トピックス

IV. 造血に関する最新の話題

1. 骨髄異形成症候群の新たな分子メカニズム

吉田 健一 真田 昌 小川 誠司

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に特徴的ではなかった。高速シーケンサーにより様々な腫瘍性疾患における遺伝子異常が明らかとなりつつあり、MDSでは、*U2AF35*, *SRSF2*, *SF3B1*, *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が明らかとなった。

〔日内会誌 101：1994～2001, 2012〕

Key words MDS, RNAスプライシング, 高速シーケンサー

はじめに

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⁾。現時点での治療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。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みられており、MDSに特徴的な遺伝子変異は少なかった。近年、高速シーケンス技術を駆使した解析によって多くの腫瘍性疾患で遺伝子病態が明らかになりつつあるが、MDSにおいてもRNAスプライシング装置に関わる遺伝子の変異がMDSをはじめとする骨髄異形成の特徴を有する骨髄性腫瘍（myelodysplasia）で高頻度に起こっていることが複数のグループから報告された。本稿では、MDSにおけるRNAスプライシング因子の遺伝子変異について概説する。

東京大学附属病院がんゲノミクスプロジェクト

Bone Marrow Failure Syndrome (Idiopathic Hematopoietic Disorders) : Progress in Diagnosis and Treatment. Topics : IV. Recent Topics of Hematopoiesis ; 1. Novel molecular mechanism of myelodysplastic syndromes.

Kenichi Yoshida, Masashi Sanada and Seishi Ogawa : Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Japan.

1. 高速シーケンサーを用いたMDSのゲノム解析

高速シーケンサーは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技術である。高速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。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bead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。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る。

我々は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を行った²⁾。同一患者から採取したT細胞あるいは頬粘膜から採取したDNAを正常コントロールとして、腫瘍細胞特異的な体細胞変異を検出した。その結果、全体として268個の体細胞変異が同定され、そ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たが、大多数（233/268）の変異はこれまでにMDSで報告のない遺伝子の変異だった。この中で複数症例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、その中にはこれまでにMDSで変異が報告されている遺伝子以外にRNAスプライシングに関わる*U2AF35*, *SRSF2*, *ZRSR2*の3つの遺伝子が含まれていて（表）、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、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髄性腫瘍で頻度を調べるため、これら6つの遺伝子に別のRNAスプライシング因子である*U2AF65*, *SF1*, *SRSF1*を加えて、582例の骨髄性腫瘍検体を用いて解析を行った。その結果、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ることがわかり、一方で*de novo* AML（6.6%）、骨髄増殖性腫瘍（myeloproliferative neoplasms：MPN）（9.4%）ではより低頻度であり、MDSに特異的な遺伝子異常であった（図1）。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。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。今回変異が見つかったRNAスプライシング因子のほとんどは主に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であり、同定されたRNAスプライシング因子の遺伝子変異はそれぞれ排他的に起こっ

トピックス

表. MDSの全エクソンシーケンスで複数症例に変異が認められた遺伝子

Gene	Mutation Type	Position	Allele Change	Aminoacid Change	Sample ID
<i>ASXL1</i>	Nonsense	Chr20	C>A	S852X	MDS-19
<i>ASXL1</i>	Nonsense	Chr20	C>T	R693X	CMML-01
<i>BCOR</i>	Frameshift	ChrX	*/+C	V1351fs	MDS-19
<i>BCOR</i>	Nonsense	ChrX	C>T	Q1187X	CMML-02
<i>DNMT3A</i>	Missense	Chr2	G>T	G543C	MDS-19
<i>DNMT3A</i>	Missense	Chr2	G>A	R882H	CMML-02
<i>EZH2</i>	Missense	Chr7	A>C	D664A	tAML-01
<i>EZH2</i>	Frameshift	Chr7	*/-AA	K718fs	CMML-01
<i>KRAS</i>	Missense	Chr12	G>A	G12D	tAML-06
<i>KRAS</i>	Missense	Chr12	A>G	K5E	CMML-01
<i>NRAS</i>	Missense	Chr1	G>A	G13D	MDS-19
<i>NRAS</i>	Missense	Chr1	G>A	G13D	MDS-20
<i>NRAS</i>	Missense	Chr1	G>A	G12S	MDS-20
<i>NRAS</i>	Missense	Chr1	G>A	G12S	tAML-05
<i>RUNX1</i>	Frameshift	Chr21	*/+G	L294fs	MDS-19
<i>RUNX1</i>	Missense	Chr21	G>A	D171N	tAML-02
<i>SRSF2</i>	Missense	Chr17	C>T	P95L	MDS-09
<i>SRSF2</i>	Missense	Chr17	C>A	P95H	MDS-18
<i>SRSF2</i>	Missense	Chr17	C>A	P95H	CMML-04
<i>TET2</i>	Frameshift	Chr4	*/-C	I340fs	MDS-06
<i>TET2</i>	Nonsense	Chr4	C>T	Q323X	MDS-16
<i>TET2</i>	Frameshift	Chr4	*/+C	Y1255Fs	MDS-16
<i>TET2</i>	Nonsense	Chr4	C>G	S825X	MDS-19
<i>TET2</i>	Frameshift	Chr4	*/+A	L1046fs	MDS-19
<i>TET2</i>	Nonsense	Chr4	C>T	R550X	tAML-01
<i>TET2</i>	Frameshift	Chr4	*/-C	H994fs	tAML-01
<i>TET2</i>	Nonsense	Chr4	C>T	Q1680X	tAML-07
<i>TET2</i>	Frameshift	Chr4	*/+A	S402Fs	tAML-07
<i>TET2</i>	Frameshift	Chr4	*/-AAAT	Q749fs	CMML-01
<i>TP53</i>	Missense	Chr17	C>T	R116W	MDS-09
<i>TP53</i>	Frameshift	Chr17	*/-T	M1fs	tAML-03
<i>U2AF35</i>	Missense	Chr21	A>G	Q157R	MDS-03
<i>U2AF35</i>	Missense	Chr21	C>T	A26V	MDS-12
<i>U2AF35</i>	Missense	Chr21	A>C	Q157P	MDS-15
<i>U2AF35</i>	Missense	Chr21	A>G	Q157R	CMML-01
<i>U2AF35</i>	Missense	Chr21	C>T	S34F	CMML-02
<i>ZRSR2</i>	Splice site	ChrX	G>A	K257splice	MDS-06
<i>ZRSR2</i>	Frameshift	ChrX	*/-G	G323fs	MDS-08
<i>ZRSR2</i>	Nonsense	ChrX	G>T	E362X	MDS-16
<i>ZRSR2</i>	Missense	ChrX	A>T	N261Y	tAML-05
<i>ZRSR2</i>	Missense	ChrX	T>G	F239V	CMML-03

ていて、MDS発症に関わる重要な遺伝子変異であると考えられた（図2）。

Papaemmanuilらは、1例の5q-症候群、8例の

RARS症例の全エクソンシーケンスを行い、6例に*SF3B1* 遺伝子の変異を同定し、354例のMDS症例で20%に、RARSおよびRCMD-RSでは65%

図 1. MDSなどの骨髄性腫瘍におけるRNAスプライシング因子の変異頻度

RNAスプライシング因子の遺伝子変異はMDS, CMML, AML/MRCという骨髄異形成の特徴がある骨髄性腫瘍でより高頻度にみられ、特にSF3B1遺伝子の変異はRARS/RCMD-RSで75%と高頻度にみられ、SRSF2遺伝子の変異はCMMLで高頻度にみられた。

にSF3B1 遺伝子変異を認めた³⁾。また、Graubertらは1例のMDSおよび二次性AML症例の全ゲノムシーケンスを行い、変異がみられていた遺伝子の中からU2AF35 (U2AF1) 遺伝子の変異に着目し、その後の150例のMDS症例の解析では13例(8.7%)にU2AF35 遺伝子の変異を同定した⁴⁾。これらの報告では、U2AF35, SRSF2, SF3B1 遺伝子における変異はRAS(codon 12, 13, 61), JAK2 (V617F), BRAF (V600E) などのがん遺伝子と同様に特定のアミノ酸に変異が集中して起こっており(図3)、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・サイトの変異であり(図3)、機能喪失型変異であると考えられた。

2. RNAスプライシング因子の変異を持つMDSの特徴

高速シーケンサーを用いた解析により発見されたRNAスプライシング因子の遺伝子変異について、その後さらにいくつかのグループが多数検体を用いた変異解析を行い、変異を持つ症例の臨床的特徴や予後などについてのデータが出始めている。特に、RARS, RCMD-RSで65~75.3%と高頻度に変異がみられたSF3B1 遺伝子変異について多数の報告が出ているが、そのうちMalcovati

図 3. MDSにおけるRNAスプライシング因子の変異の症例分布

U2AF35, SRSF2, SF3B1遺伝子変異は特定のアミノ酸に変異が集中しており、機能獲得型の変異と考えられた。一方、ZRSR2遺伝子の変異は遺伝子全体に変異が分布しており、また 2/3 はタンパクの中断が起こると予測される変異であり、機能喪失型の変異と考えられた。

DFS) については変異の有無で有意差を認めなかったが、二次性白血病に進行する可能性が 15.8% と高かったと報告した⁴⁾。また、Tholらは 193 症例のMDSでRNAスプライシング因子の遺伝子変異を調べ、U2AF35 遺伝子変異はOSに影響しないが、より急速に二次性白血病に進行したと報告した⁸⁾。一方、MakishimaらはU2AF35 遺伝子変異を有する症例ではOSが優位に短かったと報告している⁹⁾。SRSF2 遺伝子については、Tholらは変異を有する症例ではOS, LFSが有意に短かったと報告し⁸⁾、Makishimaらも低リスクMDSのみでの解析では変異を有する症例ではOSが優位に短かったと報告した⁹⁾。

3. RNAスプライシング因子の遺伝子変異によるRNAスプライシングの異常とMDSの発症

RNAスプライシング因子の遺伝子変異によりMDSを発症するメカニズムについては不明な点が多いが、いくつかの研究成果が報告されている。我々は変異U2AF35をHeLa細胞に導入し、機能的・生物学的な効果を検討した。U2AF35 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のかどうかを調べるために、正常U2AF35あるいは変異U2AF35を遺伝子導入したHeLa細胞を用いて高速シーケンサーによるRNAシーケンスを行った。その結果、変

トピックス

図 4. 変異U2AF35 の導入によるRNAスプライシング異常

HeLa細胞に正常U2AF35あるいは変異U2AF35を遺伝子導入し、RNAシーケンスを行った。変異U2AF35を導入したHeLa細胞では矢印で示すようにイントロンが残存したmRNAが著明に増加しており、RNAスプライシングが変異U2AF35により阻害されていることが示された。

異U2AF35を導入したHeLa細胞では正常U2AF35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U2AF35によりRNAスプライシングが阻害されていることが示された²⁾(図4)。一方、GraubertらはRNAスプライシングの活性を調べるため、ダブルレポーターアッセイを用いて検討を行い、変異U2AF35によりRNAスプライシングが増加していることを示している。また、ミニ遺伝子レポーターアッセイを用いて変異U2AF35により特定の遺伝子でエクソスキッピングが起こると報告している⁴⁾。

また、我々は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するために、ドキシサイクリン誘導下に正常U2AF35あるい

は変異U2AF35をHeLa細胞に導入して、細胞増殖を検討した。その結果、変異U2AF35を導入したHeLa細胞では細胞増殖の抑制がみられた。また、マウスの造血幹細胞であるCD34陰性c-Kit陽性Sca-1陽性lineage marker陰性(CD34-KSL)細胞に正常U2AF35あるいは変異U2AF35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U2AF35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。これらの結果はこれまでに報告されたがん遺伝子とは異なっており、MDSにおける無効造血と関連が示唆された²⁾。

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、今後のさらな

る研究が待たれる。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¹⁰⁾、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、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薬が知られており^{11~13)}、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治療への応用が期待されている。

おわりに

高速シーケンス技術により明らかとなったMDSで高頻度にみられるRNAスプライシング因子の遺伝子変異について概説した。今後はRNAスプライシング因子の遺伝子変異によるMDSを発症するメカニズムの解明やRNAスプライシング阻害薬のMDS治療への応用が期待されている。

著者のCOI(conflicts of interest)開示：真田 昌；研究費・助成金（高松宮妃癌研究基金）

文 献

- 1) Tefferi A, Vardiman JW: Myelodysplastic syndromes. N Engl J Med 361: 1872-1885, 2009.
- 2) Yoshida K, et al: Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature 478: 64-69, 2011.
- 3) Papaemmanuil E, et al: Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. N Engl J Med 365: 1384-1395, 2011.
- 4) Graubert TA, et al: Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes. Nat Genet 44: 53-57, 2012.
- 5) Malcovati L, et al: Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood 118: 6239-6246, 2011.
- 6) Damm F, et al: Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. Blood 2012.
- 7) Patnaik MM, et al: SF3B1 mutations are prevalent in myelodysplastic syndromes with ring sideroblasts but do not hold independent prognostic value. Blood 119: 569-572, 2012.
- 8) Thol F, et al: Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. Blood 2012.
- 9) Makishima H, et al: Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. Blood 2012.
- 10) Wang L, et al: SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. N Engl J Med 365: 2497-2506, 2011.
- 11) Kaida D, et al: Spliceostatin A targets SF3b and inhibits both splicing and nuclear retention of pre-mRNA. Nat Chem Biol 3: 576-583, 2007.
- 12) Kotake Y, et al: Splicing factor SF3b as a target of the antitumor natural product pladienolide. Nat Chem Biol 3: 570-575, 2007.
- 13) Albert BJ, et al: Total syntheses, fragmentation studies, and antitumor/antiproliferative activities of FR901464 and its low picomolar analogue. J Am Chem Soc 129: 2648-2659, 2007.