

## 「プロモドメインファミリー分子の転写後制御による造血器腫瘍の発症メカニズムの解明」

公益財団法人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 部長

氏名 井上 大地

### 要旨

近年、RNA レベルで遺伝情報が歪められる現象が次々と明らかになっているが、我々の研究室は RNA スプライシングをはじめとしてがんの病態に深く寄与していることを報告してきた。本研究では、造血器腫瘍を中心にがん横断的に最も高頻度に検出されるスプライシング関連遺伝子変異である *SF3B1* 変異の下流で生じるプロモドメインファミリー分子 *BRD9* がスプライシング異常によって mRNA レベルで喪失する現象に着眼し、それらの分子メカニズムの解明を試みた。

まず、造血細胞特異的な *Brd9* ノックアウト (KO) マウスを作成し、造血幹細胞の運命制御の観点から解析を行った。KO マウスは長期観察の結果、予想通り骨髄異形成症候群 (MDS) の形質を呈したが、*BRD9* の喪失は造血幹細胞の質・量ともに低下させ、ミエロイド系列への分化を促進する転写因子のエンリッチメントやエンハンサーのオープンクロマチンの亢進が認められた。クロマチン上での *BRD9* の挙動をマルチオミクス解析により探索すると、*BRD9* はクロマチンの区画化の形成に不可欠な *CTCF* とゲノム上で有意に共局在していた。興味深いことに、*BRD9* の喪失は *CTCF* ピークを亢進させ、主にミエロイド分化関連遺伝子でエンハンサープロモーターループを増強し、発現誘導へと導くことが明らかになった。

このような、クロマチンループを介したミエロイド分化プログラムの誘導は、*BRD9* 喪失後速やかに認められ、正常造血幹細胞だけでなく、急性骨髄性白血病 (AML) においても同様であった。AML 細胞で *BRD9* を喪失させると *BRD9/CTCF* 部位でクロマチンがオープンとなり、同部位でのクロマチン状態が分化を制御していることが明らかとなった。このことから、*BRD9* の長期的な阻害は MDS などを惹起するものの、タンパク分解誘導剤などで短期的に *BRD9* を阻害することは AML において新規治療戦略となる可能性が示された。

また、分子生物学的な視点からは、*BRD9* はクロマチン上で、新規に同定された *SWI/SNF* 複合体 (non canonical BAF 複合体, ncBAF) や、*CTCF*、*BRD4*、DNA 損傷修復や DNA 複製に寄与する分子群と結合していた。さらに、*BRD9* はプロモドメイン含有分子の中でも *BRD4* と同様に転写制御だけでなく、DNA 損傷修復に寄与する分子であることが本研究で明らかとなり、*BRD9-BRD4* を含む複合体の役割や、*BRD9* の RNA レベルでの喪失によるゲノム不安定性の誘導などについて今後の理解が期待される。

### 背景・目的

骨髄異形成症候群 (MDS, Myelodysplastic syndrome) は高齢者に多い血液がんであり、クローン性造血、エピゲノム・スプライシング異常、DNA ダメージなどによる多因子性難病である。細胞死の亢進、無効造血、白血病への進展などを特徴とする。半数の症例で *SF3B1*、*SRSR2*、*U2AF1* などのスプライシングを司る遺伝子の変異が同定されており、それらは相互排他的である。中でも *SF3B1* 変異は環状

鉄芽球 (RS) を有する MDS の 70%近くで認められるだけでなく、慢性リンパ性白血病、悪性黒色腫、乳がん、膵臓がんなどがん種をまたいで最も高頻度に報告されているが<sup>2-3)</sup>、*SF3B1* 変異などがもたらす RNA スプライシング異常がどのように発がんに寄与するかは長い間の謎であった。

スプライシング制御異常がもたらす新たな転写産物の多くは Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) により分解される。我々のこれまでの研究により、がん横断的な大規模な患者 mRNA の解析と機能的 CRISPR スクリーニングの結果から、疾患発症とバイオマーカー両面から極めて重要な NMD 標的遺伝子の存在を明らかにしてきた。中でも *SF3B1* の変異により、クロマチン制御因子 *BRD9* のスプライシング異常を介した mRNA レベルでの分解機構が腫瘍化に必須であることを報告した<sup>4)</sup>。*SF3B1* 変異を有するあらゆる腫瘍細胞で、*BRD9* 遺伝子上のイントロン 14 配列内のエキソン化を介して *BRD9* の分解を誘導していた。この結果、転写産物は NMD 機序により分解され、*BRD9* 自体のゲノム変異を認めることなく *BRD9* の機能が喪失し、発癌を誘導することをこれまでに明らかとした。これらの研究成果は、遺伝子変異を起点にスプライシング制御とエピゲノム制御がリンクするという新しいがんの病態を示唆しているものの<sup>4)</sup>、*BRD9* の役割については未解明のままであった。

*BRD9* のように、アセチル化されたリジンのリーダータンパクとして知られるプロモドメインファミリー分子は 40 種類以上知られており、ヒストンマークを介した転写因子複合体やクロマチンリモデリング因子のリクルートメントを行なっている。BET ファミリーに属するプロモドメインファミリー分子 *BRD4* は転写伸長や MYC 誘導に寄与し、広く創薬対象として開発が進んでいる。一方、本研究で注目する *BRD9* は単一のプロモドメイン (BD, Bromodomain) と機能不明ドメイン (DUF, Domain of Unknown Function) を有しているが、その詳細な分子基盤は全く明らかになっていない。*BRD9* はゲノムレベルで遺伝子変異を認められないものの、スプライシング異常によって発現量が著減すること、そして近年同定された新規 SWI/SNF クロマチン制御蛋白複合体 (non canonical BAF complex, ncBAF)<sup>5)</sup> に必須の構成因子であることを我々の報告において明らかにしてきた。しかし、「遺伝情報の新たな脆弱性」とも言える *BRD9* の RNA レベルでの制御異常が、幹細胞レベルでの運命をどのように変化させているのか、その理解は不十分なままである。

そこで、本研究では、造血幹細胞における *BRD9* の生物学的役割や ncBAF、他のクロマチン制御因子との連携がどのように行われ、運命制御が決定されているのかについて、生体モデルを作成し、その詳細なメカニズムを解明することを目的とした。

## 方法

マウス *Brd9* 遺伝子を条件的にノックアウト (KO) するべく、BD に対応するエキソン 4-6 を flox 配列で挟み、*Brd9<sup>flx</sup>* マウスを作出した。Mx1-Cre マウスと交配することで、Mx1-Cre; *Brd9<sup>flx</sup>* モデルを作出し、pIpC 投与下で時間依存的・誘導的かつ造血細胞特異的に *Brd9* をノックアウトできる生体モデルを確立した。同モデルの造血幹前駆細胞を用いたフローサームトリ解析、骨髄移植モデルを用いた造血再構築能の評価、RNA/ATAC/ChIP-seq/HiC 解析を用いたマルチオミックス解析、単一細胞レベルでの発現解析 single cell RNA-seq (scRNA-seq) を行った。

## 結果

プロモドメインをコードするマウス *Brd9* 遺伝子エクソン 4-6 を標的として、造血細胞特異的かつ時間依存的な *Mx1-Cre/LoxP* システムを用いた条件的 KO モデルを確立した。プライマリーKO マウスの解析では、コントロールと比べて長期造血幹細胞の質的量的低下、B 細胞系列への分化阻害、ミエロイド系列への顕著なスキューイングが確認された。

また、致死放射線を照射したレシピエントマウスに対する非競合的骨髄移植実験においても、KO 骨髄細胞を移植した群では、B 細胞を中心とする血球減少、ミエロイド分化シフト、形態異常を呈しヒト骨髄異形成症候群 (MDS) に合致する結果が得られ (図 1)、それらは造血細胞自律的な作用であることが裏付けられた。B 細胞分化は proB 細胞以降で顕著に阻害され、IL-7 を用いた半固形培地上でも proB コロニーは皆無であった。さらに、ドナー細胞として正常骨髄と 1:1 で混合し、致死放射線を照射したレシピエントマウスに対する競合的骨髄移植実験においても、末梢血 B 細胞中の顕著な KO 由来キメラ低下を認めたものの、ミエロイド細胞での影響は軽微であり相対的な分化シフトが確認された。

次にプライマリーKO マウスの造血幹細胞のバルク RNA-seq を行い、BRD9 が制御するパスウェイについて検討を行った。従来の報告の通り、MYC 経路の低下が確認された他、酸化的リン酸化の低下、B 細胞分化関連因子の低下、リボソーム合成系の低下が確認された。一方、ミエロイド系列の分化は顕著な亢進を認めていた。造血幹前駆細胞を用いて、単一細胞レベルでの scRNA-seq、各種ヒストン修飾抗体・転写因子による ChIP-seq、クロマチン 3 次元構造を対象とした HiC、オープンクロマチンを評価する ATAC-seq を行い、BRD9 の喪失がもたらす造血幹細胞の運命制御について統合的な解析を試みた。予想通り、B 細胞分化のプログラムが多能性前駆細胞のレベルで抑制され、ミエロイド系列への分化を促進する転写因子のエンリッチメントやパスウェイの亢進が認められた。他に、ヘム合成系の低下、ミトコンドリア膜電位の低下など加齢性造血に合致する所見が得られた。興味深いことに、BRD9 の喪失は遺伝子発現を亢進させる傾向にありスーパーエンハンサー部位でのオープンクロマチンの亢進を誘導することを明らかにした。

ChIP-seq の結果から BRD9 は、ncBAF を構成する ATPase である BRG1 はもちろん、クロマチンの区画化に不可欠な CTCF や、プロ

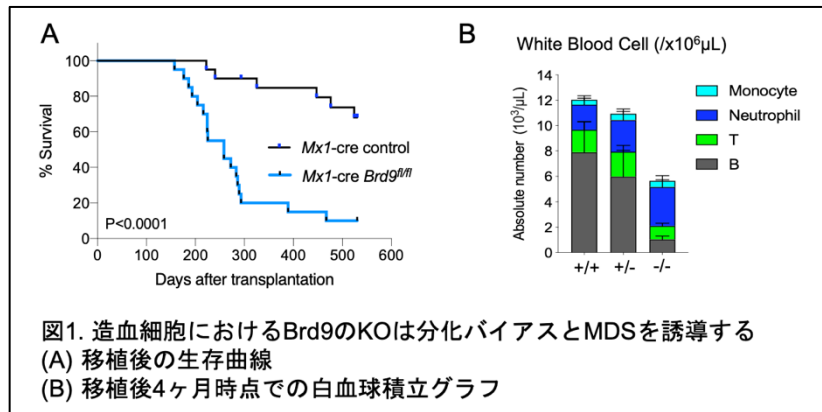


図1. 造血細胞におけるBrd9のKOは分化バイアスとMDSを誘導する (A) 移植後の生存曲線 (B) 移植後4ヶ月時点での白血球積立グラフ

BRD9 喪失時の共局在分子のピーク変動

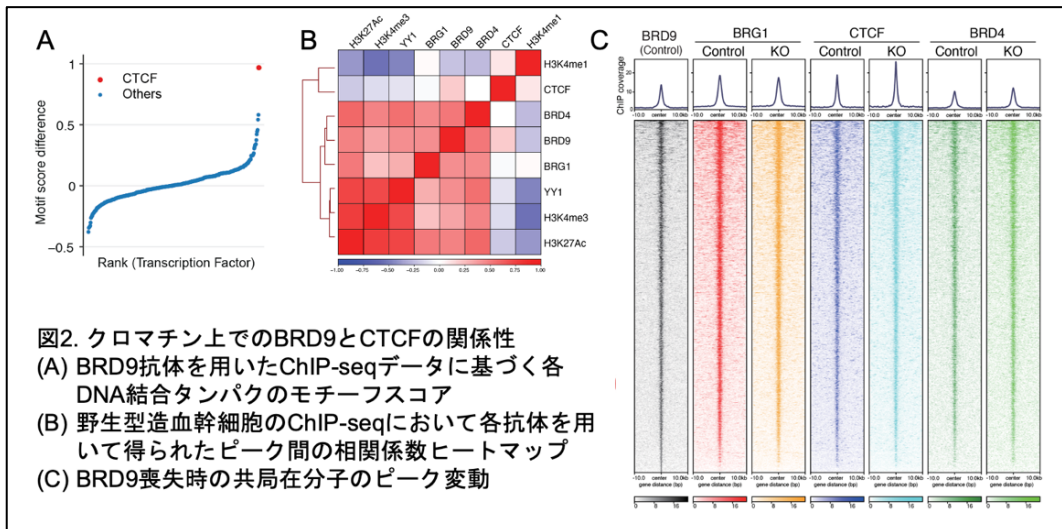


図2. クロマチン上でのBRD9とCTCFの関係性 (A) BRD9抗体を用いたChIP-seqデータに基づく各DNA結合タンパクのモチーフスコア (B) 野生型造血幹細胞のChIP-seqにおいて各抗体を用いて得られたピーク間の相関係数ヒートマップ (C) BRD9喪失時の共局在分子のピーク変動

ncBAF を構成する ATPase である BRG1 はもちろん、クロマチンの区画化に不可欠な CTCF や、プロ

ncBAF を構成する ATPase である BRG1 はもちろん、クロマチンの区画化に不可欠な CTCF や、プロ

モドメインファミリー分子である BRD4 とゲノム上で有意に共局在することが明らかになった。特に CTCF との相関は、すべての DNA 結合タンパクとのモチーフとシミュレーションを行っても、顕著な共局在が確認された (図 2)。実際、ゲノム上での BRD9 の分布は CTCF 部位とプロモーター領域で 70% を占めていた。BRD9 喪失時の変動を見ると、BRD4 や BRG1 のピークは変化せず、CTCF のみピークの亢進が認められた (図 2)。BRD9 は CTCF の発現を直接制御しないものの、CTCF と直接結合することも明らかになった。CTCF ピークが亢進する箇所を詳細に検討すると、野生型条件で CTCF が弱く結合する部位で顕著であり、それらがプロモーター部位で生じると有意に遺伝子発現の亢進が認められた。また、同部位では、H3K4me3 や H3K27Ac などの活性型ヒストンマークの上昇が認められ、Gene Ontology エンリッチメント解析では好中球分化に関連したオントロジーが最上位に検出された。これらの現象は、KO マウスでの知見に加えて、PROTAC 技術による蛋白レベルでの BRD9 喪失後、短時間で生じていたことから、BRD9 による直接的な制御機構の存在が示唆された。とりわけ、ミエロイド分化に関連した遺伝子では、BRD9 の喪失によってプロモーター・エンハンサーループを介して発現を促進していると予想された (図 3)。

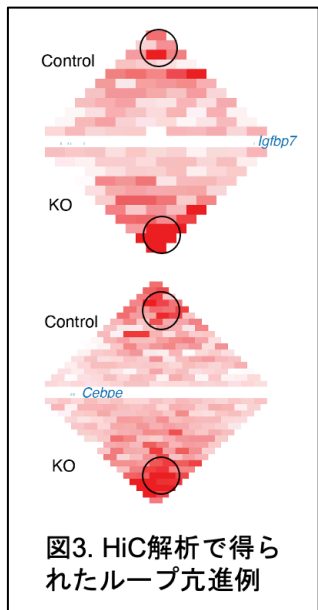


図3. HiC解析で得られたループ亢進例

ここまですべての DNA 結合タンパクとのモチーフとシミュレーションを行っても、顕著な共局在が確認された (図 2)。実際、ゲノム上での BRD9 の分布は CTCF 部位とプロモーター領域で 70% を占めていた。BRD9 喪失時の変動を見ると、BRD4 や BRG1 のピークは変化せず、CTCF のみピークの亢進が認められた (図 2)。BRD9 は CTCF の発現を直接制御しないものの、CTCF と直接結合することも明らかになった。CTCF ピークが亢進する箇所を詳細に検討すると、野生型条件で CTCF が弱く結合する部位で顕著であり、それらがプロモーター部位で生じると有意に遺伝子発現の亢進が認められた。また、同部位では、H3K4me3 や H3K27Ac などの活性型ヒストンマークの上昇が認められ、Gene Ontology エンリッチメント解析では好中球分化に関連したオントロジーが最上位に検出された。これらの現象は、KO マウスでの知見に加えて、PROTAC 技術による蛋白レベルでの BRD9 喪失後、短時間で生じていたことから、BRD9 による直接的な制御機構の存在が示唆された。とりわけ、ミエロイド分化に関連した遺伝子では、BRD9 の喪失によってプロモーター・エンハンサーループを介して発現を促進していると予想された (図 3)。

ここまですべての DNA 結合タンパクとのモチーフとシミュレーションを行っても、顕著な共局在が確認された (図 2)。実際、ゲノム上での BRD9 の分布は CTCF 部位とプロモーター領域で 70% を占めていた。BRD9 喪失時の変動を見ると、BRD4 や BRG1 のピークは変化せず、CTCF のみピークの亢進が認められた (図 2)。BRD9 は CTCF の発現を直接制御しないものの、CTCF と直接結合することも明らかになった。CTCF ピークが亢進する箇所を詳細に検討すると、野生型条件で CTCF が弱く結合する部位で顕著であり、それらがプロモーター部位で生じると有意に遺伝子発現の亢進が認められた。また、同部位では、H3K4me3 や H3K27Ac などの活性型ヒストンマークの上昇が認められ、Gene Ontology エンリッチメント解析では好中球分化に関連したオントロジーが最上位に検出された。これらの現象は、KO マウスでの知見に加えて、PROTAC 技術による蛋白レベルでの BRD9 喪失後、短時間で生じていたことから、BRD9 による直接的な制御機構の存在が示唆された。とりわけ、ミエロイド分化に関連した遺伝子では、BRD9 の喪失によってプロモーター・エンハンサーループを介して発現を促進していると予想された (図 3)。

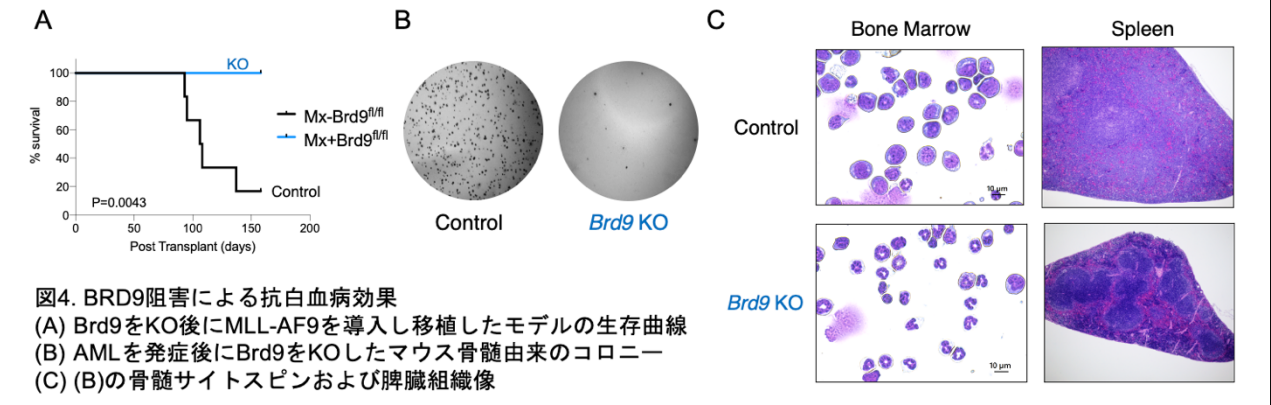


図4. BRD9阻害による抗白血病病効果  
(A) Brd9をKO後にMLL-AF9を導入し移植したモデルの生存曲線  
(B) AMLを発症後にBrd9をKOしたマウス骨髄由来のコロニー  
(C) (B)の骨髄サイトスピンおよび脾臓組織像

オープンクロマチンを認め、同部位のモチーフ解析では CTCF および CTCFL (BORIS) がトップモチーフとして検出された。すなわち、正常造血と同様に、BRD9/CTF 部位のクロマチンがオープンとなるものがミエロイド分化において重要な鍵となっていることを見出した。

また、KO マウスのリンパ系細胞分化を詳細に解析すると、DN3 以降の T 細胞分化や preB 以降の B 細胞分化において著しい障害が観察され、競合的移植実験においても同分画のキメリズムはほぼ消失していた。これらの知見は、KO マウスの骨髄細胞に由来する不死化 iLS (induced leukocyte stem cells) 細胞の培養系でも再現され、リンパ系細胞分化における BRD9 の重要性も示された。さらに、BRD9 が FOXP3 の発現および制御性 T 細胞 (Treg) の分化に不可欠であり、KO マウスにおいて Treg が著減し、

FOXP3 プログラムがクロマチンを介して抑制されていることを明らかにした。

上記の生体モデルに加えて、分子生物学的アプローチからも BRD9 の本質に迫る検討を行った。クロマチン沈降検体での質量解析の結果から、BRD9 は DNA 複製に不可欠な MCM ファミリー分子や R-loop・DNA 鎖切断に重要な役割を果たす TOP ファミリーや BRD4 とクロマチン上で結合することが明らかになった。他グループから、アセチル化された BRD4 を BRD9 のプロモドメインが認識するという報告もあるが<sup>6)</sup>、ドメイン解析の結果、BRD9 の非ドメイン N 末端領域と BRD4 の ET ドメインが両者の結合に不可欠であり、プロモドメインファミリー分子複合体の新たな役割が示唆された。また BRD9 の KO は顕著な DNA 損傷の蓄積を誘導し、 $\gamma$ H2AX 染色にて確認された。HR (Homologous Recombination) DNA レポーターアッセイにて、BRD9 の分解誘導はすみやかに HR を障害することや、これらのゲノム不安定性はプロモドメインに依存的であることも示された。

最後に、治療応用に関して、アンチセンスオリゴを用いて *BRD9* の転写後制御を正常化し NMD を阻害する治療戦略についても考察を行った。*SF3B1* 変異により *BRD9* のスプライシング異常を有するヒト MEL202 細胞の皮下移植モデルにおいて、アンチセンスオリゴの局所投与により腫瘍の縮小効果を認められた。また、全く別の観点から、*BRD9* スプライシング異常を利用した合成致死について全遺伝子を対象とした CRISPR スクリーニングを行い、SWI/SNF 複合体の構成因子だけでなく、代謝酵素やシグナル分子を候補遺伝子として同定し、生体モデルにおける標的妥当性の検証を重ねている。

## 考察

本研究では、悪性腫瘍で最も高頻度に検出されるスプライシング関連遺伝子変異である *SF3B1* 変異の下流標的を探索すべく、大規模患者検体の解析と CRISPR スクリーニング手法により、新規 SWI/SNF 複合体、ncBAF の構成因子である *BRD9* 遺伝子のスプライシング異常に伴う喪失を同定した。すなわち、ncBAF に必須のプロモドメインタンパクのスプライシング異常による ncBAF 破綻というがんの新機構を見出し、マウスモデルを用いて MDS の原因イベントとなることを証明した。BRD9 はクロマチンリモデリングを介して転写を制御する重要なプロモドメインタンパクであるが、ゲノム変異を認めない転写制御因子がスプライシング異常によって情報が書き換えられ、他の重要な遺伝子の転写を支配する現象が目されている。その中には、我々が近年報告した、*SF3B1* 変異による転写因子 EVI1 の機能変容型白血病特異的バリエーションも含まれる<sup>7)</sup>。

造血細胞特異的 *Brd9* KO マウスを用いて BRD9 の造血における役割を評価すると、造血幹細胞の質的量的低下、B 細胞への分化阻害とミエロイド系列への分化促進が HSC 自律的に生じ、血球減少や形態異常を呈するなど、ヒト MDS に合致する結果が得られた。興味深いことに、BRD9 は AML の発症および維持双方に不可欠であり、BRD9 の喪失は AML 細胞の未分化性を損なうことが明らかとなった。BRD9 の喪失は正常・腫瘍ともに造血幹細胞におけるオープンクロマチン化を介してミエロイド系列の遺伝子発現を誘導しており、分化において極めて重要な制御因子と考えられる。実際に、BRD9 や ncBAF はクロマチンループや TAD 形成に不可欠な CTCF とゲノム上で共局在しており、BRD9 の喪失は元々 CTCF の結合が弱い部位で CTCF シグナルを増強させ、エンハンサー・プロモーターループを介した分化シグナルの亢進をきたしていた。これらはゲノム変異を認めない BRD9 の転写後制御機構による新たな運命制御を示唆する知見と言え、今後の病態理解や治療応用につながる成果と言える。

本研究で得られたマルチオミクス解析結果から、BRD9 が有するクロマチン制御以外の役割には DNA 損傷修復やタンパク合成、ミトコンドリア代謝などが推測される。特に BRD9 阻害に伴う HR の

障害は MDS 発症などにおいて解決されるべき重要な課題である。例えば、*BRD9* スプライシング異常を利用した合成致死スクリーニングにおいて *TP53* がヒットしている。実際に *BRD9* と *TP53* の二重阻害を行うと  $\gamma$ H2AX の相乗的な蓄積が見られ、MDS 検体における *SF3B1* 変異と *TP53* 変異の相互排他性を説明しうる所見であると考えられる。同スクリーニングにおいては、有望なキナーゼなどがヒットしており、アンチセンスオリゴなどを用いた直接的なスプライシング修正だけでなく、*SF3B1* 変異細胞における *BRD9* スプライシング異常を利用した合成致死戦略の開発が期待される。

### 共同研究者

Muran Xiao<sup>1,2</sup>, Shinji Kondo<sup>3,4</sup>, Masaki Nomura<sup>1,5</sup>, Shinichiro Kato<sup>6,7,8</sup>, Koutarou Nishimura<sup>1</sup>, Atsushi Toyoda<sup>4</sup>, Kunihiko Hinohara<sup>6,7,8</sup>, Omar Abdel-Wahab<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Department of Hematology-Oncology, Institute of Biomedical Research and Innovation, Foundation for Biomedical Research and Innovation at Kobe, Kobe, Hyogo, Japan.

<sup>2</sup>Division of Cellular Therapy, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

<sup>3</sup>Center for Genome Informatics, Joint Support-Center for Data Science Research, Research Organization of Information and Systems, National Institute of Genetics, Mishima, Japan.

<sup>4</sup>Advanced Genomics Center, National Institute of Genetics, Mishima, Japan.

<sup>5</sup>Facility for iPS Cell Therapy, CiRA Foundation, Kyoto, Japan.

<sup>6</sup>Department of Immunology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

<sup>7</sup>Institute for Advanced Study, Nagoya University, Nagoya, Japan.

<sup>8</sup>Center for 5D Cell Dynamics, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan.

<sup>9</sup>Molecular Pharmacology Program, Sloan Kettering Institute, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, United States.

### 引用論文

1) Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*. 2011. 478:64-9.

2) Dvinge H, Kim E, Abdel-Wahab O, et al. RNA splicing factors as oncoproteins and tumour suppressors. *Nat Rev Cancer*. 2016. 16:413-30.

3) Inoue D, Bradley RK, Abdel-Wahab O. Spliceosomal gene mutations in myelodysplasia: molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis. *Genes Dev*. 2016. 30:989-1001.

4) Inoue D, Chew GL, Liu B, et al. Spliceosomal disruption of the non-canonical BAF complex in cancer. *Nature*. 2019. 574:432-436.

5) Michel BC, D'Avino AR, Cassel SH, et al. A non-canonical SWI/SNF complex is a synthetic lethal target in cancers driven by BAF complex perturbation. *Nat Cell Biol*. 2018. 20:1410-1420.

6) Gatchalian, Malik, Ho, et al. A non-canonical BRD9-containing BAF chromatin remodeling



complex regulates naive pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Commun*, 2018. 9:5139

7) Tanaka A, Nakano AT, Nomura M, et al. Aberrant *EVI1* splicing contributes to *EVI1*-rearranged leukemia. *Blood*, 2022. 140:875-888.

#### 助成研究に関連した発表論文

1. 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, Inoue D. BRD9 determines the cell fate of hematopoietic stem cells by regulating chromatin state. *Nat Commun*. 2023 Dec 15;14(1):8372. doi: 10.1038/s41467-023-44081-6.
2. 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, Inoue D. SETBP1 is dispensable for normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2023 Sep;37(9):1802-1811.
3. 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, Inoue D. Aberrant *EVI1* splicing contributes to *EVI1*-rearranged leukemia. *Blood*, 2022 Aug 25;140(8):875-888.
4. Inoue D, 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.