

# RNA代謝異常による髄芽腫の発症機序の解明

国立がん研究センター研究所脳腫瘍連携研究分野

鈴木 啓道

【背景】小児悪性脳腫瘍は、小児がんの中で最も頻度の高い死亡原因である。特に、髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で最も発症頻度が高く、極めて悪性度の高い疾患である。予後が非常に不良であり、有効な分子標的薬が存在しないため、新たな治療法の開発が強く求められている。

研究代表者は、髄芽腫の全ゲノムシーケンスデータを再解析し、解析手法に工夫を加えることで、これまで解析が困難であった繰り返し配列領域における変異の同定を可能にした。その結果、ノンコーディングRNAであるU1 small nuclear RNA (U1 snRNA) に変異が高頻度に生じていることを発見した (H. Suzuki, Nature, 2019)。

U1 snRNAは、他のRNAを塩基対形成 (base pairing) により認識する配列を有し、さまざまなRNAの代謝に関与している。髄芽腫におけるU1 snRNAの遺伝子変異は、常に3塩基目がA>G に置換されており、この変異はRNA認識配列内に存在する。したがって、変異型 U1 snRNAは、本来のU1 snRNAとは異なる配列を認識し、作用することになる。

U1 snRNA は多様な機能を有するが、そのひとつにスプライスサイトの認識がある。これまで、U1 snRNA の変異により腫瘍細胞内で広範なスプライシング異常が生じていることを明らかにした。1,000以上の遺伝子でスプライスサイト異常が生じていることを同定したが、その中でどの異常が病態形成に重要な役割を果たしているのかは明らかになっていない。近年、U1 snRNA はスプライスサイトの認識だけでなく、異常ポリアデニル化の抑制やRNAの局在制御など、多様な機能を有することが報告されている。そのため、スプライシング異常のみでは髄芽腫の病態を十分に説明することは難しく、U1 snRNA変異を有する腫瘍内では、多様なRNAプロセスの異常が生じていることが推測される。

したがって、新規治療法の開発に向けては、RNA プロセスの異常を包括的に解明し、U1 snRNA 変異がもたらす分子病態を明らかにすることが不可欠である。本研究では、U1 snRNA変異のさらなる病態解明を目的として研究を行った。

## 【方法と結果】

### 1. 一分子direct RNAシーケンスを用いたRNA解析

本研究では、4症例のU1 snRNA変異型 (mutant) および3症例の野生型 (wild-type) SHH髄芽腫に対して、Nanopore ロングリードシーケンス技術を用いた一分子direct RNAシーケンスを実施した。その結果、1症例あたり平均3.8M readsのデータを取得し、網羅的な転写産物解析を行った。さらに、133例の髄芽腫に対して、ショートリードシーケンスを用いたRNA シーケンスを実施し、遺伝子発現解析およびスプライシング異常の網羅的解析を行った。

遺伝子発現データの解析において、ゲノムワイドに発現パターンを評価したが、U1 snRNA変異型と野生型の間で明確なクラスター分離は認められず、変異型腫瘍は複数のクラスターに分布することが明らかとなった。この傾向は、サンプル数を増やしたショートリードによるRNAシーケンス解析においても同様に観察された。これらの結果から、U1 snRNA変異型腫瘍で

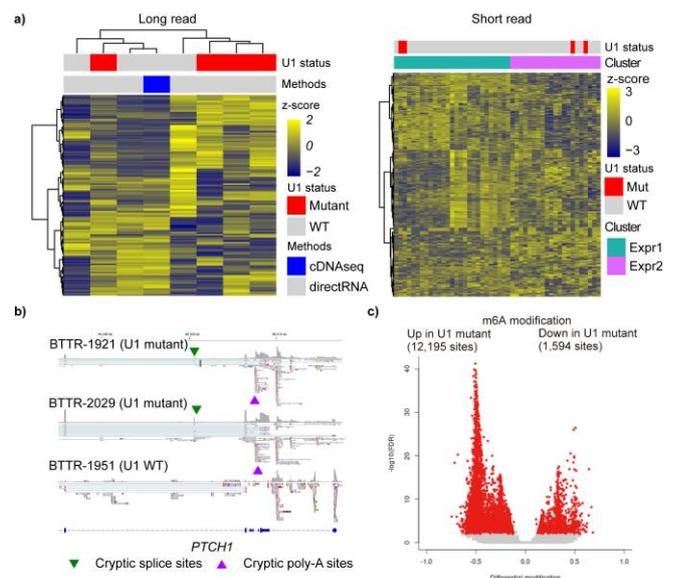


図 1: direct RNA シーケンスを用いた RNA 解析

は、多数の遺伝子にスプライシング異常が生じているものの、発現プロファイル全体に及ぼす影響は限定的である可能性が示唆された。すなわち、スプライシング異常が腫瘍細胞内の遺伝子発現パターンに大規模な変化をもたらすのではなく、一部の特定の遺伝子の発現や機能の変化が、腫瘍形成に寄与している可能性が考えられる(図1a)。

一分子direct RNAシーケンスは、RNA分子をそのままの状態でも解析可能であり、ポリアデニル化配列を含むRNA末端の詳細なシーケンスが可能である。この特性を利用することで、ポリアデニル化部位の正確な同定が可能となる。本解析において、U1 snRNA変異を有する腫瘍では、U1 snRNA野生型腫瘍では観察されない特異的なポリアデニル化部位が新たに同定された(図1b)。さらに、異常ポリアデニル化が生じる部位の多くは、転写産物の上流イントロン領域に集中していることが明らかとなった。これまでの研究において、U1 snRNAがRNAプロセッシングにおいてポリアデニル化の制御に関与することが報告されており、本研究の結果は、U1 snRNAの変異がこの制御機構を破綻させ、異常ポリアデニル化を引き起こす可能性を示唆している。

さらに、direct RNAシーケンスを活用し、RNA修飾の解析を実施した。特に、転写後修飾の一つであるN6-methyladenosine (m6A)のプロファイリングを行ったところ、U1 snRNA変異型腫瘍ではm6A修飾の亢進が認められた(図1c)。これまでの報告では、プロテオーム解析によりm6A修飾パスウェイの活性化が示唆されており、本研究の結果と整合する。さらに、U1 snRNAはRNAの細胞内局在を決定する機能を有することが報告されており、RNAの局在異常がRNA修飾の変化と関連している可能性も考えられる。これらの知見は、U1 snRNA変異によるスプライシング異常に加え、RNA修飾や局在異常が腫瘍の病態形成に関与している可能性を示唆するものである。今後、m6A修飾の異常がどのようにU1 snRNA変異型腫瘍の病態形成に寄与するのかを詳細に解析し、スプライシング異常とRNA修飾異常の相互作用を包括的に解明することが重要であると考えられる。

## 2. U1 snRNAゲノム多様性の解明

U1 snRNAはヒトゲノム内に複数のコピーを有し、90%以上の相同性を持つSegmental Duplication (SD)領域に分布している。このようなゲノム構造を持つ遺伝子領域では、個人間の多型 (Polymorphism) が生じている可能性が高いと考えられる。そこでHuman Pangenome Consortium (HPRC) が公開するHuman Pangenome Referenceを活用し、グラフゲノム解析によってU1 snRNA領域の多型を詳細に解析した。構築したグラフゲノム上では、共通配列に4つのU1 snRNA遺伝子が存在し、それぞれの領域から分岐する4つのバブル構造を同定した(図2a)。各バブル内にもU1 snRNAの配列が含まれており、このバブル構造がコピー数の多型を反映していることを明らかにした。さらに、髄芽腫患者および健常者のU1 snRNAコピー数を比較したが、患者群において有意な増減は認められず、U1 snRNAのコピー数と疾患リスクとの直接的な関連は示されなかった(図2b)。また、U1 snRNAの転写開始点上流において、一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) が高頻度に認められることが明らかとなった。これらの結果から、U1 snRNA領域には構造異常を含む複雑な多型が存在することが示唆された(図2c)。

このようにU1 snRNA遺伝子領域が複雑な多型を有することが明らかとなり新たな診断法の開発を試みた。U1 snRNAはゲノム上流および下流領域においても多型が認められるが、プロモーター機能を有する領域は高度に保存されていることが確認された。この保存性の高い領域に着目し、マイクロ流路型遺伝子定量装置を用いた変異アレル特異的PCR増幅法による迅速診断法を開発した。さらに、RNA-seqデータ

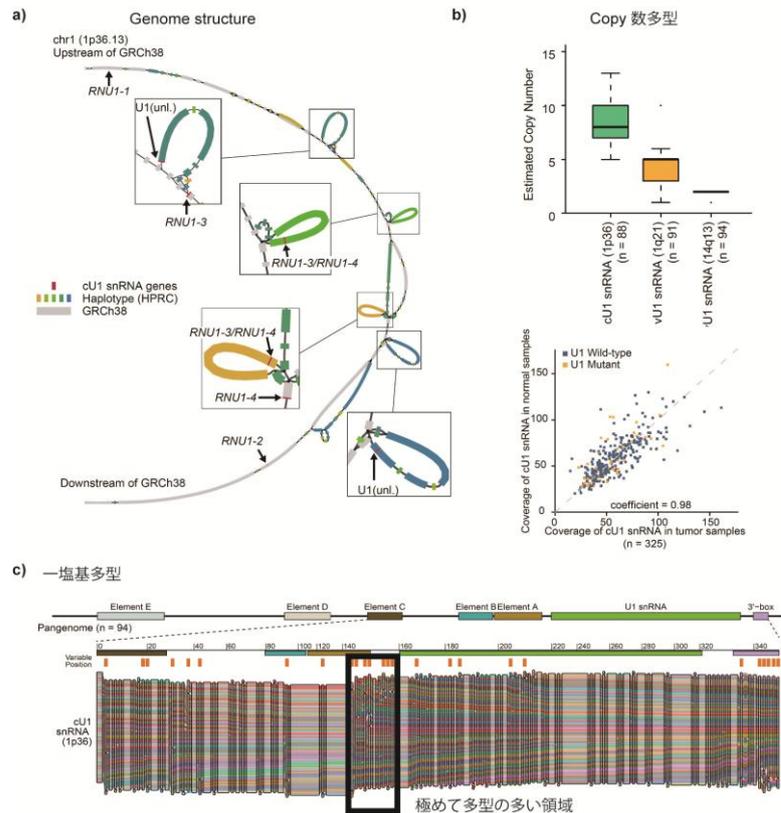


図 2: U1 snRNA の複雑性

これらの結果から、U1 snRNA領域には構造異常を含む複雑な多型が存在することが示唆された(図2c)。

このようにU1 snRNA遺伝子領域が複雑な多型を有することが明らかとなり新たな診断法の開発を試みた。U1 snRNAはゲノム上流および下流領域においても多型が認められるが、プロモーター機能を有する領域は高度に保存されていることが確認された。この保存性の高い領域に着目し、マイクロ流路型遺伝子定量装置を用いた変異アレル特異的PCR増幅法による迅速診断法を開発した。さらに、RNA-seqデータ

を解析し、スプライシング変化を定量化することで、機械学習手法の一つであるRandom Forest法を用いた変異予測アルゴリズムを構築した。開発した診断手法を新規の39症例に適用した結果、100%の精度でU1 snRNA変異を診断可能であることが確認された。また、サブサンプリング解析を実施し、診断に必要な最低限のシーケンス条件を明確にした。本研究で開発した診断手法は、U1 snRNA変異の検出精度向上に寄与し、将来的な疾患リスク評価や個別化医療への応用が期待される。

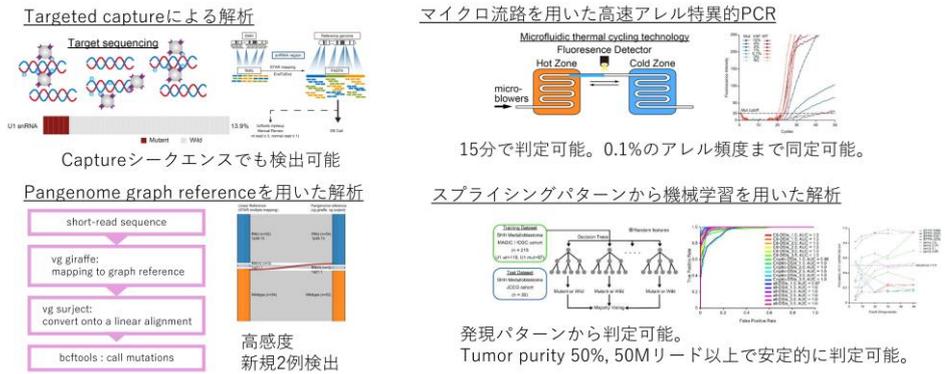


図 3: U1 snRNA 変異診断法の確立

【考察】

本研究では、一分子direct RNAシーケンスとグラフゲノム解析を用いて、U1 snRNA変異型髄芽腫のRNAプロセッシング異常とゲノム多様性を包括的に解析した。U1 snRNA変異型では広範なスプライシング異常が生じるものの、発現プロファイル全体への影響は限定的であり、一部の遺伝子の機能的変化が腫瘍形成に寄与する可能性が示唆された。また、異常なポリアデニル化やm6A修飾の増加が認められ、スプライシング異常とRNA修飾異常の相互作用が病態形成に関与することが考えられる。U1 snRNA領域には複雑なコピー数多型やSNPが存在することを明らかにし、高精度な診断法を確立した。本手法は今後の臨床試験に応用が可能であると考えられる。