

**Table 1. Clinical features and mutation characteristics in TAM patients with GATA1 mutations**

Patient No.	Sex	WBC, $\times 10^9/L$	Outcome	GATA1 mutation*	Consequence of mutation	Mutation type
1 <sup>13,24</sup>	F	63.9	CR	207 C>G	Tyr69stop	PTC 1-3'
2 <sup>13</sup>	F	89.0	Early death	199 G>T	Glu67stop	PTC 1-3'
3 <sup>13</sup>	F	NA	NA	174 ins 19 bp CAGCCACCGCTGCAGCTGC	Frame shift at codon 58, stop at codon 73	PTC 1-3'
4 <sup>13</sup>	F	128.8	CR	IVS1 to IVS2 del 1415 bp	Splice mutant	Splicing error
5 <sup>13</sup>	F	NA	NA	49 C>T	Gln17stop	PTC 1-5'
6 <sup>13</sup>	F	248.6	NA	Loss of 2nd exon	Splice mutant	Splicing error
7 <sup>13</sup>	F	31.2	CR	Loss of 2nd exon	Splice mutant	Splicing error
8 <sup>13</sup>	M	199.6	CR	-11 to +33 del 44 bp	No translation from Met1	Loss of 1st Met
9 <sup>13</sup>	M	44.9	Early death	45 ins C	Frame shift at codon 15, stop at codon 39	PTC 1-5'
10 <sup>13</sup>	M	50.9	CR	37 G>T	Glu13stop	PTC 1-5'
11 <sup>13</sup>	F	103.0	Early death	90-91 del AG	Frame shift at codon 30, stop at codon 38	PTC 1-5'
12 <sup>13</sup>	F	14.6	Evolved to ML-DS	116 del A	Frame shift at codon 39, stop at codon 136	PTC 2
13 <sup>13</sup>	M	423.0	CR	185 ins 22 bp GCTGCAGCTGCGGCACTGGCCT	Frame shift at codon 62, stop at codon 74	PTC 1-3'
14 <sup>13</sup>	M	201.2	CR	189 C>A	Tyr63stop	PTC 1-3'
15 <sup>13</sup>	M	NA	NA	1 A>G	No translation from Met1	Loss of 1st Met
16 <sup>13</sup>	F	28.3	CR	189 C>A	Tyr63stop	PTC 1-3'
17 <sup>13</sup>	M	203.0	Evolved to ML-DS	38-39 del AG	Frame shift at codon 13, stop at codon 38	PTC 1-5'
18 <sup>13</sup>	M	31.3	CR	189 C>A	Tyr63stop	PTC 1-3'
19 <sup>13</sup>	M	NA	NA	90-91 del AG	Frame shift at codon 30, stop at codon 38	PTC 1-5'
20 <sup>13</sup>	F	114.0	Early death	187 ins T	Frame shift at codon 63, stop at codon 67	PTC 1-3'
21 <sup>25</sup>	F	26.0	Evolved to ML-DS	194 ins 20 bp GGCCTGGCCTACTACAGGG	Frame shift at codon 65, stop at codon 143	PTC 2
22 <sup>25</sup>	F	25.0	Evolved to ML-DS	194 ins 20 bp GGCCTGGCCTACTACAGGG	Frame shift at codon 65, stop at codon 143	PTC 2
23	F	49.9	CR	3 G>T	No translation from Met1	Loss of 1st Met
24	F	46.2	NA	IVS1 3' boundary AG>AA	Splice mutant	Splicing error
25	F	10.5	CR	194 ins 19 bp GCACTGGCCTACTACAGGG	Frame shift at codon 65, stop at codon 73	PTC 1-3'
26 <sup>24</sup>	F	244.0	Evolved to ML-DS	1 A>G	No translation from Met1	Loss of 1st Met
27	F	38.3	CR	Loss of 2nd Exon	Splice mutant	Splicing error
28 <sup>24</sup>	F	34.6	CR	IVS1 to exon2 del 148 bp	Splice mutant	Splicing error
29	M	25.9	Evolved to ML-DS	160 ins TC	Frame shift at codon 54, stop at codon 137	PTC 2
30	F	52.3	Evolved to ML-DS	187 ins CCTAC	Frame shift at codon 63, stop at codon 138	PTC 2
31 <sup>24</sup>	F	221.0	CR	183-193 del 11 bp CTACTACAGGG	Frame shift at codon 62, stop at codon 63	PTC 1-3'
32	M	149.7	CR	2 T>G	No translation from Met1	Loss of 1st Met
33 <sup>24</sup>	M	132.3	Evolved to ML-DS	101-108 del 8 bp TCCCTCT	Frame shift at codon 34, stop at codon 36	PTC 1-5'
34 <sup>24</sup>	F	220.0	Early death	90-91 del AG	Frame shift at codon 30, stop at codon 38	PTC 1-5'
35 <sup>24</sup>	M	166.0	Early death	IVS2 5' boundary GT>CT	Splice mutant	Splicing error
36 <sup>24</sup>	M	57.6	Early death	193-199 GACGCTG>TAGTAGT	Asp65stop	PTC 1-3'
37 <sup>24</sup>	M	247.6	Early death	Exon2 to IVS2 del 218 bp	Splice mutant	Splicing error
38 <sup>24</sup>	M	93.3	Early death	IVS1 3' boundary AG>AA	Splice mutant	Splicing error
39 <sup>24</sup>	M	290.8	Early death	186 ins 12 bp GGCCTGGCCTA	Tyr62stop	PTC 1-3'
40	F	7.8	CR	2 T>C	No translation from Met1	Loss of 1st Met
41 <sup>24</sup>	M	136.6	Early death	IVS2 5' boundary GT>GC	Splice mutant	Splicing error
42	M	33.1	Early death	187 ins 8 bp TGGCTAC	Frame shift at codon 63, stop at codon 139	PTC 2
43	M	9.0	CR	22 ins G	Frame shift at codon 8, stop at codon 39	PTC 1-5'
44	M	24.1	Evolved to ML-DS	149 ins 20 bp AGCAGCTTCTCCACTGCC	Frame shift at codon 50, stop at codon 143	PTC 2
45 <sup>24</sup>	F	53.3	CR	173 C>TGCTGCAGTGTAGTA	Frame shift at codon 58, stop at codon 141	PTC 2
46	F	119.0	CR	1 A>C	No translation from Met1	Loss of 1st Met
47	M	33.0	CR	189 C>A	Tyr63stop	PTC 1-3'
48	M	178.2	Early death	188 ins 22 bp GCAGCTGCGGCACTGGCCTACT	Frame shift at codon 63, stop at codon 74	PTC 1-3'
49	F	73.6	CR	3 G>A	No translation from Met1	Loss of 1st Met
50	F	12.9	CR	158 ins 7 bp AGCACAG	Frame shift at codon 53, stop at codon 69	PTC 1-5'
51	M	13.0	CR	154-161 del 8 bp ACAGCCAC	Frame shift at codon 52, stop at codon 64	PTC 1-5'
52	M	105.5	Early death	4 G>T	Glu2stop	PTC 1-5'
53	F	98.3	CR	4 G>T	Glu2stop	PTC 1-5'
54	F	356.9	CR	219 A>C	Splice mutant	Splicing error
55	F	25.8	Evolved to ML-DS	157 ins CA	Frame shift at codon 53, stop at codon 137	PTC 2
56	M	97.4	Evolved to ML-DS	185-188 del 4 bp ACTA	Frame shift at codon 62, stop at codon 135	PTC 2
57	F	97.3	Early death	3 G>A	No translation from Met1	Loss of 1st Met
58	M	NA	CR	3 G>A	No translation from Met1	Loss of 1st Met
59	M	20.2	CR	150 ins 5 bp TGGCT	Frame shift at codon 50, stop at codon 52	PTC 1-5'
60	M	133.4	CR	174 ins 19 bp CAAAGCAGCTGCAGCGGTG	Frame shift at codon 58, stop at codon 73	PTC 1-3'
61	M	NA	CR	220 G>T	Splice mutant	Splicing error
62	M	120.2	CR	220 G>A	Splice mutant	Splicing error
63	F	39.0	CR	97-139 del 43 bp	Frame shift at codon 33, stop at codon 122	PTC 2
64	F	NA	NA	156 ins C	Frame shift at codon 52, stop at codon 67	PTC 1-5'
65	F	32.4	CR	174 ins 7 bp CTGCAGC	Frame shift at codon 58, stop at codon 69	PTC 1-3'
66	M	69.4	Early death	174-177 GGCA>TGCGGTGG	Frame shift at codon 58, stop at codon 68	PTC 1-3'

We previously reported the GATA1 mutations of the indicated patients.

F indicates female; M, male; CR, complete remission; NA, not available; and IVS, intervening sequence.

\*For cDNA nucleotide numbering, nucleotide number 1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence.

**Table 2. GATA1 expression vectors used in this study**

Name	Patient no.	GATA1 mutation*	Last normal GATA1 amino acid	PTC	Mutation type
WG	—	—	Ser413	—	Normal
SP1	24, 38	intron1 3' boundary AG>AA	Ser413	—	Splicing error
SP2	41	intron2 5' boundary GT>GC	Ser413	—	Splicing error
L	46	1 A>C	(Met1 is replaced by Val1)	—	Loss of 1st Met
P1-1	11, 19, 34	90, 91 del AG	Gly31	38	PTC 1-5'
P1-2	14, 16, 18, 47	189 C>A	Tyr62	63	PTC 1-3'
P1-3	25	194 ins 19 bp	Arg64	73	PTC 1-3'
P1-4	17	38, 39 del AG	Ser12	38	PTC 1-5'
P1-5	33	101-108 del 8 bp	Phe33	36	PTC 1-5'
P1-6	50	158 ins 7 bp	Tyr52	69	PTC 1-5'
P1-7	3	174 ins 19 bp	Ala58	73	PTC 1-3'
P1-8	48	188 ins 22 bp	Try62	74	PTC 1-3'
P2-1	21, 22	194 ins 20 bp	Arg64	143	PTC 2
P2-2	44	149 ins 20 bp	Ala49	143	PTC 2
P2-3	29	160 ins TC	Ala53	137	PTC 2

— indicates not applicable.

\*For cDNA nucleotide numbering, nucleotide number 1 corresponds to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence.

in cells transfected with PTC type 2 constructs, whereas the mRNA levels in mutants that had lost the first methionine and PTC type 1 mutants were almost comparable to those of control minigene constructs harboring wild type *GATA1* gene (Figure 2Aiii). Thus, abundant proteins were produced from *GATA1* mRNAs in mutants with splicing errors and those that lost the first methionine. Conversely, relatively low levels of protein were produced by PTC type 2 mutants because of inefficient translation and reduced levels of message (Figure 2Ai,iii). However, in the case of PTC type 1 mutations, especially P1-1 and P1-4, we could find no correlation between the amount of transcripts or translation efficiency and the expression levels of GATA1s proteins (Figure 2Ai,iii).

#### GATA1s expression levels largely depend on the amount of the alternative splicing form

To investigate the precise relationship between PTC type 1 mutations and GATA1s protein levels, we examined more type 1 mutations

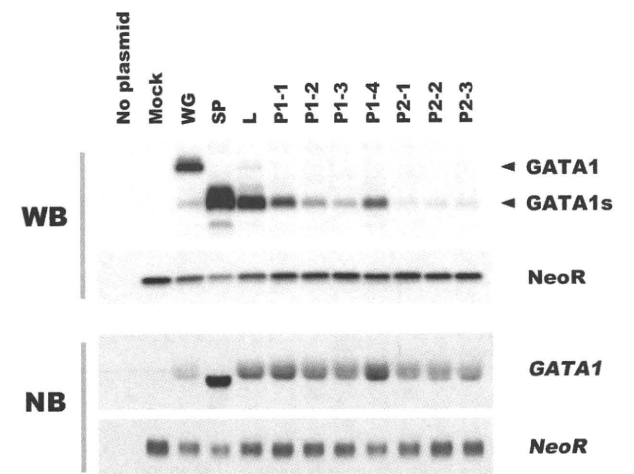
using the minigene constructs. Western blot analysis showed relatively higher expression of the proteins in samples expressing P1-5, P1-7, P1-8, P1-2, and P1-3 than the other constructs (Figure 2Bi). Each mutation in the mutant minigene construct is described in Table 2. Interestingly, all samples that expressed higher levels of GATA1s protein exhibited intense signals at lower molecular weights than the dominant GATA1 signal (Figure 2Biii). Because the size of the lower molecular weight band was identical to that observed in the splicing error mutant (Figure 2Biii), we speculated that the signal might be derived from a transcript lacking exon 2 ( $\Delta$ exon 2) by alternative splicing. To examine that possibility, we attempted Northern blot analysis using the *GATA1* exon 2 fragment as a probe, and as expected, only the longer transcript was detected (Figure 2Biv). To confirm the correlation between the amount of  $\Delta$ exon 2 transcript and GATA1s protein, we performed a quantitative assessment by densitometric analysis. The results showed a strong correlation between  $\Delta$ exon 2 transcript and GATA1s protein

**Table 3. Findings at diagnosis and during the course of TAM were significantly associated with early death and the progression to leukemia (univariate analysis)**

Variable	Total (n = 66)	Early death (n = 16)	P	Progressed to ML-DS (n = 11)	P
<b>Sex</b>					
Male, n (%)	32 (48.5)	11 (68.8)		5 (45.5)	
Female, n (%)	34 (51.5)	5 (31.3)	.088	6 (54.5)	.947
Median gestational age, wk (range)	37.35 (30.0-40.6)	34.6 (30.0-38.4)		38.1 (32.6-40.6)	
<b>Term versus preterm</b>					
Term ( $\geq$ 37 weeks), n (%)	27 (58.7)	4 (30.8)		5 (71.4)	
Preterm (< 37 weeks), n (%)	19 (41.3)	9 (69.2)	.021	2 (28.6)	.465
Median birth weight, kg (range)	2.5 (1.4-3.5)	2.2 (1.6-2.7)		2.5 (1.6-3.5)	
<b>Not LBW versus LBW</b>					
Not LBW ( $\geq$ 2.5 kg), n (%)	24 (52.2)	3 (23.1)		3 (42.9)	
LBW (< 2.5 kg), n (%)	22 (47.8)	10 (76.9)	.025	4 (57.1)	.184
Median WBC, $\times 10^9/L$ (range)	69.4 (7.8-423.0)	104.3 (33.1-290.8)		26 (14.6-244.0)	
<b>WBC &lt; <math>70 \times 10^9/L</math> vs WBC <math>&gt; 70 \times 10^9/L</math></b>					
WBC < $70 \times 10^9/L$ , n (%)	30 (50.8)	4 (25.0)		7 (63.6)	
WBC $> 70 \times 10^9/L$ , n (%)	29 (49.2)	12 (75.0)	.020	4 (36.4)	.755
Median peripheral blasts, % (range)	56.0 (4.0-94.0)	78.0 (8.0-93.0)	.031	49.5 (6.0-66.0)	.752
Median AST, IU/L (range)	61 (16-4341)	79 (41-3866)	.620	51 (16-153)	.553
Median ALT, IU/L (range)	39 (4-653)	41 (7-473)	.455	12 (4-96)	.615
Median T-Bil mg/dL (range)	6.3 (0.6-46.0)	6.06 (2.4-16.5)	.922	3.01 (1.82-6.50)	.023
Effusions, n (%)	16 of 44 (36.4)	8 of 11 (72.7)	.007	1 of 7 (14.3)	.912
Bleeding diatheses, n (%)	13 of 45 (28.9)	8 of 12 (66.7)	.001	1 of 7 (14.3)	.123

Some clinical data were not available. We defined the number of patients for whom clinical data was available as (n).

LBW indicates low birth weight; AST, aspartate transaminase; ALT, alanine transaminase; and T-Bil, total bilirubin.



**Figure 1. Effects of mutant transcripts of *GATA1* on the expression level of the truncated protein.** The *GATA1* mutations observed in TAM patients are classified according to the types of transcripts. The translational efficiency of each transcript was assessed by Western blot analysis in BHK-21 cells transfected with *GATA1* cDNA expression vectors (top part of the panel) and Northern blot analysis (bottom part of the panel), respectively. WG indicates wild type *GATA1*; SP, splicing error mutation ( $\Delta$ exon 2); L, loss of first methionine mutation; P1, PTC type 1 mutation; P2, PTC type 2 mutation. The details of the *GATA1* mutations are summarized in Table 1. NeoR indicates Neomycin phosphotransferase II.

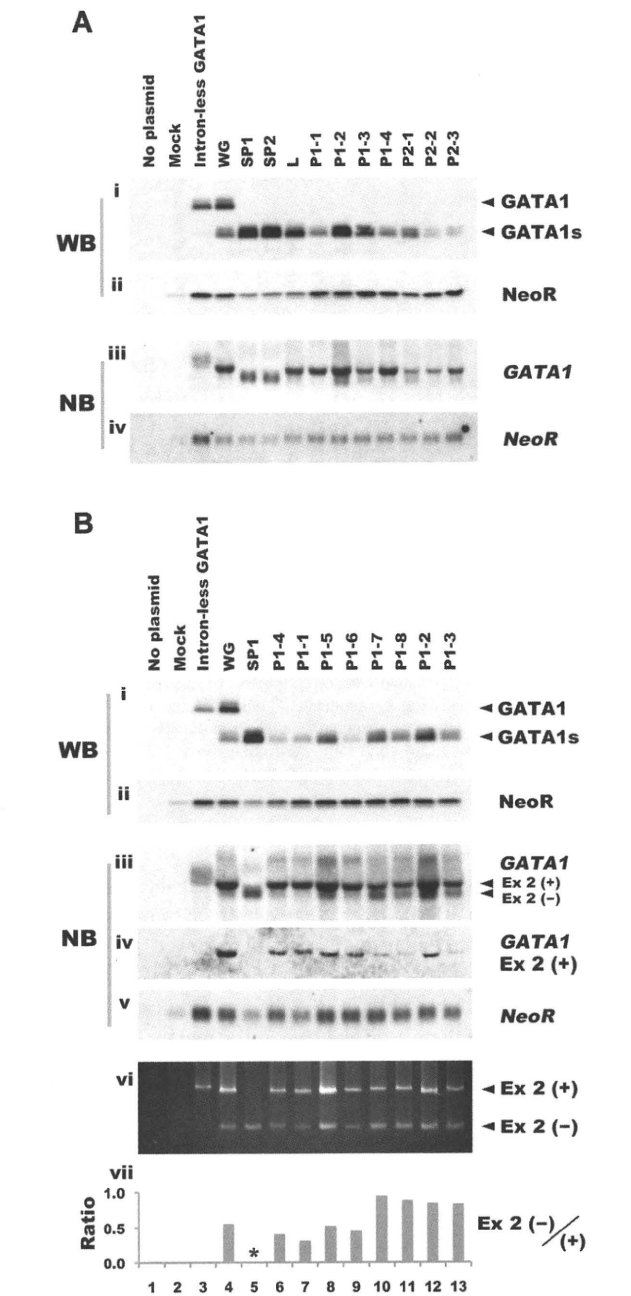
levels ( $r = 0.892$ ,  $P = .003$ ), but not with the long transcript containing exon2 nor total *GATA1* mRNA (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article). Next, we performed RT-PCR using primers recognizing both transcripts, and calculated the ratio of  $\Delta$ exon 2 to the long transcript (Figure 2Bvi-vii). The intensive short transcript was detected in all samples with higher expression of *GATA1s* (P1-5, P1-7, P1-8, P1-2, and P1-3; Figure 2Bvii). Interestingly, most of these mutations were clustered in the 3' region of exon 2 (Table 2, Figure 2Bvii). These results suggest that the location of the mutation predicts the efficiency of alternative splicing and *GATA1s* expression levels.

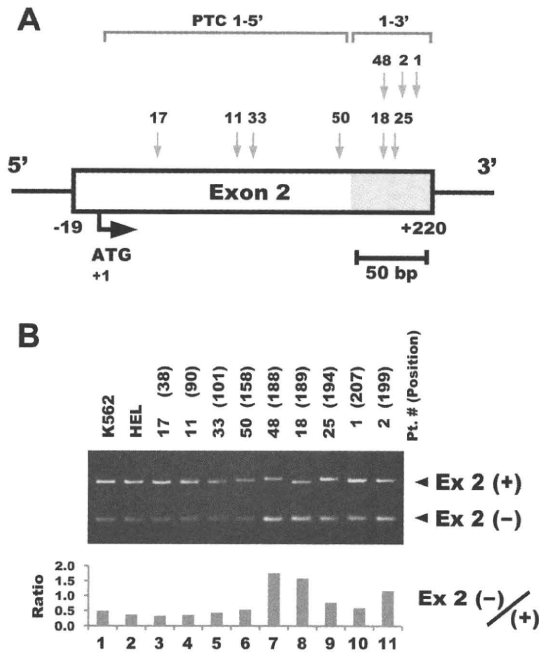
To examine whether differential splicing efficiency could also be observed in TAM blasts with PTC type 1 mutations, RT-PCR analysis was performed using patients' clinical samples. Intense transcription of the short form was observed in the samples from the patients who had *GATA1* mutations located on the 3' side of exon 2 (+169 to +218 in mRNA from the ATG translation initiation codon; Figure 3A-B). We refer to them as PTC type 1-3' and the mutations located on the 5' side of exon 2 as PTC type 1-5'.

**Correlation of the phenotype and *GATA1* mutations in TAM patients**

Based on these results, *GATA1* mutations were classified into 2 groups: a high *GATA1s* expression group (*GATA1s* high group) including the loss of first methionine type, the splicing error type, and PTC type 1-3', and a low *GATA1s* expression group (*GATA1s* low group) including PTC type 1-5' and PTC type 2. We classified TAM patients into these 2 groups in accordance with the *GATA1s* expression levels estimated from the mutations and compared their clinical data. High counts of WBC and blast cells were significantly associated with the *GATA1s* high group ( $P = .004$  and  $P = .008$ , respectively; Table 4). Although high WBC count was correlated with early death, there were no significant differences in the cumulative incidence of early death between the 2 groups (Figure 4). Importantly, TAM patients in the *GATA1s* low group had a

significantly higher risk for the development of leukemia ( $P < .001$ ; Figure 4). Of 11 TAM patients who progressed to ML-DS, 10 belonged to the *GATA1s* low group. Notably, 8 patients among them had PTC type 2 mutations (Tables 1, 5).





**Figure 3. The location of the PTC type 1 mutation affects the efficiency of alternative splicing in TAM blast cells.** (A) The location of the *GATA1* mutation in each TAM patient. Details of the mutation in each sample are described in Table 1. (B) RT-PCR analysis of *GATA1* in TAM blast cells harboring PTC type 1 mutations. RT-PCR was performed using primers recognizing both the long transcript including exon 2 and  $\Delta$ exon 2 (top). All of the patient samples consisted of mononuclear cells from peripheral blood. The numbers in parentheses indicate the number of nucleotides in mRNA from the translation initiation codon. Ex 2(+) and Ex 2(-) indicate PCR products with or without exon 2, respectively (middle). Ratio of Ex 2(-)/(+) was calculated from the results of a densitometric analysis of the RT-PCR (bottom). Note that the intense bands of the short form were observed in the samples from the patients who have *GATA1* mutations located on the 3' side of exon 2 (lanes 7-11).

To validate this observation, we examined the proportion of mutation types in 40 ML-DS patients observed in the same period of time as this surveillance. The results showed a significantly higher incidence of *GATA1*s low type mutations in ML-DS than in TAM ( $P = .039$ ; Table 5). These results further support the present findings that quantitative differences in the mutant protein have a significant effect on the risk of progression to ML-DS.

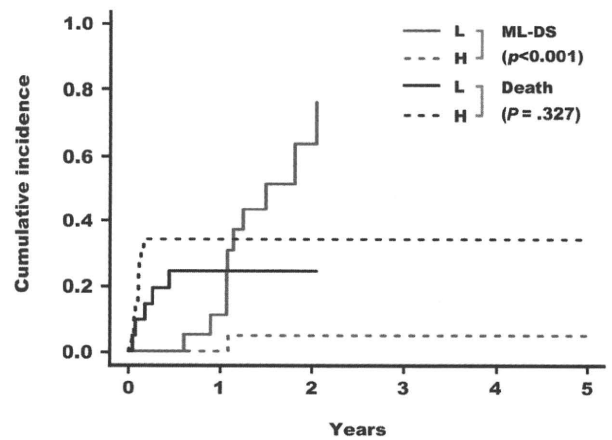
**Table 4. Correlations between patient covariates and *GATA1* expression levels**

	GATA1s expression group		<i>P</i>
	High (n = 40)	Low (n = 26)	
Sex: male/female, n	19/21	13/13	.843*
Gestational age, wk	37.3 (30.0-40.0)	37.9 (32.6-40.6)	.487
Birth weight, kg	2.5 (1.6-3.3)	2.5 (1.4-3.5)	.698
WBC, $\times 10^9/L$	105.65 (7.8-423.0)	39.0 (9.0-220.0)	.004
Number of blasts, $\times 10^9/L$	72.1 (0.42-301.6)	13.4 (0.45-189.2)	.008
AST, IU/L	68.5 (23-501)	46.5 (16-434)	.113
ALT, IU/L	41.0 (5-407)	12.5 (4-653)	.075
T-Bil mg/dL	6.7 (0.6-15.3)	4.65 (1.82-46.0)	.270
Effusions, n (%)	11 of 27 (40.7)	5 of 17 (29.4)	.447†
Bleeding diatheses, n (%)	8 of 29 (27.6)	5 of 16 (31.3)	.528†

Values are given as the median (range). *P* values estimated by Mann-Whitney *U* test.

\*Pearson  $\chi^2$  test.

†Fisher exact test.



**Figure 4. Cumulative incidence of early death and of ML-DS in children with TAM.** Based on the estimated *GATA1*s expression levels, patients were classified in 2 groups: *GATA1*s high and low groups. TAM patients in the *GATA1*s low group had a significantly higher risk for the development of leukemia ( $P$  (gray)  $< .001$ ).

## Discussion

In TAM, *GATA1* mutations lead to the expression of proteins lacking the N-terminal transactivation domain. In addition to this qualitative change, we showed here that the mutations affect the expression level of the truncated protein. The mutations were classified into 2 groups according to the estimated *GATA1*s expression level. Comparison of the clinical features between the 2 groups revealed that *GATA1*s low mutations were significantly associated with a high risk of progression to ML-DS and lower counts of both WBC and blast cells. These results suggest that quantitative differences in protein expression caused by *GATA1* mutations have significant effects on the phenotype of TAM.

*GATA1*s was shown previously to be produced from wild-type *GATA1* through 2 mechanisms: use of the alternative translation initiation site at codon 84 of the full-length transcript and alternative splicing of exon 2.<sup>12,26</sup> However, the translation efficiencies of *GATA1*s from the full-length of mRNA and short transcripts have not been investigated. Our results clearly showed that the  $\Delta$ exon 2 transcript produced *GATA1*s much more abundantly than did the full-length transcript. The translation efficiencies of *GATA1*s from full-length transcripts containing PTC were also lower than the alternative spliced form. These results support our contention that *GATA1*s expression levels largely depend on the amount of the  $\Delta$ exon 2 transcript. Thus, one cannot predict the expression level of *GATA1*s protein from the total amount of the transcript.

The differences in the quantities of *GATA1*s proteins expressed by PTC type 1-5' and -3' mutations revealed the importance of the location of the mutation for splicing efficiency and protein expression. The splicing efficiency is regulated by *cis*-elements located in exons and introns (referred to as exonic and intronic splicing enhancers or silencers), and transacting factors recognizing these elements.<sup>27,28</sup> The PTC type 1-3' mutations induced efficient skipping of exon 2 (Figures 2Bvi-vii, 3A-B). These mutations might affect exonic splicing enhancers or silencers located in exon 2. To predict the splicing pattern from the mutations more accurately, the elucidation of *cis*-elements and transacting splicing factors, which regulate the splicing of exon 2 of *GATA1*, will be very important.



**Table 5. Summary of outcomes and *GATA1* mutation types in TAM patients**

Mutation type	Outcome of TAM				TAM		ML-DS	
	CR	Early death	Evolved to ML-DS	NA	Total (n = 66)		Total (n = 40)	
High group								
Loss of 1st Met, n (%)	7	1	1	1	10 (15.2)		3 (7.5)	
Splicing error, n (%)	7	4	0	2	13 (19.7)	40 (15.2)	6 (15.0)	16 (40.0)
PTC 1-3', n (%)	10	6	0	1	17 (25.8)		7 (17.5)	
Low group								
SPTC 1-5', n (%)	6	4	2	3	15 (22.7)	26 (39.4)	14 (35.0)	24 (60.0)
PTC 2, n (%)	2	1	8	0	11 (16.7)		10 (25.0)	

The nonsense mediated RNA decay pathway (NMD), a cellular mechanism for detection of PTC and prevention of translation from aberrant transcripts,<sup>29,30</sup> might regulate the expression of *GATA1*s protein derived from PTC type 2 mutations, which contained PTCs after the second methionine at codon 84. We consistently detected low amounts of transcripts of *GATA1* in samples expressing PTC type 2 mutations, whereas the expression levels of *GATA1* mRNA from PTC type 1 mutations were comparable with that from wild-type *GATA1* (Figure 2Aiii). These results suggest that the location of PTC relative to alternative translation initiation sites is important for effective NMD surveillance.

Available evidence indicates that acute leukemia arises from cooperation between one class of mutations that interferes with differentiation (class II mutations) and another class that confers a proliferative advantage to cells (class I mutations).<sup>31</sup> Recent reports showed that introducing high levels of exogenous *GATA1* lacking the N-terminus did not reduce the aberrant growth of *GATA1*-null megakaryocytes, but instead induced differentiation.<sup>32,33</sup> This observation suggested that abundant *GATA1*s protein functions like a class I mutation in TAM blasts. In contrast, reducing *GATA1* expression leads to differentiation arrest and aberrant growth of megakaryocytic cells.<sup>19,20</sup> The present data suggest that *GATA1*s is expressed at very low levels in TAM blasts with *GATA1*s low mutations. These levels may not be sufficient to provoke normal maturation. Together, these findings suggest that the low expression of *GATA1*s might function like class II mutations in TAM blasts. Additional class I mutations or epigenetic alterations might be more effective in the development of leukemia in blast cells expressing *GATA1*s at low levels.

In the present study, we identified a subgroup of TAM patients with a higher risk of developing ML-DS. Of 66 children, 11 (16.7%) with TAM subsequently developed ML-DS and 10 of them belonged to the *GATA1*s low group harboring the PTC type 2 or PTC type 1-5' mutations. Surprisingly, 8 of 11 patients (73%) with the PTC type 2 mutations developed ML-DS (Tables 1, 5), whereas 2 of 15 patients (13.3%) with PTC type 1-5' mutations developed leukemia. The estimated expression levels of *GATA1*s from PTC type 2 mutations were lower than those from PTC type 1-5' mutations (Figures 1, 2Ai). These results suggest that the type 2 mutations may be a more significant risk factor for developing ML-DS (supplemental Figure 2). However, our classification of *GATA1* mutations mainly rested on extrapolation from in vitro transfection experiments (Figures 1-2) and RT-PCR analyses of a small number of patient samples (Figure 3). The stability of the transcripts and the splicing efficiency of the second exon of *GATA1* will be regulated through complex mechanisms. To confirm our findings, precise mapping of the mutations that affect the expres-

sion levels of *GATA1*s and a prospective study with a large series of TAM patients are necessary.

Finally, we proposed the hypothesis that the quantitative differences in *GATA1*s protein expression caused by mutations have a significant effect on the phenotype of TAM. The observations described here provide valuable information about the roles of *GATA1* mutations on multistep leukemogenesis in DS patients. Moreover, the results might have implications for management of leukemia observed in DS infants and children. Because the blast cells in both TAM and subsequent ML-DS appear highly sensitive to cytarabine,<sup>34-39</sup> the preleukemic clone could be treated with low-dose cytarabine without severe side effects, and elimination of the preleukemic clone might prevent progression to leukemia.

## Acknowledgments

We thank Dr Tetsuo Mitsui (Yamagata University School of Medicine), Shingo Morinaga (National Hospital Organization Kumamoto Medical Center), Takahide Nakano (Kansai Medical University), Masahiro Migita (Japan Red Cross Kumamoto Hospital), Hiroshi Kanda (Kurume University School of Medicine), Koji Kato (The First Nagoya Red Cross Hospital), and Takahiro Uehara (Kameda Medical Center) for providing patient samples. We thank Dr Eiki Tsushima, Ko Kudo (Hirosaki University Graduate School of Medicine), and Ms Hitomi Iwabuchi for statistical analysis, helpful discussions, and technical assistance, respectively.

This work was supported by grants-in-aid from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan and Health and Labor Sciences Research Grants (research on intractable diseases) the Ministry of Health, Labor, and Welfare of Japan.

## Authorship

Contribution: R.K. and T. Toki designed, organized, and performed research, analyzed data, and wrote the paper; K.T. designed research and collected and analyzed clinical data; G.X. and R.W. performed mutation screening; A.S., H.K., K. Kawakami, M.E., D.H., K. Kogawa, S.A., Y.I., S.I., T. Taga, Y.K., and Y.H. provided clinical samples and data; A.H. and S.K. performed mutation screening and provided clinical samples and data; and E.I. designed and organized research, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Etsuro Ito, Department of Pediatrics, Hirosaki University Graduate School of Medicine, 5 Zaifu-cho, Hirosaki, Aomori, 036-8563, Japan; e-mail: etuou@cc.hirosaki-u.ac.jp.

## References

- Zipursky A, Poon A, Doyle J. Leukemia in Down syndrome: a review. *Pediatr Hematol Oncol*. 1992;9(2):139-149.
- Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia*. 2003;17(2):277-282.
- Hitzler JK. Acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49(7):1066-1069.
- Malinge S, Izraeli S, Crispino JD. Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood*. 2009;113(12):2619-2628.
- Massey GV, Zipursky A, Chang MN, et al. A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood*. 2006;107(12):4606-4613.
- Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, et al. Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. *Blood*. 2008;111(6):2991-2998.
- Muramatsu H, Kato K, Watanabe N, et al. Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia. *Br J Haematol*. 2008;142(4):610-615.
- Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet*. 2002;32(1):148-152.
- Greene ME, Mundschaug G, Wechsler J, et al. Mutations in GATA1 in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood Cells Mol Dis*. 2003;31(3):351-356.
- 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):4301-4304.
- Mundschaug G, Gurbuxani S, Gamis AS, Greene ME, Arceci RJ, Crispino JD. Mutagenesis of GATA1 is an initiating event in Down syndrome leukemogenesis. *Blood*. 2003;101(11):4298-4300.
- Rainis L, Bercovich D, Strehl S, et al. Mutations in exon 2 of GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood*. 2003;102(3):981-986.
- Xu G, Nagano M, Kanazaki R, et al. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood*. 2003;102(8):2960-2968.
- Groet J, McElwaine S, Spinelli M, et al. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet*. 2003;361(9369):1617-1620.
- Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(21):9623-9627.
- Morceau F, Schneckeburger M, Dicato M, Diederich M. GATA-1: friends, brothers, and co-workers. *Ann N Y Acad Sci*. 2004;1030:537-554.
- Ferreira R, Ohneda K, Yamamoto M, Philipson S. GATA1 function, a paradigm for transcription factors in hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 2005;25(4):1215-1227.
- Gutierrez L, Tsukamoto S, Suzuki M, et al. Ablation of Gata1 in adult mice results in aplastic crisis, revealing its essential role in steady-state and stress erythropoiesis. *Blood*. 2008;111(8):4375-4385.
- Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet development. *EMBO J*. 1997;16(13):3965-3973.
- Vyas P, Ault K, Jackson CW, Orkin SH, Shivdasani RA. Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*. 1999;93(9):2867-2875.
- Shimizu R, Kuroha T, Ohneda O, et al. Leukemogenesis caused by incapacitated GATA-1 function. *Mol Cell Biol*. 2004;24(24):10814-10825.
- Shimizu R, Engel JD, Yamamoto M. GATA1-related leukaemias. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(4):279-287.
- Xu G, Kanazaki R, Toki T, et al. Physical association of the patient-specific GATA1 mutants with RUNX1 in acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Leukemia*. 2006;20(6):1002-1008.
- Toki T, Kanazaki R, Adachi S 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.
- Shimada A, Xu G, Toki T et al. Fetal origin of the GATA-1 mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down's syndrome. *Blood*. 2004;103(1):366.
- 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):11598-11602.
- Pozzoli U, Sironi M. Silencers regulate both constitutive and alternative splicing events in mammals. *Cell Mol Life Sci*. 2005;62(14):1579-1604.
- Wang Z, Burge CB. Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*. 2008;14(5):802-813.
- Neu-Yilik G, Kulozik AE. NMD: multitasking between mRNA surveillance and modulation of gene expression. *Adv Genet*. 2008;62:185-243.
- Shyu AB, Wilkinson MF, van Hoof A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J*. 2008;27(3):471-481.
- Deguchi K, Gilliland DG. Cooperativity between mutations in tyrosine kinases and in hematopoietic transcription factors in AML. *Leukemia*. 2002;16(4):740-744.
- Kuhl C, Atzberger A, Iborra F, Nieswandt B, Porcher C, Vyas P. GATA1-mediated megakaryocyte differentiation and growth control can be uncoupled and mapped to different domains in GATA1. *Mol Cell Biol*. 2005;25(19):8592-8606.
- Muntean AG, Crispino JD. Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood*. 2005;106(4):1223-1231.
- Taub JW, Matherly LH, Stout ML, Buck SA, Gurney JG, Ravindranath Y. Enhanced metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in Down syndrome cells: a contributing factor to the superior event free survival of Down syndrome children with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996;87(8):3395-3403.
- Taub JW, Huang X, Matherly LH, et al. Expression of chromosome 21-localized genes in acute myeloid leukemia: differences between Down syndrome and non-Down syndrome blast cells and relationship to in vitro sensitivity to cytosine arabinoside and daunorubicin. *Blood*. 1999;94(4):1393-1400.
- Frost BM, Gustafsson G, Larsson R, Nygren P, Lonnholm G. Cellular cytotoxic drug sensitivity in children with acute leukemia and Down's syndrome: an explanation to differences in clinical outcome? *Leukemia*. 2000;14(5):943-944.
- Zwaan CM, Kaspers GJ, Pieters R, et al. Different drug sensitivity profiles of acute myeloid and lymphoblastic leukemia and normal peripheral blood mononuclear cells in children with and without Down syndrome. *Blood*. 2002;99(1):245-251.
- Ge Y, Stout ML, Tatman DA, et al. GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*. 2005;97(3):226-231.
- Taub JW, Ge Y. Down syndrome, drug metabolism and chromosome 21. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;44(1):33-39.

—新生児救急疾患—

## ダウン症候群に発症した transient abnormal myelopoiesis (TAM) への対応

林 泰秀

### はじめに

ダウン症候群(DS)の新生期には一過性骨髄増殖症(transient abnormal myelopoiesis : TAM)<sup>1)</sup>または transient myeloproliferative disorder(TMD)<sup>2)</sup>が約10%の頻度でみられ、生後4年以内にその約20%が急性巨核球性白血病(acute megakaryoblastic leukemia : AMKL)に進展する<sup>2~4)</sup>。TAMは新保、長尾ら<sup>1)</sup>により一つの疾患概念として提唱され、自然寛解する例が多いとされてきたが、近年致死的な肝線維症などを合併することがあり、予後良好な疾患ではないことがクローズアップされ<sup>5~8)</sup>、一過性白血病(transient leukemia)と呼ぶべきであるとの報告もある<sup>9)</sup>。最近の Pediatric Oncology Group(POG)や I-BFM によって行われた前方視的研究や我が国の後方視的研究でも約20%の早期死亡があり、治療成績が著しく改善された AMKL より予後不良である<sup>10,11)</sup>。

### TAM 発症の分子機構

DS の AMKL では赤血球系と巨核球系の転写因子 GATA1 の遺伝子変異が、白血病の多段階発症過程の早期に起こっていることが明らかされた<sup>12)</sup>。すなわち、GATA1 遺伝子の後天的な変異が、AMKL だけでなく TAM でもほとんどの症例で検出され、この遺伝子変異の結果、TAM の細胞では約 50 kD の完全長の GATA1 蛋白が発現せず、N 末端転写活性化ドメインを欠く約 40 kD の変異 GATA1 蛋白(GATA1s)のみが発現していた<sup>3,4,13)</sup>。さらに、

一卵性双生児の TAM 症例の解析から胎児期に GATA1 遺伝子の変異が生じていることが明らかにされた<sup>14)</sup>。しかし、GATA1 変異による TAM 発症の仕組みは未だ解明されていない<sup>3,4)</sup>。

DS における 21 トリソミーの構成は TAM を合併する DS と合併しない DS では異なり、通常第2減数分裂時の染色体不分離による片親性ダイソミー(uniparental disomy)の DS における頻度は30%以下と考えられているが、TAM を合併した症例ではそのほとんどが片親性ダイソミーを認めると報告されている<sup>15)</sup>。GATA1 変異のほかに、エピジェネティックな転写制御機構などが TAM 発症に重要な役割を果たしている可能性が示唆されている<sup>3,4)</sup>。

### 一般的な TAM の臨床像と診断

DS の児に合併する TAM の頻度は約10%と考えられているが、多数の DS 例での疫学的研究の報告はないので実際の頻度は明らかではない。TAM の芽球は AMKL の芽球と類似しており、区別することができない。

TAM の診断については、DS の児で肝脾腫、白血球増多、血小板減少などがあれば末梢血の血液像から芽球の有無を確認する。骨髄中よりも末梢血中のほうが芽球の割合が多いため、骨髄穿刺は診断に必須ではない。芽球の表面マーカーの検索により TAM の芽球は AMKL と同様に CD7, 33, 34, 41, 42b, 61, glycophorinA が高率に陽性であり、電子顕微鏡による血小板ペルオキシダーゼ(PPO)反応が陽性である。芽球は形態学的に細胞質が好塩基性で辺縁に偽足様の突起(bleb)を有し、ペルオキシダーゼ染色は陰性である。モザイ

はやし やすひで 群馬県立小児医療センター  
〒377-8577 群馬県渋川市北橋町下箱田 779  
E-mail address : hayashiy-ky@umin.ac.jp

ク型DSにもTAMは合併することがあるため<sup>16)</sup>、患児の表現型が正常であってもTAMの可能性があり、体細胞の染色体検査が必要である。ほとんどのTAMは21トリソミー以外の染色体異常を有さないが<sup>2)</sup>、稀に付加的染色体異常を伴う症例の報告があり<sup>17)</sup>、白血病との異同が問題となる。先天性白血病と鑑別するためにも、TAMの芽球の染色体検査は必須である<sup>2)</sup>。致死的経過をたどるのは肝機能異常、播種性血管内凝固症候群(DIC)、全身性浮腫を合併することが多く<sup>18,19)</sup>、DICや閉塞性黄疸、肝トランスアミナーゼの上昇を伴う症例は治療のタイミングを逃さないよう慎重な経過観察が必要である。

### TAMにおける高サイトカイン血症

TAMの病態には高サイトカイン血症が関与<sup>20)</sup>し、肝線維症などの病態を反映しているものと考えられる。特に致死例では高サイトカイン血症の制御が临床上重要で、今後TAMにおける高サイトカイン血症を起こす病態の解明が必要と考えられる。

### 重症型のTAM症例

さまざまなタイプのTAMが報告されている。致死的経過をたどる劇症タイプの一つに肝機能異常を伴うものがある。これらは循環不全やDICを伴っており、剖検では多臓器へのTAM芽球の浸潤と高度の肝線維症が特徴的である。こういった症例は肝機能異常を伴い、肝生検では肝の線維化と中心静脈の閉塞、肝実質細胞の脱落、芽球の浸潤が報告されているが、芽球の浸潤を認めない症例もある。肝線維化のマーカーであるプロコラーゲンⅢペプチド(P-Ⅲ-P)やⅣ型コラーゲン、ヒアルロン酸が高値を示し、芽球から産生されるtransforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、platelet-derived growth factor(PDGF)などのサイトカインが肝の線維化の原因と推察されている<sup>18,19,21)</sup>。また、予後不良の劇症タイプとして胎児水腫による胎児死亡例やDIC、腎不全、全身性の浮腫を伴う症例があり、その機序は明らかではない。実際に

肝不全で死亡する症例以外にも芽球が消失せず、増加傾向となり死亡する症例がある。これらは出生時にGATA1以外の遺伝子異常によりすでに白血病として発症している可能性が示唆される。今後GATA1以外のsecond hit(遺伝子変異)が何であるのか解明が待たれる。

劇症タイプとは対照的に症状がなく、先天性心疾患や消化器疾患のために採血し、末梢血に芽球がみられるため診断される症例もある。AMKLの中にはTAMの既往歴が明らかでない症例があり、これらは臨床症状がはっきりしていなかったため診断に至らず、芽球も自然消失した可能性がある。TAMの既往歴が明らかでないAMKLの症例でもガスリー斑の血痕から抽出したDNAより、AMKLの時と同じGATA1遺伝子変異が確認されている。

### 我が国のTAMの多数症例の検討

塚本ら<sup>22)</sup>の全国のアンケート調査では、250施設中185施設(74%)から回答があり、約1/3の施設で重症TAMの経験があり、そのうち約1/4の施設では化学療法を試みられていた。重症TAM 38例の頻度はNICU入院1,000例に約1例で、症状として初診時、胎児期から肝脾腫を認めた。死亡例は38例中25例(66%)で、低出生体重児が多く、初診時に特にLDHが高く、経過中に肝障害、閉塞性黄疸が重篤化していた。化学療法施行例では生存率が53%(15例中8例)で、非施行例の21%(23例中5例)に比べ生存率がやや高い傾向があったが依然として低値であった<sup>22)</sup>。予後不良群を識別する指標として直接ビリルビンが8 mg/dL以上、LDH 4,000 IU/L以上、GOT 250 U/L以上と報告している。

Muramatsuら<sup>23)</sup>は1992～2006年に14施設の70例(男児46例、女児24例)についての後方視的検討を行い、16例(22.9%)が早期死亡し、死因は肝不全10例、腎不全3例、心不全2例、PPHN1例であった。12例(17.1%)で後にAMKLを発症し、うち1例が再発死亡し、最終的には全生存率は75.7%であった。多変量解析では、短い在胎週数と直接ビリルビン値が最も生命予後と関係する結



表 白血球数と在胎週数による生存率(菊地, 2009)<sup>24)</sup>

	WBC 10 万未満	WBC 10 万以上
満期産	92.1% (35/38)	50% (3/6)
早期産	85.7% (12/14)	26.7% (4/15)

満期産：在胎 37 週以上，早期産：在胎 37 週未満，WBC：白血球数

果であった。

菊地<sup>24)</sup>は、日本小児血液学会会員施設に対するアンケート調査を行い、2003～2005 年に我が国で発症した TAM 73 例をまとめて報告した。44 例に先天性心疾患がみられ、MDS が 2 例に、AMKL が 11 例に発症した。19 例が死亡し、死因は肝不全、腎不全の臓器不全が多かった。予後不良因子は(表)、在胎週数 37 週未満、初診時白血球数 10 万/ $\mu$ L 以上、直接ビリルビンの最高値 5 mg/dL 以上、全身浮腫の存在であった。

#### POG 9481 スタディ

米国の POG は 1996～1999 年に前方視的に 48 例の TAM の解析を行い<sup>10)</sup>、生後 9 カ月未満の早期死亡を 47 例中 8 例(17%)に認め、早期死亡した 8 例全例で肝機能異常と DIC を認めた。腹水、心嚢水、胸水の合併も多く、2 例で末期に少量キロサイドを投与したが、無効であったと報告している。早期死亡と関連のある因子としては診断時の白血球数増多( $p<0.001$ )、肝トランスアミナーゼの高値(ALT  $p=0.001$ , AST  $p=0.005$ )、末梢血中からの芽球が消失しない( $p<0.001$ )などをあげている。また、21 トリソミー以外の染色体異常をもつ TAM はその後 AMKL を発症するリスクが高いと報告している。

#### BFM スタディ

ヨーロッパの BFM グループは、146 例の TAM (transient leukemia と命名)の前方視的研究を行い、5 年全生存率が  $85\pm3\%$ 、無イベント生存率が  $63\pm4\%$ と報告した<sup>11)</sup>。白血球増多、血小板減少または肝不全の 28 例にシタラビン(0.5～1.5

mg/kg)を投与し、投与しない群に比べて有意に 5 年無イベント生存率がよかった( $52\pm12\%$ 対  $28\pm11\%$ ,  $p=0.02$ )と報告した。29 例(23%)が AMKL になり、TAM の既往のある患者は有意に予後良好であったと報告した。

#### 治 療

古典的タイプの TAM で全身状態がよい場合は経過観察を行う。予後不良例は 10～20%にみられ、支持療法とともに早期治療介入が必要である。治療としては、交換輸血、ステロイドにより一時的に芽球の数が減少し、症状が緩和されることもあるが、無効であることが多い。全身性浮腫、肝機能障害が増悪傾向である場合、抗癌剤の投与を考慮する。少量シタラビン(Ara-C)10 mg/ $m^2$ を 1 日 2 回投与することにより肝不全が軽快、治癒する症例も報告されている<sup>25)</sup>。そのほかシタラビン投与の報告が散見する<sup>6,7,26)</sup>。今後前方視的研究を行い、治療の時期や治療法を確立する必要がある。また、BFM ではシタラビン 0.5～1.5 mg/kg 7 日間投与法を推奨している。我が国でも重症例の定義と標準的治療を確立する必要がある。

#### 登録事業(図)と今後の方向性

これまで TAM は一般小児科、未熟児新生児科、遺伝科、循環器科、血液腫瘍科とさまざまな科で診察、治療されてきた。そのため全体像の把握が困難で、一部に予後不良例があることが知られていたが、全体としては予後良好な疾患とされてきた。近年の POG の報告や我が国の研究で約 20%の予後不良例が存在することが明らかになり、全数登録をして前方視的研究をする必要性が明らかになってきた。幸い 2007 年から日本小児血液学会で疾患登録事業が開始されて登録が可能になった。日本小児血液学会員の ID 番号とパスワードが必要なので、TAM の診断がついた際には近くにいる日本小児血液学会会員に連絡をして登録していただくことが望まれる(図)。平成 21 年度から厚生労働省の「ダウン症候群でみられる一過性骨髄異常増殖症の重症度分類のための診断基準と治

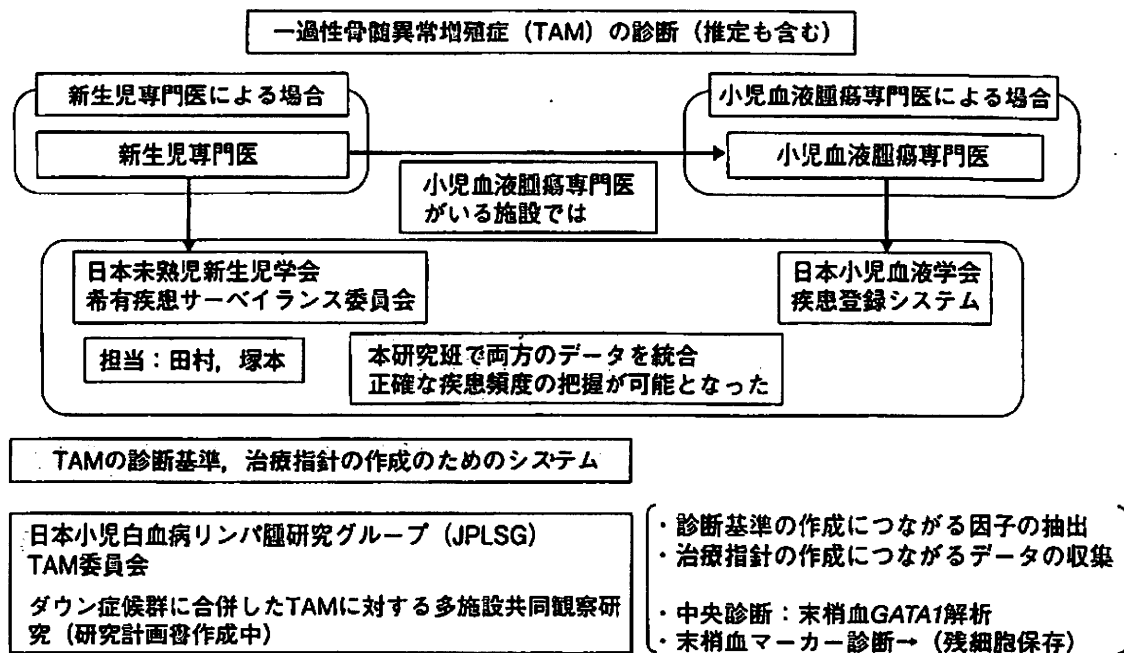


図 TAM の正確な患者数を把握するためのシステム

療指針の作成に関する研究「班(TAM 班)」ができ、今後診断と治療のガイドライン作成と科学的な臨床研究にもとづく治療成績の改善が期待される。また小児血液学会のシステムに登録されていない新生児側の症例については、日本未熟児新生児学会の希有疾患サーベイランス委員会の対象疾患として承認されたので、これまで把握ができなかった新生児施設のみに入院した TAM 症例も把握できるようになった(図)。

## おわりに

TAM の中でも約 20%の予後不良群の臨床的特徴や生物学的特徴を明らかにし、これらに対する有効な治療法を確立することは重要である。そのためにも今後各科で連携して厚生労働省の TAM 班による治療指針を確立し、多数例に対する前方視的研究を行う必要がある。

## 文献

- 1) 新保敏和，他：白血病様血液像を呈した Down 症候群 (6 症例)の臨床的経過ならびに病理解剖所見の検討—特に Transient Abnormal Myelopoiesis (TAM) の概念について。臨床血液 18 : 99-109, 1977
- 2) Hayashi Y, Eguchi M, Sugita K, et al : Cytogenetic findings and clinical features in acute leukemia and transient

myeloproliferative disorder in Down's syndrome. Blood 72 : 15-23, 1998

- 3) 伊藤悦朗 : Down 症候群の白血病の分子機構。日本小児血液学会雑誌 18 : 117-126, 2004
- 4) Hitzler JK, Zipursky A : Origins of leukaemia in children with Down syndrome. Nat Rev Cancer 5 : 11-20, 2005
- 5) Miyauchi J, Ito Y, Kawano T, et al : Unusual diffuse liver fibrosis accompanying transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome : a report of four autopsy cases and proposal of a hypothesis. Blood 80 : 1521-1527, 1992
- 6) Al-Kasim F, Doyle JJ, Massey GV, et al : Incidence and treatment of potentially lethal diseases in transient leukemia of Down syndrome : Pediatric Oncology Group Study. J Pediatr Hematol Oncol 24 : 9-13, 2002
- 7) Dormann S, Krüger M, Hentschel R, et al : Life-threatening complications of transient abnormal myelopoiesis in neonates with Down syndrome. Eur J Pediatr 163 : 374-377, 2004
- 8) Zipursky A, Rose T, Skidmore M, et al : Hydrops fetalis and neonatal leukemia in Down syndrome. Pediatr Hematol Oncol 13 : 81-87, 1996
- 9) Zipursky A : Transient leukaemia—a benign form of leukaemia in newborn infants with trisomy 21. Br J Haematol 120 : 930-938, 2003
- 10) Massey GV, Zipursky A, Chang MN, et al : Children's Oncology Group (COG) : A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS) : Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. Blood 107 : 4606-4613, 2006
- 11) Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, et al : Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. Blood 111 : 2991-2998,

2008

- 12) Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al : Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* 32 : 148-152, 2002
- 13) Xu G, Nagano M, Kanazaki R, et al : Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood* 102 : 2960-2968, 2003
- 14) Shimada A, Xu G, Toki T, et al : Fetal origin of the GATA1 mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Blood* 103 : 366, 2004
- 15) Abe K, Kajii T, Niikawa N, et al : Disomic homozygosity in 21-trisomic cells : a mechanism responsible for transient myeloproliferative syndrome. *Hum Gent* 82 : 561-566, 1989
- 16) Brodeur GM, Dahl GV, Williams DL, et al : Transient leukemoid reaction and trisomy 21 mosaicism in a phenotypically normal newborn. *Blood* 55 : 691-693, 1980
- 17) Kounami S, Aoyagi N, Tsuno H, et al : Additional chromosome abnormalities in transient abnormal myelopoiesis in Down's syndrome patients. *Acta Haematol* 98 : 109-112, 1997
- 18) 朴 明子, 林 泰秀 : Down 症候群に発症する transient abnormal myelopoiesis の臨床像と治療. *小児科* 48 : 53-57, 2007
- 19) 黒岩由紀, 鈴木信寛, 山本雅樹, 他 : Transient abnormal myelopoiesis(TAM)における肝線維化マーカーの検討. *臨床血液* 46 : 1179-1186, 2005
- 20) Shimada A, Hayashi Y, Ogasawara M, et al : Pro-inflammatory cytokinemia is frequently found in Down syndrome patients with hematological disorders. *Leuk Res* 31 : 1199-1203, 2007
- 21) Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A, et al : High expression of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 in blast cells from patients with Down Syndrome suffering from transient myeloproliferative disorder and organ fibrosis. *Br J Haematol* 115 : 472-475, 2001
- 22) 塚本桂子, 伊藤裕司, 大石芳久, 他 : 肝機能障害を伴う重症一過性骨髄異常増殖症症例の全国調査による検討. *日本周産期・新生児医学会雑誌* 43 : 85-91, 2007
- 23) Muramatsu H, Kato K, Watanabe N, et al : Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia. *Br J Haematol* 142 : 610-615, 2008
- 24) 菊地 陽 : Down 症候群の Transient Abnormal Myelopoiesis(TAM)について. *日本小児血液学会雑誌* 23 : 58-61, 2009
- 25) Tchernia G, Lejeune F, Boccara JF, et al : Erythroblastic and/or megakaryoblastic leukemia in Down syndrome : treatment with low-dose arabinosyl cytosine. *J Pediatr Hematol Oncol* 18 : 59-62, 1996
- 26) Webb DK : Optimizing therapy for myeloid disorders of Down syndrome. *Br J Haematol* 131 : 3-7, 2005

\* \* \*

# ダウン症候群に関連した骨髄増殖症

——2008 WHO 分類より——

川村眞智子<sup>1</sup>, 菊地 陽<sup>2</sup>

<sup>1</sup>がん・感染症センター都立駒込病院小児科, <sup>2</sup>帝京大学医学部小児科

## Myeloid Proliferation Related to Down Syndrome in the Updated 2008 WHO Classification

Machiko KAWAMURA<sup>1</sup> and Akira KIKUCHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center, Komagome Hospital

<sup>2</sup> Department of Pediatrics, Teikyo University, School of Medicine

**Abstract** Approximately 10% of Down syndrome (DS) neonates manifest a hematologic disorder referred to as transient abnormal myelopoiesis (TAM)/transient myeloproliferative disorder (TMD). Because this disorder resolves spontaneously, it is considered to have a good prognosis. In fact, 10-20% of these cases are life threatening or fatal. In 20% of the affected cases, acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) subsequently develops before 4 years of age. The morphologic, immunophenotypic and genetic features of TAM are biologically identical to those of DS-AML. On the other hand, DS-AMKL has unique morphologic, immunophenotypic, clinical and molecular features, including *GATA1* mutation, that justify its separation from other AMKL. In Japan, more than 90% of cases with DS-AMKL achieved a complete remission, and the estimated 4-year event-free survival rate was 80%. Therefore this disorder is unique to children with DS. For the first time "myeloid proliferations related to DS" was classified as a distinct entity which includes (1) TAM and (2) myeloid leukemia associated with DS in the updated 2008 WHO Classification 4th edition. We introduce these new criteria and add a supplementary explanation.

**要 旨** ダウン症候群 (DS) では約 10%が, 新生児期に一過性骨髄異常増殖症 (TAM) あるいは一過性骨髄増殖性疾患 (TMD) と呼ばれる一過性の類白血病反応を発症する。TAM は自然寛解するものが多く予後良好と考えられているが, 実際は 10~20%に致死的なものがある。TAM を発症した症例の約 20%が 4 歳までに骨髄異形成症候群 (MDS) や急性巨核芽球性白血病 (AMKL) に移行する。TAM の芽球は形態学, 免疫表現型, 遺伝子発現からも AMKL と区別ができない。一方 DS-AMKL は, 特異な形態と免疫表現型, *GATA1* 遺伝子変異を含めた分子遺伝学的・臨床的特徴から他の AMKL とは区別される。日本では DS-AMKL は, 治療強度を弱めた化学療法でも寛解導入率が 90%以上, 4 年無病生存率も 80%を超えている。こうした特徴のため, 2008 年改訂の WHO 分類第 4 版で, DS 関連骨髄増殖症がはじめて独立した病型として (1) TAM, (2) DS 関連骨髄性白血病に分類された。この新分類を抜粋し若干の解説を加えた。

**Key words:** Down syndrome, transient abnormal myelopoiesis, acute megakaryoblastic leukemia, *GATA1*, WHO classification

### I. はじめに

急性白血病については, 1976 年以来提唱されている

別刷請求先: 〒113-8677 東京都文京区本駒込 3-18-22 がん・感染症センター都立駒込病院小児科 川村眞智子

Reprint requests to Machiko Kawamura, Department of Pediatrics, Tokyo Metropolitan Cancer and Infectious Disease Center, Komagome Hospital, 3-18-22, Hon-Komagome, Bunkyo-ku, Tokyo, 113-8677 Japan

細胞形態を基本とした FAB 分類が世界的に活用されてきた。染色体や遺伝子異常の情報が明らかとなり, 治療選択にも分子レベルを基盤とした分類の必要性が高まっている。それを受け WHO 分類第 3 版が 2000 年に出されたが, 小児に関しては成人の分類をそのまま当てはめることの問題点が指摘された<sup>1)</sup>。

ダウン症候群 (DS) では, 約 10%が新生児期に一過性骨髄異常増殖症 (transient abnormal myelopoiesis, TAM) あるいは一過性骨髄増殖性疾患 (transient myelo-



proliferative disorder, TMD) と呼ばれる一過性の類白血病反応を発症する。TAM は自然寛解するものが多く予後良好と考えられているが、実際は致死的なものがあり、どの時期にどのような治療を行うかを明らかにすることが重要な課題となっている。TAM の発症症例の約 20% が、4 歳までに骨髄異形成症候群 (MDS) や急性巨核芽球性白血病 (AMKL) に移行する。TAM の芽球は形態学、免疫組織学的、遺伝子発現からも AMKL と区別ができない。TAM では通常は 21 トリソミー以外に核型に異常はないが、MDS や AMKL では高率に付加的核型異常が認められる<sup>2)</sup>。DS-AMKL は抗腫瘍薬に対する薬剤感受性が高く治療成績が向上している<sup>3,4)</sup>。

近年、DS の白血病の分子機構についてさまざまなことが明らかになり、DS-MDS/AML は特徴的で、他の AML とは異なっていることが示され、2008 年改訂の WHO 分類第 4 版に「DS に関連した骨髄増殖症 Myeloid proliferation related to Down syndrome」がはじめて独立した病型として分類され加わった。新分類を紹介し若干の解説を加えた。

## II. 「DS に関連した骨髄増殖症 Myeloid proliferation related to Down syndrome」—抜粋<sup>5)</sup>

DS では、non-DS と比べて白血病発症のリスクが 10~100 倍上昇する<sup>6,7)</sup>。そのリスクは成人になっても同様である。4 歳未満の non-DS では急性リンパ性白血病 (ALL) と急性骨髄性白血病 (AML) の比率は 4:1 であり、同じ年齢群の DS では 1.0:1.2 でほぼ同等である。

5 歳未満の DS では AMKL が non-DS と比べおよそ 150 倍の頻度で発症する。4 歳未満では DS の AML の 70% は AMKL であるのに対して、non-DS でのその割合は 3~6% である。DS-AMKL は、特異な形態と免疫表現型、*GATA1* 遺伝子変異を含めた分子遺伝学的、臨床的特徴から、他の型の AMKL とは区別されている<sup>8)</sup>。これらのさまざまな特徴は DS 関連白血病が、WHO 分類の中で特別な型の白血病として扱われる根拠となっている。4 歳未満の DS-AML には、独特な性質をもつ AMKL が多く、それに加えて DS の新生児の約 10% には TAM/TMD と呼ばれる、形態的に DS-AMKL とは区別できない病態が存在する<sup>9,10)</sup>。

この異常は数週間から 3 カ月で自然に軽快するが、異常があった症例の 20~30% は、1~3 年以内に自然軽快しない AMKL を発症する。DS 児では上述した病態が注目されるが、これらの病態には年齢特異性があり、DS 児には ALL と AML のどちらも発症することを認識することが重要である。DS 児でも non-DS 児と同様、詳

細な形態学的、免疫組織学的、細胞遺伝学的または分子生物学的評価が必要であり、それに基づいた適切な治療が行われるべきである<sup>11)</sup>。

### 1. 一過性骨髄異常増殖症: Transient abnormal myelopoiesis (TAM)/transient myeloproliferative disorder (TMD)

定義: TAM は、AML とは臨床的、形態的に区別できない DS の新生児に特有な病態である。芽球は巨核球系の特徴をもっている。

疫学: TAM は DS の新生児の約 10% に発症する。モザイク型 21 トリソミーで表現型が正常の新生児にもまれに発症する。

臨床的特徴: 初診時には、血小板減少症がもっとも一般的な症状で、他の血球減少症は比較的少ない。著明な白血球増多 (3~5 万/ $\mu$ l, しばしば 10 万/ $\mu$ l 以上) を呈し、芽球比率は骨髄よりも末梢血のほうがしばしば高い。合併症として肝脾腫があり、まれに、心不全、過粘稠度症候群、脾臓壊死、進行性肝線維症がある<sup>12)</sup>。患者の約 80% は生後 3 カ月以内に自然寛解するが、一部は生命を脅かし、または致死的な臨床経過をとる。

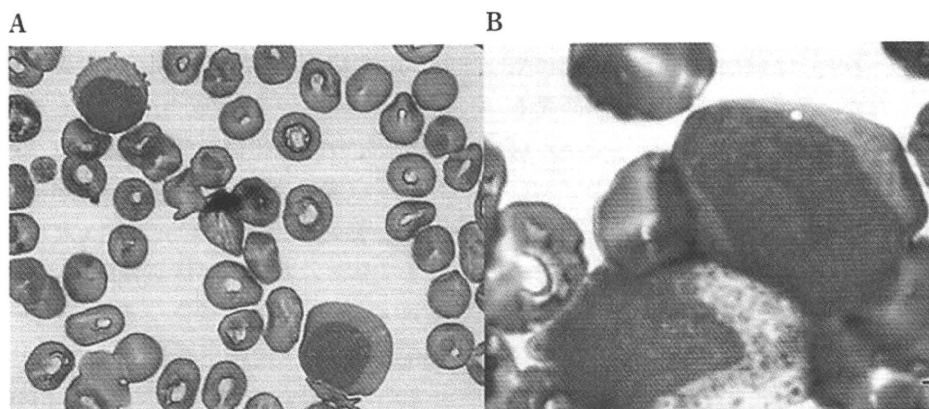
形態学的、免疫表現型: TAM の芽球形態、免疫表現型の特徴は、多くの DS-AML と同じである。末梢血および骨髄中の芽球は、細胞質は好塩基性で、粗造な好塩基性顆粒とブレブという細胞突起を有し (Fig. 1)、これらの芽球が巨核芽球であることを示唆している。末梢血で好塩基球増多症を示すものもあり、骨髄では赤芽球系、巨核球系細胞にしばしば異形成を認める<sup>13)</sup>。TAM の芽球は特徴的な免疫表現型を示す<sup>13)</sup>。表面マーカーは多くの症例で CD34, CD56, CD117, CD13, CD33, CD7, CD4 dim, CD42, TPO-R, IL-3R, CD36, CD61, CD71 が陽性となるが、myeloperoxidase, CD15, CD14, glycophorin A が陰性である。約 30% の症例で HLA-DR が陽性である。巨核球系の診断には抗 CD41 抗体と抗 CD61 抗体の診断的価値が高い。

遺伝学: 21 トリソミーに加えて *GATA1* 遺伝子体細胞変異が TAM の芽球に存在する<sup>8,14,15)</sup>。発現アレイやゲノムアレイで DS-AML と TAM の間に発現の相違があるという報告があるが、まだ追認されていない<sup>16,18)</sup>。

予後と予後因子: 高率に自然治癒する特徴があるが、1~3 年後に、これらの 20~30% が AML に進行する<sup>19)</sup>。TAM に対する化学療法はいまだ確立されていない。

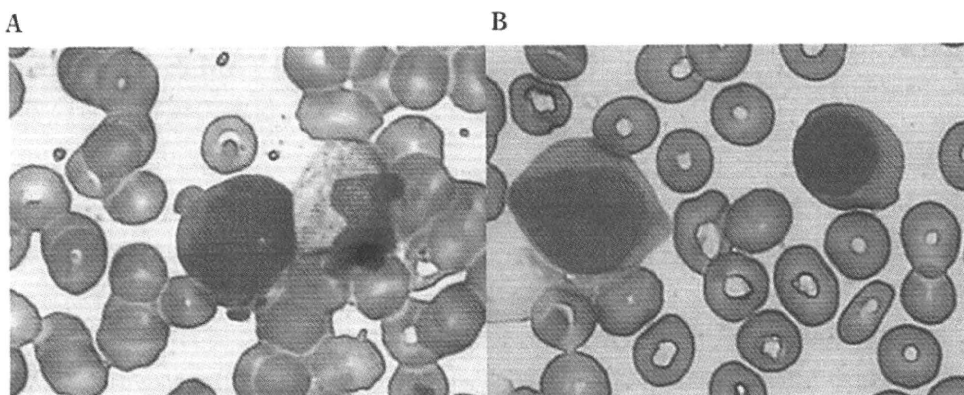
### 2. DS 関連骨髄性白血病: Myeloid leukemia associated with Down syndrome (ML-DS)

定義: 5 歳未満では、DS 児は non-DS 児と比べて 50 倍の頻度で急性白血病になりやすい。DS-AML は、通



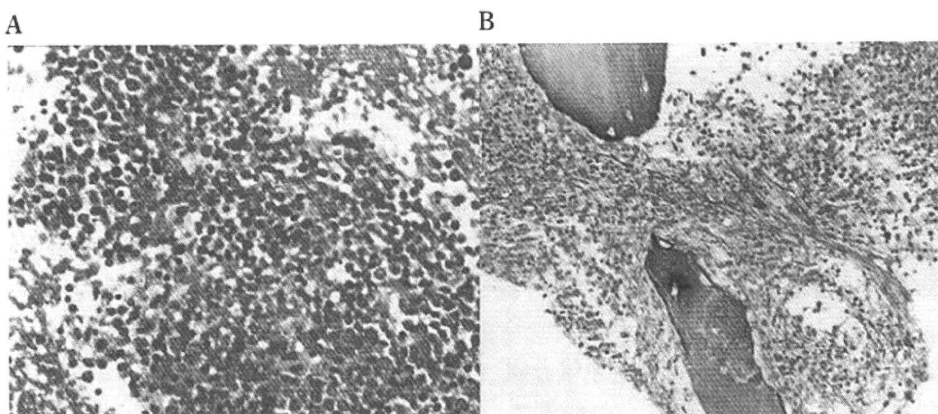
**Fig. 1** Peripheral blood smear from 18-day-old infant with DS and TAM

A blood test revealed a white blood cell count of  $11,300/\mu\text{l}$  (blast 11%), a hemoglobin concentration of 9.2 g/dl and a platelet count of  $3.0 \times 10^4/\mu\text{l}$ . Immunophenotypic analysis showed the presence of CD7, CD13, CD33, CD34, CD41, CD56, and HLA-DR. Cytogenetic study showed trisomy 21 as the sole abnormality. *GATA1* mutation was detected. The process resolved spontaneously over a period of 22 days. A: Two blasts showing basophilic cytoplasm. The intermediately differentiated blast has a cytoplasmic bleb (right). B: More undifferentiated blasts without blebs are also shown (right). (These pictures were provided from Hasegawa and Manabe)



**Fig. 2** Bone marrow smear from ML associated with DS in a 2-year-old boy who has no history of TAM

The bone marrow aspiration was dry tap. Immunophenotypic analysis showed that blasts were positive for CD7, CD13, CD33, and CD56, but negative for CD34 and CD41. In addition to trisomy 21, another chromosomal abnormality was detected. The *GATA1* mutation was detected. A: An intermediately differentiated blast showing basophilic cytoplasm, distinct nucleoli and cytoplasmic blebbing as show here (left). B: The undifferentiated blast doesn't have a cytoplasmic bleb (left). The erythroblast has coarse chromatin (right). (These pictures were provided from Hasegawa and Manabe)



**Fig. 3** Bone marrow biopsy in a patient with ML associated with DS (reproduced from Pediatric MDS CD Atlas 2002 edited by Committee for MDS in The Japanese Society of Pediatric Hematology)

A: A biopsy showed proliferation of leukemic blasts. B: On a biopsy specimen by silver stain, myelofibrosis, ranging from reticulin to collagenous is seen.

常 AMKL であり、新生児期を超えた DS における急性白血病の 50%にも上る。DS では MDS と AML の間に生物学的相違がない。したがって両者を区別して診断することに意味はなく、予後にも治療にも何も影響を与えない。このような病型は DS 児に特異なものであり、ML-DS には、MDS と AML の両方を含んでいる。

疫学：DS における ML の大部分は 5 歳までに発症する。DS の約 1~2%が 5 歳までに AML を発症し、小児の AML/MDS の約 20%は DS 児である<sup>1,9,12)</sup>。ML-DS は TAM の既往のある児の 20~30%に TAM 発症後 1~3 年の間に発症する。

臨床的特徴：この疾患の多くは、3 歳までに発症する。骨髄の芽球が 20%未満の場合は通常無症状で、血小板減少が初発症状となる。一般に、小児不応性血球減少 (RCC) に相当する前白血病期が芽球の過剰な MDS または明らかな白血病に先行する。

形態学：数カ月続く前白血病期には、この疾患は RCC の特徴をもち有意な芽球の増加がない。赤血球細胞は大球性である。異形成は一次性の不応性血球減少症よりも顕著となる場合がある。

AML の場合、芽球とともに赤芽球系前駆細胞が通常末梢血に存在する。赤血球はしばしば著明な細胞大小不均等、ときに涙滴赤血球を示す。血小板数は通常減少し、巨大血小板が観察される。

骨髄穿刺では、白血病芽球の形態は、円形から少し不規則な核をもち、細胞質は中等度の塩基性で、細胞質突起が存在する (Fig. 2)。細胞質に好塩基性顆粒に似た粗い顆粒を含んだ芽球がさまざまな程度でみられる。顆粒は通常 myeloperoxidase 陰性である。赤血球前駆細胞は、しばしば巨核球性変化や、二核、三核、核の断片化を含む異形成を示す。顆粒球系細胞の異形成がみられることもある。

骨髄中心部は網状線維の濃密なネットワークで構成され、骨髄は吸引困難となる (Fig. 3)。赤血球造血は芽球比率が低い症例で増加し、病気の進展とともに減少する。好中球系の成熟過程にある細胞は減少する。芽球が濃厚に浸潤している場合は、巨核球の異形成がまれにみられる。AMKL では、巨核球が異形成の強い小型の小巨核球として集塊をなし著明に増加し、ときに前巨核球の増加をみる。

免疫表現型：DS-AMKL の細胞は、TAM の芽球と同様の表現型を示す<sup>13)</sup>。表面マーカーは多くの症例で CD117, CD13, CD33, CD7, CD4, CD42, TPO-R, IL-3R, CD36, CD41, CD61 CD71 が陽性となるが、myeloperoxidase, CD15, CD14, glycophorin A は陰性である。しかし

TAM と異なり、CD34 は 50%に、CD56 と CD41 はおよそ 30%の症例で陰性である。DS の他の型の AML の細胞は、おのこの AML 分類に一致する表現型を示す。白血病細胞の免疫組織学的診断に際しては、TAM 同様、CD41 と CD61 が巨核芽球系の診断にとくに有用である。

遺伝学：21 トリソミーに加えて、転写因子 GATA1 をコードする遺伝子の体細胞変異は DS の TAM または MDS/AML の病因と考えられている<sup>14,20)</sup>。5 歳以上の AML は GATA1 遺伝子変異がなく“通常の”MDS/AML と考えられている。ML-DS では、trisomy 8 は 13~44%にみられ<sup>1,21)</sup>、monosomy 7 はたいへんまれである。

予後と予後因子：4 歳未満の GATA1 遺伝子変異のある ML-DS は、化学療法に対する反応がよく、その予後は non-DS の AML と比較してとても良好である<sup>22)</sup>。ML-DS は、ML-DS に適したプロトコールで治療されるべきである。GATA1 遺伝子変異のある年長児の ML-DS は、non-DS の AML と比較して予後が不良である<sup>23)</sup>。

### III. DS の TAM および AMKL の治療と日本の現状について

米国、日本、ヨーロッパの TAM 264 人の報告がある<sup>10,24,25)</sup>。通常 TAM は自然軽快するが、10~20%が死亡する。治療を要する TAM の症例は、未熟児、白血球数 10 万/ $\mu$ l 以上のほか、重度の凝固異常、出血、進行性肝障害、腹水および 3 カ月で完全寛解しない症例等で、cytarabine 少量療法 (1 mg/kg/day 7 日間) の治療の有効性が示されている<sup>10,25-27)</sup>。

日本では小児血液学会 MDS 委員会が全国 212 の施設にアンケート調査を行い、2003~2005 年に発症した DS の TAM 73 例について後方視的調査を行った。73 例中 19 例 (26%) が死亡し、16 例 (22%) は TAM の病態に直接起因する早期死亡症例であった。TAM が自然軽快したうちの 2 例が MDS、11 例が AMKL を発症し、解析した 10 例中 9 例に GATA1 遺伝子変異がみられた。予後不良因子は、在胎週数 37 週未満、初診時白血球数 10 万/ $\mu$ l 以上、直接ビリルビン 5 mg/dl 以上、全身浮腫であった。TAM の重症例の治療成績を改善するため、適正な治療選択のために、前方視的登録による症例把握と標準化された推奨治療の確立が日本における課題である<sup>24)</sup>。

一方、DS-AMKL では芽球の薬剤感受性が高く、治療強度を弱めた日本小児 AML 共同研究グループの治療 (pirarubicin 25 mg/m<sup>2</sup> 2 日, cytarabine 100 mg/m<sup>2</sup> 7 日, etoposide 150 mg/m<sup>2</sup> 3 日) で、寛解導入率は 97.2%、無病生存率 (EFS) も 80%以上と治療成績は向上している。予後不良因子は monosomy 7 であった<sup>9)</sup>。WHO 分類では、

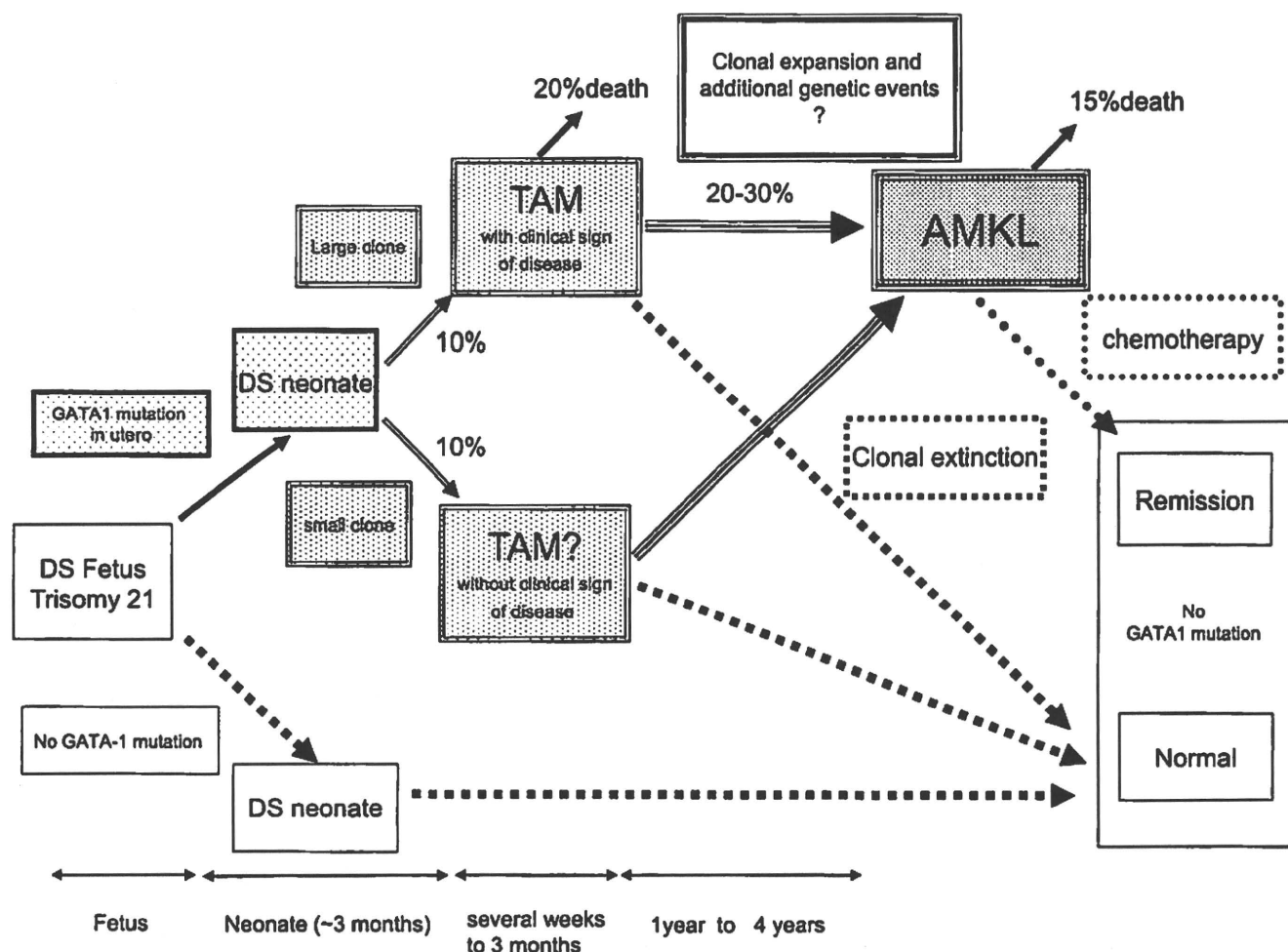


Fig. 4 A modified model for the progression of TAM and AMKL in Down syndrome<sup>28)</sup>

Trisomy 21 is the first event of leukemogenesis of DS. The subsequent mutation of *GATA1* in the fetus period is the second hit, and contributes to the development of TAM.

DS-MLで monosomy 7は非常にまれと記されているが、本邦の報告<sup>4)</sup>ではAMKLに限ると、72例中6例(8%)と比較的頻度は高く、人種差によるものかもしれないが、予後不良因子でもあり注意が必要であると思われる。

またTAMの診断がなされていないものがあり、すべてのAMKLにおいてTAMの既往があるかどうかは明らかではない。最近の報告では、TAMの既往があるほうが、*de novo*のAMKLよりも治療成績がよいとされている<sup>29)</sup>。

AMKLでは血小板減少を伴ったMDSの期間がしばしば認められる。したがって、TAMをcytarabine少量療法で治療しMDS/AMKLへの進展を予防できるかもしれない。また、TAMから自然回復した*GATA1*変異のある臨床的に無症状な状態における治療がAMKLへの進展を予防できるかどうかについても明らかではない。これについてI-BFMのグループでは*GATA1*遺伝子変異をモニターし、cytarabine治療でMDS/AMKLへの進展を制御できないか臨床研究を開始しており、予防法の発見に

つながるかもしれない。

#### IV. 発症のメカニズムに関する最新の知見と考察

現在考えられているTAMからAMKLに至る経路を示した(Fig. 4)<sup>28)</sup>。

Wechslerらは、*GATA1*遺伝子変異は後天的にAMKLに認められ、DSでもAMKL以外の白血病では検出されなかったことを報告した<sup>29)</sup>。一方、non-DSのAMKLで*GATA1*遺伝子変異が見つかった症例では後天的21トリソミーが確認されている<sup>16)</sup>。*GATA1*遺伝子はX染色体上に存在し、赤血球、巨核球の分化に必須の転写因子である。*GATA1*遺伝子変異は、AMKLだけでなくTAMやMDSでも検出されることが報告され、とくにTAMでは、ほぼすべての症例に検出され白血病の早期の遺伝子変異であると考えられた。とくに、在胎29週で出生した一卵性双生児に発症したTAMの症例から同一の*GATA1*変異が検出されたことから、*GATA1*変異は29週以前の胎児期にすでに出現していたことが示された<sup>30)</sup>。



21 トリソミーによる遺伝子過剰な状態下に、胎児期に *GATA1* 遺伝子に変異が起こり、その後いくつかの遺伝子の変異が蓄積して MDS, AMKL に進展すると考えられている。TAM から DS-AMKL への進展に関与する遺伝子変異としては、TAM では *JAK3* が 5/40 例、*TP53* が 1/13 例に、DS-AMKL では *JAK3* が 7/53 例、*FLT3* が 2/35 例、*TP53* が 6/28 例、*JAK2* が 2/32 例に検出されているが、いずれも頻度は高くなかった<sup>27)</sup>。

臨床的に無症状の DS 児の 10% に *GATA1* 遺伝子変異が検出されるが、軽症の TAM は見逃されている可能性がある。また、異なる *GATA1* 変異をもつ複数のクローンが存在することも報告されている<sup>31)</sup>。*GATA1* 遺伝子の転写活性ドメインは N 末端に存在し、約 50-kD の完全長の *GATA1* 蛋白ではなく、N 末端を欠く 40-kD の short form 変異 *GATA1* タンパク質 (*GATA1s*) が発現している。

一方、DS-AMKL より高頻度に発症する DS-ALL では化学療法の反応性が劣る。21 トリソミーに加えて染色体数の異常、とくに X 染色体の付加が 28/130 例にみられる。また、遺伝子の欠失、*JAK2* R683G 変異による遺伝子の活性化が示されている<sup>32)</sup>。この発症には *GATA1* 変異の関与はなく、骨髄増殖性疾患で高頻度にみられる *JAK2* V671F と異なる部位の変異であり、むしろ頻度は低い。DS-AMKL に *JAK2* V671F 変異が報告されており興味深い<sup>27)</sup>。

## V. おわりに

発癌は、遺伝子変異の集積—多段階発癌というメカニズムで進展していくことが知られている。DS における TAM の発症から MDS/AMKL への進展は、白血病発症の分子機構を知る非常によいモデルと考えられている。近年マイクロアレイや動物モデルから、21 番上の 4 つの遺伝子 *AML1*, *ERG*, *ETS2*, *GABPA* が TAM から MDS/AMKL への進展に関わる候補遺伝子とする報告があり<sup>27)</sup>、さらに研究が進むと考えられる。WHO 分類は、日々新たに明らかになる臨床試験、基礎研究による知見を評価し、病理医、臨床医、科学研究者が協力し、常に更新されていくことが期待されている。

稿を終るにあたり、貴重なご意見をいただきました日本小児血液学会 MDS 委員会委員長 真部 淳先生、京都府立医大分子診断・治療医学 滝 智彦先生、標本を供与いただきました聖路加国際病院小児科 長谷川大輔先生に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al: A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 17: 277-282, 2003
- 2) Hayashi Y, Eguchi M, Sugita K, et al: Cytogenetic findings and clinical features in acute leukemia and transient myeloproliferative disorder in Down's syndrome. *Blood* 72: 15-23, 1988
- 3) Kojima S, Sako M, Kato K, et al: An effective chemotherapeutic regimen for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down's syndrome. *Leukemia* 14: 786-791, 2000
- 4) Kudo K, Kojima S, Tabuchi K, et al: Prospective study of a pirarubicin, intermediate-dose cytarabine, and etoposide regimen in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: The Japanese Childhood AML Cooperative Study Group. *J Clin Oncol* 25: 5442-5447, 2007
- 5) Swerdlow SH, Campo E, NL H, eds: 2008 WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues IARC Press Lyon
- 6) Fong CT, Brodeur GM: Down's syndrome and leukemia: Epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 28: 55-76, 1987
- 7) Webb D, Roberts I, Vyas P: Haematology of Down syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 92: F503-507, 2007
- 8) Greene ME, Mundschaug G, Wechsler J, et al: Mutations in *GATA1* in both transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood Cells Mol Dis* 31: 351-356, 2003
- 9) Brink DS: Transient leukemia (transient myeloproliferative disorder, transient abnormal myelopoiesis) of Down syndrome. *Adv Anat Pathol* 13: 256-262, 2006
- 10) Massey GV, Zipursky A, Chang MN, et al: A prospective study of the natural history of transient leukemia (TL) in neonates with Down syndrome (DS): Children's Oncology Group (COG) study POG-9481. *Blood* 107: 4606-4613, 2006
- 11) Zeller B, Gustafsson G, Forestier E, et al: Acute leukaemia in children with Down syndrome: A population-based Nordic study. *Br J Haematol* 128: 797-804, 2005
- 12) Dixon N, Kishnani PS, and Zimmerman S: Clinical manifestations of hematologic and oncologic disorders in patients with Down syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142C: 149-157, 2006
- 13) Langebrake C, Creutzig U, Reinhardt D: Immunophenotype of Down syndrome acute myeloid leukemia and transient myeloproliferative disease differs significantly from other diseases with morphologically identical or

- similar blasts. *Klin Padiatr* **217**: 126-134, 2005
- 14) Hitzler JK, Cheung J, Li Y, et al: GATA1 mutations in transient leukemia and acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Blood* **101**: 4301-4304, 2003
  - 15) Vyas P, Crispino JD: Molecular insights into Down syndrome-associated leukemia. *Curr Opin Pediatr* **19**: 9-14, 2007
  - 16) Bourquin JP, Subramanian A, Langebrake C, et al: Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3339-3344, 2006
  - 17) Lightfoot J, Hitzler JK, Zipursky A, et al: Distinct gene signatures of transient and acute megakaryoblastic leukemia in Down syndrome. *Leukemia* **18**: 1617-1623, 2004
  - 18) McElwaine S, Mulligan C, Groet J, et al: Microarray transcript profiling distinguishes the transient from the acute type of megakaryoblastic leukaemia (M7) in Down's syndrome, revealing PRAME as a specific discriminating marker. *Br J Haematol* **125**: 729-742, 2004
  - 19) Zipursky A, Brown EJ, Christensen H, et al: Transient myeloproliferative disorder (transient leukemia) and hematologic manifestations of Down syndrome. *Clin Lab Med* **19**: 157-167, vii, 1999
  - 20) Magalhaes IQ, Splendore A, Emerenciano M, et al: GATA1 mutations in acute leukemia in children with Down syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* **166**: 112-116, 2006
  - 21) Henderson R, Spence L: Down syndrome with myelodysplasia of megakaryoblastic lineage. *Clin Lab Sci* **19**: 161-164, 2006
  - 22) Lange BJ, Kobrinsky N, Barnard DR, et al: Distinctive demography, biology, and outcome of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome in children with Down syndrome: Children's Cancer Group Studies 2861 and 2891. *Blood* **91**: 608-615, 1998
  - 23) Gamis AS, Woods WG, Alonzo TA, et al: Increased age at diagnosis has a significantly negative effect on outcome in children with Down syndrome and acute myeloid leukemia: A report from the Children's Cancer Group Study 2891. *J Clin Oncol* **21**: 3415-3422, 2003
  - 24) 菊地 陽: Down 症候群の Transient Abnormal Myelopoiesis (TAM) について. *日小血会誌* **23**: 58-61, 2009
  - 25) Klusmann JH, Creutzig U, Zimmermann M, et al: Treatment and prognostic impact of transient leukemia in neonates with Down syndrome. *Blood* **111**: 2991-2998, 2008
  - 26) Muramatsu H, Kato K, Watanabe N, et al: Risk factors for early death in neonates with Down syndrome and transient leukaemia. *Br J Haematol* **142**: 610-615, 2008
  - 27) Malinge S, Izraeli S, Crispino JD: Insights into the manifestations, outcomes, and mechanisms of leukemogenesis in Down syndrome. *Blood* **113**: 2619-2628, 2009
  - 28) Roy A, Roberts I, Norton A, et al: Acute megakaryoblastic leukaemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in Down syndrome: A multi-step model of myeloid leukaemogenesis. *Br J Haematol* **147**: 3-12, 2009
  - 29) Wechsler J, Greene M, McDevitt MA, et al: Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet* **32**: 148-152, 2002
  - 30) Shimada A, Xu G, Toki T, et al: Fetal origin of the GATA1 mutation in identical twins with transient myeloproliferative disorder and acute megakaryoblastic leukemia accompanying Down syndrome. *Blood* **103**: 366, 2004
  - 31) Ahmed M, Sternberg A, Hall G, et al: Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. *Blood* **103**: 2480-2489, 2004
  - 32) Bercovich D, Ganmore I, Scott LM, et al: Mutations of JAK2 in acute lymphoblastic leukaemias associated with Down's syndrome. *Lancet* **372**: 1484-1492, 2008

- 2 Ferrajoli A, Lee BN, Schlette EJ, O'Brien SM, Gao H, Wen S *et al.* Lenalidomide induces complete and partial remissions in patients with relapsed and refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008; **111**: 5291–5297.
- 3 Aue G, Njuguna N, Tian X, Soto S, Hughes T, Vire B *et al.* Lenalidomide-induced upregulation of CD80 on tumor cells correlates with T-cell activation, the rapid onset of a cytokine release syndrome and leukemic cell clearance in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2009; **94**: 1266–1273.
- 4 Andritsos LA, Johnson AJ, Lozanski G, Blum W, Kefauver C, Awan F *et al.* Higher doses of lenalidomide are associated with unacceptable toxicity including life-threatening tumor flare in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2008; **26**: 2519–2525.
- 5 Moutouh-de Parseval LA, Weiss L, DeLap RJ, Knight RD, Zeldis JB. Tumor lysis syndrome/tumor flare reaction in lenalidomide-treated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 5047 (letter).
- 6 Lapalombella R, Andritsos L, Liu Q, May SE, Browning R, Pham LV *et al.* Lenalidomide treatment promotes CD154 expression on CLL cells and enhances production of antibodies by normal B cells through a PI3-kinase dependent pathway. *Blood* 2009; **115**: 2619–2629.
- 7 Egle A, Steurer M, Melchardt T, Stoll M, Greil R. The REVLIRIT CLL5 AGMT Study – a phase I/II trial combining Fludarabine/Rituximab with escalating doses of lenalidomide followed by Rituximab/Lenalidomide in untreated CLL: results of a planned interim analysis. *Blood* 2009; **114**: 3453 (abstract).
- 8 Ferrajoli A, Badoux XC, O'Brien S, Wierda WG, Faderl S, Estrov Z *et al.* Combination therapy with Lenalidomide and Rituximab in patients with relapsed chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2009; **114**: 206 (abstract).

## High frequencies of simultaneous *FLT3*-ITD, *WT1* and *KIT* mutations in hematological malignancies with *NUP98*-fusion genes

*Leukemia* (2010) **24**, 1975–1977; doi:10.1038/leu.2010.207; published online 23 September 2010

Acute myeloid leukemia (AML) is heterogeneous in clinical features and molecular pathogenesis. Cooperating alterations of several genes, including oncogenes or tumor suppressor genes, lead to AML development.<sup>1</sup> AML leukemogenesis is thought to require at least two different types of genetic change: class I mutations, which confer a proliferative or survival advantage; and class II mutations, which block myeloid differentiation and provide self-renewability.<sup>1</sup> In hematological malignancies with 11p15 translocations, the nucleoporin (*NUP*) 98 gene is reportedly fused to various partner genes, often including homeobox genes, such as *HOXA9*, *A11*, *A13*, *C11*, *C13*, *D11*, *D13* and *PMX1*.<sup>2</sup> With respect to the oncogenic mechanism of *NUP98*-HOX fusion proteins, a previous study using a murine bone marrow transplantation assay revealed that *NUP98*-HOXA9, -HOXD13 and -PMX1 fusion proteins induce myelodysplastic syndrome (MDS) or myeloproliferative neoplasm (MPN), which progress to AML.<sup>2</sup> This latency period indicates that additional genetic events might be required for leukemic transformation. Therefore, we examined somatic mutations of the *FLT3*, *KIT*, *WT1*, *RUNX1*, *CEBPA*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS* and *MLL* genes, which are prevalent in AML, in leukemia patients with *NUP98* fusion genes. This study was approved by local ethical committee.

Sixteen patients with chromosomal 11p15 translocations included nine with *NUP98*-HOXA9, two with *NUP98*-HOXA13, two with *NUP98*-HOXA11 and one each with *NUP98*-HOXC11, *NUP98*-HOXD11, *NUP98*-HOXD13 or *NUP98*-NSD3 (Table 1). The partner gene fused to *NUP98* could not be detected in one patient with t(4;11)(q21;p15); however, fluorescent *in situ* hybridization analysis using a probe containing *NUP98* showed split signals (data not shown). No patients had any additional chromosomal abnormality except for chromosomal 11p15 translocations (Supplementary data). Two patients with t(7;11)(p15;p15) had double *NUP98* fusion transcripts: patient (PN) 13 had simultaneous *NUP98*-HOXA9 and *NUP98*-HOXA13 fusions, and PN14 had simultaneous *NUP98*-HOXA9 and *NUP98*-HOXA11 fusions. In all, 15 of the 16 patients with *NUP98*-related hematological malignancies

were diagnosed as having myeloid malignancies, and the other patient (PN16) were initially diagnosed as having T-cell non-Hodgkin's lymphoma with t(4;11)(q21;p15), and transformed into acute myelomonocytic leukemia with the same t(4;11) (lineage switch). Patients with myeloid malignancies consisted of 10 patients with AML, 2 patients with MDS and 3 patients with MPN.

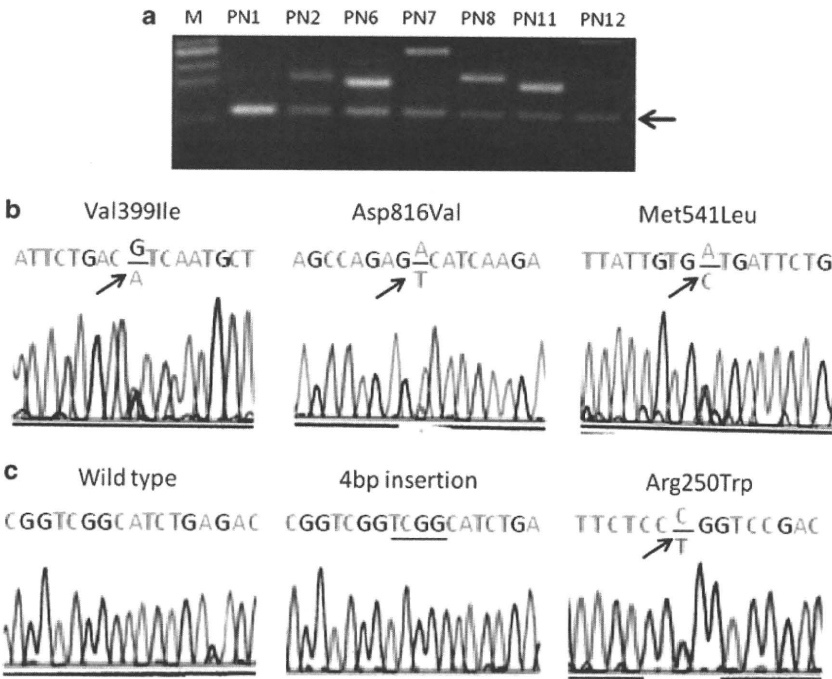
We examined the internal tandem duplications (ITDs) and tyrosine kinase domain (TKD) mutations of the *FLT3* gene in 16 patients, and detected ITDs in nine (56.3%) patients, and TKD mutations in none (Table 1, Figure 1a). The incidence of *FLT3*-ITD in our study was much higher than that in an AML cohort reported previously (12–35%).<sup>1</sup> A high frequency of *FLT3*-ITD was previously reported in 30–35% of AML patients with either normal karyotype or with t(15;17)(q21;q11) resulting in *PML-RARA*, and in 70% of AML patients with t(6;9)(p23;q34) resulting in *DEK-CAN/NUP214*.<sup>1</sup> Interestingly, both *NUP98* and *NUP214* encode a part of the nucleoporin complex. The general activation effects on reporters of the *DEK-CAN/NUP214* fusion protein are specific for myeloid cells.<sup>3</sup> Moreover, in murine bone marrow transplantation assays, *NUP98*-related fusion proteins such as *NUP98*-HOXA9, -HOXD13 and -PMX1 induced MDS or MPN, which progressed to AML.<sup>2</sup> These results demonstrate that the nucleoporin-related proteins share a common ability for myeloid differentiation. Furthermore, the very tight correlation between nucleoporin-related fusion genes and *FLT3*-ITD suggest that *FLT3*-ITD may contribute to the myeloid leukemogenesis involved in nucleoporin-related fusions.

We further examined mutations of the *KIT*, *WT1*, *AML1*, *CEBPA*, *NPM1*, *NRAS*, *KRAS* and *MLL* genes,<sup>4</sup> which are prevalent in AML. *KIT*, *NRAS* and *KRAS* mutations were found in four (25.0%), three (18.8%) and two (12.5%) patients, respectively (Table 1, Figure 1b). *WT1* aberrations were found in eight patients (50.0%; Table 1, Figure 1c). No mutations were found in the other four genes (*RUNX1*, *CEBPA*, *NPM1* and *MLL*). The mutations in *KIT* were all missense mutations including Val399Ile, Met541Leu and Asp816Val, and all mutations of *NRAS* and *KRAS* were Gly13Asp. All of *KIT*, *NRAS* and *KRAS* mutations were heterozygous. The aberrations in *WT1* comprised a frameshift insertion of exon 7 in four patients, missense mutation of exon 9 in one, deletion of exon 5 in one and deletion of the whole coding region in two. Frameshift and

**Table 1** Clinical features and additional mutations of patients with *NUP98*-related leukemias

PN	Age	Sex	Disease	WBC at diagnosis	Karyotype	Fusion partner gene of <i>NUP98</i>	CR	Relapse	Therapy	Prognosis	<i>FLT3</i>	<i>KIT</i>	<i>WT1</i>	<i>NRAS</i>	<i>KRAS</i>
PN1	14	M	AML-M1	12 500	t(11;12)	<i>HOXC11</i>	yes	yes	Chemo+SCT	Death	ITD	Val399Ile	del	WT	WT
PN2	12	F	AML-M2	133 100	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	yes	yes	Chemo+SCT	Death	WT	WT	WT	Gly13Asp	WT
PN3	13	M	AML-M2	460 000	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	yes	yes	Chemo+SCT	Death	ITD	Met541Leu	ins4bpfsX	WT	WT
PN4	13	F	AML-M2	147 000	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	yes	yes	Chemo+SCT	Alive	WT	WT	WT	WT	WT
PN5	15	M	AML-M2	22 700	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	yes	no	Chemo+SCT	Alive	WT	WT	WT	WT	Gly13Asp
PN6	57	M	AML-M2	252 000	t(7;11)	<i>HOXA13</i>	yes	yes	Chemo	Death	ITD	WT	WT	WT	WT
PN7	38	M	AML-M2	6400	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	yes	yes	Chemo+SCT	Death	ITD	Asp816Val	ins4bpfsX	WT	WT
PN8	15	M	AML-M4	187 900	t(2;11)	<i>HOXD11</i>	yes	no	Chemo+SCT	Alive	WT	WT	ins4bpfsX	WT	Gly13Asp
PN9	56	M	AML-M4	204 500	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	yes	yes	Chemo	Lost to follow-up	ITD	WT	WT	WT	WT
PN10	62	M	AML-M4	6500	t(2;11)	<i>HOXD13</i>	yes	no	Chemo	Alive	ITD	WT	WT	WT	WT
PN11	60	M	RA	6250	t(8;11)	<i>NSD3</i>	no	ND	Chemo	Death	ITD	Met541Leu	ins4bpfsX	WT	WT
PN12	69	F	RAEB	2500	t(7;11)	<i>HOXA9</i>	no	ND	Chemo	Death	WT	WT	WT	WT	WT
PN13	45	M	CMML	29 800	t(7;11)	<i>HOXA9/HOXA13</i>	yes	yes	Chemo	Death	ITD	WT	Arg250Trp	WT	WT
PN14	58	F	CML(Ph-)	11 200	t(7;11)	<i>HOXA9/HOXA11</i>	yes	no	Chemo	Alive	ITD	WT	del	WT	WT
PN15	3	F	JMML	39 400	t(7;11)	<i>HOXA11</i>	yes	no	Chemo+SCT	Alive	WT	WT	del exon5	Gly13Asp	WT
PN16	51	F	T-NHL	2600	t(4;11)	undetermined	yes	yes	Chemo+SCT	Death	WT	WT	WT	Gly13Asp	WT

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; Chemo, chemotherapy; CML, chronic myeloid leukemia; CMML, chronic myelomonocytic leukemia; CR, complete remission; del, deletion; F, female; JMML, Juvenile myelomonocystic leukemia; M, male; ND, not determined; Ph-, Philadelphia chromosome; PN, patient number; RA, refractory anemia; RAEB-t, refractory anemia with excess of blasts in transformation; SCT, stem cell transplantation; T-NHL, T-cell non-Hodgkin's lymphoma; WBC, white blood cell; WT, wild type.  
t(11;12), t(11;12)(p15;q13); t(2;11), t(2;11)(q31;p15); t(4;11), t(4;11)(q21;p15); t(7;11), t(7;11)(p15;p15); t(8;11), t(8;11; p11; p15).



**Figure 1** *FLT3*-ITD, *KIT* and *RAS* mutations, and *WT1* aberrations. (a) Identification of *FLT3*-ITD by reverse transcription PCR. M, size marker; arrow indicates wild-type allele. (b) *KIT* mutations. All figures show the sequence of PCR products. (c) *WT1* aberrations. Left panel shows wild type of *WT1* exon 7. Middle panel shows 4-bp insertion in exon 7 of *WT1*. Right panel shows *WT1* missense mutation. Left and middle panels show the sequence of each plasmid subclone, and right panel shows that of PCR products.

missense mutation of *WT1* are heterozygous, whereas deletion was homozygous. *FLT3*-ITD, *KIT* and *RAS* mutations reportedly confer cellular proliferative abilities.<sup>1</sup> In our study, 14 patients (88%) had at least one mutation involved in cellular proliferation (*FLT3*, *KIT* or *RAS*). Recently, Chou *et al.*<sup>5</sup> reported that the *NUP98*-*HOXA9* fusion is strongly associated with *KRAS* and *WT1* mutations. *Nras* and *Kras* mutations were frequently found in AML developed in transgenic mice expressing *NUP98*-*HOXD13*.<sup>6</sup> These results indicate that *NUP98*-related leukemias have a high frequency of mutations involved in growth advantage.

Interestingly, five of the six patients with *WT1* aberrations had *FLT3*-ITD, and three of the five patients with both *FLT3*-ITD and *WT1* aberrations had a *KIT* mutation, although the simultaneous *FLT3*-ITD and *KIT* mutations are reportedly very rare<sup>1</sup>. These results suggest that the *NUP98*-related leukemias share a distinct molecular subgroup in leukemias. In addition, all four patients with *KIT* mutations had both *FLT3*-ITD ( $P=0.04$ ) and *WT1* aberrations ( $P=0.03$ ), whereas all five patients with *RAS* mutations did not have *FLT3*-ITD. In all, 14 (88%) of the 16 patients had either *FLT3*-ITD or *RAS* mutations, but they were mutually exclusive as described in previous papers.<sup>1</sup> These