

論文の内容の要旨

論文題目 Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia

(骨髄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

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。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、MDS 発症に関わる遺伝子・分子標的を明らかにすることが必要である。また、これまで MDS においていくつかの遺伝子の変異や染色体異常がみられることが報告されてきたが、それらは MDS 以外の骨髄性腫瘍でも同程度あるいはより高頻度に見られており、MDS に特徴的な遺伝子変異は少なかった。一方、近年の次世代シーケンス技術の発達により網羅的な遺伝子解析が可能となり、多くのがんで新規の標的遺伝子が同定されてきていた。そこで、本研究では MDS 特異的な遺伝子異常を明らかにするために、29 症例の MDS および関連する骨髄性腫瘍の全エクソンシーケンスを行った。

結果、1 症例あたり平均 9.2 個のアミノ酸置換を伴う変異が同定され、また 12 個の遺伝子の変異については複数の症例で変異が認められ、MDS 発症に重要な遺伝子変異と考えられた。12 個の遺伝子うち 8 つはこれまでに MDS において変異が報告されている遺伝子であったが、それ以外にこれまでに報告のなかった 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た。これら 3 つの遺伝子の他に、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%) にみられていた。

さらに、582 症例の骨髄性腫瘍について RNA スプライシング因子の遺伝子変異について調べたところ、209 症例で *U2AF1*、*SRSF2*、*SF3B1*、*ZRSR2* などの RNA スプライシング因子の変異が認められた。なかでも、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%) という骨髄異形成の特徴のある骨髄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ると考えられた。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、またほとんどの遺伝子が 3' スプライス部位の認識などの RNA スプライシングの初期のステップ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。また、変異がみられているスプライシング因子はそれぞれ異なった病型と関係していて、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。また、*SRSF2* 遺伝子変異は骨髄異形成/骨髄増殖性腫瘍 (Myelodysplastic/ Myeloproliferative Neoplasm, MDS/MPN) に分類される慢性骨髄単球性白血病 (Chronic myelomonocytic leukemia, CMML) では 28.4% と高頻度に変異がみられた。同定された *SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1* 遺伝子の特定のアミノ酸に変異が集中してみられており、機能獲得型の変異と考えられた。一方、*ZRSR2* 遺伝子の変異はコーディング領域に全体に変異が分布していて、大部分がナンセンス変異や蛋白の中断を起こすと予測されるフレームシフトやスプライス部位の変異であり、機能喪失型の変異と考えられた。

RNA スプライシング因子の変異による機能的な効果を調べるために、変異型 *U2AF1* を HeLa 細胞および TF-1 細胞に導入して発現アレイ解析を行い、gene set enrichment analysis

(GSEA) を行ったところ、変異型 U2AF1 を導入した細胞では有意に nonsense-mediated mRNA decay (NMD) に関わるパスウェイの発現が上昇していて、変異型 U2AF1 により異常な RNA スプライシングが起こり、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推測された。さらに、変異型 U2AF1 により実際に RNA スプライシングの異常が起こっているのかを調べるために、変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞でエクソンアレイおよび RNA シーケンスを行ったところ、変異型 U2AF1 を導入した HeLa 細胞では正常型の U2AF1 を導入した HeLa 細胞に比べて著明にイントロン配列が残った不完全な mRNA が増加しており、変異型 U2AF1 により RNA スプライシング、特に 3' スプライス部位の認識が阻害されていることが示唆された。

次に、RNA スプライシング因子の変異による生物学的な影響を調べるため、ドキシサイクリン誘導下に正常型 U2AF1 あるいは変異型 U2AF1 を HeLa 細胞に導入して、細胞増殖を検討した。その結果、変異 U2AF1 を導入した HeLa 細胞では細胞増殖の抑制がみられ、またアポトーシスの増加がみられた。さらに、マウスの造血幹細胞が存在する分画である CD34 陰性 c-Kit 陽性 Sca-1 陽性 Lineage marker 陰性 (CD34-KSL) 細胞に正常型 U2AF1 あるいは変異型 U2AF1 を導入し、競合細胞と共に致死量の放射線照射をしたマウスに骨髄移植を行い、競合的造血再構築能アッセイを行った。その結果、変異 U2AF1 を導入した造血幹細胞では造血再構築能の低下がみられた。これらの結果から、U2AF1 遺伝子変異は MDS の特徴のひとつである、アポトーシスの増加による無効造血と関係していることが示唆された。

今回の研究により、次世代シーケンサーを用いたがんゲノム解読ががんの病態を解明するためにきわめて有効であることが示され、また RNA スプライシング因子の遺伝子変異がヒトのがんにおいて関わっているということを初めて示された。また myelodysplasia に高頻度かつ特異的な RNA スプライシング因子の遺伝子変異を同定したことで、今後 MDS 発症のメカニズムの解明や診断法の開発や治療成績の改善につながることを期待される。