

34 髄芽腫におけるスプライシング異常の解明 鈴木 啓道

**【目的】** 髄芽腫は小児悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く極めて悪性度の高い疾患である。これまでの研究で、ノンコーディング遺伝子である U1 small nuclear RNA (U1 snRNA) に変異が好発していることを発見した。U1 snRNA の主な機能はスプライスサイトの認識であり、変異が生じることにより髄芽腫細胞内ではスプライシング異常が生じていることがわかっていた。スプライシング異常は 1,000 を超える遺伝子に生じているが、有効な治療開発のための治療標的は病態の形成に不可欠なイベントを標的にする必要がある。そのため本研究では、病態の形成・維持に関与する重要な RNA スプライシング異常を同定し、具体的な治療開発につなげていくことを目的とする。

**【方法】** レンチウイルスベクターを用いて U1 snRNA 発現髄芽腫細胞株を作製した。日本小児がん研究グループのご協力を得て、髄芽腫 173 例に対し、アレル特異的な PCR と RNA-seq を用いて、U1 snRNA 変異の検出と髄芽腫サブグループ分類を行った。自験例 RNA-seq に加え、公開されているシーケンスデータ 221 例を用いてスプライシング異常解析を行った。また、2 例については一分子ロングリードシーケンスによる全長 RNA シーケンスデータを取得した。RNA 細胞内代謝プロセスの解明のため、ポリアデニル化領域が解析可能な 3'READS+法の改良を行った。また、細胞内 RNA 局在を解析できる、subRNA-seq の手法を確立した。

**【結果】** 変異型 U1 snRNA 発現細胞株は確立され、発現が確認された。173 例の臨床検体は髄芽腫の分子分類を行い、分子診断を確定し、以後の研究に使用した。スプライシング解析では 1,000 を超える遺伝子にスプライシング異常が同定された。公開データを用いた解析と比較すると、そのうちの約 30%は共通して認められていた。スプライシング異常の多くは影響がほとんどない passenger な異常であると考えられる一方、共通の異常も生じていることからその中にドライバーイベントが存在すると考えられた。スプライシング異常はスプライスサイト配列解析の結果変異により生じていることが確認された。改良型 3'READS+法を確立し、シーケンスリードの約 3 分の 1 がポリアデニル化領域を含んでいる効率的な濃縮が可能となり、ポリアデニル化領域の解析が可能となった。また subRNA-seq 手法の確立にて、細胞分画ごとの発現解析が可能となり、クロマチン領域では変異の導入にて 1,353 個の発現差異遺伝子が同定された。髄芽腫細胞内における RNA の代謝異常の解明が進み、今後解析を進めることでドライバーイベントの同定に繋げていく。

髄芽腫細胞株と臨床検体を使用したスプライシング異常の解析

