

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10094

研究課題名(和文) GATA1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) Molecular pathogenesis of leukemia by the GATA1 gene mutation

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症新生児の約10%は、未熟な巨核球が一過性に異常増殖する血液疾患(TAM)を発症する。TAMは早期死亡率と急性巨核芽球性白血病(ML-DS)への進行リスクが高率である。本研究の目的は、TAMの発症と芽球の増殖メカニズムを明らかにすることである。
TAMとML-DSのほぼ全例に、巨核球分化に必須の転写因子GATA1の、N末端を欠くタンパク(GATA1s)の発現を招く遺伝子変異が検出される。本研究では、TAMの細胞増殖を促進する、受容体型チロシンキナーゼKIT遺伝子の発現制御機構の研究を行い、GATA1sによるゲノムの高次構造変化がKIT遺伝子の発現増加をもたらすことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TAMにおけるKIT遺伝子の過剰発現が、なぜ、どのようにして引き起こされているのか発現制御メカニズムを解明することは、TAMの発症機構を解明する上で重要であり、KITを標的とした治療法を実用化する際に必要な知見である。また、本来転写活性化因子であるGATA1がKITの転写を抑制し、逆に転写活性化領域であるN末端を欠くGATA1sがGATA1にとって代わることでKITの発現が増加する、という興味深い現象に対してKIT遺伝子の発現制御モデルを示すことができ、基礎的な分子生物学の分野にも貢献しうる研究成果が得られたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Approximately 10% of newborns with Down Syndrome develop transient abnormal myelopoiesis (TAM). TAM has a high rate of early mortality and a high risk of progression to acute megakaryoblastic leukemia (ML-DS). The purpose of this study is to elucidate the molecular pathogenesis and the mechanism of cell proliferation of TAM.

In almost of all TAM and ML-DS, mutations of the GATA1 gene, essential for megakaryocytic differentiation are detected. These mutations lead to the expression of proteins lacking the N-terminus (GATA1s). In this study, we investigated the expression regulation mechanism of the receptor tyrosine kinase KIT gene that promotes cell proliferation of blast cells of TAM. We revealed that GATA1s-induced conformational changes in the genome lead to increased expression of the KIT gene.

研究分野：小児血液学

キーワード：転写因子 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ダウン症は、ヒトで最も多い染色体異常症であり、21番染色体が3本あること(Trisomy21)に起因する一連の障害や症状の総称である。約10%ものダウン症新生児が一過性に未熟な巨核球が異常増殖する血液疾患(TAM)を発症する。大半は自然寛解するものの、治療介入によっても寛解の困難な重症例も多く、TAMの早期死亡率は約20%と高い状況にある。さらにTAMの約20%は、TAM期の芽球に由来する巨核芽球性白血病(ML-DS)を発症する。

(2) TAMとML-DSの大きな特徴は、巨核球分化に必須の転写因子*GATA1*遺伝子の突然変異が、ほぼ全例に検出されるということである(引用文献1)。*GATA1*変異は完全長の*GATA1*タンパク産生を障害し、代わってN末端1-83アミノ酸を欠く短縮型*GATA1*(*GATA1s*)タンパクの発現を招く。*GATA1s*は完全長型*GATA1*と比較して、細胞増殖を制御できない性質(質的異常)を有している。

(3) TAMとML-DS症例の網羅的遺伝子変異解析(引用文献2)では、TAMにおいてはTrisomy21と*GATA1*変異以外の異常は稀であった。TAMの発症に関わる*GATA1s*の機能を解明するため、*GATA1*変異のない巨核球系細胞株K562に*GATA1*遺伝子のゲノム編集を行ない、*GATA1*に代わって*GATA1s*が発現する細胞株(*GATA1s*細胞株)を作成した。すると、この細胞株では、細胞増殖を促進する受容体型チロシンキナーゼ*KIT*遺伝子の発現が、親株と比較して約2-20倍増加していることが判明した。一方、TAMとML-DSの芽球は、*KIT*を高発現し、そのリガンドであるSCFに反応して増殖する(引用文献3)。このことは、*KIT*を標的とした治療法がTAMやML-DSに有効であるとの可能性を示唆している。

2. 研究の目的

TAMは早期死亡率とML-DSへの進行リスクが高率である。効果的かつ副作用の少ないTAMの新規治療法の開発とML-DS発症の予防を目指し、TAMの発症と芽球の増殖メカニズムを明らかにするのが本研究の目的である。上記の背景から、*GATA1*の*KIT*遺伝子発現制御に焦点をあて研究を行なうこととした。

3. 研究の方法

(1) これまでの*GATA1s*細胞株と親株のクロマチン免疫沈降-シーケンス(ChIP-seq)により、*KIT*遺伝子の転写開始点上流(-115k、-109k、-87k)に*GATA1*、*GATA1s*の結合位置を同定しているが、TAM検体でも*GATA1s*のChIP-seqを行い、*GATA1s*のゲノム上の標的がTAM芽球と共通していることを確認する。

(2) *KIT*遺伝子上流の*GATA*因子結合領域が真に*KIT*遺伝子制御に重要であるのかを検討するため、ゲノム編集と相同組み換え技術により、*GATA*因子の結合配列に変異を導入して*KIT*発現量をモニターする。

(3) *KIT*遺伝子上流の*GATA*因子結合領域は、エンハンサーあるいはサイレンサーとして、クロマチンのループ形成によりプロモーター領域などと相互作用することで、遺伝子発現のonやoffの制御に関与していると考えられる。そこで、親株と*GATA1s*細胞株とで*KIT*遺伝子の高次構造を検証し、*GATA1*と*GATA1s*の役割を比較する。

4. 研究成果

(1) TAM芽球における*GATA1s*の*KIT*遺伝子に対する結合部位の解析

凍結保存しているTAM検体を、先に確立した方法(引用文献3)で短期間培養し、*GATA1*のChIP-seqを実施した。しかし、ゲノムへの結合シグナルは全体的に弱く、*KIT*遺伝子領域についてもはっきりしない状態であった。方法の改良が必要であり、対応策を検討中である。しかしながら、代替策としてML-DS由来細胞株2株(CMK11-5、KPAM1)を用いて*GATA1s*のChIP-seqを実施し、K562と同様に*KIT* -115k、-109k、-87kへの*GATA1*の結合を確認した。従って、K562 *GATA1s*細胞株における*GATA1s*の標的位置がTAMとも共通している可能性が高いと考えられる。

(2) *KIT* 遺伝子上流の GATA 因子結合領域の重要性について

KIT 遺伝子上流の GATA 因子結合部位のエンハンサー/サイレンサーアッセイで、最も転写活性化能の大きかった -87k 領域に注目して研究することとした。-87k 領域の GATA 因子結合配列の、*KIT* 発現制御への影響を調べるため、K562 親株において CRISPR/Cas9 システムに相同組換え技術を加えたゲノム編集で、GATA 因子結合モチーフである GATA を GAGC に置換したクローンを作成した。*KIT* 発現量は、K562 親株ではもともと低いのだが、さらに検出限界以下に低下した。すなわち、-87k 領域の GATA 因子結合配列は *KIT* 発現制御に関与しており、転写の活性化と GATA1 による抑制の両面の機能があることを示唆した。

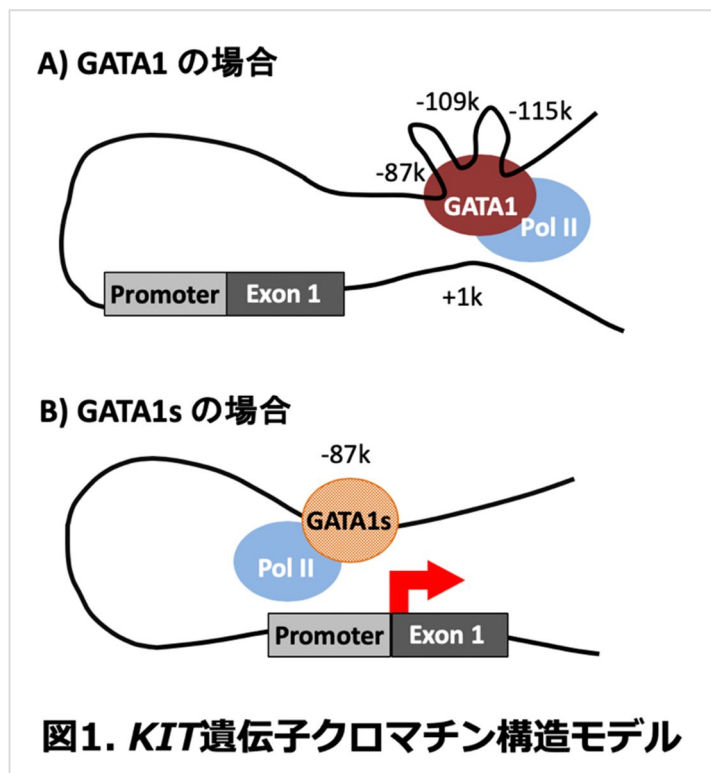
(3) *KIT* 遺伝子のクロマチン高次構造に対する GATA1、GATA1s の役割

本質的には発現活性化因子である GATA1 が *KIT* 遺伝子発現を抑制する機構として、GATA1 が *KIT* プロモーターに転写抑制因子をリクルートする *KIT* のプロモーター以外の領域を捕捉している、*KIT* のプロモーターを活性化しないという可能性が考えられた。

Yuら(引用文献4)は、マウス Gata1 が転写因子 Gfi-1b と相互作用して標的遺伝子の発現を抑制、また、ポリコーン群をリクルートして転写抑制型 H3K27me3 ヒストン修飾をもたらす、遺伝子発現を抑制状態に導くというモデルを示している。ヒストン修飾状況について、K562 親株と GATA1s 細胞株の ChIP-seq にて調べたが、親株における *KIT* 遺伝子の H3K27me3 修飾は弱く、また、GATA1s 細胞株と大きな違いもみられなかった。一方、プロモーター領域でよくみられる転写活性化修飾 H3K4me3 は親株、GATA1s 細胞株共に、*KIT* プロモーター領域から約 2kb 下流にかけて検出された。エンハンサー領域でよくみられる転写活性化修飾 H3K4me1 は、親株、GATA1s 細胞株共に、*KIT* 遺伝子上流 (-115k、-109k、-87k) で確認された。これらの結果から、*KIT* 遺伝子は親株、GATA1s 細胞株共に活性化状況にあることがわかった。

親株においても *KIT* 遺伝子自体は活性化状況にあり、かつ、*KIT* 遺伝子上流にサイレンサー活性は検出されていない。それでも親株で *KIT* 発現が抑制されているのは、ゲノムの高次構造によるものと推測された。そこで、転写活性化能が最も高い -87k 領域に注目して、ゲノム上の 2 点間の三次元的な近接関係を検出する Chromosome conformation capture (3C) を改良した ligated proximity assay (引用文献5) を実施した。ENCODE プロジェクト 2012 データによれば、*KIT* 遺伝子上流を除き、転写因子は *KIT* 遺伝子上にあまり結合しておらず、プロモーターから exon1 の領域と +1k 領域の 2 箇所に結合が集中している。そのうち、プロモーターから exon1 の領域に転写因子が多く結合しているのは、*KIT* を発現している H1-hESC 細胞であり、一方、発現の高くない細胞株の K562 では +1k 領域に転写因子がより多く結合していた。これらことを考慮し、+1k 領域を実験に加えることとした。

結果より、K562 親株では *KIT* -87k 領域と -115k、-109k、exon1、+1k 領域と近接性が検出された。このうち、+1k 領域との近接性が最も高かった。一方、GATA1s 細胞株では *KIT* -87k 領域は exon1 とのみ近接性が検出された。従って、GATA1 の存在下では、*KIT* 遺伝子上流のエンハンサー領域 -105k、-109k、-87k は +1k 領域に集まることで *KIT* の転写が起こりにくくなり、対して GATA1s の場合は、-87k



エンハンサー領域がexon1に近接し、*KIT*遺伝子の転写活性化につながることを示唆された。結果から予想される*KIT*遺伝子の立体構造モデルを図1に示す。

*KIT*遺伝子の転写制御については、ヒトにおいてはゲノムの高次構造からの研究は報告例がほとんどない。マウスでは*Kit*の発現制御に関してGata1とGata2に注目した研究が行われていたが(引用文献6)、Gata1sについて検証した研究はない。今回、マウスとヒトとはGATA1によるゲノム構造形成に違いがあることもわかった。*KIT*遺伝子の転写を抑制する完全長GATA1と、抑制できないGATA1sとの機能の差異は、GATA1のN末端領域によるものと思われる。GATA1とどのような因子が相互作用をすることでこのようなメカニズムが機能しているか解明できれば、TAM芽球の増殖をコントロールする治療薬等の開発に役立つものと思われる。

<引用文献>

Xu G, Nagano M, Kanazaki R et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down Syndrome. *Blood*. 102(8), 2960-2968.

Yoshida K, Toki T, Okuno Y et al. The landscape of somatic mutations in Down Syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1293-9.

Toki T, Kanazaki R, Adashi S et al. The key role of stem cell factor/*KIT* signaling in the proliferation of blast cells from Down Syndrome-related leukemia. *Leukemia*. 2009 Jan;23(1):95-103.

Yu M, Riva L, Xie H et al. Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell*. 2009 Nov 25;36(4):682-95.

Fujita T, Yuno M, Suzuki Y et al. Identification of physical interactions between genomic regions by enChIP-Seq. *Genes Cells*. 2017 Jun;22(6):506-520.

Jing H, Vakoc CR, Ying L et al. Exchange of GATA factors mediates transitions in looped chromatin organization at a developmentally regulated gene locus. *Mol Cell*. 2008 Feb 1;29(2):232-42.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 金崎 里香	4. 巻 34
2. 論文標題 TAMおよびDS-AMKL発症の分子機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 642-647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 金崎 里香	4. 巻 34
2. 論文標題 ダウン症関連巨核芽球性白血病発症の分子機構	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1344-1350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 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, 小林 明恵, 伊藤 悦朗
2. 発表標題 ダウン症関連骨髄疾患におけるGATA1によるKIT遺伝子発現の制御機構
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

〔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
連携研究者	伊藤 悦朗 (Ito Etsuro) (20168339)	弘前大学・医学研究科・教授 (11101)	

