

学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	成育科学領域小児病態学教育研究分野 氏名 王汝南
(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 <i>GATA1</i> インフレーム変異	
(内容の要旨) 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。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。転写因子 <i>GATA1</i> 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。DS-AMKL にみられる、 <i>GATA1</i> 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 <i>GATA1</i> の発現はみとめられず、 <i>GATA1s</i> のみが発現するようになる。本研究で我々はこの新規の <i>GATA1</i> 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 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。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 と RNA の抽出、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。genomic DNA と cDNA 塩基配列の検索。発現ベクターを QT6 細胞導入とルシフェラーゼアッセイ。患者骨髄細胞および遺伝子導入細胞からウェスタンブロット解析。細胞増殖アッセイ導入後 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 Non-DS-AMKL (#135) にみとめられた <i>GATA1</i> 変異の同定。 <i>GATA1</i> 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。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。第3エクソンを含まない転写産物(p.Val74_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。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。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抗GATA1 N末端抗体によって検出された。#135変異GATA1の転写活性化能の検索。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。#135変異GATA1の細胞増殖に対する影響は完全長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。

考察

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。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。*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。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。