

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591236
 研究課題名 (和文) 急性巨核球性白血病の表現型における転写因子 BACH1 および GATA-1 の機能解析
 研究課題名 (英文) Functional characterization of transcription factor BACH-1 and GATA-1 in phenotype of acute megakaryocytic leukemia.
 研究代表者
 土岐 力 (TOKI TSUTOMU)
 弘前大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号：50195731

研究成果の概要：

ダウン症関連急性巨核球性白血病(DS-AMKL)と、その前段階である一過性白血病様反応(TMD)では *GATA-1* 遺伝子の変異がみとめられる。しかし変異 *GATA-1* の機能については明らかになっていない。本研究では、TMD のほぼ全例で *GATA-1* の標的遺伝子、幹細胞増殖因子(SCF)・レセプター(KIT)が発現していることを明らかにした。DS-AMKL 細胞株を用いて、SCF 刺激後に活性化されるシグナルカスケードを検索したところ、RAS-MAPK カスケードおよび PI3K-AKT カスケードが活性化されることが示された。KIT、MAPK、PI3K の阻害剤がいずれもこの細胞株の増殖を阻害することから、ダウン症関連白血病細胞の新たな治療法開発の可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：白血病、転写因子、ダウン症、一過性骨髄増殖症、GATA1、c-KIT

1. 研究開始当初の背景

21 番染色体のトリソミーが原因であるダウン症は、ヒトにおいて最も多い染色体異常症である。発症率は平均 1/800 と報告されているが、高齢の母親における危険率は約 1/40 まで上昇する。現在、社会的な理由などから高齢妊娠や高齢出産は増加傾向にあり、

ダウン症発症の潜在的な危険性は高くなっていると考えられる。

ダウン症の約 10% は、出生直後から Transient myeloproliferative disorder (TMD) と呼ばれる前白血病を発症する。さらに、巨核球性白血病 (AMKL) の発症率も高く、

急性白血病の発症頻度では正常人の 10~20 倍、AMKL に限ると約 400 倍に相当する。

多くの TMD は自然寛解するが、一部は骨髄異形性症候群 (MDS) を経て、3 年以内に急性巨核球性白血病 (AMKL) を発症する。この特異な経過から、ダウン症候群関連急性巨核球性白血病 (DS-AMKL) は、白血病の多段階発症の仕組みを理解するために重要な疾患であると考えられる。

2002 年、我々は、X 染色体上に座位する造血関連転写因子 GATA-1 をコードする遺伝子が、ほとんど全てのダウン症の TMD と DS-AMKL において変異しており、変異の種類はまちまちであるが、いずれの変異によっても N 末端の転写活性化ドメインが欠落した短縮型変異 GATA-1 が発現することを発見した (Blood 2003)。

2006 年、ブラジルの 1 家系において、同様の変異 GATA-1 を構成的に発現する症例が報告されたが (Nature Genetics 2006)、この家系においては貧血がみとめられるものの、白血病の発症はみとめられなかった。これは、21 番染色体をトリソミーでもつことと変異 GATA-1 を発現することが TMD の発症に必須であることを示唆している。これらのことから、21 番染色体上で、変異 GATA-1 と協同して TMD, DS-AMKL 発症に関わる遺伝子について興味を持たれていた。

我々は以前から、21 番染色体上にあつて巨核球系細胞で発現している転写因子 BACH1 について注目し、この過剰発現トランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスでは、巨核球分化障害がみとめられ、著しい血小板減少と髄外造血、骨髄線維症が引き起こされる (Blood 2005)。TMD においても髄外造血と肝の線維化がみとめられることから、BACH1 の過剰発現と TMD, DS-AMKL の表現型は関連している可能性が高

いのではないかと考えた。また、DS-AMKL と non DS-AMKL の芽球を用いた遺伝子発現プロフィール解析において DS-AMKL では、Gene dosage では説明できない BACH1 の高発現がみとめられており、DS-AMKL の表現型になんらかの関与があるのではないかと考えられた (ProNAS 2006)。

本研究では、TMD の芽球における GATA-1 標的遺伝子の発現異常と BACH1 過剰発現マウス由来巨核球の *in vitro* における培養法の開発および遺伝子発現プロフィールの解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、急性巨核球性白血病 (AMKL) の発症機構を分子生物学的に明らかにすることである。特に、巨核球・赤芽球系転写因子 GATA-1 と BACH1 の機能に注目し、GATA-1 の標的遺伝子である *c-KIT* の発現と TMD および DS-AMKL の発症機構と表現型獲得の機構を明らかにすることに主眼を置いた。さらに、結果からダウン症関連白血病の新たな治療法開発に向けた考察を加えた。

3. 研究の方法

- (1) SCF 依存性 DS-AMKL 細胞株の樹立とその性質を明らかにする。
- (2) TMD 患者芽球および DS-AMKL 由来細胞株における *KIT* の発現量を Real-Time PCR 法にて検索する。
- (3) TMD 患者芽球および DS-AMKL 由来細胞株における *KIT* 遺伝子の変異を検索する。
- (4) TMD 患者芽球の増殖における種々サイトカインの影響をみる。
- (5) SCF 依存性 DS-AMKL 細胞株の樹立とその性質を明らかにする。
- (6) 変異 *KIT* 発現ベクターを SCF 依存性細胞株に導入し、活性型変異であるかどうかを検索する。

4. 研究成果

(1) TMD 芽球における KIT の発現

TMD とその他の小児白血病における KIT の発現量を Real-time PCR 法にて検索した。その結果、TMD においては全例で KIT が高発現であることが明らかになった。

(2) TMD 芽球における SCF 反応性

TMD 芽球に発現している KIT の機能を検索する目的で、TMD 芽球を種々サイトカイン存在下で培養したところ、SCF 添加により濃度依存的に芽球の増殖がみとめられた。TPO にはわずかに反応がみられたものの、EPO, G-CSF, IL-3 にはほとんど反応がみとめられなかった。(図 1 参照)

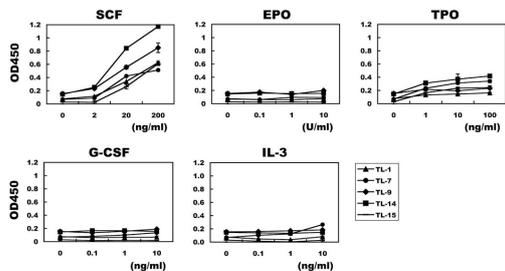


図 1 : TMD 芽球を種々サイトカイン存在下で培養し、細胞増殖を調べた。SCF 存在下で増殖することが示された。

(3) チロシンキナーゼ阻害剤 Imatinib の TMD 芽球増殖に対する影響

TMD 芽球が SCF に反応して増殖することから、KIT の阻害剤である Imatinib の増殖に対する影響を調べた。その結果、Imatinib 添加により TMD 芽球の増殖が著しく阻害された。(図 2 参照)

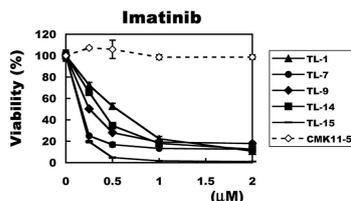


図 2 : TMD 芽球を種々濃度の Imatinib で処理した。濃度依存的に TMD 芽球の増殖が抑制された。

(4) SCF 依存性 DS-AMKL 細胞株 (KPAM1) の樹立

DS-AMKL 芽球を SCF 存在下で培養することにより細胞株を樹立した。細胞株における KIT, JAK2, JAK3 の変異を検索したがいずれも野生型であった。種々サイトカインへの反応性を検索したが、SCF に依存性は示すものの、EPO, TPO, G-CSF, IL-3 に対する反応はみとめられなかった。

(5) KPAM1 細胞株を用いた SCF 刺激下のシグナル伝達経路の検索

KPAM1 細胞株を SCF 刺激した際に活性化されるシグナル伝達系の検索をした。その結果、RAS-MAPK および PI3K-AKT カスケードの活性化はみとめられたものの、SRC の活性化はみとめられなかった。

(6) SCF 欠乏によるアポトーシスの誘導

KPAM1 を SCF 非存在下に置いたところアポトーシスが誘導された。この反応における BCL2 ファミリー因子の発現変化を検索したところ、BIM の増加と MCL1 の減少が確認されたが、他因子は全く変化が認められなかった。

(7) TMD 芽球における KIT 遺伝子の変異

TMD 芽球由来 cDNA を用いて KIT の全コーディング領域を PCR 法にて増幅し、ダイレクトシーケンス法にて塩基配列を検索した。検索した 14 例中 2 例において新規アミノ酸置換変異 (S854T および D910Y) がみとめられた。これらが活性型変異である可能性を検索するために、変異 KIT 発現ベクターを作成し、KPAM1 に導入した。しかしいずれも活性型変異ではなく、S854T においては機能欠失型変異であった。

以上のことより、TMD 芽球は SCF に反応し増殖すること、KIT の活性を阻害することに

よりその増殖を抑制できる可能性が示された。しかし、TMDの発症にKITの活性化変異が関わっている可能性は低いことが明らかになった。

TMDにおいては芽球が放出するサイトカイン(特にPDGFおよびTGF-β)により肝の線維化が引き起こされることが示唆されている。肝の線維化はTMDの予後に関わり、本研究で用いたImatinibはKITのみならず、PDGFレセプターおよびTGF-βによって活性化されるABLの阻害剤でもあることから、Imatinibに代表されるチロシンキナーゼ阻害剤によるTMDの治療は芽球の増殖を抑制すると同時に肝の線維化を抑制することにより効果的に作用する可能性が示された。

また、本研究においてはBACH1過剰発現マウスの胎児肝由来巨核球をin vitroで培養することに成功し、その遺伝子発現プロファイル解析に成功した。我々は以前に、BACH1はNF-E2転写因子の活性を負に制御する可能性を報告した(Blood 2005)。本研究のプロファイル解析により、その示唆が正しかったことを確認した(未発表)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

① Tsutomu Toki, Rika Kanezaki, Souichi Adachi, Hisanori Fujino, Gang Xu, Tomohiko Sato, Kahori Suzuki, Hisamichi Tauchi, Mikiya Endo, Etsuro Ito, 「The key role of stem cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia」、Leukemia、23巻、95-103、2008年、査読あり。

[学会発表] (計2件)

① Tsutomu TOKI, 「The Essential Role of Stem Cell Factor/KIT Signaling in the Proliferation and Survival of Blast Cells from Transient Leukemia in Neonates with Down Syndrome」、50th American Society of Hematology Annual Meeting. 2008年12月6日、米国サンフランシスコ

② 土岐 力、「一過性骨髄増殖症のマイナークローンから発生したダウン症関連急性巨核球性白血病」、第69回日本血液学会第49回日本臨床血液学会合同総会、2007年10月11日、神奈川県横浜市

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土岐 力 (TOKI TSUTOMU)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 50295731

(2) 研究分担者

渡邊 誠二 (WATANABE SEIJI)

弘前大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 10241449

(3) 連携研究者

()

研究者番号: