

論文題目：

非ダウン症小児急性巨核芽球性白血病にみとめられた新規 *GATA1* インフレーション変異

所属： 弘前大学大学院医学研究科成育科学領域小児病態学教育研究分野

申請人：玉汝南

指導教授：伊藤悦朗

抄録

ダウン症児は巨核芽球性白血病 (DS-AMKL) のリスクが高い。DS-AMKL ではほぼ全例で *GATA1* 遺伝子変異があり、N 末端領域を欠く *GATA1s* だけが発現する。非ダウン症例 (non-DS-AMKL) にはこの変異は稀である。最近我々は、19 例中 1 例の non-DS-AMKL にインフレーム欠失を見出した。患児は出生時より白血球増多を認め、生後 1 ヶ月時に AMKL と診断された。芽球の核型は 46, XY であった。変異確認の際、第 3 エクソンのスプライシングを起こす別の欠失を認め、両変異は同アレルに座位していた。この変異体 (#135) の転写活性化能は 60% に減弱していた。完全長 *GATA1* 発現レトロウィルスの導入で DS-AMKL 細胞株 KPAM1 の増殖が著しく抑制されたが、*GATA1s* や #135 では緩やかな抑制だった。これらの結果は #135 変異体が non-DS-AMKL 発症に関与していることを示している。

キーワード : *GATA1*, 巨核芽球性白血病, ダウン症

Abstract

Children with Down syndrome (DS) have an increased incidence of acute megakaryoblastic leukemia (DS-AMKL). Almost all DS-AMKL patients harbor somatic mutations in *GATA1*. These mutations lead to exclusive expression of the protein lacking the N-terminal domain (GATA1s). Few AMKL patients without DS (non-DS-AMKL) harbor the mutations. Recently, we found a novel *GATA1* mutation (c.721_732del) that causes an in-frame deletion of amino acid residues 241-244 in one of 19 non-DS-AMKL cases. The patient who showed leukocytosis from birth was diagnosed with AMKL at one month of age and had a blast cell karyotype of 46,XY. During the validation of the mutation, we identified another large deletion (c.221-33_553del) that results in the splicing of exon 3. Both mutations were located on the same allele. The mutant protein (referred to as #135) revealed decreased transactivation activity (about 60%) compared to full-length *GATA1*. From cell proliferation assays using DS-AMKL cell line KPAM1, cell proliferation was markedly reduced by transduction with a retrovirus expressing full-length *GATA1*. In contrast, expression of GATA1s or #135 moderately restricted proliferation. These results indicate that the #135 mutant is involved in the pathogenesis of non-DS-AMKL.

Key words: *GATA1*, Acute megakaryoblastic leukemia, Down syndrome

緒言

急性巨核芽球性白血病(AMKL)は、急性白血病の中では3~5%と稀で、異質性の高いサブタイプであるとされる。小児 AMKL においてはダウン症 (DS)を伴うもの(DS-AMKL)と、そうでない群に分類することができる¹⁻⁴⁾。DS-AMKLは、小児AMKLの多くを占め、予後良好である一方、DSを伴わないあるいは芽球に過剰な21番染色体を有しないAMKL(non-DS-AMKL)は、予後不良である^{5,6)}。

DSは21番染色体のトリソミーが原因で起こるヒトで最も多い染色体異常症であり⁷⁾、非ダウン症に比較して白血病発症のリスクが高く、0~4才では約50倍、骨髄球性白血病のリスクは約150倍、AMKLのリスクは500倍ともされる^{8,9)}。DS-AMKLは発症までの過程が特異で、まずDSの新生児の5~10%が一過性異常骨髄増殖症(TAM)を発症する。この芽球はDS-AMKLのものと形態学的にも細胞表面マーカー検索においても区別がつかない。TAMの約20%は早期死亡に至るが、多くが自然寛解することから一過性白血病とも呼ばれている。TAMの20~30%は生後3年以内にDS-AMKLを発症する。TAMとDS-AMKLのほぼ全例において転写因子*GATA1*(Gene ID 2623)に変異がみとめられるが、non-DS-AMKLにおいては*GATA1*変異例の報告はほとんどない。¹⁰⁻¹⁶⁾

転写因子*GATA1*は、グロビン遺伝子の発現に重要なシスエレメントに結合するZnフィンガー型転写因子として同定され、遺伝子はX染色体短腕11.23に座位する。遺伝子は6つのエクソンからなるが、第1エクソンはコード領域を持たず、翻訳開始コドンは第2エクソンに存在する。二つのZnフィンガーを持ち、C末端側のフィンガー(Cフィンガー)でDNAに結合する。N末端側のフィンガー(Nフィンガー)は、コファクターであるFriend of *GATA1*(FOG1)因子と結合し、これによりDNAへの結合が安定化する¹⁷⁻²¹⁾。第3エクソンには、第2のメチオニン(コドン84)が存在するが、野性型*GATA1*遺伝子においては完全長*GATA1*に加えて、選択的翻訳機構と選択的スプライシング機構によって、第2メチオニンから翻訳が起こり、N末端側にある転写活性化領域を欠いた*GATA1s*と呼ばれる短いイソフォームもわずかに発現する²²⁾。

DS-AMKLにみられる、*GATA1*の変異のほとんどは第2エクソンに集中しており、塩基置換、挿入、欠失、重複と様々な変異がみられる。その結果、完全長*GATA1*の発現はみとめられず、*GATA1s*のみが発現するようになる¹⁰⁻¹⁵⁾。一方、Nフィンガーにアミノ酸置換を起こす生殖細胞系列変異は、稀なX連鎖性血小板減少症およびタラセミアの原因になることが報告されており²³⁻²⁵⁾、*GATA1*は赤血球・巨核球の分化・増殖に重要な転写因子であることが確立している。

以前,我々はTAM, DS-AMKL と non-DS-AMKL の変異を比較するために次世代シーケンサーを用いたターゲットシーケンスを試みた. その結果, DS-AMKL は TAM にコヒーシ複合体関連遺伝子, エピジェネティック制御因子およびシグナル伝達系分子の変異が加わることによって発症すること, non-DS-AMKL にみられる *CBFA2T3/GLIS2* や *OTT/MAL* などのキメラ遺伝子は DS-AMKL には観察されないことなどを報告した. この結果は, DS-AMKL と non-DS-AMKL の発生には異なるメカニズムが関わっている可能性を示すものであった. しかし, この検索において non-DS-AMKL 19 例中 1 例に TAM や DS-AMKL では報告されなかった *GATA1* 変異を検出した²⁶⁾. 本研究で我々はこの新規の *GATA1* 変異の確認と機能解析を試み, non-DS-AMKL 発症におけるこの変異遺伝子の関与について考察した.

材料および方法

細胞株は, DS-AMKL 由来細胞株 KPAM1²⁷⁾ とウズラ線維肉腫細胞株 QT6 を用いた²⁸⁾. KPAM1 の培養には 10% ウシ胎児血清と Stem cell factor 50 ng/mL を添加した RPMI1640 培地を用いた. QT6 の培養には, 10%ウシ胎児血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地を用いた.

患者検体

患者(症例 #135)は男児. 在胎 37 週 2 日に変動一過性徐脈がみとめられ緊急帝王切開にて出生した. 出生時, 芽球を伴う白血球増多と血小板減少がみとめられた. 生後 3 日より哺乳良好となり体重増加も順調であったが, その後生後 1 ヶ月までに貧血の進行, 血小板減少, LDH 高値と肝脾腫をみとめ, 先天性白血病を疑われ当科に入院した. 入院時所見を表 1 に示す. 芽球の核型は 46, XY で正常であり, non-DS-AMKL と診断された.

本研究の検索には, 末梢血および骨髄細胞を用いた. 骨髄細胞は, buffy coat を採取し凍害防止液 CP-1(極東製薬)を用いて保存したものを用いた. 患者検体の使用に当たっては, 本研究の目的とその内容を説明し, 書面にて研究参加への同意を得ている. 本研究は弘前大学医学部倫理委員会の承認を得ている. DNA の抽出には QIAamp blood mini kit (QIAGEN) を, RNA の抽出には GeneJET RNA purification kit (Thermo Scientific) をマニュアルに従って用いた. 変異の検出およびクローニングに用いたオリゴヌクレオチドプライマーを表 2 に示した. cDNA の合成は 1 μ g の全 RNA を鋳型に, M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen) を用いてマニュアルに従って, random primer を用いて作成した.

DNA 塩基配列の検索

シーケンス反応には BigDye terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を用いて、解析には ABI prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

遺伝子導入とルシフェラーゼアッセイ

QT6 細胞 1×10^5 を一晩培養した後に, FuGENE HD (Promega) と DNA 500 ng を用いてマニュアルに従い遺伝子導入をした. 導入効率をモニターする目的で pEF シーパンジーベクターを同時に導入した. 培養 24 時間後に, 細胞を Dual-Luciferase reporter assay kit (Promega) に付属の溶解液を用いて処理し, ホタルルシフェラーゼ活性とウミシイタケルシフェラーゼ活性を測定した. 測定はルミノメーター Lumat LB 9507 (Berthold) を用いて quadruplicate で行った.

発現ベクターの作成

哺乳細胞用発現ベクター作成には pcDNA3.1 (Life technologies) を, レトロウイルス発現ベクターには pQCXIP (Clontech Laboratories) を用いて, 野性型および変異 *GATA1* cDNA を組み込むことにより作成した.

ウェスタンブロット解析

患者骨髄細胞および遺伝子導入細胞から Triple detergent buffer (50 mM Tris · Cl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02% Sodium azide, 0.1% SDS, 100 μ g/mL phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 μ g/mL aprotinin, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate) を用いてタンパクを抽出後, 常法に従って SDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分画し, Hybond-P (Amersham) に転写した. 一次抗体には抗 *GATA1* C 末端モノクローナル抗体 M-20 (Santa Cruz Biotechnology) および抗 *GATA1* N 末端モノクローナル抗体 D52H6 (Cell Signaling) を用い, HRP ラベルした二次抗体に用いた. 発光には ECL Western Blotting Detection reagents (Amersham) を用い, ChemiDoc MP imaging system (Bio-Rad) で検出した.

細胞増殖アッセイ

レトロウイルスのトランスダクションには, RetroNectin (タカラバイオ) を用い, マニュアルに従って導入し, 導入後 96 ウェルプレートに細胞を播き 24 時間

毎に6日間 quadruplicate で Cell counting kit-8 (同仁化学)を用いて細胞増殖を観察した。

結果

1. Non-DS-AMKL (#135) にみとめられた *GATA1* 変異の同定

我々は以前に, TAM から DS-AMKL への進行に関わる変異遺伝子を同定する目的で TAM, DS-AMKL それに non-DS-AMKL のサンプルを用いて全エクソン解析とターゲットシーケンス解析を行った. その過程において, non-DS-AMKL 症 19 例中 1 例 (症例 #135) において *GATA1* の第 4 エクソンの領域に 12bp の欠失 (c. 716_727del, p. 239_243del) を検出した.

この変異を確認する目的で, 患者の末梢血から採取したゲノム DNA を鋳型に, 第 4 エクソン領域を *GATA1_S4* および *GATA1_AS4* プライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法で増幅した. 増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法で調べたところ (図 1 A), ターゲットシーケンス解析で検出された 12 bp の欠失をみとめた. 次に, 患者末梢血の全 RNA を抽出し, これを鋳型に cDNA を作成し, この欠失を含む領域の増幅を第 4 エクソンにアニールするプライマー GF_1+ と第 5 エクソンにアニールするプライマー GF_1- を用いて増幅し, ダイレクトシーケンス法で塩基配列を検索した. その結果, cDNA においても 12bp の欠失を確認することができた (図 1D). これにより, NフィンガーとCフィンガーの間の4アミノ酸残基が欠失することが予想された (図 2A).

次に, #135 の第 2 と第 3 エクソンに変異がないことを確認するために, 末梢血由来ゲノム DNA プライマー *GATA1_S2* および *GATA1_AS2* で第 2 エクソンを含む領域を増幅し, *GATA1_S3* および *GATA1_AS3* で第 3 エクソンを含む領域を増幅した. その結果, *GATA1_S2*, *GATA1_AS2* の増幅産物に変異はみとめられなかったが, *GATA1_S3*, *GATA1_AS3* による増幅では期待される 573bp の増幅産物の他に小さなサイズの増幅産物が検出された (図 1B 矢印). この産物の塩基配列を検索したところ, 第 2 イントロンの一部と第 3 エクソンの一部を含む 366bp の欠失 (c. 221-33_553del) が検出された (図 1C). この変異は欠失している領域が大きかったために, ターゲットシーケンス解析では検出することができなかったと思われる.

このエクソン・イントロンの境界領域を含む欠失により, 第 3 エクソンのスプライシング異常が引き起こされることが予想されたことから, 我々は第 1 エクソンにアニールする *GATA1_S0* プライマーと第 6 エクソンにアニールする *GATA1_3' AS*

プライマーを用いて患者末梢血由来の cDNA を増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列を解析した (図 1E)。

その結果、第 3 エクソンを含まない転写産物(p. Val174_Cys199del) が検出され、さらにこの転写産物が前述の 12bp の欠失(c. 721_732del, p. Leu241_Pro244del)を同時に持つことを確認した。これは、両変異が同じ AMKL のクローンに由来することを示していた。今回検出された変異は、転写産物では 378bp と 12bp の欠失を引き起こすことから、変異体は N フィンガーより N 末端側 126 アミノ酸残基と C 末端側 4 アミノ酸残基を欠失した GATA1s より小さな翻訳産物であることが予想された(図 2A)。

そこで、我々は患者骨髄細胞からタンパク質を抽出しウェスタンブロット解析で変異タンパクの検出を試みた。その結果、GATA1s より小さなサイズにシグナルをみとめた (図 2B 上段 レーン 8)。また、このタンパク質は抗 GATA1 N 末端抗体によっても検出されたことから(図 2B 下段 レーン 8)、N 末端のドメインを有することが示された。対照として用いた GATA1s は抗 GATA1 N 末端抗体によって検出されなかった(図 2B 下段 レーン 2, 6)。また以前に TAM および DS-AMKL でみとめられた非常に稀なインフレーム欠失変異体 (ID type-1) も同時に解析に用いた。ID type-1 変異体は、#135 変異体の欠失領域と一部重複する 43 アミノ酸残基を欠失する変異体であり、第 3 エクソンの一部がスプライシング異常によって生じたものである²⁹⁾。ID Type-1 も #135 と同様に N 末端の転写活性化領域を持ち(図 2A) 抗 GATA1 N 末端抗体によって検出された(図 2B 下段 レーン 9)。

2. #135 変異 GATA1 の転写活性化能の検索

次に我々は、この患者にみとめられた変異 GATA1 因子 (#135) の転写活性化能の検索を試みた。まず、哺乳動物発現ベクターを作成した。患者骨髄細胞由来 cDNA を鋳型に GATA1 コード領域を増幅し、pcDNA3.1 ベクターにクローニングした。クローニング後、全長の塩基配列を確認した。この他に、完全長 GATA1、N 末端 83 アミノ酸を欠いた GATA1s、および以前に TAM および DS-AMKL でみとめられた稀なインフレーム欠失変異体 (ID type-1) 発現ベクターを用意した。ID type-1 ベクターは #135 変異体の欠失と一部重複する 43 アミノ酸残基を欠失する変異体であり、第 3 エクソンの一部がスプライシング異常を起こしたことによって生じた変異である(図 3)²⁹⁾。

転写活性化能をみるために、GATA1 の標的遺伝子である NFE2 (Gene ID 4778) の胎児型プロモーター領域 450 bp をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだ

fNF-E2_450_PICA リポーターベクターを, 前述の発現ベクターと同時に QT6 細胞株に導入した. リポーターベクターに組み込んだプロモーター領域には 3 個の GATA1 認識配列が存在するが, この全ての認識配列に塩基置換変異を導入した GATA1t_PICA ベクターも作成し対照とした³⁰⁾.

GATA1 認識配列をもつレポーターの活性は完全長 GATA1 と ID type-1 で高かったが, #135 変異体では N 末端側に存在する転写活性化領域を持っているにもかかわらず, GATA1s とほぼ同等の転写活性化能しか示さなかった.

いずれの変異体の転写活性化能も, GATA1 認識配列に変異を入れたレポーターベクターを用いた場合には極めて低く, GATA1 認識配列を介して機能していることが示唆された.

3. #135 変異 GATA1 の細胞増殖に対する影響

以前に我々は, GATA1s や ID type-1 などの TAM や DS-AMKL にみとめられる変異 GATA1 は完全長 GATA1 とは異なり, DS-AMKL 由来細胞株 KPAM1 に導入しても効率的に細胞増殖を抑制することが出来ないことを示した²⁹⁾. そこで同様の方法で #135 変異体が KPAM1 の増殖を抑制するかどうかを検索した. まずレトロウイルス発現ベクターを作成し, これを KPAM1 にトランスダクションした. その後, 96 ウェルプレートに播種し, 24 時間毎に細胞増殖をモニターした. その結果, #135 変異体は完全長 GATA1 ほどには増殖を抑制することができないことが示された (図 4).

考察

DS における TAM と DS-AMKL は, 前白血病状態から白血病発症にいたる過程を検索する上で貴重な疾患である. 極めて特異的な経過をたどるが, ここに腫瘍発生に共通のメカニズムが働いているか否かについては, より詳細な検索が待たれていた. 最近, 我々は次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析により, TAM の発症には 21 番染色体の過剰と GATA1 変異のみで条件を満たしているということ, また DS-AMKL への進展にはコヒーシン関連遺伝子, エピジェネティック制御関連遺伝子, それに JAK3, JAK2, RAS といったシグナル伝達系関連遺伝子の異常の蓄積が起こっていることを明らかにした²⁶⁾. 現在, DS-AMKL への進展に関わるこのような遺伝子の異常の多くは DS-AMKL に限らず他の白血病および腫瘍発生においても重要な機能を果たしていることが明らかになってきており^{31, 32)}, DS-AMKL 進展に関わる分子の機能解析は, 多くの腫瘍発生の機序を明らかにし, 新たな治療標的の発見や治療方法の開発につながる可能性がある. 一方, より詳細に 21 番染色体上の

遺伝子と *GATA1* 変異について検索することは、TAM や DS-AMKL がいかに巨核芽球性白血病の表現型を獲得するかを明らかにするために重要であると考えられる。

今回我々は、TAM と DS-AMKL では報告のないインフレーム欠失 *GATA1* 変異を有する正常核型 AMKL 症例を見出し、その変異 *GATA1* の機能解析を試みた。以前に我々は TAM において極めて稀なインフレーム欠失変異を二種類発見した。変異体はいずれも、*Gata1* を巨核球特異的にノックダウンしたマウスにおける巨核球系細胞の異常増殖を抑制することができず、TAM の原因となる可能性が強く示唆された。また、KPAM1 細胞株にこれらの変異体を導入しても完全長 *GATA1* とは異なり、増殖を抑制することができなかった²⁹⁾。このとき全ての変異体に共通してみられた欠失領域はコドン 77 から 83 の 7 アミノ酸残基に限られる。この領域は今回の #135 変異体でも欠失しており、#135 変異体もまた KPAM1 の増殖を抑制することができなかった。これらの知見はこの領域が *GATA1* の増殖制御機能に重要なドメインであることを強く示唆するものであると思われた。またいずれの変異も完全な機能喪失型の変異ではなく、*GATA1* の機能に必須な二つの Zn フィンガードメインが完全に保存されており、DNA への結合能や他因子との相互作用が変異 *GATA1* の機能に重要である可能性を示唆している。

またこの症例はターゲットシーケンス解析によって、小児 AMKL にみられる *CBFA2T3/GLIS2* や *OTT/MAL* キメラ遺伝子変異がみとめられず、稀な *JAK3* c. G2872A p. E958K のアミノ酸置換変異がみられた³¹⁾。*JAK3* の変異は non-DS-AMKL においてはほとんどみられないが、DS-AMKL では比較的高い頻度で検出される^{3,31,33)}。本症例では機能減弱型 *GATA1* 変異と *JAK3* 変異により白血病を発症している可能性が高い。本研究の結果は、non-DS-AMKL のサブセットの中に DS-AMKL と似た発症機構を有するものが存在する可能性を示唆する。non-DS-AMKL は異質性が高く、治療反応性が悪く予後不良な一群である。発症メカニズムの解明と表現型の詳細な検索によって、より効果的な治療法の開発が期待される。

謝辞

本研究は JSPS 科研費 25461579 の助成を受けたものです。

参考文献

- 1.) Athale UH, Razzouk BI, Raimondi SC, Tong X, Behm FG, Head DR, et al. Biology and outcome of childhood acute megakaryoblastic leukemia: a single institution's experience. *Blood*. 2001;97(12):3727-32.
- 2.) Hama A, Yagasaki H, Takahashi Y, Nishio N, Muramatsu H, Yoshida N, et al. Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) in children: a comparison of AMKL with and without Down syndrome. *Br J Haematol*. 2008;140(5):552-61.
- 3.) Hama A, Muramatsu H, Makishima H, Sugimoto Y, Szpurka H, Jasek M, et al. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2012;156(3):316-25.
- 4.) Gruber TA, Larson Gedman A, Zhang J, Koss CS, Marada S, Ta HQ, et al. An Inv(16)(p13.3q24.3)-encoded CBFA2T3-GLIS2 fusion protein defines an aggressive subtype of pediatric acute megakaryoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2012;22(5):683-97.
- 5.) Barnard DR, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange B, Woods WG. Comparison of childhood myelodysplastic syndrome, AML FAB M6 or M7, CCG 2891: report from the Children's Oncology Group. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(1):17-22.
- 6.) Creutzig U, Reinhardt D, Diekamp S, Dworzak M, Stary J, Zimmermann M. AML patients with Down syndrome have a high cure rate with AML-BFM therapy with reduced dose

- intensity. *Leukemia*. 2005;19(8):1355-60.
- 7.) Parker SE, Mai CT, Canfield MA, Rickard R, Wang Y, Meyer RE, et al. Updated National Birth Prevalence estimates for selected birth defects in the United States, 2004-2006. *Birth Defects Research Part A, Clinical and Molecular Teratology*. 2010;88(12):1008-16.
 - 8.) Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*. 2000;355(9199):165-9.
 - 9.) Zipursky A, Poon A, Doyle J. Leukemia in Down syndrome: a review. *Pediatr Hematol Oncol*. 1992;9(2):139-49.
 - 10.) Ahmed M, Sternberg A, Hall G, Thomas A, Smith O, O'Marcaigh A, et al. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood*. 2004;103(7):2480-9.
 - 11.) 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.
 - 12.) Hitzler JK, Cheung J, Li Y, Scherer SW, Zipursky A. GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood*. 2003;101(11):4301-4.
 - 13.) Rainis L, Bercovich D, Strehl S, Teigler-Schlegel A, Stark B, Trka J, et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood*. 2003;102(3):981-6.

- 14.) Groet J, McElwaine S, Spinelli M, Rinaldi A, Burtcher I, Mulligan C, et al. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*. 2003;361(9369):1617-20.
- 15.) Xu G, Nagano M, Kanezaki R, Toki T, Hayashi Y, Taketani T, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*. 2003;102(8):2960-8.
- 16.) Harigae H, Xu G, Sugawara T, Ishikawa I, Toki T, Ito E. The GATA1 mutation in an adult patient with acute megakaryoblastic leukemia not accompanying Down syndrome. *Blood*. 2004;103(8):3242-3.
- 17.) Evans T, Felsenfeld G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*. 1989;58(5):877-85.
- 18.) Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature*. 1989;339(6224):446-51.
- 19.) Trainor CD, Evans T, Felsenfeld G, Boguski MS. Structure and evolution of a human erythroid transcription factor. *Nature*. 1990;343(6253):92-6.
- 20.) Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipsen S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1215-27.
- 21.) Wolff L, Humeniuk R. Concise review: erythroid versus myeloid lineage commitment:

- regulating the master regulators. *Stem Cells*. 2013;31(7):1237-44.
- 22.) Calligaris R, Bottardi S, Cogoi S, Apezteguia I, Santoro C. Alternative translation initiation site usage results in two functionally distinct forms of the GATA-1 transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(25):11598-602.
- 23.) Nichols KE, Crispino JD, Poncz M, White JG, Orkin SH, Maris JM, et al. Familial dyserythropoietic anaemia and thrombocytopenia due to an inherited mutation in GATA1. *Nat Genet*. 2000;24(3):266-70.
- 24.) Freson K, Devriendt K, Matthijs G, Van Hoof A, De Vos R, Thys C, et al. Platelet characteristics in patients with X-linked macrothrombocytopenia because of a novel GATA1 mutation. *Blood*. 2001;98(1):85-92.
- 25.) Yu C, Niakan KK, Matsushita M, Stamatoyannopoulos G, Orkin SH, Raskind WH. X-linked thrombocytopenia with thalassemia from a mutation in the amino finger of GATA-1 affecting DNA binding rather than FOG-1 interaction. *Blood*. 2002;100(6):2040-5.
- 26.) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanezaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013;45(11):1293-9.
- 27.) Toki T, Kanezaki R, Adachi S, Fujino H, Xu G, Sato T, et al. The key role of stem cell factor/KIT signaling in the proliferation of blast cells from Down syndrome-related leukemia. *Leukemia*. 2009;23(1):95-103.

- 28.) Moscovici C, Moscovici MG, Jimenez H, Lai MM, Hayman MJ, Vogt PK. Continuous tissue culture cell lines derived from chemically induced tumors of Japanese quail. *Cell*. 1977;11(1):95-103.
- 29.) Toki T, Kanezaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, et al. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood*. 2013;121(16):3181-4.
- 30.) Toki T, Arai K, Terui K, Komatsu N, Yokoyama M, Katsuoka F, et al. Functional characterization of the two alternative promoters of human p45 NF-E2 gene. *Exp Hematol*. 2000;28(10):1113-9.
- 31.) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet*. 2013;45(10):1232-7.
- 32.) Huether R, Dong L, Chen X, Wu G, Parker M, Wei L, et al. The landscape of somatic mutations in epigenetic regulators across 1,000 paediatric cancer genomes. *Nature Communications*. 2014;5:3630.
- 33.) Malinge S, Ragu C, Della-Valle V, Pisani D, Constantinescu SN, Perez C, et al. Activating mutations in human acute megakaryoblastic leukemia. *Blood*. 2008;112(10):4220-6.

図説明

図1 症例 #135 にみとめられた変異

A: 患者#135 骨髄由来のゲノム DNA を鋳型に GATA1_S4, GATA1_AS4 を用いて第 4 エクソン領域を増幅しダイレクトシーケンス解析をした. 上段に *GATA1* 遺伝子エクソン 2~6 の模式図を示した. 青色の矢印は欠失による重複したシグナルを示した.

B: 患者#135 骨髄および K562 細胞株のゲノム DNA を鋳型に GATA1_S2, GATA1_AS2 および GATA1_3, GATA1_AS3 プライマーを用いて第 2 エクソンを含む領域と第 3 エクソンを含む領域を増幅した. 第3エクソンに予想より短い増幅産物がみとめられた. 矢印は欠失変異によると思われる増幅産物を指している.

C: 図 1B でみとめられた短い増幅産物をダイレクトシーケンス法で解析した. c. 221-33_553del がみとめられた. 上段に *GATA1* 遺伝子エクソン2~6の模式図を示した. 欠失領域を青の影で示した.

D: 患者 #135 骨髄由来の cDNA を鋳型にプライマー GF_1+と GF_1-を用いて増幅し, ダイレクトシーケンス解析した. c. 721_732del が検出された. 上段に *GATA1* の一部 cDNA の塩基配列とアミノ酸配列を示した. 欠失がみとめられた配列に影を付けた. 下段に泳動結果を示した. 欠失の境界を矢印赤で示した.

E: 患者 #135 骨髄由来の cDNA を鋳型にプライマー GATA1_S0 と GATA1_3' AS を用いて増幅し, ダイレクトシーケンス解析した. 第 3 エクソンのスプライシングが検出された. エクソンの境界に黒線を入れた.

図2 変異 *GATA1* 翻訳産物の模式図とウェスタンブロッティング解析

A: 変異 *GATA1* 翻訳産物の模式図

GATA1 : 完全長 *GATA1* 因子の構造を示した. AD は転写活性化ドメインを示している. 数字は翻訳開始メチオニンを 1 としたときのアミノ酸残基の番号. 灰色は Zn フィンガードメインを示している.

GATA1s : TAM および DS-AMKL で最も高頻度に見られる変異体. N 末端側にある転写活性化領域を欠いている.

#135 : 患者 #135 に発現していると予想される変異体. N-フィンガー領域を挟む 126 と 4 アミノ酸残基が欠失する.

ID type-1 : TAM で稀にみとめられたインフレーム欠失変異体. 転写活性化領域の下流 43 アミノ酸残基を欠いている.

B: QT6 細胞株に野生型および変異 *GATA1* 発現ベクターを導入し, 24 時間後にタンパクを抽出しウェスタンブロット解析をした. レーン 8 は患者#135 の骨髄細胞から抽出したタンパク質を用いた. 上段は C 末端領域を認識する M-20 抗体を用いた. 下段は N 末端領域 (コドン 13 グルタミン酸残基周辺) を認識する抗体を用いた. HEL 細胞には選択的翻訳機構による *GATA1s* の発現がわずかにみとめられる. また, DS-AMKL 細胞株細胞株 KPAM1 には極めて微量な完全長 *GATA1* がみとめられる

ことが知られている²⁷⁾.

図3 変異 GATA1 の転写活性化能の解析

上段: リポーターベクターの模式図 三角は GATA1 認識配列を示す. 左側: p45NF-E2 遺伝子のプロモーター領域 450 bp をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだものを (fNF-E2_PICA) レポーターとして, 図2に示した GATA1 発現ベクターを QT6 細胞に導入し, ルシフェラーゼ活性を測定した. 右側: fNF-E2_PICA にある三箇所の GATA1 認識配列に変異を導入したものを GATA1t_PICA をレポーターとした. fNF-E2_PICA に完全長 GATA1 を導入したものを 100 として相対活性を示した. 測定は quadruplicate で行い, 平均値と標準偏差を示した. MOCK には pcDNA3.1 を用いた. 実験は独立して 4 回行いそのうちの典型的な例をグラフに示した.

図4 変異 GATA1 による DS-AMKL 細胞株 KPAM1 の増殖抑制効果

種々変異 GATA1 発現レトロウィルスベクターを KPAM1 にトランスダクションし, 24 時間毎に生細胞を quadruplicate で測定した. 実験は独立して 4 回行い, 典型的な例をグラフに示した. MOCK には pQCXIP 空ベクター由来レトロウィルスを用いた.

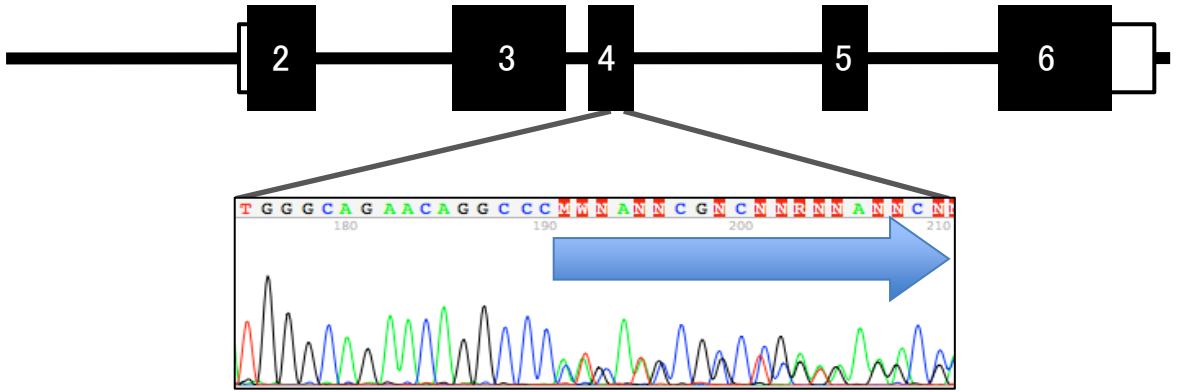
表1. 入院時検査成績

〈末梢血〉		〈骨髓検査〉	
赤血球数	183x10 ⁴ / μL	有核細胞数	87600 / μL
ヘモグロビン	6.2 g/dL	巨核球	0 / μL
白血球数	9550 / μL	M7様芽球	15 %
芽球	46 %	Peroxidase	-
分葉核球	9 %	PAS染色	-
桿状核球	0 %	Esterase	-
リンパ球	40 %	〈表面マーカー検索 (CD45 blast gating)〉	
単球	5 %	CD7	62 %
好酸球	0 %	CD13	32 %
血小板数	2.2x10 ⁴ / μL	CD33	43 %
〈生化学検査〉		CD34	45 %
Aspartate aminotransferase	25 U/L	CD41	55 %
Alanine aminotransferase	7 U/L	CD42b	26 %
Lactate dehydrogenase	675 U/L	CD61	41 %
Total bilirubin	5.2 mg/dL	Glycophorine	32 %
Direct bilirubin	0.2 mg/dL	CD56	28 %
Uric acid	2.6 mg/dL	HLA-DR	67 %
Blood urea nitrogen	5 mg/dL		
Creatinine	0.2 mg/dL		
Ca	9.6 mg/dL		
C-reactive protein	0.2 mg/dL		

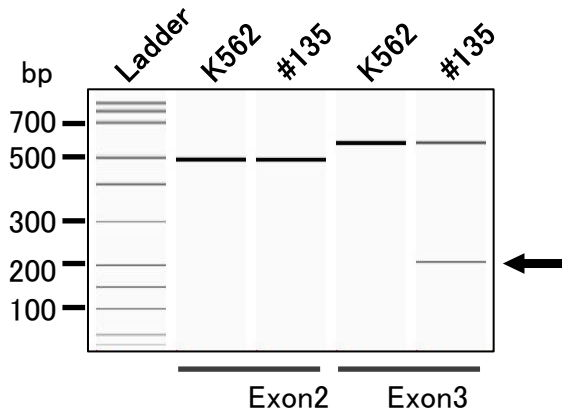
表2. オリゴヌクレオチドプライマー

プライマー	塩基配列 5'→3'
GATA1_S0	GGATCACACTGAGCTTGCCACATC
GATA1_3' AS	AAGGTTCAAGCCAGGGGGTGCCTG
GATA1_S2	TGAGGTGATGGAGTGGGAGGAGGG
GATA1_AS2	GGTCGGCACATCCATTTGAGAAGC
GATA1_S3	CCATGTTGGGGGTGCTGGGAACCA
GATA1_AS3	GTGGGGTGGAGAGGAGAAGAGGGA
GATA1_S4	AAAAAGGACAGGGAAGTTGAGGTG
GATA1_AS4	TGTGTAGGATGAAGGCAAGGGTTT
GF_1+	CAGGACAGGCCACTACCTATGCAA
GF_1-	CACCTGGTGTAGCTTGTAGTAGAG
For#135f	AGGCCACTACCTATGCAACG
For#135r	ATCCCCACTGGCATTCTC

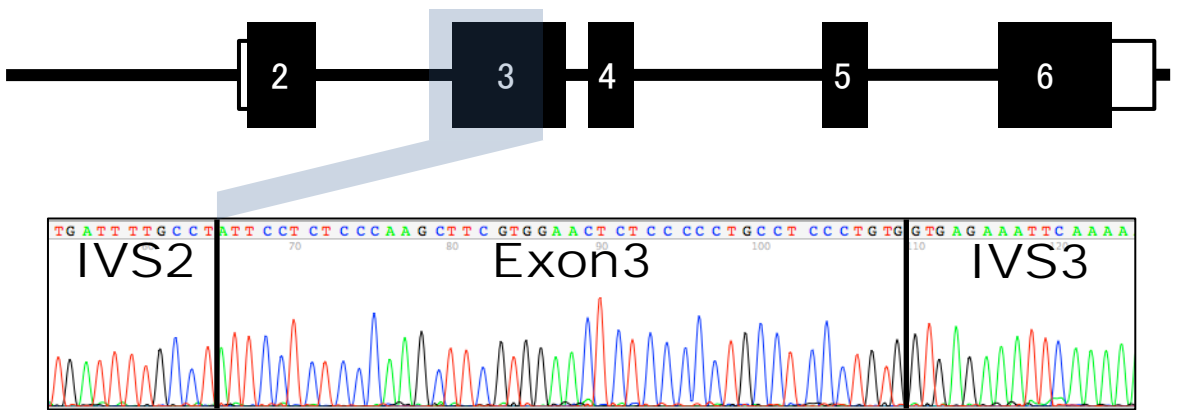
A



B



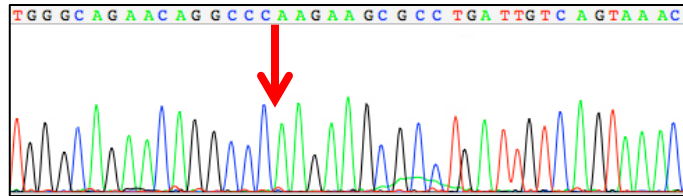
C



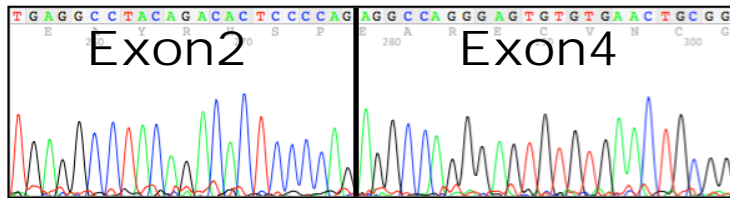
☒ 1

D

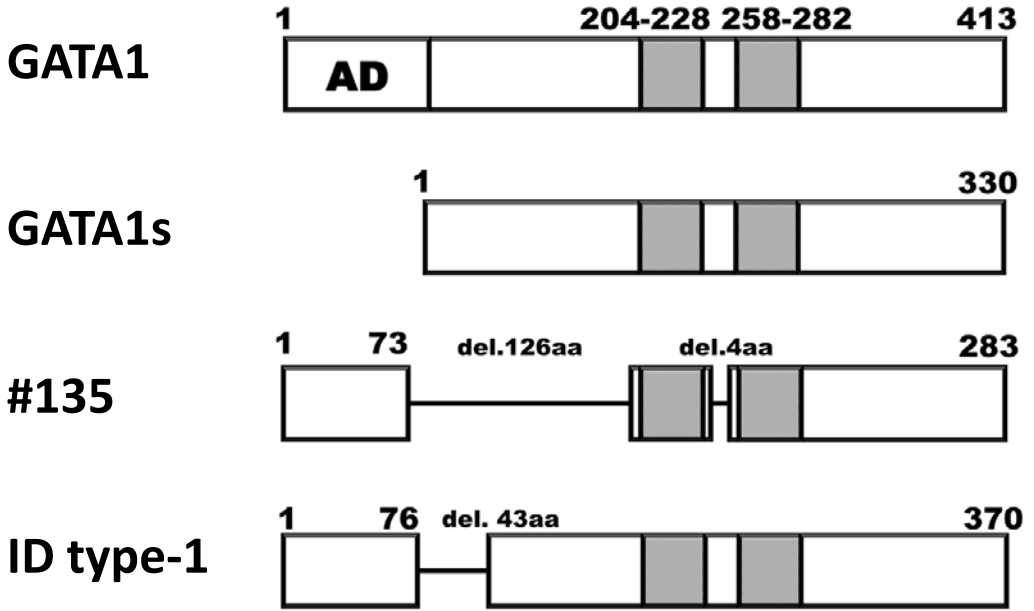
```
781 CTATGCAACGCCTGCGGCCTCTATCACAAGATGAATGGGCAGAACAGGCCCTCATCCGG
670 CTATGCAACGCCTGCGGCCTCTATCACAAGATGAATGGGCAGAACAGGCCCTCATCCGG
224 -L--C--N--A--C--G--L--Y--H--K--M--N--G--Q--N--R--P--L--I--R--
841 CCCAAGAAGCGCTGATTGTCAGTAAACGGGCAGGTACTCAGTGCACCAACTGCCAGACG
730 CCCAAGAAGCGCTGATTGTCAGTAAACGGGCAGGTACTCAGTGCACCAACTGCCAGACG
244 -P--K--K--R--L--I--V--S--K--R--A--G--T--Q--C--T--N--C--Q--T--
```



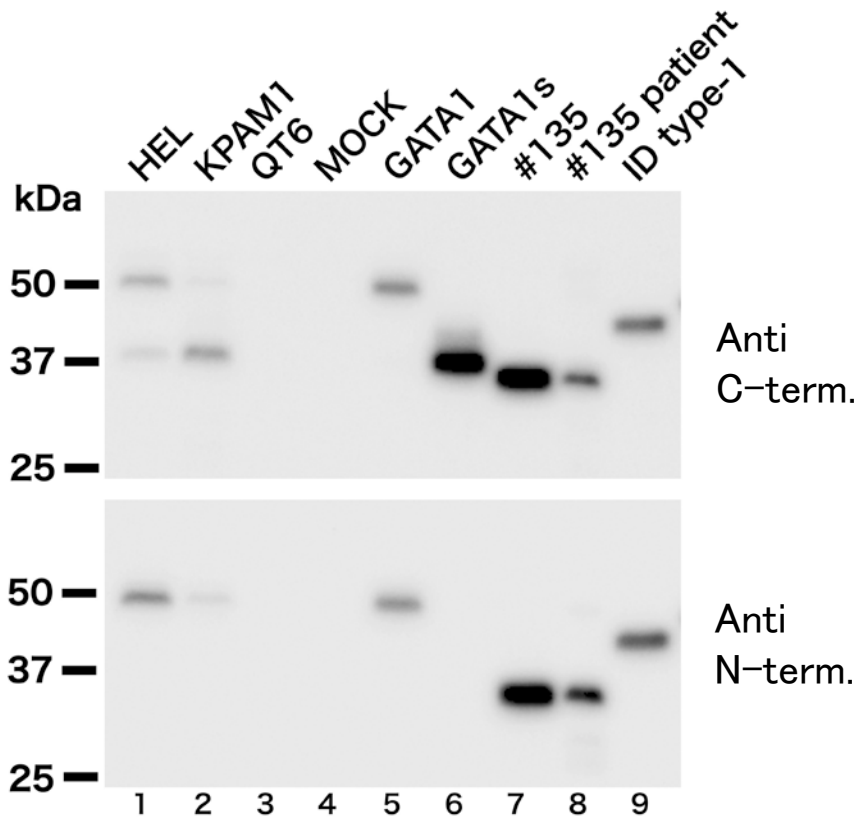
E



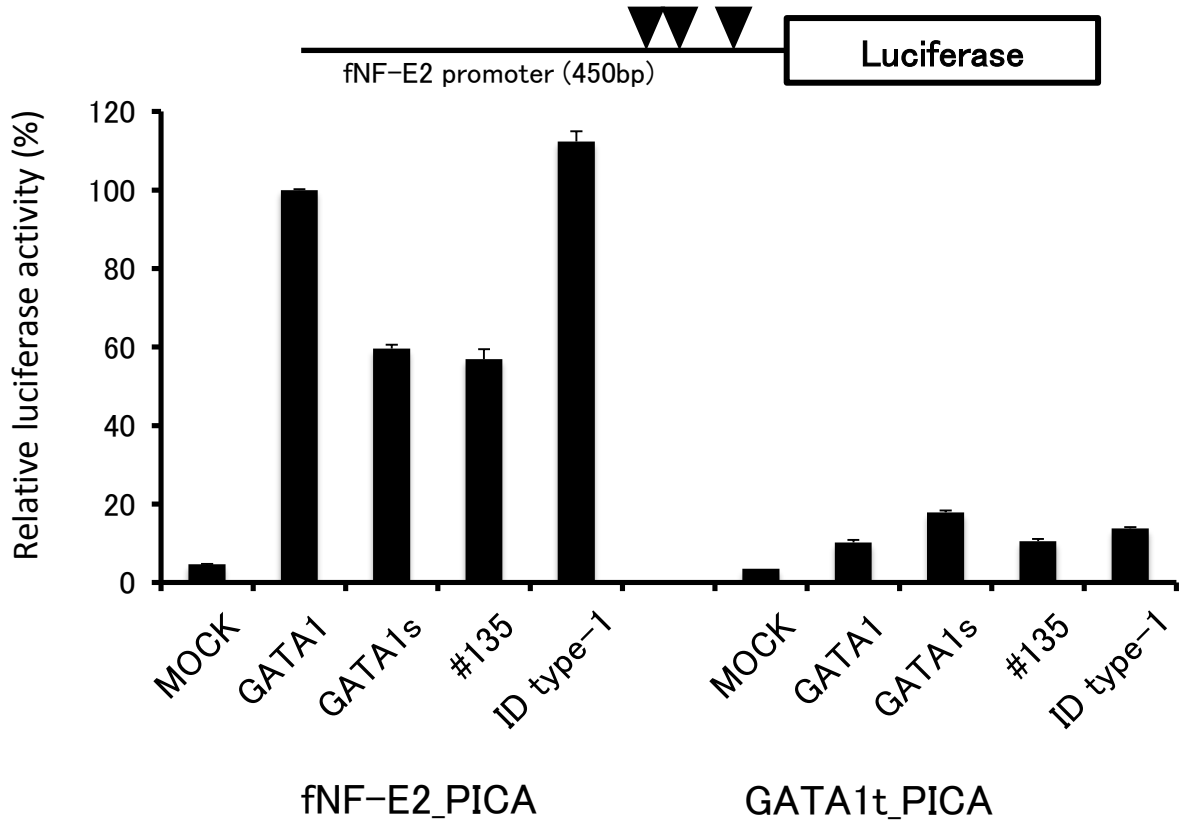
A



B



3



4

