

論文の内容の要旨

論文題目 造血幹・前駆細胞における ASXL1 変異による核内構造体形成異常の解析

氏名 山本 圭太

悪性腫瘍は数ある疾患の中でも死因の上位に位置し、それを克服するための研究が日夜世界中で行われている。白血病は血液の悪性腫瘍である。造血システムの頂点に存在する造血幹・前駆細胞 (HSPCs) が変異し、無秩序な増殖・正常造血の障害を引き起こすことが白血病の病態と考えられる。白血病細胞では様々な遺伝子変異が認められ発がんの誘因となっていることが知られている。我々の研究室では白血病発症のメカニズムを解き明かすことを目的とし、原因遺伝子の一つとして考えられている ASXL1 (Additional Sex Combs Like 1) について研究を行っている。

正常細胞が腫瘍化するまでには段階的な経緯が存在し、様々な固形がんや正常細胞と腫瘍細胞の間に位置する前腫瘍性病変の存在が知られている。近年、血液細胞でもクローン性造血 (CH : Clonal hematopoiesis) と呼ばれる前腫瘍性状態が存在することが明らかになり、注目を集めている。CH ではある一つの造血幹細胞が遺伝子変異により増殖優位性を獲得した状態となり、自己複製能と多分化能を保持して正常な造血に携わりながらもクローン性に増加していく。健常者の一部に CH を有する集団が存在することが分かり、急性骨髄性白血病 (AML : Acute myeloid leukemia) や骨髄異形成症候群 (MDS : Myelodysplastic syndrome) に進展するリスクとなることから、CH は血液における前腫瘍性状態にあると考えられている。

CH で変異が見られる遺伝子の一つである ASXL1 は、ヒストン修飾因子でありヒストン H3 4 番リジンのトリメチル化 (H3K4me3)、ヒストン H3 27 番リジンのトリメチル化 (H3K27me3)、モノユビキチン化されたヒストン H2A 119 番リジン (H2AK119Ub) を脱ユビキチン化することで遺伝子発現を制御する。造血器腫瘍患者における ASXL1 変異の多くはラストエクソンに集中し、フレームシフト変異を起こして C 末端を欠損した ASXL1 タンパク質 (ASXL1-MT) が生じると考えられている。我々の研究室では ASXL1-MT が造血器腫瘍発生に寄与するメカニズムについて研究を行ってきた。生理的な条件下で ASXL1-MT が造血に与える影響を評価するため、ヒト ASXL1 E635Rfsx15 変異を Rosa26 遺伝子座に挿入した変異型 ASXL1 コンディショナルノックイン (ASXL1-MT cKI) マウスを作製し、Vav-Cre トランスジェニックマウスと交配して造血細胞特異的に ASXL1-MT を発現するマウスを作成した。本マウスは加齢に伴い貧血、血小板増加、および骨髄球系細胞への分化シフトを認め、単独では造血器腫瘍の発症には至らないものの、追加の変異を獲得することにより白血病化することなどから、CH の病態に近いモデルマウスであることが示された。私はこの ASXL1-MT cKI マウスを用いて、ASXL1 変異が白血病発症に寄与する新たなメカニズムの解明を試みた。

近年、液-液相分離 (LLPS : liquid-liquid phase separation) という現象によって細胞内に形成される膜の無い構造体 (Membraneless Organelle) に注目が集まっている。LLPS とは水と油が分離するように異なる組成の水溶液同士が互いに分離して集合する性質であり、細胞内でタンパク質が特定の領域に集まって効率的に機能したり、反対に望ましくない領域で働かないように隔離したりする際に LLPS が働くことが明らかになってきている。パラスペックルは LLPS により形成される核内構造体で、同じく核内の Membraneless Organelle である核スペックル (Nuclear Speckle) とともに核質のクロマチン間に存在する。パラスペックル・核スペックルともに、mRNA のスプライシングや核内への retention、転写調整など RNA 制御全般に関与するとされているが、その機能の詳細については明らかになっていない。

パラスペックルの構成因子には、RNA 結合タンパク質 (RBP : RNA binding protein) の NONO (Non-POU domain-containing octamer-binding protein)、SFPQ (Splicing factor, proline- and glutamine-rich) および長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA : long non-coding RNA) の NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) がある。血液細胞におけるパラスペックルの機能は殆ど知られていないが、NONO や SFPQ が体組織の中でも造血器細胞特異的に高く発現していること、NEAT1 の発現量が造血器細胞の分化段階によりダイナミックに変化することなどから、分化・増殖過程で重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、NONO、SFPQ は DNA ダメージや修復機構に密接に関与しており、多くの悪性腫瘍で NEAT1 の発現量上昇していることなどから、発がんメカニズムにおいてもパラスペックルは重要な役割を果たすと考えられている。

私は本研究内で ASXL1 がパラスペックル形成に関与することを見出し、ASXL1-MTcKI マウスを用いて CH モデルの造血幹細胞でパラスペックル形成障害が見られることを明らかにした。

我々は過去に報告された複数のインタラクトーム解析の結果を見直し、ASXL1 が mRNA 調節に幅広く関与する RBP の NONO と結合しうることを見出した。HEK293T 細胞を用いた遺伝子導入と共免疫沈降 (Co-IP : co-immunoprecipitation) 実験により、野生型および変異型 ASXL1 が NONO と結合することを確認した。この結合は RNase 処理条件下でも認められ、タンパク質同士の直接的な結合であることが示された。ASXL1 はもう一つのパラスペックル因子である SFPQ とも結合した。Co-IP 実験および RNA IP 実験により、野生型 ASXL1 の共発現で NONO とヒストンタンパク質、NEAT1 の結合が増強されることが明らかになった。これらの NONO の機能亢進は野生型 ASXL1 によってのみ認められ、変異型 ASXL1 では認められなかった。

ASXL1 がパラスペックル構成因子と結合することを確認した我々は、続いて変異型 ASXL1 がトランスクリプトームに及ぼす影響について検討するため、ASXL1-MTcKI マウスの HSPCs を用いて RNA deep sequencing を行った。シーケンスデータからスプライ

シングの変化を解析したところ、ASXL1-MTcKI マウスの HSPCs では ES (Exons skipping) を中心とする 1033 の AS (Alternative splicing) が認められ、GGNG の配列を持つ Exon が特異的に include され、CCNG の配列を持つ Exon が skipping を受けていることが明らかになった。

続いて我々は、ASXL1 と NEAT1 との関係性についても検討した。Actinomycin D を用いた転写抑制実験で、野生型 ASXL1 の発現により NEAT1 の degradation が抑制されていることが明らかになった。一方で変異型 ASXL1 を導入した細胞においては NEAT1 の degradation は亢進していた。細胞分画抽出による RNA の発現解析では、野生型 ASXL1 が核内特異的に NEAT1 の発現量を上昇させており、ASXL1 は細胞内での NEAT1 の安定性に関係し、変異により NEAT1 安定化能を失っていることが明らかになった。

ASXL1 変異がパラスペックルに与える影響を明らかにするために、我々は ASXL1-MTcKI マウス HSPCs における Nono の評価を行った。ASXL1-MTcKI マウス HSPCs の免疫染色実験では、本来核内に局在するはずの Nono のシグナルが細胞質に見られる細胞が認められ、ウエスタンブロットでも ASXL1-MTcKI マウスでは核抽出サンプルにおいて Nono のバンドが減弱し、細胞質抽出サンプルにおいてバンドが増強していることが確認された。これらの結果から ASXL1-MTcKI マウスで Nono の局在が変化していることが示唆された。興味深いことに ASXL1-MTcKI マウス HSPCs では Neat1v1 の発現が軽度上昇しているのに対して、パラスペックル形成に必須と考えられる Neat1v2 の発現が優位に低下していることが分かった。RNA-FISH では、ASXL1-MTcKI マウスの HSPCs で Nono と Neat1v2 の共局在シグナルによって示されるパラスペックルの形成が低下していた。また、ASXL1-MTcKI マウスの RNAseq 発現データを用いて NEAT1 標的遺伝子の発現レベルを評価したところ、その大部分が低下していることが確認された。

ASXL1-MTcKI マウスでパラスペックルの形成に障害が生じていることを見出した我々は、次にパラスペックルの破綻が ASXL1-MTcKI マウスの表現型に及ぼす影響を評価するため、CRISPR-Cas9 システムを用いたノックアウト実験を行った。Rosa26 遺伝子座に Cas9 遺伝子を組み込んだ Rosa26-LSL-Cas9-KI マウス (Cas9KI マウス) と ASXL1-MTcKI マウスを交配して作成した交配第一世代マウス (F1 マウス) の HSPCs を用いて Nono をノックアウトした造血幹細胞の移植実験を行った。移植後 1 か月後の造血再構築能を評価したところ、Nono をノックアウトした分画に限ってキメリズムの上昇が認められた。この結果から我々は、ASXL1-MTcKI マウスの造血細胞ではパラスペックルの破綻により局在を変えた Nono が何らかの機能を獲得し、造血再構築能障害に影響している、という仮説を立てた。この仮説を立証するため、我々は NLS (Nuclear localization signal) を欠損した NONO 変異体 (NONO- Δ NLS) を作成し、細胞質における NONO の機能を評価した。Kusabira Orange マウス (KuO マウス) の HSPCs にレトロウイルスベクターを用いて NONO- Δ NLS を遺伝子導入し、競合的移植実験を行ったところ、

NONO- Δ NLS を導入したドナー細胞ではキメリズムの低下することが認められ、ROS (Reactive oxygen species) が上昇していた。これらの結果は、ASXL1-MTeKI マウスの競合的移植実験で見られた骨髄再構築能障害および ROS の上昇と一致するものであり、本来の局在とは異なる NONO- Δ NLS が ASXL1-MTeKI マウスと同様の造血再構築能障害を呈することが明らかになった。

本研究は、ASXL1 がパラスペックル形成に関与することを初めて示したものであり、その変異により核内構造体の形成が障害されることが明らかになった。造血器腫瘍における遺伝子変異がパラスペックルをはじめとする Membraneless Organelle に及ぼす影響については全く知られておらず、病態解明の新たな糸口となる可能性がある。