

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08201

研究課題名(和文) タンデム重複変異RUNX1の白血病発症における機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the tandem duplication mutation RUNX1 in leukemogenesis

研究代表者

土岐 力 (Toki, Tsutomu)

弘前大学・医学研究科・講師

研究者番号：50195731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：トリソミー21が原因であるダウン症では、新生児の5-10%で一過性骨髄異常増殖症(TAM)という前白血病を発症する。その多くは自然寛解するが、約20%は4年以内に急性骨髄急性白血病(ML-DS)へと進展する。このML-DSへの進展に際して、RUNX1の部分的タンデム重複変異(RUNX1-PTD)が約20%の症例でみとめられた。本研究では、この新規変異の分子生物学的機能を検索した。その結果、野生型分子と比較して、転写活性化能と細胞内局在に異常が見られた。ノックインマウスを用いた検索では、既報のRUNX1変異とは異なり、早期に白血病発症を引き起こすことを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

白血病の発症機構を探索する際、発症以前の状態を観察することは疾患特性から困難を要する。しかしML-DSの場合、ダウン症を背景にTAMからML-DSへの進展は、トリソミー21とGATA1変異に加えて、本研究で焦点を当てたRUNX1-PTD変異などの付加が原因になっていることを示した。このような発見は、白血病の多段階発症のメカニズムを明らかにする上で、非常に重要である。加えて、RUNX1-PTD変異は、他のRUNX1遺伝子変異と異なり、極めて早期に白血病を引き起こすことを発見した。この知見はCBF-AMLの発症機構の解明にも資するものである。

研究成果の概要(英文)：In Down syndrome caused by trisomy 21, 5 to 10% of newborns develop a preleukemic condition called transient abnormal myeloproliferative disorder (TAM). Most of these cases remit spontaneously, but about 20% of cases develop acute myeloid leukemia (ML-DS) within 4 years. In about 20% of cases, a partial tandem duplication mutation of RUNX1 (RUNX1-PTD) was found at the time of progression to ML-DS. In this study, we investigated the molecular biological function of this novel mutation. The results showed that RUNX1-PTD has abnormal transcriptional activation and subcellular localization compared to the wild type. Knock-in mouse studies confirmed that, unlike the previously reported RUNX1 mutation, this mutation delayed the onset of leukemia at an early stage.

研究分野：血液学

キーワード：小児白血病 ダウン症 RUNX1 GATA1

### 1. 研究開始当初の背景

トリソミー21が原因であるダウン症(DS)では、新生児の5~10%で、一過性骨髄異常増殖症(TAM)という前白血病が発症する。その多くは自然寛解するが、約20%は4年以内に急性骨髄急性白血病(Myeloid leukemia with Down syndrome: ML-DS)へと進展する。この特異な経過は白血病の多段階発症のメカニズムを解明する上でとても重要であると考えられる。

我々は、TAMとML-DSのエクソーム解析およびターゲットシーケンス解析を行い、TAMはトリソミー21と赤血球および巨核球造血に不可欠な転写因子GATA1の変異により生じ、ML-DSはこれにコヒーシンなど含む、様々な遺伝子変異が加わることを明らかにした(参考文献1)。その後も検索する検体を増やし、解析を進めたところ、RUNX1に構造的変異が、ML-DSの20%ほどで認められた(未発表・図1)。

本研究の予備解析では、この構造変異は、部分的タンデム重複(Partial tandem duplication; PTD)構造を作り出し、重複する領域は複雑で、少なくとも4種類のフォームが存在し、転写産物は野生型と共通の終止コドンをもつことが明らかになった(RUNX1-PTD変異)。(図2)

RUNX1はコア結合因子ファミリー(CBF)に属する転写因子である。Runtホモロジドメインを介してCBFβと二量体を形成後、DNAに結合し、造血に不可欠な遺伝子群の転写を制御する。また、白血病で頻繁に変異が認められ、中でも急性骨髄球性白血病(AML)を引き起こすt(8:21)はよく知られている。RUNX1やCBFβの異常による白血病は、CBF-AMLとしてカテゴライズされ、小児のde novo AMLの25%、成人でも15%を占めるとされている。

これまでに、「RUNX1の変異がどのようなメカニズムで白血病を引き起こすのか?」という疑問を解くために、多くのマウスモデルが作成されてきた。これらにはレトロウイルス感染移植モデル、トランスジェニックモデル、ノックインモデル、コンディショナルノックアウトモデルなどが含まれ、多くの知見が得られている。重要な点は、いずれのマウスもそのままでは白血病を発症せず、発症にはレトロウイルスの感染や変異原性化学物質の投与、変異遺伝子の追加発現などが必要であった。このことは、欠損を含むRUNX1の変異は、白血病の発症を促進するが、白血病を引き起こすには不十分であることを示している。

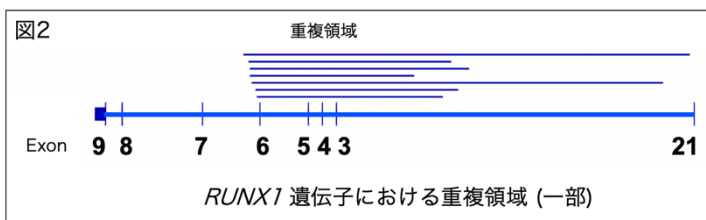
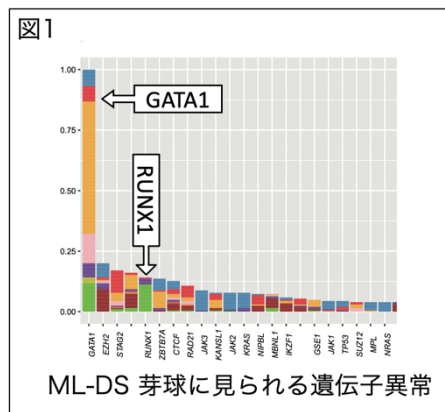
RUNX1遺伝子は21番染色体にあり、2つのプロモーターと選択的スプライシングにより、3つのアイソフォームAML1a、AML1b、AML1cを発現する。AML1aとbは造血の全体(胚型・成体型)で発現するが、AML1cは二次(成体)造血で発現する。我々が発見したPTD変異はAML1c特異的なものであった。予備実験ではAML1cタイプのRUNX1-PTDのノックインマウスを作成した。

### 2. 研究の目的

DS新生児の多くは、一過性の好中球増加症、血小板減少症および多血症がみられる頻度が高いことが知られている(Henry E et al. 2007 Am J Hematol)。また、TAMの発症には21番染色体のうちRUNX1を含む領域の遺伝子量の増加が重要であることが示されている(参考文献2)。これらのことは、21番染色体上の遺伝子量の増加、特にRUNX1の遺伝子量の増加が、DS新生児の血液学的表現型に大きな役割を果たしている可能性を示唆している。一方、ML-DSにおけるRUNX1変異についてはこれまでほとんど報告がなかったが、本研究の検索でML-DSの20%弱に構造的変異が検出された。TAMにおいては、そのような変異はみとめられなかったことから、RUNX1の機能的な変化がTAMからML-DSへの進展に関わっている可能性が示唆された。本研究の目的は、急性骨髄性白血病、特にML-DSにおけるRUNX1の新規構造変異(RUNX1-PTD)の機能を明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

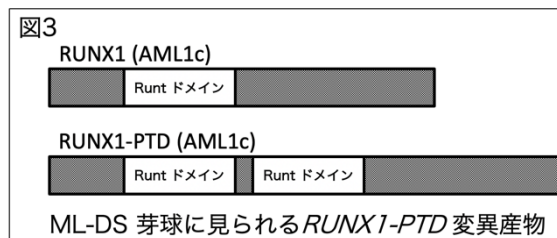
本研究では最初に、ターゲットシーケンスによってRUNX1遺伝子の構造的変異の詳細を検索し、さらにSangerシーケンスによってvalidationをした。ルシフェラーゼ・レポーターを



用いた *in vitro* の機能解析, 変異タンパク質の細胞内局在の検索を行った。さらに、RUNX1-PTD ノックイン・マウスを作成し, 表現型を解析した。このマウスの造血前駆細胞を用いて, RNA シークエンス解析, ChIP シークエンスによる結合モチーフと結合領域の検索。そして, ATAC シークエンスによるエピゲノム解析も進めた。さらに, ML-DS においては全例で GATA1 遺伝子に変異が認められ, この変異により転写活性化能がおおよそ半分に低下した GATA1s タンパク質が発現することから, この変異 GATA1 タンパク質と RUNX-PTD 相互的な影響を見るために, GATA1s 発現マウスと RUNX1-PTD マウスの掛け合わせも試みた。

#### 4. 研究成果

RUNX1-PTD 変異について検体を増やして検索したところ, いずれもインフレームであり, 最終エクソンに到達する転写産物が確認された。重複部分は変異によって異なるものの, いずれの翻訳産物も Runt ドメイン部分を重複して含んでいることを確認した。(図 3)



RUNX1-PTD の転写因子としての機能を調べる目的で, *in vitro* のレポーター解析をしたところ, 転写活性化能が著しく低下していることを確認した。細胞内局在についても野生型 RUNX1 との違い細胞質への局在の増加を検出することに成功した。しかし, ChIP シークエンスによる標的遺伝子の解析結果は, 野生型と大きな違いが認められなかった。このことは, 標的遺伝子群の変化ではなく, 標的遺伝子の過剰発現から発現抑制への変化が TAM から ML-DS の進展に関わっている可能性を示唆している。

次に我々は, RUNX1-PTD ノックインマウスを作成した。このホモ接合性マウスは早期に死亡し, ヘテロ接合性マウスは生まれてくるものの, 白血球数の低下がみられた。このマウスにおいては, 短期造血前駆細胞分画や多能性造血前駆細胞分画の数がわずかに抑制されていた。前駆細胞分画においては, 骨髄球系の増加とリンパ球系の減少がみとめられた。興味深いことに, 生まれたヘテロ接合性マウスは白血病を発症することが明らかになった。前述のごとく, 既報の RUNX1 変異マウスは, 変異導入単独で白血病を発症しないことが示されているが, 本研究で作成した RUNX1-PTD マウスでは, 非常に短期にそして高頻度に白血病を発症することが示された。しかしながら, 白血病細胞表面マーカーの解析とエクソーム解析の結果, ML-DS とは異なり T 細胞性急性リンパ性白血病であることが示唆された。

そこで我々は次のステップとして, GATA1s 発現マウスと RUNX1-PTD ノックインマウスを掛け合わせるにより ML-DS 様の表現型が得られるかを検索することにした。今回用いた GATA1s 発現マウスは, マウス *Gata1* 遺伝子の赤芽球系特異的第 1 エクソンを, コンディショナルに欠失誘導したマウスである。(参考文献 3) このマウスでは TAM や ML-DS で認められる転写活性化ドメインを欠いた GATA1s タンパク質が発現することが知られている。掛け合わせにより得られた (RUNX1-PTD; IEcKO) マウスでは, 脾臓と骨髄において異常な巨核球の増殖がみとめられた。現在このマウスの骨髄細胞と脾臓細胞を検索しているところである。巨核球系の異常細胞の他にも異常な細胞認められ, 複数の細胞系列に異常がまたがっている可能性がある。ML-DS は発症初期に骨髄異形成症候群を発症することから, そのような反応なのか, あるいはそれとは異なる現象をみているのか現在詳細な解析を進めている。

本研究では, RUNX1-PTD が他の RUNX1 変異とは異なり, マウスに容易に白血病を引き起こすこと, その際 RUNX1 ノックアウトとオーバーラップした標的遺伝子の発現に影響を与えていること, さらに ML-DS 様の巨核球系細胞の異常を単独で引き起こすことはできないこと。などが示された。

#### 参考文献

- (1) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet* 2013; 45:1293-9.
- (2) Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, et al. Systematic cellular disease models reveal synergistic interaction of trisomy 21 and GATA1 mutations in hematopoietic abnormalities. *Cell Rep* 2016; 15:1228-41.
- (3) Kobayashi E, Shimizu R, Kikuchi Y, Takahashi S, and Yamamoto M. Loss of the *Gata1* gene IE exon leads to variant transcript expression and the production of a GATA1 protein lacking the N-terminal domain. *J Biol Chem*. 2010; 285:773-83.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------