

09_□□□□□□□□□□□□□□□□

[illegible][illegible]

Image



スプライシング異常と発がん機構

監修 井上 大地 先生 公益財団法人 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 部長

HEMATOCAPSULEでは、『血液内科医が知っておきたい最近の話題』をコンパクトに紹介します。今回は、さまざまな転写後制御機構のうち、最近注目されるスプライシング異常を原因とする発がん機構について、先端医療研究センターの井上大地先生に解説いただきました。

SUMMARY

- さまざまな造血器腫瘍やがん種においてスプライソソームの遺伝子変異が報告されてきた。
- スプライシングのキープレーヤーである*SF3B1*遺伝子変異の下流標的として、新規BAF複合体の構成因子である*BRD9*遺伝子が同定され、*BRD9*のスプライシング異常による発がんへの関与が示されている。
- 進化的に保存された「マイナーイントロン」がスプライシングにより適切に除去されず、発がんに至る新たな現象が発見された。また、がん抑制遺伝子として働く*LZTR1*のイントロンリテンションが複数のがん種に横断的に観察され、スプライシング異常が造血器腫瘍以外のがんにおいても発がんに関与する可能性が示された。

1. はじめに

ゲノムシーケンス技術の進歩は造血器腫瘍やさまざまな固形がんにおいて新たな遺伝子変異の発見をもたらし、発がんに関与するがん遺伝子、がん抑制遺伝子の発現量の多寡、コーディング領域の遺伝子変異についての知見が蓄積されてきた。また、転写因子や増殖シグナルに関連した変異に加え、エピジェネティックな遺伝子発現制御やスプライシング異常にかかわる遺伝子の研究が進められている。真核生物においてスプライシングは遺伝情報に基づき多様なタンパク質を作り出すために必須の機構であるが、近年の研究により、スプライシング異常による発がんの分子機構が徐々に明らかとなりつつある。

2. RNAスプライシング異常と発がん

DNAに保存された遺伝情報はRNAを介してタンパク質へと一方的に伝達されるセントラルドグマが基本原則であるが、実際にpre-mRNAがmRNAに精製される過程では、5'末端におけるキャッピング、イントロンを除去するRNAスプライシング、ポリアダニル化、RNA編集、RNA修飾などのさまざまな転写後制御機構が存在する。近年、ハイスループットシーケンス技術により、ヒトの遺伝子の95%以上は選択的スプライシングを受け、これにより機能的に異なるmRNAやタンパク質の多様性が確保されていることが明らかとなった。RNAプロセシングのなかでも、スプライシングはこのような多様性を得るために不可欠な機構である。

2011年、Yoshidaらは骨髓異形成症候群（MDS）の半数近くで*SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1*などスプライソソームを構成する遺伝子の変異がみられ、それらが相互排他的に生じることを報告した¹。なかでも*SF3B1*変異は環状鉄芽球を有するMDSの65%²に、また慢性リンパ性白血病（CLL）の15%に認められることが報告されている³。このようなスプライソソーム構成遺

伝子の変異はさまざまながん種において報告されており、スプライシング異常は発がんに寄与しうるものと考えられている。

スプライシング異常を理解するために、まず正常なスプライシング機構についてみておきたい。スプライシングとは、pre-mRNAからイントロン配列を除去する過程をさし、この機構はスプライソソームと呼ばれる酵素活性を有するタンパク質・RNA複合体が担っている。各イントロン配列には両端に位置する5'splice site (5'SS), 3'splice site (3'SS), 3'SSの上流に位置するbranch point sequence (BPS), BPSと3'SSの間に polypyrimidine tractが存在し、スプライソソームが認識するコンセンサス配列として知られる(図1)⁴。ゲノム上に数十万個存在するイントロンは、GUで始まりAG

で終わり全体の99.7%を占めるGU-AG型イントロン「メジャーイントロン」と、イントロン内に進化的に強く保存された特徴的な配列を有する「マイナーイントロン」に大別される。後者にはGU-AG型以外にAUで始まりACで終わるAT-AC型イントロンも含まれる。メジャーイントロンを除去するスプライソソームを構成する核内低分子リボ核蛋白質 (snRNP) は、スプライシングの各段階によりU1/U2/U4/U5/U6の5つに分類される。スプライシング過程の初期段階では、U1/U2 snRNPがそれぞれ5'SSとBPSに結合するが、SF3B1はこのU2snRNPに含まれ、BPSや3'SSの認識に貢献する。snRNPの他にも、serine/arginine (SR) ファミリーがエキソン配列内のexonic splicing enhancer (ESE)、イントロン配列内のintronic splicing enhancer (ISE)と呼ばれる配列を

認識しスプライシングを促進している。SRファミリーにはU1snRNPやU2AF1をそれぞれ5'SSあるいは3'SSへとリクルートする機能もある。一方で、イントロンのごく一部(0.3%)を占めるマイナーイントロンはU2ではなく、U12snRNPに制御されており、後述するZRSR2はこのマイナーなU12snRNPの構成因子である。

前述のSF3B1, SRSF2, U2AF1変異の大半は点突然変異で、機能喪失ではなく正常とは異なる機能を獲得する⁵⁻⁷。端的に言えば、変異体タンパク質は各認識配列の親和性が正常タンパク質と異なることで異常なスプライシング産物が形成される。具体的には、5'SSや3'SSに「ズレ」を生じる、スキップされるべきエキソンが残る、含まれるべきエキソンがスキップされる、イントロン配列が誤って転写される(イントロンリテンション)などの不具合が生じる(図2)。

スプライシング異常による転写産物の多くはNMD*機序により分解され、標的遺伝子の機能喪失により発がんが誘導されと考えられる。われわれは、SF3B1変異の下流標的としてBRD9遺伝子を同定

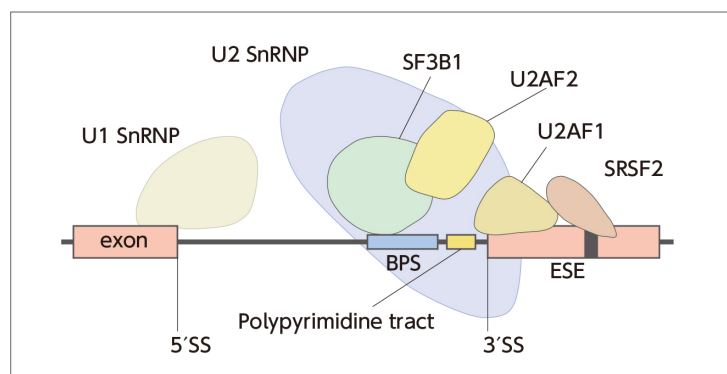


図1 スプライシングにおける核内低分子リボ核蛋白質 (snRNP) の結合部位

BPS: branch point sequence, ESE: exonic splicing enhancer

文献4より引用。

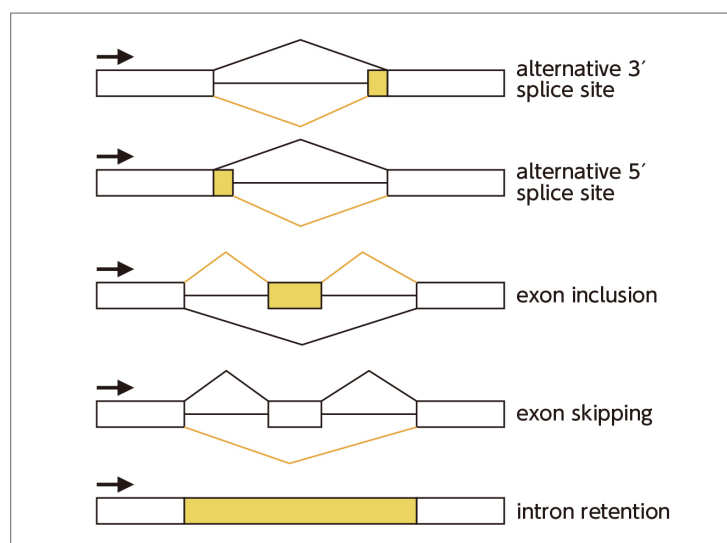


図2 スプライシング異常のパターン

文献4より引用。

し、*BRD9*のスプライシング異常がBRD9タンパク質の発現喪失を惹起して、がん抑制遺伝子の抑制により発がんを誘導することを見出した⁸。この研究では、血液がんから固形がんまでさまざまながん種のうち、*SF3B1*変異を有する患者検体のRNA-seqデータを網羅的に解析し、がん種を問わず生じるスプライシング異常を解析した。同時に、配列に基づいて235に及ぶNMD標的遺伝子を予測して一本鎖ガイドRNA (sgRNA) ライブラリーを作成し、Cas9を発現したサイトカイン依存性細胞株に導入後、サイトカイン非依存性増殖に寄与するNMD標的を抽出すべくenrichment screeningを行った。その結果、*BRD9*が最も顕著かつ機能的に重要なスプライシング異常であることを突き止めた。具体的には、無関係であるはずの*SF3B1*変異により、*BRD9*のexon14/15間の終止コドンに有するイントロンの一部がエキソンであるかのように転写され、NMDにより分解されてBRD9の喪失をきたすことが示された。悪性黒色腫では、*BRD9*ががん抑制遺伝子として機能するため、BRD9の発現喪失が発がんに重要なイベントとなる。さらに、BRD9は新規に同定されたクロマチンリモデリング複合体であるnon-canonical BAF複合体(ncBAF)の特異的な構成因子であることが明らかとなり、BRD9の発現喪失によってncBAFの形成不全が惹起され、それに伴ってクロマチン構造の変化をきたすものと考えられた。

*NMD: nonsense-mediated mRNA decay.

本来の終止コドンより5'末端側に出現した終止コドンを含むmRNAを分解・除去することにより、最終産物であるタンパク質の異常を防ぐ真核生物のmRNA品質監視機構。

3. 「マイナーイントロン」の発がんへの関与

イントロンのわずか0.3%のマイナーイントロンはU12タイプと呼ばれ、ヒトのゲノム中に700~800個程度しか存在しないが、進化的に高度に保存され、細胞周期、シグナル伝達、遺伝情報の転写・翻訳など、細胞の生存に必須となる遺伝子のなかに通常はひとつだけ含まれている。このことからマイナーイントロンはさまざまな生理機構や発がんにおいて重要な役割を果たしているものと考えられていたが⁹、その詳細な機能はほとんど解明されていなかった。

そこでわれわれは、マイナーイントロンのスプライシングに不可欠な*ZRSR2*遺伝子に着目し検討を行った¹⁰。骨髄系腫瘍患者のRNA検体についてU2タイプのイントロン除去に不可欠なsnRNPの解析を行ったところ、*SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1*変異の他、マイナーイントロンのスプライシングを担当しX染色体にコードされる*ZRSR2*変異が男性のみに検出された。前者の3つの遺伝子変異はホットスポットを有する機能獲得型変異であるが、*ZRSR2*変異はコーディング領域の全てに及び、その多くがナンセンス変異やフレームシフト変異など、機能喪失型変異であることが示唆された。*ZRSR2*変異を有する造血幹細胞では、マイナーイントロンが除去されずにmRNAに転写後も残存するイントロンリテンションが確認された。また、*ZRSR2*変異がスプライシング異常を介して血液がんを誘導するのかを確認すべく、ポリイノシン・ポリシチジン酸 (pIpC) によりMx1プロモーター制御下にCre⁺コンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを利用して、造血細胞特異

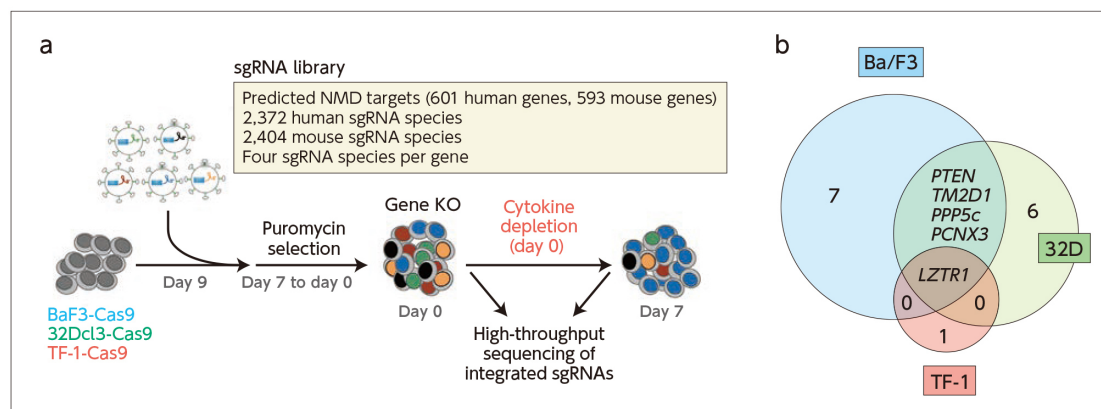


図3 CRISPRスクリーニングによる機能的スプライシング異常の探索

a. 約600遺伝子を標的としてsgRNAライブラリーを作成し、Cas9を発現した細胞株に導入後、どのsgRNAが増殖に有利に働いているかを次世代シーケンサーで解析した。
b. *LZTR1*遺伝子のNMDを最も重要な標的として同定した。

文献10より引用。

的に*Zrsr2*遺伝子をノックアウトできるマウスモデルを作成した。*Zrsr2*遺伝子を喪失した造血幹細胞では、DNA脱メチル化酵素をコードする*Tet2*をノックアウトした造血幹細胞と同様にコロニー形成能が亢進し、競合移植実験での優位性獲得が認められた。一方でU2イントロンを担当する*Sf3b1*変異や*Srsf2*変異を導入したマウスモデルでは競合移植能の顕著な低下がみられた。すなわち、*ZRSR2*変異は他のスプライシング関連遺伝子変異とは異なる効果を有しており、マイナーイントロンのスプライシング異常が発がんにおいて重要な役割を果たしているものと考えられた。

さらに、sgRNAライブラリーを作成し、Cas9を発現した細胞株に導入して腫瘍化に寄与するNMD標的を探索したところ、*LZTR1*遺伝子のNMDが最も重要な標的として同定された(図3)。*LZTR1*はRAS関連分子をユビキチン化により制御するE3ユビキチンリガーゼCUL3のアダプタータンパクとして機能し、通常はRAS経路の抑制に寄与する。*LZTR1*遺伝子のイントロン18はマイナーイントロンに分類され、それ以外のイントロンはすべてU2タイプのイントロンである。*ZRSR2*変異を有する血液腫瘍では*LZTR1*イントロンのリテンションをきたして遺伝子は分解され、その結果、RAS関連分子の発現上昇が認められた。また興味深いことに、*ZRSR2*変異を認めない急性白血病を含む悪性腫瘍で検出される*LZTR1*のイントロン変異についても、*ZRSR2*変異細胞と同様に*LZTR1*遺伝子は分解されRAS/MAPK経路が活性化されることを見出した。マイナーイントロン内にみられる変異を人為的に導入した細胞では、*ZRSR2*変異細胞と同様、イントロンリテンションの増加と*LZTR1*タンパク質の消失がみられ、すみやかに不死化した。*LZTR1*のコーディング領域の変異は、RAS経路の活性化が原因となる悪性腫瘍や、先天性疾患であるヌーナン症候群において比較的高頻度に認められるが、マイナーイントロン内の変異も同様にドライバーとなることが示された。さらに、*LZTR1*遺伝子のイントロンリテンションは種々の固形がんにおいて観察されることも明らかとなり、がん横断的にマイナーイントロンのスプライシング異常による発がんの可能性が示されている。

4. おわりに

がん化についての研究は、DNA・染色体レベルでの「遺伝情報の異常に基づくタンパク質異常」の枠組みの中で発展してきた。その一方で、がんゲノム研究で明らかにされた非翻訳領域内の塩基置換の多くは無意味なものとして見過ごされてきた面がある。そこでわれわれは、染色体異常やコーディング領域の変異の枠を超えた発がん機構が存在すると考え、RNAレベルでの発現制御機構や非翻訳領域内の異常、イントロン変異に着目し研究を重ねた。最近の研究を通じ、スプライシング異常とクロマチンによる遺伝子発現制御の接点が見出されたことや、がん横断的にマイナーイントロンのイントロンリテンションが認められたことは、ゲノム上の非翻訳領域の重要性をあらためて提示しており、スプライシング異常にかかわるさらなる研究の発展が期待される。

文献

1. Yoshida K, et al. Nature 2011; 478: 64-69.
2. Papaemmanuil E, et al. New Engl J Med 2011; 365: 1384-1395.
3. Wang L, et al. New Engl J Med 2011; 365: 2497-2506.
4. 井上大地. 実験医学 2017; 35: 3084-3089.
5. Darman RB, et al. Cell Rep 2015; 13: 1033-1045.
6. Zhang J, et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2015; 112: E4726-E4734.
7. Ilagan JO, et al. Genome Res 2015; 25: 14-26.
8. Inoue D, et al. Nature 2019; 574: 432-436.
9. Burge CB, et al. Mol Cell 1998; 2: 773-785.
10. Inoue D, et al. Nat Genet 2021; 53: 707-718.

MDS: myelodysplastic syndromes, CLL: chronic lymphocytic leukemia, snRNP: small nuclear ribonucleoprotein particle, sgRNA: single guide RNA, CRISPR/Cas9: clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated proteins 9, BRD9: bromodomain-containing protein 9, PTEN: phosphatase and tensin homolog, LZTR1: Leucine-zipper-like transcriptional regulator 1



Source URL:

https://www.pro.novartis.com/jp-ja/support/lecture/hem_mailservice/raredisease_spl