

令和 6 年 9 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(A））

研究期間：2020～2023

課題番号：19KK0398

研究課題名（和文）異所性EPO遺伝子発現を誘導する新規貧血改善薬の候補化合物の作用機序の解明

研究課題名（英文）The effects of a candidate compound for hematopoiesis of that induces ectopic EPO gene expression via GATA inhibition.

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） 11,700,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：エリスロポエチン（Epo）は腎臓で産生され赤血球造血を誘導するサイトカインである。近年、Epo遺伝子を肺などで異所性に発現誘導可能な薬剤としてGATA転写因子の阻害薬が報告された。本研究では、全身性のGATA阻害による造血系への影響、およびGATA因子によるEpo遺伝子制御機構について、それぞれ遺伝子改変マウスを樹立し、個体レベルで解析を行った。その結果、全身性のGATA因子阻害は重度の造血障害を引き起こすこと、腎臓Epo産生においてGATA因子はむしろ正に制御に関わる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、成体の造血系における転写因子GATA1、GATA2の機能を明らかにするうえで重要な知見となるものである。GATA阻害剤によるEpo遺伝子発現誘導効果は、新規貧血改善薬の開発につながると期待されるが、今回の解析結果はGATA阻害による造血系への抑制性作用、および主要なEPO産生細胞でのEPO産生制御へのGATA因子の正の関与を示すものであり、GATA阻害によるEPO産生誘導効果を得るには組織特異性を高める必要があることを示せたと考えられる。また、本研究の結果はドーピングなどでのGATA阻害剤の安易な使用を抑制する意味でも社会的意義があったと考えている。

研究成果の概要（英文）：Erythropoietin (EPO) is a cytokine produced in the kidney and induces erythropoiesis. Recently, inhibitors of GATA transcription factors have been reported as agents capable of inducing ectopic expression of the Epo gene in the lungs and other organs. In this study, we analyzed the effects of systemic GATA inhibition on the hematopoietic system and the mechanism of Epo gene regulation by GATA factors in vivo by using genetically engineered mice. The results showed that systemic GATA factor inhibition causes severe hematopoietic defects and that GATA factors may be rather positively involved in the regulation of renal Epo gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：GATA1 GATA2 Erythropoietin GATA inhibitor Doping

様式 F-19-2

1. 研究開始当初の背景

血球産生は、種々のサイトカインシグナルや細胞種特異的な転写因子による転写制御機構により調整されている。赤血球分化は、腎臓で産生されるエリスロポエチン(EPO)により強力に誘導されるが、*EPO* 遺伝子は低酸素応答性転写因子 HIF による低酸素刺激特異的な正の制御と、GATA 転写因子による負の制御を受けていることが報告されている(文献1)。我々はこれまでに、GATA 因子の活性阻害による *EPO* 遺伝子の発現誘導が可能な化合物の探索を行い、候補化合物を複数同定した(文献2)。一方で、GATA 転写因子群のうち GATA1, 2, 3 は血球分化を制御する転写因子であることから、GATA 因子阻害薬の血球分化への影響も考慮する必要があった。

2. 研究の目的

本国際共同研究では、造血促進薬として GATA 阻害薬が利用可能か否か検証するため、GATA 因子による血球分化制御機構の同定、および GATA 阻害による *Epo* 遺伝子発現への影響の解明を目的として解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 転写因子 GATA1 は、主に赤血球分化を誘導する転写因子である。細胞株や遺伝子改変マウスを用いた解析から、GATA1 がグロビン遺伝子やヘム合成関連遺伝子などを制御するなどの機能を有していることが知られている。しかし、*Gata1* 遺伝子破壊による胎生致死性が原因となり、個体レベルでの成体型造血における機能には不明な点が多い。そこで X 染色体のランダムな不活性化により、*Gata1* 遺伝子発現が低下した細胞 (*Gata1*-KD 細胞) と *Gata1* を正常に発現する細胞 (*Gata1*-WT 細胞) がランダムに生じるマウス (*Gata1.05/X*) と、各細胞における X 染色体の不活性化をモニター可能なマウス (*Hprt*-EGFP) の交配により、*Gata1*-KD 細胞と *Gata1*-WT 細胞を見かけ上正常な 1 個体内において比較できるマウスを樹立した (*G1.05, H-GFP/X*)。同マウスの、骨髄の未分化細胞 (cKit 陽性細胞) を用いた Flow 解析および single cell RNA sequencing 解析 (scRNAseq) を実施し、*Gata1* 発現低下による血球分化への影響を解析した。

(2) 転写因子 GATA2 は、造血幹細胞や前駆細胞段階の未分化な血球の分化を制御していることが知られている。ヒトの *GATA2* 遺伝子への変異が原因で発症する GATA2 欠損症では、末梢血中の樹状細胞や単球などの細胞が消失することが知られており、GATA 阻害剤による GATA2 の発現低下は、血球分化に影響することが予想された。当研究室で樹立したヒト GATA2 欠損症モデルマウス (*G2R398W*) および野生型コントロールを用いて、cKit 陽性細胞の scRNAseq 解析を実施し、GATA2 機能低下による血球分化への影響を解析した。

(3) 造血機構はマウス-ヒト間で保存されており多くの点で相同性を示すが、一部の血球分化において異なる部分も存在している。今回の解析で明らかとなった GATA1 機能がヒトの赤血球分化過程においても保存されているものなのか確認するために、CD34 陽性細胞を用いた赤血球分化誘導系および *GATA1* 遺伝子の発現低下実験をおこなった。

(4) *Epo* 遺伝子の GATA 因子による抑制性の制御は、*EPO* 遺伝子プロモーター領域のヒトマウス間で保存された GATA モチーフを介しており、本来 *EPO* 発現を行わない上皮系の細胞における異所性の *EPO* 発現を抑制していると言われている。GATA 阻害剤を介した *EPO* 発現誘導は、同モチーフを介したものであることが予想されていることから、同モチーフを破壊したマウス (TTTA) を樹立し、*Epo* 遺伝子発現への影響を解析した。

4. 研究成果

(1) *G1.05, H-GFP/X* マウスの cKit 陽性細胞を用いた scRNAseq 解析を実施し、GFP 発現を元に *Gata1*-WT 細胞と *Gata1*-KD 細胞でどのような差異が生じるか比較した。その結果、*Gata1*-WT 細胞では最も未分化な細胞集団からの、顆粒球系や赤血球系への分化の流れが可視化されたのに対し、*Gata1*-KD では赤血球分化過程の巨核球赤血球共通前駆細胞 (MEP) 以降の分化段階の細胞がほとんど消失していることが示された(図1)。MEP 段階の細胞の遺伝子発現を *Gata1*-WT 細胞と *Gata1*-KD 細胞で比較したところ、*Gata1*-KD MEP 細胞では *Car1* や *Lmo2* といった赤血球分化に関わる遺伝子の発現の低下に加え、*Gata2* や *Egr1* などの他の血球系統の分化に関わる遺伝子発現が増加していた。これらの結果は、GATA1 が MEP 段階の前駆細胞からの赤血球分化に必須であり、赤血球関連の遺伝子発現を誘導するとともに、他の血球系統に関連する遺伝子群の発現を抑制することで分化の方向性

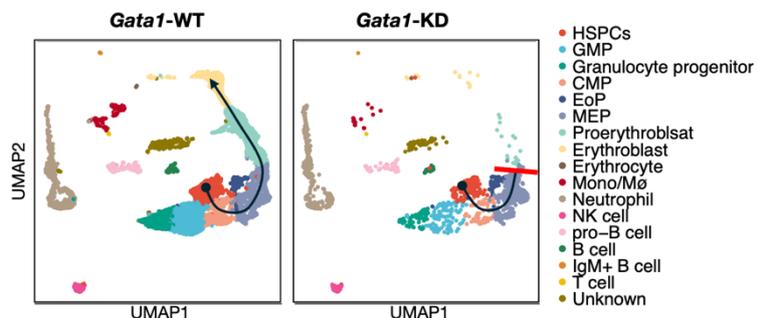


図1: UMAP plotによる血球分化の視覚化

Gata1-WT細胞では赤血球分化過程(黒矢印)が見て取れるが、*Gata1*-KD細胞では、赤血球分化のMEP段階で分化が障害されている(赤線)。

を安定化していることを示している。

(2) ヒト末梢血 CD34 陽性細胞からの赤血球分化誘導実験系において shRNA による *GATA1* 遺伝子発現のノックダウン実験を行った結果、*GATA1*-KD CD34 陽性細胞では赤血球前駆細胞分画が顕著に減少していた。また、単離した赤血球前駆細胞分画を用いた qRT-PCR による遺伝子発現解析の結果、*Gl. 05*, *H-GFP/X* マウスの scRNAseq 解析結果と同様に、*GATA1*-KD 細胞で *EGR1* 遺伝子の発現増加などが認められた。これらの結果は、GATA1 による MEP からの赤血球分化制御機構がヒト-マウス間で保存されていることを示しており、GATA1 の機能阻害はヒトにおいても赤血球分化を強力に抑制することが予想される。

(3) *Gata2-R398W* 変異はヒトの *GATA2* 遺伝子疾患で最も良く見つかる変異の 1 つであり、同変異を導入した G2R398W マウスでは、機能低下型の *GATA2* 変異体が発現することによりヒトの症例と同様に末梢血中の複数種の免疫細胞の減少が認められる (文献 3)。本課題において、*GATA2* 機能の低下による成体型造血への影響を解析することを目的に、G2R398W マウス成獣の骨髄 cKit 陽性細胞を用いた scRNAseq 解析を実施した。その結果、末梢血中で減少が見られた単球の前駆細胞である GMP クラスタやリンパ球の前駆細胞である CLP クラスタに大きな変化は認められなかったが、その一方で、最も未分化な細胞である造血幹細胞 (HSC) が含まれるクラスターが G2R398W マウスで顕著に増加していた。また、その遺伝子発現パターンを解析した結果、加齢に伴い HSC で発現が増加することが知られている遺伝子群の発現が、G2R398W の HSC クラスタで高いことがわかった。ヒトの *GATA2* 遺伝子疾患においても、末梢血中の免疫細胞の低下や白血病の発症は加齢に伴い生じることが知られている。おそらく G2R398W マウスでは *GATA2* 機能の低下により HSC の加齢様変化が促進しており、その結果、血球の分化の方向性に偏りが生じると考える。

(4) EPO は腎臓尿細管間質領域の線維芽細胞様の細胞 (Renal Epo-producing cell, REP 細胞) が産生している。我々が過去に報告したマウスへの *GATA* 阻害剤 (Mitoxantrone, MTX) の投与実験では、肺や腎臓において *Epo* 遺伝子の発現誘導が見られていた。また、*Epo* 遺伝子周辺領域を用い、*Epo* 遺伝子プロモーター領域の *GATA* モチーフを破壊した GFP レポーターマウスでは、腎臓や肺の上

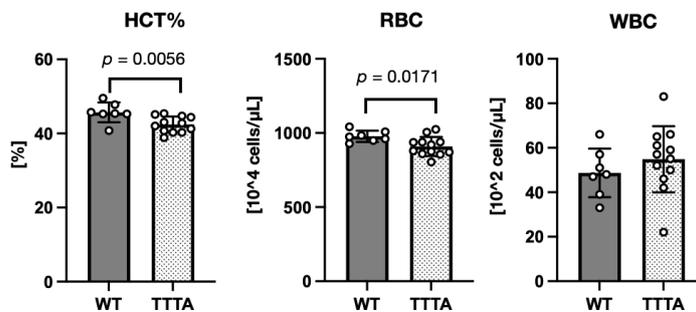


図2: TTTAマウスでは赤血球量の低下が認められる
同腹仔野生型マウスと比較し、TTTAマウスでは若干の赤血球量の低下が認められた。

皮細胞における異所性な GFP 発現が報告されている。これらの結果は、*GATA* 因子が *Epo* 遺伝子プロモーター領域の *GATA* モチーフを介して、異所性の *Epo* 遺伝子発現を抑制していることを示唆する。そこで、ゲノム編集技術を用い、同 *GATA* モチーフを TTTA へと変化させたマウスを樹立し、解析した。当初、同変異を加えたことで異所性の EPO 産生が誘導され、多血症を示すことを予想していたが、予想に反して成獣 TTTA マウスは、正常な血算値を示した。むしろ、同腹仔野生型コントロール (WT) と比較し、若干の赤血球量、HCT%値の低下を示した (図 2)。*Epo* 遺伝子は、定常状態では腎臓においても非常に低い発現しか示さず、貧血などの低酸素刺激により強力に発現が誘導される。そこで TTTA マウスに瀉血による貧血誘導をおこない、*Epo* 遺伝子発現を腎臓、肺、肝臓で解析した。その結果、同腹仔 WT、TTTA マウスどちらにおいても腎臓における貧血誘導的な *Epo* 遺伝子の発現が確認されたが、肺、肝臓では *Epo* 遺伝子発現は検出できなかった。また、同程度の貧血刺激を加えていたにもかかわらず、貧血 TTTA マウス腎臓での *Epo* 発現

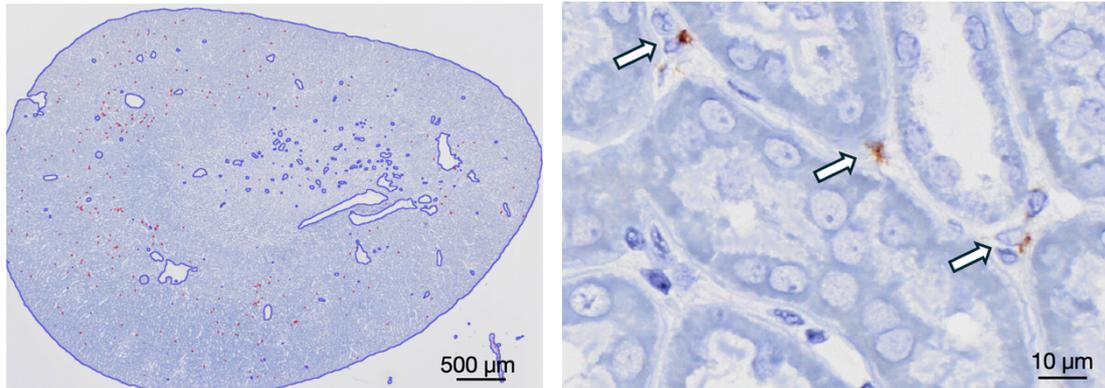


図3: TTTAマウス腎臓でも、REP細胞が主にEPOを産生している。
貧血TTTAマウス腎臓のEpo mRNAに対するin situ hybridization解析の結果 (左図: 弱拡大、右図: 強拡大)。尿細管間質領域に位置するREP細胞でシグナルが認められた (左図: 赤色、右図: 白矢印)。

は、貧血 WT 腎臓よりも低値を示した。検出された腎臓における *Epo* 遺伝子発現が、腎臓組織中のどの細胞由来のものなのかを明らかにするために、*Epo* mRNA に対する *in situ* hybridization を実施したが、その結果、WT 腎臓でも TTTA マウス腎臓でも、REP 細胞のみで *Epo* mRNA 由来のシグナルが検出された (図 3)。これらの結果は、少なくとも *in situ* hybridization 法や qRT-PCR 法で検出可能な量の異所性 *Epo* 遺伝子発現は TTTA マウスで生じていないことを意味している。さらに、腎臓における貧血誘導的な *Epo* 遺伝子発現が低下したことから、REP 細胞における *Epo* 遺伝子転写制御機構において、GATA 因子はむしろ転写を正に制御していることを示唆している。

また、これらの結果から、先行研究で認められた MTX による肺や腎臓における *Epo* 遺伝子の発現誘導は、*Epo* 遺伝子プロモーター領域の GATA モチーフを介したのではないと考えられる。また、*Epo* 遺伝子プロモーター領域の GATA モチーフを介して抑制されている異所性の *Epo* 遺伝子発現量は、REP 細胞における内在性 *Epo* 遺伝子発現と比較して、おそらくは非常に低いと予想される。

これら一連の研究の結果より、GATA1、GATA2 による造血制御機構、GATA モチーフを介した *Epo* 遺伝子制御機構の一端が明らかとなった。近年、新規貧血治療薬として *Epo* 遺伝子を強力に発現誘導する転写因子 HIF の活性化薬が開発されたが、低酸素応答のマスター因子である HIF を全身で活性化することによる副作用やドーピング使用などが危惧されている。GATA 因子による *Epo* 遺伝子の抑制性制御や GATA 因子阻害剤による *Epo* 遺伝子の発現誘導が報告されてから、GATA 阻害による赤血球造血誘導薬の開発も期待されているが、我々の結果は、全身性の GATA 因子阻害はむしろ *Epo* 遺伝子発現を低下させ、血球分化、特に赤血球分化を障害することに繋がることを示唆している。今後、GATA 因子阻害による造血誘導を得るためには、ドラッグデリバリー技術などを利用して GATA 阻害薬の効果の組織特異性を高める必要があると考えている。

<引用文献>

- ① Obara N, Suzuki N, Kim K, Nagasawa T, Imagawa S, Yamamoto M. Blood. 2008 Jan; doi:10.1182/blood-2007-10-115857
- ② Kaneko H, Katoh T, Hirano I, Hasegawa A, Tsujita T, Yamamoto M, Shimizu R. Genes Cells. 2017 Nov;22(11):939-952. doi: 10.1111/gtc.12537. Epub 2017 Oct 18.
- ③ Hasegawa A, Hayasaka Y, Morita M, Takenaka Y, Hosaka Y, Hirano I, Yamamoto M, Shimizu R. Commun Biol. 2022 Apr 19;5(1):376. doi: 10.1038/s42003-022-03316-w.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ishihara Daishi, Hasegawa Atsushi, Hirano Ikuo, Engel James Douglas, Yamamoto Masayuki, Shimizu Ritsuko	4. 巻 13
2. 論文標題 The abundance of the short GATA1 isoform affects megakaryocyte differentiation and leukemic predisposition in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Hematology & Oncology	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） 10.1186/s40164-024-00492-9	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 該当する

1. 著者名 Hirano Ikuo, Abe Kanako, Engel James Douglas, Yamamoto Masayuki, Shimizu Ritsuko	4. 巻 13
2. 論文標題 Strain-dependent modifiers exacerbate familial leukemia caused by GATA1-deficiency	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Experimental Hematology & Oncology	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） 10.1186/s40164-024-00491-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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	エンゲル ダグ (Engel Doug)	ミシガン大学・Cell & Developmental Biology・Professor	

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			
米国	ミシガン大学			