

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21591344

研究課題名（和文） 乳児急性骨髄性白血病における新規クラス 1 遺伝子変異の単離

研究課題名（英文） Isolation of novel class I mutation in infantile acute myeloid leukemia

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

ダウン症の新生児は、一過性骨髄異常増殖症(TAM)と骨髄性白血病(ML-DS)を発症するリスクが高い。いずれの疾患の症例においても、その多くは GATA1 遺伝子に変異を有している。この変異は、N末端ドメインを欠いた GATA1 タンパク(GATA1s)のみの発現を引き起こす。我々は新規のクラス I 変異の単離を試みたが、残念ながら成功しなかった。しかし、我々は自然発生による、15 アミノ酸あるいは 43 アミノ酸の内部欠損 GATA1 変異(GATA1 ID)を 6 例の TAM 患者に認めたことを報告する。この変異体は第三エクソンの変異により異常なスプライシングが引き起こされ発現する。この変異体を持つ患者は全て非常に高い白血球数を有した。このとは、この変異がクラス 1 様の活性を有する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Neonates with Down syndrome (DS) are at a high risk of developing transient abnormal myelopoiesis (TAM) and myeloid leukemia in DS (ML-DS). Most cases with both disorders carry somatic GATA1 mutations. This mutation results in the exclusive expression of a truncated protein lacking the N-terminal 83 amino acids (GATA1s). We tried to isolation of novel class I mutation from these disorders, but unfortunately we could not execute the object. Here, we report naturally occurring GATA1 mutants with internal deletions of 15 or 43 amino acids (GATA1 ID) observed in six patients with TAM, which were caused by abnormal alternative splicing due to the mutations in exon 3. WBC counts of all patients have the mutations were extremely high. These results indicated that the mutations have class 1 like activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：白血病、転写因子、ダウン症、一過性骨髄増殖症、GATA1

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、ダウン症に関連する白血

病について検索を進めてきた。ダウン症は、最も多い染色体異常症であり、発症率は平均

1/800、高齢の母親における危険率は約 1/40 まで上昇する。現在、社会的な理由などから高齢妊娠や高齢出産は増加傾向にあり、ダウン症発症の潜在的な危険性は高くなっている。

ダウン症では、血病の発症率が高く、急性白血病の頻度は正常の 10~20 倍、巨核球性白血病に限ると 400 倍以上である。また、ダウン症新生児の約 10%にみられる一過性骨髄異常増殖症 (TAM)では、多くが自然寛解するが、そのうちの 20~30%は 3 年以内に急性巨核球性白血病(ML-DS)を発症する。この特異な経過から、ダウン症候群関連白血病は、白血病の多段階発症や乳児白血病発症の機序を理解するために重要な疾患であると考えられている。

2002 年、我々は GATA1 遺伝子が、ほとんど全ての TAM と ML-DS において変異しており、N 末端の転写活性化ドメインが欠落した GATA1(GATA1s)を発現すること (Xu, Toki, et al. Blood 2003) および、この変異が胎児肝造血において引き起こされることを報告した (Shimada, Toki, et al. Blood 2004)。

近年、急性骨髄性白血病の発症には、造血前駆細胞の分化・成熟を司る遺伝子の異常「クラス II 遺伝子変異」と、細胞増殖を制御する遺伝子の異常「クラス I 遺伝子変異」が必要だという説が有力である (Deguchi and Gilliland, Leukemia 2002)。クラス II 変異は転写因子をコードする遺伝子にみられ、染色体転座などによりキメラ転写因子が産生され、そのドミナントネガティブ効果により、正常な転写因子の機能が阻害され、細胞の分化・成熟が阻害される。クラス I の変異はチロシンキナーゼなどシグナル伝達に関わる因子が多く、異常なシグナルにより増殖の制御が破綻すると考えられている。

“TAM のクラス I 変異は何であろうか?” この疑問は、全く明らかになっていない。

ML-DS および TAM では、急性骨髄性白血病の既報のクラス I 遺伝子変異のいくつかを検索され始めており、我々も検索を進めてきた (Sato, Toki, et al. Brit J Hematol 2008)。これまで、JAK3 および JAK2 に変異をもつ例 (細胞株を含む) が報告されているが、その頻度は極めて低く (10%以下)、多くの症例ではまだ明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目標は、乳児白血病の発症に関わる新規活性型クラス I 変異遺伝子の単離 (特に TAM の発症に関わるクラス I 遺伝子の単離) を最初の目的にしている。我々は、乳児急性骨髄性白血病細胞株を 4 種類保持している。そのうち、2 株においては、2008 年に公表されたものであり、1 株 (KPAM1)は我々が

共同研究者とともに樹立したものである

(Toki, et al. Leukemia 2008)。また、これまで多くの TAM 患者の GATA1 変異を調べている実績もある。一方で、TAM は前白血病状態であることから、クラス I 変異を有さない可能性がある。その場合、本研究が無駄にならないような方策も必要である。TAM には芽球が少ない症例と非常に多い症例があることが知られている。このことは、何らかのメカニズムにより、芽球の増殖が制御されている可能性がある。症例を分類することにより、その背景にあるメカニズムに焦点を当てることができるのではないかと考えている。

3. 研究の方法

先述の細胞株に由来するレトロウィルス・ライブラリーを作製し、遺伝子導入する。本研究では、これらの方法の確立と、より高力価のライブラリーの作製を試みる。ライブラリーをサイトカイン依存性急性骨髄性白血病細胞株に導入した後、サイトカインを取り除いた培地で培養することにより、乳児骨髄性白血病のクラス I 変異遺伝子を検索・単離する。

芽球数の多い TAM 症例と少ない TAM 症例を分析することにより、芽球の増殖に関わる因子の検索をする。

4. 研究成果

ML-DS 由来細胞株 CMK の cDNA を元に、レトロウィルス・ライブラリーを作製し、これを IL-3 依存性マウス細胞株 BaF3 へ導入し、スクリーニングを行った。Ras 関連遺伝子の単離に成功したが、患者における変異は認められなかった。我々は、TAM 細胞が Stem cell factor によってその増殖が刺激されることを明らかにしたので、SCF 依存性 KPAM1 にライブラリーの導入を試みた。この細胞は、ヒト由来だったためか、ウィルスによる導入効率が低く、残念ながら新規のクラス I 変異遺伝子の単離が本研究期間に間に合わなかった。ただし、この遺伝子導入効率を上げるために遺伝子改変した KPAM1 の樹立に成功し、現在それを用いた研究を進めている。

一方で、我々は TAM にみられる GATA1 変異の種類により、芽球数が大きく影響を受けることを発見した。TAM および ML-DS にみられる GATA1 変異の多くは、翻訳開始コードが存在する第二エクソンにみられる。翻訳される変異 GATA1 タンパクは、N 末端側の 83 アミノ酸を欠く GATA1s であるが、DNA を解析して検出される変異は多種多様である。我々は、解析した 66 例の TAM 症例の GATA1 変異を、転写される RNA に注目して分類することにした。まずは、翻訳開始

の第一メチオニンが終止コドンあるいは他のアミノ酸に変化した Loss of 1st Met 型変異。次に、コード領域に Premature termination codon (PTC)ができる PTC 型変異。最後に、スプライシング部位が破壊される Splicing error 型変異である。次に、GATA1 のミニ遺伝子発現ベクターを作製し、患者にみられた変異と同じ変異を再現した。この発現ベクターを一過性に細胞導入し、Western blottingにより GATA1sの発現量を調べた。

その結果、変異の種類によって翻訳される GATA1s 量に違いがあることが分かった。Loss of 1st Met 型変異、また、Splicing error 型変異では、GATA1sの発現が得られる。PTCの一部が GATA1sの発現が極端に低いことが明らかになった。さらに興味深いことに、予想された GATA1sの発現量の高・低で症例を分類してみると、GATA1sの発現量が多いと TAMの芽球数が多く、発現が少ないと芽球の数が少ない傾向があることが分かった。低発現症例では、ML-DSへの移行が高率に認められ、中でも PTCが第二メチオニンの下流に来る症例は、ML-DSへの移行の危険率がほかのグループに比較して高かった。(Kanezaki, 2010 Blood)。

また、TAM症例の約5%に、コード領域にインフレームの欠失を有する GATA1を発現するグループがあることを明らかにした(投稿中)。ここでみられる変異 GATA1タンパクは N末端の転写活性化ドメインを有することから、完全長 GATA1と同等の転写活性化能を有する。このグループでは、全例初診時の白血球数が 100000/ μ Lを超えており、早期死亡が約半分を占めた。これらの結果は、TAMにおいては GATA1sの発現量や高い転写活性化能を有する変異体の発現が TAMの表現型に影響を与えることを示唆している。

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2件)

- ① Takashi Yokoyama, Tsutomu Toki, Yoshihiro Aoki, Rika Kanezaki, Myoung-ja Park, Yohei Kanno, Tomoko Takahara, Yukari Yamazaki, Etsuro Ito, Yasuhide Hayashi, Takuro Nakamura. Identification of TRIB1 R107L gain-of-function mutation in human acute megakaryocytic leukemia. Blood 119(11): 2608-2611, 2012. 査読あり。
- ② Rika Kanezaki, Tsutomu Toki, Kiminori Terui, Gang Xu, RuNan Wang, Akira Shimada, Asahito Hama, Hirokazu Kanegane, Kiyoshi

Kawakami, Mikiya Endo, Daisuke Hasegawa, Kazuhiro Kogawa, Souichi Adachi, Yasuhiko Ikeda, Shotaro Iwamoto, Takashi Taga, Yoshiyuki Kosaka, Seiji Kojima, Yasuhide Hayashi, Etsuro Ito. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. Blood 116(22):4631-4638, 2010. 査読あり。

[学会発表] (計5件)

- ① Tsutomu Toki, Eri Kobayashi, Rika Kanezaki, RuNan Wang, Kiminori Terui, Hirokazu Kanegane, Miho Maeda, Mikiya Endo, Tatsuki Mizuochi, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Etsuro Ito. GATA1 mutants lacking Rb-binding motif observed in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. 第53回米国血液学会. 2011年12月10日-13日. San Diego Convention Center, California.
- ② Tsutomu Toki, Eri Kobayashi, Rika Kanezaki, Runan Wang, Kiminori Terui, Hirokazu Kanegane, Miho Maeda, Takayoshi Koike, Mikiya Endo, Souichi Adachi, Yasuhide Hayashi, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Etsuro Ito. Novel GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down Syndrome. 第73回日本血液学会学術集会. 2011年10月14日-16日. 名古屋国際会議場.
- ③ 土岐 力. シンポジウム「TAMにみられた GATA1 遺伝子異常の最近の話題」. 第114回日本小児科学会学術集会. 2011年8月12日-14日. グランドプリンスホテル新高輪.
- ④ Tsutomu Toki, Rika Kanezaki, RuNan Wang, Kiminori Terui, Yasuhide Hayashi, Masayoshi Miura, Miho Maeda, Etsuro Ito. Internal deletions of transcription factor GATA1 observed in transient abnormal myelopoiesis. 第72回日本血液学会学術集会. 2010年9月24日-26日. パシフィコ横浜.
- ⑤ 土岐 力. シンポジウム「ダウン症候群と血液腫瘍」. 第71回日本血液学会学術集会. 2009年10月25日. 国立京都国際会館.

〔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

土岐 力 (TOKI TSUTOMU)

弘前大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：5 0 2 9 5 7 3 1

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：