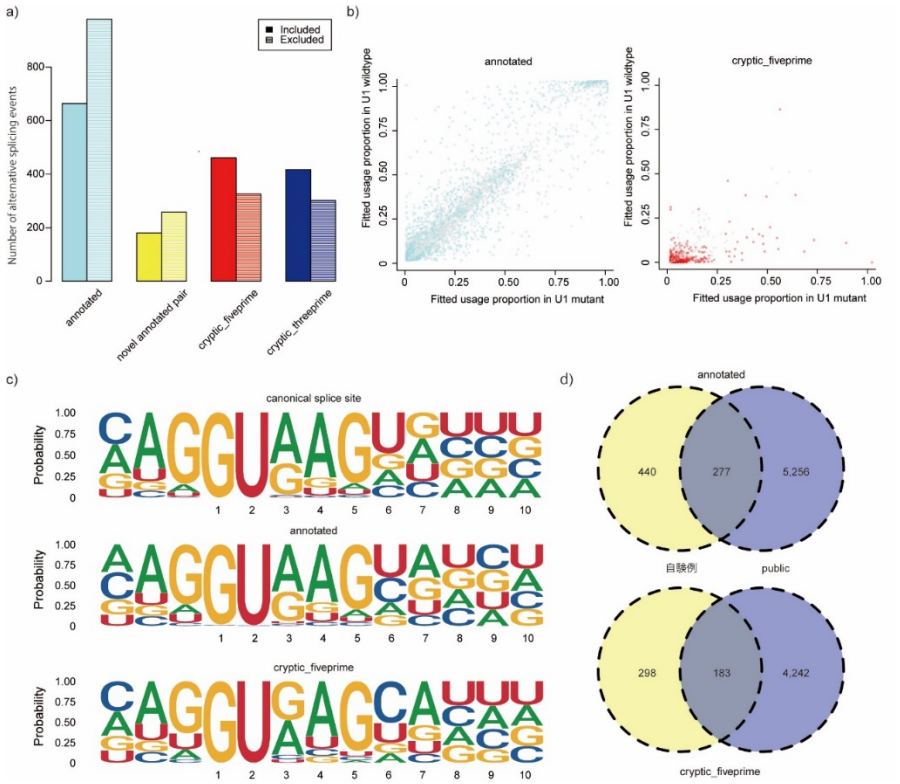


図 2. スプライシング異常解析の結果

a) U1 snRNA 変異型 SHH 髄芽腫 (n＝4) と U1 snRNA 野生型 SHH 髄芽腫 (n＝44) における alternative splicing イベントの数。

b) 同定された alternative splicing event における percent spliced in の比較。

c) 同定されたスプライシングイベントにおける 5′スプライスサイトの配列。

d) 自験例と公開データのそれぞれのコホートにおける同定イベント数と重複。

3. 細胞内 RNA プロセッシングの解析手法の確立

Mayr 法との 3′READS＋法を行ったが、改良した 3′READS＋法にてポリアデニル化領域の濃縮が可能であった。3′ READS＋従来法では、Oligo(dT)ビーズで選択した RNA を先に目的のサイズに断片化した上で、断片化 RNA に対してアダプター配列を結合させ、最後に逆転写反応と PCR により DNA ライブラリーを作製する。RNA の断片化の際に使用する酵素が販売終了となっているため、94℃の加熱処理により断片化を行い、目的のサイズとなる条件を確立した。また、アダプター配列結合過程が煩雑で結合の成功率が低く、またシングルエンドシークエンスにしか対応していないことから、本法の鍵となる RNA の 3′末端を濃縮した RNA フラグメントは従来法に準じて作製した上で、アダプター配列の結合は既存の RNA ライブラリキット（NEBNext® Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina）を用いて効率的に良好なライブラリーを得ることに成功した。構築したライブラリーを用いてシークエンスを行ったところ、ポリアデニル化起始部をカバーした配列が全体の 0.32 と濃縮が認められ、IGV 上でもポリアデニル化領域が確認できた（図 3a）。

RNA 局在解析のための subRNA-seq 手法を確立した。抗体染色の結果、各分画が濃縮されているのが確認できた。シークエンスを行い、遺伝子発現に基づいたクラスタリングを行うと細胞分画毎で異なった遺伝子プロファイルを示していることが確認された（図 3b）。U1 snRNA 変異の導入により、クロマチン領域で 1,353 個の遺伝子発現が変化していることが確認された（図 3c）。

U1 snRNA が様々な RNA 代謝に関与することが報告されてきたが、通常の RNA-seq では評価が困難である。ポリアデニル化領域と細胞内局在を解析する手法は確立されたため、今後臨床検体を使用した解析を進めていく。U1 snRNA 変異を導入することで、ポリアデニル化領域・RNA の細胞内局在が変化することが確認された。一方で、U1 snRNA 変異はスプライシング異常にて、細胞内の発現パターンを変えてしまうため、U1 snRNA 変異がダイレクトに引き起こした異常を調べていく必要がある。U1 snRNA は RNA と base pairing を行いながら機能するため、同定されたイベントの配列解析などを行い、driver イベントを同定していく必要があると考える。

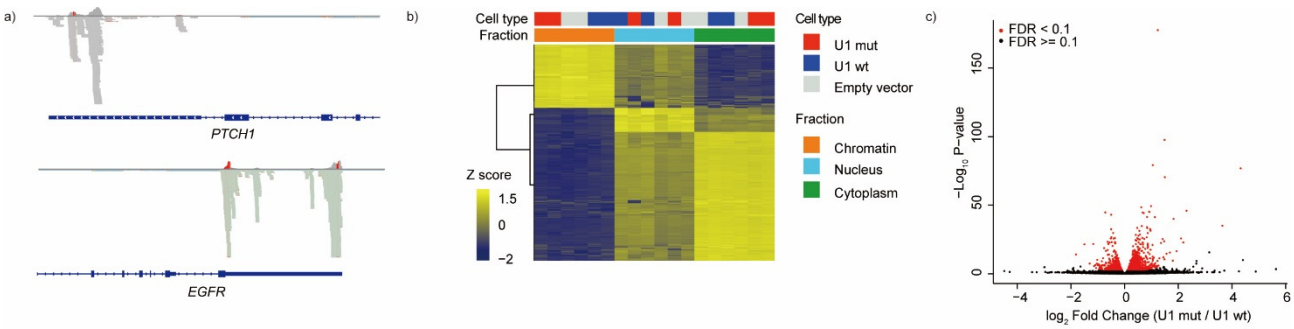


図 3. 細胞内 RNA プロセッシング解析の結果

a) 改良 3′READ＋法によるポリアデニル化領域の濃縮。*PTCH1* と *EGFR* 遺伝子領域を例示している。

b) subRNA-seq による発現クラスタリング解析の結果。

c) クロマチン領域に局在する遺伝子差異解析。

共同研究者・謝辞

本研究においては、日本小児がん研究グループからの検体提供を含めて多大なご支援をいただいた。

文　献

1) Suzuki H, Kumar SA, Shuai S, Diaz-Navarro A, Gutierrez-Fernandez A, De Antonellis P, et al. Recurrent noncoding U1 snRNA mutations drive cryptic splicing in SHH medulloblastoma. Nature. 2019;574(7780):707-11. doi: 10.1038/s41586-019-1650-0. PubMed PMID: 31664194; PubMed Central PMCID: PMCPMC7141958.

2) Shuai S, Suzuki H, Diaz-Navarro A, Nadeu F, Kumar SA, Gutierrez-Fernandez A, et al. The U1 spliceosomal RNA is recurrently mutated in multiple cancers. Nature. 2019. doi: 10.1038/s41586-019-1651-z. PubMed PMID: 31597163.

3) Yin Y, Lu JY, Zhang X, Shao W, Xu Y, Li P, et al. U1 snRNP regulates chromatin retention of noncoding RNAs. Nature. 2020. doi: 10.1038/s41586-020-2105-3.

4) Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, et al. U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. Nature. 2010;468(7324):664-8. doi: 10.1038/nature09479. PubMed PMID: 20881964; PubMed Central PMCID: PMC2996489.