

RNAレベルで歪められる遺伝情報に基づくがんの理解



医療と技術

井上大地*

Decoding Cancer:
Unraveling Genetic Information Distortions at the RNA Level

Key Words : Cancer, Leukemia, RNA splicing

はじめに

セントラルドグマとは、1958年にフランシス・クリックによって提唱された、遺伝情報の発現機構を説明する上で、分子生物学の根幹をなす概念で、DNAからRNAへの転写、そしてRNAからタンパク質への翻訳という一連の流れを指す。がんの原因は、古くはRAS、p53などのがん遺伝子やがん抑制遺伝子のゲノム変異の発見に始まり、染色体転座による融合タンパクの出現なども合わせて検証されてきた。すなわち、歴史的にはDNA・染色体レベルでの「遺伝情報変異に基づくタンパク質異常」という枠組みの中で腫瘍生物学が発展してきたと言える。しかし、DNAからRNAに至る「転写」やRNAへの「転写後」における仕組みの破綻が「がん」発症にどのように寄与するのか、その理解は未だ不十分な点が多い。

造血器腫瘍において、RNAスプライシングを制御する遺伝子の変異が高頻度に検出され、それらの発症機構においてスプライシングが重要な役割を担うと予想される。実際に、pre-mRNAからmRNAへの成熟過程で生じるスプライシングの破綻は、遺伝子発現量の変動やタンパク質機能の異常を誘導し、発がんにつながるものが明らかになってきた。我々を含む近年の研究により、スプライシング調節因子の遺伝子変異がクロマチン動態・転写因子ネットワ

ーク・増殖/炎症シグナル経路と関連し、腫瘍形成を促進する分子メカニズムが臨床検体解析および生体モデルで解明されつつある¹⁾。一方で、これらのシグナル関連の時空間的制御や変異選択性の機序は未解明な点が多い。RNAスプライシングにとどまらず、ゲノムワイドなシーケンス技術の進展により、RNAプロセッシング(5'キャッピング、スプライシング、3'ポリA付加)やRNA編集(A-to-I変換)、エピトランスクリプトミクス(mRNAメチル化)を含む転写後制御層の破綻が、DNA配列変異を伴わない発がん経路として注目されている。特に造血器腫瘍ではスプライシング因子変異が高頻度に検出されることから、その下流で活性化される分子カスケードの解明が治療標的の開発に直結する可能性が示唆される。本稿ではRNAスプライシング異常に起因する発がんメカニズムに対する我々の取り組みを中心に紹介する。

RNAスプライシング機構とその制御破綻

Pre-mRNA上のイントロン配列には、5'スプライス部位、3'スプライス部位、分枝部位のアデニンが存在し、スプライシングに不可欠な3つの特徴的なエレメントと言える。分枝部位は3'スプライス部位の上流にあり、両者の間にピリミジン塩基が連続する領域(ポリピリミジン配列)が存在する。スプライシングはスプライソソームという巨大なRNA-タンパク質複合体によって成し遂げられ、snRNP(small nuclear ribonucleoprotein particle)と呼ばれ5種類存在する。造血器腫瘍を中心に変異が認められるSF3B1、U2AF1、SRSF2遺伝子は正常細胞ではそれぞれ分枝部位周囲の配列、ポリピリミジン配列、エキソン内のスプライシングエンハンサー配列に親和性があり、正確なスプライシングに不可欠な分子である(図1)。

* Daichi INOUE

1981年1月生まれ
東京大学大学院 博士(医学)(2014年)
現在、大阪大学大学院 医学系研究科・
生命機能研究科 がん病理学教室 教授
TEL : 06-6879-3720
E-mail : d-inoue@patho.med.osaka-u.ac.jp



スプライシング異常の原因を辿ると、ゲノム配列自体の *cis* の異常と snRNP などに含まれる RNA 結合タンパクの *trans* の異常の二つに大別される。前者の例として、肺癌の一部では *MET* 遺伝子のエキソン 14 のスプライス部位の変異により同エキソンのスキッピングをきたす。このエキソンは分解に関連したユビキチン化に必要な CBL との結合領域を含んでおり、そのような症例ではチロシンキナーゼである *MET* のシグナルが亢進すると考えられている。このように翻訳配列では変化を認めないはずの非コード領域の変異であってもスプライシング及びタンパクに影響することは十分に考えられる。一方、スプライソソーム側の *trans* の異常としては *SF3B1*、*U2AF1*、*SRSF2* などの遺伝子変異が含まれる。これらは野生型に比べて新しい機能を獲得する変異であり、それぞれ分枝部位周囲の配列、3' スプライス部位、スプライシングエンハンサーへの親和性に変化が生じる。例えば、*SF3B1* 変異では認識される分枝部位周囲の配列にずれが生じる結果、野生型細胞と比べて数千個単位のエキソンで 3' スプライス部位のずれが生じる。*SRSF2* 野生型では CCNG と GGNG のエンハンサー配列を同程度の親和性で認識してスプライシングを促進するのに対して、*SRSF2*-P95 変異体では GGNG よりも CCNG への結合が促進されるため、正常とは異なるエキソンがスプライシングされることになる。この結果、フレームシフトにより転写産物の大半が早期終始コドンにより NMD の機序で分解される他、正常細胞では認められない異常なタンパクが発がんに寄与することも認められる。骨髄異形成症候群、慢性リンパ性白血病、ぶどう膜悪性黒色腫などあらゆる癌で最も高頻度に検出される *SF3B1* 変異では、異常スプライシング産物の 70% 近くが NMD により分解されると報告されている。例として、*SF3B1* 変異、*SRSF2* 変異によりクロマチン制御因子である *BRD9*、*EZH2* が NMD の機序で消失することが知られている。これらはスプライシング異常が他のパスウェイを介して発がんに寄与する好例と言える。

血液がんにおける RNA スプライシング異常

スプライシング異常を来した転写産物の ~70% は Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) により分解されることが知られている。しかし、ごく一部は

インフレームにイントロン配列が挿入され機能変容をきたしたタンパク質が産生される (図 1)。ここでは後者の一例として転写因子 *EVII* の新規スプライシングバリエーションについて紹介する。3 番染色体の逆位や転座 (*inv(3)*, *t(3;3)*) を伴う急性骨髄性白血病 (AML) では *GATA2* の遠位エンハンサーが *EVII* 近傍に位置することで *EVII* の発現を数十倍に上昇させ、造血幹細胞を形質転換させる。このような染色体再構成を伴う AML109 例の遺伝子変異を探索すると RNA スプライシング因子である *SF3B1* 遺伝子の変異が 32% と最も高頻度に検出された。これは AML 全体では 4% 以下であることを考慮すると突出した値であり、両者の機能的なリンクが予想された。予想した通り、ヒト *inv(3)* 配列を発現するトランスジェニックマウスと *Sf3b1* 変異体ノックインマウスを交配すると協調的に AML を誘導した。そこで *SF3B1* 変異が惹起する異常スプライシング産物を RNA ワイドに解析すると、*EVII* の DNA 結合領域近傍に 6 アミノ酸 (18 塩基) が挿入された未知のアイソフォームが *SF3B1* 変異細胞特異的に生じていることを発見した。この 18 塩基は、イントロン 12 の 3' スプライス部位側に由来しており、本来の canonical な 3' スプライス部位 (AG) の 18 塩基上流の AG を *SF3B1* 変異体特異的な 3' スプライス部位として利用していた。この新規アイソフォームは造血幹細胞の自己複製能を有意に亢進させており、スプライシング異常による転写因子 *EVII* の機能変容を示した研究成果と言える²⁾。

一方、スプライシング異常の大半を占める NMD イベントの中からのように生物学的に重要な標的を抽出するかは大きな課題である。一つの解決策として、我々はスプライシング関連遺伝子変異を有する患者 mRNA データから NMD 標的となる転写産物を予測し、それらに対するカスタム sgRNA ライブラリを作成することで、ヒト・マウス細胞株を用いた CRISPR スクリーニングを実施している。この手法により、*SF3B1* 変異体の重要な下流標的に *BRD9* (Bromodomain-containing protein 9) を同定した。*BRD9* は新規クロマチン制御タンパク複合体 (non canonical BAF, ncBAF) の必須の構成因子であるが、*BRD9* 自体のゲノムレベルでの変異を伴うことなく、スプライシング異常により ncBAF の機能喪失をきたし発がんが誘導されることを示した。

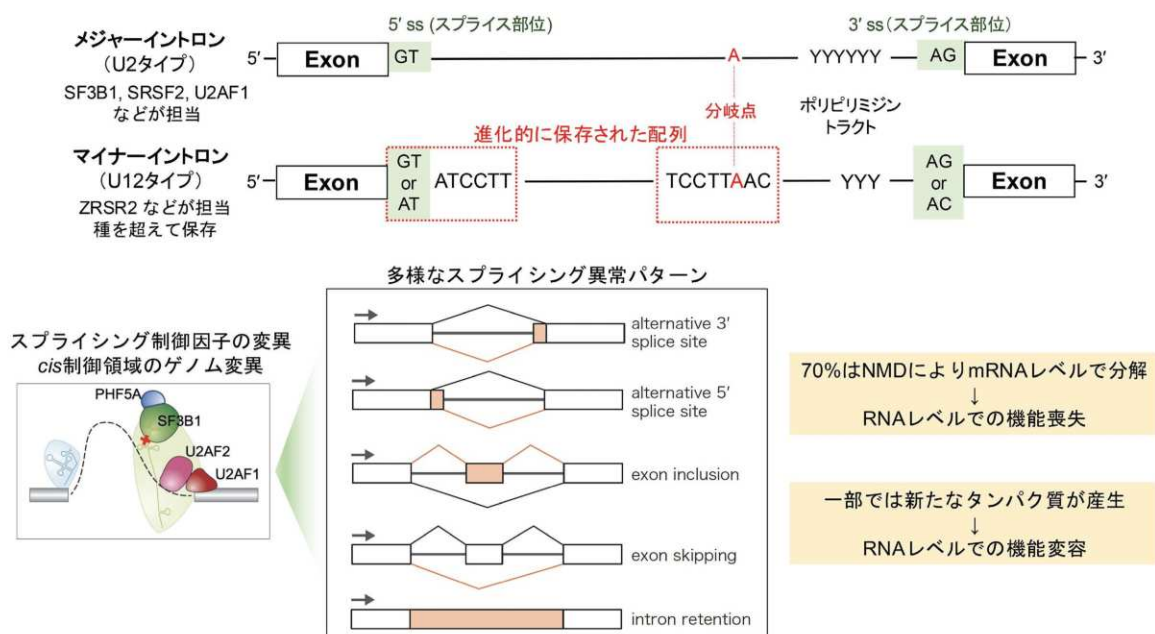


図1. 大多数を占めるメジャーイントロンと希少なが保存されてきたマイナーイントロンの特徴、およびがんで認められるスプライシング制御機構の破綻

SF3B1 変異細胞ではあらゆるがん検体コホートで強い有意差をもって BRD9 mRNA の発現が抑制され、タンパク喪失が確認された。詳細に転写産物を解析すると、BRD9 イントロン 14 配列内の両スプライス部位から離れた領域が SF3B1 変異体の存在下でエクソン化を介しており、この配列内には終始コドンが存在し、転写産物に含まれた場合、NMD によって mRNA レベルで分解される現象を捉えることができた³⁾。BRD9 を造血細胞特異的にノックアウトしたモデルを作出したところ、長期造血幹細胞の量的低下、B 細胞系列への分化阻害、ミエロイド系列への顕著な分化バイアスが確認され、移植実験においても B 細胞を中心とする血球減少、大球性貧血、形態異常を呈して骨髄異形成症候群 (MDS) に合致する結果が得られ、それらは細胞自律的な作用であることが裏付けられた⁴⁾。これらの点から、SF3B1 変異による造血異常の少なくとも一部は BRD9 の機能喪失で説明することができる。

進化的に保存されたイントロンを介した発がん機構

前述の SF3B1、U2AF1、SRSF2 などの変異とは異なり、ZRSR2 変異はスプライシング関連遺伝子の中で実にユニークな特徴を有する。我々が検討し

た 2302 例のヒト骨髄系腫瘍中の ZRSR2 機能喪失型変異陽性例は例外なく男性患者に限定された。ZRSR2 はヒトでもマウスでも X 染色体上に存在する遺伝子であることから、EXITS (escape from X inactivation tumor suppressor) と呼ばれる X 染色体上のがん抑制遺伝子であり、女性では仮に変異が生じても健常アリルが不活化されずに機能を補完する仕組みがあると推測される。SF3B1、U2AF1、SRSF2 は全イントロンの 99% 以上を占めるメジャー (U2) イントロンのスプライシングを担当するが、わずか 700 個ほどの特徴的な配列を有するマイナー (U12) イントロンのスプライシングは ZRSR2 が担当している (図 1)。一般にイントロンの配列はエクソンと比較して種間での保存性に乏しいが、この希少なイントロンは 5' スプライス部位や分岐点周囲に進化的に保存された配列「TCCTTAAC」を持ち、細胞周期、シグナル伝達、DNA 損傷修復、RNA 輸送など細胞の生存に不可欠な役割を担う遺伝子において進化的に保存されてきた。ZRSR2 変異細胞では、マイナーイントロンが pre-mRNA スプライシングの過程で除去されず、成熟 mRNA 内に一部残存してしまうイントロンリテンション (intron retention, IR) という現象が観察される。我々

は造血細胞特異的 *Zrsr2* ノックアウトマウスを作出し、*in vitro*、*in vivo* の両面で造血幹細胞の自己複製能が亢進し、クローン優位性が獲得されることを明らかにした。これは *SF3B1*、*SRSF2*、*U2AF1* のホットスポット変異が自己複製能を障害するのと対照的であり、*ZRSR2* 変異は造血幹細胞でクローン優位性が獲得できることを証明された初めてのスプライシング遺伝子変異であった。続いて、*ZRSR2* 変異における生物学的に重要な標的遺伝子を探索するために、マイナーイントロン含有遺伝子の sgRNA ライブラリを作成し、ヒト・マウス細胞株を用いた CRISPR スクリーニングを実施した。興味深いことに、RAS 関連分子 (*RIT1*, *MRAS*) をユビキチン化する *CUL3* のアダプターとして RAS 経路の抑制に寄与する *LZTR1* のスプライシング異常を同定した⁵⁾。

一方で、*cis* の異常として、*LZTR1* イントロン自身の分岐点周囲の保存配列「TCCTTAAC」にゲノム変異が生じており、やはり *LZTR1* の顕著な発現低下を来す白血病症例も存在する。同保存配列には固形腫瘍においても変異が見られ、変異型ミニジンレポーターアッセイを用いた *in vitro* 系でも、わずか 1 塩基の違いでスプライシング状況が一変し、IR を有するアイソフォームが有意になることが示された。細胞株を用いた実験ではこれらの変異が薬剤耐性やサイトカイン非依存性を誘導することを見出した。

このように、マイナーイントロンの制御異常がクローン進展に直接的に貢献することを明らかにしたが、そもそもなぜマイナーイントロンが生物学的に重要な遺伝子だけに種を超えて保存されてきたのか、男性にだけスプライシング脆弱性があるのかなど、腫瘍学の枠組みを超えた今後の研究の成果に期待したい。

おわりに

上述のとおり、RNA スプライシングの破綻ががんの発症や進展に寄与することが明らかになってき

た。現在、様々な手法で RNA スプライシング破綻を利用した治療法が検討され、一部は臨床試験も行われている。その中には、野生型 *SF3B1* の機能阻害、スプライシング制御因子の翻訳後修飾の阻害、RNA 結合タンパク質の分解誘導、アンチセンスオリゴ (antisense oligonucleotide ; ASO) によるスプライシングの制御、スプライシングに伴うネオ抗原の誘導など多岐にわたる。がん細胞ではグローバルにあらゆる遺伝子でスプライシング異常が生じており、単独の標的スプライシング産物を狙った核酸医薬により根治を目指すのは困難と言わざるを得ない。スプライソソームを標的とする薬剤も標的がブロードであり、より腫瘍細胞特異的に作用する薬剤の開発が待たれる。一方で、スプライソソーム阻害剤を利用して、がん細胞特異的な選択的スプライシングを意図的に誘導しネオ抗原を提示させることを利用した治療戦略も考案されており、今後免疫チェックポイント阻害剤等との併用療法なども期待される。

参考文献

- 1) 臧維嘉, 雜賀渉, 青山有美, 井上大地: スプライシング異常と血液悪性腫瘍, 臨床血液, 64(9):875-883 (2023)
- 2) Tanaka A et al. Aberrant *EVI1* splicing contributes to *EVI1*-rearranged leukemia. *Blood*. 2022 Aug;140(8):875-888.
- 3) Inoue D et al. Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer. *Nature*. 2019 Oct;574(7778):432-436.
- 4) Xiao et al. BRD9 determines the cell fate of hematopoietic stem cells by regulating chromatin state. *Nat Commun*. 2023 Dec;14(1):8372.
- 5) Inoue D et al. Minor intron retention drives clonal hematopoietic disorders and diverse cancer predisposition. *Nat Genetics*. 2021 May;53(5):707-718.