

を同定し、造血幹細胞の増殖に関わる遺伝子を抽出した。特定の遺伝子を対象として、さらに96症例のAA患者を対象としてエクソン解析を行った。

C. 研究結果

3症例に共通する変異は17個の遺伝子に同定された。このうち、神経軸索のガイダンス分子として知られるSLIT1については、免疫抑制療法によって改善したt(1;10)変異陽性AA例において10番染色体の切断点がこの遺伝子領域にあり、Slit1のレセプターであるRobo分子を介して細胞増殖を負に調節することが知られていたことから、特にこの遺伝子に着目した。96例のAA患者のSLIT1遺伝子は次世代シーケンサーで解析したところ、15例に変異が検出され、そのうち3症例では、サンガー法により異なる部位に一塩基置換が確認された。3症例のうち、1例の変異は顆粒球にのみ認められる体細胞変異であり、その変異部位はタンパクの三次構造解析の結果、Robo1との結合部位に一致していた。他の2例における変異は胚細胞変異であった。この2症例にはAAの家族歴は認められなかった。

SLIT1は、PHAで刺激したリンパ球の培養上清の存在下で、健常者由来CD34陽性細胞や、骨髓性白血病細胞株K562で遺伝子発現が誘導され、これらの細胞にはそのレセプターであるRobo1が発現していた。白血病細胞株K562の増殖はリコンビナントSlit1によって用量依存性に抑制された。shRNA導入によりRobo1の発現を低下させたK562細胞では、野生型K562でみられたSlit1による細胞増殖はみられなくなった。

D. 考察

典型的な自己免疫性のAAにおいて、SLIT1変異による新たなクローン性造血が同定された。SLIT1は造血幹細胞自身が産生し、それ自身の増殖を負に制御していることが、K562を用いた検討により示された。造血幹細胞に対する免疫学的な攻撃が生じた結果、種々のサイトカインが骨髓で過剰に産生され、そのサイトカインに曝されたSLIT1変異幹細胞は、自らの増殖を抑えることができないため、SLIT1変異のない正常幹細胞に比べて造血に寄与しやすくなった可能性が考えられる。造血幹細胞にSLIT1産生を促すサイトカインを同定できれば、自己免疫性骨髓不全の治療開発につながる可能性がある。

E. 結論

自己免疫性AAにおけるクローン性造血の原因となる新たな遺伝子変異としてSLIT1が同定された。このような造血を負に調節する遺伝子の変異は、他のクローン性増殖の原因にもなっている可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Ogawa S, Nakao S. Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation. *Haematologica*. 2012;97:1845-9.

2. Katagiri T, Kawamoto H, Nakakuki T, Ishiyama K, Okada-Hatakeyama M, Ohtake S, Seiki Y, Hosokawa K, Nakao S. Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or

myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages. Stem cells. 2013; in press.

3. Seiki Y, Sasaki Y, Hosokawa K, Saito C, Sugimori N, Yamazaki H, Takami A, Nakao S. Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure. Haematologica. 2013; in press.

2. 学会発表

1) Chizuru Saito, Kohei Hosokawa, Takamasa Katagiri, Akinori Kanai, Hirotaka Matsui, Toshiya Inaba, Masafumi Taniwaki, Hirohito Yamazaki, and Shinji Nakao: SLIT1 mutation

in patients with acquired aplastic anemia: Its relevance in immune pathophysiology. Session Type: Oral Session, #645: The American Society of Hematology 54th Annual Meeting, December 10, 2012. Atlanta, Georgia, USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

脱メチル化薬耐性化の分子機構

分担研究者 大屋敷一馬 東京医科大学 内科学第1講座 教授

研究要旨

骨髄異形成症候群（MDS）における脱メチル化薬の耐性化克服は MDS 治療のみでなく、今後のがん研究にとって重要な課題である。現状では臨床的に用いられている脱メチル化薬との併用薬の検討が広く行われているが、5-アザシチジン耐性化そのものの分子機序は必ずしも明らかにされていない。そこで5-アザシチジン耐性化白血病細胞株を樹立し、その耐性化の分子基盤を明確にすると共に、新たな分子標的としての可能性を見出した。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群（MDS）における脱メチル化薬治療は低リスクから高リスクの MDS まで広く用いられ、輸血依存からの脱却や芽球の減少ばかりでなく、生存期間の延長をもたらすことより広く用いられている。一方、脱メチル化薬治療の継続性が問題となり、反復投与による耐性化を示す症例も多くみられる。そこで、脱メチル化薬の耐性化の分子機構を明らかにすると共に、耐性化の克服を目指して本研究を行った。

B. 研究方法

脱メチル化薬として臨床的に用いられている5-アザシチジン（5-Aza）の耐性細胞株を樹立するために、低濃度より5-Aza存在下に培養し、5-Aza 3 μ Lにて恒常的な増殖を6ヵ月以上継続しているRU-937を樹立し、親株であるU-937との性状の違いを検討した。

5-Azaが標的とするDNMT1、DNMT3Aの発現量をWestern blotにて検討。Human methylation 450 arrayを用いてU-937とRU-937のメチル化

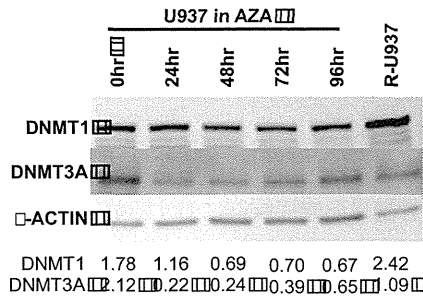
を調べ、さらに、Gene Chip ST array 1.0による遺伝子発現解析を行い、KEGG pathwayにより標的分子を探索した。この結果、抽出された分子を検討し、ピリミジン代謝経路であるCTP-synthetase 阻害剤および非核酸アナログ型DNMT阻害剤による細胞増殖の変化を検討した。

C. 研究結果

脱メチル化薬である5-Aza添加によりU-937は24時間後より顕著な細胞増殖抑制がみられたが、RU-937ではU-937に比較し、5-Aza未添加条件では細胞増殖の遅延は見られるものの、5-Aza添加による細胞増殖抑制はみられず、5-Aza耐性の樹立株として用いられることが判明した。

DNMT1発現は5-Aza添加後24時間後にRU-937は親株に比べ約1.5倍に、DNMT3Aは5-Aza添加による親株での抑制(24~48時間後で約1/5に抑制)が耐性株では見られなかった(図1)。

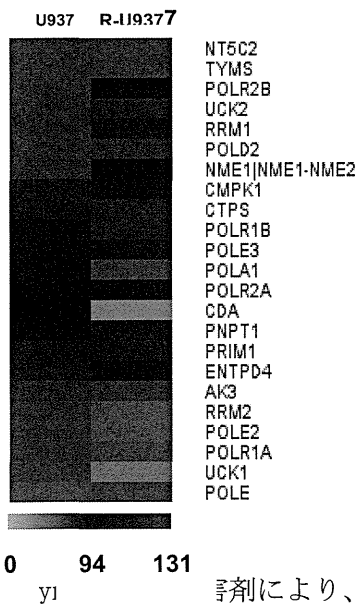
図1: 親株 U-937 と 5-Aza 耐性株 RU-937 における 5-Aza 添加後の DNMT 発現変化



遺伝子発現解析の結果、耐性株 RU-937 ではピリミジン代謝経路に關与する遺伝子発現の変動が顯著であった (図2)。

以上の事より、5-Aza 耐性化機序としてピリミジン代謝に關与する遺伝子発現が脱メチル化薬の耐性化に重要な役割を担っていることが判明した。

図2: 親株 U-937 と 5-Aza 耐性株 RU-937 での遺伝子発現変化。



薬剤により、5-Aza 耐性株 RU-937 では5-Aza 処理により細胞増殖が抑制さ

れたが、非核酸アナログ型 DNMT 阻害剤の処理では顯著な差はみられなかった。

D. 考察

5-Aza 耐性の機序としてピリミジン代謝経路に關与する遺伝子の關与が重要な役割を担い、これらの遺伝子発現の変化は5-Aza 耐性化の指標となることが推測された。また、5-Aza 耐性患者の新たな標的としてピリミジン代謝経路が重要であることが示唆された。

E. 結論

5-Aza 耐性化の克服として、新たな分子マーカーの可能性を見出すと共に、その耐性化克服の標的となる分子を同定した。今後、臨床応用の可能性を検討することが、5-Aza 耐性化の克服に重要と思われた。

F. 健康危険情報：なし。

G 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

● Imanishi S, Ohyashiki K, Ohyashiki JH: Involvement of purimidine metabolism pathway in 5'-azacytidine resistance. AACR Annual Meeting 2013, (2013/April 6-10, Washington, DC, USA)

H. 知的財産権の出願・登録状況：

なし

骨髓異形成症候群の遺伝子解析を目的とした検体集積に関する研究

分担研究者 高折 晃史 京都大学医学研究科血液・腫瘍内科学 教授

研究要旨

本研究は、臨床情報を付帯した質の高い骨髓異形成症候群の骨髓検体を集積し、各種遺伝子研究のために提供することを目的として行われている。平成 22 年度に旧「骨髓異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班」から本研究班に引き継いで以降、2 年余りの間に 138 検体、累計 226 症例 250 検体の骨髓細胞が集積された。これらの検体の一部をもちいて高密度 SNP アレイ解析が行われており、これまでに 146 検体の解析結果が検体提供施設にフィードバックされた。

A. 研究目的

骨髓異形成症候群（不応性貧血、MDS）は造血幹細胞に生じた多彩な遺伝子異常に起因する予後不良のクローン性造血障害である。唯一治療が期待できる治療法は造血幹細胞移植であるが、その適応は限られている。したがって、MDS の治療成績の改善には、その分子病態を明らかにし、これに則した治療法の確立が求められている。このような背景のもと、平成 17 年 8 月より厚生労働科学研究費補助金・難治性疾患克服研究事業「骨髓異形成症候群に対する病態解明・治療法の開発に関する研究班」によって、MDS の検体集積事業が開始された。本研究はこれを引き継いで、詳細な臨床情報を伴った質の高い MDS 検体を集積し、これらの検体と臨床情報を研究者に広く提供することで、MDS に対する遺伝子解析研究の推進をはかることを目的としている。

B. 研究方法

「特発性造血障害に関する調査研究班」および「不応性貧血の治療率向上を目指した分子・免疫病態研究班」参加施設より、MDS の骨髓検体を臨床情報とともに集積する。検体集積施設の獨協医科大学内科学（血液）、および京都大学血液・腫瘍内科では、骨髓液から単核球を分離し、ゲノム DNA および RNA を抽出し、残りの細胞は凍結保存する。これらの

試料は「造血器腫瘍における遺伝子異常の網羅的解析」、「骨髓異形成症候群の分子病態の解析と層別化治療の確立」、「骨髓異形成症候群の SPARK 発現ネットワーク解析」、「骨髓不全症候群の酸化ストレス系遺伝子発現ネットワーク解析」、その他当班で行われる各種遺伝子解析研究に提供する。

（倫理面への配慮）

検体集積事業と遺伝子解析研究はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づいて行われる。すなわち、各施設の倫理審査委員会での承認の後、文書によるインフォームドコンセントを得るとともに、検体提供施設において連結可能匿名化を行う。

C. 研究結果

平成 22 年 4 月から平成 25 年 1 月末までに、骨髓液 138 検体の提供があり、これまでに集積された検体数は合計 250（総症例数は 226）となっている。このうち 65 症例は、「特発性造血障害に関する調査研究班」が実施しているセントラルレビュー・追跡調査研究にも登録されており、信頼度の高い診断と追跡情報が得られている。収集された検体はゲノム DNA、RNA および細胞の形で凍結保存された。検体に付随した患者背景、血液検査、染色体分析などの臨床データは、ファイルメーカーで作成されたデータベースに保管されている。ゲノ

ム DNA の一部は、高密度 SNP アレイ解析（東京大学小川誠司准教授）に用いられ、これまでに 146 検体の解析結果が各検体提供施設に報告された。SNP アレイ解析された症例の 57% になんらかの異常が認められた。SNP アレイと G-バンド法の情報がそろっている 103 症例の初回検体についての解析では、SNP アレイと G-バンド法のいずれか一方のみで異常を認めた症例がそれぞれ 11 ずつ、いずれでも異常を検出できなかった症例が 36 あった。追跡情報によると、いずれでも異常が見られなかった症例の一部は、再生不良性貧血などの非腫瘍性疾患であった。

D. 考察

本検体集積事業では、通算 250 の骨髓検体が集積され、高密度 SNP アレイ解析によって臨床現場に有用なゲノム異常の情報を還元してきた。一方で、本研究実施計画の改訂のたびに各参加施設における倫理委員会承認のために多くの時間と労力を要した点、体細胞における変異を確認するための germline control の収集が行われていない点、一部の患者検体については十分な追跡情報が得られていない点などが課題である。

E. 結論

集積された骨髓検体の多くは、検体提供者から包括的な遺伝子研究に関する同意を得たものであり、今後のわが国の MDS 研究の発展のために貴重な資源である。継続的な検体集積は将来の MDS 研究の発展のために是非とも行う価値があり、遺伝子研究やエピゲノム研究が新たな知見をもたらすたびに、ますますその重要性を増している。今後、集積された検体資源と臨床情報をどのように活用していくか、また、検体の集積をどのような枠組みで継続していくか、重要な課題である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

● Sakamoto S, Kawabata H, Kanda J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. Differing impacts of pretransplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2013;97:109-16.

● Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A. Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3. *Leukemia.* In press.

● Shinohara M, Io K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A. APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells. *Sci Rep.* 2012;2:806,1-8.

● Kawabata H, Doisaki S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A. A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level. *Intern Med.* 2012;51:917-20.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究

分担研究者 稲葉 俊哉 広島大学原爆放射線医科学研究所 教授

研究要旨

MDSの新治療法開発を目標に、アザシチジン（ビダーザTM）などのDNA脱メチル化剤がMDS芽球のエピゲノム状態を変化させ、分化の促進に至るメカニズムの解明を試みた。昨年までの検討では、アザシチジンがK562白血病細胞を赤芽球系へ分化誘導する現象を利用し、標的遺伝子として翻訳伸長因子eEF1aと翻訳開始因子eIF2Bを見いだした。今年度は、ヒト臍帯血やマウスES細胞、さらにはヒトMDS細胞より採取したCD34陽性芽球を材料に、K562細胞で得られた成果の検証を行った。

A. 研究目的

アザシチジン(5-aza)などDNA脱メチル化剤がMDSに対し有効性を発揮する機序は未解明であるが、MDS芽球のエピゲノム状態を変化させ、分化を促進することが重要な要因であるとの説が有力である。しかし、ゲノムワイドに生じる脱メチル化が、結果として「分化」という一定の方向に機能するメカニズムは全く明らかにされていない。そもそも脱メチル化は脱分化につながるはずであって、このような逆説的な現象は、がん細胞だからこそ起きることなのかどうかも不明である。

昨年までに研究分担者は、5-azaがK562白血病細胞株を赤芽球系へ分化させる実験系を用いて、DNA脱メチル化剤が標的とする遺伝子群の同定とその特性の解析を行うとともに、赤芽球系への分化を促進するメカニズムとして、翻訳伸長因子eEF1aと翻訳開始因子eIF2Bの活性化に伴う翻訳効率の増加が重要であることを解明してきた。本年度は臍帯血やマウスES細胞を赤芽球系へと終末分化させる実験系や、患者サンプルを用いた分化誘導実験により、これらの成果を検証した。

B. 研究方法

赤芽球系の正常分化を試験管内で再現する実験系を用いて、5-azaによるエピゲノム変化の解析を試みた。ヒト臍帯血CD34陽性細胞（理研より購入）をSCF、IL-3、Epo存在下で7日間培養して得られたCFU-E相当細胞を、Epo単

独で5日間培養することにより、脱核した赤血球に至る分化の全課程を試験管内で再現することができる。また、マウスES細胞由来のSCF依存性MEDEP-BRC5細胞を、Epoで3日間培養すると、同様に脱核に至る終末分化段階が観察できる。一方、MDS患者骨髓血より単離したCD34細胞を、SCFやEpo存在下で培養し、赤芽球系細胞を得ることがある（サンプルによって反応はさまざまである）。以上の実験系より適宜検体を採取し、次世代シーケンサを用いて、DNAのメチル化状態、ヒストン修飾状態、トランスクリプトーム解析などを行った。

（倫理面への配慮）

ヒト臍帯血CD34陽性細胞ならびにMDS患者骨髓血の分化誘導実験とエピゲノム情報解析は、広島大学研究倫理委員会の承認を得た（承認番号：ヒ-79とヒ-62）。

C. 研究結果

ヒト臍帯血CD34陽性細胞の分化実験系では、分化に伴い一方的なメチル化過程をとるのではなく、少なくとも全体としてみる限り、ある段階で脱メチル化が進行するなど、非常に複雑な様相を呈することが明らかになった。このことが「生理的」であるか、試験管内での過剰なサイトカイン存在によるアーチファクトであるかは不明であり、基礎データの収集と解析を進めている。MEDEP-BRC5細胞での実験では、K562細胞で得られた予備実験の結果をおおむね裏付ける結果が得られた。MDS患者骨髓血よ

り単離した CD34 細胞を用いた実験では、赤芽球系に分化する細胞のなかに、K562 細胞から得られた結果を再現するものが存在した。

D. 考察

K562 白血病細胞で行われた予備実験の結果は、非特異的な脱メチル化が、翻訳効率の上昇を伴って赤芽球系への終末分化を促進するという意外なものであった。本年は、この結果が普遍性を有するかどうかの検証を、生理的な赤芽球分化過程を試験管内で再現すると考えられる実験系を用いておこなった。実験系の確立や適切な患者検体の確保に手間取り、今年度の研究の進捗は大きなものではなかったが、これまでに得られている結果からは、K562 細胞で得られた仮説を裏付けるデータが散見される。一方で、全般的な脱メチル化が、一部の遺伝子の活性化を通じて細胞を一定の方向へと分化させるメカニズムについては、そもそも臍帯血 CD34 陽性細胞由来赤芽球の「正常」な分化過程での DNA メチル化の不可解な動きなど、今後の詳細な研究を要する必要があることを再認識した。

E. 結論

5-aza の標的因子候補となるふたつの翻訳関連因子の詳細を、生理的実験系、または患者サンプルにて検討中である。

F. 健康危険情報 該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. A modified system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. **Radiat Res.** 177: 533-538, 2012
2. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H,

Kurosawa H, Look AT, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K. Oncogenic Fusion E2A-HLF Sensitizes t(17;19)-positive Acute Lymphoblastic Leukemia to TRAIL-Mediated Apoptosis by Upregulating the Expression of Death Receptors. **Leukemia** 26: 2483-2493, 2012

3. Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. (letter) **Exp. Dermatol.** 21: 535-561, 2012
 4. Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Zi, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, and Honda H. EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. **Leukemia** 26: 2557-2560, 2012
 5. Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. **Mol. Cell** 47: 694-706, 2012
 6. Nemoto A, Inukai T, Uno K, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Nakazawa S, Fujimoto J, Inaba T, Sugita K. Diverse underlying proliferation response to growth factors in imatinib-treated Philadelphia chromosome -positive leukemias. **Leukemia Res.** 37: 93-101, 2013
 7. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M. Identification of integrin $\beta 3$ L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia accompanied by anisocytosis. **Br J. Haematol** 160: 521-529, 2013
- #### H. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

骨髄異形成症候群における 20q 欠失領域の解析

分担研究者 泉二 登志子 東京女子医科大学血液内科 教授

研究要旨

20 番染色体長腕（20q）上の共通欠失領域内に存在する遺伝子について、変異の有無を次世代シーケンサーなどで検討し、また、遺伝子発現を解析し、ハプロ不全との関連を検討した。共通欠失領域に存在する遺伝子のうち、*NCOA3* 遺伝子に recurrent な変異を認めた。また、発現解析した 32 の遺伝子の約 2/3 に発現低下がみられた。さらにその中で 5 つの遺伝子については、20 番染色体異常を伴わない MDS 症例でも発現低下を認めた。

A. 研究目的

骨髄異形成症候群（MDS）に見られる 20 番染色体長腕欠失（20q-）の意義を検討し、分子病態解明を目指す。CGH アレイ法により共通欠失領域を決定し、そこに存在する遺伝子の変異や発現低下の有無について検討して、疾患関連遺伝子候補（群）を同定する。さらにそれらの遺伝子異常の臨床的、生物学的意義を明らかにし、治療標的としての可能性を追求する。

B. 研究方法

1) 共通欠失領域内に存在するがん抑制遺伝子としての機能が推定されている遺伝子、細胞周期関連する遺伝子など 32 遺伝子について、次世代シーケンサー SOLiD により網羅的解析を行った。

2) アミノ酸置換を伴う遺伝子変異が認められた遺伝子については、20 番染色体に異常を持つ MDS38 症例およびそれ以外の MDS 症例 20 症例で変異の有無を検討した。全コーディング領域の塩基配列をサンガー法により決定した。

3) 32 の遺伝子について骨髄細胞での発現を RT-PCR を用いて検討し、コントロールと比較し、検討を行った。

4) 共通欠失領域に存在する残りの遺伝子につ

いて変異の有無について次世代シーケンサーを用いて検討した。

（倫理面への配慮）

当該研究の実施については、学内倫理委員会の承認を得たうえで、臨床検体を利用する際は、書面での同意を得ている。臨床検体提供は個人の自由意志に基づくものであり、提供の有無により診療上何ら不利益を受けないことを確認している。同意については、随時撤回できることを説明している。患者の個人情報には匿名化され性別、年齢のみが記録されている。

C. 研究結果

1) 32 の遺伝子のうち *NCOA3* 遺伝子の変異が 20q- を伴う MDS 症例 38 例中 3 例（7.9%）に認められ recurrent な変異であることが確認された。変異が確認された部位は 3 つとも別の場所であった。一方 20 番染色体異常を伴わない MDS 症例 20 症例においては変異が検出されなかった。

2) 32 の遺伝子のうち、コントロールも含めて発現量が極めて少なく比較検討が困難であった 2 つの遺伝子を除いた遺伝子のうちで、19 の遺伝子の発現低下が 20q- を伴う MDS28 症例での解析で認められた。さらに、20 番染色体異

常を伴わない MDS20 症例で発現を解析したところ、5 つの遺伝子で発現低下が認められた。

D. 考察

共通欠失領域内に存在する 32 の遺伝子のうち 20 番染色体異常をもつ複数の MDS 症例において、アミノ酸置換を伴う NCOA3 遺伝子変異が複数症例で変異が検出された。NCOA3 遺伝子は転写制御因子としての機能を持つことが示されている。正常造血ならびに血液腫瘍におけるその役割は明らかにされていないが、ある種の固形がんとの関連が報告されている。今後、その異常の MDS における臨床的、生物学的意義について検討を行う。また、発現の低下はおよそ 2/3 の遺伝子で確認されたが、その中で 5 つの遺伝子の発現は、20 番染色体異常を伴わない症例でも認められており、MDS の発症における役割が示唆される。現在変異ならびに発現低下の意義について検討中である。

E. 結論

共通欠失領域内に存在する 32 の遺伝子中で、アミノ酸置換を伴う NCOA3 遺伝子変異が複数症例で検出された。また、32 の遺伝子発現についての検討では、5 つの遺伝子の発現が、20q-症例のみならず、20 番染色体異常を伴わない MDS 症例でも認められた。今後、これらの臨床的、生物学的意義について検討を行う。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Shimura H, Mori N, Wang YH, Okada M, Motoji T. Aberrant methylation and decreased expression of the RIZ1 gene are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia of T-cell phenotype. *Leuk Lymphoma*. 53(8): 1599-609, 2012.

2) Tsuji K, Wang YH, Takanashi M, Odajima T, Lee GA, Sugimori H, Motoji T. Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *Hematol Rep*. 4(3):e18, 2012.

2. 学会発表

1) Shiseki M, Mori N, Okada M, Motoji T. Molecular analyses of deletion of the long arm of chromosome 20 in myelodysplastic syndromes. 54th American Society of Hematology Annual Meeting (Atlanta). *Blood* 120: 3834, 2012.

2) Shiseki M, Okada M, Mori N, Wang YH, Ishii M, Ohwashi M, Teramura M, Motoji T. Molecular characterization of common deleted region of del(20q) in myelodysplastic syndromes. 第 74 回日本血液学会学術集会(京都). *臨床血液* 53(9):1198, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)
「不応性貧血の治癒率向上を目指した分子・免疫病態研究」
分担研究報告書

骨髓異形成症候群患者のゲノム異常、エピゲノム異常を解析するための検体収集システムの構築

分担研究者 千葉 滋
筑波大学医学医療系 教授

研究要旨

臨床研究グループと連携し、臨床データや治療法などのそろった多数の検体をスピーディに収集し、核酸を抽出・保管して研究に供しやすい体制を構築することにより、本研究費補助金による「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」を一層充実させることが可能になる。

我が国最大の造血器腫瘍臨床研究グループである日本成人白血病研究グループ(JALSG)において、MDS患者約400名を対象とする群間治療研究(JALSG MDS212試験)が開始され、患者登録が進められつつある。この臨床研究の中で、報告者はプロトコル委員として本試験に付随する検体研究計画を担当する一方、検体収集システムの構築を担当し、これを本事業における検体集積事業と結びつけるための様々な環境整備を行った。その結果、「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」、および「JALSG MDS212試験」の双方の研究計画書には両者の合同事業であることが明記され、JALSG MDS212試験に付随して収集される検体は、当試験に参加しない患者由来の検体とほぼ同じ方法で、同じ検査会社により収集、核酸調整、定量、DNA増幅が行なわれたのち、同社が連携する会社で保管することが決定された。調整されたDNAのうち一定量は、研究代表者である東京大学・小川誠司研究室に配送され、ゲノム解析が行なわれる計画である。JALSG MDS212試験参加者の大多数、また当試験に参加しない患者からも多数の検体を収集することで、3年程度で世界的にも有数の整備されたMDS検体保存システムが構築されると期待される。

一方、エピゲノム制御蛋白であるTET2変異がMDSに高率に生じている。報告者らは、概ね正常に機能している骨髓細胞に、TET2の変異が認められることを見出した。このことは、疾患に至る前にTET2変異が生じた細胞がクローン性に拡大し、MDSの準備状態を形作っていることを示唆している。今後TET2に体細胞性変異を来している健常人を10名程度同定し、追跡することで経時的なエピゲノム変化、加齢、MDS発症の関連を解明したい。

A. 研究目的

本研究事業を、我が国最大の造血器腫瘍臨床研究グループである日本成人白血病研究グループ(JALSG)と連携させ、一体的に臨床情報の整備された高品質かつ多数検体を、スピーディに収集するシステムを構築する。

B. 研究方法

本研究費補助金による「骨髓異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」と、JALSGにおける新規治療研究であるMDS212試験

とを統合に向け、基本合意に基づいてさらに詳細を検討し、プロトコル完成のための合意形成を進めた。さらに、検体回収・核酸調整・保管を一括して行なうことのできる業者を選定し、作業手順書を完成させるための指導を行った。

一方、種々の患者骨髓サンプルを用いてTET2遺伝子変異を解析した。
(本研究における倫理面への配慮)

JALSG MDS212試験、本研究費補助金による検体集積事業のいずれも中央施設での倫理委員会で承認を受けた後、参加各施設の倫理委員会で

審査される。承認を受けた後にJALSG MDS212試験あるいは検体集積事業に参加できる。

C. 研究結果

JALSG MDS212試験は「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」との合同研究であること、また「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」はJALSG MDS212試験との合同事業であることを双方の研究計画書に明記し、これに基づいてJALSG MDS212試験が開始された。

一方、独自に種々の患者から得られた骨髄サンプルでTET2の変異解析を行った結果、概ね正常に機能している骨髄細胞に、TET2の変異を同定した。

D. 考察

今回のJALSGとの一体化は、本研究事業が目的の一つに掲げた多数の検体収集にとって極めて重要なステップである。一方、JALSG試験に参加した患者およびその担当医にとっても、ゲノムコピー数異常についての情報が得られ有益である。

TET2遺伝子解析の結果、疾患に至る前にTET2変異が生じた細胞がクローン性に拡大し、MDSの準備状態を形作っていることが示唆された。

E. 結論

「骨髄異形成症候群に対する検体集積事業ならびに遺伝子解析研究」とJALSG MDS212試験とを共同事業として一体的に運用するプラットフォームを完成し、臨床試験開始にこぎつけた。

TET2は正常に機能する骨髄細胞でも変異を来しクローン性造血に寄与している。

G. 研究発表

1. Kojima M, Nishikii H, Takizawa J, Aoki S, Noguchi M, Chiba S, Ando K, Nakamura N. MYC rearrangements are useful for predicting outcomes following rituximab and chemotherapy: multi-center analysis of Japanese patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma*, in press

2. Kamada Y, Sakata-Yanagimoto M, Sanada M, Sato-Otsubo A, Enami T, Suzukawa K, Kurita N, Nishikii H, Yokoyama Y, Okoshi Y, Hasegawa Y, Ogawa S, Chiba S. Identification of unbalanced genome copy number abnormalities in patients with multiple myeloma by single-nucleotide polymorphism genotyping microarray analysis. *Int J Hematol* 96(4):492-500, 2012

3. Goyama S, Takeuchi K, Kanda Y, Nannya Y, Chiba S, Fukayama M, Kurokawa M. Post-transplant endothelial disorder after hematopoietic SCT: a blinded autopsy study. *Bone Marrow Transplant* 47(9):1243-1245, 2012

4. Yokoyama Y, Suzukawa K, Okoshi Y, Nanmoku T, Obara N, Enami T, Hasegawa Y, Chiba S. Nine years interval between first and second bone marrow transplantations and subsequent long-term survival—a case of acute myeloid leukemia with MLL-AF6 fusion gene. *Ann Hematol* 91(9):1491-1493, 2012

5. Sakata-Yanagimoto M, Chiba S. Notch2 and Immune Function. *Curr Top Microbiol Immunol* 360:151-161, 2012

6. Machino T, Okoshi Y, Miyake Y, Akatsuka Y, Chiba S. HLA-C matching status does not affect rituximab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity by allogeneic natural killer cells. *Immunol Invest* 41(8):831-846, 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況 該当なし

研究成果の刊行に関する一覧

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
大屋 敷一馬	骨髄異形成症候群	杉本恒明、 矢崎義雄	朝倉書店	東京	内科学	2012	1645-1649

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>Ogawa S.</u>	Splicing factor mutations in myelodysplasia.	Int J Hematol.	96(4)	438-42	2012
Shiraishi Y, Sato Y, Chiba K, Okuno Y, Nagata Y, Yoshida K, Shibata N, Hayashi Y, Kume H, Homma Y, Sanada M, <u>Ogawa S.</u> , Miyano S.	An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data.	Nucleic Acids Research		In press	2013
Kon S, Minegishi N, Tanabe K, Watanabe T, Funaki T, Wong WF, Sakamoto D, Higuchi Y, Kiyonari H, Asano K, Iwakura Y, Fukumoto M, Osato M, Sanada M, <u>Ogawa S.</u> , Nakamura T, Satake M.	Smad1 deficiency perturbs receptor trafficking and predisposes mice to myelodysplasia.	J Clin Invest.	123(3)	1123-37	2013

Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, <u>Ogawa S</u>	ACTN1 Mutations Cause Congenital Macrothrombocytopenia.	Am J Hum Genet.	92(3)	431-8	2013
Ohba R, Furuyama K, Yoshida K, Fujiwara T, Fukuhara N, Onishi Y, Manabe A, Ito E, Ozawa K, <u>Kojima S</u> , <u>Ogawa S</u> , Harigae H	Clinical and genetic characteristics of congenital sideroblastic anemia: comparison with myelodysplastic syndrome with ring sideroblast (MDS-RS).	Ann Hematol.	92(1)	1-9	2013
Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dickler F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, <u>Ogawa S</u> , Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S.	SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML).	Blood	120(15)	3080-8	2012
Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, Shih LY, Mori H, <u>Inaba T</u> , <u>Ogawa S</u> , Honda H.	EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms.	Leukemia	26(12)	2557-60	2012
Takita J, Yoshida K, Sanada M, Nishimura R, Okubo J, Motomura A, Hiwatari M, Okikawa K, Igarashi T, Hayashi Y, <u>Ogawa S</u> .	Novel splicing-factor mutations in juvenile myelomonocytic leukemia.	Leukemia	26(8)	1879-81	2012

Sugimoto T, Tomita A, Abe A, Iriyama C, Kiyoi H, <u>Naoe T.</u>	Chimeric antisense RNA derived from chromosomal translocation modulates target gene expression.	Haematologica	97(8)	1278-80.	2012
Shimada K, Tomita A, Minami Y, Abe A, Hind CK, Kiyoi H, Cragg MS, <u>Naoe T.</u>	CML cells expressing the TEL/MDS1/EV11 fusion are resistant to imatinib-induced apoptosis through inhibition of BAD, but are resensitized with ABT-737.	Exp Hematol.	40(9)	724-737.	2012
<u>Naoe T</u> , Kiyoi H.	Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era.	Int J Hematol.	97(2)	165-174	2013
Hosokawa K, Katagiri T, Sugimori N, Ishiyama K, Sasaki Y, Seiki Y, Sato-Otsubo A, Sannada M, <u>Ogawa S</u> , <u>Nakao S.</u>	Favorable outcome of patients who have 13q deletion: a suggestion for revision of the WHO 'MDS-U' designation.	Haematologica	97	1845-9	2012
Katagiri T, Kawamoto H, Nakakuki T, Ishiyama K, Okada-Hatakeyama M, Ohtake S, Seiki Y, Hosokawa K, <u>Nakao S</u>	Individual hematopoietic stem cells in human bone marrow of patients with aplastic anemia or myelodysplastic syndrome stably give rise to limited cell lineages	Stem cells	In press		2013
Seiki Y, Sasaki Y, Hosokawa K, Saito C, Sugimori N, Yamazaki H, Takami A, <u>Nakao S</u>	Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure	Haematologica	In press		2013

<p>Schanz J, Tuchler H, Sole F, Mallo M, Luno E, Cervera J, Granada I, Hildebrandt B, Slovak ML, <u>Ohyashi K</u>, Steidl S, Fionatsch C, Pfeilstocker M, Noslinger T, Valent P, Giagounidis A, Aul C, Lubbert M, Stauder R, Krieger O, Garcia-Manero G, Faderl S, Pierce S, Le Beau MM, Bennett JM, Greenberg P, Germing U, and Haase D</p>	<p>A new comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes and oligoblastic AML following MDS derived from an international database merge.</p>	<p>Journal of Clinical Oncology</p>	<p>30</p>	<p>820-829</p>	<p>2012</p>
<p>Cherrya AM, Slovack ML, Campbell LJ, Chung K, Eclachee V, Haasef D, Hildebrandt B, Iqbal AM, Jhanwarji SC, <u>Ohyashiki K</u>, Solel F, Vandenberghe P, VanDyken DL, Zhang Y, Dewaldn GW</p>	<p>Will a peripheral blood (PB) sample yield the same diagnostic and prognostic cytogenetic data as the concomitant bone marrow (BM) in myelodysplasia?</p>	<p>Leukemia Research</p>	<p>36</p>	<p>832-840</p>	<p>2012</p>
<p>Oki Y, Kondo Y, Yamamoto K, Ogura M, Kitasai M, Kobayashi Y, Watanabe T, Uike N, <u>Ohyashiki K</u>, Okamoto S, Ohnishi K, Tomita A, Miyazaki Y, Toyama K, Mukai HY, Hotta T, Tomonaga M</p>	<p>A phase I/II study of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome: a multi-center study in Japan.</p>	<p>Cancer Science</p>	<p>103</p>	<p>1839-1847</p>	<p>2012</p>

Sakamoto S, Kawabata H, Kanada J, Uchiyama T, Mizumoto C, Kondo T, Yamashita K, Ichinohe T, Ishikawa T, Kadowaki N, Takaori-Kondo A.	Differing impacts of pretransplant serum ferritin and C-reactive protein levels on the incidence of chronic graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.	Int J Hematol	97	109-16	2013
Chonabayashi K, Hishizawa M, Kawamata S, Nagai Y, Ohno T, Ishikawa T, Uchiyama T, Takaori-Kondo A.	Direct binding of Grb2 has an important role in the development of myeloproliferative disease induced by ETV6/FLT3.	Leukemia	In press	In press	2013
Shinohara M, Iino K, Shindo K, Matsui M, Sakamoto T, Tada K, Kobayashi M, Kadowaki N, Takaori-Kondo A.	APOBEC3B can impair genomic stability by inducing base substitutions in genomic DNA in human cells.	Sci Rep	2	806.1-8	2012
Kawabata H, Doi S, Okamoto A, Uchiyama T, Sakamoto S, Hama A, Hosoda K, Fujikura J, Kanno H, Fujii H, Tomosugi N, Nakao K, Kojima S, Takaori-Kondo A.	A case of congenital dyserythropoietic anemia type 1 in a Japanese adult with a CDAN1 gene mutation and an inappropriately low serum hepcidin-25 level.	Intern Med	51	917-20	2012
Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Akai D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T.	Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation.	Mol. Cell	47	694-706	2012

Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, <u>Inaba T</u> , Kobayashi M	Identification of the integrin b3 L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis.	British Journal of Haematology	160	521-529	2013
Shimura H, Mori N, Wang YH, Okada M, <u>Motoji T</u> .	Aberrant methylation and decreased expression of the RIZ1 gene are frequent in adult acute lymphoblastic leukemia of T-cell phenotype.	Leuk Lymphoma	53(8)	1599-609	2012
Tsuji K, Wang YH, Takanashi M, Odajima T, Lee GA, Sugimori H, <u>Motoji T</u> .	Overexpression of lung resistance-related protein and P-glycoprotein and response to induction chemotherapy in acute myelogenous leukemia.	Hematol Rep.	4(3)	e18	2012
Machino T, Okoshi Y, Miyake Y, Akatsuka Y, <u>Chiba S</u> .	HLA-C Matching Status Does Not Affect Rituximab-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity by Allogeneic Natural Killer Cells.	Immunological investigations	41	831-46	2012
Sakata-Yanagimoto M, <u>Chiba S</u> .	Notch2 and Immune Function.	Current topics in microbiology and immunology	360	151-161	2012

Splicing factor mutations in myelodysplasia

Seishi Ogawa

Received: 6 September 2012 / Revised: 14 September 2012 / Accepted: 14 September 2012
© The Japanese Society of Hematology 2012

Abstract Myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid neoplasms are a heterogeneous group of myeloid neoplasms, which frequently terminate in acute myeloid leukemia (AML). During the past decade, a number of gene mutations have been identified in MDS. However, the spectrum of these mutations overlaps largely with that in AML, complicating the understanding of MDS-specific pathogenesis that discriminates MDS from AML. Recently, several groups reported frequent mutations of multiple components of the RNA splicing machinery in MDS and related disorders. Largely specific to myelodysplastic phenotypes, these splicing factor mutations provide a potential clue to better understanding of the pathogenesis of MDS.

Keywords SF3B1 · U2AF35 · SRSF2 · ZRSR2 · RNA splicing · MDS

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid neoplasms are a heterogeneous group of intractable myeloid malignancies, characterized by deregulated blood cell production with dysplastic cell morphology and a high propensity to acute myeloid leukemia (AML) [1]. Over the past 10 years, significant advances have been made in our understanding of the molecular pathogenesis of MDS and other myelodysplasias, including chronic myelomonocytic

leukemia (CMML) and atypical chronic myeloid leukemia, through identification of common gene mutations found in these neoplasms [2]. The spectrum of gene mutations in MDS and related myeloid neoplasms includes mutations involving classical signaling molecules, such as *NRAS*/*KRAS*, *PTNP11*, *NF1*, *c-CBL*, *JAK2*, and *FLT3*, and those involving hematopoietic transcription factors, such as *RUNX1*, *ETV6*, and *CEBPA*, together with *TP53* and other tumor suppressor genes. In addition, the recent discovery of frequent mutations of epigenetic regulators engaged in DNA methylation (*DNMT3A*, *TET2*, and *IDH1/2*) and histone modifications (*ASXL1* and *EZH2* and other components of Polycomb complex 2) in MDS suggested a central role of a compromised epigenetic regulation in their pathogenesis [3]. However, many of these mutations in MDS are observed to some extent in other myeloid neoplasms, including AML and other myeloproliferative neoplasms (MPNs), indicating the presence of common mechanisms among different myeloid neoplasms [4]. For example, *DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2* and *ASXL1* are among most frequent targets of gene mutations in both MDS and normal karyotype AML [5–10]. A few gene mutations are highly specific to MDS or myelodysplasia, whereas a number of chimeric genes and other mutations, including those in *MPN1* and *CEBPA*, are highly specific to AML [11].

Discovery of frequent mutations of splicing machinery in myelodysplasia

Recently, several groups have reported whole exome sequencing of MDS and other myelodysplasias, in which a common finding was frequent mutations of genes involved in RNA splicing in MDS and related myeloid neoplasms

S. Ogawa (✉)
Cancer Genomics Project, Graduate School of Medicine,
The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo,
Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan
e-mail: sogawa-ky@umin.ac.jp

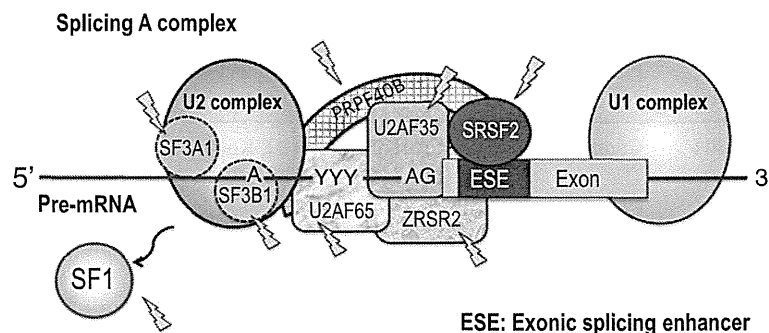


Fig. 1 After the recognition of the 5' splice site by U1 snRNP complex, a protein complex consisting of a U2AF heterodimer, ZRSR2 and SRSF1/2 was recruited to the 3' splice boundary, where the smaller subunit (U2AF35) of the U2AF heterodimer binds to the AG-dinucleotide, while the larger subunits recognize a polypyrimidine tract. SRSF1 and SRSF2 belong to a SR family of proteins, having one or more Serine–Arginine-rich domains, and bind to splicing enhancer sequences and also interact with other proteins

through its SR domain. To the 5' upstream of the polypyrimidine tract lies a branchpoint sequence, to which another splicing factor, SF-1, binds and together with the U2AF heterodimer and other components, participates in the establishment of the splicing E complex. Once the splicing E complex is established, a U2 snRNP complex replaces SF-1 to generate the splicing A complex. Prominently, all the major components of these splicing complex are targets of gene mutations in MDS

[12–15]. Through the whole exome sequencing of nine cases with low risk MDS, of which eight were MDS with ring sideroblasts, Papaemmanuil et al. [12] identified *SF3B1* mutations in six cases and in a subsequent large-scale mutation analysis, confirmed the high frequency of *SF3B1* mutations in MDS (72/354; 20 %), which were rare in other myeloid neoplasms, including AML (3/57; 5 %), CML (0/53), and MPNs (12/420, 3 %). Moreover, Yoshida et al. [13] analyzed 29 cases with different subtypes of myelodysplasia and identified mutations of multiple components of the RNA splicing machinery, including *SF3B1*, *U2AF35*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *SF3A1* and *PRPF40B*, in 16 cases. Affecting at least eight components of the RNA splicing machinery, mutations were found in 130 of 228 MDS (57 %), 48 of 88 CMML (55 %) and 16 of 62 secondary AML (25.8 %) cases, but relatively rare in de novo AML (10/151; 6.6 %) and MPNs (5/53; 9.4 %) [13]. These observations were confirmed in subsequent studies [15–27], although splicing factor mutations seem to be rare in pediatric myeloid neoplasms, including juvenile myelomonocytic leukemia [28, 29].

Pathway mutations involving the RNA splicing machinery

RNA splicing provides a basic cellular mechanism for expression of genetic information [30]. Common to all eukaryotes, this mechanism allows for generating a large diversity of protein species in the face of limited set of genes by alternative splicing [31]. RNA splicing is accomplished by recruitment and disengagement of multiple snRNP complexes and other protein factors to newly transcribed pre-mRNA, through which exon–intron

boundaries are recognized and intronic sequences were correctly spliced out to generate mature mRNA [30]. RNA splicing is initiated by the recognition of 5' splice site by a U1 snRNP complex, followed by the recruitment of a complex consisting of a U2AF35/65 heterodimer, ZRSR2 and an SR protein such as SRSF1 or 2, and other factors to recognize the 3' splice site. Finally, a U2 snRNP complex replaces SF1 bound to the branchpoint sequence with one of its subcomponent, SF3B1, to establish a splicing A complex (Fig. 1) [30, 32]. Notably, most of the mutated splicing factors in MDS belong to the A complex, occurring largely in a mutually exclusive manner, strongly indicating that the common functional target of these mutations should be the 3' splice site recognition (Table 1) [13].

Presence of mutational hot spot in *SF3B1*, *SRSF2*, and *U2AF35*

Another conspicuous feature of splicing factor mutations is the presence of mutational hot spots in major mutational targets, including *SF3B1*, *SRSF2* and *U2AF35*. In *U2AF35*, the mutations almost exclusively involved highly conserved two amino acid positions, S34 and Q157, within the N- and C-terminal zinc finger domains, while almost all *SRSF2* mutations are missense changes at P95 or deletions involving this amino acid position [13, 17, 21, 23]. Less conspicuously, *SF3B1* mutations were confined to 5–7 amino acid positions within the domains corresponding to exons14–15, of which ~50 % of the mutations were accounted for the K700E [12, 13]. No homozygous mutations have been reported for these three genes. The presence of hot spots and the absence of nonsense or frameshift