

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860204

研究課題名(和文) GATA2を介した骨髄単球性白血病の発症機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the onset mechanism of myelomonocytic leukemia by GATA2 deficiency

研究代表者

原田 伸彦 (Harada, Nobuhiko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20431439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々が作成したGata2遺伝子発現低下マウスは若齢では血液に異常がみられないが、加齢に伴いGATA2異常症患者でみられる慢性骨髄性白血病様の病態を示す。このマウスを用いて若齢での骨髄細胞について解析したところ、顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)の増加がみられ、このGMPでコロニーアッセイをすると単球への分化の亢進がみられた。このGMPの遺伝子発現について解析したところM-CSF受容体およびIL-6受容体の発現亢進がみられた。これらのことからGata2発現低下したGMPでは潜在的な単球系への分化能を有し、何らかの刺激により単球分化が亢進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gata2 knockdown(KD) mice showed no abnormality in complete blood count but these mice showed monocytosis with aging, like chronic myelomonocytic leukemia patients. By using a colony-forming unit(CFU) assay, the proportion of CFU-M(monocyte) from Gata2 KD bone marrow was increased. The gene expression of Csf1 receptor and IL-6 receptor was increased in granulocyte-macrophage progenitors(GMPs) from Gata2 KD bone marrow. These results suggested that GMPs from Gata2 KD has a potential to promote aberrant monocytic differentiation.

研究分野：分子生物学

キーワード：単球性白血病

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA2 は主に造血幹・前駆細胞や血管・リンパ管の内皮細胞などで発現がみられる。血球では造血幹・前駆細胞の維持・分化に重要な働きがあり、内皮細胞では管腔の形成に重要と考えられている。Gata2 遺伝子ノックアウトマウス (G2(-/-)) は胎生期 10 日目で造血不全で致死に至ることが報告されている。また、G2(-/+)ヘテロマウスは致死性は回避できるが造血異常がみられる。一方、Gata2 過剰発現マウスでも造血異常がみられる。血球分化において GATA2 はダイナミックに発現量が変動しており (図 1)、その

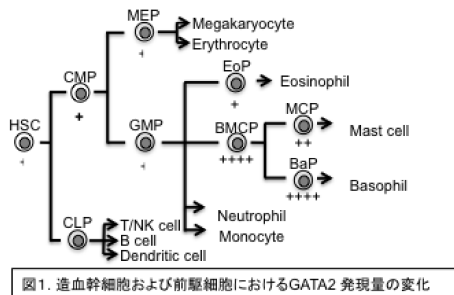


図1. 造血幹細胞および前駆細胞におけるGATA2 発現量の変化

発現量によって血球分化の方向性を運命付けていることが示唆されているが詳細なメカニズムについては未だに不明である。

近年、分子生物学的手法の進歩により、患者血液の遺伝子変異を網羅的に解析することが出来るようになってきた。これらの解析により、骨髄異形成症候群、急性骨髄性白血病、MonoMAC 症候群 (単球減少症に伴うマイコバクテリア感染症)、DCML 欠損症 (樹状細胞、単球、リンパ球欠損症)、Emberger 症候群 (骨髄異形成を伴う原発性リンパ浮腫) など様々な白血球系疾患で GATA2 遺伝子変異が存在することが明らかになってきた (図 2)。しかしながら、GATA2 変異による病態発症メカニズムについては不明な部分が多い。急性骨髄性白血病に着目すると、患者サンプルにおける GATA2 の発現量に多様性が

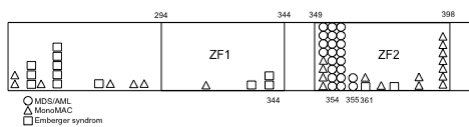


図2 ヒト血液系疾患患者にみられたGATA2変異部位

みられ、形態学的に FAB 分類で分けて比較すると M5 (骨髄単球性白血病) の患者の細胞のみで GATA2 が発現低下していることが報告されている。さらに若年性骨髄単球性白血病 (JMML) 患者サンプルにおいても GATA2 の発現低下がみられる。GATA2 発現低下と単球性白血病には関連性が示唆されるが、その機序については不明である。我々がこれまでに作製した Gata2 ノックダウンマウスは尿路の形成不全でほとんどが胎生

致死であるが、わずかに生き残ったマウスは加齢に伴い骨髄単球性白血病様の症状を示す。このマウスの骨髄では正常な Gata2 は野生型の 20%程度しか発現しておらず、この発現低下により、単球系への分化が促進されていることが示唆されており、その発症メカニズムを明らかにすることで新たな白血病の予防・治療への分子標的を示すことが出来るのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

近年の分子生物学的研究の進歩により、造血器腫瘍では実際の患者の血液細胞を網羅的に解析することにより染色体ならびに様々な遺伝子に変異があることが分かってきた。なかでも造血幹・前駆細胞の維持・分化に関わる転写因子 GATA2 の遺伝子に家族性の機能欠失型変異が骨髄単球性白血病を含むいくつかの種類の急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群などの患者の血液細胞からみつかった。しかしながら、GATA2 変異によるこれらの病態発症メカニズムは明らかにされていない。本研究の目的は、我々がこれまでに作製した骨髄単球増多を呈する Gata2 遺伝子ノックダウン (Gata2(fGN/fGN)) マウスをもちいて、GATA2 の発現低下による骨髄単球性白血病発症メカニズムを解明し、GATA2 遺伝子変異と多彩な白血球系疾患の関係性の一端を明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

GATA2 発現低下による造血幹・前駆細胞の単球系への分化傾向の分子メカニズムを明らかにするため、骨髄細胞での Gata2 遺伝子発現が 20%まで低下して骨髄単球性白血病様の症状を示す Gata2 遺伝子ノックダウンマウスを用いた。このマウスから各分化段階の造血幹細胞または前駆細胞をフローサイトメトリーを用いて分取してきて、その細胞の分化能を調べて、原因と成っている細胞分画を明らかにした。さらにそれらの細胞の遺伝子発現変動をマイクロアレイ解析し、責任遺伝子群を明らかにし、Gata2 発現低下によって引き起こされる造血幹・前駆細胞の単球系への分化傾向の詳細なメカニズムを個体レベルで明らかにした。

Gata2 発現低下による単球への分化傾向のメカニズムを明らかにするため Gata2 発現低下マウスの造血幹・前駆細胞における単球への分化傾向とそのメカニズムについての解析を行った。

我々がこれまでに作製した骨髄細胞における Gata2 の発現が本来の 20%程度まで低下している Gata2 遺伝子ノックダウン (Gata2(fGN/fGN)) マウスはその多くが尿管の形成異常で胎生致死であったが、わずかに生き残ったマウスは加齢とともに骨髄単

球増多症を発症する。この病態モデルマウスをもちいるが、C57BL/6J 純系バックグラウンドの成獣マウスは得にくかったので、ICR ミックスバックグラウンドマウスで成獣マウス得て、このマウスの10週齢の成獣で、骨髄から造血幹・前駆細胞を分取し、これらの細胞の分化能について、特に単球系への分化傾向があるのかどうかを検証した。これまでの解析から、Gata2(fGN/fGN)マウスの胎児肝臓から得られた造血幹・前駆細胞が *in vitro* コロニーアッセイにより野生型マウスの細胞より単球系コロニーの形成が多いことが明らかになった。この単球系細胞への分化傾向が実際にどの分化段階の造血幹細胞または前駆細胞で起っているかを明らかにするため、フローサイトメトリーをもちいて、成獣マウスの骨髄を骨髄球系共通前駆細胞細胞(CMP)、巨核球・赤芽球共通前駆細胞(MEP)および顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)に分画し、そこから単球系に分化する骨髄球系共通前駆細胞細胞(CMP)および顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)を単離し、それぞれの分化傾向についてコロニーアッセイを行い、どの分化段階の造血細胞が影響を受けているかを検証した。さらに異常な単球系細胞への分化傾向のみられた細胞分画の遺伝子発現について野生型と Gata2(fGN/fGN)マウスを比較して解析した。Ras 経路の活性化を特徴とする若年性骨髄単球性白血病の患者でも GATA2 の発現低下がみられることが報告されているので、Ras 経路を中心に、また、単球系への分化に関与する Pu.1、Runx1、M-CSFR などの原因と成り得る遺伝子について特に注目して、発現変動のみられる遺伝子群についてマイクロアレイ解析を用いて、網羅的な解析を行った。マイクロアレイ解析で変化のみられた遺伝子については定量的 PCR で確認を行った。

4. 研究成果

我々が作成した Gata2 遺伝子発現低下マウス(Gata2(fGN/fGN))では若齢では血液に異常がみられなかったが、加齢に伴い GATA2 異常症患者でみられる慢性骨髄性白血病様の病態を示した。このマウスを用いて若齢での骨髄細胞について解析したところ、顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)分画の増加がみられ

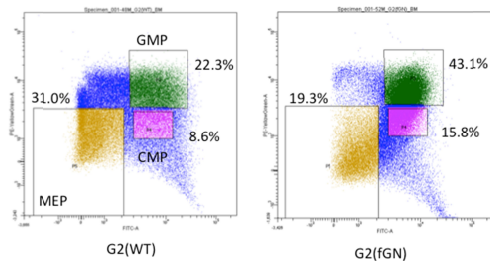


図3 骨髄細胞の FACS による CMP、GMP および MEP の展開像

(図3) さらに脾臓においては骨髄球系共通前駆細胞細胞(CMP)、巨核球・赤芽球共通前駆細胞(MEP)および顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)のいずれの前駆細胞においても増加が観察された。このマウスの骨髄細胞から骨髄球系共通前駆細胞(CMP)および顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)を分取し、*in vitro* でコロニーアッセイをすると顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)の単球への分化(CFU-M)および顆粒球・単球への分化(CFU-GM)の亢進

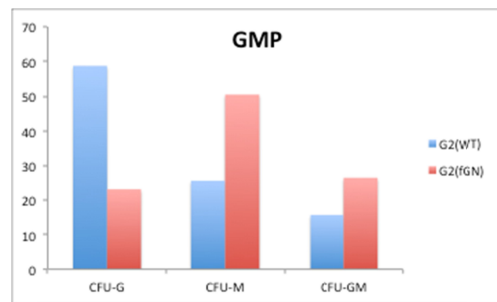


図4 コロニーアッセイの結果

がみられた(図4)。この顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)の遺伝子発現についてマイクロアレイを用いて解析したところ、単球への分化を促進するサイトカイン類である Csf1 および IL-6 の受容体である Csf1 受容体および IL-6 受容体の発現亢進がみられ、これらの遺伝子について定量的 PCR で遺伝子発現量について解析したところの発現亢進が確認された(図5、6)。これらのことから Gata2 発現低下した顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)

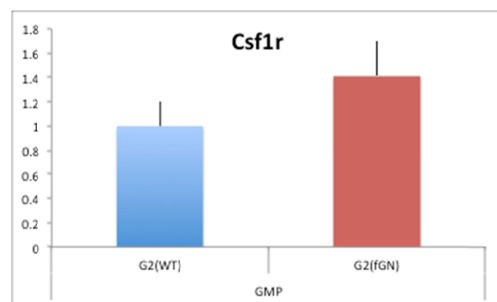


図5 GMP における Csf1 受容体遺伝子の発現量の比較

では Csf1 受容体および IL-6 受容体の発現亢進により潜在的な単球系への分化能を有していることが明らかになった。これらのことから、20%程度までの Gata2 遺伝子の発現低下が起きている場合は、若齢の時は異常を示さないが、一旦、何らかの炎症刺激が入ると骨髄細胞中の顆粒球・単球系前駆細胞(GMP)に Csf1 受容体および IL-6 受容体が発現亢進しているため単球分化が亢進し、単球増多症を示すことが示唆された。今後、このマウスのさらなる発症メカニズムの解析により、GATA2 異常のうち慢性骨髄単球性白血病を示

す患者の治療法を開発することができる
と考えられる。また、今回のマイクロアレイ解
析により、G2(fGN/fGN)マウスの顆粒球・単
球系前駆細胞（GMP）では Aryl-hydrocarbon
receptor（Ahr）のリプレッサーである Ahr

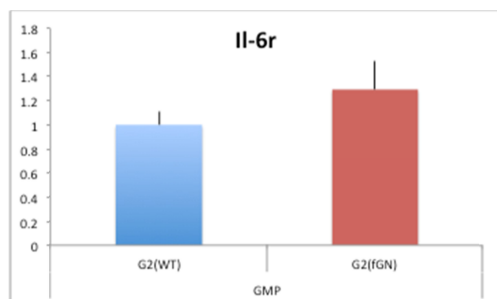


図 6 GMP における IL-6 受容体遺伝子
の発現量の比較

repressor（Ahrr）の発現亢進がみられた。
造血幹・前駆細胞において Ahr シグナルの抑
制はこれらの細胞の自己複製を促進するこ
とが明らかにされている。このことから、
G2(fGN/fGN)マウスでみられた造血前駆細胞
の増加には Ahrr の発現亢進による Ahr シグ
ナルの抑制が働いている可能性が示唆され
た。

5．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線）

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

原田伸彦、Gata2 発現低下による単球性
白血病の発症メカニズムの解析、第 15
8 回日本獣医学会学術集会、2015 年
9 月 8 日、北里大学獣医学部（青森県・
十和田市）

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

原田 伸彦 (HARADA Nobuhiko)
東北大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：20431439

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：