

機関番号：11101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390289

研究課題名 (和文) GATA1 遺伝子変異による一過性白血病の分子機構の解明と分子標的療法の開発

研究課題名 (英文) The molecular mechanisms of transient leukemia by GATA1 mutation and development of molecular target therapy

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、*GATA1* の変異による一過性白血病の仕組みを分子レベルで明らかにし分子標的療法を開発するために、以下の研究を進めた。

1. SCF/KITシグナル伝達系が一過性白血病細胞の生存に重要な働きをしていることを明らかにした。
2. *GATA1* 遺伝子変異は一過性白血病細胞の GATA1s タンパクの発現量に影響し、GATA1s が低発現であれば芽球数が少なくなるものの、白血病への移行の危険度が高くなることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We performed this study to understand the role of *GATA1* mutations in the development of transient leukemia and develop the molecular target therapy, and found the following results.

1. We found the essential role of SCF/KIT signaling in the proliferation of transient leukemia in Down syndrome.
2. We showed that the mutations in the *GATA1* genes affect the expression levels of GATA1s protein. Furthermore, GATA1s low mutations were significantly associated with a risk of progression to ML-DS and lower WBC counts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

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：GATA1、一過性白血病、TAM、ダウン症候群、分子標的療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 21番染色体の過剰が原因である Down 症は最も多い染色体異常症で、約 10% の症例に TAM という一過性白血病を発症する。TAM は自然寛解するが、約 20% の症例は生後 4 年以内に急性巨核球性白血病 (acute megakaryocytic leukemia (AMKL)) を発症する。TAM の早期死亡は約 20% と AMKL よりむしろ高いが、重症 TAM に対する有効な治療法は開発されていない。

(2) 我々は、赤血球・巨核球分化に重要な役割を果たす GATA1 転写因子の遺伝子変異が Down 症の TAM 発症の段階で起こっていることを世界に先駆けて発見した (Xu G et al. Blood 2003)。変異の結果、TAM や AMKL 細胞では、正常の完全長 GATA1 は発現せず、N 末端の 83 アミノ酸が欠けた変異 GATA1 (GATA1s) のみが発現していた。さらに、我々は、一卵性双生児の TAM の症例が同一の GATA1 遺伝子異常を持つことを発見し、GATA1 遺伝子の変異が胎児期に既に生じていることを世界で初めて証明した (Shimada A et al. Blood 2004)。

(3) 一方、多くの研究結果から、白血病の発症には、増殖を刺激し、Apoptosis を抑制するシグナル伝達系の分子の活性化変異 (class I 変異) と分化を抑制する転写因子の機能喪失変異 (class II 変異) が少なくとも必要であることが提唱されている (Speck and Gilliland. Nat Rev Cancer 2002)。我々は JAK3 の活性化変異を DS-AMKL 細胞株で見出した。これは、最近の Walters らの報告と一致していた (Cancer Cell 2006)。しかし、予想外な事に TAM でも JAK3 活性化変異が認められた。しかも、JAK3 変異の頻度は、TAM でも AMKL でも約 10% であったため、この変異は TAM から AMKL に進展する時に起る変異ではないことが明らかとなった (Sato et al. 投稿中)。これは、TAM の発症段階で JAK3 変異などの class I 変異と class II 変異 (GATA1 変異) の両方が必要であることを示唆している。しかし、約 90% の TAM 症例では class I 変異はまだ不明であり、TAM から AMKL に進展する過程で起る遺伝子変異もまったく未知のままである。

以上の学術的背景から、class I 変異と class II 変異による TAM の発症機構を解明

し、両者を標的とした分子標的療法を開発する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請期間の 3 年以内に TAM の発症機構と分子病態を解明し、重症 TAM に対する分子標的療法を開発するための基礎研究を行うことである。具体的には以下の 3 点に焦点を絞って研究を行なう。

1. TAM の発症機序と病態を分子レベルで明らかにする。

未知の class I 変異を同定し、class II 変異 (GATA1 変異) による TAM 発症の分子機構を明らかにする。既に全国から 100 例以上の TAM の臨床検体が集積している。Class I 変異については JAK/STAT 系の分子を中心に網羅的に遺伝子変異の解析を行なう。Class II 変異 (GATA1 変異) による TAM 発症の分子機構の解析は、GATA1 トランスジェーンを conditional に発現誘導することが可能な新規の DS-AMKL 細胞株を用いる。

2. TAM の動物モデルを作製する。

TAM の遺伝子異常をもつトランスジェニックマウスを作製し、表現型を解析する。

3. 原因遺伝子産物を標的とした分子標的療法を開発する。

作製した TAM の細胞モデルと動物モデルを用いて、特異的阻害分子 (JAK 阻害剤や特異的 GATA 阻害剤など) を用いた分子標的療法を開発する。

3. 研究の方法

1. TAM の発症機序と病態の解明。

1) GATA1 変異 : GATA1 は転写活性化因子として機能するばかりではなく、標的遺伝子によっては転写を負に制御しており、GATA1s は GATA1 に比して転写を抑制する能力も低下している。これらの遺伝子発現の異常が TAM の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。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 DNA マイクロアレイや real time PCR 法を用いて同定し、分子標的療法の標的となる分子を検索する。また、GATA1s による TAM 発症の分子機構を明らかにするた

めに、GATA1 の N 末端に結合する未知のパートナー (X) を InterPlay Mammalian Tap System と TOF-mass spectrometry 法を用いて同定する。

- 2) Class I 変異: 未知の class I 変異を同定する。我々は、*JAK3* 変異が存在しない新規の DS-AMKL 細胞株や TAM 細胞でも、pan JAK inhibitor で増殖が完全に抑制されることを見出した。さらに、ほとんどの TAM 細胞では恒常的 STAT3 のリン酸化が認められた。これらの結果は、TAM の発症には JAK3 以外の JAK/STAT 系の分子の異常が存在することが強く示唆しているため、TAM の臨床検体を用いて JAK/STAT 系分子の遺伝子変異解析を行なう。
2. TAM の動物モデルの作製。
新規の遺伝子異常をもつ細胞株やトランスジェニックマウスを作製し、表現型を解析する。まずは、我々が見出した *JAK3* 変異を持つ細胞株やトランスジェニックマウスを作製する。
3. 原因遺伝子産物を標的とした分子標的療法の開発。
作製した TAM の細胞モデルと動物モデルを用いて、特異的阻害分子 (JAK 阻害剤や特異的 GATA 阻害剤など) の *in vitro* および *in vivo* での効果を解析する。

4. 研究成果

本研究は、GATA1 の変異による一過性白血病の仕組みを分子レベルで明らかにし分子標的療法を開発するために、以下の研究を進めた。

1. 変異GATA-1によるKITの発現制御: 我々は、real time PCRを用いて、13例のTAM、5例のDS-AMKL、17例のAMLおよび5例のALL臨床検体でのKITの発現を検討した。その結果、TAMでKITが均一に高発現していることを見出した。また、KITのリガンドであるSCF存在下に液体培養で解析したところ、5例のTAM細胞全てがSCFに反応して著しく増殖した。チロシンキナーゼ阻害剤imatinibでKITの活性を抑制すると、TAMの増殖が完全に抑制された。次に、KITの下流のシグナル伝達系を明らかにするために、SCF依存性DS-AMKL細胞を用いて解析を加えた。SCFを培養液から除くとアポトーシスが誘導された。SCF添加により、RAS/MAPKとPI3K/AKTシグナル伝達系が活性化し、アポトーシスに促進的に働くBIMの抑制とアポトーシスを抑制するMCL1 (両者ともBCL2ファミリー・メン

バー) の誘導が引き起こされた。以上の結果より、SCF/KITシグナル伝達系はTAMやDS-AMKL細胞の生存に重要な働きをしていることが示唆された。

2. TAM の分子標的療法を開発するために、我々が TAM と DS-AMKL で見出した *JAK3* 変異をレトロウイルスベクターを用いて Ba/F3 細胞に導入し、*JAK3* 特異的な阻害剤 (*JAK3* inhibitor I など) の効果を解析した。また、*JAK3* 変異をもつ DS-AMKL 細胞株 MGS を用いて同様の解析を行なった。*JAK3* 阻害剤 (*JAK3* inhibitor I および II) により、MGS 細胞および変異 *JAK3* を発現させた Ba/F3 細胞の増殖が著しく抑制された。
3. *GATA1* 変異と *GATA1s* 蛋白の発現量の関係を明らかにするために、転写産物から *GATA1* 変異を以下の 4 種類 ((a) 最初のメチオニンが失われる Loss of 1st Met タイプ、(b) premature termination codon が導入される PTC タイプ (これは PTC が 2 番目のメチオニンより前に入る type 1 と後に導入される type 2 に分類)、(c) エクソン・イントロンのバンダリーの変異のために exon 2 が splicing out されてしまう splicing error タイプ) に分類した。次に、それぞれの cDNA および minigene 発現ベクターを作成し、遺伝子導入実験で *GATA1s* 発現量を解析した。その結果、*GATA1* 変異のタイプから *GATA1s* タンパク発現量を推定できることが明らかになった。
4. そこで、*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、2003年~2008年の間に遺伝子解析を行い、*GATA1* 変異を認めた66例について、ジェノタイプ・フェノタイプの解析を行った。その結果、*GATA1s* low 群では診断時の末梢血白血球数は少ないが、白血病を発症するリスクが有意に高いことが明らかになった。以上の結果より、*GATA1* 遺伝子の変異は *GATA1s* タンパクの発現量に影響し、*GATA1s* の高発現は TAM 芽球の増殖を亢進させ、逆に *GATA1s* が低発現であれば、芽球数が少なくなるものの、白血病への移行の危険度が高くなることが明らかになった。*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可能性がある。

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 18 件)

- ①. Kamio T, Ito E, Ohara A, Kosaka Y, Tsuchida M, Yagasaki H, Mugishima H, Yabe H, Morimoto A, Ohga S, Muramatsu H, Hama A, Kaneko T, Nagasawa M, Kikuta A, Osugi Y, Bessho F, Nakahata T, Tsukimoto I, Kojima S. Relapse of aplastic anemia in children after immunosuppressive therapy: a report from the Japan Childhood Aplastic Anemia Study Group. **Haematologica**. 2011;96(6):814-819.
- ②. Kudo K, Terui K, Sasaki S, MD, Kamio T, Sato T, Ito E. CD7-positive acute myelomonocytic leukemia with trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in two adolescents. **Leuk Res**. 2011. (in press)
- ③. Ito E, Konno Y, Toki T, Terui K. Molecular pathogenesis in Diamond-Blackfan anemia (review). **Int J Hematol**. 2010;92(3):413-8.
- ④. Taketani T, Taki T, Nakamura T, Kobayashi Y, Ito E, Fukuda S, Yamaguchi S, Hayashi Y. High frequencies of simultaneous *FLT3*-ITD, *WT1*, and *KIT* mutations in hematologic malignancies with *NUP98*-fusion genes. **Leukemia** 2010;24(11):1975-7.
- ⑤. Kanezaki R, Toki T, Terui K, Xu G, Wang RN, Shimada A, Hama A, Kanegane H, Kawakami K, Endo M, Hasegawa D, Kogawa K, Adachi S, Ikeda Y, Iwamoto S, Taga T, Kosaka Y, Kojima S, Hayashi Y, Ito E. Down syndrome and *GATA1* mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. **Blood** 2010;116(22):4631-8.
- ⑥. Terui K, Takahashi Y, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E. Guillain-Barre Syndrome mimicking acute methotrexate-associated encephalopathy in an adolescent patient with lymphoblastic lymphoma. **J Pediatr Hematol Oncol**. 2010;32(8):615-6.
- ⑦. Kudo K, Terui K, MD, 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**. 2011;46(2):310-1.
- ⑧. 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** 2010;29(25):3723-31.
- ⑨. Aikawa Y, Katsumoto T, Zhang P, Shima H, Shino M, Terui K, Ito E, Ohno H, Stanley ER, Singh H, Tenen DG and Kitabayashi I. PU.1-mediated upregulation of *M-CSFR* is critical for MOZ-leukemia stem cell potential. **Nature Medicine** 2010;16(5):580-585.
- ⑩. 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** 2010;95(8): 1293-9.
- ⑪. 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**

2010;24(5):1090-1092.

- ⑫. Oda M, Isoyama K, Ito E, Inoue M, Tsuchida M, Kigasawa H, Kato K, Kato S. Survival after cord blood transplantation from unrelated donor as a second hematopoietic stem cell transplantation for recurrent pediatric acute myeloid leukemia. **Int J Hematol.** 2009;89:374-82.
- ⑬. Iida A, Inagaki K, Miyazaki A, Yonemori F, Ito E, Igarashi K. Bach1 deficiency ameliorates hepatic injury in a mouse model. **Tohoku J Exp Med.** 2009; 217: 223-229.
- ⑭. Minakawa S, Takeda H, Nakano H, Tono C, Takahashi Y, Sasaki S, Terui K, Ito E, Sawamura D. Successful umbilical cord blood transplantation for intractable eczematous eruption in hypohidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. **Clin Exp Dermatol.** 2009;34(7):e441-2.
- ⑮. Kitamura H, Kaneko T, Nakano H, Terui K, Ito E, Sawamura D. Juvenile myelomonocytic leukemia presenting multiple painful erythematous lesions diagnosed as Sweet's syndrome. **J Dermatol.** 2008;35:368-370.
- ⑯. Toki T, Kanezaki R, Adachi S, Fujino H, Xu G, Sato T, Suzuki K, Tauchi H, Endo M and Ito E. The key role of stem cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. **Leukemia** 2009; 23:95-103.
- ⑰. Terui K, Sato T, Sasaki S, Kudo K, Kamio T, Ito E. 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.** 2008; 93: 1591-1593.
- ⑱. Sato T, Toki T, Kanezaki R, Xu G, Terui K, Kanegane H, Miura M, Adachi S, Migita M,

Morinaga S, Nakano T, Endo M, Kojima S, Kiyoi H, Mano H, Ito E. Functional analysis of JAK3 mutations in transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. **Brit J Haematol.** 2008; 141: 681-688.

[学会発表] (計 4 件)

- ①. 伊藤悦朗、照井君典、土岐力. TAM の分子診断 (シンポジウム: 小児血液疾患の分子診断の進歩とその臨床応用). 第 113 回日本小児科学会学術集会、2010 年 4 月 23~25 日、盛岡市.
- ②. Etsuro Ito, Tsutomu Toki. Transient abnormal myelopoiesis and acute myeloid leukemia in Down syndrome (血液プレジデンシャルシンポジウム). 第 52 回日本小児血液学会総会、2010 年 12 月 17~19 日、大阪国際会議場、大阪市.
- ③. Etsuro Ito, Rika Kanezaki, Kiminori Terui, and RuNan Wang, Tsutomu Toki. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes affect the phenotype of the disorder. 5th International Symposium on GATA factors (9th Japanese Biochemical Society (JBS) Bio-Frontier Symposium 2010). Gonryo-Hall, Sendai, Nov. 17-19, 2010.
- ④. 伊藤悦朗. Ribosomal protein と赤血球産生障害 (Diamond-Blackfan anemia 群と 5q 欠失症候群) (教育講演). 第 71 回日本血液学会. 10 月 23-25 日, 2009. 京都国際会議場、京都.

[図書] (計 0 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 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

http://www.a-onclick.com/hirodai_syonika/

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 (TSUTOMU TOKI)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50195731

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

