

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07766

研究課題名（和文）赤血球分化における転写因子IRX1の機能の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of transcription factor, IRX1, in erythropoiesis

研究代表者

佐藤 知彦（Sato, Tomohiko）

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70587005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）： IRX1遺伝子変異はダウン症候群に伴う骨髄性白血病(ML-DS)の大規模遺伝子解析の結果見出された。しかしIRX1は血球分化やがんの発症に関連することが知られていない転写因子であったため、本研究ではIRX1の機能解析を行った。  
研究の結果、IRX1は細胞増殖および赤血球/巨核球分化に関わること、またIRX1はMYC経路を抑えることで、ML-DSの腫瘍抑制因子として働いていることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IRX1が血球分化およびがんの発症に関わることを世界で初めて証明した研究であり、血液学や腫瘍学の今後の発展に寄与する可能性がある。  
また、IRX1がMYC経路を介して腫瘍抑制効果をもつことが証明できたことから、MYCがML-DSの治療標的となることが示され、臨床的意義も大きいと思われる。

研究成果の概要（英文）： IRX1 mutations were found in a large scale genetic analysis of myeloid leukemia-associated with Down syndrome (ML-DS). However, IRX1 was not known to be associated with hematopoietic differentiation or cancer development; therefore, functional analysis of IRX1 was performed in this study.

This study demonstrated that IRX1 is involved in cell proliferation and erythroid/ megakaryocyte differentiation, and that IRX1 acts as a tumor suppressor in ML-DS by suppressing the MYC signaling pathway.

研究分野：血液学

キーワード：IRX1 ダウン症候群に伴う骨髄性白血病 血球分化 腫瘍抑制因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は Down 症候群に関連した骨髄性白血病 (ML-DS) の大規模遺伝子解析を行い、ML-DS 発症に関連するであろうこれまでに報告のない多くの遺伝子を発見していた。その遺伝子の 1 つ *IRX1* は多くの種で保存されている Iroquois ホメオドメイン転写因子 (*IRX1*) をコードしており、胎児期の外肺葉の発達に関連することが知られていたが、がんの発生に関与する報告はほとんど存在せず、また血液疾患・造血との関連について言及している報告はこれまで全く存在していなかった。

### 2. 研究の目的

*IRX1* が血球分化に関わる遺伝子であることを証明し、その標的遺伝子や下流の伝達機構を明らかにすること。

*IRX1* ががん、特に白血病の発症に関わることを証明すること。

### 3. 研究の方法

#### 細胞増殖について

*IRX1* 遺伝子変異を有する ML-DS 細胞株、KPAM1 に野生型 *IRX1* を過剰発現させ最適な条件下で培養し細胞増殖を観察、*IRX1* を発現していない細胞と比較する。

#### 細胞周期について

ドキシサイクリン容量依存性に *IRX1* の発現を調整できる細胞株 (KPAM1-Tet-*IRX1*) を使用し、*IRX1* 発現の有無によって細胞周期に違いがあるかどうか BrdU 解析を行い比較する。

#### 発現変動遺伝子等の解析について

- 1) KPAM1-Tet-*IRX1* 細胞株および MGS-Tet-*IRX1* 細胞株を使用し、Flow cytometry で巨核球系マーカーの発現を解析する。またそれらの細胞の形態学的変化を観察する。
- 2) KPAM1-Tet-*IRX1* 細胞株を使用し、*IRX1* 発現あり/なし双方の細胞での RNA-seq のデータをもとに Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行う。

### 4. 研究成果

#### 細胞増殖について

図 1 の通り、遺伝子導入しなかった KPAM1 (右図黒線) に比較して、野生型 *IRX1* を遺伝子導入した細胞は、細胞増殖が著しく低下していた (右図赤線)。

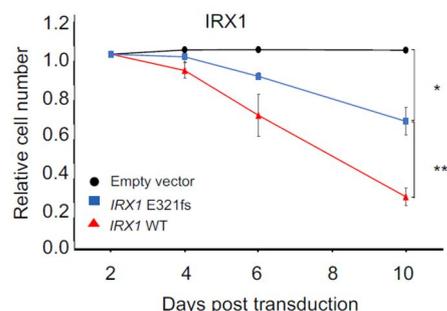


図 1 細胞増殖曲線

#### 細胞周期について

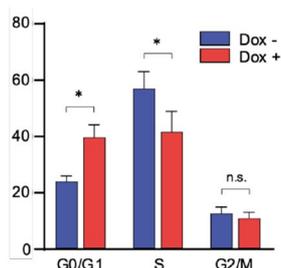


図 2 細胞周期

*IRX1* 発現を誘導した KPAM1 (左図 Dox+) では、*IRX1* を誘導しなかったもの (左図 Dox-) に比べて G0/G1 期にとどまっている細胞の割合が優位に高かった。前述の細胞増殖の低下は、細胞周期が停止することに起因することが示された。

発現変動遺伝子等の解析

1) Flow cytometry 解析において、IRX1 発現を誘導した KPAM1、MGS は CD61 の発現上昇、また MGS においては CD41 の発現上昇と CD117 の発現低下が確認された。また形態的( 図 4 )にも巨核球系への分化が示唆された。これらの結果は *IRX1* が巨核球分化に関連することを示している。

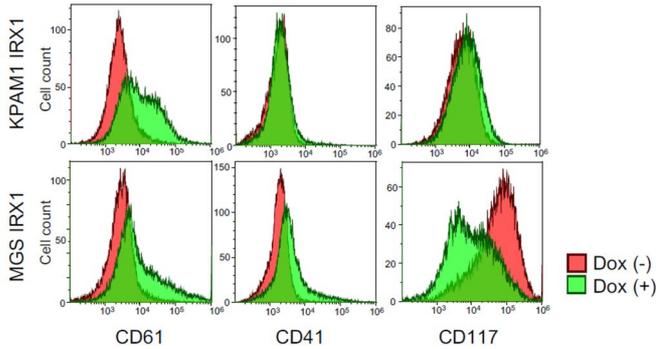


図 3 巨核球系マーカー

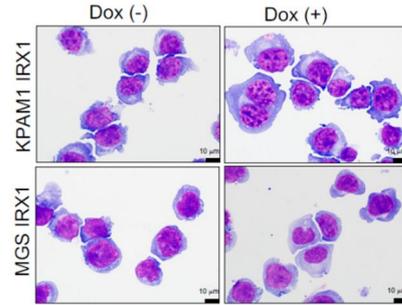


図 4 細胞の形態変化

IRX1 発現を誘導した KPAM1 は、GO 解析により赤血球系特異的遺伝子である複数の Hb 遺伝子の発現上昇が確認されたが、実際に細胞のペレットを観察すると赤色に変化していた( 図 5 )。これは *IRX1* が赤血球分化にも関連することを表している。

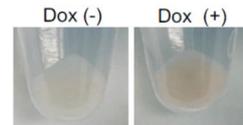


図 5 細胞ペレットの色調変化

2)

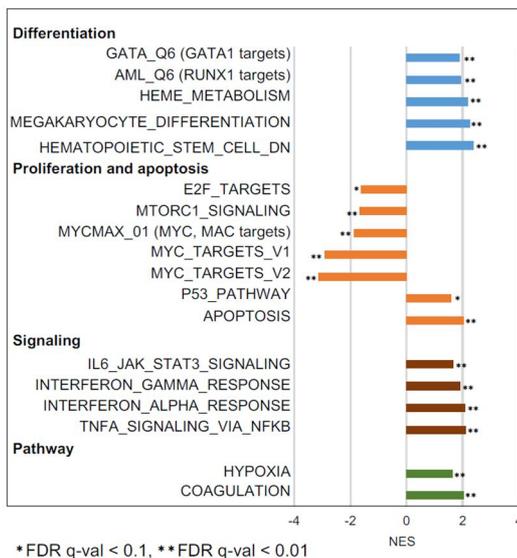


図 6 GSEA 解析

IRX1 発現を誘導した KPAM1 は、p53 経路やアポトーシスに関連した遺伝子群の発現上昇が認められたほか、MYC 経路に関連する遺伝子群の発現低下が認められた( 図 6 )。MYC はがん原遺伝子として広く知られていることから、この結果は *IRX1* が MYC 経路を抑えることでがん抑制遺伝子として働いていることを示唆するものである。

実際、右に示す通り、複数の ML-DS 細胞株はそのほかの AML 細胞株と比較して MYC の発現を抑制する BRD4 阻害剤 (ARV-825) に対して高感受性であった。ML-DS 患者において MYC が治療標的となりうることを示している。

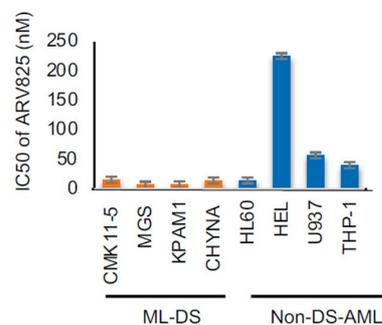


図 7 BRD4 阻害剤への感受性

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Sato Tomohiko, Yoshida Kenichi, Toki Tsutomu, Kanezaki Rika, Terui Kiminori, Ogawa Seishi, Ito Etsuro	4. 巻 -
2. 論文標題 Landscape of driver mutations and their clinical effects on Down syndrome-related myeloid neoplasms	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2023022247	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	土岐 力 (Toki Tsutomu) (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師  (11101)	
研究分担者	金崎 里香 (Kanezaki Rika) (60722882)	弘前大学・医学研究科・助教  (11101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------