

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15897

研究課題名(和文) 一過性骨髄異常増殖症の発症過程における短型GATA1タンパクの機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of GATA1-short-form protein in the pathogenesis of transient abnormal myeloproliferative disorders

研究代表者

西中 瑶子(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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、ダウン症児に合併する前白血病疾患「一過性骨髄異常増殖症(TAM)」に焦点を当てた、病態形成の分子メカニズムの解明である。TAMの原因遺伝子として知られているGATA1遺伝子はX染色体上に位置し、TAM発症時には通常のGATA1f1ではなく、アイソジェニックなGATA1sのみが発現していることから、GATA1sタンパクに着目し、TAMモデルとして患者由来疾患iPS細胞を用いて、その転写因子としての独自の役割を解析した。結果として、GATA1sはGATA1f1非存在下でのみ特定のがん関連遺伝子に結合していることが認められ、これがTAMの表現型に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、多段階発がんのモデルと考えられているダウン症に合併する造血器腫瘍をモデルとして、発がんの分子メカニズムの解明を目指したものである。本疾患は1段階目の変異がトリソミー21、2段階目の変異がGATA1変異、と限定的であり、解析には最適であるものの、胎生期に発症するため、解析が困難であった。その点をヒト人工多能性幹細胞を用いることで解析を可能にした。その結果、病態形成に寄与していることが示唆されたがん関連遺伝子経路を抽出することが出来た。この結果を深めることで新規治療法の開発と繋がる可能性も見出され、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the molecular mechanisms underlying the pathogenesis of Transient Abnormal Myelopoiesis (TAM), a pre-leukemic condition that occurs in children with Down syndrome. We focused on the GATA1 gene, which is recognized as a causative gene for TAM and is located on the X chromosome. Unlike the usual GATA1f1, only the isogenic GATA1s is expressed during the onset of TAM. Using patient-derived disease-specific iPS cells as a TAM model, we analyzed the unique role of the GATA1s protein as a transcription factor. Our findings suggest that GATA1s uniquely binds to specific cancer-related genes in the absence of GATA1f1, potentially contributing to the TAM phenotype.

研究分野：小児血液腫瘍学

キーワード：一過性骨髄異常増殖症 発がん ダウン症候群 白血病 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

一過性骨髄異常増殖症 (Transient abnormal myelopoiesis: TAM) は、近年増加しているダウン症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、さらに数年以内に追加変異を獲得し、急性巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) へと進展することが知られている。この trisomy21 を背景に *GATA1* 変異が生じて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。

TAM では全ての芽球細胞において *GATA1* 変異陽性であり、他の変異はほとんど見られない。すなわち、このモデルにおいて trisomy21 に続く 2nd hit 変異は芽球細胞の *GATA1* 遺伝子のみを選択的に獲得され、*GATA1* 変異のみによって病態が形成されるといっても過言ではない。

TAM の責任遺伝子である *GATA1* 遺伝子は X 染色体上に存在し、赤血球・巨核球系の分化・成熟に関わる造血系転写因子である。*GATA1* 遺伝子には 2 つの翻訳開始点が存在し、正常細胞においても *GATA1fl* と少量の *GATA1s* の、両方の蛋白を発現することが知られている。一方、TAM の芽球細胞では *GATA1* 遺伝子の exon 2 近傍ホットスポットに生じた変異により、*GATA1fl* がタンパクとして翻訳されず、*GATA1s* タンパクのみが発現する。つまり、新規の異常タンパクが産生されるのではなく、正常でも存在するマイナーアイソフォームが単独で翻訳される結果として前癌状態の表現型が導かれる点が、他の多くの腫瘍遺伝子と決定的に異なっている。そのため、TAM 発症の病態分子メカニズムとしては、一般的には「*GATA1fl* の欠損による loss of function」によるという報告が主流である。一方で「*GATA1s* が積極的に TAM の表現型や DS-AMKL への進展に何らかの影響を及ぼす」ことを示唆する報告も見られ、責任遺伝子が明確になっているが、TAM 発症の病態分子メカニズムの詳細は依然として不明である。

## 2. 研究の目的

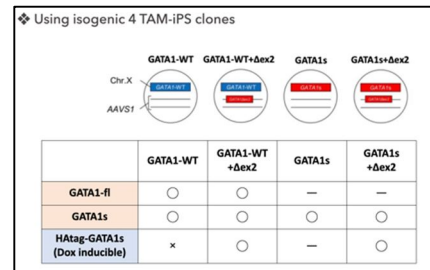
本研究の目的は、TAM 発症及び AMKL への進展における病態分子メカニズムの解明である。特に TAM 発症に関連する責任遺伝子として *GATA1* 遺伝子が同定されているにも関わらず、その働きについては詳細が不明である、これは、*GATA1* 遺伝子変異によって、新規の異常タンパクが誘導されるわけではない、というその特殊性に基づいていると考えられる。遺伝子変異により新たに生み出された変異タンパクの摂動については、これまでも多くの研究がなされ、成果も多く報告されている。しかしながら、正常細胞にも存在するマイナーアイソフォームタンパク自身が発現時期や量によって独自の働きをもつのではないかと考え、腫瘍の発生過程において細胞生物学的に解明した例はほとんどない。

加えて、従来の白血病研究では患者血液初代細胞や株化細胞、あるいは成体型の骨髄造血細胞や臍帯血が多用されてきたが、上述のように TAM が胎生期に発症する病態であることに鑑み、iPS 細胞を用いることで胎生期発生段階を追いながら検討を行う。

### 3. 研究の方法

患者由来疾患 iPS 細胞である TAM モデルを用いて、**GATA1s タンパクの GATA1fl と類似する働き及び、GATA1fl とは異なる独自の働きの解明**を行った。

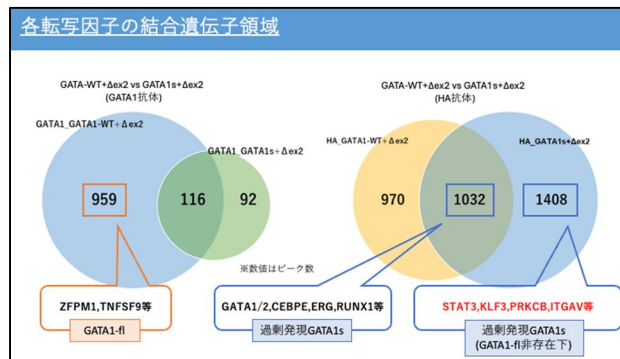
TAM 患者由来の GATA1s-iPS 細胞とアイソジェニックな GATA1-WT-iPS 細胞のペア及び、それぞれにドキシサイクリン誘導性の FLAG-tag 付き GATA1s(ex2)を導入した iPS 細胞ペアの 4 クローンの細胞を用いて解析を行った(右図)。まず、初期胚 (iPS 細胞)と初期血液前駆細胞(CD235a<sup>+</sup>KDR<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup>CD43<sup>+</sup>細胞)



の 2 点で細胞を回収し、GATA1 抗体及び FLAG-tag 抗体を用いて ChIP-seq を行い、GATA1fl の存在下または非存在下において GATA1s が結合していたクロマチン領域を比較した。さらに、ChIP-seq を実施した分画に加えて、既存の研究で我々が TAM の責任分画として同定した血液前駆細胞(CD235a<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>CD71<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD43<sup>-</sup>)を加えた 3 点で細胞を回収し、RNA-seq を行い、遺伝子発現の変化についても比較を行った。

### 4. 研究成果

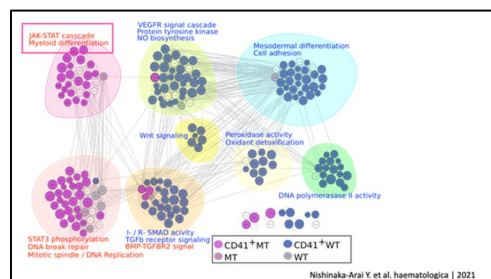
ChIP-seq において、GATA1fl または GATA1s の結合部位としてピークが検出された。しかしながら、内在性の GATA1s は発現量が低いためピークが検出されなかった。ピークが得られた遺伝子領域を比較解析すると、GATA1fl でのみ結合が見られた領域には、ZFPM1、TNFSF9 などの血球関連または細胞増殖に関わる遺伝子が認められた。



同様に過剰発現した GATA1s の結合領域のうち、GATA1fl の存在の有無に左右されない領域には GATA1、GATA2、CEBPE、ERG、RUNX1 などが検出された。さらに、GATA1fl 存在下に限った場合の GATA1s 結合領域には血球関連及び細胞増殖関連の遺伝子はなかった一方で、TAM と同じ条件である GATA1fl 非存在下における GATA1s の結合領域には STAT3、KLF3、PRKCB、ITGAV といったがん関連遺伝子が検出された。つまり、GATA1fl 非存在下における GATA1s 独自の結合領域の遺伝子が TAM の表現型に寄与している可能性が示唆された。

次に、ChIP-seq で解析したものと同様の細胞を用いて RNA-seq を行い、遺伝子発現を比較した。

しかし、ChIP-seq で GATA1s 独自の結合が見られた条件下において GATA1-WT クローンと有意に発現に差のある遺伝子は認められなかった。一方で、我々の先行研究で行った血液関連遺伝子セットのプライマーアレイの結果では、GATA1s クローンでは GATA1-WT クローンと比較して JAK-STAT カスケード及び骨髄球系細胞分化の経路が濃縮していた。



このことは、初期血液前駆細胞の段階において、GATA1s は TAM 発症に関与する遺伝子領域への結合

に変化を起こすのみで、分化が進むにつれて遺伝子発現を変化させる可能性があると考え、より分化段階の進んだ TAM の責任分画において RNA-seq を実施した。

その結果、プライマーアレイにおいて GATA1s クローンで発現上昇の認められた STAT3 は RNA-seq では有意差が認められなかった。一方で、GATA1s クローンでのみ STAT1 の発現上昇が認められた。また、GATA1s クローン及び、過剰発現 GATA1s クローンの全てで GATA1-WT に比べて PI3KCD と BCL2 の発現上昇が認められた。

以上の結果をまとめると、GATA1fl 非存在下において GATA1s は独自の働きを持っていることが示唆された。その影響は初期造血前駆細胞段階では、TAM の病態形成に寄与する遺伝子領域への結合を変化させるのみに留まるが、分化が進むにつれて遺伝子発現を変化させている可能性が示唆された。

このことを裏付けるために、STAT 及び BCL2 阻害剤を用いた検証を現在行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1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, Yohko Kitagawa, Yasuhiro Kazuki, Yasuyuki Arai, Tatsutoshi Nakahata, Akira Niwa and Megumu K. Saito
2. 発表標題 Elucidation of the unique function of GATA1s in the development of transient abnormal myeloproliferative disorders
3. 学会等名 65 th ASH annual meeting and exposition (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------	---------