

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07790

研究課題名(和文) ダウン症のTAMにおけるGATA1変異タイプと巨核球分化・白血病進展との関連

研究課題名(英文) Effects of GATA1 mutation types on megakaryocytic differentiation and development of leukemia

研究代表者

照井 君典 (Terui, Kiminori)

弘前大学・医学研究科・教授

研究者番号：00333740

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)：ダウン症のTAMにおいてGATA1変異タイプが巨核球分化と白血病進展に及ぼす影響を調べるために本研究を行い、以下の成果を得た。

1. ダウン症のAML細胞株CMK11-5にGATA1sタンパクの発現を誘導したところ、巨核球関連遺伝子の発現レベルの亢進が観察され、GATA1sタンパクの高発現が巨核球系への分化を促進する可能性が示唆された。
2. CMK11-5細胞株のGATA1変異を、早期終止コドンをきたす変異からスプライシングの異常をきたす変異に改変したところ、巨核球関連遺伝子の発現レベルは後者で高く、巨核球系への分化の促進が示唆された。GATA1sタンパクの発現レベルは後者で高い傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究により、ダウン症のTAMにおいて、GATA1変異のタイプにより血小板数やAMLに進展する率が異なることは分かっていたが、その機序は不明であった。本研究により、GATA1変異のタイプにより巨核球分化に及ぼす影響が異なり、その影響はGATA1sタンパクの発現レベルの違いによることが示唆された。巨核球分化を促進するGATA1変異タイプはAMLに進展する率が低いことが予想され、今回の結果は過去に行われた臨床研究の結果と矛盾のない結果であった。GATA1変異解析により、AMLに進展する高危険群を正確に同定できるようになれば、AMLの早期発見・早期治療や、予防に応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We performed this study to evaluate the effects of GATA1 mutation types on megakaryocytic differentiation and development of leukemia in infants with Down syndrome and TAM and obtained following results.

1. We found that overexpression of GATA1s protein upregulated the expression of megakaryocytic genes in an AML cell line of Down syndrome, CMK11-5, suggesting that the high expression of GATA1s protein may promote megakaryocytic differentiation.
2. We edited the GATA1 mutation of CMK11-5 cell line from premature termination codon (PTC) type to splicing error (SE) type and found that expression levels of megakaryocytic genes were higher in the SE type, suggesting the SE type of the GATA1 mutation may induce megakaryocytic differentiation more efficiently than the PTC type. Expression level of GATA1s protein was slightly higher in the SE type than the PTC type.

研究分野：小児科学

キーワード：ダウン症候群 一過性異常骨髄増殖症 GATA1 血小板 巨核球 白血病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) ダウン症候群の新生児の約 10%は一過性異常骨髄増殖症 (TAM) という一過性の白血病を発症する。ほぼ全例で血球特異的転写因子 GATA1 の遺伝子変異がみられ、変異により完全長の GATA1 タンパクが発現せず、短縮型の GATA1 タンパク (GATA1s) のみが発現する。約 20% の症例は肝線維症や呼吸循環不全のため早期に死亡し、寛解例の約 20~30% は 4 歳までに真の白血病 (AML) を発症することが問題になっている。

(2) 以前我々は、GATA1 変異のタイプにより GATA1s タンパクの発現レベルが異なること、GATA1 変異タイプにより白血球数や芽球数、AML に進展する率が異なることを報告した (Blood 2010)。この結果を確認するために、日本小児白血病リンパ腫研究グループ (JPLSG) の多施設共同臨床試験 TAM-10 に参加した 167 例を解析したところ、スプライス変異 (splicing error, SE) と 1 番目の翻訳開始コドンを失う変異 (loss of first methionine, LOM) では、早期終止コドンをきたす変異 (premature termination codon, PTC) よりも有意に血小板数が高値であることが明らかになった。さらに、SE は他の変異よりも AML への進展が少ない傾向にあった。この結果は、GATA1s タンパクの高発現群は低発現群に比べて有意に AML 進展が少ないという既報の結果と矛盾しないものであった (Blood 2010)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、TAM において GATA1 変異タイプにより血小板数や AML への進展率が異なる仕組みを明らかにし、AML 進展の高危険群の同定や、新しい予防法・治療法の開発につなげることである。具体的には、以下の 2 点に絞って研究を行う。

(1) SE タイプと LOM タイプの GATA1 変異が TAM 芽球から巨核球への分化・増殖を促進する仕組みを明らかにする。

(2) SE タイプの GATA1 変異が AML への進展率が低い仕組みを明らかにし、予防や治療の標的となる分子や経路を同定する。

3. 研究の方法

(1) TAM 患者検体を用いた分化能、細胞増殖能、未分化性の解析

TAM 芽球を抗 CD34 抗体を用いて分離し、通常のコロニーアッセイを行い、GATA1 変異タイプにより各 lineage への分化能・増殖能に違いがみられるか評価する。また、SCF、IL-6、IL-9、TPO を含む培地で培養し、巨核球への分化能・増殖能を評価する。Flt3L、SCF、IL-3、IL-6、TPO を含む培地で長期培養を行い、未分化な造血前駆細胞の評価を行う。また、巨核球分化や細胞増殖、自己複製能、アポトーシスなどに関連する遺伝子群の発現を定量 RT-PCR で解析し、GATA1 変異タイプにより発現パターンが異なる分子や経路を同定する。

(2) 白血病細胞株を用いた機能解析

ダウン症候群の AML 細胞株である CMK11-5 に、ドキシサイクリンで発現誘導可能な変異 GATA1 遺伝子をレトロウイルスを用いて導入する。ドキシサイクリンで GATA1s タンパクの発現を誘導し、誘導前後で細胞増殖や形態、表面マーカーなどの解析を行い、GATA1s タンパクの発現量と細胞増殖能や巨核球への分化能・増殖能との関連を解析する。また、上記の遺伝子群の発現を定量 RT-PCR やウエスタンブロッティングで解析する。GATA1s タンパクの誘導により発現が変化する分子や経路を同定し、AML 進展への関与が疑われるものについては阻害薬の影響も調べる。ダウン症候群の AML の発症に MYC 経路が重要であることが解明されつつあり、この経路を重点的に解析する予定である。

(3) 正常臍帯血造血幹細胞を用いた巨核球への分化・増殖能の解析

Maroz らの方法 (Leukemia 2014) に従い、臍帯血 CD34 陽性細胞の内因性 GATA1 をレンチウイルスベクターを用いてノックダウンするとともに、様々な変異を持った GATA1 遺伝子を導入する。上記の 1 と同様に、各 lineage への分化能・増殖能、巨核球への分化能・増殖能、未分化な造血前駆細胞の評価および遺伝子発現解析を行う。

(4) 白血病細胞株を用いた機能解析

GATA1 変異タイプと臨床像との関連が、GATA1s タンパクの発現量に依存しない可能性も考慮し、以下の解析も行う。CMK-11-5 に CRISPR/Cas9 システムを用いて種々の変異 GATA1 遺伝子を導入する。上記の 2 と同様に、細胞増殖や形態、表面マーカー、遺伝子発現などについて解析を行う。GATA1 変異タイプにより発現パターンが異なる分子や経路を同定し、AML 進展への関与が疑われるものについては阻害薬の影響も調べる。

4 . 研究成果

(1)当初、患者検体を用いて分化能、細胞増殖能、未分化性の解析を行う予定であったが、芽球割合や白血球分画などの条件が患者によって大きく異なることから、細胞株を使った実験を優先して行った。GATA1s タンパクの発現レベルの違いが巨核球分化に及ぼす影響を調べるために、ダウン症候群の AML 細胞株である CMK11-5 に、ドキシサイクリンで発現誘導可能な変異 GATA1 遺伝子を Sleeping Beauty システムを用いて導入した。その結果、ドキシサイクリンで変異 GATA1 遺伝子の発現をゆるやかに誘導できる細胞が得られた。この細胞をドキシサイクリンで処理し GATA1s タンパクの発現を誘導したところ、巨核球関連遺伝子である ITGA2B、ITGB3、MPL の発現レベルの亢進が観察された。一方、GP1BA、GP5、GP9 などの巨核球関連遺伝子の発現レベルに大きな変化はみられなかった。これらの結果から、GATA1s タンパクの高発現が巨核球系への分化を部分的に促進する可能性が示唆された。

(2)GATA1 変異タイプにより巨核球系への分化能や GATA1s タンパクの発現レベルが異なることを確認するために、ダウン症候群の AML 細胞株である CMK11-5 に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて様々な GATA1 変異の導入を試みた。CMK11-5 はもともと PTC タイプの GATA1 変異 (c.5_7del insC, p.Glu2Alafs*37) を持っているため、SE タイプの変異を導入し (もともとの変異のあるエクソン 2 はスプライスアウトされる)、両者を比較・検討する方針とした。その結果、異なる GATA1 変異を持つ 34 種類のクローンが得られ、32 種類は SE タイプ、2 種類は PTC タイプ (もともとの変異) を持つクローンであった。巨核球関連遺伝子の発現レベルを解析したところ、ITGA2B、ITGB3、GP5、GP9、MPL など多くの巨核球関連遺伝子の発現レベルが SE タイプで高く、巨核球系への分化の促進が示唆された。GATA1s タンパクの発現レベルは SE タイプで高い傾向にあり、既報と矛盾のない結果であったが、その差はわずかであった。

(3)SE タイプと PTC タイプにおける GATA1s タンパクの発現レベルの差がわずかであったことから、クローン化の過程で GATA1s タンパクの発現レベルが変化した可能性も考え、ゲノム編集 4 日後にも同様の解析を行った。その結果、GATA1s タンパクの発現レベルは SE タイプで高い傾向にあることが確認された。また、巨核球関連遺伝子の発現レベルを解析したところ、ITGB3 の発現レベルが SE タイプで高く、巨核球系への分化の促進も確認された。

(4)これらの結果から、GATA1 変異のタイプにより巨核球分化に及ぼす影響が異なり、その影響は GATA1s タンパクの発現レベルの違いによることが示唆された。巨核球分化を促進する GATA1 変異タイプは AML に進展する率が低いことが予想され、今回の結果は過去に行われた臨床研究の結果と矛盾のない結果であった。GATA1 変異解析により、AML に進展する高危険群を正確に同定できるようになれば、AML の早期発見・早期治療や、予防に応用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9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 Sato Tomohiko, Yoshida Kenichi, Toki Tsutomu, Kanezaki Rika, Terui Kiminori, Saiki Ryunosuke, Ojima Masami, Ochi Yotaro, Mizuno Seiya, Yoshihara Masaharu, Uechi Tamayo, Kenmochi Naoya, Tanaka Shiro, Matsubayashi Jun, Kisai Kenta, Kudo Ko, Yuzawa Kentaro, Takahashi Yuka, Tanaka Tatsuhiko, Yamamoto Yohei, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Landscape of driver mutations and their clinical effects on Down syndrome-related myeloid neoplasms	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood.2023022247	査読の有無 有
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 Tanaka Tatsuhiko, Kudo Ko, Kanezaki Rika, Yuzawa Kentaro, Toki Tsutomu, Okuse Ryo, Kobayashi Akie, Sato Tomohiko, Kamio Takuya, Terui Kiminori, Ito Etsuro	4. 巻 132
2. 論文標題 Antileukemic effect of azacitidine, a DNA methyltransferase inhibitor, on cell lines of myeloid leukemia associated with Down syndrome	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2024.104179	査読の有無 有
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 Yamashita Motoi, Tomoda Takahiro, Mizuo Ami, Isoda Takeshi, Egawa Makiko, Yoshida Masayuki, Toki Tsutomu, Kudo Ko, Terui Kiminori, Ito Etsuro, Morio Tomohiro, Takagi Masatoshi	4. 巻 71
2. 論文標題 Transient erythroblastopenia due to a GATA1 variant in an infant female	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pediatric Blood & Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.30834	査読の有無 有
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 Kanezaki Rika, Toki Tsutomu, Terui Kiminori, Sato Tomohiko, Kobayashi Akie, Kudo Ko, Kamio Takuya, Sasaki Shinya, Kawaguchi Koji, Watanabe Kenichiro, Ito Etsuro	4. 巻 12
2. 論文標題 Mechanism of KIT gene regulation by GATA1 lacking the N-terminal domain in Down syndrome-related myeloid disorders	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-25046-z	査読の有無 有
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 Kobayashi Akie, Ohtaka Ryusei, Toki Tsutomu, Hara Junichi, Muramatsu Hideki, Kanezaki Rika, Takahashi Yuka, Sato Tomohiko, Kamio Takuya, Kudo Ko, Sasaki Shinya, Yoshida Taro, Utsugisawa Taiju, Kanno Hitoshi, Yoshida Kenichi, Nannya Yasuhito, Takahashi Yoshiyuki, Kojima Seiji, Miyano Satoru, Terui Kiminori, et al.	4. 巻 3
2. 論文標題 Dyserythropoietic anaemia with an intronic GATA1 splicing mutation in patients suspected to have Diamond Blackfan anaemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eJHaem	6. 最初と最後の頁 163 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jha2.374	査読の有無 有
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 Tomizawa Daisuke, Tsujimoto Shin-ichi, Tanaka Shiro, Matsubayashi Jun, Aoki Takahiro, Iwamoto Shotaro, Hasegawa Daisuke, Nagai Kozo, Nakashima Kentaro, Kawaguchi Koji, Deguchi Takao, Kiyokawa Nobutaka, Ohki Kentaro, Hiramatsu Hidefumi, Shiba Norio, Terui Kiminori, Saito Akiko, Moriya, Kato Motohiro, Taga Takashi, et al.	4. 巻 52
2. 論文標題 A phase III clinical trial evaluating efficacy and safety of minimal residual disease-based risk stratification for children with acute myeloid leukemia, incorporating a randomized study of gentuzumab ozogamicin in combination with post-induction chemotherapy for non-low-risk patients (JPLSG-AML-20)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1225 ~ 1231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyac105	査読の有無 有
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 Ozono Shuichi, Yano Shoichiro, Oishi Saori, Mitsuo Miho, Nakagawa Shinichiro, Toki Tsutomu, Terui Kiminori, Ito Etsuro	4. 巻 44
2. 論文標題 A Case of Congenital Leukemia With MYB-GATA1 Fusion Gene in a Female Patient	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Hematology/Oncology	6. 最初と最後の頁 e250 ~ e252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPH.0000000000002119	査読の有無 有
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 Yamato Genki, Deguchi Takao, Terui Kiminori, Toki Tsutomu, Watanabe Tomoyuki, Imaizumi Takahiro, Hama Asahito, Iwamoto Shotaro, Hasegawa Daisuke, Ueda Takahiro, Yokosuka Tomoko, Tanaka Shiro, Yanagisawa Ryu, Koh Katsuyoshi, Saito Akiko M., Horibe Keizo, Hayashi Yasuhide, Adachi Souichi, Mizutani Shuki, Taga Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Predictive factors for the development of leukemia in patients with transient abnormal myelopoiesis and Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 1480 ~ 1484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01171-y	査読の有無 有
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 Taga Takashi, Tanaka Shiro, Hasegawa Daisuke, Terui Kiminori, Toki Tsutomu, Iwamoto Shotaro, Hiramatsu Hidefumi, Miyamura Takako, Hashii Yoshiko, Moritake Hiroshi, Nakayama Hideki, Takahashi Hiroyuki, Shimada Akira, Taki Tomohiko, Ito Etsuro, Hama Asahito, Ito Masafumi, Koh Katsuyoshi, Hasegawa Daiichiro	4. 巻 35
2. 論文標題 Post-induction MRD by FCM and GATA1-PCR are significant prognostic factors for myeloid leukemia of Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Leukemia	6. 最初と最後の頁 2508 ~ 2516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41375-021-01157-w	査読の有無 有
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8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kana Soma, Tomohiko Sato, Tsutomu Toki, Rika Kanazaki, Ko Kudo, Genki Yamato, Hideki Muramatsu, Kenichiro Watanabe, Etsuro Ito, Kiminori Terui
2. 発表標題 Clinical characteristics of infants with transient abnormal myelopoiesis and two GATA1 mutations: A report from the JPLSG TAM-10 study
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Genki Yamato, Hideki Muramatsu, Akira Shimada, Takahiro Imaizumi, Hiroyuki Tsukagoshi, Norio Shiba, Kiminori Terui, Etsuro Ito, Kenichiro Watanabe, Yasuhide Hayashi
2. 発表標題 Cytokine profiling in 128 patients with transient abnormal myelopoiesis: JPLSG TAM-10 study
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中島健太郎, 大和玄季, 加登翔太, 川口晃司, 宮村能子, 濱麻人, 岩本彰太郎, 平松英文, 湯坐有希, 盛武浩, 照井君典, 多賀崇, 足立壯一, 宮澤大輔, 長谷川大輔, 日本小児がん研究グループAML委員会
2. 発表標題 ダウン症候群に発症した再発・難治急性骨髄性白血病の予後調査
3. 学会等名 第125回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 照井君典
2. 発表標題 Down症候群関連骨髄性白血病における新規予後因子の探索
3. 学会等名 第64回日本小児血液・がん学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yamato G, Park MJ, Shimada A, Shiba N, Yamada Y, Terui K, Ito E, Muramatsu H, Watanabe K and Hayashi Y
2. 発表標題 Cytokine Analysis in 154 Patients with transient abnormal myelopoiesis: JCCG JPLSG TAM-10 clinical study
3. 学会等名 American Society of Hematology 63rd Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yamato G, Park M, Shimada A, Shiba N, Yamada Y, Terui K, Muramatsu H, Watanabe K, Hayashi Y
2. 発表標題 Cytokine analysis in 151 patients with transient abnormal myelopoiesis: JCCG JPLSG TAM-10 study
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tanaka T, Kudo K, Kanezaki R, Kobayashi A, Sato T, Kamio T, Sasaki S, Toki T, Ito E, Terui K
2. 発表標題 Anti-leukemic effect of DNA methyltransferase inhibitor on cell lines derived from myeloid leukemia in Down syndrome
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林明恵, 大高龍星, 土岐力, 金崎里香, 高橋佑果, 佐藤知彦, 神尾卓哉, 工藤耕, 佐々木伸也, 村松秀城, 原純一, 菅野仁, 照井君典, 伊藤悦朗
2. 発表標題 Dyserythropoietic anemia with an intronic GATA1 splicing mutation in patients suspected to have DBA
3. 学会等名 第83回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本小児血液・がん学会	4. 発行年 2022年
2. 出版社 診断と治療社	5. 総ページ数 640
3. 書名 小児血液・腫瘍学 改訂第2版	

1. 著者名 滝田順子	4. 発行年 2021年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 344
3. 書名 小児白血病・リンパ腫 Strategy & Practice	

〔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
研究分担者	土岐 力 (Toki Tsutomu) (50195731)	弘前大学・医学研究科・講師 (11101)	

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