

医学奨励賞 2021 – がん領域 –
研究成果報告書（追加助成） <概要>

所 属	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
氏 名	井上 大地
研究テーマ	スプライシング異常による発癌機構の解明

- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
(図表、写真などの貼付を含む)

遺伝情報をコードするエクソンは全ゲノムの 1-2% 程度とされ、その間に介在するイントロン配列は、我々の全ゲノム内に 20 万個以上存在しスプライシングの過程で pre-mRNA から適切に除去され成熟 mRNA となる。全イントロンのわずか 0.3% とされ 700 余りの「マイナーイントロン」は重要な遺伝子にのみ含まれ通常とは異なる機序でスプライシングされることが知られている。非コード領域であるイントロン配列は通常のイントロンでは進化的に保存されていないが、マイナーイントロンはシグナル伝達・細胞周期・翻訳・転写・DNA 損傷修復などに関連した遺伝子に高度に保存されており生物学的な意義がうかがえる。マイナーイントロンの制御異常は遺伝子発現や発がんに深く寄与すると考えられるが、その詳細な機構は十分に解明されていない。

これまでの研究により、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検出されることに注目し、*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行った。*ZRSR2* 遺伝子変異細胞ではマイナーイントロンが正確に除去されず、イントロンの残存(イントロンリテンション、IR)を伴い NMD (nonsense mediated mRNA decay) によって mRNA レベルで分解されること、中でも RAS 経路を負に制御する *LZTR1* のマイナーイントロンのスプライシング異常を介して、RAS が活性化する未知の機構の描出に成功した (Inoue et al. *Nature Genetics* 2021)。生体モデルや細胞株を用いて、*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明らかとした。そこで本研究では、進化学・遺伝学・腫瘍学の観点から、マイナーイントロンのスプライシングにおける脆弱性の探索、RAS 経路活性化の詳細なメカニズム解析、マイナーイントロンの生理学的意義について探索を行った。

まず、X 染色体にコードされた *ZRSR2* 遺伝子の変異を有する患者は全例男性であり、*ZRSR2* は X 染色体の不活化から逃れられるがん抑制遺伝子と考えられた。また、*ZRSR2/Zrsr2* を喪失した際のスプライシング異常はマウスよりヒトの方が顕著であり、ヒト、男性におけるマイナーイントロンスプライシングの脆弱性が明らかとなった。がん横断的にスプライシング異常が認められた *LZTR1* を介した RAS 経路活性化機構の詳細について CRISPR スクリーニングを用いて探索し、*MRAS* あるいは *RIT1* といった non-canonical RAS タンパクの分解機構が重要であること、*LZTR1* 自身の機能喪失型イントロン変異や *RIT1* の機能獲得型変異を発見した。最後に、マイナーイントロンの生理学的意義を評価するために、その代表例として *PTEN* の第一イントロンを欠失したマウスを作出したところ、体外ストレス環境下での造血幹細胞の維持において、欠失モデルでは機能低下が認められるなど、マイナーイントロンの存在の重要性が示唆された。これらの結果は、マイナーイントロンのスプライシング機構による発がん機構だけでなく、マイナーイントロンそのものの脆弱性や意義を進化学や遺伝学も含めて、未知の役割を示唆する所見であり、今後の同領域の理解の進展が期待される。

医学奨励賞 2021 – がん領域 –

研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所 属	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
氏 名	井上 大地

1. 論文発表実績	
	<ul style="list-style-type: none"> ● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 論文の PDF を添付すること。 ● 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に<u>下線</u>を引く。 ● 国内外雑誌を問わない。 ● 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。
1	Nishimura K, Saika W, <u>Inoue D</u> . Minor Introns Impact on Hematopoietic Malignancies. <i>Exp Hematol</i> . In press. 査読あり
2	Xiao M, Kondo S, Nomura M, Kato S, Nishimura K, Zang W, Zhang Y, Akashi T, Viny A, Shigehiro T, Ikawa T, Yamazaki H, Fukumoto M, Tanaka A, Hayashi Y, Koike Y, Aoyama Y, Ito H, Nishikawa H, Kitamura T, Kanai A, Yokoyama A, Fujiwara T, Goyama S, Noguchi H, Lee S, Toyoda A, Hinohara K, Abdel-Wahab O, <u>Inoue D</u> . BRD9 determines the cell fate of hematopoietic stem cells by regulating chromatin state. <i>Nat Commun</i> . 2023 Dec 15;14(1):8372. doi: 10.1038/s41467-023-44081-6. 査読あり
3	Tanaka A, Nishimura K, Saika W, Kon A, Koike Y, Tatsumi H, Takeda J, Nomura M, Zang W, Nakayama M, Matsuda M, Yamazaki H, Fukumoto M, Ito H, Hayashi Y, Kitamura T, Kawamoto H, Takaori-Kondo A, Koseki H, Ogawa S, <u>Inoue D</u> . SETBP1 is dispensable for normal and malignant hematopoiesis. <i>Leukemia</i> . 2023 Sep;37(9):1802-1811. 査読あり
4	Hayashi Y, Nishimura K, Tanaka A, <u>Inoue D</u> . Extracellular vesicle-mediated remodeling of the bone marrow microenvironment in myeloid malignancies. <i>Int J Hematol</i> . 2023 Apr 12. doi: 10.1007/s12185-023-03587-x. 査読あり
5	Chen S, Vedula RS, Cuevas-Navarro A, Lu B, Hogg SJ, Wang E, Benbarche S, Knorr K, Kim WJ, Stanley RF, Cho H, Erickson C, Singer M, Cui D, Tittley S, Durham BH, Pavletich TS, Fiala E, Walsh MF, <u>Inoue D</u> , Monette S, Taylor J, Rosen N, McCormick F, Lindsley RC, Castel P, Abdel-Wahab O. Impaired proteolysis of non-canonical RAS proteins drives clonal hematopoietic transformation. <i>Cancer Discov</i> . 2022 Oct 5;12(10):2434-2453. 査読あり
6	Nishimura K, Yamazaki H, Zang W, <u>Inoue D</u> . Dysregulated Minor Intron Splicing in Cancer. <i>Cancer Sci</i> . 2022 Sep;113(9):2934-2942. 査読あり
7	Tanaka A, Nakano AT, Nomura M, Yamazaki H, Bewersdorf JP, Lazaro RM, Hogg S, Liu B, Penson A, Yokoyama A, Zang W, Havermans M, Koizumi M, Hayashi Y, Cho H, Kanai A, Lee SC, Xiao M, Koike Y, Zhang Y, Fukumoto M, Aoyama Y, Konuma T, Kunimoto H, Inaba T, Nakajima H, Honda H, Kawamoto H, Delwel R, Abdel-Wahab O, <u>Inoue D</u> . Aberrant <i>EV11</i> splicing contributes to <i>EV11</i> -rearranged leukemia. <i>Blood</i> , 2022 Aug 25;140(8):875-888. 査読あり

8	Hayashi Y, Kawabata KC, Tanaka Y, Uehara Y, Mabuchi Y, Murakami K, Nishiyama A, Kiryu S, Yoshioka Y, Ota Y, Sugiyama T, Mikami K, Tamura M, Fukushima T, Asada S, Takeda R, Kunisaki Y, Fukuyama T, Yokoyama K, Uchida T, Hagihara M, Ohno N, Usuki K, Tojo A, Katayama Y, Goyama S, Arai F, Tamura T, Nagasawa T, Ochiya T, <u>Inoue D (corresponding author)</u> , Kitamura T. MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis. Cell Rep , 2022 May;39(6):110805. 査読あり
9	<u>Inoue D</u> , Polaski JT, Taylor J, Castel P, Chen S, Kobayashi S, Hogg SJ, Hayashi Y, Bello Pineda JM, Ettaib EM, Erickson C, Knorr K, Fukumoto M, Yamazaki H, Tanaka A, Fukui C, Lu XL, Durham BH, Liu B, Wang E, Mehta S, Zakheim D, Grippa R, Penson A, Chew GL, McCormick F, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Minor intron retention drives clonal hematopoietic disorders and diverse cancer predisposition. Nat Genetics , 2021 May;53(5):707-718. 査読あり
10	

様式 4-3②

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ● 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ● 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ● アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ● 国内外を問わない。 ● 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2023年9月23日	第82回日本癌学会学術総会 井上大地 Unraveling the Mechanisms of Aberrant Post-Transcriptional Regulation in Cancer: Implications for Therapeutic Strategies
2	2022年9月29日	第81回日本癌学会学術総会 井上大地 Dysregulated Minor Intron Splicing and Cancer
3		
4		
5		
6		
3. 投稿、発表予定（投稿中の論文も含める）		
	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1		
2		
3		
4		
5		
6		