

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19537

研究課題名（和文）転写因子GATA2によるT細胞エピゲノムメモリー制御機構の解明

研究課題名（英文）The Roles of Transcription Factor GATA2 in T Cell Development by Epigenetic Memory

研究代表者

張替 秀郎（Harigae, Hideo）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50302146

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：GATA2は造血幹細胞の維持や分化に必要な転写因子である。その先天的遺伝子変異は、GATA2欠失症候群の原因であり、重症例ではT細胞造血障害が認められる。本病態にT細胞の造血異常が関わる可能性が考えられるが、T細胞造血でのGATA2の役割は未解明であった。そこで、本研究では、その詳細の究明を試みた。その結果、胸腺の最も未熟なT細胞前駆細胞では、骨髄におけるリンパ球前駆細胞と同程度にGATA2の発現が維持されていることを発見した。遺伝子発現変化やオープンクロマチン状態に関する網羅解析を追加したところ、GATA2は、ETPにおいて、その維持や分化能の保持に寄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

今回の研究から、これまで不明な点が多かった、T細胞の初期分化における、造血幹細胞のマスター転写因子GATA2の働き的一端が明らかとなった。特に、胸腺における最も未熟な細胞をGATA2の発現量に基づいて規定できる可能性があると同時に、この細胞こそが自然免疫細胞と獲得免疫細胞の最終分化の分岐点である可能性が考えられ、造血における細胞の運命決定機構を理解する上で、今後欠かせない発見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：GATA2 is a transcription factor that is essential for the maintenance and differentiation of hematopoietic stem cells. Genetic mutation of GATA2 can be a cause of GATA2 deficiency syndrome, and its severe case shows T cell development impairments, suggesting the notion that GATA2 might possess important roles for T cell development. However, still little is known about the roles of GATA2 in T cell development. In this study, we sought to reveal the roles of GATA2 in T cell development. We found that the earliest T cell progenitors in the thymus express GATA2 at a comparable level of lymphoid progenitors in the bone marrow. Taking advantage of comprehensive transcriptomic analysis and open chromatin analysis revealed that GATA2 might possess significant roles in the earliest T cell progenitors in the thymus to regulate its survival and differentiation potentials.

研究分野：造血

キーワード：GATA2 T細胞初期分化

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA2 は造血幹細胞の維持や分化に必要なマスター転写因子である。一方で、GATA2 は、成熟した T 細胞や B 細胞では発現しないことから、獲得免疫では GATA2 は機能していないものと考えられていた。しかし、先天性 GATA2 の遺伝子変異により生ずる GATA2 欠失症候群では、病態の重症度が高いほど成熟 T 細胞数が低下しており、GATA2 が獲得免疫でも何らかの機能を有している可能性が考えられた。そこで、我々が、造血細胞特異的 GATA2 欠損マウスを作成し T 細胞造血を評価したところ、GATA2 欠損が胸腺の T 細胞数を著減させることが明らかとなった。さらに、我々が、T 細胞の分化段階毎に GATA2 の発現量を評価したところ、胸腺の最も幼

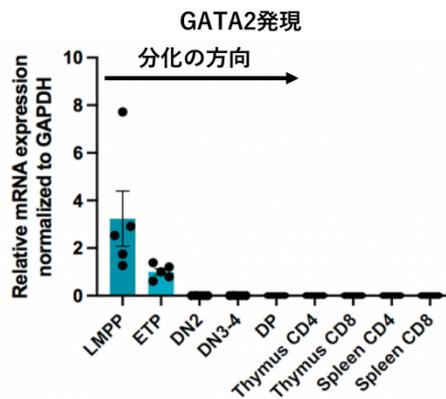


図1 T細胞分化とGATA2発現

LMPP: 骨髄のT細胞前駆細胞 ETP: 胸腺で最も未熟なT細胞
DN:CD4/8陰性T細胞 DP:CD4/8陽性T細胞

若な T 細胞前駆細胞 (ETP: early T cell progenitor) まで、GATA2 の発現が維持されていた (図 1)。さらに、DP 細胞 (CD4/8 陽性 T 細胞) 以前から GATA2 を欠損させた場合には、GATA2 の発現がほとんど認められない DP 細胞において、広範な遺伝子発現変化が起きていた。これらのことから、ETP での GATA2 の有無が何らかの機序により DP 細胞以降の細胞の機能に影響を与えているものと考えた。GATA2 が転写因子であることを踏まえると、これは GATA2 による ETP のエピゲノム修飾が成熟細胞にまで残存していることによるものである可能性を考えた。

2. 研究の目的

胸腺の最も幼若な T 細胞前駆細胞 (ETP: early T cell progenitor) まで発現が維持され、その後急激に発現が低下する、転写因子 GATA2 の、T 細胞造血での役割の解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(方法 1) GATA2-Venus マウスを用いた GATA2 発現量の解析

GATA2-Venus マウスは、GATA2 タンパク質を蛍光でモニター可能なマウスであり、フローサイトメトリー解析により、胸腺細胞中の GATA2 発現細胞を単一細胞レベルで解析可能である。本マウスを用いて、胸腺の ETP やその他の細胞での GATA2 の発現量もモニターし、実際に胸腺の ETP での GATA2 発現レベルがどの程度であるか、タンパク質レベルで検証する。

(方法 2) ETP における GATA2 欠損の影響の解析

造血前駆細胞での GATA2 の欠損により、実際に ETP 数が低下するか検証する。ETP 数が低下した場合、その機序を明らかにするために、網羅的遺伝子発現解析を実施する。ETP は T 細胞への分化能に加えて、自然免疫細胞への分化能も保持しており、ETP での GATA2 欠損がその分化能へ与える影響についても、あわせて検証する。

(方法 3) 各分化段階での GATA2 欠損の DP 細胞への影響の解析

DP 細胞での極微量な GATA2 発現の影響を否定するために、DP 細胞で GATA2 を欠損させたマウスを作成し、T 細胞の機能に異常がないか検証する。造血前駆細胞で GATA2 を欠損させた場合のみ、DP 細胞で影響が認められる場合には、GATA2 によるエピゲノムメモリー制御を強く支持する所見となる。その場合、クロマチンのアクセシビリティに関する網羅解析を追加し、その詳細を検証する。

4. 研究成果

(方法1の結果) GATA2-Venus マウスを用いた GATA2 発現量の解析

T 細胞の各分化段階での GATA2 の発現量を GATA2-Venus マウスを用いたフローサイトメトリー解析にて検証した。その結果、前述の結果と一致して、GATA2 の発現は胸腺の ETP まで保持され、その後、急速に低下することが明らかとなった。さらに興味深いことに、ETP は GATA2 発現の高い細胞集団と低い細胞集団に分けることが可能であった。特に重要なことに、GATA2 発現の高い細胞集団における GATA2 の発現量は、骨髄における直接の前駆細胞 (LMPP: lymphoid-primed multipotent progenitor) での GATA2 の発現量と同程度であった (図2)。このことから、ETP は均一の細胞集団ではなく、ETP のなかでも GATA2 の発現が高い細胞集団が、LMPP が胸腺へ移行した直後の、真の ETP である可能性が考えられた。この仮説を検証するために、LMPP、GATA2 発現の高い ETP (GATA2 high ETP)、GATA2 発現の低い ETP (GATA2 low ETP) および DN2 細胞を分取して、網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、GATA2 high ETP は GATA2 low ETP と比較して、遺伝子発現プロファイルが LMPP に近いことが明らかとなった。逆に、GATA2 low ETP は GATA2 high ETP と比較して、遺伝子発現プロファイルが DN2 に近いことが明らかとなった。さらに、GATA2 high ETP がその T 細胞分化の過程で GATA2 発現を喪失するか検証するために、GATA2 high ETP を分取して、*in vitro* で T 細胞分化誘導を行った。その結果、実際に、GATA2 high ETP であっても、その GATA2 発現は T 細胞分化に伴って低下することが明らかとなった (図3)。これらのことから、やはり GATA2 high ETP がより未分化な ETP である可能性が考えられた。

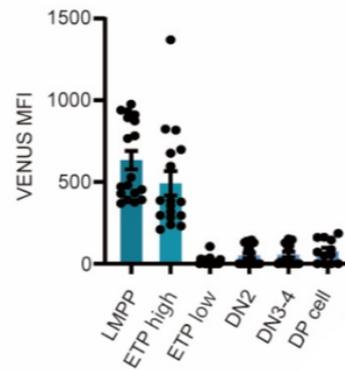


図2 T細胞の各部分化段階でのGATA2発現量
ETP high: ETPの中でGATA2発現の高い分画
ETP low: ETPの中でGATA2発現の低い分画

その結果、GATA2 high ETP は GATA2 low ETP と比較して、遺伝子発現プロファイルが LMPP に近いことが明らかとなった。逆に、GATA2 low ETP は GATA2 high ETP と比較して、遺伝子発現プロファイルが DN2 に近いことが明らかとなった。さらに、GATA2 high ETP がその T 細胞分化の過程で GATA2 発現を喪失するか検証するために、GATA2 high ETP を分取して、*in vitro* で T 細胞分化誘導を行った。その結果、実際に、GATA2 high ETP であっても、その GATA2 発現は T 細胞分化に伴って低下することが明らかとなった (図3)。これらのことから、やはり GATA2 high ETP がより未分化な ETP である可能性が考えられた。

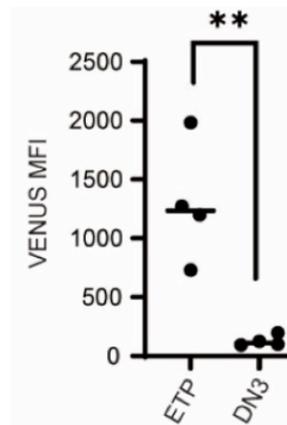


図3 GATA2 high ETPのT細胞分化過程でのGATA2発現変化
GATA2 high ETPを分取し、試験管内でDN3へ分化させると、GATA2発現が低下した。

(方法2の結果) ETPにおける GATA2 欠損の影響の解析

造血前駆細胞での GATA2 の欠損が、胸腺の ETP 数の減少につながるか、マウスモデルで検証した。その結果、実際に、造血前駆細胞での GATA2 欠損により、胸腺の ETP 数が顕著に減少することが確認された (図4)。その機序を解明するために、野生型および GATA2 を欠損させた ETP を分取して、網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、GATA2 の欠損により、広範な遺伝子発現変化が起きていることが明らかになった。遺伝子変化の特徴を捉えるために、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を実施した。その結果、GATA2 を欠損させた ETP では、造血幹前駆細胞で発現する遺伝子群やミエロイド細胞で発現する遺伝子群の発現低下を認めた。このことから、ETP での GATA2 欠損は、その生存と増殖だけでなく、分化能の保持にも影響を与えたと考えられた。ETP は T 細胞への分化能だけでなく、自然免疫細胞への分化能も保持している bipotential な細胞であると考えられており、GATA2 は、造血幹細胞のマスター転写因子であるだけでなく、ETP においても、その増殖能と多分化能の保持に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。つづいて、GATA2 がそのような機能を実現する上で重要な、標的遺伝子を明らかにするために、抗 GATA2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーク

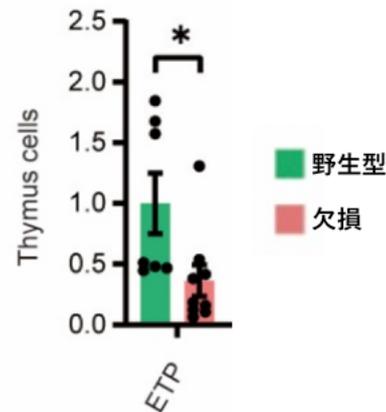


図4 GATA2欠損のETP数への影響
造血前駆細胞でのGATA2欠損により、胸腺のETP数が減少する。

エンズ解析 (GATA2 ChIP-seq) データ (既報) と我々の網羅的遺伝子発現解析データを統合した。その結果、いくつかの興味深い標的遺伝子候補群を同定している。今後、これらの標的遺伝子候補群が実際に ETP において GATA2 の標的であるのか、さらなる検証が必要と考えられる。

(方法 3 の結果) 各分化段階での GATA2 欠損の DP 細胞への影響の解析

造血前駆細胞で GATA2 を欠損させ、DP 細胞を分取して網羅的遺伝子発現解析を実施した場合、DP 細胞においても広範な遺伝子発現変化が起きていることが明らかとなっていた。DP 細胞では GATA2 の発現を認めないため、これは DP 細胞における GATA2 欠損の影響ではないことが予想された。しかし、DP 細胞での微量な GATA2 の欠損が、その広範な遺伝子発現変化の原因であることは、完全には排除できなかった。そこで、DP 細胞から GATA2 を欠損可能なマウスを作成し、表現型の解析を行った。その結果、予想に一致して、DP 細胞から GATA2 を欠損させた場合には、DP 細胞以降の T 細胞造血に明らかな変化は認められなかった。さらに、野生型 DP 細胞および DP 細胞から GATA2 を欠損させた DP 細胞を分取して、網羅的遺伝子発現解析を実施したところ、遺伝子発現レベルにおいても、明らかな変化は認められなかった (図 5)。このことから、やはり前駆細胞での GATA2 欠損が、エピゲノムメモリーなどを介して DP 細胞以降の細胞の機能に影響を与えている可能性が示唆された。その詳細を解明するべく、前駆細胞から GATA2 欠損を誘導する系において、野生型および GATA2 欠損 DP 細胞を分取し、クロマチンアクセシビリティに関する網羅解析 (ATAC-seq) を実施した。その結果、クロマチンアクセシビリティにおいても、GATA2 欠損によりゲノムワイドな変化が起きているものと考えられた。今後、さらなるデータの統合解析により、GATA2 が具体的にどのようなゲノム領域において、エピゲノムメモリー制御を行っているか検証する必要がある。

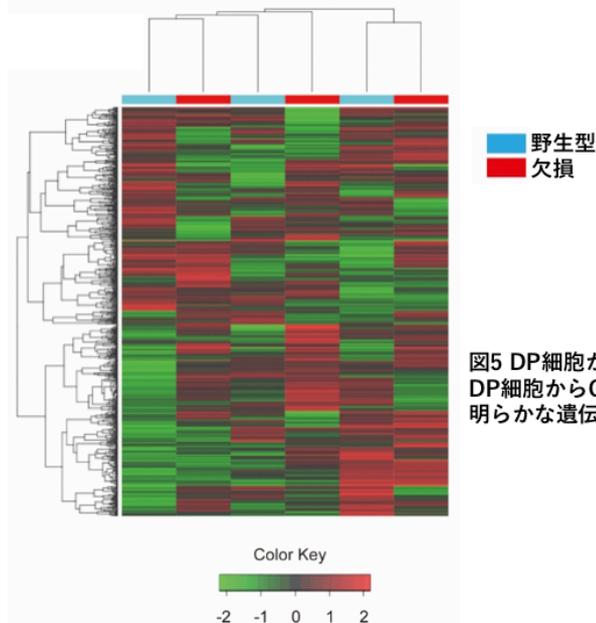


図5 DP細胞からのGATA2欠損の影響
DP細胞からGATA2を欠損させた場合、
明らかな遺伝子発現変化を認めない。

(結語)

今回の研究により、これまで不明な点が多かった転写因子 GATA2 の、T 細胞造血における重要性が明らかとなった。特に、胸腺における最も未熟な T 細胞 (ETP) を GATA2 の発現量に応じてさらに細分化し、真の ETP といえる細胞集団を同定できたことは、これまでにない発見である。これまでにも、ETP には、T 細胞への分化能と自然免疫細胞への分化能があることが示されていたが、この獲得免疫と自然免疫の最終分化の分岐点において、GATA2 が決定的な役割を果たすことが示唆された点は大変興味深い。今後、どのように GATA2 が分化を制御しているかさらに検証することで、造血進化の過程でも重要な分化制御機構の解明につながることを期待される。一方で、造血前駆細胞での GATA2 欠損がエピゲノムメモリー機構を介して、GATA2 を発現していない成熟細胞でも、重要な役割を果たしている可能性が示唆されたことの意義は大きい。本機構の詳細を今後さらに解明することで、T 細胞免疫に関わる様々な疾患 (自己免疫疾患や感染症、がんなど) を克服する端緒となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Sayaka Sano, Hiroki Kato, Yan Yan, Eijiro Furukawa, Daigo Michimata, Yuya Tanaka, Kazuki Sakurai, Koichi Onodera, Satoshi Ichikawa, Noriko Fukuhara, Yasushi Onishi, Hisayuki Yokoyama, Tohru Fujiwara, Hideo Harigae.
2. 発表標題 Transcription Factor GATA2 Is Inevitable for the Survival and Proper Differentiation of Thymic Multipotent Progenitor Cells By Gene Expression Orchestration
3. 学会等名 第65回米国血液学会（国際学会）
4. 発表年 2023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
研究分担者	加藤 浩貴 (Kato Hiroki) (50801677)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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
---------	---------