

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10090

研究課題名(和文) ダウン症候群における造血異常の病態解明と責任遺伝子の同定

研究課題名(英文) Investigation of disease mechanisms in hematopoietic abnormalities in Down syndrome

研究代表者

北畠 康司 (Kitabatake, Yasuji)

大阪大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：80506494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群では新生児期に一過性骨髄異常増殖症(TAM)と呼ばれる前白血病状態が高率に起こる。申請者はヒトiPS細胞とゲノム編集技術を用いてTAMの病態解明に取り組み、21番染色体上で造血異常に強く関与する4Mbの重要領域(Critical Region)を同定することに成功した。さらに21トリソミーiPS細胞において、遺伝子発現プロファイルによってピックアップされたRUNX1, ETS2, ERGの3つの遺伝子の欠失を導入し、これらがGATA1変異との相互作用によってダウン症の造血異常ならびにTAM発症を制御する重要責任遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ダウン症候群の新生児に頻発し高い頻度で重篤化する一過性骨髄異常増殖症(TAM)の発症メカニズムを明らかにし、さらにその責任遺伝子を同定することができた。これによりTAMの診断・治療法の開発が進むと思われる。さらに、今回我々が作成したiPS細胞疾患モデルは、前白血病段階から白血病へと進む造血性腫瘍の多段階発症メカニズムの解明に役立つと思われる、今後白血病の治療法開発へとつながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Chromosomal aneuploidy and specific gene mutations are recognized early hallmarks of many oncogenic processes. However, the net effect of these abnormalities has generally not been explored. We focused on transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome, which is characteristically associated with somatic mutations in GATA1. To better understand functional interplay between trisomy 21 and GATA1 mutations in hematopoiesis, we constructed cellular disease models using human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and genome editing technologies. Comparative analysis of these engineered iPSCs demonstrated that trisomy 21 perturbed hematopoietic development through the enhanced production of early hematopoietic progenitors and the upregulation of mutated GATA1, resulting in the accelerated production of aberrantly differentiated cells. These effects were mediated by dosage alterations of RUNX1, ETS2, and ERG, which are located in a critical 4-Mb region of chromosome 21.

研究分野：小児科学

キーワード：ダウン症候群 iPS細胞 造血異常 TAM ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は 700 人に 1 人という高い頻度で見られとくに白血病を高率に呈する。特徴的な点は、ダウン症候群をもつ新生児症例の約 10%において出生直後より白血病細胞と見分けのつかない異常な芽球が出現し、一過性骨髄異常増殖症(TAM; transient abnormal myelopoiesis)と呼ばれる前白血病状態を呈する点である。TAM を発症した症例の約 8 割は自然寛解するものの、残りの 2 割は芽球の過剰な増殖によって肝線維症から肝不全を呈し重篤な転帰をたどる。さらには自然寛解した症例のうちの約 3 割は数年以内にダウン症関連骨髄性白血病 (ML-DS; myeloid leukemia of Down syndrome) に発展する。これまでの研究により、この TAM および ML-DS の発症には X 染色体上にコードされる転写因子 *GATA1* の突然変異が強く関与していることが分かってきた。すなわち、両疾患で出現する芽球を調べると、ほぼ全症例で *GATA1* の N 末端を失った短縮型変異が認められる。芽球中に *GATA1* の欠失型変異は見られないこと、非ダウン症児では TAM は発症しないことなどから、TAM の発症には 21 トリソミーと *GATA1* 短縮型変異の 2 つの因子が必須であると考えられている。しかしながら 21 番染色体上のどの、いくつかの遺伝子が、*GATA1* とどのような相互作用で TAM を引き起こすのかについては、ほとんどにも分かっていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、臍帯血から作製した疾患特異的ヒト iPS 細胞と、新規の遺伝子改変技術であるゲノム編集技術を組み合わせることで TAM の疾患モデル系を作製し、ダウン症候群における造血異常の病態解明に取り組んできた。そして 21 番染色体の本数と *GATA1* の遺伝子型の組み合わせに基づく 14 種類、40 株以上の iPS 細胞を樹立し、それらをすべて血球細胞へと分化誘導することで、21 トリソミーと *GATA1* 変異が TAM において引き起こす相互作用を調べてきた。その結果、以下の点が明らかとなってきた (図 1)。

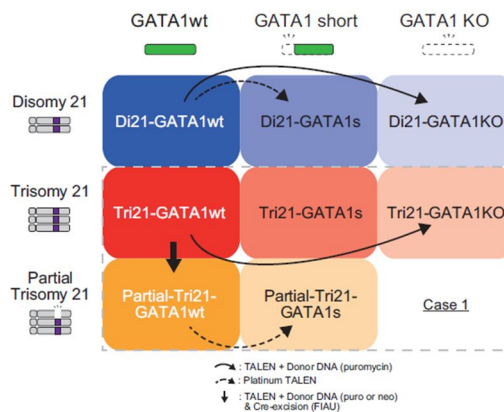


図 1. ヒト iPS 細胞とゲノム編集技術による TAM の病態モデルの作製

- 21 トリソミーは、赤芽球・巨核芽球・骨髄球の各系列における造血亢進作用をもつ。
- 短縮型 *GATA1* は、巨核芽球の分化を阻害し、量依存的に異常芽球を産生する。
- 21 トリソミーには短縮型 *GATA1* の発現を亢進させる作用をもち、この両者の相互作用により異常芽球の産生亢進が起こり、TAM の臨床病態が形成される。

申請者はこれらの研究の過程において、造血細胞でとくに発現量の高い遺伝子群が 21 番染色体上に存在すること、それらが 4Mb の領域にクラスターを形成して存在することに気付いた。そしてこの 4Mb 領域について、3 本の 21 番染色体のうち 1 本分だけ欠失させることができ、しかもその細胞が上記の異常な造血表現型を失えば、この領域がダウン症候群における造血異常の責任領域であると証明できるだろうと考えた。そしてヒト細胞において初めて 4Mb という巨大な領域を人工的に欠失させた部分トリソミー iPS 細胞の樹立に成功し、しかも造血分化誘導を行うことによって、この 4Mb 領域がダウン症候群における造血異常の重要領域 (critical region) であることを証明した。

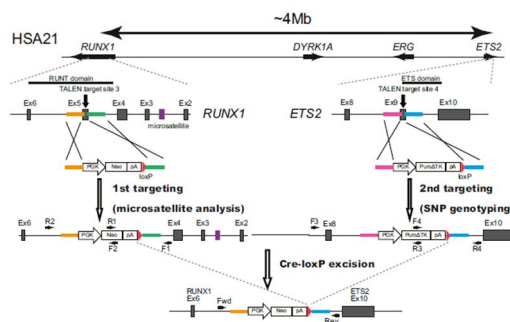


図 2. 4Mb 欠失部分トリソミー iPS 細胞の作成

これらの研究により、TAM の病態発症過程の概略と病態責任領域は同定することができたが、領域内のどの遺伝子が、造血のどの過程に関与しているのかについては分かっていない。本研究ではこれらの研究をさらに進め、「TAM の発症に関わる具体的な責任遺伝子群の同定」と「それらの遺伝子が TAM の発症過程にはたす役割の解明」を目的とした。重要領域として同定した 4Mb 領域には約 20 個の遺伝子がコードされている。そのうちでとくに造血分化に関与していると予想される遺伝子に注目し、これらをゲノム編集によりひとつずつ欠失導入し、さらに造血分化誘導を行うことによって、本当の責任遺伝子を明らかにすることを目指した。その際、21 トリソミーの造血における役割は「*GATA1* とは無関係な、造血機能の亢進」と「*GATA1s* の発現増加を介した、造血分化の異常」のふたつに分かれることから、候補遺伝子の欠失導入においては「正常 *GATA1*」と「短縮型変異を伴った *GATA1*」の両方の組み合わせをそろえ、目的に応じた適切な分化誘導を行うことで、各遺伝子の役割を明確にすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究では、これまでに21番染色体上に同定した4MbのTAM責任領域から、さらに具体的な遺伝子の同定とその果たす役割を明らかにすることを目的とし、以下のように研究を進めた。

1. トリソミー*iPS*細胞から分化誘導した血球細胞上の遺伝子発現プロファイルをもとに、4Mb領域内の遺伝子の中から、TAM発症に重要と思われる候補遺伝子をピックアップした
2. これらの遺伝子について1コピー分だけ欠失させた*iPS*細胞を樹立し、それらを造血分化誘導する

4Mb領域には約20個のコーディング遺伝子と1個のノンコーディング遺伝子が載っている。このうち血球分化させた細胞で十分な発現量が見られ、さらに健常児とトリソミーとで比較した場合に有意な発現増加が見られた遺伝子に注目し、21トリソミー*iPS*細胞をもとにゲノム編集を行い、これらの遺伝子を1コピー分だけ欠失させた*iPS*細胞を樹立した(図3)。

このとき、これらの*iPS*細胞におけるGATA1は正常型であるため、まず通常の分化誘導を行って造血亢進作用を確認した。さらに巨核芽球系への異常分化の過程を見るために、責任候補遺伝子の欠失をおこなった*iPS*細胞にGATA1短縮型変異を導入した。これらを巨核芽球系へ分化誘導し、GATA1sの発現量と異常巨核芽球の産生亢進について観察を行った。

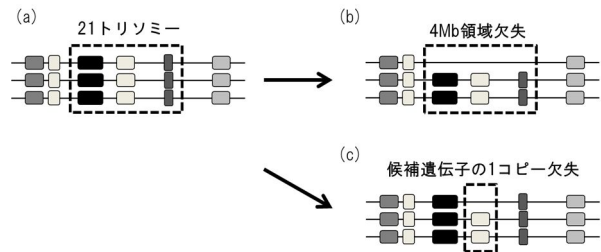
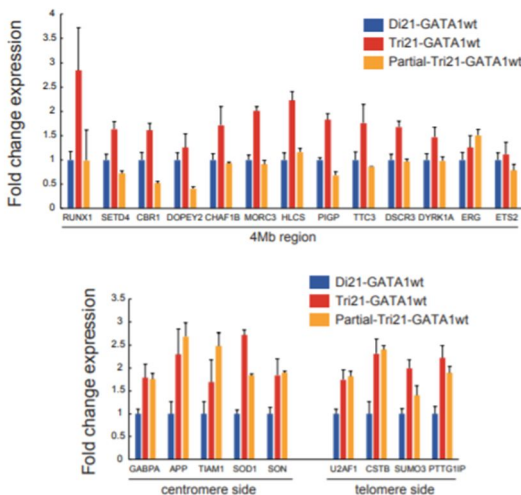


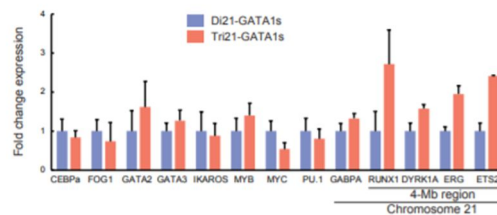
図3. TAMの発症責任遺伝子の同定 (a) 21トリソミー。造血異常を呈し、4Mb領域(破線)はその重要領域 (b) 4Mb領域を1コピー分だけ欠失させると造血異常が消失 (c) 4Mb領域内にある病態責任遺伝子の候補について、1コピー分だけ欠失させる。各遺伝子に付き、正常および短縮型GATA1の2通り用意

4. 研究成果

正常なGATA1(GATA1wt)をもつDisomy 21(Di21)、Trisomy 21 (Tri21)、4Mb領域欠失Trisomy 21 (Partial-Tri21)の*iPS*細胞を、それぞれ造血分化誘導したところ、4Mb領域の多くの遺伝子の発現量がtrisomyで上昇していた(図4)。さらにこれらにGATA1短縮型変異を導入し(GATA1s)、その造血分化細胞での遺伝子発現を調べたところ、RUNX1、ETS2、ERGの3つの遺伝子が重要な制御因子の候補として上がってきた(図5)。



(左) 図4. 正常GATA1をもつDisomy, Trisomy 21を造血系分化誘導してみると、4Mb領域の遺伝子が優位に発現亢進していることが分かる



(右上) 図5. 短縮型GATA1(GATA1s)をもつDisomy, Trisomy 21を造血系分化誘導し、その遺伝子発現を比較してみたところ、RUNX1、ERG、ETS2の発現量が著しく上昇していることが分かった

そこで、これらの遺伝子に注目し、21トリソミーがもつ3つのアレルのうちひとつだけに変異を導入することで、その作用を解析した。その際、Tri21-GATA1wt *iPS*細胞とTri21-GATA1s *iPS*細胞の両方の細胞株に遺伝子改変を施した(図6、図7)。

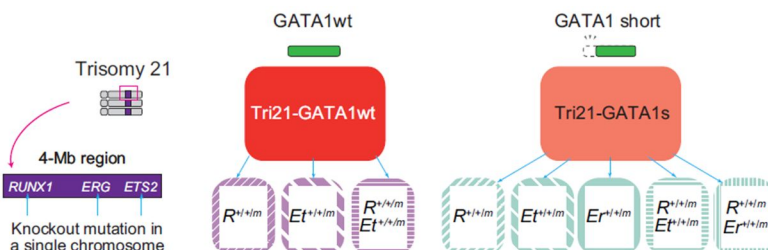


図6. RUNX1、ETS2、ERGの機能解析

Tri21-GATA1wt *iPS*細胞にRunx1変異、ETS2変異、RUNX1 + ETS2変異を、Tri21-GATA1s *iPS*細胞にRunx1変異、ETS2変異、ERG変異、RUNX1 + ETS2変異、RUX1 + ERG変異をそれぞれ導入した

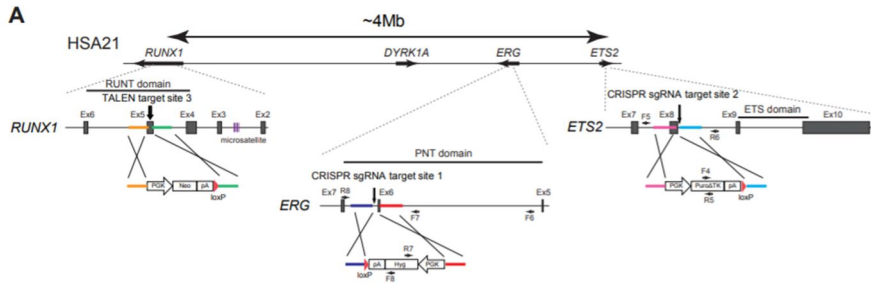


図7. RUNX1、ETS2、ERGの遺伝子改変
ゲノム編集を使用し、RUNX1、ETS2、ERGのそれぞれの遺伝子に遺伝子改変を施した

21トリソミーでは、胎児造血における血管内皮細胞から造血幹細胞への転換(内皮-造血転換; Endothelial-to-Hematopoietic Transition; EHT)が促進されている。RUNX1のみ2コピーとなった21トリソミーiPS細胞では、CD43+血液前駆細胞、そしてCD235+赤芽球系前駆細胞、CD33+骨髓球系前駆細胞の割合が減少し造血亢進作用が消失した。このことから、21トリソミーによる造血亢進作用はRUNX1が重要な役割を果たしていることが分かった。さらにGATA1s変異をとめない、かつRUNX1 + ETS2、あるいはRUNX1 + ERGが2コピーとなった21トリソミーiPS細胞では、GATA1s

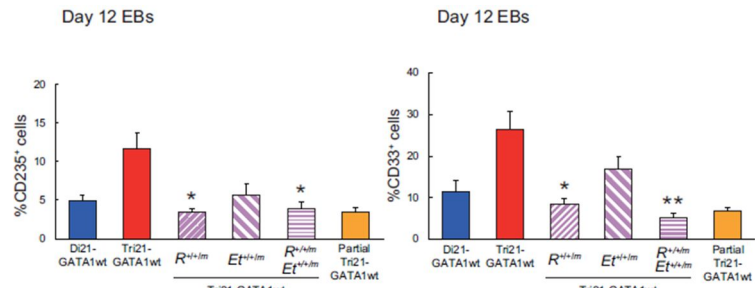


図8. RUNX1, ETS2, ERG 変異を GATA1wt-Tri21 iPS 細胞に入れ造血変化を見た。RUNX1 は初期造血の重要な制御因子であることが分かる

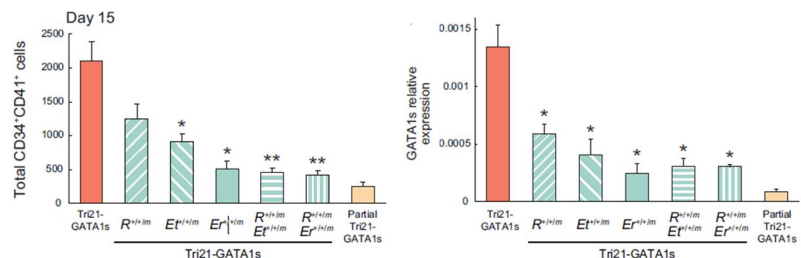
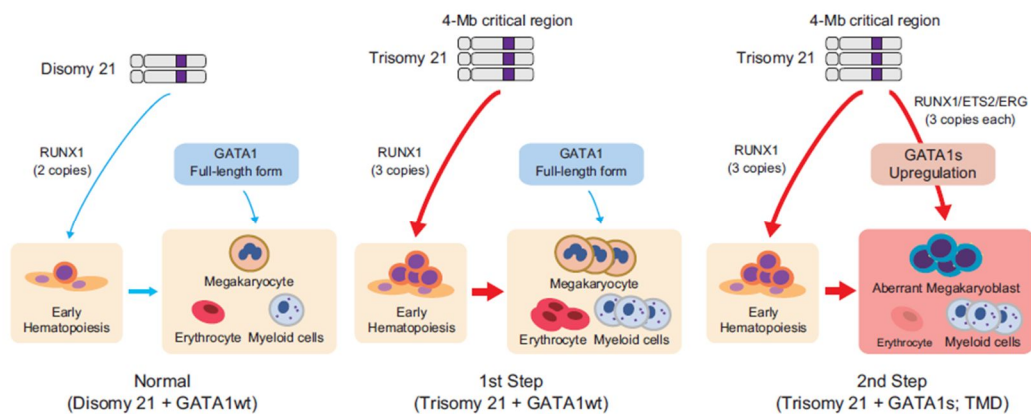


図9. RUNX1, ETS2, ERG 変異を GATA1s-Tri21 iPS 細胞に入れ巨核芽球分化を見た。RUNX1 + ETS2、RUNX1 + ERG は巨核芽球分化に重要である

発現量の低下と異常な巨核芽球産生の低下が認められた。このことから、これらの遺伝子の発現量増加が、巨核芽球分化に強い影響を及ぼしていることが判明した。

本研究によって、TAMの多段階発症メカニズムが明らかになった(下図)。正常段階では、2本の21番染色体と正常GATA1によって造血は正確に制御されているが(左図)、21番染色体のトリソミーによってRUNX1が3コピーとなり、初期造血が亢進される(中図)。さらに短縮型GATA1変異が入ると、RUNX1、ETS2、ERGの3つのコピー数増加によりこのGATA1sの発現増加が起こり、巨核芽球分化が乱され、最終的にTAMの病態が起こると考えられる。



これらの研究により、TAMの病態が明らかになり、かつその責任遺伝子を同定することができた。今後、ダウン症候群の新生児に頻発し白血病の前段階と言われるTAMの診断と治療法の開発に役立つものと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, and Ozono K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1228-1248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 北畠康司, 坂野公彦, 大森早也佳, 平田克弥, 那波伸敏, 中川夏季, 谷口英俊, 荒堀仁美, 和田和子, 大園恵一
2. 発表標題 疾患iPS細胞とゲノム編集をもちいたダウン症候群におけるTAMの病態解析
3. 学会等名 第119回 日本小児科学会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----