

新しく同定した RNA スプライシング因子の変異が
急性骨髄性白血病を誘発する分子機構の解明

大阪国際がんセンター 血液内科

横田 貴史

【研究背景と目的】

造血機構は日々膨大な数の血液細胞を産生し、生涯にわたり生命活動を支えている。これまでに、造血に関与する多数の遺伝子が同定され、それらの異常と血液がんとの関連が示されてきた。しかし、これらの遺伝子異常がいかなる分子機序によって発がんに至るのかについては、未解明の点が多い。さらに、原因遺伝子が特定できない症例も一定数存在する。このことは、造血制御に関与し、その異常が血液がんの発症に寄与する未知の遺伝子の存在を示唆している。

申請者らは、独自に構築した変異胚性幹細胞ライブラリーを用いたスクリーニングにより、造血に必須の機能を有する未解析遺伝子を同定し、*Attenuated hematopoietic development (Ahed)* と命名した。*Ahed* は造血細胞に高発現する核内タンパク質をコードし、分子遺伝学的解析の結果、RNA スプライシング制御を介して造血に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに、がん関連遺伝子異常データベースの解析から、*Ahed* 遺伝子変異がヒト急性白血病において複数同定されており、病因との関連が示唆された。

本研究では、新規 RNA スプライシング因子である *Ahed* に着目し、正常造血過程における生理的機能の解明とともに、*Ahed* 変異が急性骨髄性白血病 (AML) の発症および進展に果たす役割を明らかにすることを目的とする。近年、RNA スプライシング因子の変異は骨髄異形成症候群や AML の予後不良群に高頻度で認められ、その多くは片アレル性の機能獲得型ミスセンス変異である。*Ahed* 変異も同様の分子特性を有する可能性が考えられる。本研究では、*Ahed* の正常造血における機能、変異による白血病発症誘導能、ならびに白血病細胞の悪性形質 (増殖能や薬剤耐性) への影響を体系的に解析する。これにより、*Ahed* 変異を含む RNA スプライシング異常を標的とした新たな分子標的治療戦略の基盤を確立し、難治性 AML に対する治療開発への展開を目指す。

【方法と結果】

1. 正常および変異 *Ahed* のヒト白血病細胞への影響

ヒト白血病細胞株 K562 に野生型 *Ahed* および変異型 *Ahed* を強制発現させ、増殖能および薬剤耐性への影響を検討した。通常培養条件下では、いずれの *Ahed* 発現細胞においても増殖能に明らかな変化は認められなかった。一方、BCR-ABL 融合蛋白に対する分子標的薬 イマチニブ (1 μ M) を含有する条件下では、親株 K562 は増殖を示さなかったのに対し、野生型 *Ahed* を過剰発現した細胞では増殖能が維持された。さらに、ヒト急性白血病で報告されている *Ahed* ミスセンス変異 (S138C および E291D) を導入した細胞では、野生型と比較してより高い増殖能が認められた。

2. *Ahed* 蛋白の相互作用分子の解析

近位ビオチン標識法および質量分析 (mass spectrometry) を用いて、Ahed の結合分子の網羅的解析を行った。

・**近位ビオチン標識法**：ビオチン化酵素 AirID を野生型または変異型 Ahed と融合させ、レトロウイルスベクターを用いて K562 細胞に導入した。これにより、Ahed と直接または間接に近接する分子をビオチン標識し、解析を行った。その結果、野生型 Ahed では多数の RNA ヘリカーゼおよび RNA 結合蛋白が同定された。また、ミトコンドリアにおける RNA 翻訳に関与するミトコンドリアリボソーム蛋白も強く標識された。変異型 Ahed では、各蛋白の標識レベルに変化が認められ、特に RNA スプライシング関連蛋白群においては全体として標識の減弱傾向が観察された。

・**質量分析**：Ahed-AirID 融合蛋白を発現させた K562 細胞から、抗 AirID 抗体を用いて免疫沈降を行い、会合蛋白の網羅的解析を実施した。その結果、野生型 Ahed と会合する蛋白として、RNA の成熟過程に関与する多数の因子が同定され、RNA スプライシング関連蛋白に加えて、RNA の核外への輸送に関与する蛋白も含まれていた。一方、変異型 Ahed と特異的に会合する蛋白も検出され、その中には急性骨髄性白血病や固形癌において予後不良と関連する分子が含まれていた。

【考察と今後の展望】

本研究の結果から、野生型 Ahed の高発現はヒト急性骨髄性白血病細胞において、増殖能の維持・亢進および薬剤耐性の増強に関与する可能性が示唆された。さらに、Ahed ミスセンス変異を導入した細胞では、これらの性質が一層強まる傾向が認められ、Ahed の機能異常が白血病細胞の悪性形質に寄与する可能性が考えられる。

相互作用解析の結果から、Ahed は RNA スプライシングにとどまらず、RNA の核外輸送や翻訳過程に関与する蛋白群とも広く会合しており、RNA 代謝全体の制御に関与する分子である可能性が示唆された。特に、ミトコンドリア関連蛋白との相互作用が認められた点は、エネルギー代謝や蛋白質合成制御との関連を示唆する所見として注目される。

また、ヒト急性骨髄性白血病で同定されている Ahed 変異は、野生型とは異なる蛋白相互作用プロファイルを示したことから、これらの変異が特異的な分子ネットワークの再構築を介して腫瘍細胞の性質に影響を及ぼしている可能性がある。

今後は、タグの異なる発現系や内因性発現レベルでの解析を行うことで、今回の結果の再現性および生理的妥当性を検証する必要がある。さらに、Ahed 機能を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドなどの分子標的アプローチを開発し、難治性・再発性急性骨髄性白血病に対する治療効果を前臨床モデルで検証することで、新たな治療戦略への展開が期待される。