

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461559

研究課題名(和文) GATA1およびコヒーシン遺伝子変異による白血病発症の分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of leukemogenesis with GATA1 and cohesin gene mutations

研究代表者

金崎 里香 (KANEZAKI, RIKA)

弘前大学・医学研究科・助教

研究者番号：60722882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症児は、白血病発症リスクが健常児の10-20倍高いと言われている。約10%ものダウン症新生児が、未熟な巨核球が一過性に増殖する血液疾患(TAM)を発症し、また、その約20%が巨核球性白血病(ML-DS)へ進行する。本研究の目的は、ML-DS発症の分子機構を明らかにすることである。TAMとML-DSのほぼ全例に、巨核球系転写因子GATA1の遺伝子変異が検出される。本研究では、細胞の生存と増殖を支持するKIT遺伝子の発現制御にGATA1変異が影響を及ぼすことを明らかにした。一方、ML-DSで高頻度に遺伝子変異が検出されるコヒーシン複合体については、遺伝子発現制御への影響を調査中である。

研究成果の概要(英文)：It is known that children with Down syndrome are at about 10-20 times higher risk of leukemia than healthy children. About 10% of newborns with Down Syndrome develop a blood disease (TAM) in which immature megakaryocytes transiently proliferate, and about 20% of them progresses to megakaryocytic leukemia (ML-DS). The purpose of this study is to clarify the molecular mechanism for development of ML-DS. In almost of all TAM and ML-DS, mutations of the megakaryocytic transcription factor GATA1 are detected. In this study, we revealed that GATA1 mutations affected the expression control of KIT gene which supports cell survival and proliferation. And, about the reserch of cohesin complex whose gene mutations are detected with high frequency in ML-DS, we are now investigating the effect on regulation of gene expression.

研究分野：小児血液学

キーワード：白血病 転写因子

1. 研究開始当初の背景

(1) ダウン症は、21 番染色体の過剰に由来する、最も多い染色体異常症である。新生児期には約 10%が TAM を発症し、多くは一旦自然寛解するものの、その約 20% は 4 年以内に ML-DS に至る。当初、ML-DS において巨核球系転写因子 *GATA1* の遺伝子突然変異が発見されたが、その後、ML-DS 症例だけではなく TAM のほぼ全例に *GATA1* 遺伝子の変異が存在することが判明している (Xu, Kanazaki et al. Blood 2003)。

(2) *GATA1* 変異は、完全長の *GATA1* タンパクの産生を障害し、代わりに N 末端 1-83 アミノ酸を欠く短縮型 *GATA1* (*GATA1s*) タンパクのみの発現を招く。*GATA1s* は、完全長型 *GATA1* とは異なり、細胞増殖を制御できない性質 (質的異常) を有している (Toki, Kanazaki et al. Blood 2013)。

(3) 研究代表者らは、*GATA1* 遺伝子の変異は *GATA1s* の発現量に影響し、遺伝子変異から *GATA1s* の発現量を推定できることを見出した。*GATA1s* low (L) 変異をもつ TAM においては、*GATA1s* high (H) の群に比べて ML-DS に移行するリスクが有意に高いことが明らかとなった (図 1) (Kanazaki et al. Blood 2010)。

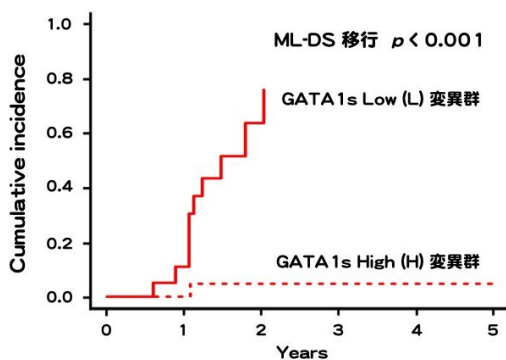


図1. *GATA1* Low 変異 (L) は高率に白血病を発症する

(4) TAM と ML-DS 症例の網羅的遺伝子変異解析では、TAM においては trisomy 21 と *GATA1* 変異以外の異常は稀であった。一方、ML-DS においてはコヒーシン複合体を構成する遺伝子 (*RAD21*, *STAG2*, *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*) の変異と、コヒーシンと機能的に関連のある *CTCF* 遺伝子変異は合わせて 65% と高頻度に存在しており、これらは ML-DS 発症に関わる重要な遺伝子変異と考えられる (図 2) (Yoshida, Kanazaki et al. Nature Genetics 2013)。

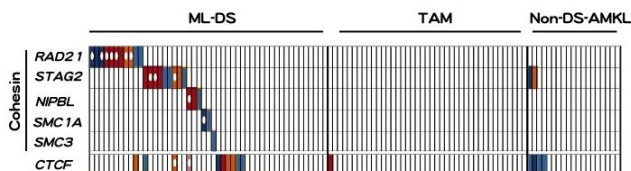


図2. コヒーシン複合体/*CTCF*の遺伝子異常

コヒーシンの変異は「排他的」に生じている。コヒーシンを構成するのどの分子が障害されても共通の機序で TAM から ML-DS に進展することを示唆している。

ML-DS へ移行する TAM においては早期に治療を開始することが望まれるが、移行のメカニズムの解析は途に就いたところであり、その解明が求められている。

2. 研究の目的

TAM から ML-DS へ移行する症例を早く見出して治療介入することは、予後の改善につながるものと期待される。

本研究の目的は、ML-DS 発症の分子機構を明らかにすることである。上記の背景から、本研究は *GATA1s* の低発現変異、コヒーシン複合体の遺伝子変異の 2 点 が ML-DS にどのように関与するかについて研究を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) *GATA1s* の低発現がどのように白血病化に影響するかを解明

TAM 検体の *GATA1s* (L) 群と (H) 群の遺伝子発現プロファイル比較と、TAM 細胞や ML-DS 由来細胞株での *GATA1s* のクロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) から、白血病化に関与する *GATA1s* の標的遺伝子を抽出する。特に注目度の高い遺伝子は機能アッセイをして評価する。

(2) 遺伝子変異によるコヒーシン複合体の機能低下と ML-DS 発症との関連性の検証

TAM 細胞でコヒーシン遺伝子の発現量を siRNA や shRNA でノックダウンし、細胞増殖能や遺伝子発現への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) *GATA1s* の低発現がどのように白血病化に影響するかについて

TAM 検体の *GATA1s* (L) 群と (H) 群の遺伝子発現プロファイル比較については、腫瘍マーカーとして有名な *WT1* や mast cell 系の遺伝子 *CPA3*, *HPGD5*, *TPSAB1*, *HDC*, 細胞周期関連では抑制因子の *CDKN2A*、促進因子の *CCND2* が (L) 群で高い傾向がみられた。一方、(H) 群では *GP5*, *GP9*, *ITGB3*, *MPL*, *PF4* など巨核球系遺伝子の発現が高い傾向が見られた。しかしながら、さらに検体数を追加して解析したところ、(L) 群と (H) 群の差が不明瞭となった。TAM 検体は全国から送付されてくるため、到着後 RNA を抽出するまでに長時間の輸送を経ていることがある。その間に細胞の状況が変化し、結果として遺伝子発現のプロファイリングに影響した可能性が考えられた。

より、遺伝子発現の解析は、TAM 検体内で群間比較するという繊細な解析には、より実験的なサンプルの方が適していると思われた。そこで、CRISPR/Cas9 を利用したゲノム編集にて、*GATA1* 遺伝子に変異のない巨核球系の細胞株 K562 に *GATA1s* のみが発現する変異の *GATA1s* (L) タイプ、(H) タイプを導入した。得られたクローン (K562 *GATA1s* サブクローンは、(L) タイプ、(H) タイプともに *GATA1* の標的遺伝子の一つである *HBG1* の発現が低

下していた。また、興味深いことに、TAM と ML-DS で高発現している、細胞増殖促進因子の受容体型チロシンキナーゼ *KIT* の発現量が 2-20 倍増加していることが判明した。*KIT* の発現量が (L) タイプのサブクローンで高い傾向が見られたが、(H) タイプでも発現量が高いサブクローンが存在しており、GATA1s 量と *KIT* 発現量との関連を説明するにはさらなる裏付けが必要である。しかしながら、完全長型 GATA1 に代わって GATA1s が発現するサブクローンにおいて *KIT* 発現が増加するという現象をとらえたことは、本研究による新たな知見であり、TAM の発症機構の解明につながるものと考えられる。

K562 および K562 GATA1s サブクローン、ML-DS 由来細胞株 (CMK11-5、KPAM1) における GATA1、GATA2 の ChIP-seq

GATA1s の標的遺伝子を調べるため、GATA1 の ChIP-seq を実施した。また、GATA1 と DNA 結合配列が重複し、TAM や ML-DS 細胞で発現している転写因子 GATA2 についても実施した。

K562 および K562 GATA1s サブクローンによる完全長 GATA1 と GATA1s の ChIP-seq ピーク比較では、GATA1s サブクローンでの GATA1 は親株 K562 よりもゲノムへの結合ピーク数が少ないことが判明した。また、GATA1s サブクローンでは親株と比較して標的遺伝子への GATA1 の結合量が少ない箇所も見られた。以上の特徴は、マウスサンプルを用いた先行論文 (Chlon TM et al. 2015 Haematologica) で報告された、GATA1 の発現しない ES 由来細胞に完全長型 GATA1 や GATA1s を導入したものと同様であった。

KIT 遺伝子の発現制御については、以前 Jing H らがマウス赤血球系細胞の GATA1 発現誘導系を用いた実験から、GATA1 と GATA2 による発現制御モデルを提唱している (Jing H et al. Mol Cell. 2008)。GATA2 は *KIT* 遺伝子 -114kb にあるエンハンサーに結合して発現を促進するが、GATA1 を誘導すると GATA1 が GATA2 に取って代わって *KIT* 遺伝子エンハンサーの GATA 因子認識配列 (GATA site) に結合し発現を抑制するというものである。

本研究では、*KIT* 遺伝子 -115kb、-87kb に GATA1、GATA2 の結合が確認された。-115kb では GATA1s サブクローンの GATA1 の結合が親株の K562 よりも少なかった。一方、-87kb では両者の結合に大きな差は見られなかった。また、親株の K562 には -109kb にもわずかに結合が見られた。この -109kb には CMK11-5 と KPAM1 の GATA1、GATA2 ChIP においても結合が確認されていることから、GATA1s サブクローンにおいてはこの領域にエピジェネティックな変化が生じ、結合できない状態にあるものの、GATA1s 分子自体は結合しうる領域であると推測される。また、この -109kb 領域はマウスの -114kb の塩基配列と相同性があり、細胞の分化度や状況によっては機能的に作用する領域である可能性がある。なお、K562 GATA1s サブクローンで

は親株と比較して GATA2 の発現量および *KIT* 遺伝子上流への結合量に大きな変動が見られなかったことから、*KIT* の発現量増加が GATA2 の転写活性化によるものとは考えにくい。一方、Jing H らのマウスの系では、*KIT*+5k 領域にも GATA 因子の結合が示されたが、この領域の配列と相同性が高いヒト +6kb では、GATA1 と GATA2 の結合はほとんど検出されなかった。このように、ヒトの *KIT* の発現調節機構はマウスとは異なることが判明した。

KIT 上流 GATA 結合領域 (-115kb、-109kb、-87kb) の塩基配列を用いてエンハンサーアッセイを行ったところ、K562、GATA1s サブクローン、CMK11-5 共に -87kb の活性が最も高かった。また、この領域の GATA site に変異を導入すると活性は低下することから、この実験系では -87kb 領域にある GATA site への GATA 因子の結合が転写活性化に重要であることが示された。完全長 GATA1 が *KIT* 遺伝子の転写抑制因子ならば、この実験系においても K562 では転写活性値が低下すると予想されるが、実際には *KIT* プロモーターのみの場合よりも逆に増加しており、この実験系では捉えることのできない発現調節機構 (例えばゲノムの高次構造を介したもの) が *KIT* 遺伝子に存在していることを示唆した。*KIT* プロモーター/転写開始点とエンハンサーとの高次構造形成を GATA1 が制御している可能性が考えられる。

TAM 細胞の ChIP については、多くの細胞数が必要なため、芽球の多い凍結保存検体を解凍、培養して固定条件を検討した。安定した増殖が得られず苦戦しているが、TAM 細胞での ChIP-seq を実施し次第、TAM のマイクロアレイと照らし合わせる見込みである。

すでに得られている K562 や ML-DS 細胞株の ChIP-seq データと TAM のマイクロアレイデータを照らし合わせた限りでは、(H) 群で発現が多い巨核球系の遺伝子の多くに GATA1 の結合が検出されており、これらは GATA1 の直接的な標的遺伝子で、GATA1 によって転写活性化していると推察される。一方、(L) 群で高発現の遺伝子においても GATA1 の結合が見られたが、i) GATA1 が発現抑制している、ii) GATA1 よりも GATA2 の結合が優位になり転写を促進している、iii) GATA1 発現量の差によって細胞の分化段階や分化系統に差異が生じ、活性化している遺伝子が変化した、などの可能性を個別に慎重に検討する必要があると思われる。

(2) 遺伝子変異によるコヒーシン複合体の機能低下と ML-DS 発症との関連性の検証

コヒーシン複合体と機能的に関連性が深く、ML-DS において遺伝子変異が高頻度に検出される転写因子 CTCF に注目した。

ML-DS 由来細胞株は、一過性の遺伝子導入の効率があまり高くなかったため、まずは K562 に CTCF の siRNA 導入を試みた。siRNA による CTCF ノックダウン効率が 5 割を下回

っていたためか、細胞増殖に対する影響ははっきりしなかった。

CTCF のナンセンス遺伝子変異を有する、ML-DS 由来細胞株 KPAM1 にゲノム編集にて CTCF 変異の修繕を試みた。しかし、編集効率がきわめて低く、実験継続を断念した。

ウイルスを介して作成した、野生型 CTCF をドキシサイクリンにて発現誘導可能な KPAM1 では、CTCF mRNA が最大 5 倍まで発現増加していたものの、細胞増殖はわずかに抑制されるにとどまった。

CTCF の認識配列への結合は、DNA メチル化の影響を受ける。様々ながんでがん抑制遺伝子が DNA メチル化異常により不活性状況にあると言われている。このため、KPAM1 に野生型 CTCF を発現誘導するだけでは影響が観察されにくいという可能性が考えられた。そこで、DNA メチル化阻害剤処理を行うこととした。5-Aza-deoxycytidine 高濃度側で細胞増殖のわずかな速度低下が観察されたものの、はっきりとした効果は得られなかった。

今回の研究では、CTCF の細胞増殖に対する影響はわずかであったが、CTCF はゲノムの構造に大きく関わる重要な因子であることから、遺伝子発現制御への影響を継続調査中である。

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 2 件)

照井君典、金崎里香、土岐力、伊藤悦朗、ダウン症候群に伴う TAM 発症の分子機構、日本産婦人科・新生児血液学会誌、査読無、25 巻、vol.1、2015、49-54、<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ep50bgyn/2015/t02501/020&name=0049-0054j&UserID=133.60.150.16>

王汝南、金崎里香、土岐力、照井君典、佐々木伸也、工藤耕、神尾卓哉、池田史圭、伊藤悦朗、非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規 GATA1 インフレーム変異、弘前医学、査読有、65 巻、2014、227-237、<http://hdl.handle.net/10129/5431>

[学会発表](計 2 件)

金崎里香、土岐力、照井君典、佐々木伸也、工藤耕、神尾卓哉、佐藤知彦、池田史圭、伊藤悦朗、Dysregulation of the KIT gene expression by GATA1s in Down syndrome related myeloid disorders、第 78 回日本血液学会学術集会、2016 年 10 月 13 日～2016 年 10 月 15 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

金崎里香、王汝南、土岐力、照井君典、佐々木伸也、工藤耕、神尾卓哉、佐藤知彦、池田

史圭、伊藤悦朗、In-frame deletion of GATA1 in pediatric acute megakaryoblastic leukemia without Down syndrome、第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日～2014 年 11 月 2 日、大阪国際会議場(大阪府大阪市)

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 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 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「テニュアトラック普及・定着事業」
<http://www.med.hirosaki-u.ac.jp/tenure/researcher.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

金崎 里香 (KANEZAKI, Rika)
弘前大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：6 0 7 2 2 8 8 2

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

伊藤 悦朗 (ITO Etsuro)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：2 0 1 6 8 3 3 9

土岐 力 (TOKI Tsutomu)

弘前大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：5 0 1 9 5 7 3 1

(4)研究協力者

なし