

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17358

研究課題名(和文) ダウン症に合併する白血病モデルを用いた発がんの原因となる遺伝子変異獲得機序の解明

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of mutation acquisition to induce tumorigenesis using Down syndrome associated leukemia model

研究代表者

西中 瑤子(Nishinaka-Arai, Yoko)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80789644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多段階発がん説に則って説明可能な疾患モデルを用いて、発がんを誘導する遺伝子変異獲得機序を解析した。

具体的な実験としては、disomy21(d21)とtrisomy21(t21)の多能性幹細胞ペアを用いて分化段階ごとに比較した。

その結果、変異獲得及び、DNAダメージ修復機構が働く過程においては、初期造血前駆細胞の分化段階まででは、d21とt21細胞間に有意な差は認められなかった。一方で細胞増殖能は、未分化な状態では有意差は認められなかったが、血液前駆細胞分画においてt21細胞で細胞周期が亢進している傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは日本人の死因第1位として知られており、その発生・進展は、ゲノム変異の蓄積によるクローン進化を基本原理とする、いわゆる多段階発がん説によって説明される。本研究は、多段階発がんのモデルとして知られるダウン症に合併する白血病に着目し、疾患特異的iPS細胞を用いて、その発症メカニズムを解析したものである。特色としては、細胞が遺伝子変異を獲得する流れを3段階に分けて定義することで、解析を可能としたことにあり、この定義は今回の対象疾患に留まらず、他のがん解析にも応用出来るものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gene mutation acquisition mechanism which induced tumorigenesis was analyzed using the disease model applicable to the multi-step tumorigenesis theory.

We performed experiments that pluripotent stem cell pairs of disomy 21 (d21) and trisomy 21 (t21) clones were used and compared at each hematopoietic differentiation stage.

As a result, in the process of mutation acquisition and DNA damage repair, no significant difference was observed between d21 and t21 clones until early hematopoietic progenitor cells. On the other hand, the cell proliferation activity was not significantly different at the undifferentiated stage, but in hematopoietic progenitor cell stage, there was a tendency for increased cell cycle in t21 clones.

研究分野：小児血液学

キーワード：一過性骨髄異常増殖症 発がん

1. 研究開始当初の背景

がんの発生・進展は、ゲノム変異の蓄積によるクローン進化を基本原理とする、いわゆる多段階発がん説によって説明される。白血病においても、次世代シーケンス(NGS)技術を始めとする近年の解析手法の発展により、一患者の臨床経過に沿ってクローンが複数の異なる遺伝子変異を獲得し多様な細胞集団へ変化するさまを俯瞰することが可能となった。しかし、それら変異獲得のメカニズムには、いまだ不明な点が多く残されている。特に、個々の変異が「なぜ、どのように獲得されたのか」については、これまで詳細な機構は殆ど明らかにされていない。

一過性骨髄異常増殖症(TAM)は、近年増加している、ダウン症候群患児の生下時に合併する前白血病疾患である。TAM患者のうち約60%は自然寛解するが、約20%は死亡し、残りの約20%は一度寛解を経た後、さらに1-2年後に追加変異を獲得し、急性巨核芽球性白血病(AMKL)へと進展することが知られている。この trisomy21 を背景に *GATA1* 変異が生じた際に発症する前がん状態を経て、さらなる追加の遺伝子変異を獲得した際に真のがんへと病態進展する経緯は、多段階発がんモデルと考えられている。極めて興味深いことは、TAMでは全てのプラスト細胞において *GATA1* 変異陽性であり、他の変異はほとんど見られないということである。すなわち、このモデルにおいて trisomy21 に続く 2nd hit 変異はもっぱらプラスト細胞の *GATA1* 遺伝子のみを選択的に獲得される。一般にダウン症児は健常児に比べ悪性腫瘍合併率の少ないこと、一方で TAM はダウン症児のみに発症する疾患であることも勘案すると、1st hit としての trisomy21 を有する胎生期造血前駆細胞でのみ、かつゲノム上の *GATA1* 遺伝子領域だけに選択的に変異を獲得させる内在性機構の存在が強く示唆される。このようにターゲット遺伝子が明確であることから、TAM は多段階発がんにおけるクローン進化の際におこる細胞内分子機構の解明に最適なモデルのひとつであると考えられる。

iPS 細胞は、無限の増殖能と多様な分化能を有する細胞である。我々の研究室はこれまで一貫して造血細胞分化系の構築、およびそれらを応用した疾患解析に携わっている。特に、iPS 細胞を用いた分化培養系の特長として、iPS 細胞が胚発生の過程を再現する様式で、中胚葉前駆細胞を経て胎生肝造血期頃までの、即ち出生前の体内で見られる造血過程を再現できる点が挙げられる。上述のように TAM は胎生肝造血期の trisomy21 造血前駆細胞が *GATA1* 変異を獲得することによって発生する疾患であり、その時期の造血を再現する iPS 細胞由来造血分化系は、TAM の病態解析へ応用するのに適した培養系であり、我々はこれまでに、この培養系と疾患 iPS 細胞を用いた TAM モデルを構築し、TAM 発症の責任細胞分画を同定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*GATA1* 変異が trisomy21 の造血前駆細胞のどの分画の細胞で、どのような分子機構に基づいて獲得されるのか、という点を疾患特異的 iPS 細胞由来の造血系を用いて詳細に解明することである。特に TAM 発症に関連する遺伝子変異は trisomy21 及び特定の *GATA1* 変異ホットスポットに集中して見られるため、アイソジェニックな disomy21 と trisomy21 の

iPS 細胞を用いることで、それらの *GATA1* 変異がなぜ disomy21 でなく trisomy21 細胞でのみ見られるのか(あるいは trisomy21 細胞で *GATA1* 変異を獲得した造血前駆細胞に生存バイアスがかかるのか)について検討を行う。最終的には、これらの解析を通じて、「がん細胞のクローン進化過程において「特定の先行変異が次の部位特異的遺伝子変異を誘導する機序」を明らかにすることで、多段階発がんとしての白血病発症に繋がる遺伝子変異の獲得のメカニズムを解明することを目標としている。

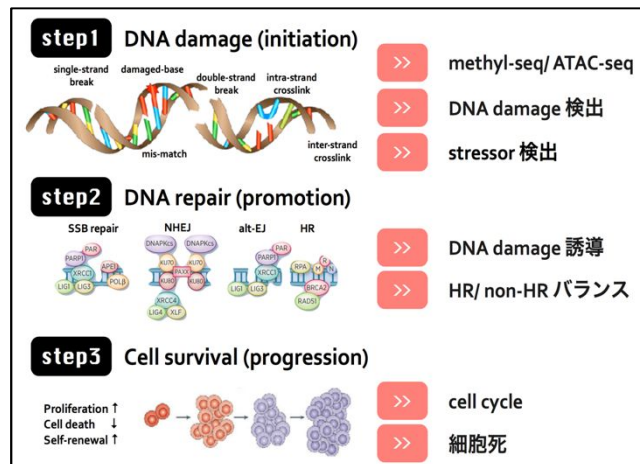
3. 研究の方法

発がんに関わる遺伝子変異獲得過程を、step1: initiation、step2: promotion、step3: progression と定義し、以下の通り解析・検討を行った。

step1 の DNA ダメージにより変異を獲得する過程において、disomy21 細胞と比較して、trisomy21 細胞で *GATA1* 特異的、また造血前駆細胞及び分化段階特異的な DNA ダメージの増加があるかどうかを検討するため、disomy21 細胞と比較して、trisomy21 細胞で分化段階特異的に DNA ダメージの増加が見られるかどうかを解析した。評価の方法としては、DNA ダメージ応答関連分子(γ-H2AX)の比較及び、メチル化状態の比較を行った。次に step2 の DNA ダメージ修復過程に着目し、クロマチン部位、リネージ及び分化段階毎に DNA ダメージを故意に誘導したときの DNA ダメージ応答を disomy21 と

trisomy21 細胞で比較した。さらに、step3 の変異獲得細胞の生存過程においては、細胞周期の亢進や細胞死の抑制などに変化が見られるかを比較した。

また、*GATA1* 変異タンパクが血球分化に及ぼす影響を分化段階及びリネージ毎に検討することで、*GATA1* 遺伝子変異獲得の分化段階をより限定的な分画へと絞り込むことも行った。



4. 研究成果

全ての解析で、アイソジェニックな disomy21 と trisomy21 の多能性幹細胞ペアを用いて血球分化を行い、未分化、血球血管共通前駆細胞、初期造血前駆細胞の3ポイントで分化段階ごとに各種項目を比較評価した。

まず、step1 (initiation)の変異を獲得する過程について、DNA ダメージ応答関連分子の定量比較及び、*GATA1* 遺伝子関連領域のメチル化状態の比較を行ったが、初期造血前駆細胞の分化段階までにおいては、有意な差は認められなかった。次に、step2 (promotion)の DNA ダメージ修復機構の評価を行うために、細胞に故意に DNA ダメージを誘導した時の修復系について検討した。結果、初期造血前駆細胞の分化段階まででは、disomy21 と trisomy21 の細胞に DNA ダ

メージ量及び、DNA ダメージ修復機構の働きに有意な差は認められなかった。最後に、 step3 (progression)として、細胞増殖能の比較を行った。結果、未分化な状態では有意差は認められなかったが、血液前駆細胞分画において trisomy21 細胞で細胞周期が亢進している傾向が見られた。そこで、比較検討を行う分化ステージの見直しを行った。初期造血前駆細胞から、我々が同定した TAM の表現型を誘導している血液前駆細胞分画までの間の段階において、GATA1 変異タンパクが血球分化に及ぼす影響を時期別、系統別に検討した。この結果から GATA1 遺伝子変異獲得の分化段階をより限定的に絞り込むことが出来、論文として報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishinaka-Arai Y, Niwa A, Matsuo S, Kazuki Y, Yakura Y, Hiroma T, Toki T, Sakuma T, Yamamoto T, Ito E, Oshimura M, Nakahata T, Saito MK.	4. 巻 106(2)
2. 論文標題 Down syndrome-related transient abnormal myelopoiesis is attributed to a specific erythro-megakaryocytic subpopulation with GATA1 mutation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 635-640
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2019.242693	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo S, Nishinaka-Arai Y, Kazuki Y, Oshimura M, Nakahata T, Niwa A, Saito MK.	4. 巻 16(3)
2. 論文標題 Pluripotent stem cell model of early hematopoiesis in Down syndrome reveals quantitative effects of short-form GATA1 protein on lineage specification.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0247595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0247595	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoko Nishinaka-Arai, Akira Niwa, Shiori Matsuo, Yasuhiro Kazuki, Yuwna Yakura, Takehiro Hiroma, Tsutomu Toki, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Etsuro Ito, Mitsuo Oshimura, Tatsutoshi Nakahata, and Megumu K. Saito
2. 発表標題 Down syndrome-related transient abnormal myelopoiesis is derived from a newly identified hematopoietic subpopulation
3. 学会等名 ISSCR 2019 annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoko Nishinaka-Arai, Akira Niwa, Shiori Matsuo, Yasuhiro Kazuki, Yuwna Yakura, Takehiro Hiroma, Tsutomu Toki, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Etsuro Ito, Mitsuo Oshimura, Tatsutoshi Nakahata, and Megumu K. Saito
2. 発表標題 hPSC model reveals impact of GATA1 mutation on a newly defined subpopulation leading to TAM
3. 学会等名 第81回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------