

博士論文

論文題目 Frequent pathway mutations of splicing machinery
in myelodysplasia

(骨髓異形成症候群で高頻度にみられる
RNA スプライシング関係遺伝子変異)

氏名 吉田 健一

要旨

骨髄異形成症候群（MDS）の分子メカニズムとしては従来からいくつかの遺伝子変異や染色体異常が報告されていたが、それらの多くは他の骨髄性腫瘍でもみられ、MDS に特徴的な異常は少なかった。29 症例の MDS および関連疾患の全エクソンシーケンスを行うことにより、MDS では *SF3B1*、*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かつ特異的にみられることを見出した。同定された RNA スプライシング因子の変異は変異例において排他的にみられていて、多くの遺伝子が 3' スプライス部位の認識に関わる遺伝子であることから、共通のメカニズムで MDS の発症に寄与していると考えられた。

序文

骨髄異形成症候群

骨髄異形成症候群（Myelodysplastic syndromes、MDS）は血球産生と分化の異常による血球減少と、急性骨髄性白血病（Acute myeloid leukemia、AML）への移行を特徴とする腫瘍性疾患である¹。MDS の患者数は正確には把握されていないものの、米国では年間に 1 万人以上が罹患すると推定されている²。現時点での治癒の期待できる唯一の治療は造血幹細胞移植であるが、患者の多くが高齢者であり副作用の観点からその適応は限られており、予後は不良である。したがって、MDS の治療成績向上のためには、MDS 発症に関わる遺伝子異常を明らかにし、分子標的を同定することや、より正確に予後を予測して治療を選択することが必要である。

WHO 分類³における MDS の定義の主要な要素の一つがクローナルな造血であるが、MDS 発症には未熟な造血幹細胞が体細胞変異を獲得して優位性を獲得し、最初は局所的にクローンを形成し、やがて骨髄全体で優位性を獲得して循環している成熟した細胞もほとんどがクローン造血由来のものになるという過程をとると考えられている¹。一方、MDS のもうひとつの特徴として、少なくとも低リスク MDS では造血幹細胞でアポトーシスが増加していると考えられており、骨髄内で未熟な赤芽球や顆粒球、単球、巨核球にアポトーシスが起

こり、汎血球減少をきたすと考えられる。したがって、MDS 発症には造血幹細胞において機能獲得をもたらす遺伝子異常に加えて、造血前駆細胞の機能喪失をきたすような遺伝子異常も必要だと考えられている¹。

従来から MDS においてはいくつかの遺伝子の変異や染色体異常が報告されてきたが、これまで MDS において報告されていた遺伝子変異 (*RAS*⁴、*TP53*⁵、*RUNX1*^{6,7}、*ASXL1*⁸、*c-CBL*⁹⁻¹¹、*DNMT3A*¹²、*IDH1/2*¹³、*TET2*^{14,15}、*EHZ2*^{16,17} など) や染色体異常の多くは MDS とは形態学的にあるいは臨床的に異なった特徴を有する骨髄性腫瘍である AML や骨髄増殖性腫瘍 (Myeloproliferative neoplasms、MPN) などの MDS 以外の骨髄性腫瘍 (表 1) でも同程度あるいはより高頻度にみられており、MDS に特徴的な遺伝子変異は少なく¹⁸、MDS の特徴的な病態を説明する遺伝子異常は同定されていなかった。また、20%程度の MDS 症例では従来の方法ではまったく遺伝学的な異常を検出できていなかったため¹¹、MDS の原因となっている遺伝子異常の理解は十分ではないと考えられていた。

表 1 WHO 分類³による骨髓性腫瘍の分類

骨髓異形成症候群 (MDS)
単血球系異形成を伴う不応性血球減少 (RCUD)
鉄芽球性不応性貧血 (RARS)
複数血球系異形成を伴う不応性血球減少 (RCMD)
芽球増化を伴う不応性貧血 (RAEB)
5q-症候群
分類不能方骨髓異形成症候群 (MDS-U)
骨髓増殖性腫瘍 (MPN)
慢性骨髓性白血病 (CML)
慢性好中球性白血病 (CNL)
真性赤血球増加症 (PV)
原発性骨髓線維症 (PMF)
本態性血小板血症 (ET)
慢性好酸球白血病 (CEL)
肥満細胞症 (mastocytosis)
骨髓異形成/骨髓増殖性腫瘍 (MDS/MPN)
慢性骨髓単球性白血病 (CMML)
非定型性慢性骨髓性白血病、BCR-ABL1陰性 (aCML)
若年性骨髓単球性白血病 (JMML)
著明な血小板増加を伴い環状鉄芽球を有する不応性貧血 (RARS-T)
急性骨髓性白血病 (AML)
芽球の形態や遺伝学的情報により様々なサブタイプにわけられる

次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析

がんは遺伝子異常が蓄積することにより生じるが¹⁹、がんの生物学的理解、診断技術の向上や標的治療の開発のためにはがんにおける点変異、コピー数異常、構造異常などの様々なゲノム異常の解析が必要である。我々のゲノムはハプロイドあたり約 30 億塩基からなっており、2 万 4 千～5 千種類のタンパクコ

ード遺伝子を持っている。これらの塩基配列のすべてを決定するためのヒトゲノムプロジェクトにより、2001年に初めてヒトゲノムが解読された²⁰。これによりヒトリファレンスゲノム配列が得られ、がんにおけるゲノム変異、遺伝性疾患の発症責任遺伝子などの解析が加速している。

また、従来のシーケンス技術では一人のゲノムの解読に13年もの年月がかかっていたが、近年の次世代シーケンス技術の発達により現在ではヒトゲノムを最短1日で解読できるようになった。次世代シーケンサーの技術は、断片化したDNA（リード）を数十億本も同時に並行して読む方法をとっており、この技術は大量並列シーケンス技術（massively parallel sequencing）と呼ばれる²¹⁻²⁴。これにより従来のキャピラリーシーケンサーに比べて1回の解析で100万倍以上もの大量の塩基情報を得ることができるようになった。次世代シーケンサーを使用したゲノム解析には主に全ゲノムシーケンスと全エクソンシーケンスに代表される全ゲノムのうちの一部の領域のみを解析するターゲットゲノムシーケンスがある。全エクソンシーケンスはヒトゲノムの約1.3%のみを占めるタンパクをコードする領域のみに解析対象を絞る方法である。遺伝子再構成やnon-coding領域の解析は難しいが、ヒトの疾患の原因となる遺伝子異常の約85%はコーディング領域にあると推定されていることから²⁵、効率的な方法である。過去にVogelsteinらは従来のSanger法を用いて悪性膠芽腫のエクソン

シーケンスを行い、*IDH1* 遺伝子変異の同定に成功し、その有効性を示していた²⁶。次世代シーケンサーを使用した全エクソン解析ではより効率よく網羅的に解析が可能である。現在、最も広く使用されている Agilent 社の SureSelect というシステムでは対象配列に相補的な bait と呼ばれる cRNA プローブを用いて、溶液中でハイブリダイゼーションによって標的配列を含む DNA のみを濃縮している（図 1）。ターゲットゲノムシーケンスでは全ゲノムシーケンスに比べて一度に大量のサンプルの解析が可能であり、全エクソン解析により多く

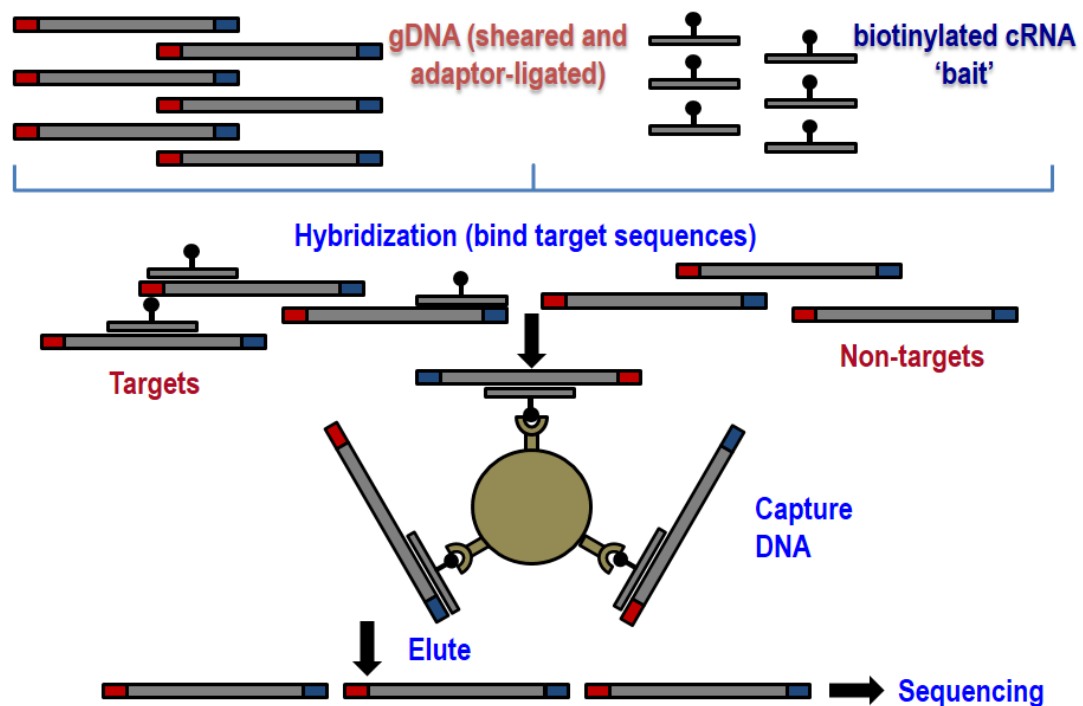


図 1 ターゲットゲノムシーケンス（エクソンシーケンス）（）
ゲノム上の解析を目的とする標的配列（エクソンシーケンスの場合は、全ての遺伝子のエクソン）に相補的なプローブを設計し、断片化した DNA と溶液中でハイブリダイゼーションを行ったあと、プローブを磁気ビーズで純化する。
（文献 22 より引用）

の新規の標的遺伝子が同定されていた²⁷⁻²⁹。そこで、本研究では MDS の遺伝子変異の全貌を明らかにし、MDS 特異的な変異を明らかにするため、MDS および関連する骨髄性腫瘍について全エクソンシーケンスをはじめとするゲノム解析を行った。

方法と材料

検体

29 症例の様々な病型の MDS および関連する骨髄性腫瘍である慢性骨髄単球性白血病 (Chronic myelomonocytic leukemia、CMML)、骨髄異形成に関連した変化を有する急性骨髄性白血病 (Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes、AML/MRC) を対象に全エクソンシーケンスおよび SNP アレイを用いたコピー数解析を行った (表 2)。骨髄あるいは末梢血から採取した腫瘍 DNA と同一患者から採取した CD3 陽性 T 細胞あるいは頬粘膜由来の germline コントロール DNA をペアで解析し、腫瘍細胞特異的な体細胞変異を検出した。さらに、582 例の様々な病型の骨髄性腫瘍検体について、RNA スプライシング因子の遺伝子変異を解析した (表 3)。検体はインフォームドコンセントを取得した上で患者より採取され、本研究は、東京大学倫理委員会の承認を受けて施行された (承認番号 : 948)。

表 2 全エクソンシーケンスを行った 29 症例の MDS および関連骨髄性腫瘍

Sample ID	Sex	Age	WHO Classification	Cytogenetics	Sample(腫瘍)	Germline control
MDS-03	M	45	RA	47,XY,+1,der(1;7)(q10;p10),+8	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-04	M	72	RA	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-06	M	73	RCMD	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-07	M	70	RCMD	47,XY,+8	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-08	M	75	RCMD	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-09	M	86	RCMD	46,XY,add(5)(q11.2),add(8)(q24.1)	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-10	F	25	RCMD	47,XX,+8	骨髄	頬粘膜
MDS-11	M	64	RCMD	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-12	F	24	RCMD	NA	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-13	F	40	del(5q)	46,XX,del5q	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-14	F	46	del(5q)	46,XX,del5q	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-15	M	77	RAEB-1	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-16	M	86	RAEB-1	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-17	M	73	RAEB-1	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-18	F	75	RAEB-2	46,XX	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-19	F	78	RAEB-2	46,XX	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-20	F	56	RAEB-2	46,XX,t(6;9)(p23;q34)	骨髄	CD3陽性T細胞
MDS-21	M	59	RAEB-2	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
tAML-01	M	77	AML/MRC	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
tAML-02	F	68	AML/MRC	47,XX,der(1;7)(q10;p10),+8	末梢血(CD3陰性)	CD3陽性T細胞
tAML-03	M	67	AML/MRC	Complex	骨髄	CD3陽性T細胞
tAML-04	M	58	AML/MRC	NA	骨髄	CD3陽性T細胞
tAML-05	M	59	AML/MRC	47,XY,+11	骨髄	CD3陽性T細胞
tAML-06	M	73	AML/MRC	45,XY,-7	骨髄	CD3陽性T細胞
tAML-07	F	73	AML/MRC	Complex	骨髄	頬粘膜
CMML-01	M	48	CMML1	46,XY	末梢血(CD3陰性)	CD3陽性T細胞
CMML-02	M	83	CMML2	47,XY,+14	骨髄	CD3陽性T細胞
CMML-03	M	77	CMML1	46,XY	骨髄	CD3陽性T細胞
CMML-04	F	88	CMML1	NA	骨髄	CD3陽性T細胞

Abbreviations: NA, not available; ND, not determined.

表 3 RNA スプライシング遺伝子の変異解析を行った 582 症例の骨髄性腫瘍

	N
MDS	228
不応性貧血 (RA)	8
RARS	23
RCMD with ringed sideroblasts (RCMD-RS)	50
RCMD	39
5q-症候群	8
RAEB-1	45
RAEB-2	46
分類不能型 骨髓異形成症候群 (MDS-U)	2
Unknown	7
CMMML	88
AML	213
<i>de novo</i> AML	151
骨髓異形成に関連した変化を有するAML (AML/MRD)	62
MPN	53
合計	582

全エクソンシーケンス

エクソン領域の濃縮は Agilent 社の SureSelect 38Mb あるいは 50Mb キットを用いて、溶液中でエクソン領域を含むゲノム DNA 断片のみを濃縮した。

Illumina 社の次世代シーケンサーGAIIx あるいは HiSeq2000 を用いて、75-108 塩基のペアエンドで解析を行った。シーケンスデータは東京大学医科学研究所のスーパーコンピューターを用いて、in-house の解析パイプライン Genomon-exome (<http://genomon.hgc.jp/exome/en/>) を用いて体細胞変異を検出した。具体的には、シーケンサーから得られたシーケンスリードからまず PCR アダプター一配列を除去した後、ヒトゲノムリファレンス配列 (NCBI Human Reference Genome Build 37) に BWA (Burrows-Wheeler Aligner) ³⁰ を用いてマッピングを行った。PCR による重複リードやクオリティの低いリードを除去した後、コー

ディング領域上の全塩基における塩基配列を測定し、腫瘍検体においてそれぞれのゲノム上の部位を読んでいた総リード数の 7%以上のリードにより同定されている一塩基置換 (single nucleotide variant, SNV) あるいは挿入欠失変異 (insertion-deletion, indel) を変異候補として抽出した。また、dbSNP131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、1000 genome project (<http://www.1000genomes.org/>) および in-house の SNP データベースに登録がある一塩基多型と考えられる候補 (single nucleotide polymorphism, SNP) およびアミノ酸置換を伴わない変異を候補から除いた。さらに、抽出された候補が体細胞変異であるかどうかを調べるために、それぞれの変異候補の腫瘍および正常コントロール検体における変異アレルをサポートするリードの数、正常アレルをサポートするリードの数を用いて腫瘍検定で有意に変異アレルをサポートするリードの割合が多いかを Fisher 検定により評価し、p 値が 0.001 以下である場合に体細胞変異の最終的な候補とし、Sanger シーケンス法により確認した。その結果、497 個の候補のうち、268 個の変異が体細胞変異であることが確認された。

582 例の骨髄性腫瘍検体のプールシーケンス

スプライシング経路の遺伝子 (*U2AF1*、*SRSF2*、*ZRSR2*、*SF3B1*、*SF3A1*、*PRPF40B*、*U2AF2*、*SF1*、*SRSF1*) の変異について、582 症例の骨髄性腫瘍に

ついてプールシーケンス法により解析を行った（表 3）^{31,32}。具体的には、解析検体数が多いことから 12 患者由来の DNA を均一に混合した DNA プールを 49 個作成し、各遺伝子の全てのエクソンについて PCR アンプリコンを作成した。さらに、次世代シーケンサーの解析ではランダムに断片化したゲノム DNA を繰り返し読むことが重要であるため、電気泳動で Not I 配列を付加したプライマーで作成した PCR 産物を確認後、Not I 酵素で切断し T4 ligase で PCR アンプリコンをライゲーションして、長鎖の DNA を作成した（図 2）。その後、次世代シーケンサー用に DNA を断片化して、次世代シーケンサーで解析した。検出された変異を各プールに対応する 12 サンプルについて Sanger シーケンスを行い、変異を持つ検体を同定した。



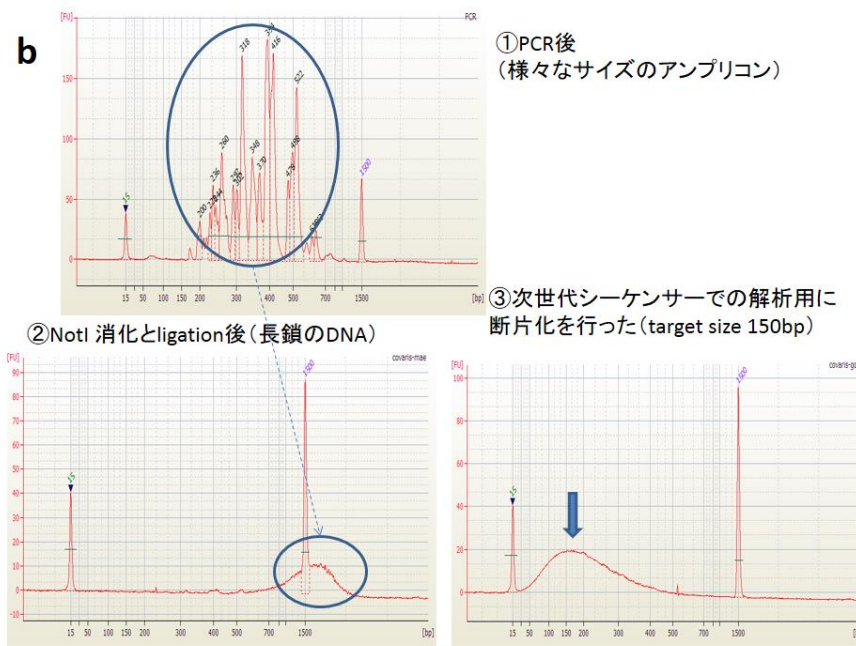


図 2 NotI 配列を付加したプライマーを用いたサンプル調整

a. PCR 後、NotI 消化、ligation を行うことで長鎖の DNA を作成した。**b.** Bioanalyzer (Agilent) を用いて実際に長鎖の DNA が作成されたことを確認した後、DNA を断片化した。

SNP アレイを用いた網羅的なコピー数およびアレル不均衡の解析

Affymetrix GeneChip 50K/250K array (Affymetrix) を用いて網羅的なゲノムコピー数およびアレル不均衡の解析を行った。解析は Affymetrix 社のプロトコールに準じて行った。スキャンされたアレイ情報を GTYPE ソフトウェア

(Affymetrix) によって SNP タイピングを行い、CNAG/AsCNAR アルゴリズムを用いてコピー数およびアレル不均衡の解析を行った^{33,34}。

U2AF1 遺伝子の細胞株および CD34-KSL 細胞への発現

FLAG タグを付加した変異型 (S34F、Q157R、Q157P) あるいは正常型の U2AF1 cDNA を作成し、マウス CD34 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lineage marker

陰性（CD34-KSL）細胞あるいは細胞株にそれぞれ GFP マーカーにより標識したレトロウイルスベクターあるいはテトラサイクリン誘導型のレンチウイルスベクターにより U2AF1 遺伝子を導入した。

変異 U2AF1 を導入した細胞株の発現アレイ解析

正常型および変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞および TF-1 細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイ（GeneChip Human genome U133 plus 2.0 array、Affymetrix）で解析した。NMD 関連遺伝子の発現については定量 PCR 法で結果の妥当性を確認した。

変異 U2AF1 による RNA スプライシングへの影響についての検討

変異 U2AF1 発現により RNA スプライシングの異常が誘導されるか評価するために、正常型および変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞から RNA を抽出し、エクソンアレイ（GeneChip Human exon 1.0 ST Array, Affymetrix）および次世代シーケンサーを用いて RNA シーケンスを行った。RNA シーケンスは illumina 社の mRNA Sample Preparation Kit を用いて調整し、GAIIx でシーケンスを行った。

変異 U2AF1 を導入した細胞株の細胞増殖の解析

正常型および変異型 U2AF1 を前述のレンチウイルスベクターで導入した HeLa 細胞および TF-1 細胞の増殖について、ドキシサイクリン存在下／非存在下に

において細胞数の推移を Cell Counting Kit-8 (Dojindo co.) を用いた MTT アッセイにより解析した。また、細胞のアポトーシスの誘導を検出するために、抗 Annexin-V 抗体を用いてフローサイトメトリーにて Annexin-V 陽性細胞数を測定した。

in vivo における変異 U2AF1 による生物学的効果の検討

変異 U2AF1 発現による in vivo での効果を検討するために、マウスを使用した競合的造血再構築能アッセイを行った。C57BL/6(B6)-Ly5.1 マウス骨髄から分離した CD34-KSL 細胞にレトロウイルスで EGFP マーカーをつけた正常 U2AF1、変異 (S34F、Q157P あるいは Q157R) U2AF1 あるいは mock ベクターを導入し、ドキシサイクリンによる遺伝子発現誘導の 48 時間後に 2×10^5 個の B6-Ly5.1/5.2 F1 由来の競合細胞と共に致死量の放射線照射をした B6-Ly52 マウスに骨髄移植を行った。移植後 6 週間後に末梢血で GFP 陽性のドナー由来細胞の割合をフローメトリーで測定した。本研究は東京大学の倫理委員会の承認を受けて行われた (PM22-38)。

結果

MDS の全エクソンシーケンス

全エクソンシーケンスでは、ターゲット領域の平均で 133.8 回 (depth) 以上読まれていて、またターゲット領域の 80.4% は 20 回以上読まれていて、十分な深度、カバレッジでシーケンスされていると考えられた (図 3)。

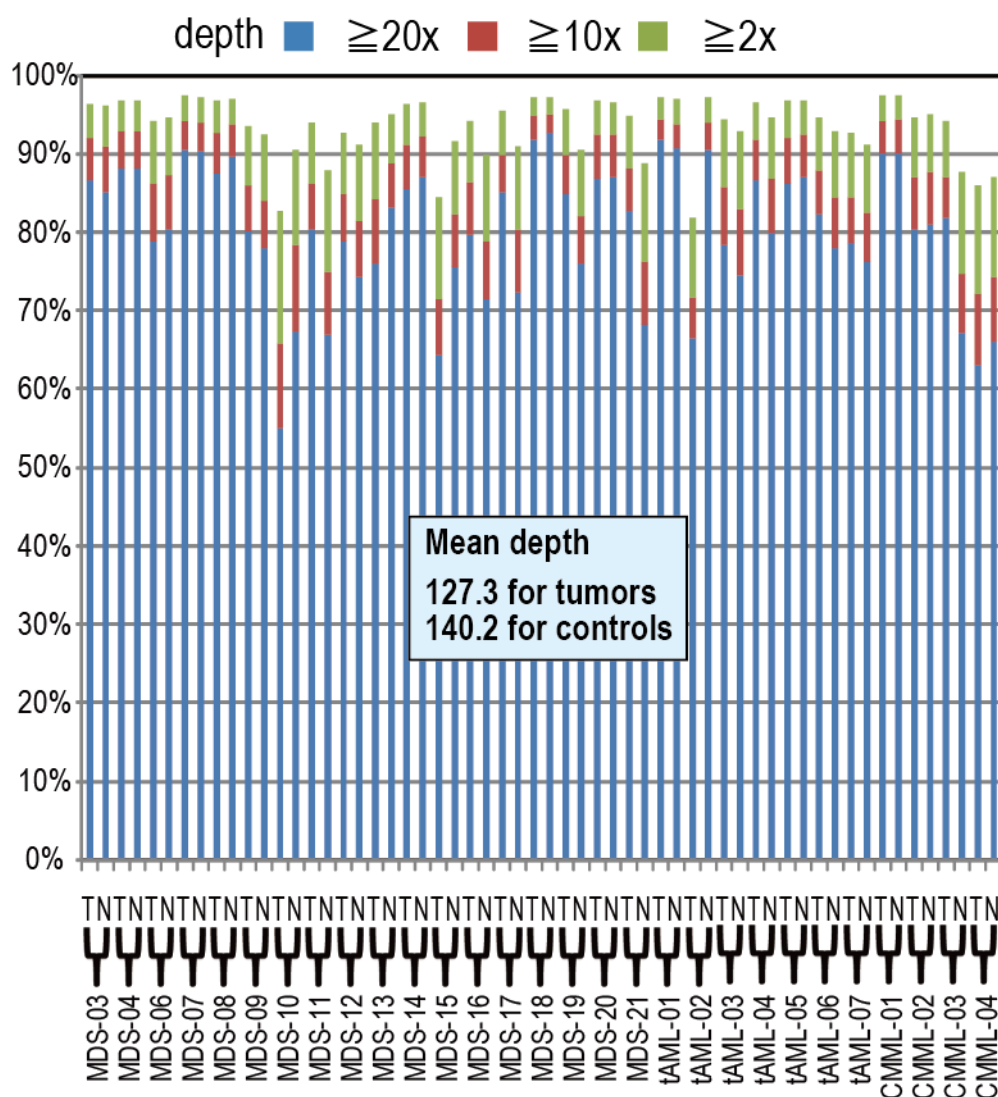


図3 29 ペアの MDS およびコントロール検体のエクソンシーケンス

平均カバレッジは腫瘍で 127.3×、germline コントロールで 140.2×と十分な深度でシーケンスされていた。20×、10×、2×、それぞれの深度で読めているターゲット領域の割合をそれぞれ対応する色で示した。

検出された体細胞変異の候補を Sanger シーケンス法で validation し、全体として 29 症例で 268 個の体細胞変異が確認された（陽性的中率は 53.9%）。この中には 206 個のミスセンス変異、25 個のナンセンス変異、10 個のスプライス部位に起こった変異、27 個の挿入・欠失変異が含まれていた（図 4）。

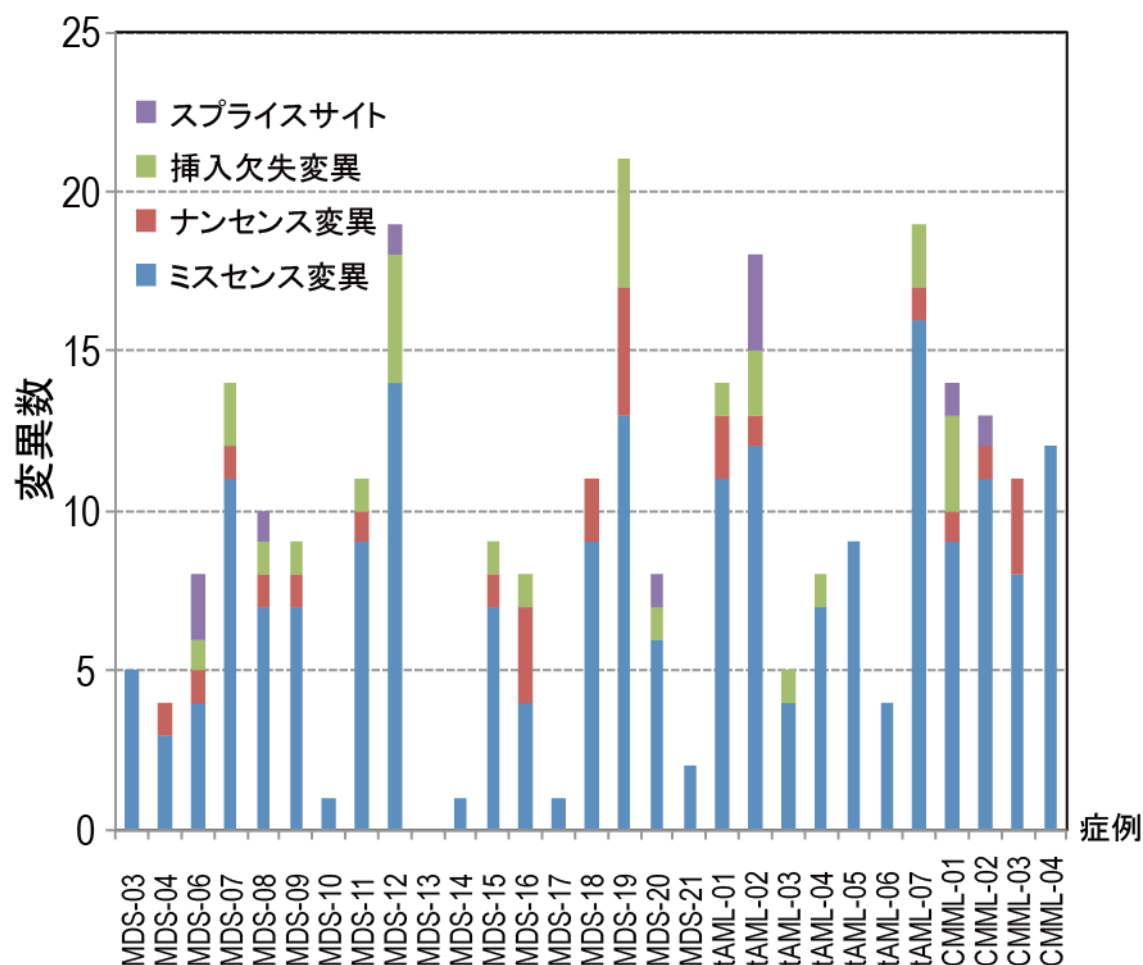


図 4 29 症例の myelodysplasia 症例で同定された体細胞変異

平均で 1 症例あたり 9.2 個の体細胞変異が同定された。同定された変異のタイプを色分けして示した。

1 症例あたりの平均のアミノ酸置換を伴う変異の数は 9.2 個（0-21）と、過去に報告されている固形腫瘍^{28,35,36}や多発性骨髄腫³⁷における数に比べると優位

に少ないものの、AML (7.3-13) ^{29,38,39} や慢性リンパ性白血病 (Chronic lymphocytic leukemia, CLL) (11.5) ⁴⁰ などの造血器腫瘍とは同等の数であると考えられた ^{41,42}。

同定された遺伝子変異の中にはこれまでに MDS で変異が報告されていた *TET2*、*RAS*、*ASXL1*、*TP53*、*RUNX1*、*DNMT3A* などの遺伝子の変異が過去の報告と同程度の頻度で検出され、今回の解析の感度は十分であると考えられた。

一方、残りの大多数 (235/268) の変異はこれまでに MDS で報告のない遺伝子の変異であった。この中で複数症例に高頻度に変異が認められる遺伝子には MDS 発症に関わる重要な遺伝子が含まれると予測されたが、それら 12 個の遺伝子にはこれまでに MDS で変異が報告されている 8 個の遺伝子 (*ASXL1*、*DNMT3A*、*EZH2*、*KRAS*、*NRAS*、*RUNX1*、*TET2*、*TP53*) 以外に、RNA スプライシングに関わる *U2AF1*、*SRSF2*、*ZRSR2* の 3 つの遺伝子が含まれていて (表 4)、これらの遺伝子の他に 1 症例のみに変異がみられた *SF3B1*、*SF3A1*、*PRPF40B* という 3 つの RNA スプラインシング因子の遺伝子を含めると RNA スプラインシング装置の遺伝子変異は実に 29 例中の 16 例 (55%) にみられ、変異がある症例では変異は排他的にみられていた (図 5)。

表 4 29 症例の myelodysplasia で複数症例に認められた変異遺伝子

Annotated Gene	Mutation Type	Amino Acid Change	RefSeq	Sample ID	WHO Classification
<i>ASXL1</i>	Nonsense	S852X	NM_015338	MDS-19	RAEB-2
<i>ASXL1</i>	Nonsense	R693X	NM_015338	CMML-01	CMML1
<i>BCOR</i>	Frameshift	V1351fs	NM_017745	MDS-19	RAEB-2
<i>BCOR</i>	Nonsense	Q1187X	NM_017745	CMML-02	CMML2
<i>DNMT3A</i>	Missense	G543C	NM_175629	MDS-19	RAEB-2
<i>DNMT3A</i>	Missense	R882H	NM_175629	CMML-02	CMML2
<i>EZH2</i>	Missense	D664A	NM_004456	tAML-01	AML/MRC
<i>EZH2</i>	Frameshift	K718fs	NM_004456	CMML-01	CMML1
<i>KRAS</i>	Missense	G12D	NM_033360	tAML-06	AML/MRC
<i>KRAS</i>	Missense	K5E	NM_033360	CMML-01	CMML1
<i>NRAS</i>	Missense	G13D	NM_002524	MDS-19	RAEB-2
<i>NRAS</i>	Missense	G13D	NM_002524	MDS-20	RAEB-2
<i>NRAS</i>	Missense	G12S	NM_002524	MDS-19	RAEB-2
<i>NRAS</i>	Missense	G12S	NM_002524	tAML-05	AML/MRC
<i>RUNX1</i>	Frameshift	L294fs	NM_001001890	MDS-19	RAEB-2
<i>RUNX1</i>	Missense	D171N	NM_001001890	tAML-02	AML/MRC
<i>SRSF2</i>	Missense	P95L	NM_003016	MDS-09	RCMD
<i>SRSF2</i>	Missense	P95H	NM_003016	MDS-18	RAEB-2
<i>SRSF2</i>	Missense	P95H	NM_003016	CMML-04	CMML1
<i>TET2</i>	Frameshift	I340fs	NM_017628	MDS-06	RCMD
<i>TET2</i>	Missense	C1271W	NM_017628	MDS-15	RAEB-1
<i>TET2</i>	Nonsense	Q323X	NM_017628	MDS-16	RAEB-1
<i>TET2</i>	Frameshift	Y1255fs	NM_017628	MDS-16	RAEB-1
<i>TET2</i>	Nonsense	S825X	NM_017628	MDS-19	RAEB-2
<i>TET2</i>	Frameshift	L1046fs	NM_017628	MDS-19	RAEB-2
<i>TET2</i>	Nonsense	R550X	NM_017628	tAML-01	AML/MRC
<i>TET2</i>	Frameshift	H994fs	NM_017628	tAML-01	AML/MRC
<i>TET2</i>	Nonsense	Q1680X	NM_017628	tAML-07	AML/MRC
<i>TET2</i>	Frameshift	S402fs	NM_017628	tAML-07	AML/MRC
<i>TET2</i>	Frameshift	Q749fs	NM_017628	CMML-01	CMML1
<i>TET2</i>	Nonsense	Q317X	NM_017628	CMML-03	CMML1
<i>TP53</i>	Missense	R116W	NM_001126116	MDS-09	RCMD
<i>TP53</i>	Frameshift	M1fs	NM_001126116	tAML-03	AML/MRC
<i>U2AF1</i>	Missense	Q157R	NM_006758	MDS-03	RA
<i>U2AF1</i>	Missense	A26V	NM_006758	MDS-12	RCMD
<i>U2AF1</i>	Missense	Q157P	NM_006758	MDS-15	RAEB-1
<i>U2AF1</i>	Missense	Q157R	NM_006758	CMML-01	CMML1
<i>U2AF1</i>	Missense	S34F	NM_006758	CMML-02	CMML2
<i>ZRSR2</i>	Splice site	K257_splice	NM_005089	MDS-06	RCMD
<i>ZRSR2</i>	Frameshift	G323fs	NM_005089	MDS-08	RCMD
<i>ZRSR2</i>	Nonsense	E362X	NM_005089	MDS-16	RAEB-1
<i>ZRSR2</i>	Missense	N261Y	NM_005089	tAML-05	AML/MRC
<i>ZRSR2</i>	Missense	F239V	NM_005089	CMML-03	CMML1

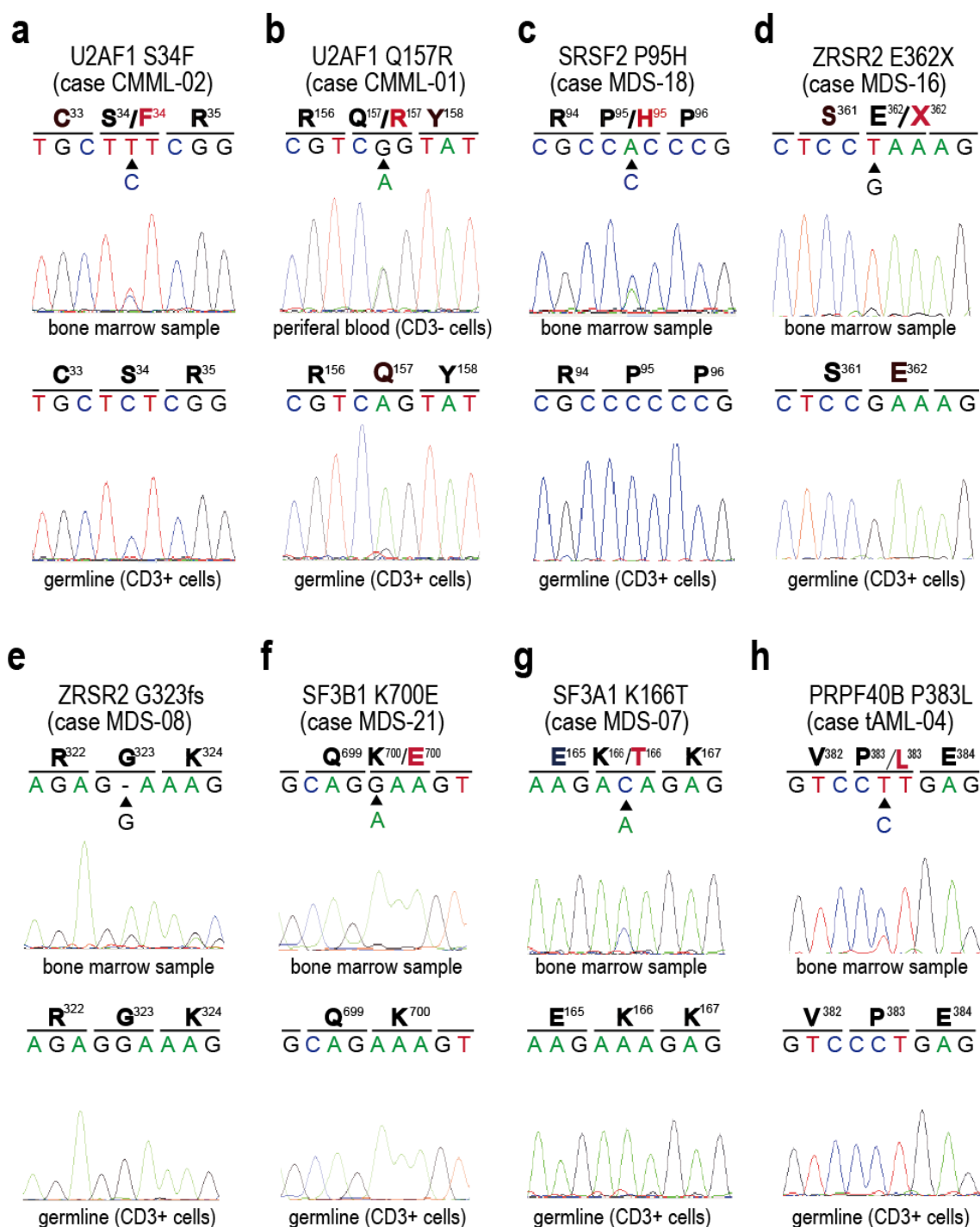


図 5 全エクソンシーケンスで検出された 6 つの RNA スプライシング関連遺伝子の変異の Sanger 法での validation

16 個の変異について、腫瘍検体（上部）および germline コントロール検体（下部）を Sanger シーケンスし、体細胞変異であることが確認された。代表的な 8 例について示した。変異が見られた塩基について矢印で示し、変異がみられたアミノ酸については赤字で示した。

造血器腫瘍における RNA スプライシング因子の変異

RNA スプライシングは遺伝子を転写した前駆体 mRNA からイントロンを除去し、エクソンを結合して成熟 mRNA を合成する反応であり、RNA スプライシングはスプライセオソームと呼ばれる、5 つ (U1、U2、U4、U5、U6) の核内低分子リボ核酸蛋白質粒子 (snRNP) と 150 以上の蛋白で構成される複合体 (スプライセオソーム) により行われる⁴³ (図 6)。一方、イントロンには 2 種類のイントロンがあり、ヒトでは 99.5%以上を占める U2-type イントロンと 0.5%以下でヒトでは 700-800 個の遺伝子にあると考えられている U-12 type イントロンがある。それぞれのスプライシングを行うスプライセオソームは major spliceosome, minor spliceosome としばしば呼ばれる⁴⁴。U1、U2、U4/U6、U5 snRNP が主な major spliceosome の構成要素であるが、それぞれの snRNP は snRNA とさまざまな数の関係する蛋白により構成されている。スプライシングの過程で、各イントロンの始まりと終わり (5' と 3' のスプライス部位) と 3' に近いところにある branch site にある共通配列 (consensus sequence) に snRNP と U2AF1、U2AF2 などの補助因子が結合することにより認識されている。今回変異が見つかった RNA スプライシング因子は、機能が十分にわかっていない *PRPF40B* を除いて主に 3' 側のエクソン・イントロン境界の認識に関わるスプライセオソーム E/A 複合体に属するものだった。

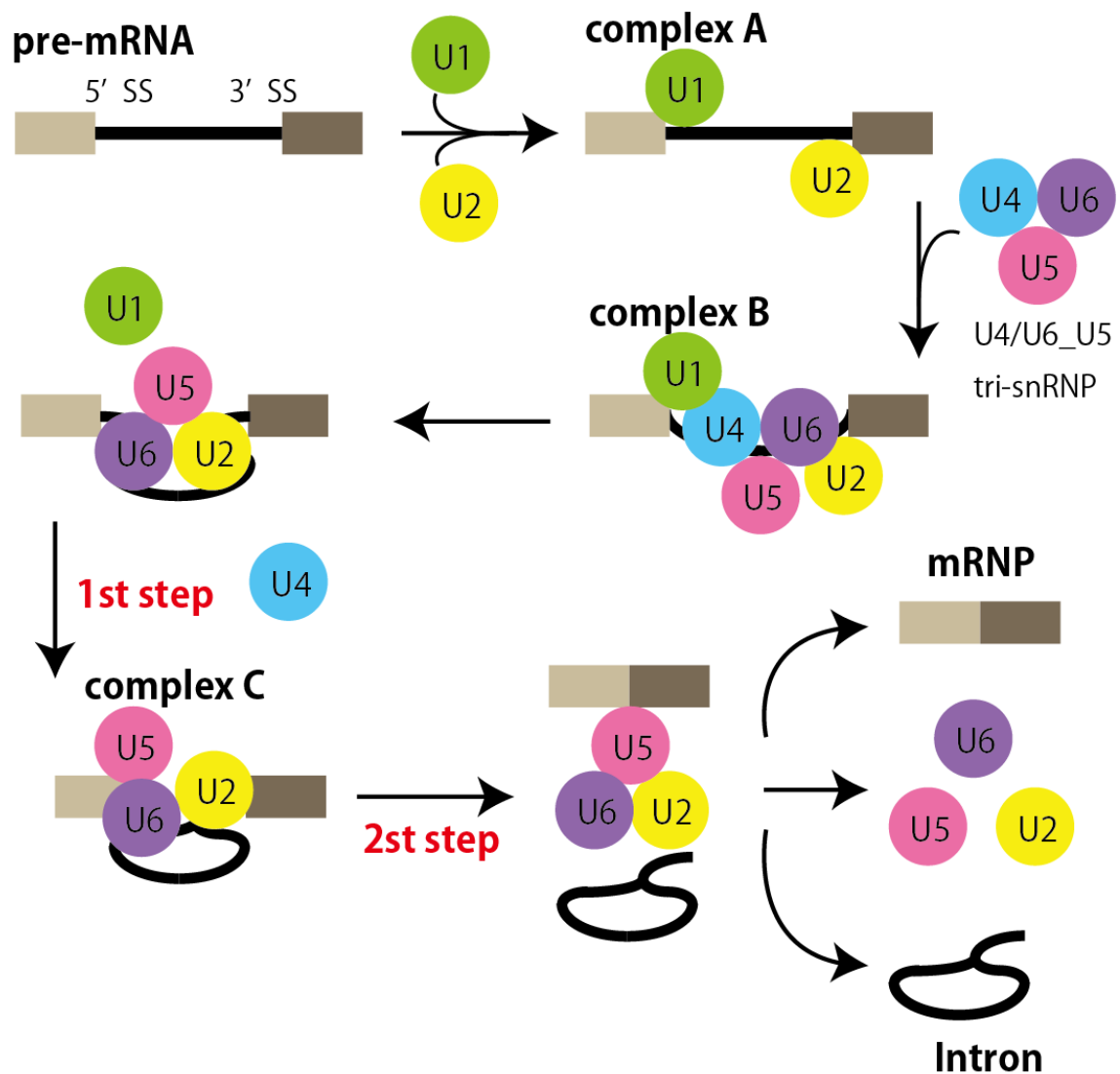


図6 RNA スプライシングとスプライセオソーム

U1, U2, U4/U6, U5 snRNPs が主スプライセオソーム (major spliceosomes) の主な構成因子で、それぞれの snRNP は small nuclear RNA (snRNA) と多くの関連蛋白からなっている。スプライセオソームの集合は U1 snRNP が 5' スプライスサイトに結合することから始まり、続いて U2 snRNP が branch point sequence に結合し (A 複合体)、さらに U4/U6/U5 tri-snRNP がリクルートされ、B 複合体を作る。U1 および U4 snRNP を放出した後、活性化された B 複合体は触媒工程を受ける (C 複合体)。はじめに、5' スプライスサイトが開裂し、イントロンの 5' 側が 3' スプライスサイトに接近する。次に、3' スプライスサイトが開裂し、エクソンが結合する。イントロンはラリアット型で放出され、mRNA は mRNA and associated protein (mRNP) の形で放出される。

(著者作成)

U2AF1 (U2AF35: 35 kDa subunit of U2AF) は U2AF2 (U2AF65) とともに、U2 auxiliary factor (U2AF) の subunit の一つで、U2AF2 と結合して U2AF heterodimer を形成し、また 3' splice 部位の AG dinucleotide に結合する (図 7)。一方、branch point sequence (BPS) と polypyrimidine tract には SF1/BBP と U2AF2 が結合する。これらの結合によりスプライセオソーム E 複合体を形成し、3' スプライス部位の認識に重要な役割を果たしている。

SRSF2 (SC35) は SR 蛋白に属し、arginine-serine-rich (RS) domain と RRM (RNA recognition motif) を持ち、RRM domain を介して exonic splicing enhancer (ESE) と相互関係し、splice-site usage に positive に作用すると考えられている。また、ESE に結合すると、SRSF1 や SRSF2 といった SR 蛋白は RS domain を介して、下流の 5' splice site に U1 snRNP を、上流の 3' splice site に U2AF1、U2AF2 を誘導すると考えられている。SF3B complex は SF3A complex とともに U2 snRNP を構成し、SF3B1 (subunit 1 of the splicing factor 3b protein complex あるいは SF3b155) は SF3B14(p14) とともにスプライセオソーム A 複合体を構成し、BPS に結合し、また U2AF2 とも結合し、U2 snRNP と pre mRNA の結合を強固なものにしている。ZRSR2 (Urp) は U2AF1 と似た構造を持ち⁴⁵、U2AF や SR 蛋白と相互作用すると考

えられているが、U2-type と U12-type 両方のイントロンにおいて 3' スプライス部位で働いている⁴⁶。U12-type イントロンでは A 複合体を構成するが、U2-type イントロンでは U2AF に置き換わって働くと考えられている。

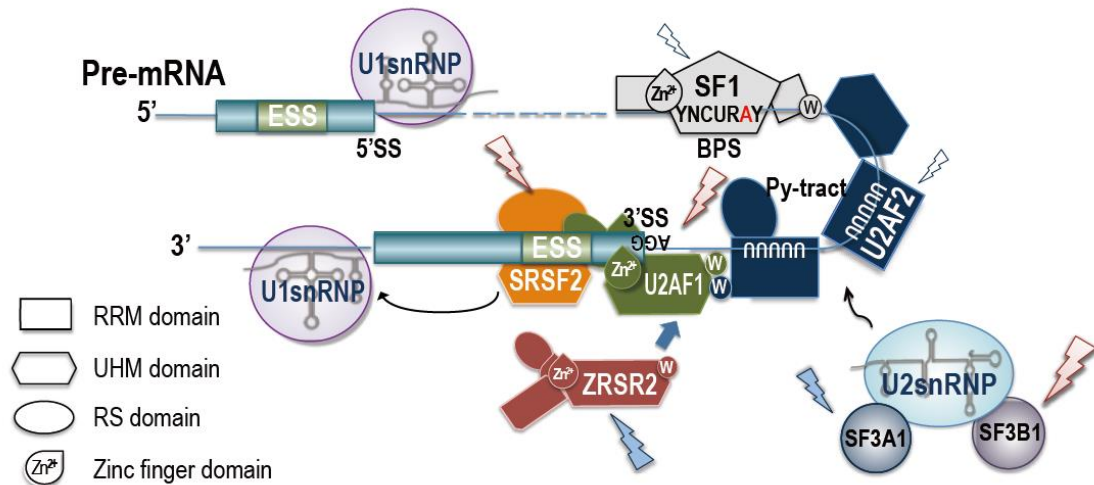


図7 myelodysplasia で変異がみられたスプライセオソーム E/A 複合体の構成要素

変異がみられたスプライシング因子のほとんどは 3' スプライスサイトの認識など RNA スプライシングの初期のステップに関わる遺伝子だった。U2AF1 は U2AF2 とともに、U2 auxiliary factor の subunit の一つで、U2AF2 と結合して U2AF heterodimer を形成し、また 3' splice 部位の AG dinucleotide に結合する。一方、BPS と polypyrimidine tract には SF1 と U2AF2 がそれぞれ結合する。これらの結合によりスプライセオソーム E 複合体を形成し、3' スプライス部位の認識に重要な役割を果たしている。SRSF2 は SR 蛋白に属し、RRM domain を介して ESE と interact し、splice-site usage に positive に作用すると考えられている。また、ESE に結合すると、RS domain を介して、下流の 5' splice site に U1 snRNP を、上流の 3' splice site に U2AF1、U2AF2 を誘導すると考えられている。SF3B complex は SF3A complex とともに U2 snRNP を構成し、SF3B1 は SF3B14(p14)や SF3A1 とともにスプライセオソーム A 複合体を構成し、BPS に結合し、また U2AF2 と結合し、U2 snRNP と pre mRNA の結合を強固なものにしている。ZRSR2 は U2AF1 と似た構造を持ち、U2AF や SR 蛋白と相互作用すると考えられている。(著者作成)

W: Trp residues, RRM: RNA-recognition motif, UHM: U2AF homology motif domain, RS domain: arginine and serine rich domain

今回見つかった RNA スプライシング関係の遺伝子変異をより多数例の骨髓性腫瘍で頻度を調べるため、これら 6 つの遺伝子にさらに関連のある RNA スプライシング因子である *U2AF2*、*SF1*、*SRSF1* を加えて、582 例の骨髓性腫瘍検体を用いて次世代シーケンサーを用いたプールシーケンス解析を行った (表 3)^{31,32}。その結果、582 例中の 209 症例で合計 219 個の変異が同定され、*SF3B1* (N =79)、*U2AF1* (N = 37)、*SRSF2* (N = 56)、*ZRSR2* (N = 23) 遺伝子に主に変異が同定され、低頻度ではあるが *SF3A1* (N = 8)、*PRPF40B* (N =7)、*U2AF2* (N = 4)、*SF1* (N =5) の遺伝子変異も同定された。RNA スプライシング装置の遺伝子変異は MDS (57.0%)、CMML (54.5%) や AML/MRC (25.8%) という骨髓異形成の特徴のある骨髓性腫瘍で高頻度にみられることがわかり、一方で *de novo* AML (6.6%)、MPN (9.4%) ではより低頻度であり、*myelodysplasia* に特異的な遺伝子異常であった (図 8)。同定された遺伝子変異は多数例の解析でもやはり変異のある症例では排他的にみられ、RNA スプライシングの機能がこれらの遺伝子変異の共通の標的となっていることが考えられた (図 9)。また、それぞれの遺伝子変異の頻度は特定の病型と相関がみられ、特に *SF3B1* 遺伝子の変異は鉄芽球性不応性貧血 (Refractory anemia with ring sideroblasts、RARS) および多血球異形成を伴う鉄芽球性不応性貧血 (Refractory cytopenia with

multilineage dysplasia and ring sideroblasts、RCMD-RS) という環状鉄芽球の増加により特徴づけられる病型の MDS で 75.3%と高頻度に変異がみられた。

RARS および RCMD-RS はそれぞれ MDS の 4.3%、12.9%を占め、鉄代謝の異常の病態への関与が考えられているが⁴⁷、今回見つかった高頻度かつ特異的な *SF3B1* 遺伝子の変異は RARS および RCMD-RS の原因とも言っている遺伝子異常と考えられた。また *SRSF2* 遺伝子の変異は CMML で 28.4%とより高頻度に見られていた。したがって、今回変異が見つかった RNA スプライシング因子の変異は共通して 3' 側のエクソン・イントロン境界の認識に関わるスプライセオソームを構成するものではあったが、それぞれの遺伝子変異は異なった効果を持っていると考えられた。例えば、*SRSF2* 遺伝子は DNA 安定性の調節に関与し、*SRSF2* 蛋白の減少によりゲノム不安定性が引き起こされるという報告があるが⁴⁸、実際に *SRSF2* 遺伝子変異を持った症例では *U2AF1* 変異を持った症例に比べて多くの他の遺伝子変異を持っていた ($p=0.001$)。

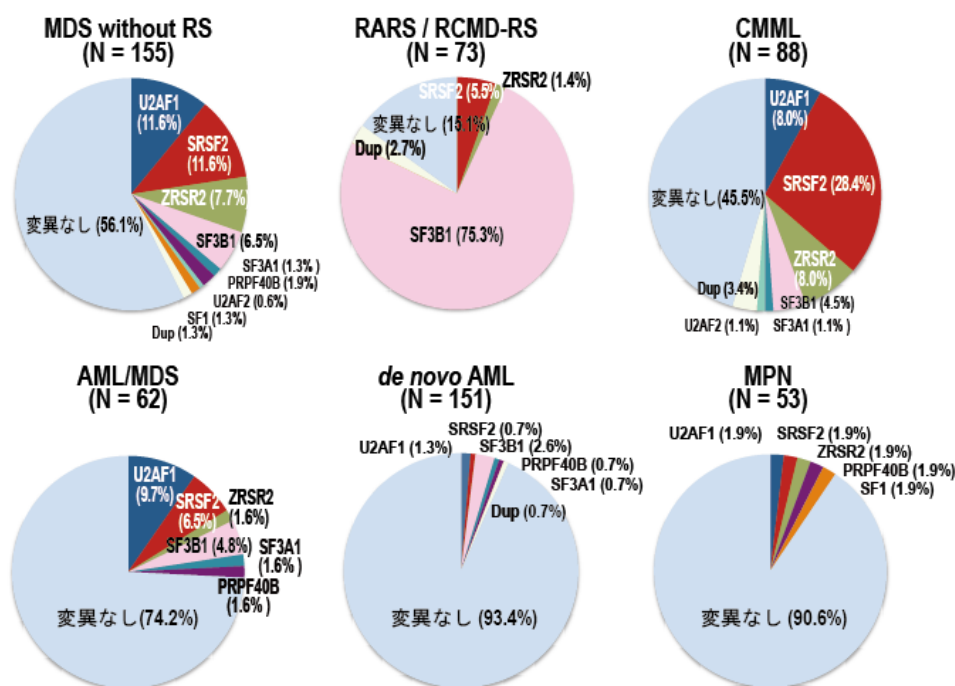


図 8 RNA スプライシング因子の遺伝子変異の様々な骨髄性腫瘍における頻度

582 症例の骨髄性腫瘍で検出されたスプライシング因子の遺伝子変異の頻度を占めた。582 例中の 209 症例で変異が同定された。RNA スプライシング装置の遺伝子変異は MDS (57.0%)、CMML (54.5%)、AML/MRC (25.8%) という骨髄異形成の特徴のある骨髄性腫瘍で高頻度にみられ、一方で de novo AML (6.6%)、MPN (9.4%) ではより低頻度であり、myelodysplasia に特異的な遺伝子異常であった。SF3B1 遺伝子の変異は RARS、RCMD-RS という環状鉄芽球の増加により特徴づけられる病型の MDS で 75.3%と高頻度に変異がみられた。また SRSF2 遺伝子の変異は CMML で 28.4%とより高頻度に見られた。

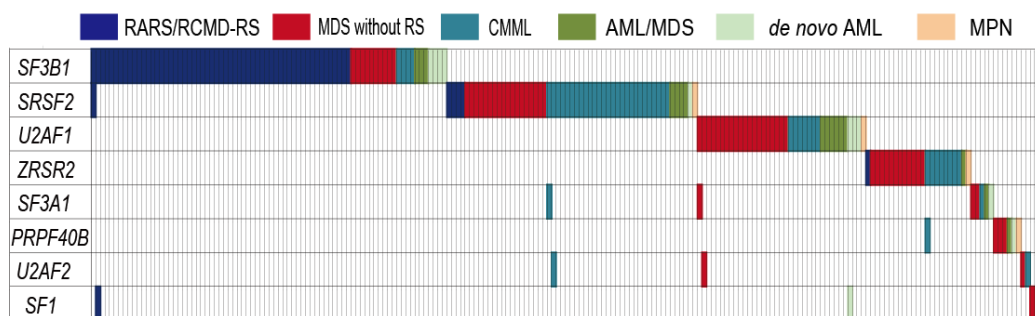


図 9 RNA スプライシング因子の変異子変異の変異例における分布

同定された遺伝子変異は変異のある症例ではほぼ排他的にみられ、RNA スプライシングの機能がこれらの異なった遺伝子の変異の共通の標的となっていると考えられた。

U2AF1 遺伝子の変異は N 末端と C 末端にある 2 つの zing finger ドメインにある特定の種間で保存されたアミノ酸 (S34 あるいは Q157) に変異に集中している (図 10、11)、また *SRSF2* 遺伝子は RPM ドメインと RS ドメインの間にある P95 に (図 10、12)、*SF3B1* 遺伝子における変異は HEAT リピート領域にある K700、K666、H662、E622 などのやはり種間で保存されたアミノ酸に集中してみられていた (図 10、13)。これらの変異は、*RAS* (codon 12、13、61)、*JAK2* (V617F)、*BRAF* (V600E)、*EZH2*(641)⁴⁹ などのがん遺伝子と同様に機能獲得型の変異であると考えられた。一方、*ZRSR2* 遺伝子の変異はコーディング領域全体に変異が起こり、2/3 がナンセンス変異やタンパクの中断を起こすと予測されるスプライス部位の変異であり (図 10)、機能喪失型変異であると考えられた。一方、*U2AF1* および *SRSF2* 遺伝子の変異はリンパ性腫瘍である、急性リンパ性白血病 (N = 24) や非ホジキンリンパ腫 (N = 87) には認められなかった。

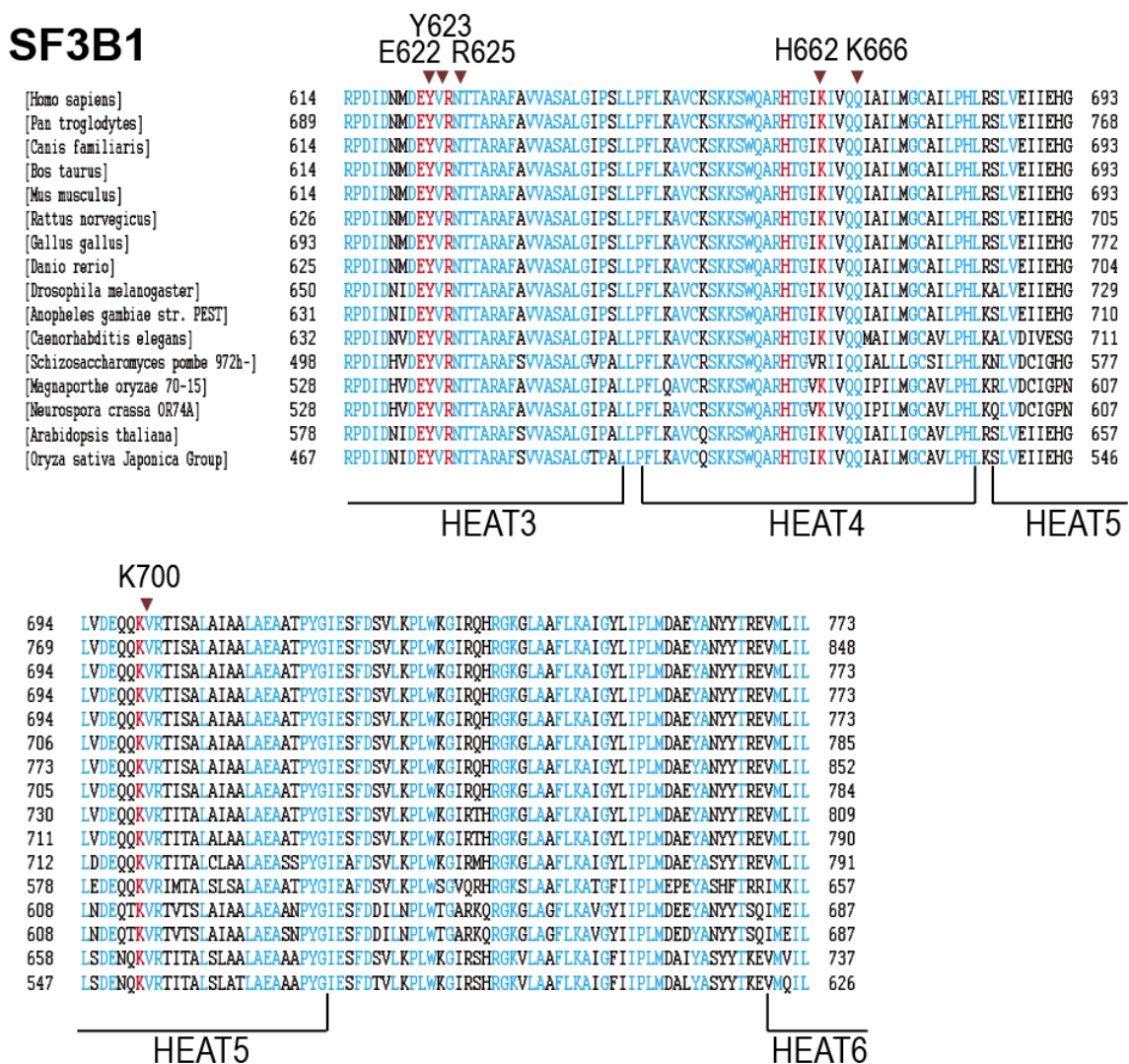


図 13 SF3B1 遺伝子のアミノ酸配列の異なった種間での比較

種間で完全に保存されたアミノ酸配列は青字で示し、変異がみられたアミノ酸部位を赤字で示した。また、保存された機能的ドメインを示した。

RNA スプライシング因子の変異による RNA スプライシングの異常

今回同定された RNA スプライシング因子の遺伝子変異はスプライセオソー

ム E/A 複合体の主なコンポーネントに排他的にみられていたことから、これらのスプライシング因子の変異により 3' のスプライス部位の認識が障害されることによりにより異常なスプライシングを受けた mRNA が産生されると推測され

た。そこで、実際にスプライシング因子の変異による生物学的/生化学的な効果を調べるために、正常型および変異型 U2AF1 (U2AF35) を EGFP (enhanced green fluorescent protein) によって標識したレトロウイルスベクターを用いた遺伝子導入により HeLa および TF-1 細胞に導入し、発現アレイ (GeneChip Human genome U133 plus 2.0 array、Affymetrix) を用いて遺伝子発現を解析し、gene set enrichment analysis (GSEA) ⁵⁰ を行った。GSEA により、変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞、TF-1 細胞では有意に nonsense-mediated mRNA decay (NMD) に関わるパスウェイの発現が上昇している (図 14、15)、これは定量的 PCR (quantitative polymerase chain reaction) でも確認された (図 16a)。

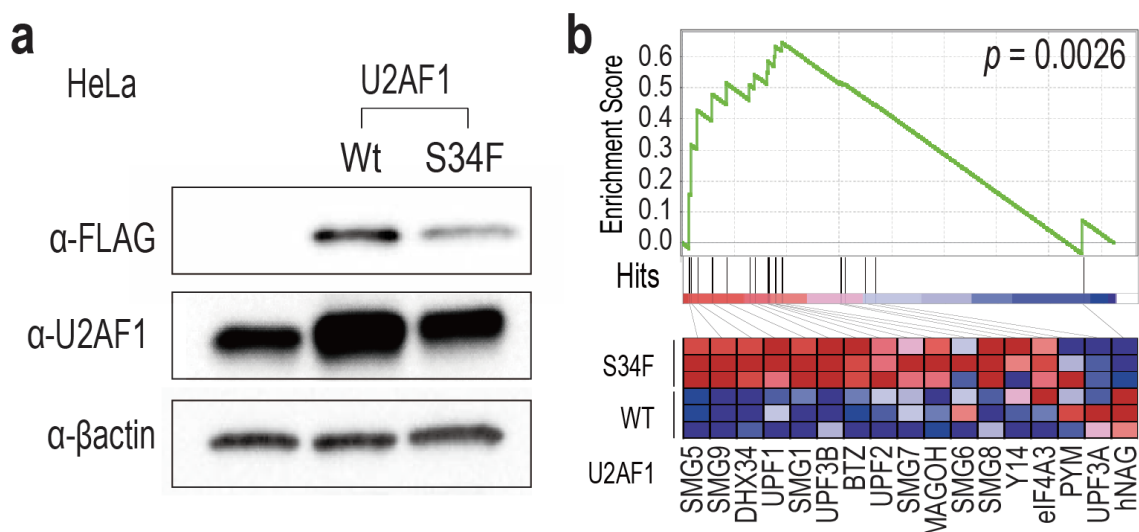


図 14 変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞における NMD パスウェイの活性化
a. 野生型および変異型 U2AF1 をレトロウイルスベクターを用いて HeLa 細胞に導入し、Western blot で発現を確認した。**b.** GSEA では 17 個の NMD パスウェイの遺伝子が正常型および変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞で有意に異なって発現される遺伝子として濃縮された。

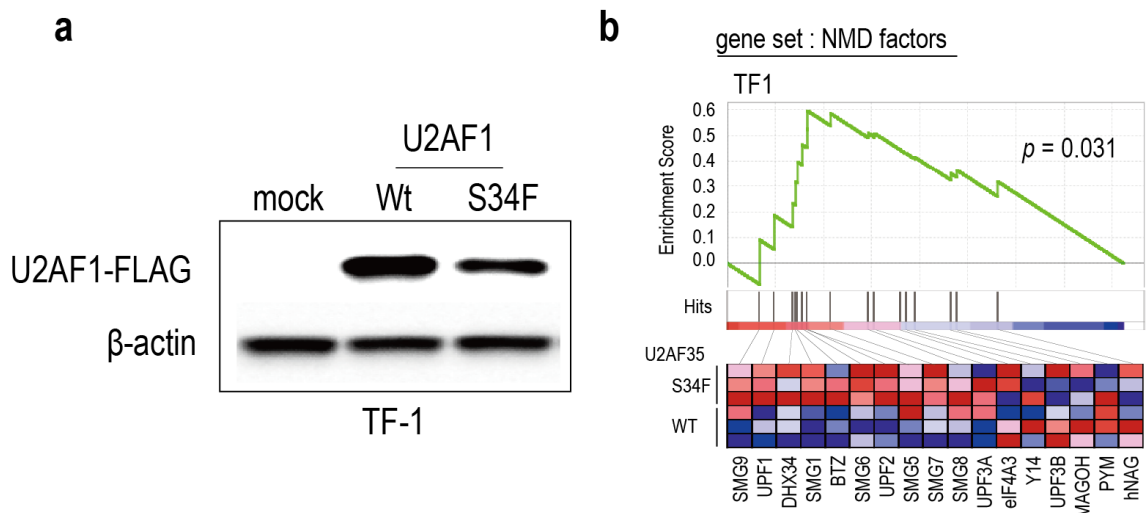


図 15 変異 U2AF1 を導入した TF-1 細胞における NMD パスウェイの活性化

a. 野生型および変異型 U2AF1 をレトロウイルスベクターを用いて TF-1 細胞に導入し、Western blot で発現を確認した。**b.** GSEA では 17 個の NMD パスウェイの遺伝子が正常型および変異型 U2AF1 を導入した TF-1 細胞でも有意に異なって発現される遺伝子として濃縮されていた。底部にこれらの遺伝子の発現の heat map を示した。

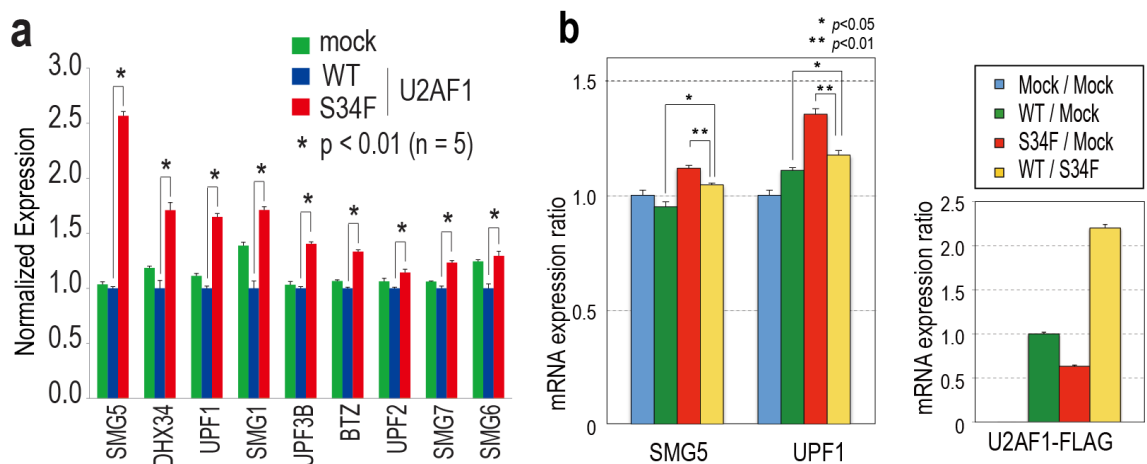


図 16 NMD パスウェイ遺伝子の発現の定量 PCR 法による確認

a. 発現アレイで同定された変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞での NMD パスウェイの活性化を、9 つの遺伝子で定量 PCR 法により validation した。GAPDH の発現レベルを基に正規化した発現値の平均値と標準誤差、Mann-Whitney U test により算出した p 値を示した。**b.** NMD パスウェイ遺伝子の活性化は正常型 U2AF1 を共発現させることにより抑制された (左)。導入された U2AF1 遺伝子の発現は RT-PCR 法で確認された。(右)

この変異 U2AF1 による NMD パスウェイの活性化は正常 U2AF1 を共発現させることにより有意に抑制されたことから (図 16b)、変異蛋白による効果は正常型蛋白の機能を抑制することを介している可能性が高いと考えられた。NMD パスウェイは mRNA 監視機構として転写後に途中で翻訳が中止してしまう異常な転写産物を認識・除去していることを考えると⁵¹、変異 U2AF1 により異常な RNA スプライシングが HeLa あるいは TF-1 細胞に起こり、スプライシングされなかった不完全な終始コドンを持つ mRNA が産生され、NMD パスウェイが活性化されていると考えられた。

U2AF1 遺伝子変異によって実際に RNA スプライシングの異常が起こっているかどうかを調べるために、正常 U2AF1 あるいは変異 U2AF1 を遺伝子導入した HeLa 細胞を用いてエクソンアレイ (GeneChip Human exon 1.0 ST Array, Affymetrix) を用いたトランスクリプトーム解析を行った。エクソンアレイでは 2 種類のプローブが設計されており、対象がエクソンであることを示すエビデンスのレベルにより、“Core” (真のエクソン) と “non-Core” (よりイントロンである可能性があるエクソン) に分けられる。“Core” と “non-Core” のエクソンは正常型あるいは変異型 U2AF1 を導入した細胞で有意に異なって発現がみられていた (図 17a) (FDR = 0.01)。“Core” セットのプローブは正常型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞に比べて変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞で有意に発

現が低下しているプローブに濃縮されていて、一方”non-Core”プローブセットは変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞で有意に発現が上昇しているプローブに濃縮されていた (図 17b)。全てのプローブセットを解析した場合にも、この有意な発現の差はみられていた (図 17c)。さらに、有意に異なって発現がみられている”Core”セットのプローブは、mock ベクターを導入した HeLa 細胞に比べると、正常型を導入した HeLa 細胞では発現が上昇していて、変異型を導入した HeLa 細胞では発現が低下している傾向があった。”non-Core”セットのプローブでは逆の傾向がみられていた。この結果から正常型 U2AF1 は正しく RNA スプライシングを促進していたが、変異 U2AF1 では正しいスプライシングが阻害され、”non-Core”すなわちイントロンの可能性が高いシーケンスがスプライスされずに残っていると考えられた。

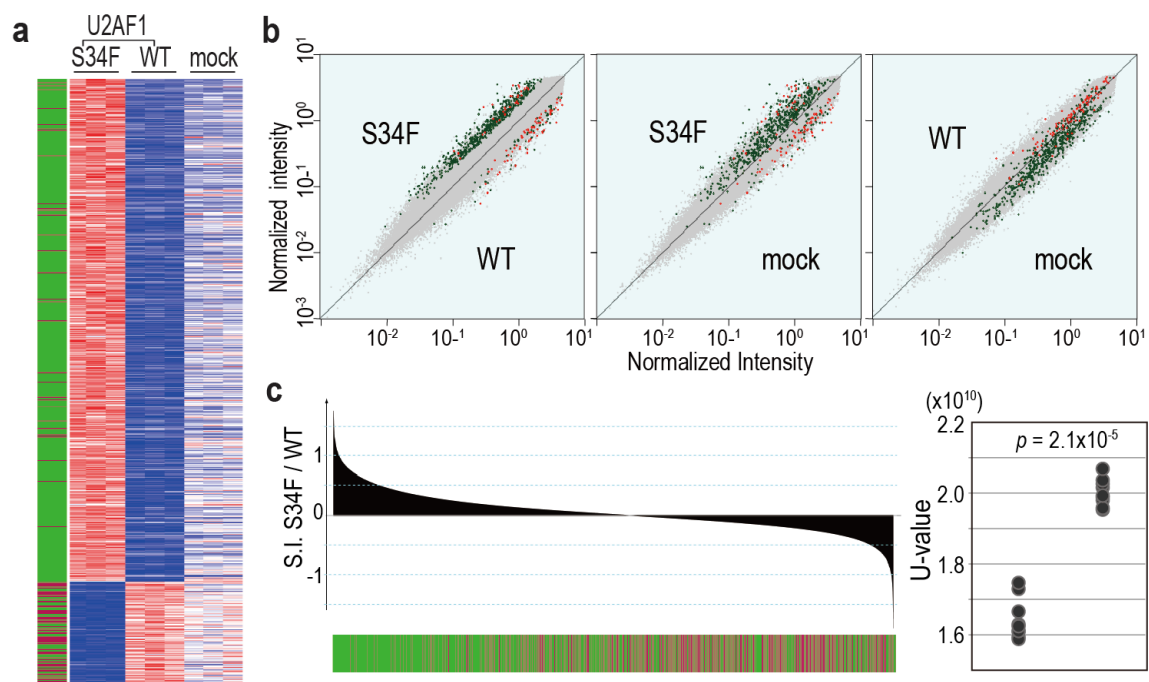


図 17 エクソンアレイ解析で検出された変異 U2AF1 によって起こった RNA スプライシング異常

a. エクソンアレイ解析で変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞で正常型 U2AF1 あるいは mock を導入した HeLa 細胞と比較して有意に発現が上昇あるいは低下しているプローブセットを heat map で示した。**b.** 細胞間での全プローブ（灰色）の正規化した intensity の pair-wise scatter plot を示した。正常型と変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞では”Core”セット（赤）と”non-Core”セット（緑）のプローブは有意に異なったパターンで発現されていた。**c.** 全てのプローブを splicing index($S.I. = \log_2(\text{変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞での正規化した intensity} / \text{正常型で U2AF1 を導入した HeLa 細胞での正規化した intensity})$)の順に並べた場合の”Core”セット（赤）と”non-Core”セット（緑）のプローブの分布を示した（左）。変異型および正常型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞での異なったプローブセットが濃縮されるパターンは Mann-Whitney U test により有意であると確認された（右）。

さらに、変異 U2AF1 を導入した細胞において異常なスプライシングが起きていることを直接的に示すために、正常型あるいは変異型 U2AF1 をドキシサイクリンで誘導した HeLa 細胞の次世代シーケンサーによる RNA シーケンスを行った。まず、正常型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞ではより多くのリードがエクソン上にマッピングされ、その他の部位にマッピングされるリードは変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞に比べて少なかった (図 18a)。変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞では正常 U2AF1 を導入した HeLa 細胞に比べてより広範なゲノム部位にリードがマップされ、これらの多くは非エクソン由来のリードと考えられた (図 18b)。最後に、真のエクソン/イントロン境界をまたいでいるリードは正常型 U2AF1 を導入した細胞に比べて変異 U2AF1 を導入した細胞で有意に増加していた (図 18c)。これらの結果から、変異 U2AF1 により実際に RNA スプライシングが広範囲に阻害されていることが示された。変異型 U2AF1 を導入した細胞でスプライスされなかったイントロンが残っている典型的な遺伝子の例を示した (図 19)。

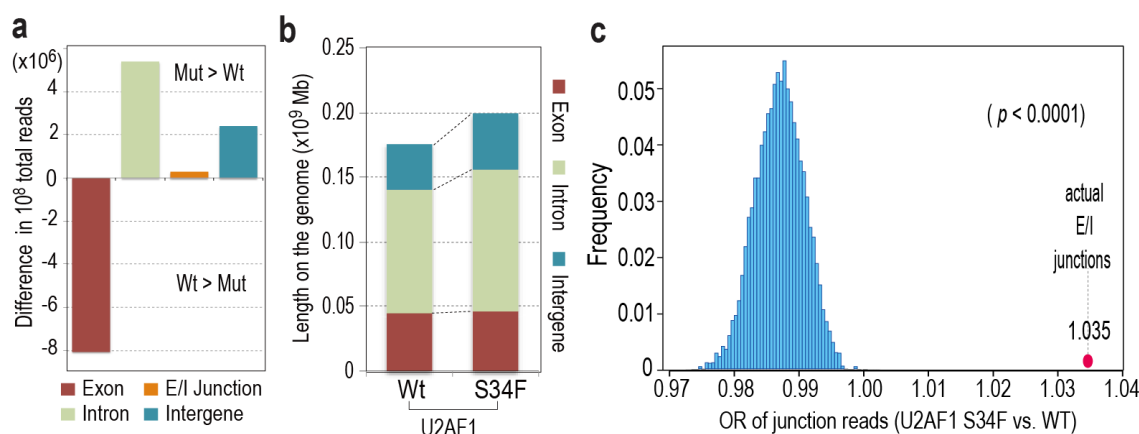


図 18 RNA シーケンスで検出された変異 U2AF1 によって起こった RNA スプライシング異常

a. 10⁸ リードあたりの正常型および変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞の間のそれぞれのゲノム領域にマッピングされたリード数の差を示した。正常型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞ではより多くのリードがエクソン上にマッピングされ（下部）、その他の部位にマッピングされるリードは変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞に比べて少なかった（上部）。**b.** ランダムに抽出した 10⁸ リードでそれぞれの細胞でカバーされていたゲノム領域のサイズを示した（10 回の独立した実験の平均値）。変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞では正常 U2AF1 を導入した HeLa 細胞に比べてより広範なゲノム部位にリードがマップされ、とくにイントロン領域にマッピングされるリードが多く、スプライスされなかったイントロンの残存と考えられた。**c.** 正常型および変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞の間での真のエクソン/イントロン境界をまたいでいるリードの増加のオッズ比を赤い丸で示し、同じ数のエクソン/イントロン境界をまたいでいるリード数を持っているとした帰無仮説を立てた場合に 10,000 回シミュレーションした場合のオッズ比の分布（青のヒストグラム）と比較した結果、有意に増加していると考えられた。

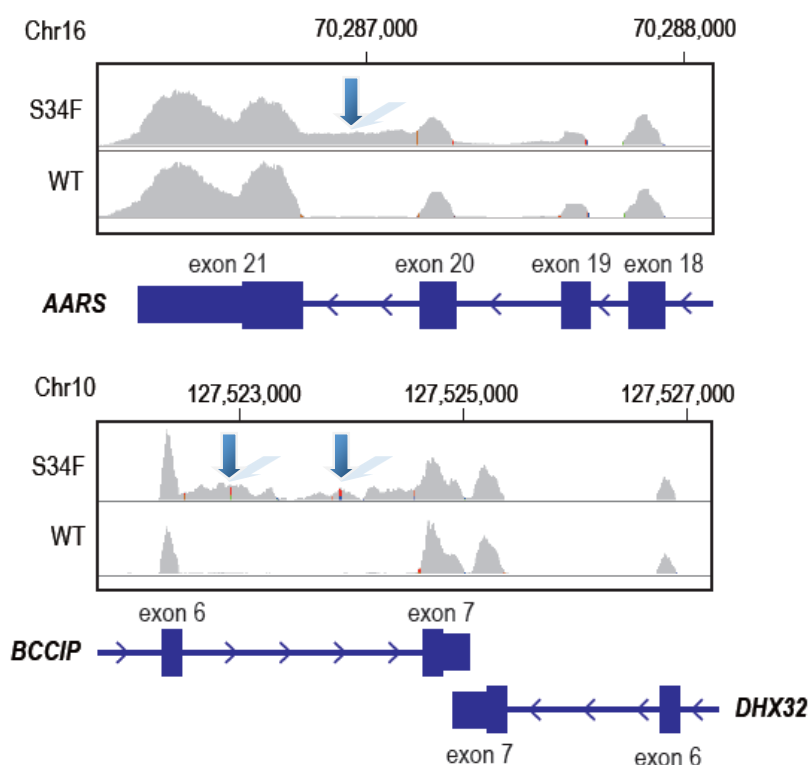


図 19 RNA シーケンスにおいて変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞で異常なスプライシングが観察された典型例

変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞（それぞれの遺伝子の上部）では正常型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞（それぞれの遺伝子の下部）ではみられなかったスプライシングされなかったイントロン（矢印）にマッピングされるリードが検出されている。

RNA スプライシング因子の変異の生物学的意義

最後に、RNA スプライシング因子の遺伝子変異による細胞学的な効果を検討した。まず、テトラサイクリン誘導プロモーター下の正常 U2AF1 あるいは変異 U2AF1 をレンチウイルスベクターで HeLa 細胞に導入して、発現誘導後の細胞増殖を検討した（図 20）。その結果、予想に反してドキシサイクリンで変異 U2AF1 の発現を誘導した細胞では細胞増殖の抑制がみられた。TF-1 細胞でも

同様の結果が観察された (図 21)。また、G2/M 期にある細胞の割合が増殖し (G2/M 停止)、sub-G1 期にある細胞が増加し Annexin V 陽性の細胞が増えていたことからアポトーシスが増加していると考えられた (図 22)。一方、正常型 U2AF1 の発現を誘導した細胞では増殖の抑制はみられなかった (図 20b、21b)。

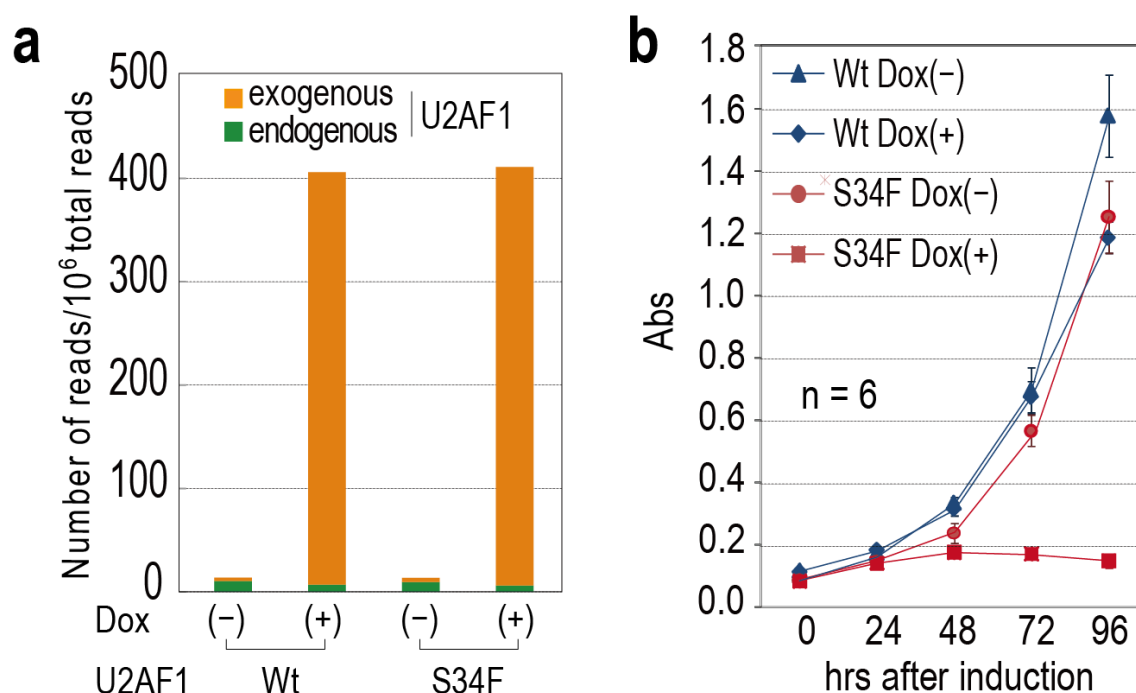


図 20 変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞の増殖アッセイ

a. 正常型および変異型 U2AF1 を HeLa 細胞にレンチウイルスベクターで導入した。RNA シーケンスで内因性および外因性の U2AF1 の発現を確認した。FLAG 配列の有無により内因性と外因性の U2AF1 配列を区別し、それぞれのリード数を算出した。**b.** ドキシサイクリンで正常型および変異型 U2AF1 を発現誘導した HeLa 細胞の増殖を測定した。細胞数は Cell counting kit により吸光度として測定され、平均値と標準偏差を表示した。

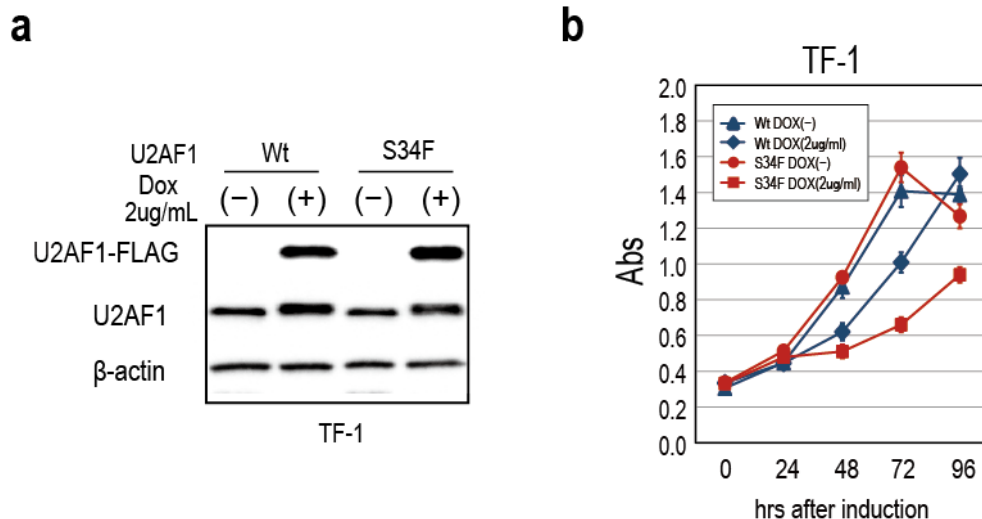


図 21 変異 U2AF1 を導入した TF-1 細胞の増殖アッセイ

a. 正常型および変異型 U2AF1 を TF-1 細胞にレンチウイルスベクターで導入した。Western blot 法によりドキシサイクリン誘導後の正常型、変異型 U2AF1 の発現を抗 FLAG 抗体、抗 U2AF1 抗体を用いて確認した。**b.** ドキシサイクリンで正常型および変異型 U2AF1 を発現誘導した TF-1 細胞の増殖を測定した。

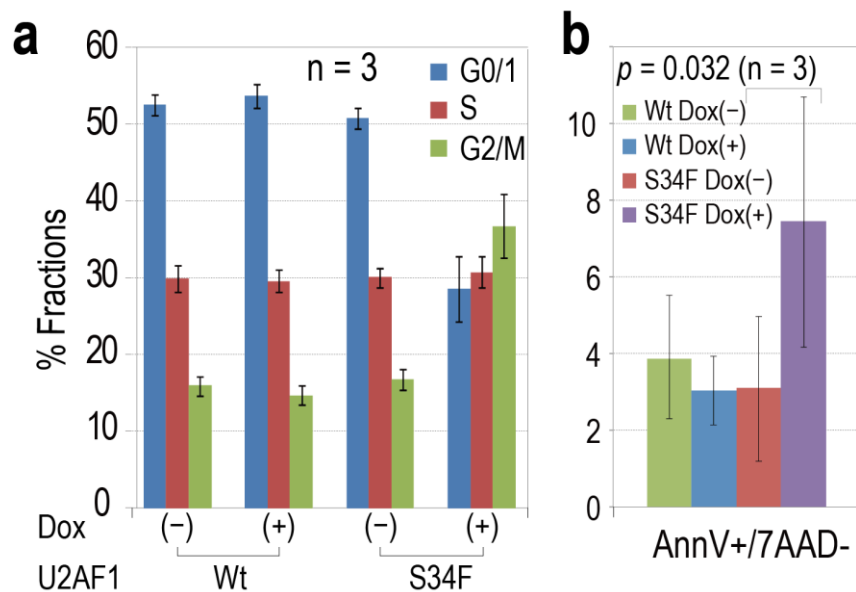


図 22 変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞の細胞周期、アポトーシス解析

a. HeLa 細胞にドキシサイクリンで正常型および変異型 U2AF1 を発現誘導し、propidium iodide (PI) 染色で染まった HeLa 細胞をフローサイトメトリーにより各細胞周期にある細胞の割合を測定し、平均値と標準偏差を示した。**b.** 正常型および変異型 U2AF1 をドキシサイクリンにより発現誘導する前後の HeLa 細胞における 7-amino-actinomycin 陰性 (7AAD) annexin V 陽性 (AnnV+) のアポトーシス細胞の割合を測定し、平均値と標準偏差を示した。サンプル間の差の有意性については paired t-test で検定した。

さらに、変異 U2AF1 による細胞増殖の抑制を *in vitro* で確認するため、マウスの造血幹細胞が存在している分画である CD34 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lineage marker 陰性 (CD34-KSL) 細胞⁵² を C57BL/6(B6)-Ly5.1 マウス骨髄から分離し、レトロウイルスベクターを用いて EGFP マーカーで標識した正常型 U2AF1、変異型 (S34F、Q157P あるいは Q157R) U2AF1 あるいは mock ベクターを導入した。これらの細胞の造血系を再構成する能力について、競合的造血再構築能アッセイで調べた。B6-Ly5.1/5.2 F1 由来の競合細胞と共に致死量の放射線照射をした B6-Ly52 マウスに骨髄移植を行い、移植後 6 週間後に末梢血で GFP 陽性のドナー由来細胞のキメリズムをフローメトリーで解析した (図 23)。それぞれのレシピエントマウスが同等数の GFP 陽性細胞を移植されることが確認され、またそれぞれの CD34-KSL 細胞間で transwell assay では遊走能に優位な差はなかった。結果、正常型 U2AF1 を導入した細胞は mock ベクターを導入した CD34-KSL 細胞に比べてわずかに再構成能が高かった。一方、変異 U2AF1 を導入した CD34-KSL では mock あるいは正常 U2AF1 を導入した CD34-KSL 細胞に比べて有意にキメリズムが低下しており、変異 U2AF1 を発現した造血幹細胞あるいは前駆細胞では造血再構成能が低下していることが示唆された。

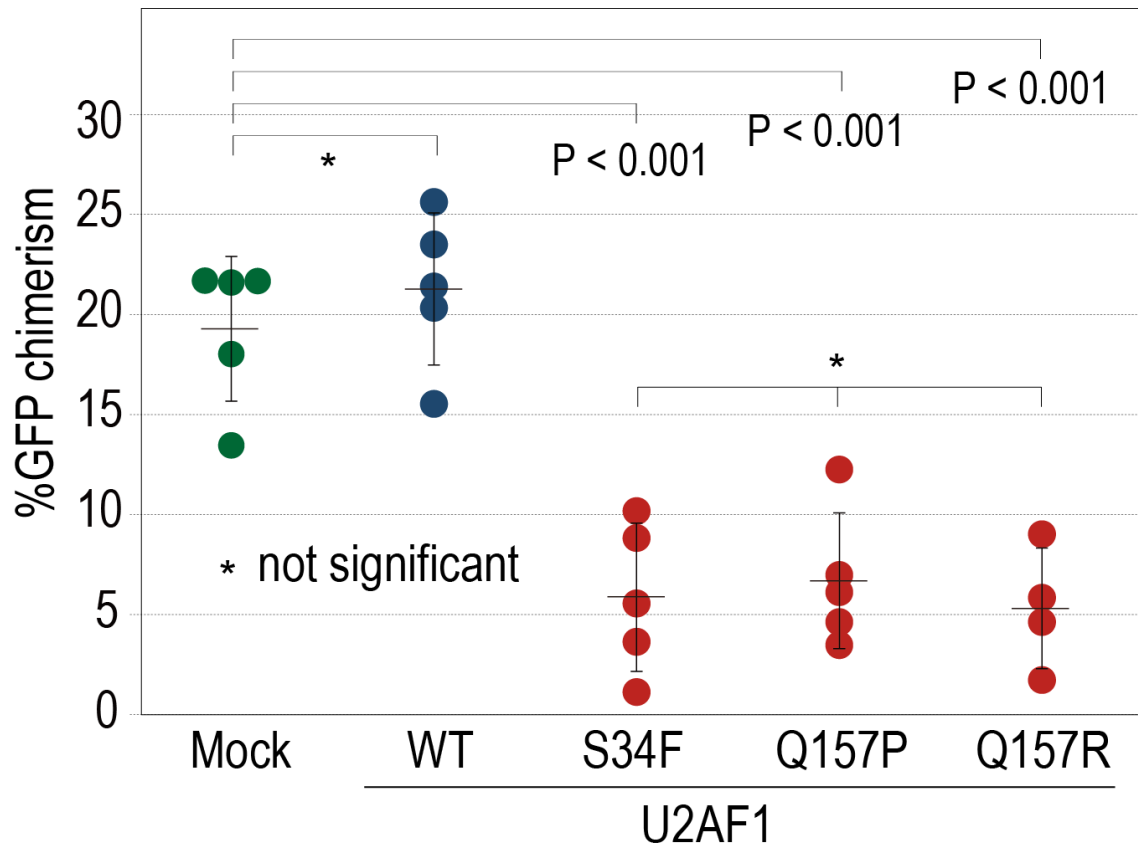


図 23 様々な変異 U2AF1 を導入した CD34-KSL 細胞を用いた競合的造血再構築能アッセイ

移植後 6 週間後での末梢血の EGFP 陽性 Ly 5,1 細胞の割合によりキメリズムを測定し、平均値と標準偏差を表示した。サンプル間の差の有意性を paired t-test により検定した。変異 U2AF1 を導入した CD34-KSL では mock あるいは正常 U2AF1 を導入した CD34-KSL 細胞に比べて有意にキメリズムが低下しており、変異 U2AF1 を発現した造血幹細胞あるいは前駆細胞では造血再構成能が低下していることが示唆された。

考察

今回の研究で MDS をはじめとする myelodysplasia の全エクソンシーケンスにより myelodysplasia では病型により 45%から 85%と高頻度に RNA スプライシング経路の遺伝子変異がみられることが明らかになり、次世代シーケンサーによる遺伝子解析ががん研究において極めて有用であることが示された。

RNA スプライシングは正しい転写が行わるために必須の細胞機構であり、また選択的スプライシングにより限られた数の遺伝子から複数の mRNA が発現することにより組織あるいは種特異的な分化のパターンを生み出す重要なメカニズムである⁵³。従って、RNA スプライシングの精密な調整が細胞の恒常性を維持するためには必須であると考えられ⁵⁴、この調節の破綻により重症の発達異常をきたす疾患も知られている^{55,56}。今回の myelodysplasia における高頻度の RNA スプライシング因子の遺伝子変異はどのようにしてがんが重要な細胞機構を標的にして発症するかを示した新たな発見である¹⁹。また、従来から MDS などの造血器腫瘍も含めてがんにおける特異的な選択的スプライシングがみられ、がんの発症と関連付けられていたことから興味深い発見である^{57,58}。

Myelodysplasia では遺伝子変異の主な標的はスプライセオソーム E/A 複合体を構成する *SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1*、*ZRSR2* などの遺伝子に局限していて、高頻度かつ特異的に myelodysplasia において変異が観察された。また、変異が見

られる症例では排他的にみられていたことから、RNA スプライシング因子の遺伝子変異は myelodysplasia という疾患群の顕著な特徴で、発症に中心的な役割を果たしていることが考えられた。

変異が同定されたスプライシング因子の多くが 3' スプライス部位の認識に関わるものであったことから、変異が起こる結果様々な遺伝子において RNA スプライシングが障害されていることが推測されたが、実際に変異 U2AF1 を HeLa 細胞に導入すると様々なスプライシング異常が広範囲な遺伝子にわたって起こり (図 24)、スプライスされなかったイントロンが残った転写産物が増加していた。

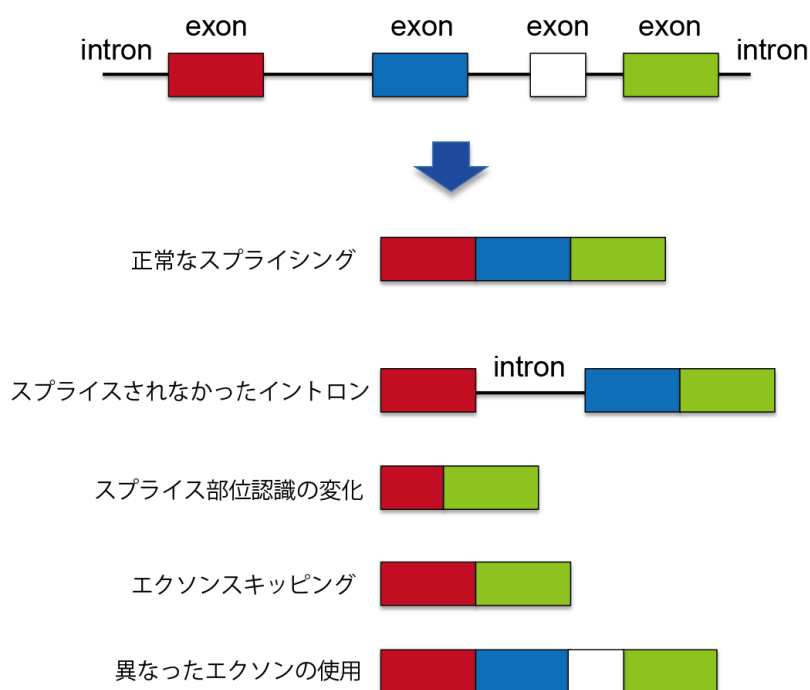


図 24 RNA スプライシング因子の遺伝子の変異によっておこる様々なタイプのスプライシング異常

変異 U2AF1 遺伝子の導入によって様々なタイプの RNA スプライシングの異常が観察された。(著者作成)

一方、RNA スプライシング因子の遺伝子変異によりどのように MDS が発症するのかについてはまだ十分にはわかっていない。変異型 U2AF1 は細胞増殖における優位性の獲得やクローン性の獲得につながるのではなく、むしろ細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが示された。ZRSR2 遺伝子の HeLa 細胞におけるノックダウン実験でも生存能力が低下することが報告されており⁴⁶、RNA スプライシング経路の変異による共通の結果であると考えられた。したがって、スプライシング経路の遺伝子変異は従来からよく知られているキナーゼやシグナル伝達分子の遺伝子変異のような典型的ながん遺伝子とは異なったメカニズムで発癌に関わっていると考えられた。ここで注目すべきは、MDS で共通する臨床的特徴は無制限な増殖ではなく、アポトーシスの増加に起因する無効造血による多系統にわたる汎血球減少であることである。また、MDS の病型の一つである 5q-症候群においては 5 番染色体長腕にある RPS14 遺伝子のハプロ不全により、骨髓増殖ではなく赤芽球系前駆細胞のアポトーシスが増加することにより発症していると報告されている⁵⁹。

今回の発見と同時期に他のグループからも SF3B1⁶⁰、U2AF1⁶¹ 遺伝子の変異が報告され、さらにいくつかのグループが RNA スプライシング変異について MDS および関連する骨髓腫瘍で調べ、同様に高頻度の変異が確認された⁶²⁻⁶⁵。また、今回の研究では同定された RNA スプライシング因子と予後との関係に

については明らかにすることはできなかったが、MDSにおいては遺伝子変異と予後が強く相関することが報告されており⁶⁶、RNA スプライシング因子の遺伝子変異と予後の関係を明らかにすることは重要である。その後の報告で *SF3B1* 遺伝子については予後良好因子であり⁶⁷、*U2AF1* や *SRSF2* については予後不良因子であると報告された^{61,63,64,68}。*ZRSR2* 遺伝子では予後への有意な影響は観察されなかった⁶⁹。一方で、従来から MDS の患者の予後予測には International Prognostic Scoring System (IPSS)⁷⁰ あるいは最近では Revised IPSS (IPSS-R)⁷¹ が用いられてきたが、これらの中では染色体異常については考慮されているものの、遺伝子変異については反映されていなかった。そこで、最近では大規模コホートでこれらのスプライシング遺伝子などの多数の遺伝子変異について検討し、遺伝子変異の情報を取り入れて予後予測を改善させる試みが行われている^{69,72}。現在、International Working Group for Prognosis in MDS (IWG-PM)でも臨床データ、血液学的データに分子異常のパラメーターを含めた予後予測システム IPSS-Mol を作成する準備を始めている¹。

今後、RNA スプライシング因子の変異によりどのようなメカニズムで MDS を発症するのかについてはさらなる研究が必要である。MDS を発症するために特定の標的遺伝子の RNA スプライシングが障害されているのか、あるいはマウスモデルを用いた RNA スプライシング因子の変異による生物学的な効果の

解析が必要である。また、*SF3B1* 遺伝子変異は慢性リンパ性白血病でも高頻度に変異が報告されており^{73,74}、また *SF3B1*、*U2AF1* 遺伝子変異については固形腫瘍でも低頻度ながら報告がみられ⁷⁵⁻⁷⁷、同じ遺伝子変異により、どのようなメカニズムで異なった疾患を発症するのかについても興味深い。

また、RNA スプライシング因子の遺伝子の治療標的としての可能性についても検討が必要であるが、SF3B 複合体を阻害することにより抗癌活性を有する RNA スプライシング阻害剤が知られている⁷⁸⁻⁸¹。これまで報告されている *U2AF1*、*SRSF2*、*SF3B1* 遺伝子の変異は全て heterozygous 変異であり、また Sf3b1 の homozygous knockout mouse が胎生致死であった。従って、スプライシング変異がある細胞にスプライシング阻害剤を使用すると、*BRCA* 変異を持つ腫瘍に同じ DNA repair pathway を阻害する PARP inhibitor が効果的であるように（合成致死性、synthetic lethality）⁸²、変異がない細胞に比べてより効果的であるという仮説が考えられた（図 25）。MDS などの RNA スプライシング因子の遺伝子変異を持つがんでの RNA スプライシング阻害剤の治療への応用が期待されている⁸³。

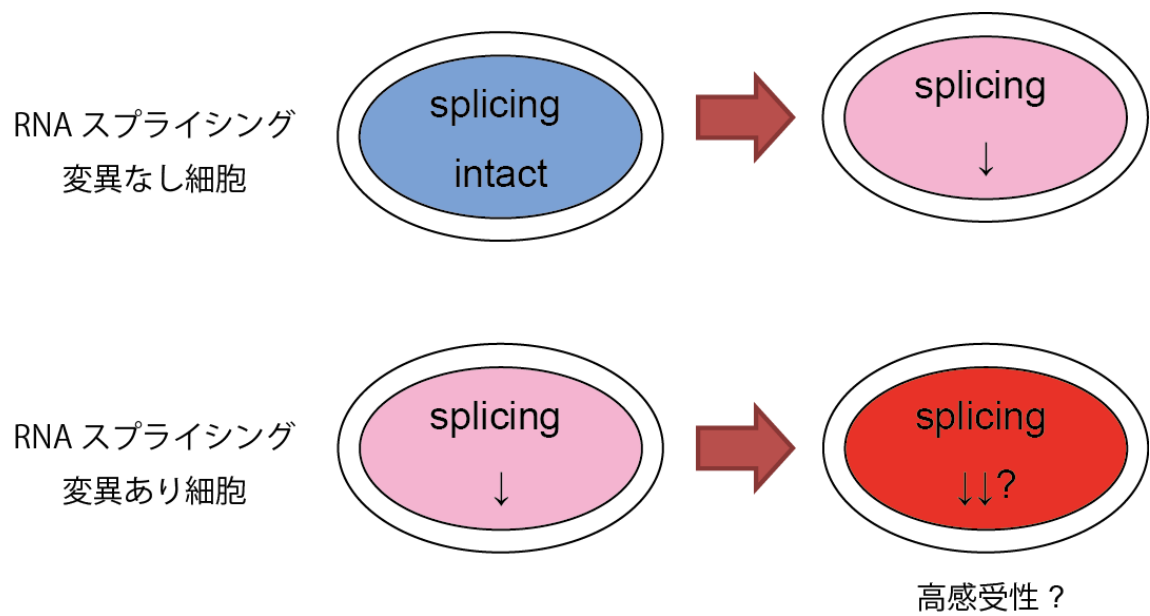


図 25 RNA スプライシング因子の治療標的としての可能性

RNA スプライシングの因子の変異を持った腫瘍細胞は変異によって RNA スプライシングが障害されているため、RNA スプライシングの阻害剤に感受性が高いと推測される。(著者作成)

引用文献

1. Cazzola, M., Della Porta, M.G. & Malcovati, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood* **122**, 4021-4034 (2013).
2. Ma, X., Does, M., Raza, A. & Mayne, S.T. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer* **109**, 1536-42 (2007).
3. Swerdlow, S.H., Jaffe, E.S., International Agency for Research on Cancer. & World Health Organization. *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*, 439 p. (International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008).
4. Hirai, H., Kobayashi, Y., Mano, H., Hagiwara, K., Maru, Y., Omine, M., Mizoguchi, H., Nishida, J., & Takaku, F. A point mutation at codon 13 of the N-ras oncogene in myelodysplastic syndrome. *Nature* **327**, 430-2 (1987).
5. Sugimoto, K., Hirano, N., Toyoshima, H., Chiba, S., Mano, H., Takaku, F., Yazaki, Y., & Hirai, H. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. *Blood* **81**, 3022-6 (1993).
6. Song, W. J., Sullivan, M. G., Legare, R. D., Hutchings, S., Tan, X., Kufrin, D., Ratajczak, J., Resende, I. C., Haworth, C., Hock, R., Loh, M., Felix, C., Roy, D. C., Busque, L., Kurnit, D., Willman, C., Gewirtz, A. M., Speck, N. A.,

- Bushweller, J. H., Li, F. P., Gardiner, K., Poncz, M., Maris, J. M., & Gilliland, D. G. Haploinsufficiency of CBFA2 causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nat Genet* **23**, 166-75 (1999).
7. Osato, M. Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia. *Oncogene* **23**, 4284-96 (2004).
 8. Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adelaide, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carbuccia, N., Lagarde, A., Prebet, T., Nezri, M., Sainty, D., Olschwang, S., Xerri, L., Chaffanet, M., Mozziconacci, M. J., Vey, N., & Birnbaum, D. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* **145**, 788-800 (2009).
 9. Dunbar, A. J., Gondek, L. P., O'Keefe, C. L., Makishima, H., Rataul, M. S., Szpurka, H., Sekeres, M. A., Wang, X. F., McDevitt, M. A., & Maciejewski, J. P. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res* **68**, 10349-57 (2008).
 10. Grand, F. H., Hidalgo-Curtis, C. E., Ernst, T., Zoi, K., Zoi, C., McGuire, C.,

- Kreil, S., Jones, A., Score, J., Metzgeroth, G., Oscier, D., Hall, A., Brandts, C., Serve, H., Reiter, A., Chase, A. J., & Cross, N. C. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* **113**, 6182-92 (2009).
11. Sanada, M., Suzuki, T., Shih, L. Y., Otsu, M., Kato, M., Yamazaki, S., Tamura, A., Honda, H., Sakata-Yanagimoto, M., Kumano, K., Oda, H., Yamagata, T., Takita, J., Gotoh, N., Nakazaki, K., Kawamata, N., Onodera, M., Nobuyoshi, M., Hayashi, Y., Harada, H., Kurokawa, M., Chiba, S., Mori, H., Ozawa, K., Omine, M., Hirai, H., Nakauchi, H., Koeffler, H. P., & Ogawa, S. Gain-of-function of mutated C-CBL tumour suppressor in myeloid neoplasms. *Nature* **460**, 904-8 (2009).
 12. Walter, M. J., Ding, L., Shen, D., Shao, J., Grillot, M., McLellan, M., Fulton, R., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Kandoth, C., Baty, J., Westervelt, P., DiPersio, J. F., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Ley, T. J., & Graubert, T. A. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **25**, 1153-8 (2011).
 13. Yoshida, K., Sanada, M., Kato, M., Kawahata, R., Matsubara, A., Takita, J., Shih, L. Y., Mori, H., Koeffler, H. P., & Ogawa, S. A nonsense mutation of IDH1

- in myelodysplastic syndromes and related disorders. *Leukemia* **25**, 184-6 (2010).
14. Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Masse, A., Kosmider, O., Le Couedic, J. P., Robert, F., Alberdi, A., Lecluse, Y., Plo, I., Dreyfus, F. J., Marzac, C., Casadevall, N., Lacombe, C., Romana, S. P., Dessen, P., Soulier, J., Viguie, F., Fontenay, M., Vainchenker, W., & Bernard, O. A.. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med* **360**, 2289-301 (2009).
 15. Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., Stevens-Linders, E., van Hoogen, P., van Kessel, A. G., Raymakers, R. A., Kamping, E. J., Verhoef, G. E., Verburgh, E., Hagemeijer, A., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B. A., & Jansen, J. H. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **41**, 838-42 (2009).
 16. Nikoloski, G., Langemeijer, S. M., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tonnissen, E. R., van der Heijden, A., Scheele, T. N., Vandenberghe, P., de Witte, T., van der Reijden, B. A., & Jansen, J. H. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **42**, 665-7 (2010).
 17. Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V.,

- Waghorn, K., Zoi, K., Ross, F. M., Reiter, A., Hochhaus, A., Drexler, H. G., Duncombe, A., Cervantes, F., Oscier, D., Boultonwood, J., Grand, F. H., & Cross, N. C. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* **42**, 722-6 (2010).
18. Bejar, R., Levine, R. & Ebert, B.L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* **29**, 504-15 (2011).
 19. Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V. E., Zhou, S., Diaz, L. A., Jr., & Kinzler, K. W. Cancer genome landscapes. *Science* **339**, 1546-58 (2013).
 20. Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczy, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C.,

Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H.,
 Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R.,
 Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissoe, S. L., Wendl,
 M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L.
 L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T.,
 Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N.,
 Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs,
 R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K.
 C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R.
 S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada,
 T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T.,
 Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T.,
 Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L.,
 Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer,
 M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G.,
 Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A.,
 Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood,
 J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima,

S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H.,
 Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M.,
 Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind,
 L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglou, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G.,
 Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R.,
 Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G.,
 Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang,
 W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W.
 J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M.,
 McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting,
 C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski,
 J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R.,
 Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer,
 M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M.
 J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., & Chen, Y.
 J. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921
 (2001).

21. Metzker, M.L. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* **11**,

- 31-46 (2010).
22. Yoshida, K., Sanada, M. & Ogawa, S. Deep sequencing in cancer research. *Jpn J Clin Oncol* **43**, 110-5 (2012).
23. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* **26**, 1135-45 (2008).
24. Meyerson, M., Gabriel, S. & Getz, G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet* **11**, 685-96 (2010).
25. Bamshad, M. J., Ng, S. B., Bigham, A. W., Tabor, H. K., Emond, M. J., Nickerson, D. A., & Shendure, J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* **12**, 745-55 (2010).
26. Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E., & Kinzler, K. W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**,

1807-12 (2008).

27. Tiacci, E., Trifonov, V., Schiavoni, G., Holmes, A., Kern, W., Martelli, M. P., Pucciarini, A., Bigerna, B., Pacini, R., Wells, V. A., Sportoletti, P., Pettirossi, V., Mannucci, R., Elliott, O., Liso, A., Ambrosetti, A., Pulsoni, A., Forconi, F., Trentin, L., Semenzato, G., Inghirami, G., Capponi, M., Di Raimondo, F., Patti, C., Arcaini, L., Musto, P., Pileri, S., Haferlach, C., Schnittger, S., Pizzolo, G., Foa, R., Farinelli, L., Haferlach, T., Pasqualucci, L., Rabadan, R., & Falini, B. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. *N Engl J Med* **364**, 2305-15 (2011).
28. Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C. K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M. L., Teague, J., Bignell, G., Butler, A., Cho, J., Dalglish, G. L., Galappaththige, D., Greenman, C., Hardy, C., Jia, M., Latimer, C., Lau, K. W., Marshall, J., McLaren, S., Menzies, A., Mudie, L., Stebbings, L., Largaespada, D. A., Wessels, L. F., Richard, S., Kahnoski, R. J., Anema, J., Tuveson, D. A., Perez-Mancera, P. A., Mustonen, V., Fischer, A., Adams, D. J., Rust, A., Chan-on, W., Subimerb, C., Dykema, K., Furge, K., Campbell, P. J., Teh, B. T., Stratton, M. R., & Futreal, P. A. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* **469**, 539-42 (2011).

29. Yan, X. J., Xu, J., Gu, Z. H., Pan, C. M., Lu, G., Shen, Y., Shi, J. Y., Zhu, Y. M., Tang, L., Zhang, X. W., Liang, W. X., Mi, J. Q., Song, H. D., Li, K. Q., Chen, Z., & Chen, S. J. Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nat Genet* **43**, 309-15 (2011).
30. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-60 (2009).
31. Bevilacqua, L., Doly, S., Kaprio, J., Yuan, Q., Tikkanen, R., Paunio, T., Zhou, Z., Wedenoja, J., Maroteaux, L., Diaz, S., Belmer, A., Hodgkinson, C. A., Dell'osso, L., Suvisaari, J., Coccaro, E., Rose, R. J., Peltonen, L., Virkkunen, M., & Goldman, D. A population-specific HTR2B stop codon predisposes to severe impulsivity. *Nature* **468**, 1061-6 (2010).
32. Calvo, S. E., Tucker, E. J., Compton, A. G., Kirby, D. M., Crawford, G., Burt, N. P., Rivas, M., Guiducci, C., Bruno, D. L., Goldberger, O. A., Redman, M. C., Wiltshire, E., Wilson, C. J., Altshuler, D., Gabriel, S. B., Daly, M. J., Thorburn, D. R., & Mootha, V. K. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet* **42**, 851-8 (2010).

33. Nannya, Y., Sanada, M., Nakazaki, K., Hosoya, N., Wang, L., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Bailey, D. K., Kennedy, G. C., & Ogawa, S. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* **65**, 6071-9 (2005).
34. Yamamoto, G., Nannya, Y., Kato, M., Sanada, M., Levine, R. L., Kawamata, N., Hangaishi, A., Kurokawa, M., Chiba, S., Gilliland, D. G., Koeffler, H. P., & Ogawa, S. Highly sensitive method for genomewide detection of allelic composition in nonpaired, primary tumor specimens by use of affymetrix single-nucleotide-polymorphism genotyping microarrays. *Am J Hum Genet* **81**, 114-26 (2007).
35. Lee, W., Jiang, Z., Liu, J., Haverty, P. M., Guan, Y., Stinson, J., Yue, P., Zhang, Y., Pant, K. P., Bhatt, D., Ha, C., Johnson, S., Kennemer, M. I., Mohan, S., Nazarenko, I., Watanabe, C., Sparks, A. B., Shames, D. S., Gentleman, R., de Sauvage, F. J., Stern, H., Pandita, A., Ballinger, D. G., Drmanac, R., Modrusan, Z., Seshagiri, S., & Zhang, Z. The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature* **465**, 473-7 (2010).
36. Shah, S. P., Morin, R. D., Khattra, J., Prentice, L., Pugh, T., Burleigh, A., Delaney, A., Gelmon, K., Guliany, R., Senz, J., Steidl, C., Holt, R. A., Jones, S.,

- Sun, M., Leung, G., Moore, R., Severson, T., Taylor, G. A., Teschendorff, A. E., Tse, K., Turashvili, G., Varhol, R., Warren, R. L., Watson, P., Zhao, Y., Caldas, C., Huntsman, D., Hirst, M., Marra, M. A., & Aparicio, S. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature* **461**, 809-13 (2009).
37. Chapman, M. A., Lawrence, M. S., Keats, J. J., Cibulskis, K., Sougnez, C., Schinzel, A. C., Harview, C. L., Brunet, J. P., Ahmann, G. J., Adli, M., Anderson, K. C., Ardlie, K. G., Auclair, D., Baker, A., Bergsagel, P. L., Bernstein, B. E., Drier, Y., Fonseca, R., Gabriel, S. B., Hofmeister, C. C., Jagannath, S., Jakubowiak, A. J., Krishnan, A., Levy, J., Liefeld, T., Lonial, S., Mahan, S., Mfuko, B., Monti, S., Perkins, L. M., Onofrio, R., Pugh, T. J., Rajkumar, S. V., Ramos, A. H., Siegel, D. S., Sivachenko, A., Stewart, A. K., Trudel, S., Vij, R., Voet, D., Winckler, W., Zimmerman, T., Carpten, J., Trent, J., Hahn, W. C., Garraway, L. A., Meyerson, M., Lander, E. S., Getz, G., & Golub, T. R. Initial genome sequencing and analysis of multiple myeloma. *Nature* **471**, 467-72 (2011).
38. Mardis, E. R., Ding, L., Dooling, D. J., Larson, D. E., McLellan, M. D., Chen, K., Koboldt, D. C., Fulton, R. S., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L.

- A., Locke, D. P., Magrini, V. J., Abbott, R. M., Vickery, T. L., Reed, J. S., Robinson, J. S., Wylie, T., Smith, S. M., Carmichael, L., Eldred, J. M., Harris, C. C., Walker, J., Peck, J. B., Du, F., Dukes, A. F., Sanderson, G. E., Brummett, A. M., Clark, E., McMichael, J. F., Meyer, R. J., Schindler, J. K., Pohl, C. S., Wallis, J. W., Shi, X., Lin, L., Schmidt, H., Tang, Y., Haipek, C., Wiechert, M. E., Ivy, J. V., Kalicki, J., Elliott, G., Ries, R. E., Payton, J. E., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Watson, M. A., Baty, J., Heath, S., Shannon, W. D., Nagarajan, R., Link, D. C., Walter, M. J., Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Wilson, R. K., & Ley, T. J. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med* **361**, 1058-66 (2009).
39. Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., Kandoth, C., Payton, J. E., Baty, J., Welch, J., Harris, C. C., Lichti, C. F., Townsend, R. R., Fulton, R. S., Dooling, D. J., Koboldt, D. C., Schmidt, H., Zhang, Q., Osborne, J. R., Lin, L., O'Laughlin, M., McMichael, J. F., Delehaunty, K. D., McGrath, S. D., Fulton, L. A., Magrini, V. J., Vickery, T. L., Hundal, J., Cook, L. L., Conyers, J. J., Swift, G. W., Reed, J. P., Alldredge, P. A., Wylie, T., Walker, J., Kalicki, J., Watson, M. A., Heath, S., Shannon, W. D., Varghese, N., Nagarajan, R., Westervelt, P., Tomasson, M. H., Link, D. C.,

- Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Mardis, E. R., & Wilson, R. K. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med* **363**, 2424-33 (2010).
40. Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordonez, G. R., Villamor, N., Escaramis, G., Jares, P., Bea, S., Gonzalez-Diaz, M., Bassaganyas, L., Baumann, T., Juan, M., Lopez-Guerra, M., Colomer, D., Tubio, J. M., Lopez, C., Navarro, A., Tornador, C., Aymerich, M., Rozman, M., Hernandez, J. M., Puente, D. A., Freije, J. M., Velasco, G., Gutierrez-Fernandez, A., Costa, D., Carrio, A., Guijarro, S., Enjuanes, A., Hernandez, L., Yague, J., Nicolas, P., Romeo-Casabona, C. M., Himmelbauer, H., Castillo, E., Dohm, J. C., de Sanjose, S., Piris, M. A., de Alava, E., San Miguel, J., Royo, R., Gelpi, J. L., Torrents, D., Orozco, M., Pisano, D. G., Valencia, A., Guigo, R., Bayes, M., Heath, S., Gut, M., Klatt, P., Marshall, J., Raine, K., Stebbings, L. A., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Campbell, P. J., Gut, I., Lopez-Guillermo, A., Estivill, X., Montserrat, E., Lopez-Otin, C., & Campo, E. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* **475**, 101-5 (2011).
41. Lawrence, M. S., Stojanov, P., Polak, P., Kryukov, G. V., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Carter, S. L., Stewart, C., Mermel, C. H., Roberts, S. A., Kiezun, A., Hammerman, P. S., McKenna, A., Drier, Y., Zou, L., Ramos, A. H.,

- Pugh, T. J., Stransky, N., Helman, E., Kim, J., Sougnez, C., Ambrogio, L.,
 Nickerson, E., Shefler, E., Cortes, M. L., Auclair, D., Saksena, G., Voet, D.,
 Noble, M., DiCara, D., Lin, P., Lichtenstein, L., Heiman, D. I., Fennell, T.,
 Imielinski, M., Hernandez, B., Hodis, E., Baca, S., Dulak, A. M., Lohr, J.,
 Landau, D. A., Wu, C. J., Melendez-Zajgla, J., Hidalgo-Miranda, A., Koren, A.,
 McCarroll, S. A., Mora, J., Lee, R. S., Crompton, B., Onofrio, R., Parkin, M.,
 Winckler, W., Ardlie, K., Gabriel, S. B., Roberts, C. W., Biegel, J. A., Stegmaier,
 K., Bass, A. J., Garraway, L. A., Meyerson, M., Golub, T. R., Gordenin, D. A.,
 Sunyaev, S., Lander, E. S., & Getz, G. et al. Mutational heterogeneity in cancer
 and the search for new cancer-associated genes. *Nature* **499**, 214-8 (2013).
42. Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S.,
 Biankin, A. V., Bignell, G. R., Bolli, N., Borg, A., Borresen-Dale, A. L., Boyault,
 S., Burkhardt, B., Butler, A. P., Caldas, C., Davies, H. R., Desmedt, C., Eils, R.,
 Eyfjord, J. E., Foekens, J. A., Greaves, M., Hosoda, F., Hutter, B., Ilcic, T.,
 Imbeaud, S., Imielinski, M., Jager, N., Jones, D. T., Jones, D., Knappskog, S.,
 Kool, M., Lakhani, S. R., Lopez-Otin, C., Martin, S., Munshi, N. C., Nakamura,
 H., Northcott, P. A., Pajic, M., Papaemmanuil, E., Paradiso, A., Pearson, J. V.,
 Puente, X. S., Raine, K., Ramakrishna, M., Richardson, A. L., Richter, J.,

- Rosenstiel, P., Schlesner, M., Schumacher, T. N., Span, P. N., Teague, J. W., Totoki, Y., Tutt, A. N., Valdes-Mas, R., van Buuren, M. M., van 't Veer, L., Vincent-Salomon, A., Waddell, N., Yates, L. R., Zucman-Rossi, J., Futreal, P. A., McDermott, U., Lichter, P., Meyerson, M., Grimmond, S. M., Siebert, R., Campo, E., Shibata, T., Pfister, S. M., Campbell, P. J., & Stratton, M. R. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-21 (2013).
43. Wahl, M.C., Will, C.L. & Luhrmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**, 701-18 (2009).
44. Turunen, J.J., Niemela, E.H., Verma, B. & Frilander, M.J. The significant other: splicing by the minor spliceosome. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **4**, 61-76 (2013).
45. Tronchere, H., Wang, J. & Fu, X.D. A protein related to splicing factor U2AF35 that interacts with U2AF65 and SR proteins in splicing of pre-mRNA. *Nature* **388**, 397-400 (1997).
46. Shen, H., Zheng, X., Luecke, S. & Green, M.R. The U2AF35-related protein Urp contacts the 3' splice site to promote U12-type intron splicing and the second step of U2-type intron splicing. *Genes Dev* **24**, 2389-94 (2010).
47. Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstocker, M., Nosslinger, T., Hildebrandt, B., Kundgen, A., Lubbert, M., Kunzmann, R., Giagounidis, A. A., Aul, C.,

- Trumper, L., Krieger, O., Stauder, R., Muller, T. H., Wimazal, F., Valent, P., Fonatsch, C., & Steidl, C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* **110**, 4385-95 (2007).
48. Xiao, R., Sun, Y., Ding, J. H., Lin, S., Rose, D. W., Rosenfeld, M. G., Fu, X. D., & Li, X. Splicing regulator SC35 is essential for genomic stability and cell proliferation during mammalian organogenesis. *Mol Cell Biol* **27**, 5393-402 (2007).
49. Morin, R. D., Johnson, N. A., Severson, T. M., Mungall, A. J., An, J., Goya, R., Paul, J. E., Boyle, M., Woolcock, B. W., Kuchenbauer, F., Yap, D., Humphries, R. K., Griffith, O. L., Shah, S., Zhu, H., Kimbara, M., Shashkin, P., Charlot, J. F., Tcherpakov, M., Corbett, R., Tam, A., Varhol, R., Smailus, D., Moksa, M., Zhao, Y., Delaney, A., Qian, H., Birol, I., Schein, J., Moore, R., Holt, R., Horsman, D. E., Connors, J. M., Jones, S., Aparicio, S., Hirst, M., Gascoyne, R. D., & Marra, M. A. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* **42**, 181-5 (2010).
50. Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L.,

- Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-50 (2005).
51. Maquat, L.E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 89-99 (2004).
 52. Ema, H., Morita, Y., Yamazaki, S., Matsubara, A., Seita, J., Tadokoro, Y., Kondo, H., Takano, H., & Nakauchi, H. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nat Protoc* **1**, 2979-87 (2006).
 53. Chen, M. & Manley, J.L. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 741-54 (2009).
 54. Ni, J. Z., Grate, L., Donohue, J. P., Preston, C., Nobida, N., O'Brien, G., Shiue, L., Clark, T. A., Blume, J. E., & Ares, M., Jr. Ultraconserved elements are associated with homeostatic control of splicing regulators by alternative splicing and nonsense-mediated decay. *Genes Dev* **21**, 708-18 (2007).
 55. Edery, P., Marcaillou, C., Sahbatou, M., Labalme, A., Chastang, J., Touraine, R., Tubacher, E., Senni, F., Bober, M. B., Nampoothiri, S., Jouk, P. S., Steichen, E.,

- Berland, S., Toutain, A., Wise, C. A., Sanlaville, D., Rousseau, F., Clerget-Darpoux, F., & Leutenegger, A. L. Association of TALS developmental disorder with defect in minor splicing component U4atac snRNA. *Science* **332**, 240-3 (2011).
56. He, H., Liyanarachchi, S., Akagi, K., Nagy, R., Li, J., Dietrich, R. C., Li, W., Sebastian, N., Wen, B., Xin, B., Singh, J., Yan, P., Alder, H., Haan, E., Wieczorek, D., Albrecht, B., Puffenberger, E., Wang, H., Westman, J. A., Padgett, R. A., Symer, D. E., & de la Chapelle, A. Mutations in U4atac snRNA, a component of the minor spliceosome, in the developmental disorder MOPD I. *Science* **332**, 238-40 (2011).
57. Pajares, M. J., Ezponda, T., Catena, R., Calvo, A., Pio, R., & Montuenga, L. M. Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* **8**, 349-57 (2007).
58. David, C.J. & Manley, J.L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* **24**, 2343-64 (2010).
59. Barlow, J. L., Drynan, L. F., Hewett, D. R., Holmes, L. R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A. L., Jolin, H. E., Pannell, R., Middleton, A. J., Wong, S. H., Warren, A. J., Wainscoat, J. S., Boulton, J., & McKenzie, A. N. A p53-dependent

mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q-syndrome. *Nat Med* **16**, 59-66 (2010).

60. Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boultonwood, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., Pellagatti, A., Wainscoat, J. S., Hellstrom-Lindberg, E., Gambacorti-Passerini, C., Godfrey, A. L., Rapado, I., Cvejic, A., Rance, R., McGee, C., Ellis, P., Mudie, L. J., Stephens, P. J., McLaren, S., Massie, C. E., Tarpey, P. S., Varela, I., Nik-Zainal, S., Davies, H. R., Shlien, A., Jones, D., Raine, K., Hinton, J., Butler, A. P., Teague, J. W., Baxter, E. J., Score, J., Galli, A., Della Porta, M. G., Travaglino, E., Groves, M., Tauro, S., Munshi, N. C., Anderson, K. C., El-Naggar, A., Fischer, A., Mustonen, V., Warren, A. J., Cross, N. C., Green, A. R., Futreal, P. A., Stratton, M. R., & Campbell, P. J. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med* **365**, 1384-95 (2011).
61. Graubert, T. A., Shen, D., Ding, L., Okeyo-Owuor, T., Lunn, C. L., Shao, J., Krysiak, K., Harris, C. C., Koboldt, D. C., Larson, D. E., McLellan, M. D., Dooling, D. J., Abbott, R. M., Fulton, R. S., Schmidt, H., Kalicki-Veizer, J., O'Laughlin, M., Grillot, M., Baty, J., Heath, S., Frater, J. L., Nasim, T., Link, D. C., Tomasson, M. H., Westervelt, P., DiPersio, J. F., Mardis, E. R., Ley, T. J., Wilson, R. K., & Walter, M. J. Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor

- in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* **44**, 53-7 (2011).
62. Damm, F., Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Renneville, A., Carbuccia, N., Hidalgo-Curtis, C., Della Valle, V., Couronne, L., Scourzic, L., Chesnais, V., Guerci-Bresler, A., Slama, B., Beyne-Rauzy, O., Schmidt-Tanguy, A., Stamatoullas-Bastard, A., Dreyfus, F., Prebet, T., de Botton, S., Vey, N., Morgan, M. A., Cross, N. C., Preudhomme, C., Birnbaum, D., Bernard, O. A., & Fontenay, M. Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 3211-8 (2012).
63. Thol, F., Kade, S., Schlarmann, C., Loffeld, P., Morgan, M., Krauter, J., Wlodarski, M. W., Kolking, B., Wichmann, M., Gorlich, K., Gohring, G., Bug, G., Ottmann, O., Niemeyer, C. M., Hofmann, W. K., Schlegelberger, B., Ganser, A., & Heuser, M. Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood* **119**, 3578-84 (2012).
64. Makishima, H., Visconte, V., Sakaguchi, H., Jankowska, A. M., Abu Kar, S., Jerez, A., Przychodzen, B., Bupathi, M., Guinta, K., Afable, M. G., Sekeres, M. A., Padgett, R. A., Tiu, R. V., & Maciejewski, J. P. Mutations in the spliceosome

- machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood* **119**, 3203-10 (2012).
65. Bejar, R., Stevenson, K. E., Caughey, B. A., Abdel-Wahab, O., Steensma, D. P., Galili, N., Raza, A., Kantarjian, H., Levine, R. L., Neuberg, D., Garcia-Manero, G., & Ebert, B. L. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol* **30**, 3376-82 (2012).
 66. Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., Kantarjian, H., Raza, A., Levine, R. L., Neuberg, D., & Ebert, B. L. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* **364**, 2496-506 (2011).
 67. Malcovati, L., Papaemmanuil, E., Bowen, D. T., Boultonwood, J., Della Porta, M. G., Pascutto, C., Travaglino, E., Groves, M. J., Godfrey, A. L., Ambaglio, I., Galli, A., Da Via, M. C., Conte, S., Tauro, S., Keenan, N., Hyslop, A., Hinton, J., Mudie, L. J., Wainscoat, J. S., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Campbell, P. J., Hellstrom-Lindberg, E., & Cazzola, M. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* **118**, 6239-46 (2011).

68. Wu, S. J., Kuo, Y. Y., Hou, H. A., Li, L. Y., Tseng, M. H., Huang, C. F., Lee, F. Y., Liu, M. C., Liu, C. W., Lin, C. T., Chen, C. Y., Chou, W. C., Yao, M., Huang, S. Y., Ko, B. S., Tang, J. L., Tsay, W., & Tien, H. F. The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution. *Blood* **120**, 3106-11 (2012).
69. Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., Yoshida, K., Roller, A., Nadarajah, N., Shiraishi, Y., Shiozawa, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Koeffler, H. P., Klein, H. U., Dugas, M., Aburatani, H., Kohlmann, A., Miyano, S., Haferlach, C., Kern, W., & Ogawa, S. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* **28**, 241-7 (2014).
70. Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., Sanz, M., Vallespi, T., Hamblin, T., Oscier, D., Ohyashiki, K., Toyama, K., Aul, C., Mufti, G., & Bennett, J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* **89**, 2079-88 (1997).
71. Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Sole, F., Bennett, J. M., Bowen, D., Fenaux, P., Dreyfus, F., Kantarjian, H., Kuendgen, A., Levis, A., Malcovati, L., Cazzola, M., Cermak, J., Fonatsch, C., Le Beau, M.

M., Slovak, M. L., Krieger, O., Luebbert, M., Maciejewski, J., Magalhaes, S. M., Miyazaki, Y., Pfeilstocker, M., Sekeres, M., Sperr, W. R., Stauder, R., Tauro, S., Valent, P., Vallespi, T., van de Loosdrecht, A. A., Germing, U., & Haase, D.

Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes.

Blood **120**, 2454-65 (2012).

72. Papaemmanuil, E., Gerstung, M., Malcovati, L., Tauro, S., Gundem, G., Van Loo, P., Yoon, C. J., Ellis, P., Wedge, D. C., Pellagatti, A., Shlien, A., Groves, M. J., Forbes, S. A., Raine, K., Hinton, J., Mudie, L. J., McLaren, S., Hardy, C., Latimer, C., Della Porta, M. G., O'Meara, S., Ambaglio, I., Galli, A., Butler, A. P., Walldin, G., Teague, J. W., Quek, L., Sternberg, A., Gambacorti-Passerini, C., Cross, N. C., Green, A. R., Boultonwood, J., Vyas, P., Hellstrom-Lindberg, E., Bowen, D., Cazzola, M., Stratton, M. R., & Campbell, P. J. (2013). Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood* **122**, 3616-27 (2013).

73. Wang, L., Lawrence, M. S., Wan, Y., Stojanov, P., Sougnez, C., Stevenson, K., Werner, L., Sivachenko, A., DeLuca, D. S., Zhang, L., Zhang, W., Vartanov, A. R., Fernandes, S. M., Goldstein, N. R., Folco, E. G., Cibulskis, K., Tesar, B.,

- Sievers, Q. L., Shefler, E., Gabriel, S., Hacohen, N., Reed, R., Meyerson, M., Golub, T. R., Lander, E. S., Neuberg, D., Brown, J. R., Getz, G., & Wu, C. J. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **365**, 2497-506 (2011).
74. Quesada, V., Conde, L., Villamor, N., Ordonez, G. R., Jares, P., Bassaganyas, L., Ramsay, A. J., Bea, S., Pinyol, M., Martinez-Trillos, A., Lopez-Guerra, M., Colomer, D., Navarro, A., Baumann, T., Aymerich, M., Rozman, M., Delgado, J., Gine, E., Hernandez, J. M., Gonzalez-Diaz, M., Puente, D. A., Velasco, G., Freije, J. M., Tubio, J. M., Royo, R., Gelpi, J. L., Orozco, M., Pisano, D. G., Zamora, J., Vazquez, M., Valencia, A., Himmelbauer, H., Bayes, M., Heath, S., Gut, M., Gut, I., Estivill, X., Lopez-Guillermo, A., Puente, X. S., Campo, E., & Lopez-Otin, C. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* **44**, 47-52 (2011).
75. Imielinski, M., Berger, A. H., Hammerman, P. S., Hernandez, B., Pugh, T. J., Hodis, E., Cho, J., Suh, J., Capelletti, M., Sivachenko, A., Sougnez, C., Auclair, D., Lawrence, M. S., Stojanov, P., Cibulskis, K., Choi, K., de Waal, L., Sharifnia, T., Brooks, A., Greulich, H., Banerji, S., Zander, T., Seidel, D.,

Leenders, F., Ansen, S., Ludwig, C., Engel-Riedel, W., Stoelben, E., Wolf, J.,
 Goparju, C., Thompson, K., Winckler, W., Kwiatkowski, D., Johnson, B. E.,
 Janne, P. A., Miller, V. A., Pao, W., Travis, W. D., Pass, H. I., Gabriel, S. B.,
 Lander, E. S., Thomas, R. K., Garraway, L. A., Getz, G., & Meyerson, M.
 Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel
 sequencing. *Cell* **150**, 1107-20 (2012).

76. Stephens, P. J., Tarpey, P. S., Davies, H., Van Loo, P., Greenman, C., Wedge, D.
 C., Nik-Zainal, S., Martin, S., Varela, I., Bignell, G. R., Yates, L. R.,
 Papaemmanuil, E., Beare, D., Butler, A., Cheverton, A., Gamble, J., Hinton, J.,
 Jia, M., Jayakumar, A., Jones, D., Latimer, C., Lau, K. W., McLaren, S.,
 McBride, D. J., Menzies, A., Mudie, L., Raine, K., Rad, R., Chapman, M. S.,
 Teague, J., Easton, D., Langerod, A., Lee, M. T., Shen, C. Y., Tee, B. T., Huimin,
 B. W., Brooks, A., Vargas, A. C., Turashvili, G., Martens, J., Fatima, A., Miron,
 P., Chin, S. F., Thomas, G., Boyault, S., Mariani, O., Lakhani, S. R., van de
 Vijver, M., van 't Veer, L., Foekens, J., Desmedt, C., Sotiriou, C., Tutt, A.,
 Caldas, C., Reis-Filho, J. S., Aparicio, S. A., Salomon, A. V., Borresen-Dale, A.
 L., Richardson, A. L., Campbell, P. J., Futreal, P. A., & Stratton, M. R. The
 landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature* **486**,

400-4 (2012).

77. Biankin, A. V., Waddell, N., Kassahn, K. S., Gingras, M. C., Muthuswamy, L. B., Johns, A. L., Miller, D. K., Wilson, P. J., Patch, A. M., Wu, J., Chang, D. K., Cowley, M. J., Gardiner, B. B., Song, S., Harliwong, I., Idrisoglu, S., Nourse, C., Nourbakhsh, E., Manning, S., Wani, S., Gongora, M., Pajic, M., Scarlett, C. J., Gill, A. J., Pinho, A. V., Rooman, I., Anderson, M., Holmes, O., Leonard, C., Taylor, D., Wood, S., Xu, Q., Nones, K., Fink, J. L., Christ, A., Bruxner, T., Cloonan, N., Kolle, G., Newell, F., Pinese, M., Mead, R. S., Humphris, J. L., Kaplan, W., Jones, M. D., Colvin, E. K., Nagrial, A. M., Humphrey, E. S., Chou, A., Chin, V. T., Chantrill, L. A., Mawson, A., Samra, J. S., Kench, J. G., Lovell, J. A., Daly, R. J., Merrett, N. D., Toon, C., Epari, K., Nguyen, N. Q., Barbour, A., Zeps, N., Kakkar, N., Zhao, F., Wu, Y. Q., Wang, M., Muzny, D. M., Fisher, W. E., Brunicardi, F. C., Hodges, S. E., Reid, J. G., Drummond, J., Chang, K., Han, Y., Lewis, L. R., Dinh, H., Buhay, C. J., Beck, T., Timms, L., Sam, M., Begley, K., Brown, A., Pai, D., Panchal, A., Buchner, N., De Borja, R., Denroche, R. E., Yung, C. K., Serra, S., Onetto, N., Mukhopadhyay, D., Tsao, M. S., Shaw, P. A., Petersen, G. M., Gallinger, S., Hruban, R. H., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Schulick, R. D., Wolfgang, C. L., Morgan, R. A.,

- Lawlor, R. T., Capelli, P., Corbo, V., Scardoni, M., Tortora, G., Tempero, M. A., Mann, K. M., Jenkins, N. A., Perez-Mancera, P. A., Adams, D. J., Largaespada, D. A., Wessels, L. F., Rust, A. G., Stein, L. D., Tuveson, D. A., Copeland, N. G., Musgrove, E. A., Scarpa, A., Eshleman, J. R., Hudson, T. J., Sutherland, R. L., Wheeler, D. A., Pearson, J. V., McPherson, J. D., Gibbs, R. A., & Grimmond, S. M. Pancreatic cancer genomes reveal aberrations in axon guidance pathway genes. *Nature* **491**, 399-405 (2012).
78. Kaida, D., Motoyoshi, H., Tashiro, E., Nojima, T., Hagiwara, M., Ishigami, K., Watanabe, H., Kitahara, T., Yoshida, T., Nakajima, H., Tani, T., Horinouchi, S., & Yoshida, M. Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. *Nat Chem Biol* **3**, 576-83 (2007).
79. Kotake, Y., Sagane, K., Owa, T., Mimori-Kiyosue, Y., Shimizu, H., Uesugi, M., Ishihama, Y., Iwata, M., & Mizui, Y. Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. *Nat Chem Biol* **3**, 570-5 (2007).
80. Fan, L., Lagisetti, C., Edwards, C. C., Webb, T. R., & Potter, P. M. Sudemycins, novel small molecule analogues of FR901464, induce alternative gene splicing. *ACS Chem Biol* **6**, 582-9 (2011).
81. Albert, B. J., McPherson, P. A., O'Brien, K., Czaicki, N. L., Destefino, V.,

- Osman, S., Li, M., Day, B. W., Grabowski, P. J., Moore, M. J., Vogt, A., & Koide, K. Meayamycin inhibits pre-messenger RNA splicing and exhibits picomolar activity against multidrug-resistant cells. *Mol Cancer Ther* **8**, 2308-18 (2009).
82. Shaheen, M., Allen, C., Nickoloff, J.A. & Hromas, R. Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair. *Blood* **117**, 6074-82 (2011).
83. Bonnal, S., Vigevani, L. & Valcarcel, J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 847-59 (2012).

謝辞

本研究の遂行におきましてご指導をいただきました京都大学腫瘍生物学の小川誠司先生、真田昌先生およびご支援いただきました永田安伸先生、佐藤悠佑先生、佐藤亜以子先生、昆彩奈先生、塩坂雅司氏、川幡亮一郎氏に深謝いたします。

本研究の遂行において貴重な検体をご供与いただきました筑波大学の小原直先生、坂田麻実子先生、千葉滋先生、都立大塚病院の石山謙先生、宮脇修一先生、昭和大学の森啓先生、ミュンヘン白血病研究所の Claudia Haferlach 先生、Torsten Haferlach 先生、マンハイム医科大学の Daniel Nowak 先生、Florian Nolte 先生、Wolf-Karsten Hofmann 先生、Cedars-Sinai 病院の H.Phillip Koeffler 先生、長夷記念病院の Lee-Yung Shih 先生、また解析面でご支援をいただきました東京大学医科学研究所の白石友一先生、長崎正朗先生、George Chalkidis 氏、宮野悟先生、実験技術でご指導いただきました東京大学医科学研究所の山本玲先生、山口智之先生、大津真先生、中内啓光先生、鈴木穰先生、菅野純夫先生に深謝いたします。