

## コクローアッセイ、骨髄機能解析、移植治療開発

研究分担者 小島 勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学 教授)  
研究協力者 村松 秀城 (名古屋大学医学部附属病院小児科 助教)

### 研究要旨

GATA2 は生体内の造血機能に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、家族性 MDS/AML、MonoMAC 症候群、DCML 欠損症、Emberger 症候群など、様々な疾患群で GATA2 遺伝子異常が共通して同定された。小児血液疾患における GATA2 異常症の果たす役割を明らかにする目的で、家族性 MDS3 家系 4 例、AML75 例、再生不良性貧血 75 例、若年性骨髄単球性白血病 96 例において GATA2 異常症を検索した。家族性 MDS4 例全例および AML2 例(3%)に GATA2 遺伝子変異が同定されたが、再生不良性貧血および若年性骨髄単球性白血病症例では GATA2 遺伝子変異は認められなかった。

### A. 研究の目的

GATA2 は生体内の造血機能に重要な役割を果たしている転写因子である。近年、家族性 MDS/AML、MonoMAC 症候群、DCML 欠損症、Emberger 症候群など、様々な疾患群で GATA2 遺伝子異常が共通して同定された。小児血液疾患における GATA2 異常症の果たす役割を明らかにするため、GATA2 遺伝子変異を検索した。

### B. 研究方法

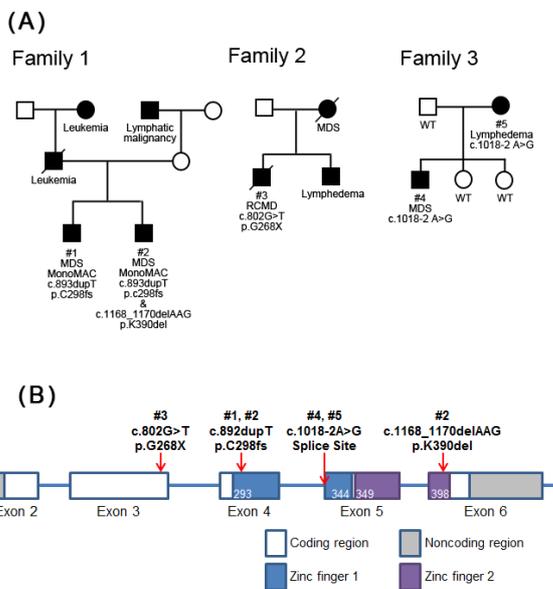
家族性 MDS3 家系 4 例、AML75 例、再生不良性貧血 75 例、若年性骨髄単球性白血病 96 例の骨髄ないし末梢血単核球から genomic DNA を抽出し、サンガーシーケンシング法で GATA2 の全エクソンおよびイントロン 5 の塩基配列を決定した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学医学部倫理委員会の承認を得た研究計画のもと、患者家族の同意を得た。

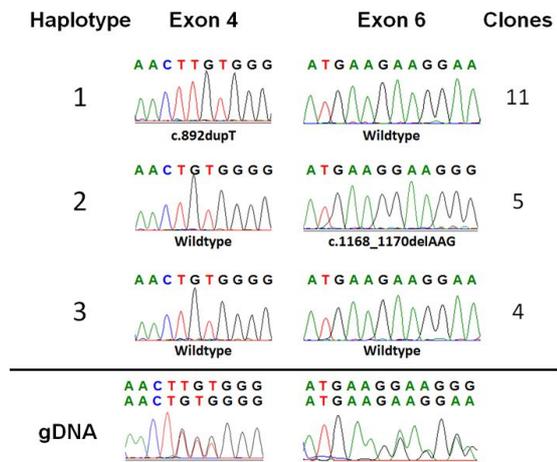
### C. 研究結果

家族性 MDS4 例全例および AML2 例(3%)に GATA2 遺伝子変異が同定されたが、再生不良性貧血および若年性骨髄単球性白血病症例では GATA2 遺伝子変異は認められなかった。家族性 MDS3 家系の家系図および変異部位について、図1にまとめた。Family1 に属する患者#2 では、同一家系の他の罹患者と共通の germline GATA2 変異に加えて、MDS 発症時の検体から somatic GATA2 変異が同定された。



**図 1. 家族性 MDS 3 家系の(A)家系図および (B) GATA2 変異部位**

患者#2 の germlineGATA2 変異(エクソン 4 の c.892dupT) および somatic GATA2 変異 (エクソン 6 の c.1168\_1170delAAG) が同一アレルに存在するか、対立アレルに存在するか検討するため、両変異を含む PCR アンプリコンを増幅し、TA クローニング法による解析を行った。20 クローンピックアップし、塩基配列を決定した。エクソン 4 の変異のみが検出されたクローンが 11 個、エクソン 6 の変異のみが検出されたクローンが 5 個、両方とも正常配列であったクローンが 4 個であった(図 2)。この結果から、これら 2 つの変異は対立アレルに存在すると考えられた。



**図 2. TA クローニング法による患者#2 の GATA2 変異解析**

## D. 考察

germlineGATA2 変異に加えて、MDS 発症時に対立アレルに somatic GATA2 変異を獲得した家族性 MDS 症例を同定した。GATA2 遺伝子変異は、MDS クローンの腫瘍化進展にも関与していることが考えられた。また、若年性骨髄単球性白血病および再生不良性貧血では変異例を認めず、GATA2 異常症がこれらの病状を示す可能性は低いことが考えられた。

## E. 結論

小児血液疾患における GATA2 遺伝子異常について解析を行った。家族性 MDS では高率に変異が検出された一方、若年性骨髄単球性白血病および再生不良性貧血では変異例は認められなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Hira A, Yabe H, Yoshida K, Okuno Y, Shiraishi Y, Chiba K, Tanaka H, Miyano S, Nakamura J, Kojima S, Ogawa S, Matsuo K, Takata M, Yabe

- M. Variant ALDH2 is associated with accelerated progression of bone marrow failure in Japanese Fanconi anemia patients. *Blood*. 2013 Oct 31;122(18):3206-3209.
- 2) Kunishima S, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Sanada M, Muramatsu H, Chiba K, Tanaka H, Miyazaki K, Sakai M, Ohtake M, Kobayashi R, Iguchi A, Niimi G, Otsu M, Takahashi Y, Miyano S, Saito H, Kojima S, Ogawa S. ACTN1 mutations cause congenital macrothrombocytopenia. *Am J Hum Genet*. 2013 Mar 7;92(3):431-438.
  - 3) Makishima H, Yoshida K, Nguyen N, Przychodzen B, Sanada M, Okuno Y, Ng KP, Gudmundsson KO, Vishwakarma BA, Jerez A, Gomez-Segui I, Takahashi M, Shiraishi Y, Nagata Y, Guinta K, Mori H, Sekeres MA, Chiba K, Tanaka H, Muramatsu H, Sakaguchi H, Paquette RL, McDevitt MA, Kojima S, Sauntharajah Y, Miyano S, Shih LY, Du Y, Ogawa S, Maciejewski JP. Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):942-946.
  - 4) Nomura K, Hoshino A, Miyawaki T, Hama A, Kojima S, Kanegane H. Neutropenia and myeloid dysplasia in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):885-886.
  - 5) Okuno Y, Murakoshi A, Negita M, Akane K, Kojima S, Suzuki H. CD8+ CD122+ regulatory T cells contain clonally expanded cells with identical CDR3 sequences of the T-cell receptor beta-chain. *Immunology*. 2013 Jul;139(3):309-317.
  - 6) Sakaguchi H, Okuno Y, Muramatsu H, Yoshida K, Shiraishi Y, Takahashi M, Kon A, Sanada M, Chiba K, Tanaka H, Makishima H, Wang X, Xu Y, Doisaki S, Hama A, Nakanishi K, Takahashi Y, Yoshida N, Maciejewski JP, Miyano S, Ogawa S, Kojima S. Exome sequencing identifies secondary mutations of SETBP1 and JAK3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet*. 2013 Aug;45(8):937-941.
  - 7) Takahashi Y, Muramatsu H, Sakata N, Hyakuna N, Hamamoto K, Kobayashi R, Ito E, Yagasaki H, Ohara A, Kikuchi A, Morimoto A, Yabe H, Kudo K, Watanabe K, Ohga S, Kojima S, Japan Childhood Aplastic Anemia Study G. Rabbit antithymocyte globulin and cyclosporine as first-line therapy for children with acquired aplastic anemia. *Blood*. 2013 Jan 31;121(5):862-863.
  - 8) Yoshida K, Toki T, Okuno Y, Kanazaki R, Shiraishi Y, Sato-Otsubo A, Sanada M, Park MJ, Terui K, Suzuki H, Kon A, Nagata Y, Sato Y, Wang R, Shiba N, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Muramatsu H, Hasegawa D, Nakamura K, Kanegane H, Tsukamoto K, Adachi S, Kawakami K, Kato K, Nishimura R, Izraeli S, Hayashi Y, Miyano S, Kojima S, Ito E, Ogawa S. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013 Nov;45(11):1293-1299.
  - 9) Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S.

Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2013 May;60(5):836-841.

## 2. 学会発表

- 1) Kojima S. Aplastic Anemia : Therapeutic updated in HSCT. 2013 International Forum on Bone Marrow Failure. Aug.16, 2013. Tianjin, China.
- 2) Kojima S. Clonal Evolution from Aplastic Anemia to Myelodysplastic Syndrome with Monosomy7. 7th International Congress on Shwachman-Diamond Syndrome. Nov. 3-6, 2013. Toronto, Canada.
- 3) 小島勢二. 先天性血液疾患の病態研究に関する最近の進歩. 第 116 回日本小児科学会学術集会. 2013 年 4 月 19 日. 広島.
- 4) 坂口 大俊、西尾 信博、川島 希、王 希楠、成田 敦、土居崎 小夜子、村松 秀城、濱 麻人、中西 康詞、高橋 義行、土田 昌宏、小林 良二、伊藤 悦朗、矢部 普正、大賀 正一、小原 明、長谷川 大輔、真部 淳、伊藤 雅文、小島 勢二. Telomere length as a predictor for the immunosuppressive therapy in acquired aplastic anemia. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.
- 5) 王 希楠、村松 秀城、坂口 大俊、徐 銀燕、川島 希、成田 敦、土井崎 小夜子、Olfat Ismael、中西 康詞、濱 麻人、高橋 義行、小島 勢二. GATA2 shows association with familial MDS, but not AA and JMML in Japanese children. 第 75 回日本血液学会学術集会. 2013 年 10 月 12 日. 札幌.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし