

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08364

研究課題名（和文）DCML欠損症発症に関与するGATA2による造血幹前駆細胞の分化運命制御

研究課題名（英文）GATA2-mediated regulation of hematopoietic stem/progenitor cell differentiation involved in immunodeficiency syndrome

研究代表者

長谷川 敦史（Hasegawa, Atsushi）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・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）：本研究では転写因子GATA2による造血幹前駆細胞の分化運命決定・分化制御機構に着目し、DCML欠損症発症の原因となるGATA2R398W変異により惹起される分化運命偏向を明らかにすることを目的とした。疾患モデルマウス由来リンパ球系共通前駆細胞、さらにBリンパ球系前駆細胞に由来する培養細胞株を用いた遺伝子発現プロファイル解析および細胞機能解析より、GATA2発現パターンの詳細な推移と、GATA2R398W変異に起因する免疫細胞分化・免疫応答・増殖制御に関連する表現型を明らかにすることができた。また本成果は、分化運命偏向解析において効率的かつ良好な結果を得るための解析対象分画の選定に有用となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血球分化過程で造血幹細胞の発生や維持におけるGATA2の重要性はよく知られていたが、DCML欠損症とGATA2遺伝子変異の関連が見出されて以降、これまで不明であったBリンパ球をはじめとする免疫系細胞の産生におけるGATA2の重要性が注目されてきている。本疾患保因者は、感染症の重篤化・感染拡大のリスクを抱え、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恐れに恐怖に対峙しなければならない。本研究により得られた知見は、血球分化におけるGATA2の機能解明に貢献するとともに、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医学研究を支えるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on GATA2-mediated fate decision and differentiation regulation of hematopoietic stem/progenitor cells, and analyzed the differentiation fate deflection induced by GATA2R398W mutation. Analysis of gene expression profile and cell function in the lymphoid lineage progenitor cells derived from DCML-deficiency model mice and the B-cell progenitor-like cell line revealed alteration of GATA2 expression pattern through hematopoietic differentiation and cell phenotype related to immune cell differentiation, immune response and proliferation induced by GATA2R398W mutation. This study also supported us to select cell subset for effective analysis of the differentiation fate deflection.

研究分野：分子生物学

キーワード：GATA2 血球分化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 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り、その破綻は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強く発現し、胎児期の造血幹細胞の発生 (Tsai *et al.* 1994 *Nature*)、自己複製や生存能、多分化能の制御 (Li *et al.* 2016 *Eur J Haematol.*) に重要な役割を持つ。

近年、単球/マクロファージ、B リンパ球、NK 細胞、樹状細胞の特異的な産生異常による免疫不全と骨髄増殖性腫瘍への進展を特徴とする DCML 欠損症患者から、常染色体優性遺伝形式の GATA2 遺伝子変異が相次いで見つかри、原因遺伝子として着目されている (Shimizu and Yamamoto 2020 *IUBMB Life*)。本研究代表者はこれまでに、疾患患者と同様の *Gata2*<sup>R398W</sup> 変異を持つゲノム編集マウス系統を樹立し、*Gata2* 変異がドライバーとなってヒト DCML 欠損症様の血球減少を引き起こすこと、リンパ球・骨髄球系前駆細胞において多数の遺伝子発現異常を惹起することを明らかにした。 (Hasegawa *et al.* 2022 *Commun Biol.*)。これにより従来のノックアウトマウス解析ではわからなかった、B リンパ球や樹状細胞等の分化過程での GATA2 の新たな役割が見出された。しかしながら、GATA2 は造血幹細胞の機能維持に重要であるにも関わらず特定の血球系列のみが障害されるメカニズムや、細胞機能を直接的に障害する責任遺伝子は依然として不明である。疾患発症機序の解明と新規治療標的の創出に向け、GATA2 を中核とする分化制御機構の解明は必須である。

### 2. 研究の目的

造血幹前駆細胞集団を構成する各細胞には GATA2 発現量や分化運命の多様性があり、GATA2 変異を有する疾患患者ではその分布に偏りがあることが報告されている。このことから、系列決定した細胞における分化制御だけでなく、より未熟な造血幹前駆細胞における将来の分化運命バランスの維持においても、変異 GATA2 の作用点が存在するという仮説を立てた。本研究では、DCML 欠損症モデルマウス (*Gata2*<sup>R398W/+</sup>マウス) の造血幹前駆細胞における、分化運命の偏向を明らかにすること、さらに分化運命偏向と連動する遺伝子発現パターンの変化から、変異 GATA2 による転写制御異常が誘発する分子病態を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) より効率的な分化偏向解析を行うために解析対象とする細胞集団を絞り込む目的で、*Gata2*<sup>R398W/+</sup>マウスにおいて細胞機能異常が最も顕著と予想される血球分化段階を同定した。*Gata2* 遺伝子の発現制御領域を用いた GFP レポータートランスジェニックマウス骨髄細胞を用い、造血幹細胞から各血球系列の前駆細胞までの分化段階をフローサイトメトリーにより分離し、GFP レポーターシグナルをモニターすることで各分化段階での GATA2 発現量およびその推移を解析した。また、野生型マウスと *Gata2*<sup>R398W/+</sup>マウスから各分化段階の細胞をセルソーターにより分取し、実際の GATA2 発現量を確認するとともに、変異アリル由来 mRNA と野生型アリル由来 mRNA の発現比率を解析した。

(2) 血球分化段階ごとの GATA2 発現パターンの解析より GATA2 変異の影響が最も強いと予想された、リンパ球・骨髄球系共通前駆細胞(LMPP)を野生型マウスおよび *Gata2*<sup>R398W/+</sup>マウスの骨髄から分取し、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析を行った。得られた遺伝子発現変動データから網羅的パスウェイ解析を行い、変異により誘発される細胞機能破綻を解析した。

(3) リンパ球系前駆細胞における変異 GATA2 の影響をより詳細に解析するために、また分化偏向解析に同分画を用いることの妥当性を確認するために、DCML 欠損症において産生異常を示す B リンパ球の前駆細胞に由来する Ba/F3 細胞株を用い、誘導的 *Gata2*<sup>R398W</sup> 発現株の樹立と RNA-Seq 解析を行った。また、遺伝子発現解析より得られたパスウェイ異常について、細胞学的手法を用いて検証した。

(4) 上記解析の結果より、分化運命偏向解析をより効率よく実施し、分化異常や細胞機能異常を見出すために、リンパ球・骨髄球系共通前駆細胞(LMPP)を含む細胞集団を用いることが至適であることがわかった。野生型マウスおよび *Gata2*<sup>R398W/+</sup>マウスの骨髄から、LMPP および造血幹細胞が強く濃縮される LSK 分画を分取し、Single cell RNA-Seq を用いて GATA2 変異に起因する分化運命偏向解析を実施した。

### 4. 研究成果

(1) リンパ球系共通前駆細胞における GATA2 発現量・アリル別発現比率の推移

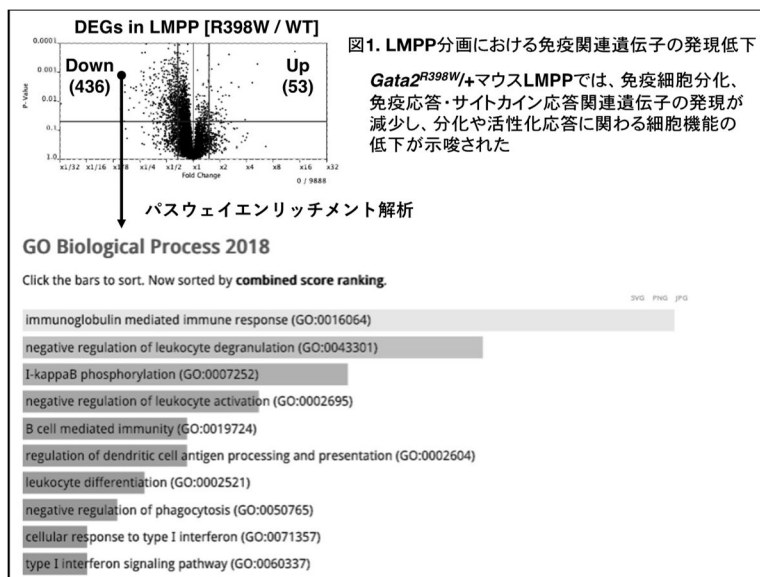
*Gata2* 遺伝子の発現制御領域を用いた GFP レポーターシグナル解析より、リンパ球・骨髄球系共通前駆細胞(LMPP)と、よりリンパ球系列に分化が進行したリンパ球系前駆細胞(LP)での強

い GFP 発現を認め、従来から知られていた造血幹細胞と同様に GATA2 の発現および機能が示唆された。LMPP においてはほぼ全ての細胞が GFP 陽性であった一方で、LP においては GFP 陽性と陰性の二つのサブポピュレーションが存在することがわかった。さらに B リンパ球系列の成熟過程に焦点を当てると、分化に伴い GFP シグナルが完全に消失することがわかった。同じ分画をセルソーターにより分取し、GATA2 の mRNA 発現量を解析したところ、GFP レポーターシグナルの推移と一致した発現量変化が認められた。このことは、GATA2 の重要性が高い比較的未熟な前駆細胞段階が、GATA2 変異の影響をより強く受けることで、DCML 欠損症におけるリンパ球および骨髄球系の血球産生異常につながることを示唆する。

さらに興味深いことに、*Gata2*<sup>R398W/+</sup> マウス個体内の種々の GATA2 発現細胞を単離し、変異アリル由来の GATA2<sup>R398W</sup> mRNA と野生型アリル由来の GATA2 mRNA の発現比率をサンガー法により解析したところ、各アリルからの mRNA 発現比率が細胞により大きく異なることが明らかとなった。変異アリル比率が 80% と最も高かったのは LMPP、次いで 60-70% を示した造血幹細胞であり、DCML 欠損症において表現型が認められない顆粒球系細胞では 40% 程度であった。本マウスは *Gata2* 遺伝子の発現制御領域の改変をしていないことから、アリル比率の差異は、ランダムな比率で各アリルから GATA2 を発現する細胞の集団性を反映している可能性が高いと推察される。故に変異アリル比率が高い LMPP では、正常に分化できない異常細胞が蓄積していると予想され、GATA2 変異の影響を解析する候補分画としての妥当性を支持する結果であった。しかしながらアリル比率の差異を生み出すメカニズムには不明な点が多く、さらなる詳細な解析が求められる。

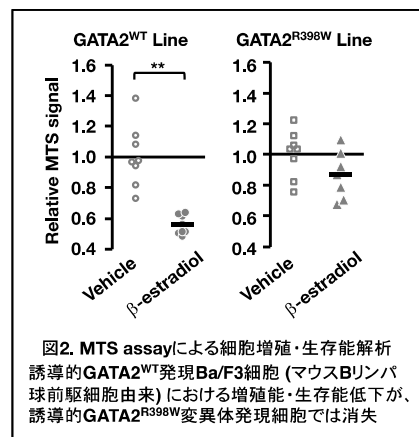
## (2) マウスリンパ球系共通前駆細胞における遺伝子発現プロファイル変化

LMPP 分画を野生型マウスおよび *Gata2*<sup>R398W/+</sup> マウスの骨髄から分取し、次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq 解析を行った。遺伝子発現のパターンよりそれぞれの分画は明確に区別することができ、各分画におけるマウス間での発現変動遺伝子のエンリッチメント解析より、免疫細胞分化・免疫刺激応答に関わる遺伝子が強く濃縮された。このことから、LMPP では変異 GATA2 の発現による分化制御異常が顕著であることが考えられ、その先の系列特異的な分化方向の制御および分化の進行が障害されていることが示唆された。さらに LMPP では免疫刺激応答に関係する複数の遺伝子、およびその発現を制御する転写因子が抽出され、免疫細胞分化を制御する刺激応答機構の異常が起こっていることが示唆される結果が得られた。



## (3) 誘導的 GATA2 発現 Ba/F3 細胞株における細胞機能・遺伝子発現プロファイル変化

マウス B リンパ球系前駆細胞由来の Ba/F3 細胞株を用い、GATA2 発現亢進環境で惹起される細胞機能変化と、その表現型を支える遺伝子発現変化を解析した。野生型 GATA2 発現 Ba/F3 細胞では、コントロールとなる Ba/F3 細胞（内在性 GATA2 のみを発現）と比較して細胞増殖能の抑制とアポトーシスの亢進が有意に認められた。一方で変異 GATA2 発現 Ba/F3 細胞細胞では、コントロール Ba/F3 細胞と比較して増殖能低下、およびアポトーシス亢進は軽微であり、野生型 GATA2 発現により惹起される細胞機能変化が、変異 GATA2 では喪失していることがわかった(図2)。



各細胞株における遺伝子発現プロファイルをRNA-Seqにより比較したところ、変異 GATA2 発現 Ba/F3 細胞細胞の遺伝子発現プロファイルは、野生型 GATA2 発現 Ba/F3 細胞および GATA2 未誘導の Ba/F3 細胞とは明確に異なることが、多変量解析により明らかとなった。このことは、GATA2<sup>R398W</sup> 変異の影響として、野生型 GATA2 の持つ標的遺伝子発現制御活性が単純に減弱化しただけでなく、本来の GATA2 による制御を外れた遺伝子発現プロファイルの攪乱が引き起こされたことを示唆している。

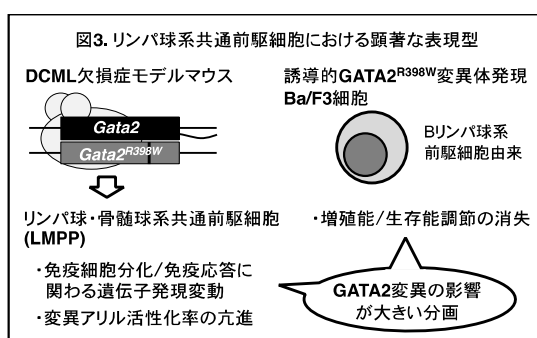
各細胞株において発現変動が認められた遺伝子群を抽出し、パスウェイ解析を行ったところ、細胞機能の変化と一致して、増殖制御遺伝子の発現抑制が、変異 GATA2 発現細胞と比較して野生型 GATA2 発現細胞で顕著であった。一方で変異 GATA2 発現細胞においては、生存能を積極的に維持する方向に遺伝子発現プロファイルが変化していることが明らかとなった。以上の結果より、Ba/F3 細胞は内在性 GATA2 を発現しているものの、GATA2 の発現亢進による細胞機能不均衡を感受し、異常細胞の増殖および生存能を抑制するメカニズムを備えていることが示唆された。ところが変異 GATA2 発現細胞では、異常状態にある細胞の排除機構が機能していない可能性が示唆された。このことは、研究成果(1)で示したマウス生体内での変異 GATA2 発現前駆細胞の蓄積と関連して、GATA2 変異による血球分化異常、特に B リンパ球産生異常のメカニズムにつながる知見であると考えられる。さらに一細胞レベルでの分化偏向解析を実施するにあたり、リンパ球・骨髄球系共通前駆細胞(LMPP)を含む分画を用いることが、より効率的な解析を可能にすることを示している。

#### (4) GATA2 変異に起因する分化運命偏向解析

野生型マウスおよび *Gata2*<sup>R398W/+</sup> マウスの骨髄から分取した細胞を用いた、Single cell RNA-Seq 解析を実施した。情報学的・統計学的手法を用いたサブポピュレーション分類、および遺伝子型による比較を今後予定している。

#### (5) 総括

Single cell RNA-Seq の手法を用いた分化運命偏向解析を実施するにあたり、解析対象とする細胞集団の選定は重要な要素であり、細胞の多分化能と着目する分化系列への運命決定とのバランスを十分に考慮する必要がある。本研究により、DCML 欠損症モデルマウス個体におけるリンパ球・骨髄球系共通前駆細胞、また同細胞に近い性質を有する B リンパ球前駆細胞由来培養細胞株において、変異 GATA2 を発現することによる、分化制御の破綻や増殖・生存能制御の破綻に関連する遺伝子発現プロファイル変化を見出すことができた(図 3)。このことは、変異 GATA2 の機能的変化の解明のみならず、より発展的な分化運命偏向解析の対象とする細胞集団としての妥当性を示すことに繋がる知見である。今後の分化偏向解析、およびその偏向を惹起する一細胞レベルでの遺伝子発現変化の解析により、疾患発症に関連する、血球系列特異的な分化異常メカニズムの解析を大きく進めることができると期待される。



#### <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. Shimizu R. and Yamamoto M. 2020 Quantitative and qualitative impairments in GATA2 and myeloid neoplasms. *IUBMB Life* 72, 142-150.
4. Hasegawa A. *et al.* 2022 GATA1 Heterozygous variants in GATA2 contribute to DCML deficiency in mice by disrupting tandem protein binding. *Commun Biol.* 5(1), 376.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa Atsushi, Hayasaka Yuki, Morita Masanobu, Takenaka Yuta, Hosaka Yuna, Hirano Ikuo, Yamamoto Masayuki, Shimizu Ritsuko	4. 巻 5
2. 論文標題 Heterozygous variants in GATA2 contribute to DCML deficiency in mice by disrupting tandem protein binding	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03316-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保坂優奈, 長谷川敦史, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 GATA2変異が引き起こす細胞機能の変化
3. 学会等名 第87回 日本生化学会東北支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長谷川敦史, 保坂優奈, 山本雅之, 清水律子
2. 発表標題 変異タンパク質によるGATA2の機能障害が惹起する免疫細胞産生異常
3. 学会等名 第26回 造血器腫瘍研究会
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
---------	---------