

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16074

研究課題名（和文）DCML欠損症発症に寄与するGATA2によるB細胞分化制御機構

研究課題名（英文）GATA2-mediated regulation of immune cell differentiation involved in immunodeficiency

研究代表者

長谷川 敦史（Hasegawa, Atsushi）

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80747460

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：免疫担当細胞の分化制御における転写因子GATA2の役割と、その破綻による疾患発症機序の解明を目的とし、造血疾患患者より見つかったGATA2R398W変異体を発現するマウスの血液学的表現型解析と、同変異体の分子機能解析をおこなった。同マウスより、ヒトDCML欠損症と類似した末梢血白血球、特にB細胞、NK細胞、樹状細胞、および単球の有意な減少と、B細胞分化異常を認めた。さらに同変異体はDNA結合能および転写活性化能が減弱するが、GATA2の結合配列構造に依存して、共存する野生型GATA2に対しドミナントネガティブ作用を示し、ヘテロ接合で発症する疾患の発症機序の一端を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本変異マウスにおけるB細胞減少を始めとした免疫系異常は、従来用いられてきたGATA2ノックアウトマウスでは見出されてこなかった。本研究より血球分化制御におけるGATA2の新たな役割を見出した。さらに疾患患者と同様にヘテロ接合で表現型を示す本マウスは、GATA2の多様な機能、特に本変異体で特徴的なドミナントネガティブ作用を解析可能な重要な動物モデルとなる。疾患保因者は、加齢に伴い進行する免疫機能低下や骨髄増殖性腫瘍発症の逃れ得ない恐怖に対峙しなければならない。新規治療薬につながる標的分子の発見や悪性化の効果的な予防法の開発を目指した基礎研究を、本研究成果により加速させることができると考える。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the roles of GATA2, an indispensable transcription factor in hematopoiesis, for regulation of immune cell differentiation and the pathogenesis of GATA2-related diseases, we analyzed mouse model expressing GATA2R398W mutant found in disease patients and characterized molecular function of this mutant. This mouse line exhibited decrease of peripheral immune cells, containing B-cell, NK-cell, dendritic-cell and monocyte, and abnormal differentiation of B-cell in bone marrow. DNA binding ability and trans activation activity of GATA2R398W were impaired. Furthermore, dominant negative effects of GATA2R398W against co-existing intact GATA2 were also observed on a specific Cis-element configuration. Above molecular character of GATA2R398W enabled to elucidate a part of pathogenesis of diseases with heterozygous GATA2 mutation.

研究分野：分子血液学

キーワード：GATA2

1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞が自己複製し、あらゆる血球へ分化する際には、転写因子ネットワークによる多様な遺伝子発現制御が不可欠である。したがって、転写因子の機能異常は、白血病や貧血、免疫不全症等の多くの血液疾患の原因となる。

GATA 結合転写因子群に属する GATA2 は、造血幹細胞や骨髄球系列において特異的に発現している。これまで、GATA2 を完全欠失した遺伝子破壊マウスでは造血幹細胞が産生されずに胎生致死となること (Tsai *et al.* 1994 *Nature*)、また成獣マウスにおける後天的な GATA2 の欠失が造血幹細胞の自己複製や生存能、また多分化能を強く障害することがわかっており (Li *et al.* 2016 *Eur J Haematol.*)、造血幹細胞の機能維持における GATA2 の重要性が注目されている。一方、血球運命決定や分化誘導における GATA2 の役割には不明な点が多い。

近年、単球/マクロファージ、B 細胞、NK 細胞、樹状細胞の減少と免疫不全、さらに骨髄増殖性腫瘍への進展を特徴とする DCML 欠損症患者において、GATA2 遺伝子の変異がその病態形成に關与していることが示唆され、GATA2 機能異常と疾患と関連がクローズアップされてきた (Bresnick *et al.* 2012 *Nucleic Acids Res.*, Shimizu and Yamamoto 2020 *IUBMB Life*)。本疾患は、GATA2 のフレームシフト変異やアミノ酸置換変異など多様な GATA2 の変異が報告されているが、いずれも常染色体顕性遺伝形式で発症することから、GATA2 のハプロ不全が疾患発症に関わっていると推察されている。申請者は、患者由来 GATA2R398W 変異 (398 番目のアルギニンのトリプトファン置換) を持つマウス系統をゲノム編集技術により樹立し、そのヘテロ接合マウス (*Gata2*^{R398W/+}) が B 細胞や NK 細胞の減少を伴う DCML 欠損症様症状を持つことを見いだした。一方、申請者および他の研究者らの解析より、単純な GATA2 ヌルアルリルをヘテロにもつマウス (*Gata2*^{KO/+}) では、造血幹細胞や骨髄系前駆細胞の僅かな異常を認めるのみで、末梢血中の成熟血球数は保たれていることがわかっている (Rodrigues *et al.* 2005 *Blood*)。このことから DCML 欠損症の発症には、単純な GATA2 の量的異常ではなく、変異による GATA2 の機能不均衡が複雑に影響していると考えられる。

2. 研究の目的

本申請研究では、ヒト DCML 欠損症と申請者が樹立した DCML 欠損症モデルマウス (*Gata2*^{R398W/+}) において共通した表現型を示す B 細胞系列に着目し、B 細胞分化における GATA2 の役割を、同モデルマウスを用いて個体内で明らかにすることを目的とした。また、GATA2 の機能異常が病態形成に寄与する分子メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 先行研究より確認された、生後 5-7 ヶ月齢の *Gata2*^{R398W/+} マウスにおける末梢白血球減少の経時変化を明らかにするために、若齢期 (生後 3 ヶ月齢)、中間期 (生後 5-7 ヶ月齢)、老齢期 (生後 12 ヶ月齢) における血液学的表現型を解析した。さらに、*Gata2*^{R398W} 変異のホモ接合個体および *Gata2* ノックアウトアルリルとのヘテロ接合個体を作出し、ヘテロ接合個体との表現型の差異を解析した。

(2) 末梢白血球の産生異常につながる、造血幹前駆細胞分画における表現型を解析するために、*Gata2*^{R398W/+} マウス骨髄のフローサイトメトリー解析を行った。造血幹前駆細胞分画および B 細胞系前駆細胞分画を対象に分化段階を細分化し、分布異常を解析した。さらに、B 細胞分化能を詳細に解析するために、骨髄細胞を用いたコロニー形成能解析を行った。

(3) GATA2R398W 変異は生体分子間相互作用に重要な C 末側亜鉛フィンガードメインに位置することから、GATA2 タンパク質の機能欠失を惹起すると想定された。分子間相互作用の性質変化を解析するために、精製タンパク質を用いたタンパク質間相互作用解析 (Pull-down 解析)、タンパク質-核酸相互作用解析 (表面プラズモン共鳴解析) を行った。さらに標的遺伝子の転写制御能を、培養細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにより解析した。この際、GATA2 が結合するシス配列の構造を変化させ、DNA 結合能および転写活性化能の強弱にシス配列構造特異性が存在するかを検討した。

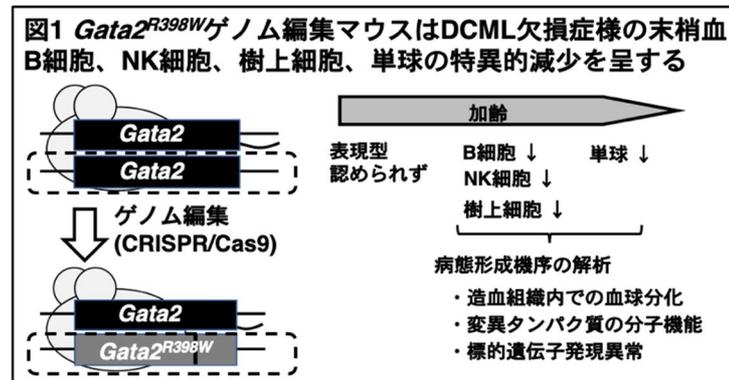
(4) *Gata2*^{R398W/+} マウスにおける表現型発現につながる GATA2 標的遺伝子の発現制御異常を、骨髄 LSK 分画の定量 RT-PCR により解析した。ヘテロマウスにおける野生型 GATA2 と GATA2R398W 変異体の共発現は、Tandem-GATA モチーフを有する標的遺伝子においてドミナントネガティブ作用による発現制御破綻を惹起すると想定し、既存の GATA2 を対象とした網羅的クロマチン免疫沈降解析の情報より、該当する標的遺伝子の探索と発現量変化を解析した。また B 細胞の分化異常に直接的に關与する遺伝子発現異常を探索するため、マウス骨髄リンパ球系前駆細胞を分取し、網羅的 RNA-Seq 解析を行った。

4. 研究成果

(1) *Gata2*^{R398W/+} マウスにおけるヒト DCML 欠損症の血液学的所見の再現

若齢期（生後 3 ヶ月齢）における *Gata2*^{R398W/+} マウスは顕著な血液学的異常を示さず、中間期（生後 5-7 ヶ月齢）より末梢白血球、特に B 細胞、NK 細胞、樹状細胞の減少を呈することがわかった。老齢期（生後 12 ヶ月齢）ではさらに、末梢血中の単球の減少を呈することがわかり、生後から加齢に伴って表現型が重篤化していくことがわかった。病態の加齢変化はヒト DCML 欠損症患者においても認められる特徴であるが、疾患症例と異なり、本マウスでは観察期間中に白血病に進行することはなかった。本変異マウスは複数の系統が樹立されており、別系統マウスにおいても同様の傾向が確認された。以上の結果より、本マウスは DCML 欠損症の病態の一部をよく再現する動物モデルであることが示された（図 1）。

一方、変異 GATA2 のみを発現する *Gata2*^{R398W/R398W} マウス、および *Gata2*^{R398W/KO} マウスは、それぞれ胎生 14.5 日、13.5 日までに致死となることがわかり、GATA2R398W 変異による重篤な遺伝子機能欠失が示された。GATA2 の完全ノックアウトマウス胎仔はより早期に致死となることから、GATA2R398W 変異体は、部分的に GATA2 の機能が残存していることが示唆された。また *Gata2*^{R398W/R398W} マウス胎仔の方が *Gata2*^{R398W/KO} マウス胎仔と比較して僅かながらも延命が認められたことから、アリル数に依存した機能代償があることが示唆された。



(2) *Gata2*^{R398W/+} マウス骨髄における B 細胞分化異常

Gata2^{R398W/+} マウス骨髄のフローサイトメトリー解析より、造血幹前駆細胞分画における顕著な表現型は認められないことがわかった。一方で、骨髄における B 細胞系前駆細胞の割合減少が認められた（図 2）。さらに、*Gata2*^{R398W/+} マウス骨髄における B 細胞系のコロニー形成能低下より、B 細胞分化を支える前駆細胞の減少あるいは異常が支持された。このことは、あらゆる血球分化に影響を与え得る造血幹前駆細胞ではなく、分化系列決定後の前駆細胞における細胞機能異常が、特定系列の血球産生産生異常を惹起していることを示唆する結果である。

(3) GATA2R398W 変異体の生化学的特性と、野生型 GATA2 との共発現条件下でのドミナントネガティブ作用

野生型 GATA2 および GATA2R398W 変異体、GATA2T354M 変異体の精製タンパク質を用いた Pull-down 解析より、GATA2 がホモダイマーを形成することが示された。また GATA2R398W 変異体、GATA2T354M 変異体も、野生型 GATA2 と同等のダイマー形成能が認められた。

野生型 GATA2 および GATA2R398W 変異体、GATA2T354M 変異体の精製タンパク質と合成オリゴ DNA を用いた SPR 解析より、GATA 結合モチーフに対する GATA2 変異体の結合能低下が認められた。特に、2 つの GATA 結合モチーフが連続した Tandem-GATA モチーフでは、野生型 GATA2 と GATA2 変異体を混合した条件下において、GATA2 変異体の混合量に依存した顕著な結合親和性の低下が認められた。一方で単一の GATA 結合モチーフのみを有する Single-GATA モチーフでは、GATA2 変異体の混合量が増加しても結合親和性の低下は軽微であった。

Single-GATA モチーフ、Tandem-GATA モチーフを内包するルシフェラーゼ発現構築を導入した HEK293T 細胞を用い、ルシフェラーゼレポーター解析を行った。その結果、野生型 GATA2 と比較し、両モチーフに対する GATA2R398W 変異体および GATA2T354M 変異体の転写活性化能低下が認められたが、GATA2 変異体単独発現条件下では、発現量依存的に転写活性化能が回復することがわかった。ところが野生型 GATA2 と GATA2 変異体の共発現条件下で、GATA2 変異体の発現量を増加させた場合には、Single-GATA モチーフ上では野生型 GATA2 の転写活性化能以上の活性増加が認められたが、一方で Tandem-GATA モチーフ上では野生型 GATA2 の転写活性化能を抑制した。

以上の結果は、GATA2 変異体は共存する野生型 GATA2 に対しドミナントネガティブ作用を持つこと、その抑制作用は Tandem-GATA モチーフ上において特異的であることを示している。実施者らは先行研究より、GATA 転写因子ファミリーに属する GATA1 が Tandem-GATA モチーフ上でホモダイマーを形成して結合・転写制御を行うことを見出している（Hasegawa *et al.* 2016 *Mol Cell Biol.*）。同様の機構は GATA2 においても存在することが推察される。このことは、共存する野生型 GATA2 と GATA2 変異体のダイマー形成による転写制御活性の抑制が、ドミナントネガティブ作用の本質であることを示唆する。

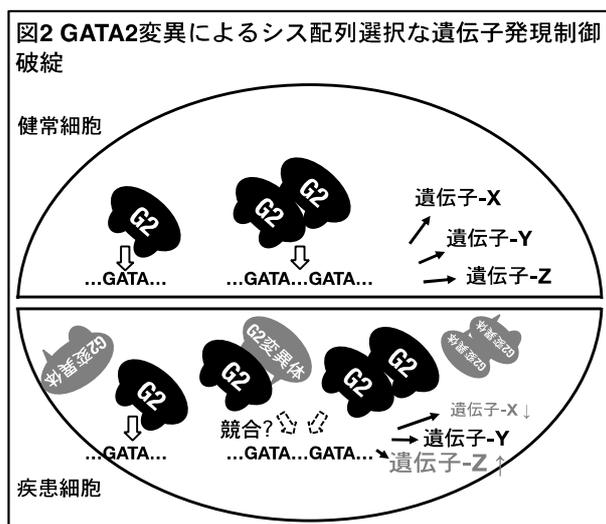
(4) Tandem-GATA モチーフを有する標的遺伝子の探索と *Gata2*^{R398W/+} マウスにおける発現変動

ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) に公開させている、GATA2 を対象とした網羅的クロマチン免疫沈降解析のデータを再解析し、ゲノム上の GATA2 結合領域における Tandem-GATA モチーフの有意な濃縮を認めた。Tandem-GATA モチーフが近傍に存在する標的遺伝子を抽出し、マウス骨髄 LSK (Lineage⁻ cKit⁺ Sca1⁺) 分画を用いた定量 RT-PCR により発現量を解析したところ、複数の遺伝子において、野生型マウスに対し *Gata2*^{R398W/+} マウスで発現量変動が認められた。このことは細胞内における一部の内在性遺伝子の転写制御に、Tandem-GATA モチーフを介した GATA2 の転写制御活性が重要である可能性を示している。

マウス骨髄リンパ球系前駆細胞の RNA-Seq 解析より、*Gata2*^{R398W/+} マウスでは免疫系細胞分化、機能制御に関わる多数の遺伝子の発現異常を認め、GATA2 変異に起因する、分子レベルでの細胞障害が明らかとなった。この中では Tandem-GATA モチーフを有する遺伝子はほとんど含まれていないことが明らかとなり、GATA2 変異によるドミナントネガティブ制御のみならず、複合的なタンパク質機能異常が病態を形成していることが示唆された。

(5) 総括

本研究での解析結果は、これまで未知であったリンパ球分化における GATA2 の貢献を示唆するものである。またヒト DCML 欠損症患者と同様のヘテロ接合変異が疾患発症に強く関わること、その背景として標的遺伝子の転写制御破綻(その一部にはシス配列構造の特異性が存在) が、表現型につながる遺伝子発現異常を惹起していることを示唆するものである (図 2)。



<引用文献>

1. Tsai FY *et al.* 1994 An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature* 371, 221-226.
2. Li HS, *et al.* 2016. Loss of c-Kit and bone marrow failure upon conditional removal of the GATA-2 C-terminal zinc finger domain in adult mice. *Eur J Haematol.* 97(3):261-270.
3. Bresnick EH. *et al.* 2012 Master regulatory GATA transcription factors: mechanistic principles and emerging links to hematologic malignancies. *Nucleic Acids Res.* 40(13):5819-5831.
4. Shimizu R. and Yamamoto M. 2020 Quantitative and qualitative impairments in GATA2 and myeloid neoplasms. *IUBMB Life* 72, 142-150.
5. Rodrigues NP *et al.* 2005 Haploinsufficiency of GATA-2 perturbs adult hematopoietic stem-cell homeostasis. *Blood* 106, 477-484.
6. Hasegawa A. *et al.* 2016 GATA1 Binding kinetics on conformation-specific binding sites elicit differential transcriptional regulation. *Mol Cell Biol.* 36, 2151-2167.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 長谷川敦史, 竹中佑太, 保坂優奈, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 GATA2による系列特異的な免疫細胞産生制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷川敦史, 藤田優城, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 GATA2による系列特異的な免疫細胞産生制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田優城, 長谷川敦史, 平野育生, 清水律子
2. 発表標題 DCML欠損症発症に関与する変異GATA2の分子機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------