

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013004

研究課題名（和文） ダウン症候群に伴う急性巨核球性白血病の多段階発症の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of multi-step leukemogenesis in Down syndrome

研究代表者

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：20168339

研究成果の概要（和文）：本研究は、ダウン症の白血病発症の仕組みを明らかにするために 21 番染色体上の遺伝子を解析し、*ERG*、*RUNX1*、*BACH1* が白血病の責任候補遺伝子であることを明らかにした。また、*JAK3* 活性化変異が約 10% の前白血病状態 (TMD) にみられた。*GATA1* 遺伝子の変異は *GATA1s* タンパクの発現量に影響し、高発現変異をもつ TMD は、白血球は少ないが白血病発症のリスクが有意に高いことが示された。

研究成果の概要（英文）：To understand the mechanism of leukemogenesis in Down syndrome, we investigate the genes on chromosome 21 and identified *ERG*, *RUNX1* and *BACH1* as the candidates of the causative genes. *JAK3* activating mutations were identified in about 10% of preleukemia (TMD) in Down syndrome. *GATA1* mutations affected the expression levels of *GATA1s* protein. *GATA1s* low mutations in TMD were significantly associated with a risk of progression to acute megakaryoblastic leukemia and lower WBC counts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,400,000	0	9,400,000
2006年度	9,400,000	0	9,400,000
2007年度	9,400,000	0	9,400,000
2008年度	9,400,000	0	9,400,000
2009年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	47,000,000	0	47,000,000

研究分野：小児血液学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ダウン症候群 白血病 転写因子 *GATA1* 21 番染色体

1. 研究開始当初の背景

ヒトの悪性腫瘍は、多段階の遺伝子異常が蓄積して発症する。21 番染色体の過剰が原因であるダウン症は、最も多い染色体異常症で、約 10% の症例に前白血病である transient myeloproliferative disorder (TMD) を発症し、

その 20～30% は生後 4 年以内に急性巨核球性白血病 (AMKL) を発症する。このため、ダウン症候群関連白血病は白血病の多段階発症の仕組みを理解するために、たいへん良いモデルであると考えられる。最近、我々は、赤血球・巨核球系転写因子 *GATA-1* 遺伝子の

変異がダウン症のTMDとAMKLにおいて高率に見られ、いずれの症例もN末端の転写活性化ドメインが欠落した変異GATA-1が発現していることを発見した(Blood 2003)。しかし、変異GATA-1因子による白血病発症の仕組みについては、未解決のままであった。また、GATA-1遺伝子はX染色体上に存在するため、GATA-1遺伝子の変異は白血病発症の early event であるが、first hit ではないと考えられた。また、TMDからAMKLに進展する仕組みも不明であった。本研究は、以上の背景をもとにダウン症の白血病が多段階に発症する仕組みを分子レベルで明らかにすることを目指して計画された。

2. 研究の目的

ダウン症は、約10%の症例にTransient myeloproliferative disorder (TMD) という前白血病を発症し、その20~30%は生後4年以内に急性巨核球性白血病(AMKL)を発症する。本研究の目的は、ダウン症の白血病発症の仕組みを分子レベルで明らかにすることである。具体的には、以下の3点に焦点を絞り研究を行う。

- (1) 変異GATA1が、正常造血細胞分化・増殖を障害する仕組みを明らかにする。
- (2) 変異したGATA1と共同して働く21番染色体上の遺伝子を同定する。
- (3) TMDがAMKLに進展する時に加わる新たな遺伝子の異常を見出す。

3. 研究の方法

(1) 変異GATA-1が、正常造血細胞の分化・増殖を障害する仕組みの解析

ダウン症のAMKL細胞株CMK細胞は変異GATA-1のみが発現している。これに正常GATA-1遺伝子を過剰発現させた細胞株と親株における遺伝子発現量の差をDNAマイクロアレー法で解析する。発現量に有意差がある遺伝子については、northern hybridization法などで確認した後、GATA-1による発現調節機構を明らかにする。また、CMK細胞を用いて、RNAi法などの遺伝子機能阻害実験あるいは遺伝子導入実験によって、白血病発症における役割について解析する。

(2) 白血病発症の早い段階で、変異したGATA-1と協同して働く21番染色体上の遺伝子を同定

ダウン症のTMD発症の責任候補遺伝子BACH1の解析

GATA-1遺伝子の赤血球・巨核球特異的なプロモーターを含む発現ベクターIE3.9 int.polyAAを用いて、ダウン症のAMKLで検出された変異GATA-1遺伝子のトランスジェニックマウスを作成する。GATA-1ノックダウン

マウスとかけ合わせ、変異GATA-1遺伝子のみが発現しているマウスを作成する。次に、BACH1トランスジェニックマウスとかけ合わせ、BACH1の過剰発現とGATA-1の異常が白血病の原因となるか解析する。

BACH1トランスジェニックマウスにおける巨核球分化障害の解析

受精後13.5日のマウス胎児から肝を採取し、トロンボポイエチン存在下に液体培養して巨核球を大量に得る。Mac-1, GR-1, TER-119抗体、次にIgG抗体でコートされた磁気ビーズ反応させた後、MACSカラムを通して巨核球以外の細胞を除き巨核球を純化する。BACH1トランスジェニックマウスとコントロールマウスの巨核球における遺伝子の発現量の差をDNAマイクロアレー法で解析し、BACH1の標的遺伝子を検索する。また、新規の標的遺伝子については、ノックアウトマウスを作成し、血小板造血における遺伝子の機能を解析する。

(3) TMDがAMKLに進展する時に加わる新たな遺伝子変異の解析

TMDのモデルマウスの作成(分担 土岐)

放射線照射したNOD/SCIDマウスにTMD芽球を移植し、TMDのモデルマウスの作成を作成する。ヒト血球細胞の生着の確認は、ヒトCD45に対するモノクローナル抗体を用いて細胞表面の発現をFACSで解析して行う。

TMDがAMKLに進展する時に加わる新たな遺伝子変異の解析

TMDからAMKLが発症した症例で、両者の細胞が保存されている検体を用いてDNAマイクロアレー法で遺伝子発現量の変化を解析し、両者の生物学的な差異を明らかにする。また、ダウン症候群のAMKL細胞におけるがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異を解析する。

4. 研究成果

本研究では、ダウン症の白血病発症の仕組みを分子レベルでさらに明らかにすることを目的に転写因子GATA-1とBACH1の解析を進め、以下の点について明らかにした。

(1) 変異したGATA-1と協同して働く21番染色体上の遺伝子を同定するため、その候補遺伝子BACH1のトランスジェニックマウスを作製した。BACH1の過剰発現はin vivoでNF-E2転写因子の機能を抑制し、巨核球分化を障害することを明らかにした。Microarray解析で得られたBACH1の標的候補遺伝子の発現をBACH1トランスジェニックマウスか

ら巨核球を純化し、real time PCR で解析した。その結果、BACH1 によって発現が負あるいは正に制御されている遺伝子を複数同定した。

(2) 21 番染色体上の TMD 責任候補遺伝子の一つである RUNX1 転写因子に注目し、解析を行った。その結果、GATA1 がその zinc finger ドメインを介して RUNX1 と結合することを見出した。患者特異的 GATA1 変異体はその zinc finger ドメインを介して RUNX1 と結合し、GATA1 と RUNX1 の結合配列を持つ巨核球特異的な *GP1b* プロモーターを相乗的に活性化した。この結果より、DS-AMKL の原因は、GATA1 と RUNX1 の相互作用の喪失のためではないことが明らかとなった。

(3) TMD から AMKL に進展する時に加わる *GATA1* 遺伝子以外の遺伝子変異を解析した。Pan JAK inhibitor によって、解析した 3 種類すべての DS-AMKL 細胞株の増殖と生存率が著しく低下した。そこで、JAK ファミリーの遺伝子 (*JAK1*, *JAK2*, *JAK3*, *TYK2*) の塩基配列を解析したところ、2 つの DS-AMKL 細胞株で *JAK3* 遺伝子の変異が検出された。Ba/F3 細胞にレトロウイルスベクターを用いて変異 *JAK3* を発現させたところ、IL-3 非依存性に増殖が認められ、活性化変異であることが明らかとなった。DS-AMKL でも 12 例中 1 例の *JAK3* 変異がみられ、驚いたことに TMD でも 12 例中 1 例に *JAK3* の変異が認められた。DS-AMKL 細胞株 MGS では、同一のアレルの SH2 ドメインと pseudokinase ドメインにミスセンス変異が存在し、TMD では受容体結合ドメインにミスセンス変異が存在した。IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 にレトロウイルスベクターを用いて変異 *JAK3* を発現させたところ、IL-3 非依存性増殖や STAT5 の持続的リン酸化が認められ活性化変異であることが明らかとなった。さらに DS-AMKL でも TMD とほぼ同頻度で *JAK3* 変異が見出されることから、*JAK3* 変異は TMD から AMKL に進展する時に起る変化ではなく、白血病発症のごく初期に起ることが明らかになった。

(4) TMD 細胞および SCF 依存性 DS-AMKL 細胞株を用いて、SCF/KIT シグナル伝達系がダウン症の白血病発症に重要な役割を果たしていることを見出した。また、SCF/KIT の下流のシグナルとして、DS-AMKL では RAS/MAPK と PI3K/AKT シグナルが重要であることを見出した。タモキシフェンで完全長 *GATA1* の機能的発現が誘導可能な DS-AMKL 細胞株 (CMK および KPAM1) を用いて、*GATA1* 変異によって発現が障害されている遺伝子を real time PCR 法を用いて同定した。その結果、完全長 *GATA1* の発

現により KIT の発現が抑制されることが明らかになった。以上の結果などから KIT は *GATA1* により正常では負に制御されているが、DS-AMKL では発現の抑制が障害されていることが示唆された。

(5) ほとんどの TMD 細胞で、恒常的 STAT3 のリン酸化が認められ、TMD の発症に JAK/STAT 系の分子の異常が存在することが示唆された。そこで、変異遺伝子を絞り込むために、恒常的 STAT3 のリン酸化の仕組みの解明を進めた。STAT3 のリン酸化に関わる gp-130 のシグナル伝達系に注目し、サイトカインあるいはサイトカイン受容体に対する中和抗体を用いて STAT3 のリン酸化の解析を行った。その結果、KPAM1 細胞では LIF の autocrine によって恒常的 STAT3 の活性化が生じていることが明らかになった。現在、臨床検体を用いて LIF や受容体の発現の解析を進めている。

(6) ダウン症の TMD と ML-DS の患者のほとんどに *GATA1* の遺伝子異常が認められる。遺伝子変異の結果、完全長の *GATA1* タンパクが全く産生されなくなり、*GATA1s* のみが発現している。しかし、*GATA1* 遺伝子変異が *GATA1s* の発現量に影響を与えるのかどうかは知られていない。この問題を解くために、まず *GATA1* の転写産物によって *GATA1* 変異を分類した。TAM 症例でみられた変異を導入した *GATA1* の cDNA 発現ベクターおよび mini gene 発現ベクターを作成して、培養細胞に発現させて、*in vitro* の系で *GATA1s* タンパクの発現量を解析した。その結果、*GATA1* 遺伝子の変異は *GATA1s* タンパクの発現量に影響し、遺伝子変異から *GATA1s* タンパクの発現量が予想できることが明らかになった。

GATA1 変異を高発現変異 (*GATA1s high*) と低発現変異 (*GATA1s low*) の二つのグループに分類した。2003 年～2008 年の間に遺伝子解析を行い、*GATA1* 変異を認められた 66 例について解析を行った。*GATA1* 変異により、患者を *GATA1s high* と *low* の 2 群に分け臨床データを比較すると、白血球数が *GATA1s high* の群で有意に高値であった。さらに驚いたことに、*GATA1s low mutation* をもつ TAM は、白血病を発症するリスクが有意に高いことが示された。

以上より、*GATA1* 遺伝子の解析は TAM の確定診断に重要であるばかりではなく、予後を予想する貴重な情報を与えてくれると思われる。

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19件)

Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Shingh H, Tenen DG and Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of M-CSFR is critical for MOZ-leukemia stem cell potential. **Nature Medicine**. 査読有. 16 巻. 2010. 580-585.

Yamashita Y, Yuan J, Suetake I, Suzuki H, Ishikawa Y, Choi YL, Ueno T, Soda M, Hamada T, Haruta H, Takada S, Miyazaki Y, Kiyoi H, Ito E, Naoe T, Tomonaga M, Toyota M, Tajima S, Iwama A, Mano H. Array-based genomic resequencing of human leukemia. **Oncogene**. 査読有. 2010. (Epub ahead of print).

Shiba N, Kato NM, Park MJ, Sanada M, Ito E, Fukushima K, Sako M, Arakawa H, Ogawa S, and Hayashi Y. CBL mutations in juvenile myelomonocytic leukemia and pediatric myelodysplastic syndrome. **Leukemia**. 査読有. 24 巻. 2010. 1090-1092.

Kudo K, Terui K, Sasaki S, Kamio T, Sato T, and Ito E. Voriconazole for both successful treatment of disseminated Trichosporon asahii infection and subsequent cord blood transplantation in an infant with acute myelogenous leukemia. **Bone Marrow Transplant**. 査読有. 2010. (Epub ahead of print).

Konno Y, Toki T, Tandai S, Xu G, Wang RN, Terui K, Ohga S, Hara T, Hama A, Kojima S, Hasegawa D, Kosaka Y, Yanagisawa R, Koike K, Kanai R, Imai T, Hongo T, Park MJ, Sugita K, and Ito E. Mutations in the ribosomal protein genes in Japanese patients with Diamond-Blackfan anemia. **Haematologica**. 査読有. 2010. (Epub ahead of print).

Toki T, Ito E et al. The key role of stem cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. **Leukemia**. 査読有. 23 巻. 2009. 95-103.

Oda M, Ito E, et al. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. **Int J Hematol**. 査読有. 89 巻. 2009. 374-382.

Iida A, Ito E. Bach1 deficiency ameliorates hepatic injury in a mouse model. **Tohoku J**

Exp Med. 査読有. 217 巻. 2009. 223-229.

Terui K, Sato T, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E, et al. Two novel variants of MOZ-CBP Fusion transcripts in spontaneously remitted infant leukemia with t(1;16;8)(p13;p13;p11), a new variant of t(8;16)(p11;p13). **Haematologica**. 査読有. 93 巻. 2008. 1591-1593.

Sato T, Toki T, Kanezaki R, Ito E, et al. Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. **Brit J Haematol**. 査読有. 141 巻. 2008.681-688.

Ogawa J, Kanegane H, Tsuneyama K, Kanezaki R, Futatani T, Nomura K, Ishizawa S, Sasahara M, Ito E, Miyawaki T. Platelet-derived growth factor may be associated with fibrosis in a Down syndrome patient with transient myeloproliferative disorder. **Eur J Haematol**. 査読有. 2008. 81 巻. 58-64.

Kanegane H, Watanabe S, Nomura K, Gang X, Ito E, Miyawaki T. Distinct clones are associated with the development of transient myeloproliferative disorder and acute megakaryocytic leukemia in a patient with Down syndrome. **Int J Hematol**. 査読有. 86 巻. 2007. 250-252.

Narumi Y, Ito E, et al. Molecular and clinical characterization of cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome: overlapping clinical manifestations with Costello syndrome. **Am J Med Genet A**. 査読有. 143 巻. 2007. 799-807.

Xu G, Kato K, Toki T, Takahashi Y, Terui K, Ito E. Development Acute Megakaryoblastic Leukemia From a Minor Clone in a Down Syndrome Patient With Clinically Overt Transient Myeloproliferative Disorder. **J Pediatr Hematol Oncol**. 査読有. 28 巻. 2006.696-698.

Kanezaki R, Toki T, Xu G, Narayanan R, Ito E. Cloning and Characterization of the Novel Chimeric Gene p53/FXR2 in the Acute Megakaryoblastic Leukemia Cell Line CMK11-5. **Tohoku J Exp Med**. 査読有. 209 巻. 2006. 169-180.

Xu G, Kanezaki R, Toki T, Watanabe S, Takahashi Y, Terui K, Kitabayashi I, and Ito E. Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. **Leukemia**. 査読有. 20 巻. 2006. 1002-1008.

Rainis L, Toki T, Pimanda JE, Rosenthal E, Machol K, Strehl S, Gottgens B, Ito E

and Izraeli S. The proto-oncogene ERG in megakaryoblastic leukemias. **Cancer Res.** 査読有. 65 巻. 2005. 7596-7602.

Toki T, Katsuoka F, Kanezaki R, Xu G, Kurotaki H, Sun J, Kamio T, Watanabe S, Tandai S, Terui K, Yagihashi S, Komatsu N, Igarashi K, Yamamoto M, and Ito E. Transgenic expression of Bach1 transcription factor results in megakaryocytic impairment. **Blood.** 査読有. 105 巻. 2005. 3100-3108.

Tono C, Xu G, Toki T, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, and Ito E. JAK2 Val617 Pheactivating tyrosine kinase mutation in juvenile myelomonocytic leukemia. **Leukemia.** 査読有. 19 巻. 2005. 1843-1844.

〔学会発表〕(計2件)

Toki T, Ito E, et al. Activating *JAK3* Mutations in Transient Myeloproliferative Disorder and Acute Megakaryoblastic Leukemia Accompanying Down Syndrome. **The 50th Mnnual meeting of American Society of Hematology.** December 5-8. 2008. サンフランシスコ.

Sato T, Toki T, Kanezaki R, Xu G, Terui K, Kamio T, Kiyoi H, Mano H, Ito E. Activating *JAK3* mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. **The 49th Mnnual meeting of American Society of Hematology.** December 8-11. 2007. アトランタ.

〔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

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：20168339

(2)研究分担者

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