

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K09819
研究課題名(和文) 転写因子GATA-2による造血微小環境の維持機構の解明

研究課題名(英文) Role of GATA2 in bone marrow stromal cells

研究代表者

沖津 庸子 (Okitsu, Yoko)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80451558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子GATA-2は間葉系幹細胞(MSC)の機能において重要な役割を持ち、この発現低下が脂肪髄という再生不良性貧血に特徴的な異常形質をもたらす。本研究ではMSCにおけるGATA-2の造血機能への影響について検討した。全ての細胞でGATA-2をノックアウトできるGata2^{f1/f1}/ER-Creマウスに対して正常骨髄を移植後に、GATA-2のノックアウトを行った。その結果、MSCでGATA-2をノックアウトすると、骨髄球系共通前駆細胞が有意に低下し、リンパ球系共通前駆細胞が上昇する傾向を認めた。この結果から、MSCにおいてGATA-2が造血細胞分化に関与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、in vivoにおけるGata2の骨髄微小環境での機能を検討してきた。Gata2は造血前駆細胞における増殖や分化の制御のみではなく、BM-MSKにおいてもニッチとしての機能を制御し、HSCから骨髄球系共通前駆細胞およびリンパ球系共通前駆細胞への分化調節を担っている可能性があり、この機序としてはITGA11やITGB3、カテプシンGをはじめとした細胞接着因子や走化性因子が候補として考えられた。しかし、BM-MSKからHSCへのシグナル伝達経路に関しては検討が不十分であり、今後の課題として取り組んでいくべき点であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The bone marrow (BM) microenvironment comprises multiple stem cell niches derived from BM mesenchymal stem cells (BM-MSCs). Previous in vitro analyses have suggested that transcription factor GATA2 plays an important role in adipocyte differentiation of BM-mesenchymal stem cells as well as in hematopoietic support, but the role of GATA2 in vivo remains unknown. We evaluated GATA2 effects in BM-MSK in vivo. We did not find any phenotypic changes when Gata2 was deleted with BM-MSK-related gene promoters, such as Nestin, Prx1, and Lepr, except for a significant decrease in the colony number of Gata2^{f/f}/Prx1-Cre mice. Noticeably, there was a significant decrease in the percentage of the CMP fraction when Gata2 was deleted in all BM cells except for hematopoietic cells, after normal BM cells were transplanted into irradiated Gata2^{f/f}/ER-Cre mice, with Gata2 subsequently knocked out by tamoxifen administration. In conclusion, GATA2 could affect the function of BM-MSCs in vivo.

研究分野：血液内科

キーワード：GATA-2 間葉系幹細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血は造血細胞の減少と脂肪髄という特徴的所見を呈する難治性の造血不全症である。転写因子 GATA-2 は造血幹細胞及び間葉系幹細胞の機能において重要な役割をもつが、近年申請者らのグループはこの両者における転写因子 GATA-2 の発現低下が、造血細胞の減少と脂肪髄という二つの異常形質をもたらすことを見出した。しかしながら、再生不良性貧血における GATA-2 発現低下の機序については共通の上流因子の影響か、あるいは間葉系幹細胞における GATA-2 発現低下であるか不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、間葉系幹細胞における GATA-2 発現異常が *in vivo* の造血微小環境の機能に及ぼしうる影響について、コンディショナルノックアウトマウスを用いて検討することを計画した。

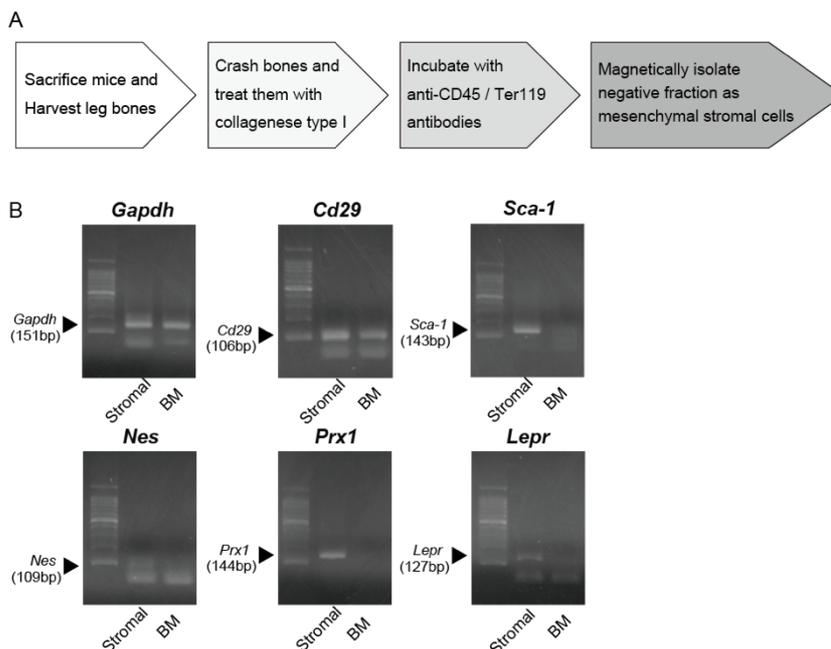
3. 研究の方法

Cre-loxP システムを用いて間葉系幹細胞特異的に *Gata2* をノックアウトさせ、造血細胞への影響、間葉系幹細胞における *Gata2* 発現低下による脂肪分化能の変化などを *in vivo* で評価する。

4. 研究成果

(1) マウス緻密骨からの MSC 単離

野生型のマウスの大腿骨および脛骨から磁気的に単離した CD45 Ter119 分画、およびその際に洗浄除去して得られた全骨髄細胞について、全 RNA から cDNA を作成し、定性 PCR 法により mRNA 発現を比較したところ、前者において MSC のマーカーとして知られている各遺伝子 (*Cd29*, *Sca-1*, *Nes*, *Prx1*, *Lepr*) の発現が認められた (図 1A、1B)。



(図 1) マウス緻密骨からの MSC 単離

(2) *In vivo* MSCにおける GATA2 制御遺伝子発現プロファイル解析

In vivo 環境下の MSC において GATA2 が制御している遺伝子群を同定するために、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイリングを行った。Day 1-3, 8-10 にタモキシフェン 1 mg を腹腔内投与した *Gata2*^{fl/fl}/ER-Cre マウスおよび *Gata2*^{fl/fl} マウスの緻密骨から MSC を単離し、マイクロアレイ解析により遺伝子発現の比較を行った。*Gata2* ノックアウト群をコントロール群と比較した際に、2 検体の平均値で発現が 2 倍以上上昇した遺伝子は 114 遺伝子、2 倍以上低下した遺伝子は 153 遺伝子だった (図 2A)。この上昇した遺伝子群には脂肪関連遺伝子である *Fabp5* (fatty acid binding protein 5) が含まれ、低下した遺伝子群には *Itga11* (integrin alpha 11)、*Itgb3* (integrin beta 3) をはじめとする細胞接着因子や、造血幹細胞の維持や遊走に関与するとされる *CtsG* (cathepsin G)、*Il1b* (interleukin- 1 beta)、*Pf4* (platelet factor 4)などが含まれていた。遺伝子オンロジー解析では、*Gata2* ノックアウトにより発現が低下した遺伝子群は、細胞接着 (cell adhesion)、その中でも特にインテグリン経路 (integrin-mediated signaling pathway)、および走化性 (chemotaxis) などに関与していることが明らかになった。

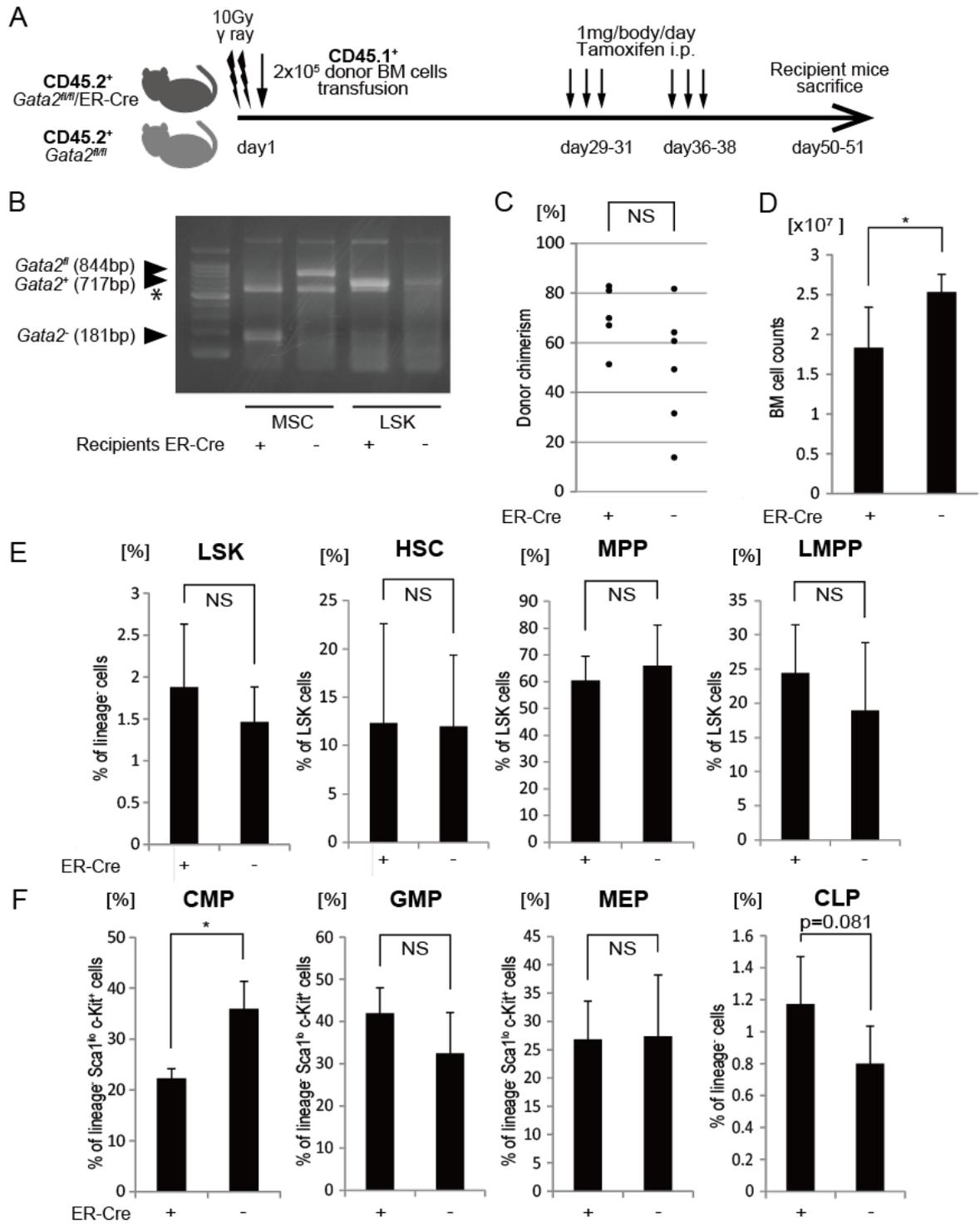
(3) MSC 選択的 *Gata2* ノックアウトは造血機能に影響を与えない

MSC 選択的に *Gata2* のノックアウトを起こす *Gata2*^{fl/fl}/*Nes-CreER* マウス、*Gata2*^{fl/fl}/*Prx1-Cre* マウス、*Gata2*^{fl/fl}/*Lepr-Cre* マウスを交配により作製し、各系統のマウスについて若年 (8-14 週齢) における MSC 選択的 *Gata2* ノックアウトの影響を調べた。しかし、いずれのマウスも血算、骨髓細胞数、造血前駆細胞割合に有意な変化は見られなかった。

(4) 骨髓移植による骨髓微小環境での *Gata2* 欠失は骨髓球系細胞の分化に影響を与える

Nes, *Prx1*, *Lepr* 陽性の細胞は、それぞれ MSC の特徴を示すとの報告がなされてきたが、それぞれの細胞の性質や分布は完全には一致しないことから、MSC は不均一な細胞集団であると考えられる (図 1)。つまり、これらの単一のマーカーでは全ての MSC を網羅できず、*Gata2* のノックアウトが不十分であったために造血機能への影響が不明確であった可能性が考えられた。そこで、全細胞で *Gata2* をノックアウトしたマウスに *Gata2* が正常に発現した骨髓細胞を移植し、骨髓微小環境全体で *Gata2* がノックアウトされるモデルを考えた (図 2A、2B)。移植を行ったマウスのうち、ドナー割合が 40%以下であった ER-Cre 陰性群 2 例については、生着不全として以下の解析対象から除外した (図 2C)。骨髓細胞数は ER-Cre 陽性群で有意に少なかったが (図 2D)、これは残存した ER-Cre 陽性のレシピエント由来骨髓細胞において、タモキシフェンによる *Gata2* の欠失が生じ、その細胞数が減少したためと考えられた。骨髓造血前駆細胞比率の解析では、造血幹細胞(LSK)の比率は変化を認めなかったが、骨髓球系共通前駆細胞 (common myeloid progenitor; CMP) が有意に低下し、リンパ球系共通前駆細胞 (common lymphoid progenitor; CLP) が上昇する傾向を認めた。この結果から、機序は不明であるが MSC においても *Gata2* が HSC の分化調節に関与している可能性が考えられた (図 2E、2F)。

以上の結果より、GATA2 は造血微小環境の機能維持に重要な役割を果たしており、その機序の 1 つとして細胞接着因子や走化性に関わる遺伝子群の制御を介している可能性が示唆された。



(図2) 骨髄移植による骨髄微小環境での *Gata2* 欠失

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H | 4. 巻 244 |
| 2. 論文標題 Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Tohoku J Exp Med | 6. 最初と最後の頁 41-52 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.244.41 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. | 4. 巻 244(1) |
| 2. 論文標題 Establishment of a Screening System to Identify Novel GATA-2 Transcriptional Regulators | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine | 6. 最初と最後の頁 41-52 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1620/tjem.244.41 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports | 6. 最初と最後の頁 105-111 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2017.07.006 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. | 4. 巻 56 |
| 2. 論文標題 Effects of in vivo deletion of GATA2 in bone marrow stromal cells | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 31-45 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2017.08.004 | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Fujiwara T, Fukuhara N, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Onishi Y, Furuyama K, Harigae H | 4. 巻 96(11) |
| 2. 論文標題 A novel heterozygous ALAS2 mutation in a female with macrocytic sideroblastic anemia resembling myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts: a case report and literature review | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Annals of Hematology | 6. 最初と最後の頁 1955-1957 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-017-3106-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Fujiwara T, Sasaki K, Saito K, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. | 4. 巻 485(2) |
| 2. 論文標題 Forced FOG1 expression in erythroleukemia cells: Induction of erythroid genes and repression of myelo-lymphoid transcription factor PU.1 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 380-387 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.068 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Inokura K, Fujiwara T, Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H. | 4. 巻 49 |
| 2. 論文標題 Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 56-67 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2017.01.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Kanehira M, Fujiwara T, Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Okada Y, Harigae H. | 4. 巻 35(3) |
| 2. 論文標題 An Lysophosphatidic Acid Receptors 1 and 3 Axis Governs Cellular Senescence of Mesenchymal Stromal Cells and Promotes Growth and Vascularization of Multiple Myeloma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells | 6. 最初と最後の頁 739-753 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2499 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H | 4. 巻 103 |
| 2. 論文標題 Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Hematology | 6. 最初と最後の頁 387-395 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-016-1968-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Sakurai K, Fujiwara T, Hasegawa S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Yamada-Fujiwara M, Ichinohasama R, Harigae H | 4. 巻 104 |
| 2. 論文標題 Inhibition of human primary megakaryocyte differentiation by anagrelide: A gene expression profiling analysis. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Hematology | 6. 最初と最後の頁 190-199 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-016-1968-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Okitsu Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H | 4. 巻 128 |
| 2. 論文標題 GATA2 regulates dendritic cell differentiation. | 5. 発行年 2016年 |
| 3. 雑誌名 Blood | 6. 最初と最後の頁 508-518 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2016-02-698118 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kanehira M, Fujiwara T, Nakajima S, Okitsu Y, Onishi Y, Fukuhara N, Ichinohasama R, Harigae H | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 An LPA1/3 axis governs cellular senescence of mesenchymal stromal cells and promotes growth and vascularization of multiple myeloma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Stem Cells | 6. 最初と最後の頁 739-753 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2499 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Inokura K, Fujiwara T, Saito K, Iino T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H | 4. 巻 印刷中 |
| 2. 論文標題 Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Hematology | 6. 最初と最後の頁 印刷中 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2017.01.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H |
| 2. 発表標題 Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators |
| 3. 学会等名 第80回日本血液学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ichikawa S, Okitsu Y, Fukuhara N, Ono K, Himuro M, Hatta S, Kobayashi M, Onodera K, Kohata K, Yamamoto J, Onishi Y, Fujiwara M, Harigae H. |
| 2. 発表標題 Six cases of acquired hemophilia: Aingle center experience. |
| 3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hatta S, Fujiwara T, Yamamoto T, Kamata M, Tamai Y, Nakamura Y, Kawamata S, Harigae H |
| 2. 発表標題 Generation of induced pluripotent stem cell-derived erythroblasts from a patient with X-linked sideroblastic anemia. |
| 3. 学会等名 第58回米国血液学会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kondo A, Fujiwara T, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Sawada K, Harigae H |
| 2. 発表標題 Identification of a novel putative mitochondrial protein FAM210B associated with erythroid differentiation. |
| 3. 学会等名 第78回日本血液学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saito K, Inokura K, Fujiwara T, Hatta S, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimoda K, Harigae H |
| 2. 発表標題 Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts. |
| 3. 学会等名 第78回日本血液学会 |
| 4. 発表年 2016年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H |
| 2. 発表標題 Role of GATA2 in the maintenance of bone marrow microenvironment |
| 3. 学会等名 第59回米国血液学会 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Hasegawa S, Fujiwara T, Okitsu Y, Kato H, Sato Y, Fukuhara N, Onishi Y, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H |
| 2. 発表標題 Role of GATA2 in the maintenance of the bone marrow microenvironment |
| 3. 学会等名 第79回日本血液学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学血液・免疫病学分野
<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/index.html>

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|