

令和元年5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16175

研究課題名(和文) GATA-2を介した炎症性サイトカインの産生制御機構の解明

研究課題名(英文) Role of GATA-2 in regulating inflammatory cytokine production

研究代表者

小野寺 晃一 (Onodera, Koichi)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80792291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：MonoMAC症候群は、単球および樹状細胞欠損を特徴とし、非定型抗酸菌感染症、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病の発症を来す疾患である。MonoMAC症候群では片方のアレルのGATA2遺伝子変異によるGATA2タンパク質の量的異常を呈していることが原因であるため、野生型GATA2タンパク質の発現を誘導する事が治療戦略の1つとなり得る。しかしながら、現在のところ、GATA2遺伝子の上流の制御機構については十分に明らかになっていない。本研究では樹状細胞の一部が単球から分化していることに着目し、単球細胞株U937を用いてGATA2遺伝子の発現レベルを評価するバイオアッセイ系の構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MonoMAC症候群では片方のアレルのGATA2遺伝子変異によるGATA2タンパク質の量的異常を呈していることが原因であるため、野生型のGATA2の発現を誘導することが治療戦略の1つとなり得る。今回樹立したGATA2バイオアッセイ系を用いたスクリーニング法はGATA2遺伝子上流制御機構の解明やMonoMAC症候群をはじめとする難治性疾患に対する新規治療薬の開発に一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Heterozygous germline GATA2 mutations induce GATA-2 deficiency syndrome, characterized by monocytopenia, a predisposition to myelodysplasia and acute myeloid leukemia, and a profoundly reduced dendritic cell (DC) population, which is associated with increased susceptibility to viral infections. Because patients with GATA-2 deficiency syndrome could retain a wild-type copy of GATA-2, boosting residual wild-type GATA-2 activity may represent a novel therapeutic strategy for the disease. Here, we established a screening system to identify GATA-2 activators based on human U937 monocytic cells as a surrogate model of DC progenitor. In conclusion, our system represents a potential tool for identifying novel regulators of GATA-2, thereby contributing to the development of novel therapeutic approaches.

研究分野：血液内科

キーワード：GATA-2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

造血幹細胞は多分化能と自己複製能を有することを特徴とする。この造血幹細胞の機能の維持、及び造血幹細胞から成熟血液細胞への分化において転写因子が重要な役割を果たしている。そのうちの一つである GATA2 は造血幹細胞の生存、維持、増殖に重要とされる転写因子である。近年、*GATA2* 遺伝子の先天性変異により MonoMAC 症候群を発症することが報告されている。MonoMAC 症候群は、単球および樹状細胞欠損を特徴とし、非定型抗酸菌感染症、骨髄異形成症候群や急性骨髄性白血病の発症を来す疾患である。申請者らは、*Gata2* ヘテロ不全マウスにおいては、リポ多糖(LPS: Lipopolysaccharide)投与による血清 IL-6 の反応性上昇が有意に減弱することを明らかとした(Onodera et al. *Blood* 2016)。この結果は、GATA-2 が免疫系細胞の分化以外に関わる以外に、サイトカイン産生において何らかの重要な役割を果たす可能性を示唆する。一方、現在のところ、*GATA2* 遺伝子の上流の制御機構については十分に明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では樹状細胞の一部が単球から分化していることに着目し、単球細胞株 U937 を用いて *GATA2* 遺伝子の発現レベルを評価するバイオアッセイ系の構築を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

ヒト *GATA2* 遺伝子の転写開始点から 0.5kb 上流の領域とイントロン 4 (+9.9kb) におけるエンハンサー領域をタンデムに 2 つ挿入したルシフェラーゼプラスミド(pGL4.20-Luc2)を作成した。同プラスミドを、U937 細胞において安定的に発現させた。

## 4. 研究成果

### (1) U937 細胞株における *GATA2* 強制発現による樹状細胞特異的遺伝子の発現変化

*GATA2* 遺伝子が単球から樹状細胞の分化に寄与する可能性を調べるために、*GATA2* 発現ベクターを U937 細胞株にレトロウイルスシステムを用いて導入し、定量リアルタイム RT-PCR を用いて樹状細胞特異的遺伝子の転写活性の変化を調べた。その結果、*GATA2* タンパク質の強制発現により、樹状細胞特異的遺伝子である *CD205* 遺伝子の有意な発現上昇を認めた ( $p = 0.002$ )。 *CD83* 遺伝子においても発現が上昇する傾向を認めた ( $p = 0.09$ )。本結果より、単球系細胞からの樹状細胞分化に *GATA2* が関わっている可能性が示唆された。

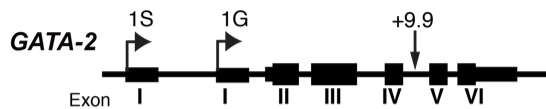
### (2) *GATA2* 遺伝子の転写活性を評価するためのレポーターコンストラクトの作製

*GATA2* バイオアッセイ系を用いたスクリーニングシステムの概要を以下に示す。1. *GATA2* 遺伝子プロモーターコンストラクトを組み入れたルシフェラーゼベクターを作製する。2. 各ルシフェラーゼベクターを用いたルシフェラーゼ解析により、*GATA2* 遺伝子のプロモーター活性を測定できるコンストラクトを決定する。決定したルシフェラーゼベクターを U937 細胞株に遺伝子導入し、クローンを樹立する。3. そのクローンを用いて、cDNA ライブラリー、RNAi ライブ

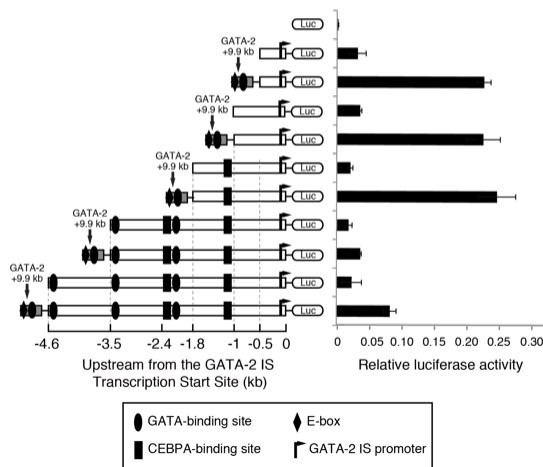
ラリーおよび低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを行う計画である。

まず、*GATA2* 遺伝子の転写開始点からそれぞれ上流-0.5 kb、-1.0 kb、-1.8 kb、-3.4 kb、-4.6 kb までの領域、および Intron4 +9.9 kb エンハンサー領域 (206 bp)を組み合わせて挿入したルシフェラーゼレポーターベクター-pGL3 basic を作製した (図 1A、B)。これらのコンストラクトを内部コントロールとしての pGL4.74 とともに U937 細胞株に一過性に遺伝子導入を行った。+9.9 kb エンハンサー領域を含まないレポーターベクターではルシフェラーゼ活性が比較的低く、+9.9 kb エンハンサー領域を含むレポーターベクターでルシフェラーゼ活性が高い傾向がみられた。また、コンストラクト塩基配列が上流-0.5 kb、-1.0 kb、-1.8 kb で+9.9 kb エンハンサー領域を挿入したレポーターベクターでのルシフェラーゼ活性が高く、pGL4.20 (*GATA2* -0.5 kb/E)、(*GATA2* -1.0 kb/E)、(*GATA2* -1.8 kb/E)をレポーターベクターとして候補と考えた (図 1B)。さらに、スクリーニングの感度を高める目的で+9.9 kb エンハンサー領域をタンデムに 2 つ挿入したコンストラクト pGL4.20 (*GATA2* -0.5 kb/EE)を導入した細胞と、pGL4.20 (*GATA2* -0.5 kb/E)を導入した細胞のルシフェラーゼ活性を比較したところ、pGL4.20 (*GATA2* -0.5 kb/EE)を導入した細胞でルシフェラーゼ活性がより高かったため、以後の実験は pGL4.20 (*GATA2* -0.5 kb/EE)をレポーターコンストラクトとして用いることとした。

A



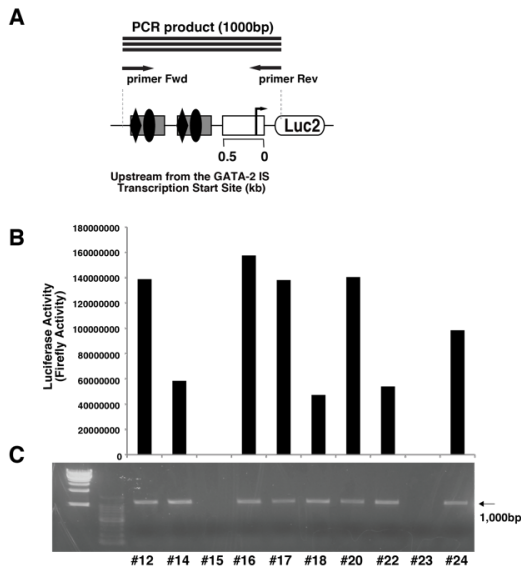
B



(図 1) 各 *GATA2* プロモーターコンストラクトにおけるルシフェラーゼ活性

### (3) レポーターコンストラクト安定発現 U937 クローンの作製

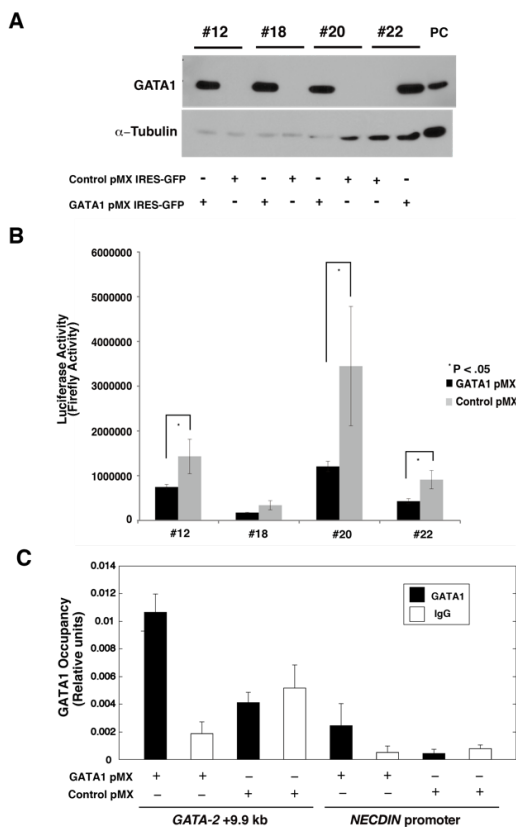
上述のコンストラクトを挿入した pGL4.20 を安定発現したクローンを作製するために、U937 細胞株にプラスミドを導入し、ピューロマイシン添加した培地で細胞選択を行った。細胞選択後、限界希釈法でクローニングを行った。13 株のクローンを作製し、ルシフェラーゼ値が高いクローンを以後の研究に使用した。また、コンストラクトに対する PCR プライマーを作製し、PCR 法にてこれらのクローンにおいてコンストラクトサイズ相当のバンドを確認した (図 2A-C)。



(図2) pGL4.20 (*GATA2*-0.5 kb/E)および pGL4.20 (*GATA2*-0.5 kb/EE)を安定発現した U937 細胞株のルシフェラーゼ活性

#### (4) GATA1 強制発現によるレポーター活性の変化

赤芽球分化において GATA1 は GATA2 を抑制することが報告されている。そこで、今回作製したバイオアッセイ系が GATA1 強制発現によってどのような挙動を示すか調べるために、コンストラクト pGL4.20 (*GATA2* -0.5 kb/EE)安定発現 U937 クローンにレトロウイルスシステムを用いて GATA1/GFP 共発現ベクターを一過性に導入した。導入2日後に FACS を用いて GFP 陽性細胞を回収し、ウェスタンブロッティング、ルシフェラーゼ解析を行った。ウェスタンブロッティングで GATA2 タンパク質を確認した (図 3A)。ルシフェラーゼ解析で GATA1 強制発現したクローンで活性低下を認めた (図 3B)。さらにクロマチン免疫沈降法にてエンハンサー領域への GATA-1 の結合も確認した (図 3C)。



(図3)GATA1 強制発現によるルシフェラーゼ活性の変化

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Nakagawa R, Onishi Y, Kawajiri A, Onodera K, Furukawa E, Sano S, Saito K, Ichikawa S, Fujiwara T, Fukuhara N, Harigae H. Preemptive therapy for cytomegalovirus reactivation after daratumumab-containing treatment in patients with relapsed and refractory multiple myeloma. *Ann Hematol*. 2019 in press. (査読あり) doi: 10.1007/s00277-019-03645-7.
2. Ochi T, Onishi Y, Nasu K, Onodera K, Kobayashi M, Ichikawa S, Fujiwara T, Fukuhara N, Yamada-Fujiwara M, Harigae H. Umbilical Cord Blood Transplantation Using Reduced-intensity Conditioning without Antithymocyte Globulin in Adult Patients with Severe Aplastic Anemia. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25:e55-e59. (査読あり) doi: 10.1016/j.bbmt.2018.09.039.
3. Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. *Tohoku J Exp Med*. 2018;244:41-52. (査読あり) doi: 10.1620/tjem.244.41.
4. Harada Y, Nishiwaki S, Sugimoto T, Onodera K, Goto T, Sato T, Kamoshita S, Kawashima N, Seto A, Okuno S, Yamamoto S, Iwasaki T, Ozawa Y, Miyamura K, Akatsuka Y, Sugiura I. Successful treatment with allogeneic stem cell transplantation followed by DLI and TKIs for e6a2 BCR-ABL-positive acute myeloid leukaemia: A case report and literature review. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96:e9160. (査読あり) doi: 10.1097/MD.0000000000009160.

[学会発表] (計 4 件)

1. Ohashi K, Fujiwara T, Onodera K, Saito Y, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Harigae H. Establishment of a screening system to identify novel GATA-2 transcriptional regulators. 第80回日本血液学会 2018年10月12日 大阪国際会議場 (大阪)
2. Onishi Y, Fujiwara M, Sano S, Nakagawa R, Kawajiri A, Saito K, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Fujiwara T, Harigae H. Cyclosporine A treatment for T-cell large granular lymphocytic leukemia: a single-center experience. 第80回日本血液学会 2018年10月12日 大阪国際会議場 (大阪)
3. Saito K, Fujiwara T, Hatta S, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. Characterization of in vitro model of X-linked sideroblastic anemia. 第80回日本血液学会 2018年10月11日 大阪国際会議場 (大阪)
4. Fujiwara T, Saito K, Hatta S, Suzuki C, Onodera K, Ichikawa S, Fukuhara N, Onishi Y, Nakamura Y, Harigae H. The effect of TET2 disruption in human erythroid cells. 第9回日本血液学会国際シンポジウム 2018年7月27日 国立京都国際会館 (京都)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

血液免疫病学分野ホームページ

<http://www.rh.med.tohoku.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：