

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659456

研究課題名(和文) 転写調節不均衡による前白血病状態形成機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of leukemogenesis caused by disordered transcription regulation

研究代表者

清水 律子 (SHIMIZU, Ritsuko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40226262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：GATA1は赤血球・巨核球分化に重要な遺伝子の発現を制御する転写因子である。ダウン症患者では、アミノ末端の欠失した短型GATA1が発現し、急性巨核芽球性白血病の前癌病態(一過性骨髄増殖性疾患:TMD)を構築する。私たちは、GATA1欠失マウス胎児肝の巨核球前駆細胞や急性巨核芽球性白血病由来白血病細胞株の過増殖傾向が完全長GATA1を導入することにより抑制することができるが、このRbとの結合能が減弱しているGATA1変異体では抑制できないことを見いだした。この結果はRbとの結合に依存したGATA1機能が障害されることがTAM発症に寄与していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：GATA1 is a transcription factor essential for erythroid/megakaryocytic cell differentiation. Acquired mutations deleting the N-terminal region of GATA1 protein are frequently found in acute megakaryoblastic leukemia (AMKL) and transient myeloproliferative disorder (TMD) in children with Down syndrome. We found that full length of GATA1 could restrict proliferation of megakaryocyte progenitors derived from livers of GATA1-null fetus and cell line originally established from AMKL patients, whereas mutant GATA1s lacking consensus motif essential for the interaction sites with Rb protein could not support the GATA1 function on the growth regulation of immature megakaryocytes. This finding indicates that the GATA1 function supported by interaction with Rb protein is involved in the onset of TMD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：GATA転写因子 遺伝子改変マウス 白血病 巨核球

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の発症には、その疾患に特徴的な遺伝子変異に起因する恒常性の破綻が根底にあると考えられている。特に、受容体-シグナル伝達系の破綻に起因する悪性腫瘍に対しては、そのメカニズムに特異的な分子標的治療薬の開発が積極的に行われている。一方、転写因子の機能異常を原因とする白血病は数多く存在し、また、注目を浴びているにもかかわらず、発症に関わる分子メカニズムの詳細は明らかでない。

転写因子 GATA1 は赤血球系および巨核球系細胞の増殖、分化、細胞死に関わる複数の遺伝子を包括的に制御するマスター転写因子として解析が進んでいる。ダウン症患児に高率に発症する一過性骨髄増殖症 (TMD) と急性巨核芽球性白血病 (AMKL) では、ほぼ全例で GATA1 の変異が存在し、結果的に、酸性アミノ酸に富み、転写活性化能に重要な N-末端領域の 83 アミノ酸が欠失した短い GATA1 (GATA1s) が発現している。細胞内一過性発現実験で、GATA1s の転写活性化能が野生型 GATA1 の約 30% にまで低下していることから、疾患発症には GATA1 の転写活性の減弱が関与していると考えられてきた。先行研究から、私たちは、遺伝子相補レスキュー手法を用いて GATA1s のみを発現するマウス系統の樹立に成功し、このマウスでは、胎生期から新生児期において未熟な巨核芽球が異常増殖をしていること、しかし、この病態は生後間もなく消失することを見だし、GATA1s 変異が第一義的に TMD 様の病態形成に寄与していること明らかにした。さらに、内在性 GATA1 と同程度の GATA1s を発現しているマウスでは、一時的な寛解期を経た後に高率に AMKL を発症するが、過剰量の GATA1s を発現させることにより白血病発症を阻止できるが、興味深いことに、GATA1 遺伝子発現低下マウスでは、GATA1 機能が減弱しているにもかかわらず TMD/AMKL 様病態を呈さないことを見いだしてきた。このことは、TMD/AMKL の発症には、GATA1 の単なる転写活性化能低下ではなく、GATA1s の発現による積極的な転写調節不均衡が関わっていることを示している。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、ダウン症患児に高率に発症する巨核芽球性白血病の多段階白血病発症メカニズムを、GATA1 と Rb の協調不全による転写調節不均衡に着目して、マウス個体内でダイナミックに解析する。研究期間中に、(1) 変異により影響を受ける GATA1 と Rb/E2F の標的遺伝子を、特に増殖、分化、細胞死調節機構の破綻に着目して分類し、(2) 巨核芽球性白血病の前白血病状態形成に至る分子機構を明らかにする。さらには、(3) 造血系組織の恒常性維持に関わる転写調節因子の機能破綻による多段階白血病発症メカ

ニズムを個体内で解き明かすことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞を用いた GATA1 機能の解析  
巨核球特異的 GATA1 欠失胎児肝の巨核球は、GATA1 の機能欠失により増殖制御を欠失し、未分化な状態で増殖が亢進している。そこで同胎児の肝臓から cKit 陽性の多能性前駆細胞を分取し、幹細胞増殖因子 (SCF) 存在下で 2 日間培養する。レトロウイルスベクターを用いて野生型 GATA1、N 末端欠失変異体 (GATA1s)、Rb 結合配列 (LxCxE) に変異を挿入して Rb との結合能を減弱させた GATA1 変異体 2 種 (GATA1-GK、GATA1-AA) を発現導入させ、トロンボポエチン (TPO) 存在下で培養し巨核球系細胞増殖を検討する。

(2) マウス個体を用いた GATA1 機能の解析  
トランスジェニックマウスの樹立：トランスジェニックレスキュー法を用いて GATA1 変異による白血病発症メカニズムを解析する目的で、GATA1 発現調節領域を含む約 200kb の大腸菌人工染色体 (BAC) を用いて、野生型 GATA1、GATA1s、GATA1-GK、GATA1-AA を発現するトランスジェニックマウスを複数系統樹立する。

それぞれのマウス系統を GATA1 遺伝子ノックダウンマウスと交配し、レスキュー個体を得る。それぞれマウス系統のレスキュー個体において、胎児期と出生後の造血組織 (胎児肝) の巨核球を用いて FACS 解析による表面マーカー解析を行い、変異によって引き起こされる造血障害を考察する。

(3) GATA1 変異体と Rb の結合性に関する検討

Rb が、種々の転写因子やクロマチン再構成因子と複合体を形成し、転写制御を行っていることが報告されている。従って、Rb との結合力の有無が巨核球分化に重要であることが予想される。そこで、野生型 GATA1、GATA1s、GATA1-GK に GST タグを連結し、大腸菌で組換えタンパク質を合成した。同様に Rb タンパク質を合成した。試験管内で種々の GATA1 タンパク質と Rb タンパク質を混合し、GST プルダウンアッセイを行う。

## 4. 研究成果

(1) 細胞を用いた GATA1 機能の解析  
巨核球特異的 GATA1 欠失胎児肝由来の cKit 陽性の多能性前駆細胞は、TPO 存在下で培養することにより、CD41 巨核球マーカー陽性の細胞が著増した。同細胞にベクターのみを導入しても、その増殖曲線に変化はなかったが、野生型 GATA1 導入することで、CD41 陽性細胞の増殖を抑制することができた。同様な条件で GATA1s を導入すると、ベクター単独導入よりもむしろ CD41 陽性細胞は増殖した。一方、GATA1-GK、GATA1-AA を導

入すると、ベクター単独に比較してわずかに増殖が抑制されたが、野生型 GATA1 ほどの抑制効果は得られなかった。

(2) マウス個体を用いた GATA1 機能の解析  
野生型 GATA1、GATA1s、GATA1-GK、GATA1-AA を発現するトランスジェニックマウスをそれぞれ 2 から 3 系統樹立した。mRNA の発現量をリアルタイム PCR 方で検討したところ、内在性の GATA1 とほぼ同程度の発現量をもつ系統は得られたが、内在性 GATA1 よりも大量の発現量を有する系統は得られなかった。そこで、内在性とほぼ同程度の発現量をもつトランスジェニック系統と GATA1 遺伝子ノックダウンマウスと交配し、レスキュー個体の解析を行った。まず、野生型 GATA1 を発現するレスキュー胎児では、赤血球系および巨核球系のいずれも同腹の野生型個体と同様に正常に分化していたが、GATA1s を発現するレスキュー胎児では、赤血球系分化の障害と巨核球前駆細胞の蓄積があった。ところが GATA1-GK、GATA1-AA を発現するレスキュー胎児では、異常は見られなかった。

(3) GATA1 変異体と Rb の結合性に関する検討

野生型 GATA1 を用いた沈降物中に Rb タンパク質が検出できるが、GATA1s を用いた場合は全く検出できなかった。一方、GATA1-GK を用いた沈降物中には Rb タンパク質がわずかに検出できるが、野生型 GATA1 の場合と比較すると有意にその量が減少していた。

(4) 結果の考察

GATA1s で見られる巨核球系表現型は GATA1-GK、GATA1-AA では軽減されていた。GATA1 は単一の Rb 結合配列を持つ分子として知られているが、従来のコンセンサス配列を欠失してもわずかに Rb との結合性が残存するが GATA1s では完全に欠失することから、TMD/AMKL の発症には GATA1 は Rb と結合の有無が大きく関与していることが考えられる。

## 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 13 件)

1. Cui S, Tanabe O, Lim K-C, Xu HE, Zhou XE, Lin JD, Shi L, Shimizu R, Schmidt L, Campbell A, Yamamoto M, Engel JD. PGC-1 Coactivator Activity is Required for Murine Erythropoiesis. *Mol Cell Biol* 34(11), 1956-1965, 2014, doi: 10.1128/MCB.00247-14. (査読あり)
2. Yamazaki H, Suzuki M, Otsuki A, Shimizu R, Bresnick EH, Engel JD, Yamamoto M. A remote GATA2 hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in inv(3)(q21;q26) by activating EVI1 expression. *Cancer Cell* 25(4), 415-427, 2014, doi: 10.1016/j.ccr.2014.02.008 (査読あり)
3. Murakami S, Shimizu R, Romeo PH, Yamamoto M, Motohashi H. Keap1-Nrf2 system regulates cell fate determination of hematopoietic stem cells. *Gene Cells* 19(3), 239-253, 2014, doi: 10.1111/gtc.12126 (査読あり)
4. Watanabe S, De Zan T, Ishizaki T, Yasuda S, Kamijyo H, Yamada D, Aoki T, Kiyonari H, Kaneko H, Shimizu R, Yamamoto M, Goshima G, Narumiya S. Loss of a Rho-regulated actin nucleator, mDia2, impairs cytokinesis during mouse fetal erythropoiesis. *Cell Report* 5(4), 926-932, 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.10.021 (査読あり)
5. Shimizu R, Hasegawa A, Ottolenghi S, Ronchi A, Yamamoto M. Verification of the *in vivo* activity of three distinct *cis*-acting elements within the *Gata1* gene promoter-proximal enhancer in mice. *Gene Cells* 18(11), 1032-1041, 2013, doi: 10.1111/gtc.12096 (査読あり)
6. Suzuki M, Koyayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M. GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. *Gene Cells* 18(11), 921-933, 2013, doi: 10.1111/gtc.12086 (査読あり)
7. Mukai H, Suzuki M, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Shimizu R, Ohneda O, Yamamoto M. Establishment of erythroleukemic GAK14 cells and characterization of GATA1 N-terminal domain. *Gene Cells* 18(10), 886-898, 2013, doi: 10.1111/gtc.12084 (査読あり)
8. Toki T, Kanazaki R, Kobayashi E, Kaneko H, Suzuki M, Wang R, Terui K, Kanegane H, Maeda M, Endo M, Mizuoichi T, Adachi S, Hayashi Y, Yamamoto M, Shimizu R, Ito E. Naturally occurring oncogenic GATA1 mutants with internal deletions in transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome. *Blood* 121(16), 3181-3184, 2013, doi: 10.1182/blood-2012-01-405746 (査読あり)
9. Guiu J, Shimizu R, D'Altri T, Fraser ST, Hatakeyama J, Bresnick EH, Kageyama R, Dzierzak E, Yamamoto M, Espinosa L, Bigas A. Hes repressors are essential regulators of hematopoietic stem cell development downstream of Notch signaling. *J Exp Med* 210(1), 71-84, 2013, doi: 10.1084/jem.20120993 (査読あり)
10. Shimizu R, Yamamoto M. The contribution of GATA1 dysfunction to multi-step leukemogenesis. *Cancer Sci* 103(12), 2039-2044, 2012, doi: 10.1111/cas.12007.42 (査読あり)

11. Kaneko H, Kobayashi E, Yamamoto M, Shimizu R. N- and C-terminal transactivation domains of GATA1 protein coordinate hematopoietic program. *J Biol Chem* 287(25), 21439-21449, 2012, doi: 10.1074/jbc.M112.370437 ( 査読あり )
  12. Ainoya K, Moriguchi T, Ohmori S, Souma, T, Takai J, Morita M, Chandler KJ, Mortlock DP, Shimizu R, Lim, KC, Engel JD, Yamamoto M. UG4 enhancer-driven GATA-2 and BMP4 complementation remedies the CAKUT phenotype in *Gata2* hypomorphic mutant mice. *Mol Cell Biol* 32(12), 2312-2322, 2012, doi: 10.1128/MCB.06699-11 ( 査読あり )
  13. Hasegawa A, Shimizu R, Mohandas N, Yamamoto M. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. *Blood* 119(11), 2615-2623, 2012, doi: 10.1182/blood-2011-09-382473 ( 査読あり )
- [学会発表](計 18 件)
1. 平野育生, 鈴木教郎, 峯岸直子, 山本雅之, 清水律子. *Epo* 遺伝子転写調節領域の探索. 第 11 回がんハイポキシア研究会, 東北大学片平さくらホール, 仙台, 2013 年 12 月 13 日(口演・ポスター)
  2. 原田伸彦, 村田典子, 清水律子. 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 24 回東北動物実験研究会 弘前文化センター 弘前 2013 年 12 月 6 日(口頭発表, 要旨集 P8)
  3. 山寄博未, 鈴木未来子, 加藤幸一郎, 大槻晃史, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. A remote *GATA2* hematopoietic enhancer drives leukemogenesis in *inv(3)(q21;q26)* by activating *EVII* expression. 第 36 回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日(ポスター発表, ポスター番号; 3P0852)
  4. 平野育生, 鈴木教郎, 山寄瞬, 峯岸直子, 山本雅之, 清水律子. トランスジェニックマウスを利用したエリスロポエチン遺伝子エンハンサーの探索. 第 36 回日本分子生物学会年会神戸国際会議場 神戸 2013 年 12 月 3 日-6 日(ポスター発表, 1P-0195)
  5. 長谷川敦史, 金子寛, 山本雅之, 清水律子. GATA1 アミノ末端側亜鉛フィンガーによる DNA 結合親和性調節機構が赤血球分化に果たす役割. 日本生化学会東北支部第 79 回例会・シンポジウム, 東北大学さくらホール, 仙台, 2013 年 5 月 11 日(口頭発表, 要旨集 p26, No. C-1)
  6. 山寄博未, 鈴木未来子, 加藤幸一郎, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. 3q21q26 症候群における *EVII* 転写活性化と白血病発症の分子機構. 日本生化学会東北支部第 79 回例会, 東北大学さくらホール 仙台, 2013 年 5 月 11 日(ポスター発表, 要旨集; p45)
  7. 清水律子. 転写因子 GATA1 の機能異常と多段階白血病発症. 鳥取大学染色体工学研究センターセミナー, 鳥取大学, 2 月 22 日, 2013
  8. 鈴木未来子, 山寄博未, 加藤幸一郎, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. 8 染色体逆位モデルマウスを用いた *EVII* 高発現白血病発症機構の解析. 第 17 回造血器腫瘍研究会, シーガイア・コンベンションセンター 宮崎, 2013 年 2 月 1-2 日(口頭発表)
  9. 濱中悠賀, 鈴木未来子, 山寄博未, 清水律子, 山本雅之. 転写因子 GATA1 による胎児型グロビン遺伝子発現制御機構の解明. 転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム 若手ワークショップ@鬼怒川, ホテル鬼怒川御苑 鬼怒川, 2013 年 1 月 24-26 日(ポスター発表, 要旨集; p53)
  10. 鈴木未来子, 山寄博未, 加藤幸一郎, 清水律子, James Douglas Engel, 山本雅之. 3q21q26 白血病染色体転座・逆位モデルマウスを用いた *EVII* 遺伝子転写活性化機構の解析. 転写研究会&転写サイクル&転写代謝システム 若手ワークショップ@鬼怒川, ホテル鬼怒川御苑 鬼怒川, 2013 年 1 月 24-26 日(口頭/ポスター発表, 要旨集; p22)
  11. 大槻晃史, 金子寛, 清水律子, 山本雅之. 赤血球分化に関わる転写因子 GATA1 による ROS 制御機構の解明. 東北大学大学院医学系研究科 第 6 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学さくらホール 仙台, 2013 年 1 月 19 日(ポスター発表, 要旨集 p73)
  12. 濱中悠賀, 鈴木未来子, 山寄博未, 清水律子, 山本雅之. 転写因子 GATA1 による胎児型グロビン遺伝子発現制御機構の解明. 東北大学大学院医学系研究科 第 6 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学さくらホール 仙台, 2013 年 1 月 19 日(ポスター発表, 要旨集 p58)
  13. 長谷川敦史, 清水律子, 金子寛, 山本雅之. 大槻シス配列に依存した GATA1-DNA 結合親和性修飾機構の生理機能解析. 東北大学大学院医学系研究科第 6 回リトリート大学院生研究発表会, 東北大学さくらホール, 仙台, 2013 年 1 月 19 日(ポスター発表, 要旨集 p70, No. P-5-E)
  14. Hasegawa A, Shimizu R, Kurokawa H, Yamamoto M. DNA binding diversity achieved through the interaction of GATA1 N-finger and GATA motif is important for embryonic erythropoiesis. 54<sup>th</sup> ASH Annual Meeting and Exposition, Georgia World Congress Center, Atlanta, GA, USA, December 8-11, 2012
  15. 長谷川敦史, 清水律子, 金子寛, 黒河博文, 山本雅之. シス配列多様性に依存した *GATA1*-DNA 結合親和性修飾機構の生理機能解析 BIA Symposium 2012 (GE Healthcare), 明治記念館, 東京, 2012 年 7 月 20 日(ポスター発表, A-3)

16. 長谷川敦史, 清水律子, 金子寛, 黒河博文, 山本雅之. シス配列多様性に依存した GATA1-DNA 結合親和性修飾機構の生理機能解析平成 24 年度「転写代謝システム」領域班会議, つくばグランドホテル, つくば, 2012 年 7 月 2-4 日(ポスター発表, P-18)
17. 清水律子. 多段階白血病発症に関与する転写因子 GATA1 の機能解析、第 4 回お茶の水セミナー、東京ドームホテル、東京、4 月 18 日, 2012
18. Kaneko H, Eri Kobayashi, Shimizu R, Yamamoto M. Amino- and Carboxyl-terminal transactivation domains of GATA1 coordinate the hematopoietic program. The 18th Conference on Hemoglobin Switching, Asiloma Conference Grounds, CA, USA, June 8-10, 2012

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

清水 律子 (SHIMIZU RITSUKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40226262

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：