

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461579

研究課題名(和文) クロマチン免疫沈降・シーケンス法による変異GATA1標的シス・エレメントの検索

研究課題名(英文) Investigation of cis-elements recognized by mutant GATA1 by chromatin immunoprecipitation sequencing analysis

研究代表者

土岐 力 (TOKI, Tsutomu)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：50195731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症新生児の約5%は一過性骨髄異常増殖症(TAM)を発症し、寛解例の約20%は急性巨核芽球性白血病へ進展する。ほぼ全例でGATA1遺伝子に変異がみとめられ、N末端側を欠いた変異タンパク(GATA1s)が発現する。本研究の目的は、GATA1sの標的遺伝子を探索し、TAMの発症メカニズムを解明であり三点に焦点を当てた。1. 変異GATA1のシス・エレメントと標的遺伝子の同定 2. GATA1sの発現量が標的遺伝子発現に与える影響 3. TAM発症に関わるドメインの検索である。我々は、発症に関わる新規ドメインを発見した。また、変異によるKIT遺伝子の発現上昇と、そのシス・エレメントを同定した。

研究成果の概要(英文)：About 5% of Down syndrome neonates develop transient abnormal myelopoiesis (TAM). It has been reported that 20% of patients remitted develop acute megakaryoblastic leukemia. Interestingly, almost cases of the disorders harbored mutations in GATA1 gene. The mutations lead to the exclusive expression of a truncated form lacking the N-terminal domain (GATA1s). We aimed to investigate the target genes of GATA1s and to elucidate the pathogenic mechanism of TAM. We focused on three points in this project. First, identification of cis-elements and target genes of GATA1s. Second, investigation of the effect of GATA1s expression level on regulation of target gene expression. Third, probing the responsible domain for development of TAM. In this study, we reported the noble narrower region GATA1 gene for responsible to development of TAM. Next, we proved the increasing the expression of KIT gene by induction of the mutation. We also identified the cis-elements responsible for the up-regulation.

研究分野：血液学

キーワード：GATA1 ダウン症 白血病

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最も頻度の高い染色体異常症であり、出生率は 1/800 と言われる。ダウン症の新生児の 5 ~ 10% は一過性骨髄異常増殖症 (TAM) と呼ばれる前白血病を発症する。多くは無治療で寛解するが、約 20% を占める重症例は早期に死亡する。また自然寛解した症例においてもその 20 ~ 30% は、4 年以内に巨核芽球性白血病 (ML-DS または DS-AMKL) を発症することが知られている。このように、前白血病状態から発症までの過程を追うことのできる極めて稀な疾患である。TAM, ML-DS のほぼ全症例の芽球では Zn フィンガー型転写因子 GATA1 をコードする遺伝子に変異がみとめられ、その結果 N 末端の 83 アミノ酸を欠いた GATA1 因子 (GATA1s) が選択的に発現する。TAM では 21 番トリソミーと GATA1 以外に変異がみとめられていないことから、両者が前白血病発症に重要な要因となっていることが明らかになった。しかし、GATA1s がどのような遺伝子発現に影響を与え TAM 発症に関わっているのか、その機序は明らかになっていない。TAM にみられる GATA1 の変異は欠失、重複、挿入、塩基置換など多彩であるが、いずれの場合も変異遺伝子から発現するタンパクは前述の GATA1s 因子である。我々は TAM 症例にみられた変異を詳細に検討したところ、変異が入る場所により GATA1s 因子の発現量に差がみられ、さらにその差が病態に影響を与える可能性を示した。これらのことより、GATA1s の標的遺伝子を検索し、GATA1s の発現量によりどのような制御を受けているのかを明らかにすることにより TAM 発症のメカニズムを明らかにできると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GATA1s の標的遺伝子を検索し、TAM, ML-DS の発症メカニズムを解明することである。具体的には以下の三点に焦点を絞って研究を行なった。

- (1) 変異 GATA1 を用いたシス・エレメントと標的遺伝子の同定
- (2) GATA1s の発現量の変化が標的遺伝子の発現に与える影響の検討
- (3) TAM 発症に関わる GATA1 ドメインの検索である。

3. 研究の方法

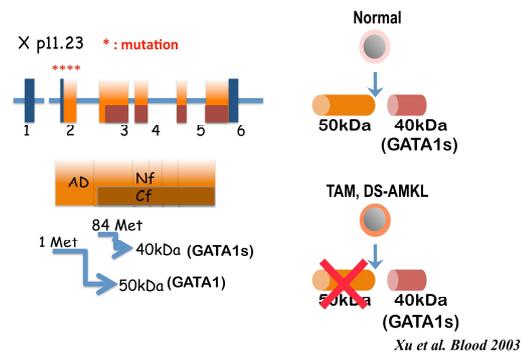
造血系細胞株である K562 へ CRISPR/CAS9 システムを用いて GATA1 遺伝子に変異を導入する。変異は TAM に実際にみられた複数の変異を導入することにより GATA1s の発現量が異なるクローンが得られる可能性が高い。遺伝子改変したクローンと親株を用いて免疫沈降シーケンス解析 (ChIP-Seq 解析) することにより、完全長 GATA1 と GATA1s の認識配列を比較する。TAM 症例の詳細な検索と遺伝子組み換え法による種々 GATA1 変異体を用いた解析により、GATA1 因子におけるより詳

細な TAM 発症責任領域の決定を試みる。

4. 研究成果

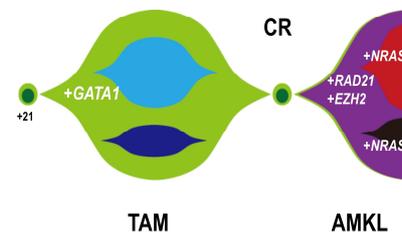
本研究では、100 検体を越す TAM 症例を詳細に検索したところ、6 例においてこれまでに報告のない変異を見出した。ほとんどの TAM, ML-DS 症例では GATA1 遺伝子の第二エクソンに変異がみられるが、これらの変異は第 3 エクソンにあり、GATA1s とは異なるタンパクを発現する (図 1 参照)。

図1 GATA1 mutation in TAM and DS-AMKL



GATA1s とこれらの変異の共通の欠失領域はわずか 7 アミノ酸残基であり、TAM 発症に関わる GATA1 の責任領域を大幅に絞り込まれた。研究成果は Blood に掲載された。TAM から ML-DS への進展は 20 ~ 30% の症例に限られることから、進展にはなんらかの機序が関与していることが予想されていた。最も高い可能性としては、TAM のクローンへの変異の蓄積が考えられていたが、直接証明した研究はなかった。本研究の GATA1 変異に関する詳細な解析法を基に、ML-DS にみられる GATA1 変異と変異アレル頻度を検索した。さらに体細胞変異のゲノムワイドな検索を試みた。その結果、コヒーシン関連遺伝子、エピゲノム制御関連遺伝子、シグナル伝達関連遺伝子が様々な頻度で変異していることが明らかになった。このことは、TAM から ML-DS への進展過程において追加的に異なるタイミングで変異が生じることが証明された (図 2 参照)。

図2 Clonal evolution of DS-AMKL

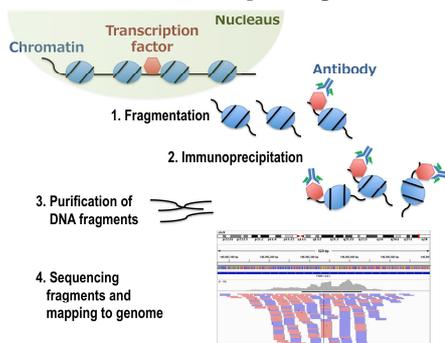


Yoshida et al. Nat. Genet., 2013

本成果は Nature Genetics に報告された。さらに本研究では、ChIP-Seq 解析 (図 3 参照) のセットアップを試みた。当初、抗体や固定法、DNA 断片のプレパレーション法などの条件出しに時間を要したが、GATA1s および先の

研究で変異がみつめられたコヒーシオン関連遺伝子などの認識配列をゲノムワイドで検索可能になった。また、造血系細胞株 K562 の *GATA1* 遺伝子に CRISPR/CAS9 システムを用いて変異を導入し、遺伝子発現プロファイ

図3 **ChIP-Seq Analysis**



ルと ChIP-Seq 解析を行った。*GATA1s* 変異導入株ではチロシンキナーゼ型レセプターである *KIT* の発現上昇がみつめられた。最近、マウスにおける *GATA1* による *KIT* の発現制御機構が明らかになったが、マウスとヒトの *KIT* 遺伝子の調節領域はの相同性は低く、ChIP-Seq 解析の結果はヒトとマウスでは大きく異なることが予想された。本成果は発表準備中である。

#### 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 8 件)

Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, *et al*. Naturally occurring oncogenic *GATA1* mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood*. 査読有 121(16):3181-3184, 2013

Saida S, Watanabe K, Sato-Otsubo A, Terui K, Yoshida K, Okuno Y, Toki T, *et al*. Clonal selection in xenografted TAM recapitulates the evolutionary process of myeloid leukemia in Down syndrome. *Blood*. 査読有 121(21):4377-4387, 2013

Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, *et al*. The landscape of somatic mutations in Down syndrome related myeloid disorders. *Nat Genet*. 査読有 45(11):1293-1299, 2013

Kazuki Y, Yakura Y, Abe S, Osaki M, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, *et al*. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing

technologies. *Sci Rep*. 査読有 4: 6136, 2014

王 汝南, 金崎里香, 土岐 力, 照井君典, 佐々木伸也, 他 非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみつめられた新規 *GATA1* インフレーム変異. 弘前医学 査読有 65 :227-237, 2014

Ono R, Hasegawa D, Hirabayashi S, Kamiya T, Yoshida K, Yonekawa S, Ogawa C, Hosoya R, Toki T, *et al*. Acute megakaryoblastic leukemia with acquired trisomy 21 and *GATA1* mutations in phenotypically normal children. *Eur J Pediatr*. 査読有 174(4):525-531, 2015

Taga T, Watanabe T, Tomizawa D, Kudo K, Terui K, Moritake H, Kinoshita A, Iwamoto S, Nakayama H, Takahashi H, Shimada A, Taki T, Toki T, *et al*. Preserved High Probability of Overall Survival with Significant Reduction of Chemotherapy for Myeloid Leukemia in Down Syndrome: A Nationwide Prospective Study in Japan. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有 63(2):248-254, 2016

Takahashi T, Inoue A, Yoshimoto J, Kanamitsu K, Taki T, Imada M, Yamada M, Ninomiya S, Toki T, *et al*. Transient myeloproliferative disorder with partial trisomy 21. *Pediatr Blood Cancer*. 査読有 62(11):2021-2024, 2015

[学会発表](計 2 件)

土岐 力, Hematologic disorders in Down syndrome, 第 57 回日本小児血液・がん学会学術集会, 2015 年 11 月 27 日~2015 年 11 月 29 日, 甲府富士屋ホテル(山梨県, 甲府市)

土岐 力, ダウン症関連白血病にみられた遺伝子変異について - 最近の知見 -, 日本血液学会東北地方会, 2013 年 9 月 1 日青森県観光物産館アスパム(青森県, 青森市)

[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

弘前大学医学部小児科学教室 HP

<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/~pedia/>

## 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：50195731

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし