

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860716

研究課題名(和文) 樹状細胞分化におけるGATA2の機能同定 - MonoMac症候群の病態解明 -

研究課題名(英文) Identification of GATA2 function in dendritic cell differentiation for elucidating the pathological mechanism of MonoMAC syndrome

研究代表者

大西 康 (Onishi, Yasushi)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：10509574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：MonoMAC症候群の責任遺伝子であるGATA2が免疫応答の中心となる樹状細胞の分化において果たす役割を解析した。GATA2の欠失により骨髄球系共通前駆細胞および樹状細胞共通前駆細胞からの樹状細胞分化が障害された。さらに、GATA2が骨髄球系前駆細胞においてGATA3などT細胞分化に関連する遺伝子発現を抑制した。GATA2が造血幹細胞の維持・増殖だけではなく、血球の分化過程でも重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要(英文)：Mutations in GATA2 are associated with the monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. In this syndrome, monocyte, B-cell, NK-cell, and dendritic cell (DC) populations are diminished or undetectable. DCs are central regulators for immune response. We investigated the role of GATA2 in DC differentiation and function by Gata2 conditional knockout mice. It was found that GATA2 was required for the in vitro generation of DCs from common myeloid-restricted progenitors and common DC precursors. But common lymphoid-restricted progenitors or granulocyte-macrophage progenitors were not affected for the DC differentiation by GATA2-knockout. Moreover, expression profiling showed GATA2 could suppress T-cell-related genes, including Gata3 and Tcf7 in myeloid progenitors. These findings suggest GATA2 has an important role in cell-fate specification toward the myeloid vs. T-cell lineage by regulating lineage-specific transcription factors in progenitors.

研究分野：血液内科学

キーワード：GATA2 MonoMAC症候群 樹状細胞 転写因子

1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA2 は、血球分化において重要な役割を担う転写因子であり、造血幹細胞 (Hematopoietic stem cells: HSC) の分化の初期段階において増殖や維持に働くことが示されている。2011年に GATA2 変異が、単球、B 細胞、NK 細胞、Dendritic cell (DC) の減少による免疫不全を呈する monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) 症候群の原因であることが報告された。この MonoMAC 症候群は免疫不全を経て骨髄異形成症候群/急性骨髄性白血病 (MDS/AML) に進展し、これに対する治療として同種造血幹細胞移植が有効と考えられている。DC は免疫応答の中心的役割を担う細胞であり、MonoMAC 症候群で減少・欠損している。易感染性や発がんの機序を含めて、MonoMAC 症候群の病態解明のためには DC の分化制御と機能発現における GATA2 の役割を明らかにすることが必要と考えた。

2. 研究の目的

HSC からの DC の分化・成熟・活性化に関しては common DC progenitor の存在を含めて不明な点が多く、他の血球系統と比較して DC の分化制御を担う転写因子に関する報告は少ない。また、GATA2 は HSC を中心とする幹細胞での機能を中心に研究が進められてきているが、DC を含めた免疫担当細胞における機能については検討されていない。本研究では HSC から DC への分化制御と DC の機能発現における GATA2 の役割を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) GATA2 欠損マウス

GATA2 のホモノックアウトマウスは胎生致死のため、*Gata2* 遺伝子の ZF2 領域をコードする 5 番エクソンの両端に loxp 配列が導入されている *Gata2*^{f/f} マウスと、エストロゲンレセプターと Cre リコンビナーゼの融合蛋白質をコードする配列が導入された ER-Cre マウスを交配することにより、タモキシフェン投与 (1 μg を day 1-3, 8-10 に腹腔内投与し day 20-22 に解析) により GATA2 がホモでノックアウトされる条件付きノックアウトマウス (*Gata2*^{f/f}/ER-Cre マウス) を作製した。次に *Gata2*^{f/f} マウスと CD11c-Cre マウスと交配させることにより、DC へ分化後に *Gata2* を欠損する *GATA2*^{f/f}/CD11c-Cre マウスを作成した。

(2) 骨髄前駆細胞からの DC 分化誘導

GATA2^{f/f}/ER-Cre マウス (CD45.2⁺) の骨髄より HSC (LSK)、common myeloid-restricted progenitor (CMP)、granulocyte-macrophage progenitor (GMP)、common lymphoid-restricted progenitor (CLP)、common DC precursor (CDP) 分画をセルソーターで分離し、Flt3L (200ng/ml) の存在下で SJL マウス (CD45.1⁺) の全骨髄細胞をフィーダー細胞と

して共培養した。4-ヒドロキシ-タモキシフェン (4-OHT) を 0.1 μM の濃度で添加することにより in vitro で GATA2 をノックアウトした。

(3) 骨髄由来樹状細胞 (BM-DC) の作成

マウス大腿骨および脛骨より骨髄細胞を採取し、GM-CSF (20 ng/ml) もしくは Flt3L (200 ng/ml) の存在下で培養し DC へ分化させた。その後、CD11c Microbeads もしくは Pan-DC Microbeads を用いて DC を分離した。

(4) BM-DC の T 細胞分裂刺激能評価

脾臓から分離した T 細胞を CFSE にて標識し、抗マウス CD3 ε 抗体の存在下で BM-DC と共培養を行い、フローサイトメトリーで分裂した T 細胞割合を評価した。

(5) マイクロアレイ解析

GATA2^{f/f}/ER-Cre マウス骨髄由来 CMP をフィーダー細胞および Flt3L の存在下で 3 日間培養後に分離し全 RNA 抽出した。RNA 増幅後に CyDye post-labeling Reactive Dye Pack を用いて標識し、Superprint G3 mouse GE microarray slide を用いて解析を行った。データ解析には GeneSpring software package (Agilent Technologies) を用いた。培養時の 4-OHT 添加 (*Gata2* ノックアウト) の有無で遺伝子発現を比較した。

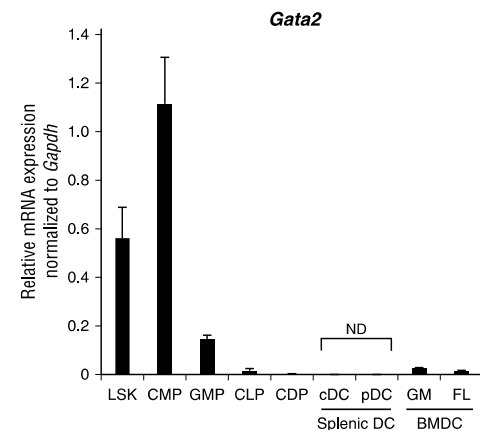
(6) GATA3 発現のルシフェラーゼ解析

ルシフェラーゼベクター (pGL4.10) に ① *Gata3* のプロモーター領域を組み込んだベクター、② *Gata3* のプロモーター領域と共に *Gata3* の +190kb 領域 (GATA 結合配列) を組み込んだベクター、③ *Gata3* のプロモーター領域と共に *Gata3* の +190kb 領域から GATA 結合配列を除去した配列を組み込んだベクターの 3 つを作成し、GATA2 と GATA3 をともに発現するマウス由来の未分化造血細胞株である EML 細胞に導入してルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) 骨髄前駆細胞における GATA2 発現

LSK、CMP では高い GATA2 発現が確認されたが、CDP および GMP での GATA2 発現は著明に減少した。脾臓の plasmacytoid DC (pDC)、conventional DC (cDC) では GATA2 発現は確認されなかった。骨髄細胞より GM-CSF もしくは Flt3L を用いて誘導した BM-DC においては低値ではあるが GATA2 発現が認められた。

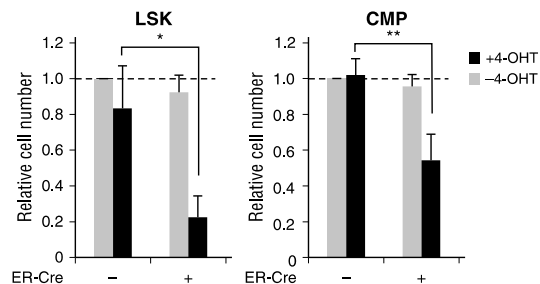


(2) DC 分化における GATA2 欠損の影響

GATA2^{f/f}/ER-Cre マウスに対するタモキシフェン投与後 21 日目には正常な GATA2 発現がほぼ消失していることが確認された。さらにタモキシフェン投与後、このマウスの脾臓における pDC、cDC はともに著明に減少することが確認された。一方で、骨髄の前駆細胞は LSK 以下、CMP、GMP、CLP、CDP のいずれの段階においても著減していた。

(3) 骨髄前駆細胞における GATA2 の役割

GATA2 欠損による DC の減少が HSC の枯渇に起因するものか、あるいは DC の分化障害によるものかを同定するために、各分化段階の骨髄前駆細胞を分離して GATA2 ノックアウトによる DC 分化への影響を評価した。GATA2 欠損により、LSK では DC 分化が 70%以上低下し、CMP では約 50%、CDP では約 30%の減少が認められた。一方で、CLP や GMP においては、DC の分化割合に有意な差は認められなかった。以上の結果から GATA2 は LSK から CMP を経て CDP までの DC 分化において重要な役割を担うことが示唆された。



(4) DC の機能発現における GATA2 の役割

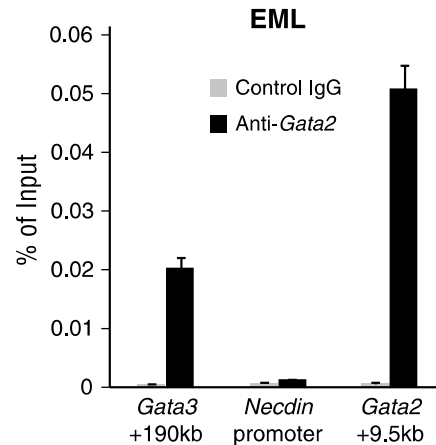
GATA2^{f/f}/CD11c-Cre マウスより作成した BM-DC では GATA2 mRNA の発現が著明に減少していることを確認した。DC の機能評価として、LPS 刺激による共刺激分子 (CD40, CD80, CD86) の発現量変化、共培養による T 細胞刺激能、FITC 標識デキストランの貪食能のいずれにおいても、GATA2 欠損 BM-DC はコントロールと比較して、有意差は認められなかった。LPS 刺激の 24 時間および 60 時間後の apoptosis に関して有意差は認められなかった。

(5) CMP における GATA2 ノックアウトによる遺伝子発現変化

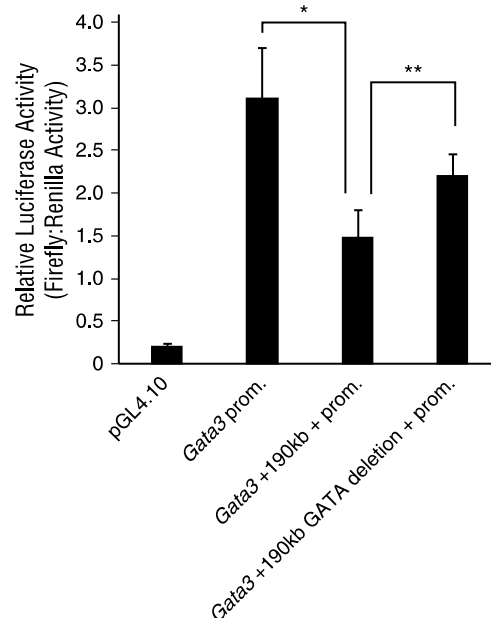
GATA2 欠損により 2 倍以上発現が上昇または低下した遺伝子はそれぞれ 224 遺伝子、234 遺伝子であり、5 倍以上発現上昇または低下した遺伝子はそれぞれ 67 遺伝子、63 遺伝子であった。DC 分化に関連する既存の遺伝子は抽出されなかった。一方で、ImmGen データベース (<http://www.immgen.org>) を用いた解析では、GATA2 欠失により、骨髄球系細胞が分化する際に上昇する転写因子の低下が認められ、*Tcf7* や *Gata3* など T 細胞系の転写因子の発現上昇が認められた。以上の結果から GATA2 が骨髄球系前駆細胞において T 細胞分化に関連する遺伝子発現を抑制する役割を担っている可能性が示唆された。

(6) GATA2 による GATA3 発現調整

UCSC Genome Browser を用いた解析により *Gata3* の +190kb 領域に GATA 結合配列 (A/GATA/A) が存在することを確認した。次に野生型マウスの CMP および EML 細胞を用いて ChIP-sequence 法による解析を行ったところ、同領域に GATA2 が結合することが確認された。



さらに、ルシフェラーゼベクターに *Gata3* のプロモーター領域を組み込み、EML 細胞に導入した実験では、*Gata3* の +190kb 領域の付加によりルシフェラーゼ活性は有意に低下し、+190kb 領域の GATA 結合配列除去により活性回復が認められた。以上より、GATA2 は *Gata3* の +190kb 領域へ結合することにより、GATA3 の転写を負に制御することが示唆された。



(Onodera K, et al. Blood 2016; 128: 508-18)

以上の結果から、GATA2 は造血幹細胞の維持や増殖だけでなく、CMP、CDP など前駆細胞の段階でも DC 分化、さらには T 細胞系転写因子を抑制することで骨髄球系分化形質を維持する役割を持つ可能性が示された。MonoMAC 症候群における複数の細胞系列欠損、

易感染性、白血病発症の機序を解明して新規治療の開発につなげるには、造血幹細胞から血球の分化成熟段階を含めたより広い範囲における GATA2 の機能解析をさらに進めていく必要がある。

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 9 件)

1. Onodera K, Fujiwara T, Onishi Y, Itoh-Nakadai A, Okitsu Y, Fukuhara N, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. *Blood* 2016; 128: 508-18.

2. Saito Y, Fujiwara T, Ohashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Harigae H. High-Throughput siRNA Screening to Reveal GATA-2 Upstream Transcriptional Mechanisms in Hematopoietic Cells. *PLoS One* 2015; 10: e0137079. doi: 10.1371/journal.pone.0137079

3. Onishi Y, Sugimura K, Ohba R, Imadome K, Shimokawa H, Harigae H. Resolution of chronic active EBV infection and coexisting pulmonary arterial hypertension after cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2014; 49: 1343-4.

4. Kamata M, Okitsu Y, Fujiwara T, Kanehira M, Nakajima S, Takahashi T, Inoue A, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Shimizu R, Yamamoto M, Harigae H. GATA2 regulates differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Haematologica* 2014; 99: 1686-96.

5. Fujiwara T, Okamoto K, Niikuni R, Takahashi K, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizawa K, Ichinohasama R, Nakamura Y, Nakajima M, Tanaka T, Harigae H. Effect of 5-aminolevulinic acid on erythropoiesis: a preclinical in vitro characterization for the treatment of congenital sideroblastic anemia. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 454: 102-8.

6. Fujiwara T, Fukuhara N, Funayama R, Nariai N, Kamata M, Nagashima T, Kojima K, Onishi Y, Sasahara Y, Ishizawa K, Nagasaki M, Nakayama K, Harigae H. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in GATA-2 deficiency evolving into myelodysplasia and acute leukemia. *Ann Hematol* 2014; 93: 1515-22.

(以上全て査読有)

[学会発表] (計 12 件)

1. Yasushi Onishi, Masahiro Kobayashi, Shunsuke Hatta, Satoshi Ichikwa, Noriko Fukuhara, Tohru Fujiwara, Minami Yamada Fujiwara, Hideo Harigae. Outcome of umbilical cord blood transplantation in adult patients with chronic active Epstein-Barr Virus infection. 43rd Annual Meeting of EBMT, 2017 年 3 月 27 日, マルセイユ (フランス)

2. Koichi Onodera, Tohru Fujiwara, Yasushi Onishi, Ari Itoh-Nakadai, Yoko Okitsu, Noriko Fukuhara, Kenichi Ishizawa, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Hideo Harigae. GATA2 regulates dendritic cell differentiation. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月 13-15 日, パンフィコ横浜 (横浜)

3. Koichi Onodera, Tohru Fujiwara, Yasushi Onishi, Ari Itoh-Nakadai, Yoko Okitsu, Noriko Fukuhara, Kenichi Ishizawa, Ritsuko Shimizu, Masayuki Yamamoto, Hideo Harigae. GATA-2 Regulates Dendritic Cell Differentiation. 57th ASH Annual Meeting & Exposition, 2015 年 12 月 5-8 日, オーランド (米国)

4. Yo Saito, Tohru Fujiwara, Masahiro Kobayashi, Makiko Suzuki, Yoko Okitsu, Noriko Fukuhara, Yasushi Onishi, Kenichi Ishizawa, Hideo Harigae. High-Throughput siRNA screening reveals GATA-2 upstream transcriptional mechanisms in hematopoietic cells. 20th EHA Congress, 2015 年 6 月 11-14 日, ウィーン (オーストリア)

5. Kyoko Inokura, Tohru Fujiwara, Yoko Okitsu, Noriko Fukuhara, Yasushi Onishi, Kenichi Ishizawa, Kazuya Shimoda, Hideo Harigae. Impact of TET2 deficiency on iron metabolism in erythroblasts: a potential link to ring sideroblast formation. 56th ASH Annual Meeting and Exposition, 2014 年 12 月 6-9 日, サンフランシスコ (米国)

6. Onishi Y, Saito K, Suzuki T, Ohashi K, Kondo A, Hasegawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Fujiwara T, Fujiwara M, Kameoka J, Ishizawa K, Harigae H. Salvage cord blood transplant in patients with graft failure after myeloablative conditioning. 第 76 回日本血液学会, 2014 年 10 月 31 日-11 月 2 日, 大阪国際会議場 (大阪)

7. Nakagawa R, Fukuhara N, Okitsu Y, Takahashi T, Katsuoka Y, Kobayashi M, Onishi Y, Fujiwara T, Sasahara Y, Ishizawa K, Harigae H. Adult MDS cases diagnosed as MonoMAC syndrome.

第76回日本血液学会, 2014年10月31日-11月2日, 大阪国際会議場 (大阪)

8. Tohru Fujiwara, Noriko Fukuhara, Ryo Funayama, Naoki Nariai, Mayumi Kamata, Takeshi Nagashima, Kaname Kojima, Yasushi Onishi, Yoji Sasahara, Kenichi Ishizawa, Masao Nagasaki, Keiko Nakayama, Hideo Harigae. Identification of acquired mutations by whole-genome sequencing in monomac syndrome evolving into myelodysplasia and acute leukemia.

19th EHA Congress, 2014年6月12-15日, ミラノ (イタリア)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大西 康 (Onishi, Yasushi)
東北大学・大学病院・講師
研究者番号: 10509574

(2) 研究協力者

小野寺 晃一 (Onodera, Koichi)
東北大学大学院医学系研究科・血液免疫病学分野・博士課程
(現)大崎市民病院・血液内科・副科長
研究者番号: 80792291