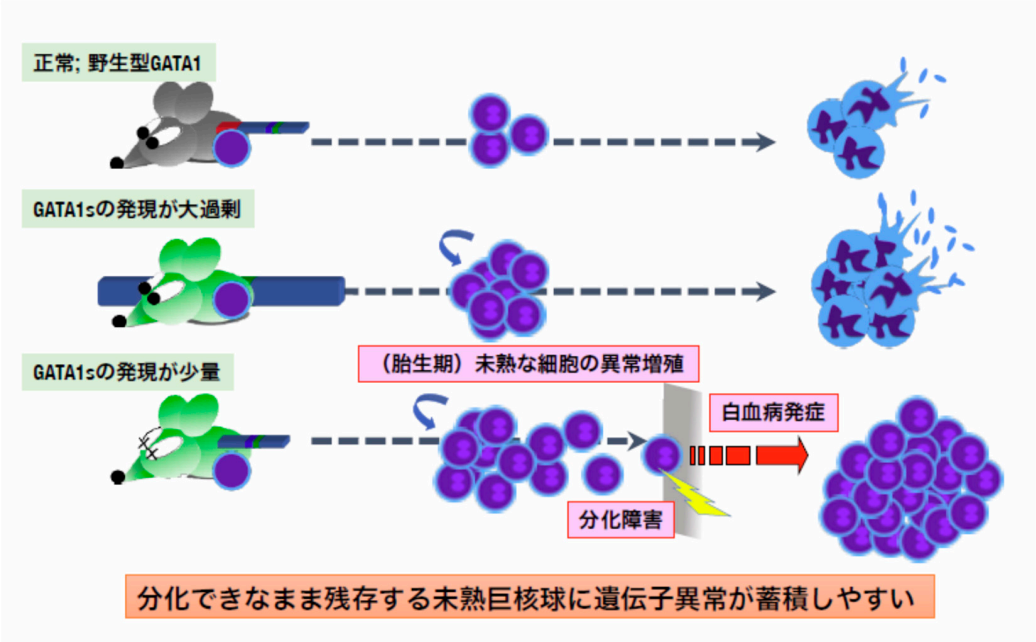
45	*GATA1* 遺伝子異常による巨核芽球性白血病発症機構	清水　律子

【目的】ダウン症群患児の約 10%において、胎生期または出生直後に一過性骨髄異常増殖症（TMD）を発症する。TMD では、白血病芽球に酷似した細胞が異常増殖すること、また、臓器浸潤による患児の早期死亡もまれではないことから、病態的には急性白血病と鑑別が困難である。TMD は、通常、生後三ヶ月程度で自然退縮するが、TMD 既往を持つダウン症群患児の約 20%程度が数ヶ月後から数年後に、今度は真の巨核芽性白血病（AMKL）を発症する。この TMD 発症、自然寛解、AMKL 発症の形質転換にどのような分子メカニズムが関与しているかについては、いまだ、詳細は明らかにされていない。近年、TMD や引き続く AMKL のほぼ全例でアミノ末端側の転写活性化領域を欠失した短型 GATA1（GATA1s）を発現していることが明らかになった。私たちは、GATA1 がアミノ末端側とカルボキシ末端側にそれぞれ独立した転写活性化領域を持つことを発見し、GATA1 が二つの領域を巧妙に使い分けて転写調節をしていることを提唱してきた、本研究では、GATA1s 変異による白血病発症には、一方の転写活性化領域を欠失したことによる転写調節不均衡が白血病発症に関与するという仮説を検証する。

【方法】*Gata1* 遺伝子破壊マウスに *Gata1* 遺伝子発現制御領域を用いて GATA1s を発現させ、GATA1s の発現量が異なる複数のマウス系統を樹立し、GATA1s 発現量による巨核球への影響、および、AMKL 発症の分子機構を解析する。

【結果】GATA1s のみを発現する遺伝子改変マウスは、GATA1s 発現量の多寡にかかわらず、全例で胎児肝臓での未熟巨核球の異常増殖をみとめた。この未熟巨球の異常増殖は思春期までには消失し、成獣期には観察されなかった。一方、GATA1s 発現量が少ないマウスは生後 2 ヶ月齢から白血病を発症するが、GATA1s 発現量が多いマウスでは白血病を発症しなかった。また、GATA1s 発現量が少ないマウスの巨核球は血小板産生能が減弱していたが、GATA1s 発現量が多いマウスでは比較的保たれていた。このことは、GATA1s は、その発現の多寡にかかわらず、巨核球増殖制御を代償できないこと、一方で、大量の GATA1s があれば巨核球分化を代償できるが少量の GATA1s では代償できないことを示している。すなわち、GATA1s による AMKL 発症には、巨核球分化制御における GATA1 の調節不均衡が関与していると考えられる。

GATA1s 変異による巨核球分化異常と白血病発症



45. *GATA1* 遺伝子異常による巨核芽球性白血病発症機構

清水　律子

東北大学 大学院医学系研究科 分子血液学分野

Key words：白血病，転写因子，GATA1

緒　言

GATA1 は赤血球や巨核球分化に重要な転写因子である。GATA1 は、アミノ末端側とカルボキシ末端側に二つの転写活性化領域をもち、それぞれ、独立して機能している［1］。ダウン症候群に高頻度に発症する巨核芽性白血病のほぼ全例で *GATA1* 遺伝子の体細胞性変異が存在し、アミノ末端側の転写活性化領域を欠失した短型 GATA1（GATA1s）が発現していること［2］、また、同 GATA1s を産生するような遺伝子多型が Diamond-Blackfan 貧血発症に関与していることが明らかになり［3］、GATA1 転写因子の機能異常による血液疾患発症機構が注目されてきている。

ダウン症群患児の約 10%において、胎生期または出生直後に一過性骨髄異常増殖症（TMD）を発症する。TMD は、白血病芽球に酷似した細胞が異常増殖すること、また、臓器浸潤による患児の早期死亡もまれではないことから、病態的には急性白血病と鑑別が困難であるが、生後三ヶ月程度で自然退縮するため無治療で寛解する患児も多い。ところが、TMD 発症の既往を持つダウン症群患児の約 20%程度が数ヶ月後から数年後に、今度は真の巨核芽性白血病（AMKL）する［4］。この TMD 発症、自然寛解、白血病発症の形質転換にどのような分子メカニズムが関与しているかについては、いまだ、詳細は明らかにされていない。

私たちは、以前、GATA1 欠失マウスに GATA1s を発現するトランスジーンを外来的に導入することで、TMD 病態マウスの樹立に成功した［5］。本マウスでは、ヒトダウン症 21 染色体トリソミーに相当する染色体数異常はなく GATA1s 変異のみを有することから、TMD の病態形成には GATA1s が第一義的に関与することが示唆される。そこで本研究では、GATA1s 変異に起因する一連の白血病発症機構について、本モデル系を用いて解析することを目的とする。

方　法

1. 動物実験、フローサイトメトリー、胞体突起形成

全ての実験は、東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会及び動物実験専門委員会の承認を得た後、規定に従って行った。血算は、吸入麻酔下で成獣眼窩静脈叢より採取した末梢血、または、リン酸鑑賞生理食塩水（PBS）で 6 倍に希釈した胎児血を、日本光電の自動血球計数器を用いて測定した。胎児肝臓または骨髄のフローサイトメトリー解析は、単核球を分離したあと、蛍光標識された抗 CD41 抗体、抗 CD61 抗体、及び、抗 cKit 抗体（eBioscience）に反応させ、FACSCalibur を用いて解析した。胎児肝臓または骨髄の巨核球の巨核球胞体突起形成能は、CATCH メディウム［6］に懸濁した単核球を、2%、3%、4%、16%の不連続アルブミン溶液上に重層し、密度勾配を利用して大型単核球を沈降させたあと、Nutridoma-SP（ベーリンガー）を含む IMDM メディウム 2ml に再懸濁した。24 時間後に胞体突起を形成した巨核球を算定した。

2. 遺伝子発現解析

胎児肝臓の単核球をビオチン化抗 CD41 抗体（eBioscience）に反応させ、ストレプトアビジンコートのマグネットビーズ（Invitorgen）で単離した。単離した細胞から ISOGEN（Nippon gene）を用いて RNA 抽出した。マイクロチップ型電気泳動装置 2100 バイオアナライザー（Agilent）を用いて RNA の品質確認を行ったあと、RAN Integrity Number 値が 8 以上の RNA のみを、ReverTra Ace qPCR kit（TOYOBO）を用いて cDNA を合成した。網羅的遺伝子発現解析はプロトコールに従って 4×44K 全マウスゲノムオリゴマイクロアレイスライド（Agilent）にハイブリダイ

ズし、GeneSpring GX12（Agilent）を用いて解析した。野生型での遺伝子発現量を基準にΔNTR-H およびΔNTR-M における発現量変化が 1.5 倍以上を示す遺伝子群とした。

3. 遺伝子発現解析

実験結果の統計解析には、マン・ホイットニーの U 検定を用いた。

結果および考察

1. GATA1s を導入したマウスは一過性骨髄異常増殖症様病態を呈する

G1HRD（*Gata1*-hematopoietic regulatory domain）制御領域を用いたトランスジェニックマウスの利点は、トランスジーンの挿入領域によりトランスジーン由来 GATA1s の発現量の異なるマウスラインを用いることができる点である。私たちは、GATA1s 発現量の異なるトランスジェニックマウス系統 2 種（ΔNT-H、および、ΔNT-M）の雄と GATA1 遺伝子改変マウス系統の雌（$G1^{KD}$/X）を交配し、トランスジーンをもつ GATA1 遺伝子改変マウス系統の雌（$G1^{KD}$/Y）を作成した。*Gata1* 遺伝子は X 染色体上に存在するので、トランスジーンを持たない $G1^{KD}$/Y は GATA1 欠失による赤血球造血不全により胎生致死となるが、トランスジーン由来のタンパク質が欠失している機能を補うことができれば $G1^{KD}$/Y の胎生致死を回避することができる［7］。GATA1 のカルボキシ末端側転写活性化領域が、アミノ末端転写活性化領域が欠失したことによる機能欠失を部分的に代償することができるので［1］、GATA1s を発現させることでその発現量依存的に $G1^{KD}$/Y の胎生致死を回避することができることがわかっている［7］。ΔNT-H、または、ΔNT-M トランスジーンにより出生した $G1^{KD}$/Y マウスを、それぞれ、ΔNTR-H、ΔNTR-M と呼ぶ。ΔNTR-H では野生型マウスの GATA1 の 5～6 倍程度の GATA1s が、ΔNTR-M では同等程度の GATA1s が発現していた。

私たちは、ΔNTR-H マウスが、胎児期に一過性に未熟な巨核球が増加するが、出生後にその異常増殖が徐々に収束することを報告した［5］。さらに、本研究でΔNTR-M もまた、胎児期に一過性に未熟な巨核球が増加するが、その異常増殖が出生後に収束することを確認した。染色体数異常がないΔNTR-H やΔNTR-M においても TMD 病態が見られることから、ヒトダウン症患児に好発する TMD の病態形成には 21 番染色体のトリソミーは必ずしも必須ではなく、GATA1 の機能異常が関与していることが考えられた。

TMD 病態から回復したΔNTR-H やΔNTR-M 新生児は成長して成獣になることができる。特にΔNTR-H マウスは、GATA1 の機能欠失を大量の GATA1s により代償することができるので、末梢血所見で有意な異常は認めない。一方、ΔNTR-M マウスは貧血と血小板減少を呈していた（表 1）。このことから、健常マウスの GATA1 と同程度の GATA1s の発現では、GATA1 の機能欠失を完全には代償できないことが考えられる。

表 1. ΔNTR-M マウスの血算

	赤血球数 (10^4/μl)	ヘマトクリット (%)	ヘモグロビン濃度 (g/dl)	血小板数 (10^4/μl)	白血球数 (10^3/μl)
野生型	**790**	**39.3**	**13.0**	**67**	**97**
ΔNTR-M	**427**	**27.0**	**9.1**	**34**	**105**

20日齢同腹マウスの血算を示す。ΔNTR-Mマウスは野生型マウスに比べて、貧血と血小板減少を示す。

胎児期では、ΔNTR-M 胎児は、ΔNTR-H 胎児と同様に、未熟な巨核球が著明に増多していた。また、ΔNTR-H マウスと同様に、出生後に未熟な巨核球が増多は軽減したが、成獣期においても軽度の巨核球数増多が認められた。

2. GATA1s を導入したマウスの一部は巨核芽球性白血病を発症する

TMD 発症の既往を持つダウン症群患児の約 20%程度が数ヶ月後から数年後に、今度は真の巨核芽性白血病する。そこで、全例で TMD 様病態の既往を有するΔNTR-H マウスやΔNTR-M マウスを長期飼育し、白血病発症の有無について検討した。ΔNTR-M マウスでは二ヶ月齢ごろより高頻度に白血病を発症するのに対し、ΔNTR-H マウスは全く白血病を発症しなかった。白血病細胞は cKit（肝細胞増殖因子受容体）、CD41（血小板 IIb 抗原）、CD71（トランス

フェリン受容体）の表面抗原を持ち、赤芽球系列と巨核球系列の両方の性質を有していた。円形または不整形の核を持ち、核網は粗荒で、細胞質には突起が見られ（図 1）、形態的には急性巨核芽球性白血病に酷似していた。

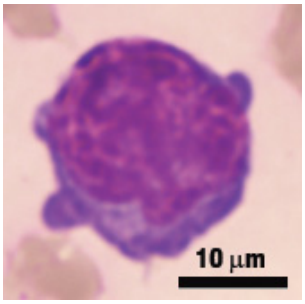


図 1. ΔNTR-M に発症した白血病の芽球

生後50日齢で白血病を発症したΔNTR-Mマウスの末梢血に出現した芽球の形態。核網は粗荒で不整形の核を持ち、細胞質には突起がみられる。

3. 白血病を発症するマウスでは巨核球の分化が障害されている

ΔNTR-H マウスもΔNTR-M マウスも、胎児期にいずれも TMD 病態を呈するにもかかわらず、ΔNTR-H 成獣マウスでは白血病を発症しないがΔNTR-M 成獣マウスは高率に白血病を発症する。この違いを検証するために、胎齢 18.5 日の胎児の末梢血所見を検討した。ΔNTR-H マウスでは、血小板数値が同腹仔よりも高いのに対し、ΔNTR-M マウスでは、同等か若干低下していた。また、成獣 NTR-H マウスは血小板数値が野生型と同等であったが、成獣 NTR-M マウスは血小板減少を呈した（図 2）。

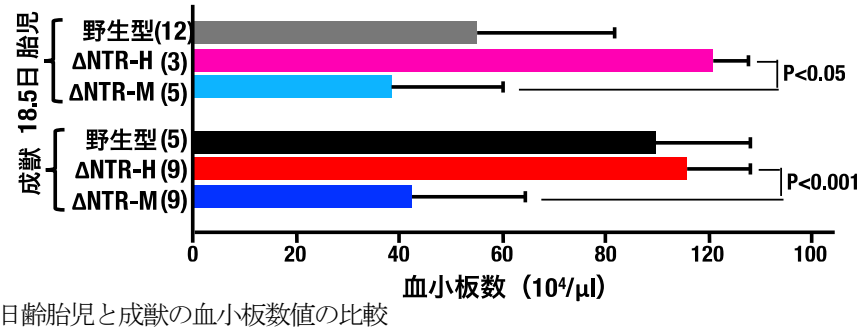


図 2. 18.5 日齢胎児と成獣の血小板数値の比較

ΔNTR-H胎児は、巨核球数の増多を反映して血小板数が増加する傾向にあるが、ΔNTR-M胎児は、巨核球数が増多しているにも関わらず、血小板数値は増加していない。巨核球数増多がみられない成獣期には、ΔNTR-H マウスの血小板数は野生型と同等であるが、ΔNTR-Hマウスは血小板数値が減少している。

前述したようにΔNTR-H 胎児やΔNTR-M 胎児は未熟巨核球が増加しているので、ΔNTR-H マウスの血小板数値の上昇は増加した未熟巨核球が分化して血小板産生に至っているからだと思われる。一方、ΔNTR-M マウスでは、未熟巨核球が著増しているのにもかかわらず血小板数値が上昇しないことから、ΔNTR-M マウスで増多した巨核球は分化が障害されていると考えられる。

そこで、マウス胎児肝臓および成獣骨髄より、アルブミン不連続密度勾配沈降法を用いて巨核球を分取し、巨核球胞体突起形成能を検討した。胎児肝臓由来の巨核球は、ΔNTR-H マウスやΔNTR-M マウスの胎児肝臓由来巨核球は、いずれも、野生型胎児のそれと比べて胞体突起形成能が低下していた。ΔNTR-H マウスでは若干ΔNTR-M マウスよりも形成能が勝っていたが、統計学的な有意差はなかった。一方、成獣骨髄由来の巨核球は、ΔNTR-H マウスでは胞体突起形成能が保たれていたが、ΔNTR-M マウスではほとんど胞体突起が形成されなかった。このことは、ΔNTR-M マウスの巨核球は血小板産生能が減弱している事を示している。

4. 白血病を発症するマウス巨核球の遺伝子発現解析

ΔNTR マウスは、GATA1s の発現量に関係なく，胎児期に一過性に巨核球が増多するが、出生後にその表現型は消失する。一方、ΔNTR-H マウスは白血病を発症しないが ΔNTR-M マウスでは白血病を発症しない。この発症の有無には、GATA1s 量の多寡に起因する GATA1 標的遺伝子の発現異常が関与している可能性が考えられる。そこで、ΔNTR-H 胎児の巨核球（将来白血病を発症しない）とΔNTR-M の巨核球（将来白血病を発症する）を分取し、遺伝子発現解析を行った。*Gata1* 遺伝子の発現は、ΔNTR-H では野生型の 14.6 倍、ΔNTR-M では 5.8 倍と、大きく増加していた。一方、*Rasal1* 遺伝子の発現は、ΔNTR-H では野生型の 1.5 倍程度であったにもかかわらず、ΔNTR-M では 76 倍も上昇していた。また、アポトーシスや巨核球分化に関わる遺伝子の中に、その発現がΔNTR-M とΔNTR-H で大きく乖離している遺伝子が見いだされた。

Rasal1 遺伝子は GAP1 ファミリーに属する GTPase 活性化タンパク質で、Ras-GTP を Ras-GDP に変換して Ras シグナルを負に制御する機能を持っている。GATA1 が Ras 依存的な巨核球の分化に関与することが報告されていることから［8］、ΔNTR-H 胎児やΔNTR-M 胎児では GATA1s 変異により未熟巨核球が異常増殖するが、GATA1s が大量にあるΔNTR-H マウスでは巨核球が分化できるために白血病に至らないが、ΔNTR-M では巨核球が分化できないまま蓄積し、残存した巨核球に新たな遺伝子異常が蓄積しやすく、そのため白血病を発症すると考えられる（図 3）。

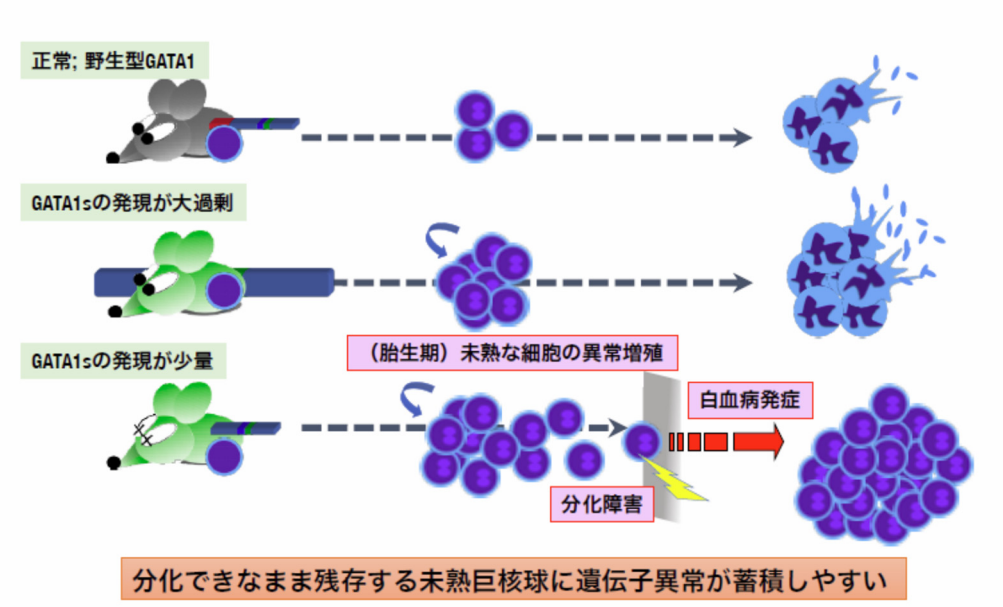


図 3. GATA1s 変異による巨核球分化異常と白血病発症

GATA1s変異があると未熟巨核球が異常増殖する。GATA1sが大量あれば巨核球が分化できるために白血病に至らないが、GATA1s量が不十分だと巨核球が分化できない。未分化なまま蓄積した巨核球には新たな遺伝子異常が蓄積しやすく、そのため白血病を発症する。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学大学大学院医学系研究科分子血液学分野の長谷川敦史博士、平野育生博士、および、石原大嗣氏である。

文 献

1) Kaneko H, Kobayashi E, Yamamoto M, Shimizu R. N- and C-terminal transactivation domains of GATA1 protein coordinate hematopoietic program. J Biol Chem. 2012;287(25):21439-49. Epub 2012/05/05. PMID: 22556427 DOI: 10.1074/jbc.M112.370437

2) Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, Anastasi J, Karp JE, Le Beau MM, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. Nat Genet. 2002;32(1):148-52. Epub 2002 Aug 12. PMID: 12172547 DOI: 10.1038/ng955

3) Ludwig LS, Gazda HT, Eng JC, Eichhorn SW, Thiru P, Ghazvinian R, et al. Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. Nat Med. 2014;20(7):748-53. Epub 2014/06/24. PMID: 24952648 DOI: 10.1038/nm.355

4) Shimizu R, Yamamoto M. Leukemogenesis in Down syndrome. In: Day S, ed. Health Problems in Down Syndrome: Rijeka, Croatia, InTech; 2015. DOI: org/10.5772/60598

5) Shimizu R, Kobayashi E, Engel JD, Yamamoto M. Induction of hyperproliferative fetal megakaryopoiesis by an N-terminally truncated GATA1 mutant. Genes Cells. 2009;14(9):1119-31. Epub 2009/08/18. PMID: 19682090 DOI: 10.1111/j.1365-2443.2009.01338.x

6) Levine RF, Fedorko ME. Isolation of intact megakaryocytes from guinea pig femoral marrow. Successful harvest made possible with inhibitions of platelet aggregation; enrichment achieved with a two-step separation technique. J Cell Biol. 1976;69(1):159-72. PMID: 3509

7) Shimizu R, Takahashi S, Ohneda K, Engel JD, Yamamoto M. *In vivo* requirements for GATA-1 functional domains during primitive and definitive erythropoiesis. Embo J. 2001;20(18):5250-60. PMID: 11566888 DOI: 10.1093/emboj/20.18.5250

8) Matsumura I, Kawasaki A, Tanaka H, Sonoyama J, Ezoe S, Minegishi N, et al. Biologic significance of GATA-1 activities in ras-mediated megakaryocytic differentiation of hematopoietic cell lines . Blood. 2000;96(7):2440-50. PMID: 11001896