



公益財団法人
神戸医療産業都市推進機構
Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe

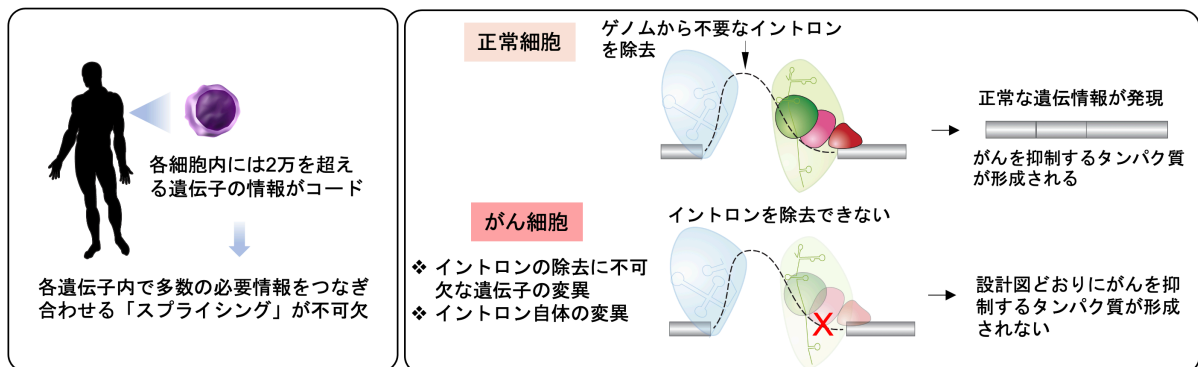
経営企画部 広報戦略課 永田・太田

TEL: 078-306-2231 E-mail: kbic-pr (末尾に @fbri-kobe.org をつけてください)

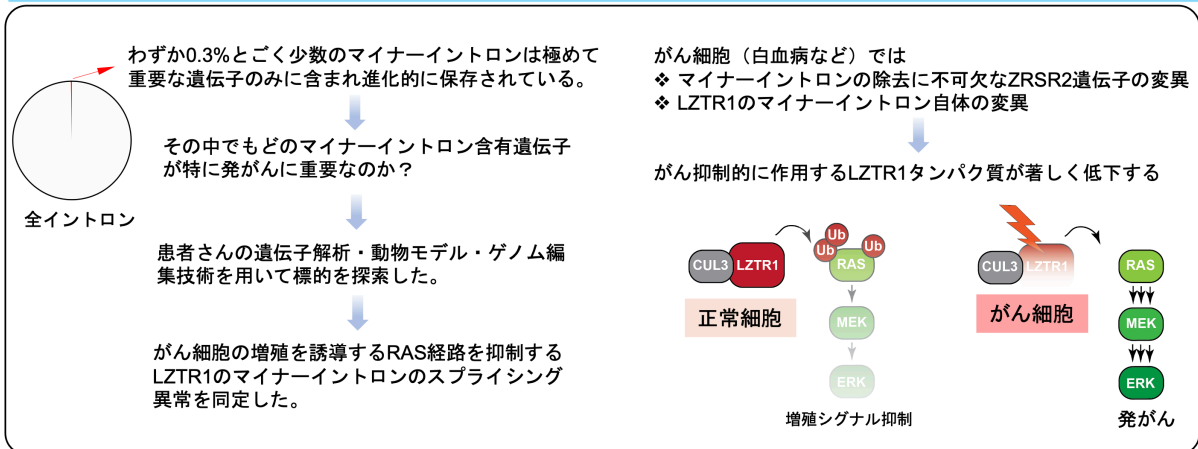
ごく少数の「マイナーイントロン」が がんを導くメカニズムを初めて解明 ——不要な遺伝情報を除去できずがんに至る——

神戸医療産業都市推進機構（神戸市、理事長：本庶佑、以下「当機構」）は、井上大地博士（当機構先端医療研究センター血液・腫瘍研究部首席研究員）の研究成果が2021年4月12日（月）午前11時（米国東部時間）、13日（火）午前0時（日本時間）、国際科学誌 *Nature Genetics*（オンライン版）に掲載されましたので、お知らせします。

井上博士が、米国メモリアルスローンケタリングがんセンター、フレッドハッチンソンがん研究センターらとの共同研究により、我々の遺伝子（DNA）の中にごく少数しか存在しない「マイナーイントロン」と呼ばれる遺伝情報を含まない配列が適切に除去（スプライシング）できないことで発がんに至る新しいメカニズムを初めて解明しました。



本研究でごく少数の特殊な「マイナーイントロン」のスプライシング異常によるがん発症機構を解明した



研究の外観図

2019年に *Nature* に報告した内容と合わせて、スプライシングの異常による発がん機構は近年とても注目されており、今後の治療応用につながる研究成果と言えます。

【本研究のポイント】

- 白血病を中心に様々ながんに共通する「スプライシング」を介した未知の発がん機構を解明した
- ごく少数の重要な遺伝子のみに含まれる「マイナーイントロン」がスプライシングの異常により適切に取り除くことができなくなる現象を見出し、ヒト検体・モデルマウス・ゲノム編集技術を用いてその機構を明らかにした
- 近年注目のがん抑制遺伝子であるLZTR1遺伝子に含まれるマイナーイントロンがスプライシング異常により除去されず、LZTR1の機能喪失をきたして発がんに至る新たな現象を発見した
- スプライシング異常の原因として、マイナーイントロンを制御するZRSR2遺伝子の変異だけでなくマイナーイントロン自身の変異も発見し、ゲノム上の非コード領域の重要性をあらためて提示した
- マイナーイントロンを介した「マイナー」でない発がん機構に基づいた治療応用が期待される

※研究成果等の具体的な内容につきましては、添付資料をご参照ください。

■ 発表者

井上 大地



神戸市立医療センター中央市民病院に5年間勤務後、東京大学医科学研究所、米国メモリアルスロンケタリングがんセンターで計9年間白血病研究に従事し、2019年より現職。

■ 報道に関するお問合せ

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構

経営企画部 広報戦略課 永田・太田

TEL: 078-306-2231 E-mail: kbic-pr (末尾に @fbri-kobe.org をつけてください)

※報道（取材等）に関する件は、公益財団法人神戸医療産業都市推進機構 広報戦略課までお問合せ下さい。

※FBRIのロゴは、公益財団法人神戸医療産業都市推進機構の登録商標です。

2021（令和3）年4月12日（月）

報道機関各位

ごく少数の「マイナーイントロン」ががんを導くメカニズムを初めて解明～不要な遺伝情報を除去できずがんに至る～

神戸医療産業都市推進機構先端医療研究センター血液・腫瘍研究部の井上大地上席研究者らの研究グループは、米国メモリアルスロンケタリングがんセンターの Omar Abdel-Wahab 博士、フレッドハッチンソンがん研究センターの Robert K. Bradley 博士らとの共同研究により、ゲノム上にごく少数しか存在しない「マイナーイントロン」と呼ばれる配列が遺伝情報の伝達の際に適切に除去（スプライシング）できないことで発がんに至る新しいメカニズムを初めて解明しました。

遺伝情報をコードするエクソンをつないでいるイントロン配列は、全ゲノム内に数十万個存在しており、スプライシングの過程で除去されます。また、全イントロンのわずか0.3%は「マイナーイントロン」として重要な遺伝子のみに含まれており、通常とは異なる機序でスプライシングされます。これらの特殊なイントロンは、機能的に重要な遺伝子にのみ含まれていることから、その制御異常は発がんなどに深く関わっていることが予想されていました。スプライシングの異常が発がんの直接的な原因となるという知見が相次いでいますが、少数ながら進化的に高度に保存されたマイナーイントロンの発がんにおける機能は全く解明されていませんでした。

本研究では、まず、マイナーイントロンのスプライシングを制御する ZRSR2 遺伝子の機能喪失型変異が血液がんで報告されていることに注目しました。ZRSR2 変異を有する患者 RNA データの解析や Zrsr2 ノックアウトマウスの作成を介して、mRNA の段階でマイナーイントロンが適切に除去されずに mRNA ごと分解され、標的遺伝子の機能喪失に至る現象を ZRSR2 によ

る制御機構と合わせて分子レベルで捉えることに成功しました。さらに、ゲノム編集技術を活用した CRISPR スクリーニング法により、発がんに関与する重要なスプライシング異常をきたす標的遺伝子の探索を行い、RAS 関連分子を負に制御する LZTR1 のスプライシング異常を同定しました。すなわち、ZRSR2 変異は LZTR1 の喪失を介して、造血細胞の形質転換やクローン拡大に寄与していることを示しました。さらに、様々ながん種で LZTR1 のマイナーイントロン上の変異が検出され、上記と同様のスプライシング異常を惹起することを明らかにし、マイナーイントロンを介した LZTR1 mRNA の制御に基づいた新規発がん経路の存在を発見しました (図 1)。

これらの研究でマイナーイントロンと発がんとの関わりを初めて明らかにしただけでなく、がん促進的に機能するイントロン変異の同定においても、新しい手法を提案することができました。LZTR1 のスプライシング異常は血液がんにとどまらず、多くの固形がんにも幅広く認められる現象であることも本研究で明らかになりました。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機構は近年とても注目されており、本研究が発展することで、スプライシング異常が引き起こす病気の理解や新しい治療標的の開発につながることを期待されます。

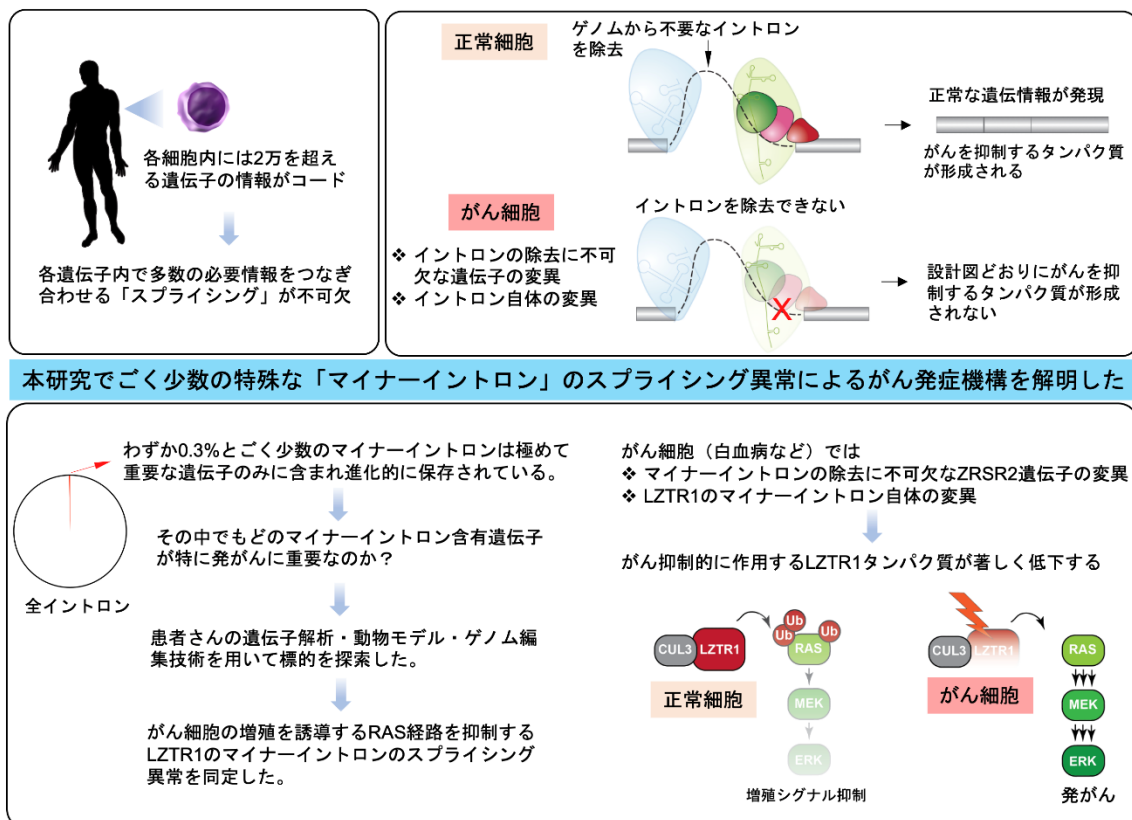


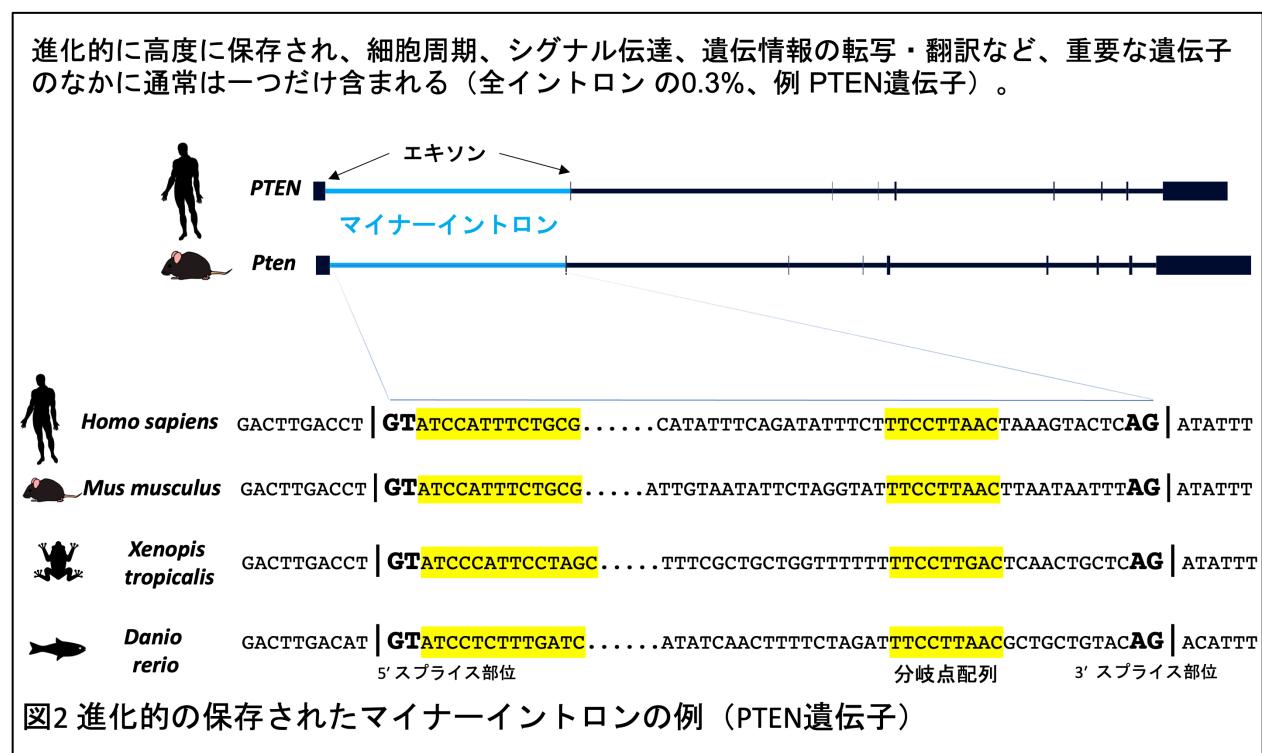
図1 本研究の概要

本研究成果は、2021年4月12日(米国東部時間)に国際科学誌『Nature Genetics』(オンライン版)に掲載されました。

研究の背景と概要

我々の細胞の DNA 上には 2 万個以上の遺伝子がコードされていますが、各遺伝子の情報は主にエクソンと呼ばれる配列にコードされており、エクソンと隣のエクソンの間はイントロンと呼ばれる非コード領域によって分断されています。遺伝情報がメッセンジャーRNA に転写される過程でイントロンが取り除かれ、コード領域のエクソンのみが結合した核酸配列がタンパク質の設計図となります。このイントロンが除かれエクソン同士が結合する過程はスプライシングと呼ばれ、遺伝情報に基づいて正常なタンパク質を作り出す上で必須の機構と言えます。

ゲノム上に数十万個存在するイントロンはそれらのスプライシング機構の視点から、99.7% を占める U2 タイプとわずか 0.3% の U12 タイプに分類されます。後者はごく少数のため「マイナーイントロン」(注 1) と呼ばれていますが、進化的に強く保存され、細胞の生存に必須とされる重要な遺伝子にのみ含まれていることから(図 2)、マイナーイントロンが様々な生理機構や発がんに関与していることが予想されていました。しかし、その詳細はほとんど解明されていませんでした。そこで、本研究ではマイナーイントロンのスプライシングに不可欠な ZRSR2 遺伝子の変異をもつ患者群やマウスモデルの解析、ならびにがんの発症や進展に不可欠な標的を新規スクリーニングにより見つけ出し、進化的に保存され機能が解明されていなかったマイナーイントロンのがんにおける役割を解き明かすことを目的としました。



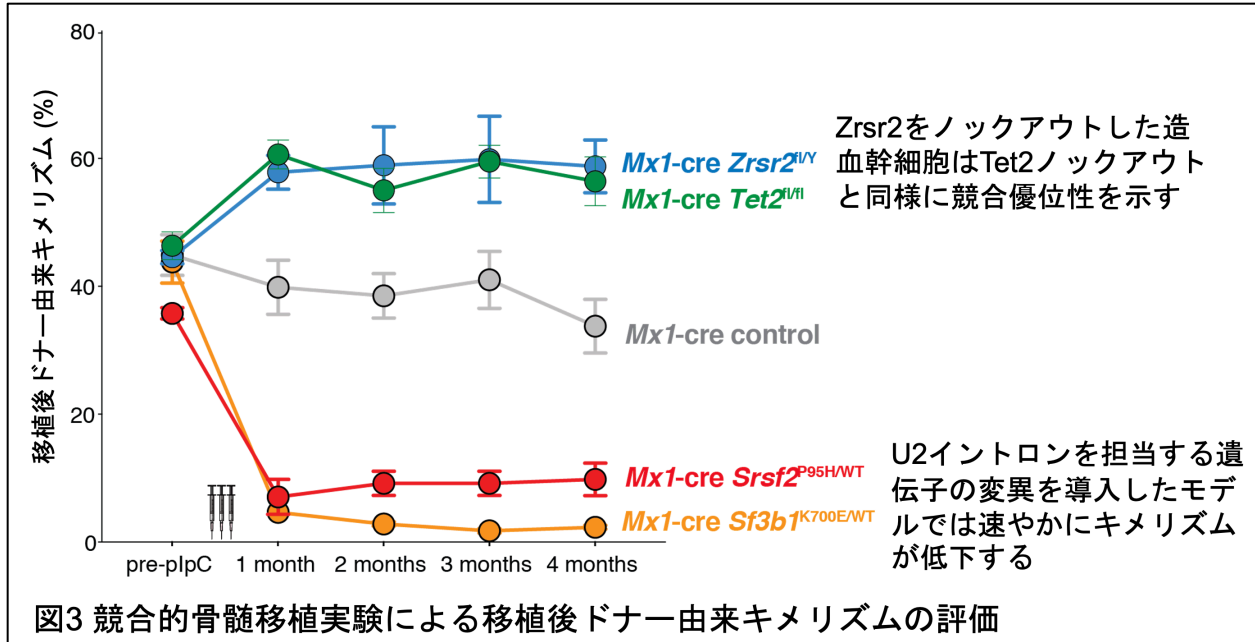
まず、スプライシング異常(注 2)をきたす原因としてスプライシングを担当するタンパク質 RNA 複合体(スプライソソーム)自体の変異を血液がん患者の RNA 検体を使用して探索しま



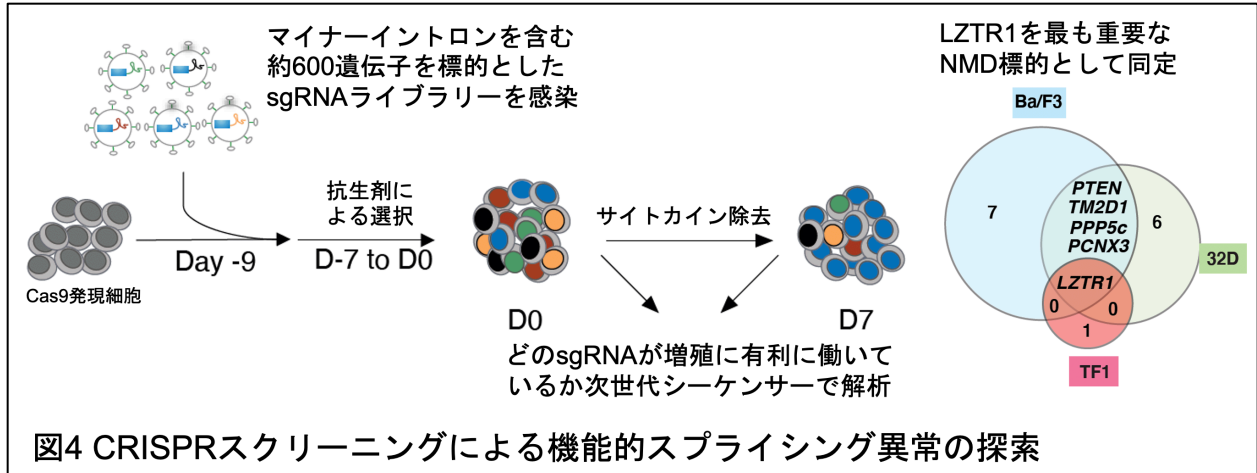
した。大多数を占める U2 タイプのイントロン除去に不可欠なタンパク質複合体の構成因子を中心に解析を行ったところ、SF3B1、SRSF2、U2AF1 遺伝子の変異の他に、ごく少数の U12 (マイナー) イントロンのスプライシングを担当し X 染色体にコードされる ZRSR2 遺伝子の変異が男性患者のみに検出されることが分かりました。前者 3 つはホットスポットを有する機能獲得型変異であることが知られていますが、ZRSR2 はコード領域全域にナンセンス及びフレームシフト変異を認め、前者とは異なり機能喪失型変異と予想されました。顕著な性差は、男性では X 染色体が 1 本しかないことと、女性において X 染色体の不活化からエスケープできるからと考えられます。

続いて、スプライソソームの変異によりどのような様な転写産物が生じるのかについて、患者検体の RNA をスプライシング異常の観点から評価すると、ZRSR2 遺伝子の変異をもつ造血幹前駆細胞ではマイナーイントロンが除去されずに mRNA 内に転写後も残存してしまう現象 (イントロンリテンション) が確認されました。このような転写産物は、早期終始コドンにより速やかに分解される機序 (NMD) があることが知られています。このスプライシング変化が ZRSR2 による直接的なものか検討するために、eCLIP-seq と呼ばれる手法を用いて、ZRSR2 の RNA ワイドな結合を評価すると、やはりマイナーイントロン周囲への結合が確認されました。進化的に保存されたマイナーイントロンを有する遺伝子は 700 個程度しか存在せず、そのどれもが細胞の生存等において重要な役割を担っています。興味深いことに、このうち 1/3 程度は特に ZRSR2 変異により強くイントロンリテンションが誘導されていましたが、残り 2/3 は影響が軽微でした。そこで、両者のイントロンがどのように区別されているのかを配列パターンの観点から検討すると、ZRSR2 の有無に影響を受けるマイナーイントロンはイントロン除去の際に必須となる分岐点とよばれる部位とイントロン/エキソン接合部である 3'スプライス部位との距離に規定されることが明らかとなりました。すなわち、この距離が近いと ZRSR2 によるスプライシングの対象となることが分かり、マイナーイントロンとカテゴライズされる特殊なイントロンは少なくとも 2 つ以上にさらに分類できることが分かりました。

では、ZRSR2 変異はスプライシング異常を介して血液がんを誘導するのでしょうか? この問いに答えるために、plpC により Mx1 プロモーター制御下に Cre リ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ました。Zrsr2 を喪失した造血幹細胞は、既報の 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の亢進や、競合移植実験 (注 3) での優位性の獲得が認められました。一方で、U2 イントロンのスプライシング異常をきたすことがすでに報告されているヒト変異を模倣した Sf3b1 や Srsf2 の変異体ノックインモデルマウスでは、競合移植能が顕著に低下していました (図 3)。すなわち、あらゆるスプライシング関連遺伝子変異の中で ZRSR2 変異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と考えられました。



続いて、どのようなイントロンリテンションが発がんに関与しているかを特定する手法を開発しました。機能的 CRISPR スクリーニング法として、まず NMD 標的となる遺伝子群を予測してシングルガイド RNA (sgRNA) ライブラリーを作成し、様々な細胞株やマウスを用いて腫瘍化に寄与する NMD 標的遺伝子の同定を試みました。これにより、Cas9 と sgRNA を用いて DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を改変するゲノム編集を行うことで、特定の遺伝子をノックアウトすることが可能となります。このスクリーニングでは約 600 遺伝子を同時にノックアウトした細胞群を作成して、どの遺伝子のノックアウトが細胞の生存や増殖に有利に働いているかについて、統計学的手法を用いて検討しました。その結果、RAS ファミリー分子（注 4）の分解に寄与する LZTR1 遺伝子（注 5）の NMD が最も重要な標的として見つけ出すことができました（図 4）。LZTR1 遺伝子の 18 番目のイントロン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全て U2 タイプのイントロンです。ZRSR2 変異を持つ血液腫瘍では LZTR1 イントロン 18 のリテンションをきたして遺伝子ごと分解され、その結果 RAS ファミリー分子の著しい発現上昇が認められました。CRISPR 技術により、マイナーイントロンの分岐点周囲に変異を人為的に導入するだけで、造血幹細胞や細胞株が不死化することがわかり、同部位のスプライシングが発症に極めて重要であることを証明しました（図 5）。



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 遺伝子のイントロン変異が、ZRSR2 変異細胞と同様の帰結を辿り、RAS/MAPK 経路が活性化していることを合わせて発見しました。例えば、図 5 の白血病症例ではわずか 1 つのイントロン配列の違いでスプライシング異常を介して LZTR1 が全く発現しないことが分かりました。マイナーイントロン内に認められるイントロン変異を人為的に導入した細胞は ZRSR2 変異細胞と同様にイントロンリテンションの増加とタンパク質レベルでの低下を認め、すみやかに不死化することから、LZTR1 遺伝子に隠されたマイナーイントロンの重要性を支持する結果が得られました。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に比較的高頻度に認められていますが、マイナーイントロン内の変異も同様に疾患の原因となることを細胞株および生体モデルを用いて証明しました。最後に、このような LZTR1 遺伝子のイントロンリテンションは、ZRSR2 変異を有する血液腫瘍にとどまらず、がん横断的に観察されることも 20 種類を超える様々ながん患者 RNA のデータ解析で明らかとなり、血液がんにとどまらず固形腫瘍に至るまでこの経路の重要性が示唆される結果といえます。

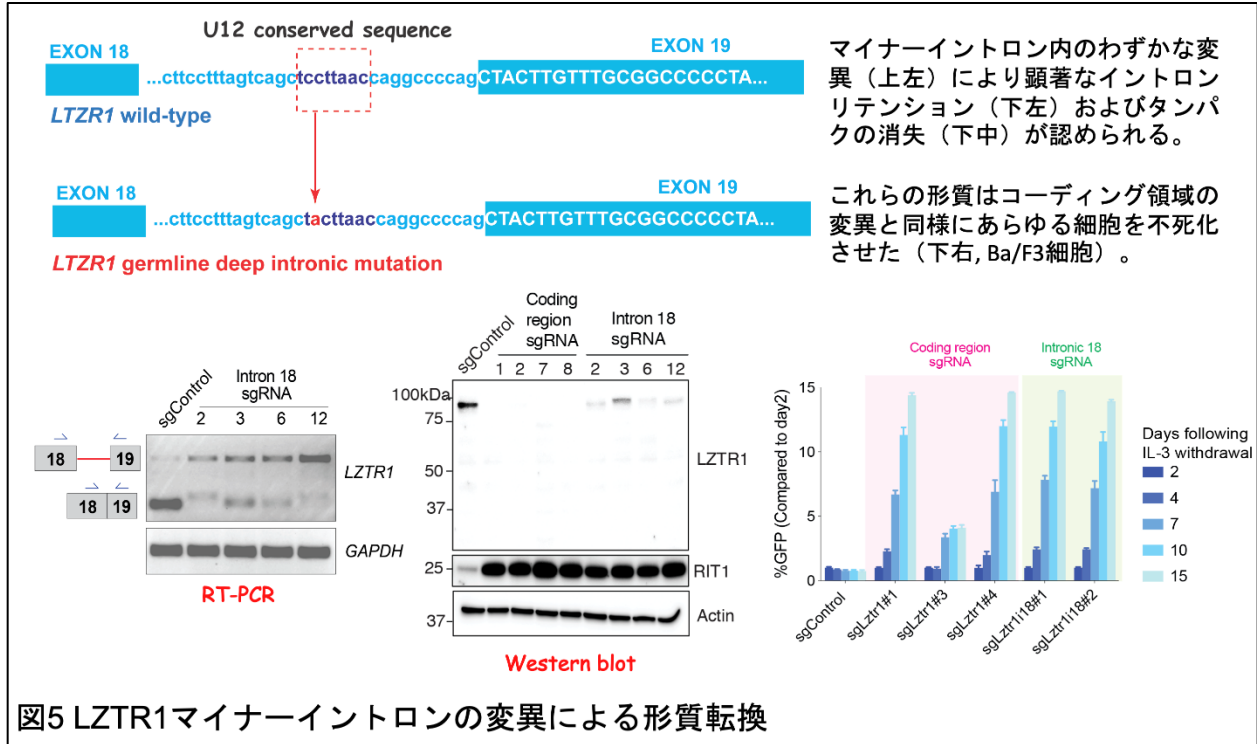


図5 LZTR1マイナーイントロンの変異による形質転換

研究の成果と意義・今後の展開

がん化についての研究は、これまでに 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」という枠組みの中で発展してきました。しかし、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逃されてきました。そこで、本研究グループ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あると考え、RNA レベルでの発現制御メカニズムや、非コード領域の異常、イントロン変異に着眼して研究を重ねてきました。今回の研究で、マイナーイントロンというごく少数の「隠された秘宝」が、悪性腫瘍の制御に極めて重要であることを統合的な解析から明らかにすることができました（図 5）。U2 タイプのイントロンのスプライシングに異常をきたす SF3B1 遺伝子変異とその下流標的に関する報告 (Inoue et al. Nature 2019) と合わせて、スプライシング異常による発がん機構について新知見をヒト・マウス・分子レベルで証明することが可能になりました。本研究グループが、これらのスプライシング異常に着眼した理由のひとつは特異的な治療応用が可能である点でといえます。核酸医薬 ASO (Anti-sense oligonucleotide) によるイントロン転写の阻害、CRISPR 技術によるスプライシングエンハンサー配列の除去、スプライソソーム阻害剤を用いてこれらの異常が修正し、新たな治療戦略として実用化されることが期待されます。

また、本研究で利用した CRISPR スクリーニング技術は、スプライシング異常をきたすイントロン変異の探索にも応用でき、これまで大半が意味のない 1 塩基置換と考えられてきたものの中から、LZTR1 のマイナーイントロン変異のように発がんに直接的に寄与するものを抽出す



る上で有用なツールとなることが期待されます。

現段階では、なぜイントロンリテンションががん横断的に認められるのかは明らかとなっていませんが、その未知の機構の探索や上記の治療応用の可能性について検討を進める予定です。また LZTR1 の基質として数ある RAS 関連タンパク質の中でどの経路が重要であるのか、タンパク質レベルでの解析を行なっていきます。さらに、本研究グループは SF3B1 や ZRSR2 などあらゆるスプライシング関連遺伝子変異に共通した標的遺伝子の同定に成功しており、これらの造血における役割についてノックアウトマウス等を用いて検討し、新規メカニズムに基づいた治療開発を目指します。

掲載論文

掲載誌 Nature Genetics

英文タイトル

Minor intron retention drives clonal hematopoietic disorders and diverse cancer predisposition

タイトル和訳

マイナーイントロンリテンションは造血器腫瘍など多様ながんにおけるクローン拡大やがん発症を誘導する

著者名

Daichi Inoue^{1,2}, Jacob T. Polaski³, Justin Taylor⁴, Pau Castel⁵, Sisi Chen², Susumu Kobayashi^{1,6}, Simon J. Hogg², Yasutaka Hayashi¹, Jose Mario Bello Pineda^{3,7,8}, Ettaib El Marabti², Caroline Erickson², Katherine Knorr², Miki Fukumoto¹, Hiromi Yamazaki¹, Atsushi Tanaka^{1,9}, Chie Fukui¹, Sydney X. Lu², Benjamin H. Durham², Bo Liu², Eric Wang², Sanjoy Mehta¹⁰, Daniel Zakheim¹⁰, Ralph Garippa¹⁰, Alex Penson², Guo-Liang Chew¹¹, Frank McCormick⁵, Robert K. Bradley^{3,7}, Omar Abdel-Wahab²

所属

¹ Department of Hematology-Oncology, Institute of Biomedical Research and Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe, Kobe, Japan.

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

² Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA.

³ Public Health Sciences and Basic Sciences Divisions, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington, USA.

⁴ Sylvester Comprehensive Cancer Center at the University of Miami Miller School of Medicine

⁵ Helen Diller Family Comprehensive Cancer Center, University of California San Francisco, San Francisco, CA, USA.

⁶ Division of Cellular Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

⁷ Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Washington, USA.

⁸ Medical Scientist Training Program, University of Washington, Seattle, Washington, USA.

⁹ Department of Immunology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan.

¹⁰ Gene Editing & Screening Facility, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA.

¹¹ Cancer Science Institute of Singapore, National University of Singapore, Singapore.

DOI 10.1038/s41588-021-00828-9

用語解説

(注1) マイナーイントロン

進化の過程で長く保存されてきたイントロンであり特殊な配列を持ち、通常とは異なるメカニズムでスプライシングされる。全ゲノムの中でわずか 700 個程度しか存在せず、進化的にも重要な遺伝子の中に通常はひとつだけ含まれている。ZRSR2 などマイナーイントロンのスプライシングに携わる遺伝子の変異が血液がんを中心に報告されている。

(注2) スプライシング異常

DNA の塩基配列に基づく遺伝情報から、不要な部分を取り除く編集作業をスプライシングという。エクソンにコードされた各遺伝情報は暗号としての意味をもたないイントロンによって中断されており、スプライシングによって不要箇所のイントロンが除去され成熟したメッセンジャーRNAとなる。この過程で異常が生じるとメッセンジャーRNA が分解されたり、正常とは異なるタンパク質が生成される。

(注3) 競合移植実験

モデルマウス（ノックアウトマウスなど）の骨髄細胞を競合細胞（通常は野生型骨髄細胞）と一定割合で混合後、致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植して、生体内での造血再構築能を評価する実験。キメリズムを用いて競合的優位性を経時的に追跡することが可能である。

(注4) RAS

低分子 GTP 結合タンパク質の一種で、細胞増殖、転写、細胞死の抑制などに関わる。様々ながんで RAS の活性型変異が高頻度に報告されており、下流シグナルと合わせてがん化において最も重要な経路の一つといえる。

(注5) LZTR1

RAS 関連分子をユビキチン化により制御する CUL3 のアダプタータンパクとして機能し、正常細胞では RAS 経路の抑制に寄与する。2018 年以降、LZTR1 の機能低下や変異による発がん機構が相次いで報告され近年注目を浴びているがん抑制遺伝子である。

研究支援

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）の次世代がん医療創生研究事業における研究開発課題「マイナーイントロンのスプライシング異常による発癌機構と治療応用に関する研究」、JSPS 科研費（JP20H00537, JP 20H03717）、武田科学振興財団、MSD 生命科学財団、安田記念医学財団、かなえ医薬振興財団、ブリストル・マイヤーズスクイブ株式会社研究助成の支援によって行われました。

本リリースの配信元

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構

経営企画部 広報戦略課 永田、太田

TEL : 078-306-2231 E-mail : kbic-pr@fbri-kobe.org

AMED 事業に関する問い合わせ先

国立研究開発法人日本医療研究開発機構 (AMED) 創薬事業部医薬品研究開発課

TEL : 03-6870-2311 E-mail : cancer@amed.go.jp

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構

FBRI : Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe

神戸医療産業都市推進機構（理事長：本庶佑）は、2000年3月、阪神・淡路大震災からの創造的復興プロジェクト「神戸医療産業都市」の中核的支援機関および先端医療研究機能を併せ持つ財団法人先端医療振興財団として設立されました。2012年4月に公益財団法人へ移行し、2018年4月、神戸医療産業都市推進機構へと組織を発展的に改組、「健康長寿社会に向けた課題解決策を神戸から世界へ発信していく」ことを掲げ、先端医療研究センター、医療イノベーション研究センター、細胞療法開発研究センター、クラスター推進センターの4センターで事業を推進しています。

<https://www.fbri-kobe.org>



国立研究開発法人
日本医療研究開発機構

国立研究開発法人 **日本医療研究開発機構**

AMED : Japan Agency for Medical Research and Development

独立行政法人日本医療研究開発機構法に基づいて、2015年4月に設立されました。

医療の分野における基礎から実用化までの研究開発が切れ目なく行われ、その成果が円滑に実用化されるよう、大学や研究機関などが行う研究を支援し、研究開発やそのための環境の整備に取り組んでいます。