

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17392

研究課題名(和文) 転写因子GATA1とエリスロポエチンシグナルが形作る赤血球への運命決定機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the regulation of early erythropoiesis by transcription factor GATA1 and erythropoietin signal

研究代表者

平野 育生 (Hirano, Ikuo)

東北大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00708117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、赤血球分化を制御する転写因子GATA1と、赤血球造血を促すサイトカインであるEPOシグナルによる赤血球分化制御機構の詳細を明らかにすることを目的としている。同一個体内でGATA1 KDまたはGATA1 KO細胞と正常細胞を比較可能なマウスを用いた比較解析により、GATA1がMEP段階の分化に必須であること、GATA1 KD細胞では異常な遺伝子発現パターンを示す細胞集団が生じること、また同分化段階でGATA1はEpor遺伝子発現を制御することでEPOシグナルを制御している一方で、EPOシグナルによるGata1遺伝子の発現制御は存在しないと考えられることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

赤血球は、その分化過程において造血幹細胞から段階的に分化が進み運命決定される。GATA1転写因子は赤血球分化のマスター転写因子として知られており、赤血球分化過程の広範な段階を制御しているが、比較的その発現量の少ない分化段階初期における機能については、その標的遺伝子を含め不明であった。本研究は、GATA1が機能する最初期の赤血球分化過程における働きを明らかとするものであり、将来的にiPS細胞等からの効率的な赤血球分化誘導系の最適化や、種々の貧血を伴う血液疾患の治療法の開発につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the details of the regulatory mechanism of erythropoiesis by EPO, a cytokine that promotes erythropoiesis, and GATA1, a transcription factor that regulates erythroid differentiation. I performed a comparative analysis using mice in which GATA1 KD or GATA1 KO cells could be compared to normal cells within the same individual. The results showed that GATA1 is essential for differentiation at the MEP stage and that GATA1 KD cells produce an abnormal cell cluster that exhibits a specific gene expression pattern. We also suggested that GATA1 regulates EPO signaling by regulating Epor gene expression during the MEP stage, while there is no regulation of Gata1 gene expression by EPO signaling.

研究分野：分子生物学

キーワード：GATA1 Erythropoiesis differentiation EPO

1. 研究開始当初の背景

全ての血球は造血幹細胞 (hematopoietic stem cells, HSC) より分化し生じる。種々の血球の分化過程は多様なサイトカインや転写因子などにより緻密に制御されているが、その全容は未だ明らかとなっていない。近年、少数細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析手法などの解析技術の進歩により、その制御の一端が明らかになり、古典的な血球分化系統樹も塗り替えられつつある。赤血球は、HSCからMPPを経て、巨核球赤芽球共通前駆細胞 (MEP)、前赤芽球、赤芽球と分化が進み、最終的に脱核し赤血球となり末梢血中出现する。この分化過程の運命決定は赤血球分化を誘導するサイトカインであるエリスロポエチン (EPO) と赤血球特異的な遺伝子発現を制御する転写因子GATA1により制御されている。GATA1発現が必須となる赤血球分化段階を解析したこれまでの結果より、GATA1発現はMEP段階の分化に重要であることが示されている。同分化段階はEPOレセプターの発現が確認される段階でもあるため、EPO-EPORシグナルとGATA1は赤血球分化を協調的に制御していると予想された。

2. 研究の目的

本研究は、赤血球分化を制御する転写因子 GATA1 と赤血球造血を促すサイトカインである EPO シグナルによる協調的な赤血球分化制御機構の詳細を、マウス個体を用いた解析により明らかにすることを目的とした。特に、GATA1 発現が必須となる分化段階における GATA1 標的遺伝子の同定、および EPO シグナルによる *Gata1* 遺伝子発現制御の有無を明らかにすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

X 染色体上に存在する *Gata1* 遺伝子の欠損マウス (*Gata1-null/Y*) や *Gata1* 発現低下マウス (*Gata1.05/Y*) は造血障害を伴い胎生致死となる。また、X 染色体を 2 本持つ雌個体ではランダムな X 染色体の不活性化 (XCI) がおこるため、*Gata1-null/X* や *Gata1-KD/X* マウスでは、GATA1 正常発現細胞と GATA1 異常細胞がランダムに生じてしまい GATA1 発現異常による影響をマウス個体で解析するのは困難であった。そこで本研究では、*Gata1* 遺伝子の発現低下アリルである *Gata1.05* アリルと、XCI パターンを蛍光色素発現で識別可能とするアリル (*Hprt-EGFP*, *Hprt-RED*) を両方持つマウスを作成し解析に用いた。同マウスを用い、骨髓細胞を用いたフローサイトメトリー (FCM) 解析や、単離した細胞サンプルを用いたバルク RNA-sequencing 解析、シングルセル RNA-sequencing 解析を実施した。また、EPO シグナルによる *Gata1* 遺伝子発現の制御機構がある可能性を示すため、*Gata1* 遺伝子領域の種間保存性の高い STAT 因子結合モチーフに変異を導入したマウスを作製し、解析を行なった。

4. 研究成果

Gata1-null/Hprt-RED マウスは目立った血算値の異常は示さないが、体内に XCI により正常に GATA1 を発現する細胞 (GATA1 WT 細胞) と *Gata1* を発現しない細胞 (GATA1 KO 細胞) が同時に存在し、またこれらの細胞は mCherry 蛍光により識別可能である。同マウスを用い、GATA1 が必須となる赤血球分化段階の同定を FCM 解析により行なった結果、GATA1 WT 細胞では野生型マウ

スと同様に赤血球が正常に分化しているのに対し、GATA1 KO 細胞では MEP 細胞分画 (Lin⁻, Sca1⁻, cKit⁺, CD41⁻, FcγR⁻, CD105⁻, CD150⁺) がほとんど消失しており、MEP 段階よりも前の分化段階で分化が障害されていることが示された。また、*Gata1.05/Hprt-EGFP* と同様に、*Gata1-null/Hprt-RED* マウスにおいても巨核球前駆細胞分画 (Lin⁻, Sca1⁻, cKit⁺, CD41⁺, CD150⁺) が増加していた (図 1)。*Gata1* 遺伝子の発現は MEP 以降の分化段階で劇的に増加することが知られているが、この結果は、相対的に低程度の発現であっても GATA1 の発現が CMP から MEP への分化に重要であることを意味している。また、MEP は巨核球・赤芽球共通前駆細胞であることから、GATA1 発現欠失により分化が障害された細胞は巨核球系列へと分化方向が変化していることが示唆されたが、巨核球前駆細胞自身が GATA1 発現欠失により異常増殖している可能性も考えられるため、今後のより詳細な解析が必要である。

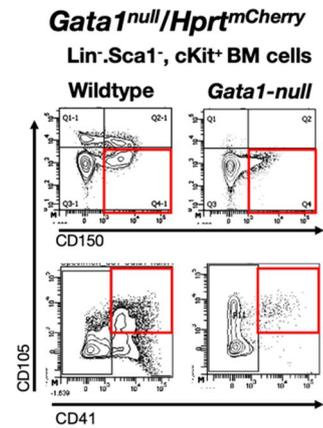


図.1 *Gata1*-null細胞はMEPへの分化が障害され、巨核球前駆細胞が増加する

次に、赤血球分化過程において GATA 1 発現が重要となる MEP 分画において、GATA1 により制御される因子を解明することを目的に、GATA1WT MEP 細胞と GATA1KD MEP 細胞を同一個体より分取し、網羅的な遺伝子発現解析を行った。その結果、GATA1 KD MEP 細胞においてアポトーシスや細胞周期に関連する遺伝子、KIT シグナルに関わる遺伝子の発現などに差を認めた。造血幹前駆細胞では GATA2 転写因子が幹細胞製の維持などに働いていることが知られており、赤血球分化過程においては GATA1 発現により *Gata2* 遺伝子の発現が抑制され、発現する GATA 転写因子が GATA2 から GATA1 へと置き換わる GATA factor switching という現象が生じる。RNA-seq 解析の結果では、GATA1 KD MEP 細胞で *Gata2* 遺伝子の発現増加や EPO レセプター (*Epor*) 遺伝子の発現低下が認められた。これらの結果は、GATA1 発現低下により GATA factor switching が正常に起こらず、また EPOR 発現が誘導されないことで EPO シグナルも誘導されないため MEP 段階以降の分化が障害されていることを示している (図 2)。

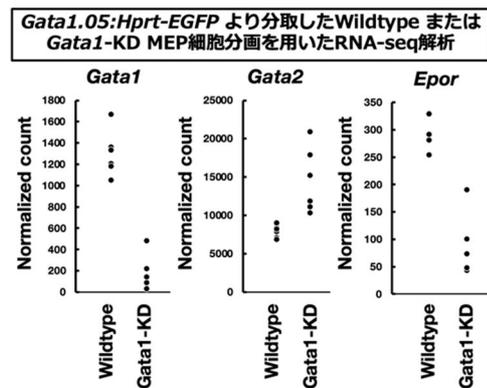


図.2 *Gata1*-KD MEP細胞では*Epor*発現誘導が抑制されている

転写因子 GATA1 発現の低下により血球分化全般への影響、および遺伝子発現パターンの変化を解析する目的で、*Gata1.05, HprtGFP/IX* マウス cKit 陽性骨髄細胞を用いたシングルセル (sc) RNA-seq 解析を実施した。クラスタリング解析により得られた各クラスターについて遺伝子発現パターンにより細胞種を特定した後、*Hprt-GFP* 遺伝子発現の有無により GATA1 WT 細胞と GATA1 KD 細胞を分離、比較した。その結果、細胞表面タンパク質マーカーにより分類する FCM 解析による結果と同様に、GATA1 KD 細胞では MEP 細胞クラスター以降の赤血球系列が消失していることが示された (図 3)。その一方で、同解析において MEP として識別されたクラスターをサブクラスター解析により解析した結果、GATA1KD および GATA1 正常細胞どちらにおいても同定される細胞集団 (C1, C2) と、GATA1KD 細胞で特異的に出現している細胞集団 (C3) および GATA1 正常細胞特異的に出現している細胞集団 (C4) が MEP クラスターに内包されていることが示された。このことは、MEP 集団内にはその遺伝子発現パターンで識別可能な分化段階またはサブタイプが

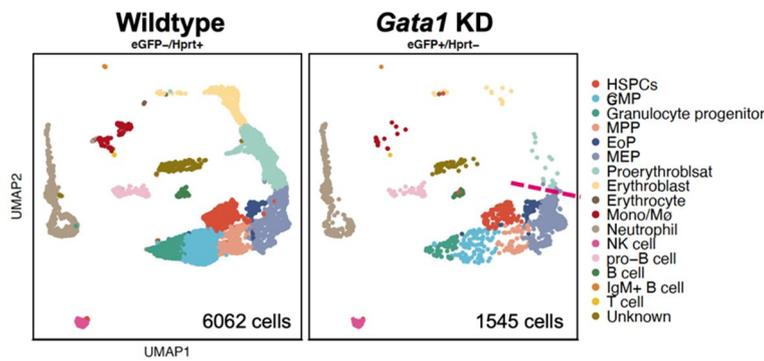


図.3 *Gata1.05, Hprt-EGFP/X* cKit陽性骨髓細胞を用いたscRNA-seq解析結果

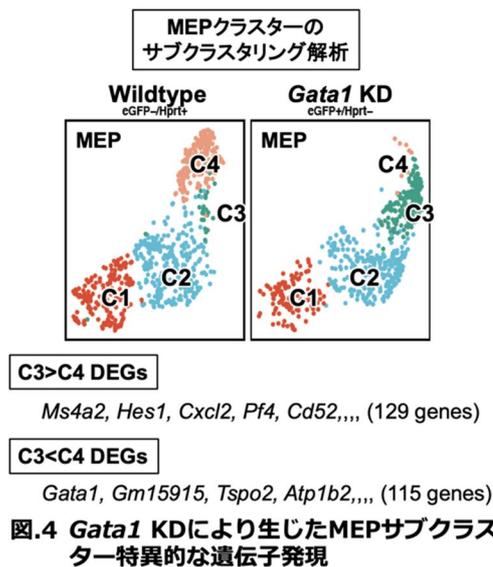


図.4 *Gata1* KDにより生じたMEPサブクラスター特異的な遺伝子発現

存在していることを示しており、C4 クラスタは GATA1 発現に依存性の高い集団であること、C3 クラスタは GATA1 発現低下により生じた異常な集団であると考えられる。C3-C4 クラスタ間で発現の異なる遺伝子セット

を抽出し解析した結果、C3 クラスタにおいて *Gata1* 遺伝子の発現とともに赤血球分化過程でその発現が報告されている複数の遺伝子の発現が低下していた (図 4)。その一方で、*Epor* 遺伝子や EPO シグナルにより誘導される遺伝子 *Cish, Bcl2l1* などの発現に大きな変動は認められなかった。この結果は、前述した RNA-seq 解析の結果と異なるが、おそらく FCM 解析において細胞表面タンパク質発現を元にして分画した MEP 画分と、scRNA-seq 解析において遺伝子発現パターンにより識別された MEP クラスタの違いを反映していると考えられる。また、この分化異常を示していると考えられる C4 が出現したことは、EPO シグナルによる制御と独立し

た、GATA1 による赤血球初期分化制御機構が同分化段階に存在することを示している。

最後に、EPO シグナルにより *Gata1* 遺伝子の発現が制御されている可能性を検証するために、*Gata1* 遺伝子制御領域内の種間で高度に保存された STAT 結合配列を探索した。その結果、*Gata1* 遺伝子第 1 イントロン内に、種間保存性の高い STAT 結合配列が存在し、またその近傍には同様に種間保存性の高い GATA 配列、CACCC モチーフが存在していた。そこで同領域を介した *Gata1* 遺伝子発現制御機構の有無を検証する目的で、ゲノム領域より同領域を欠失したマウスを CRISPR/Cas9 システム法により作製した (*dG1Ebc*)。樹立した複数系統について末梢血血算測定、および、胎児肝臓ならびに成獣骨髓における赤血球分化過程を FCM 解析により解析したが、同領域の欠失による影響は認められなかった。この結果は、赤血球分化過程において同領域は必須ではなく、また、同 STAT 結合配列を介した *Gata1* 遺伝子の制御機構は存在しないことを示唆している。

本研究で得られた結果は、赤血球分化初期過程における GATA1 による分化制御機構を明らかにするものである。また、GATA1 はその標的遺伝子である *Epor* 遺伝子の発現を制御することで赤血球分化に重要な EPO シグナルを調整するが、その一方で、EPO シグナルによる *Gata1* 遺伝子の発現制御は存在しないことを示唆する結果である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平野育生、張琳、西羽美、木下賢吾、山本雅之、清水律子
2. 発表標題 転写因子GATA1による初期赤血球分化制御機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第88回例会
4. 発表年 2022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
---------	---------