

リボソーム生合成経路の異常がもたらす造血器腫瘍発症メカニズムの解明

松井啓隆

熊本大学大学院生命科学研究部 臨床病態解析学分野

【研究の背景】

近年の、次世代シーケンサーを活用した網羅的かつハイスループットなゲノム解析技術の発展により、悪性腫瘍の発症に関与する遺伝子変異の多くが明らかとなった。とりわけ造血器腫瘍は、比較的遺伝子変異の蓄積が少なく発症することもあるが、責任遺伝子のほぼ全容が判明し、かつ、正常造血細胞が腫瘍化に至る遺伝子変異の系譜まで示されたといっても過言ではない。例えば、骨髄異形成症候群(MDS)や急性骨髄性白血病(AML)では、まず *DNMT3A* や *TET2* などのエピゲノム制御因子に体細胞遺伝子変異が生じていわゆるクローン造血状態となり、その後段階的に、クロマチン制御因子や RNA スプライシング因子、RAS など細胞増殖に関わる分子をコードする遺伝子に変異が生じることで、MDS や AML が顕在化することが示されている。このように、ゲノムの視点からは主だった造血器腫瘍の発症メカニズムがほぼ解明されたといえるが、一方で、ではいったいそれぞれの分子が正常血液細胞においてどのような役割を担っているのか、また、遺伝子変異に伴って、翻訳されるタンパク質の発現量が減少したり、異常な蛋白質が産生されたりすることが、どのように造血器腫瘍への転化に帰結するのかという点では、まだ大いに議論の余地があるといえる。ここでは、最近造血器腫瘍における遺伝子変異の存在が明らかにされた *DDX41* 遺伝子に焦点を当て、腫瘍発症への機序を詳細に検討することとした。

【目 的】

造血器腫瘍における *DDX41* 遺伝子変異は、2015 年に米国のグループが初めて明らかにした¹⁾。本遺伝子変異のたいへん興味深いところは、一定の低い割合で生殖細胞系列変異が認められるところである。米国の研究で対象とされたコホートでは、おもに p.D140fs 変異が生殖細胞変異として同定されている。一方、体細胞変異としては p.R525H 変異にその多くが集中していることが報告されており、実際、我々がこれまでに同定した症例もすべて p.R525H 変異であった。もともと生殖細胞変異を片アレルに有する個体が反対アレルに p.R525H 変異を獲得して正常 *DDX41* を失う、というのが典型的なパターンではあるが、片アレルの体細胞変異のみの症例も多く見られること、ならびに体細胞変異の場所が p.R525H に偏っていることなどから、p.R525H 変異は正常 *DDX41* タンパク質に対して別の機能を獲得するか、もしくはドミナント・ネガティブな作用を発揮するものと想定される。この研究では、まず p.R525H 変異タンパク質の正常 *DDX41* タンパク質との相違を検証することを目的とした研究を実施した。

【方 法】

p.R525H 変異体を発現させた造血前駆細胞(臍帯血由来 CD34 陽性細胞)を主な研究対象とし、mRNA シーケンス法による網羅的な遺伝子発現解析と、GSEA によるパスウェイ解析を行い、細胞増殖・分化などの表現型と関連付けることで *DDX41* の生理的な役割を検証した。また、野生型・変異型それぞれの *DDX41* タンパク質を細胞株に発現させ、免疫蛍光染色法によるタンパク質局在の解析、免疫沈降法による結合分子の解析などを実施した。

【結 果】

DDX41 p.R525H 変異体を造血前駆細胞に発現させると、細胞の増殖が著しく抑制されることが分かった²⁾。遺伝子発現解析の結果などから、この細胞増殖の抑制はアポトーシス誘導によるものが主体ではなく、RB-E2F 経路が抑制されることによ

る細胞周期の不活化を介したものであると推定された。我々が同定した *DDX41* 遺伝子変異を伴う臨床検体は、いずれも骨髓不全を背景に発症したと思われる臨床像を呈し、また、まだ論文化された事実はないが、一般的にも *DDX41* 遺伝子変異症例は骨髓不全傾向が見られるようで、こうした臨床的なデータも実験的に示された細胞表現型と矛盾しないものであった。

上記に加え、遺伝子発現解析において、DDX41 p.R525H 変異体発現細胞ではリボソーム生合成の抑制が起きていることが示唆された。DDX41 が ATP 依存性の RNA ヘリケースであること、および 2013 年のベルギーのグループからの報告³⁾で、核小体に存在する pre リボソーム RNA (rRNA) プロセシング分子のひとつとして本分子がリストアップされていることから、我々は DDX41 p.R525H 変異の発現によって pre rRNA プロセシングに障害が生じ、これに伴ってリボソーム生合成の抑制が生じるのではないかと考えている。実際、ノザンプロット法で pre rRNA 量を比較定量すると、p.R525H 発現細胞ではプロセシングの進んでいない大きなサイズの pre rRNA が蓄積することが判明した。またこれまでに、リボソーム生合成の障害に伴って生じるリボソーム関連タンパク質の不均衡によって、RB-E2F 経路が抑制されるという証左を得ているが、一方で、この経路の障害が直接的に血液細胞を腫瘍化させようとは考えにくく、本遺伝子変異に伴ってさらに別の未知の問題が生じるはずだと考えている。

【考 察】

上記したように、DDX41 遺伝子変異に伴って pre rRNA プロセシング異常が生じ、これがリボソーム生合成の抑制につながることはほぼ示すことができたが、必ずしもこれは腫瘍化そのものを説明できていないわけではない。これは、RPS14 や RPS19 などのリボソームタンパク質の異常に起因するいわゆる ribosomopathy でも同様で、リボソーム関連分子の発現低下や変異は MDS に深く関連することが示されているものの、その分子メカニズムはまだ十分には理解されていない。今回我々は、リボソーム生合成の障害が起こることによって、mRNA からタンパク質へ翻訳がなされる過程で品質保持機構に問題が生じるのではないかとこの作業仮説を立てた。今後、これを立証するため、リボソームに取り込まれまさに翻訳を受けつつある mRNA のみを分離精製し、これを次世代シーケンサーで解析する手法などを取り入れる計画を実行に移しつつある。併せて、マウスモデルもほぼ樹立が終了した。このマウスはコンディショナルにヒト DDX41 p.R525H に相当する変異体を発現するマウスであり、本マウスを用いることで個体レベルの機能解析に着手できるものと見込んでいる。本研究に助成くださいました先進医薬研究振興財団に、厚く御礼申し上げます。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

造血器腫瘍における *DDX41* 遺伝子変異は、従来のクラス 1 変異、クラス 2 変異、エピゲノム変異およびスプライシング変異のいずれにも属さない、新しいクラスの遺伝子変異となる可能性を帯びていると考えられる。生殖細胞系列変異と体細胞系列変異の機能的な相違が明確でないなど、まだ多くの解決すべき課題は残されているが、本遺伝子変異の造血器腫瘍への関わりを示すことで、造血細胞におけるリボソーム・翻訳システムの恒常性やストレス時の可塑性を維持することの重要性と、疾患への関与を明らかにする糸口になるものと期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Polprasert C, Schulze I, Sekeres MA, Makishima H, Przychodzen B, Hosono N, Singh J, Padgett RA, Gu X, Phillips JG, Clemente M, Parker Y, Lindner D, Dienes B, Jankowsky E, Sauntharajah Y, Du Y, Oakley K, Nguyen N, Mukherjee S, Pabst C, Godley LA, Churpek JE, Pollyea DA, Krug U, Berdel WE, Klein HU, Dugas M, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Yoshida K, Ogawa S, Müller-Tidow C, Maciejewski JP. Inherited and Somatic Defects in DDX41 in Myeloid Neoplasms. *Cancer Cell*. 2015 May 11;27 (5):658-70.
- 2) Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, Matsui H. Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*. 2016 Aug;44 (8):745-754.

- 3) Tafforeau L, Zorbas C, Langhendries JL, Mullineux ST, Stamatopoulou V, Mullier R, Wacheul L, Lafontaine DL. The complexity of human ribosome biogenesis revealed by systematic nucleolar screening of Pre-rRNA processing factors. Mol Cell. 2013 Aug 22;51(4):539-51.