

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：32305  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2015～2017  
課題番号：15K19014  
研究課題名(和文) マウス生体内マスト細胞におけるGATA2の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of GATA2 in mast cells

## 研究代表者

大森 慎也 (Ohmori, Shinya)

高崎健康福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：10509194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は以前、マウス骨髄マスト細胞(BMMCs)を用いた培養実験で、GATA2を欠失するとマスト細胞が脱分化することを報告した。本課題では、この事象が生体内でも生じるのか否かが検証した。まず、tdTomato(+)/GATA2<sup>-/-</sup> BMMCsを腹腔内に移植し解析したが、腹腔内と腸管膜にtdTomato陽性細胞は確認できなかった。次に、マスト細胞特異的CreERT2マウス(Cma1-BAC-CreERT2)を作製し、TGの挿入が確認された6系統のF1マウスを得たが、全てのラインの腹腔マスト細胞でCreERT2は発現していなかった。生体内GATA2欠失マスト細胞の解析法には再検討が必要である。

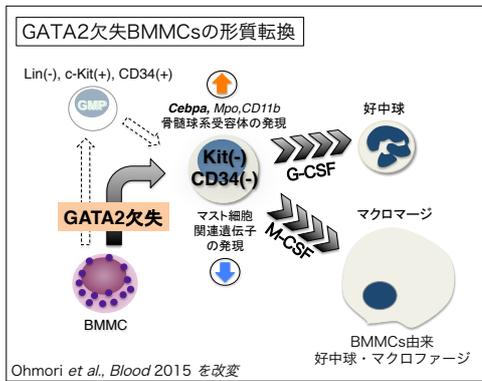
研究成果の概要(英文)：We previously reported that ablation of GATA2 in mouse bone marrow-derived mast cells (BMMCs) resulted in the dedifferentiation of mast cells into myeloid-like cells. In this study, we examined whether this phenomenon is also observed in vivo. Firstly, the tdTomato(+)/GATA2<sup>-/-</sup> BMMCs were transplanted into the peritoneal cavity of wild type mice. Unexpectedly, however, tdTomato-positive cells were not detectable in the mesentery and peritoneal cavity of the mice 7 days following the transplantation. Secondly, we generated BAC transgenic mice harboring mast cell-specific CreERT2 and obtained 6 lines of F1 mice. Transgene copy number was estimated for 1-3 by quantitative genomic PCR. However, none of these lines express CreERT2 transgene in their peritoneal mast cells. Collectively, alternative strategies might be considered for studying GATA2-deficient mast cells in vivo.

研究分野：分子生物学

キーワード：GATA2 mast cells トランスジェニックマウス BAC

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子 GATA2 は、造血幹細胞および前駆細胞に発現し、I 型アレルギー反応に関与するマスト細胞系列への分化決定に必須であることが報告されている。近年申請者らは、分化決定したマスト細胞における GATA2 の役割を明らかにする目的で *Gata2*CKO マウス由来の骨髓細胞由来マスト細胞 (BMMCs) を用いて、GATA2 欠失解析を行った (H25-26 若手 (B): 研究課題番号 25860221)。その結果、①GATA2 を欠いた BMMCs は、マスト細胞マーカー (c-Kit+/FceRIα+) の発現が減少すると同時に骨髓球マーカー (Mac1+/Gr1+, -) が陽性となること、②細胞死を起こさずに未熟な骨髓球様の形態を呈すること、③サイトカインカクテルを添加することで、機能的な好中球やマクロファージに分化転換すること、④また、この形質転換は *Cebpa* の発現上昇に起因することを見いだした (Ohmori et al., *Blood*, 2015)。



マスト細胞は、皮膚、消化管粘膜、肺をはじめ生体内の各組織で最終分化すると考えられている。一般的に細胞の運命は、一度決定すると以後の過程は不可逆的であると考えられているが、近年 2 型糖尿病患者の  $\beta$  細胞が生理的に脱分化するという興味深い報告がなされた (Talchai C. et al., *Cell*, 2012)。申請者が行った先行研究成果の重要な点は、iPS 細胞の様に複数の外来遺伝子を強制発現することなく、GATA2 の機能欠失のみでマスト細胞の脱分化が誘導されたことである。GATA2 は、Noct、TGF  $\beta$ 、BMP4 シグナル等の環境刺激によってその発現が制御されることが報告されていることから、末梢組織の微小環境に反応してマスト細胞内の GATA2 の発現量が増減し、好中球や単球・マクロファージに分化転換する可能性もあるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本課題では、生体内での細胞の脱分化の基盤となる知見を得る為に、マウス末梢組織のマスト細胞で人為的に GATA2 を欠失させ、マスト細胞の運命転換が起こりえるのか否かについて検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究で使用した *Gata2*CKO (*Gata2*<sup>fllox/fllox</sup>) マウスは、GATA2 の DNA 結合領域 (C finger:CF) をコードする第 5 エクソン (ex5) を LoxP 配列で挟んでいる。Cre-LoxP システムにより 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) 誘導的に ex5 を欠失させるために、全身性に CreER<sup>T2</sup> を発現する Rosa26-CreER<sup>T2</sup> マウスと交配し *Gata2*<sup>fllox/fllox</sup>::*Rosa26*-CreER<sup>T2</sup> (G2FC) を産出した。さらに組み替えが起きた細胞で蛍光タンパク質である tdTomato が発現する *Rosa26*-STOP-tdTomato (Tom) マウスと交配し、産出した G2FC::Tom (G2FCT) マウスを用いた。

この G2FCT マウスの全骨髓細胞から樹立された G2FCT-BMMCs は、4-OHT 処理を行うと GATA2 の機能欠失がおけると同時に tdTomato の蛍光を発するため (G2  $\Delta$  CFT+-BMMCs)、マーカーとしてフローサイトメーター (FACS) で運命を追跡することが可能である。本課題では当該細胞を用いた移植および解析、またマスト細胞特異的 CreERT2 発現マウスの樹立を行った。また本研究の動物実験は高崎健康福祉大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験ガイドラインに従い実施した。

## 4. 研究成果

1) GATA2 の欠失によるマスト細胞の形質転換が生体内でも起こり得るのか否か検証するために、GATA2 欠失 BMMCs (G2  $\Delta$  CFT+-BMMCs) を生体内へ移植し解析を行った。4-OHT 処理後 2 日目に G2  $\Delta$  CFT+-BMMCs をセルソーターで分取し、野生型 C57BL/6J オスマウス (10-15 週齢) の腹腔に移植した。7 日後に腹腔細胞を採取し FACS 解析を行った結果、コントロール細胞として用いた tdTomato 陽性の *Gata2*<sup>fllox/-</sup>-BMMCs の存在は認めることができ、c-Kit/FceRI $\alpha$  の発現は共に陽性であった。この結果に対し、tdTomato 陽性 G2  $\Delta$  CFT+-BMMCs の存在はごく僅かにしか確認することができず、これらの細胞における他系列の分化マーカーの発現は陰性であった (図 1)。また同個体で腸間膜における細胞群についても解析を行ったが tdTomato 陽性の細胞を同定することはできなかった。

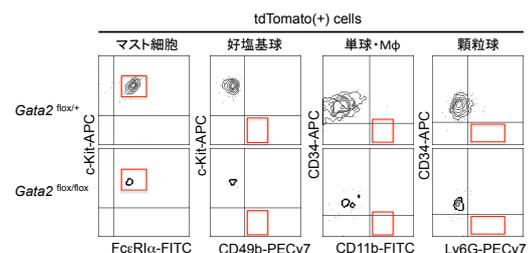


図 1. 腹腔移植後 7 日目における tdTomato(+) G2  $\Delta$  CFT+-BMMCs の FACS 解析

赤枠は、分化マーカーに対応する各系列の細胞が出現することが予想される場所を示す。

2) これまでにマスト細胞特異的に Cre recombinase を発現するマウスは複数報告されているが、薬剤によって誘導可能な CreER<sup>T2</sup> を発現するマウスは報告されていない。そこで末梢組織に分布するマスト細胞で薬剤誘導的に GATA2 を欠失させることを想定し、本課題ではマスト細胞特異的に CreER<sup>T2</sup> を発現するマウスの樹立を試みた。トランスジーン (TG) は、マスト細胞特異的に発現することが知られている *Cma1* 遺伝子が中心に位置する 207.5 kbp の BAC-DNA (RP23-284A14) を利用した (図 2: 実線で示す)。

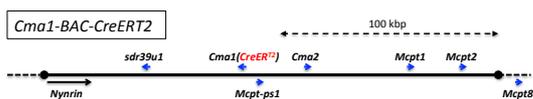


図2. 本課題で用いたBAC-DNA(RP23-284A14)の模式図と CreER<sup>T2</sup>の挿入位置

相同組換えにより CreER<sup>T2</sup> の cDNA を *Cma1* 遺伝子の第一エクソンに挿入し BAC 構築を作成後、外部受託により F0 マウスを 13 ライン得た。次に、方法で述べた Tom マウスと交配し *Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup>::Tom(F1) を複数ライン樹立した。これらのラインについて TG のコピー数を Q-PCR によって調べた結果、6 ラインが 1-4 コピーを有していた (図 3)。

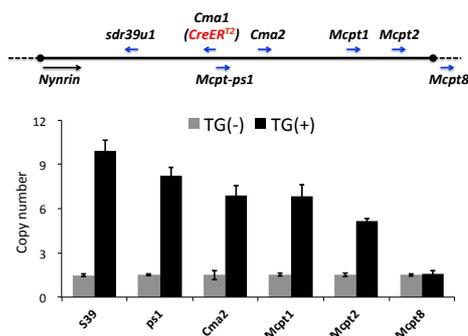


図3. 本課題で樹立した *Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup>-Line 89 のコピー数 (例)

ジェノタイプングにより Cre(+) となったマウスの尻尾ゲノムを鋳型にし、BAC-DNA (RP23-284A14) 上に存在する各遺伝子を增幅するプライマーを用いて Q-PCR を実施した。得られた定量値は、*Gata1* プロモーターを増幅した時の定量値で補正した。*Mcpt8* は BAC-DNA に含まれていないため、予想通り TG(-) と TG(+) で定量値に差は認められなかった。TG(-): N=4, TG(+): N=6

次に、樹立された *Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup>::Tom(F1) 6 ラインに Tamoxifen (Tx) を投与し、10 日後に全腹腔細胞の FACS 解析を行った。その結果、コントロールとして全身性に CreER<sup>T2</sup> を発現する Rosa26-CreER<sup>T2</sup> マウスとの交配で産出した Rosa26-CreER<sup>T2</sup>::Tom では、腹腔マスト細胞を含むほぼすべての細胞が tdTomato 陽性であったのに対し、*Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup>::Tom のいずれのラインにおいても tdTomato 陽性の細胞を同定することはできなかった。CreER<sup>T2</sup> は発現量により細胞死を誘導することが報告されているが (Yoshioka-Higashi et al., *J Immunol*, 2009)、本解析結果ではマスト細胞の存在は 2-5% 認められたことから CreER<sup>T2</sup> の毒性によ

ってマスト細胞が消失した可能性はないと考えられた。そこでさらにセルソーターを用いて *Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup>::Tom(F1) マウスの腹腔マスト細胞と腹腔マクロファージを分取し、Q-PCR によって CreER<sup>T2</sup> mRNA の発現量を解析した。その結果、コントロールとして用いた Rosa26-CreER<sup>T2</sup> マウスでは CreER<sup>T2</sup> mRNA の発現が十分検出できたのに対し、*Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup>::Tom(F1) はいずれのラインにおいても CreER<sup>T2</sup> mRNA の発現は認められなかった (図 4)。

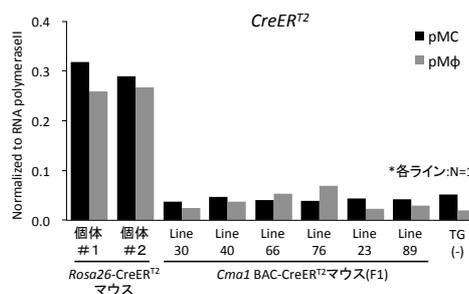


図4. *Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup> マウスの腹腔マスト細胞 (pMC) と腹腔マクロファージ (pMφ) における CreER<sup>T2</sup> mRNA の発現

以上の結果から今回樹立した *Cma1* BAC-CreER<sup>T2</sup> マウスは、少なくとも腹腔マスト細胞で CreER<sup>T2</sup> が発現しないマウスであることがわかった。確かな理由は明らかにできていないが、本課題で TG として用いた領域は、マスト細胞特異的に発現する遺伝子群がクラスターを形成しているため、立体構造の形成などの影響から生体内の発現が再現できない可能性が考えられた。今後生体内 GATA2 欠失マスト細胞の解析法には再検討が必要である。

## 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 2 件)

1) Yano K, Otsuka K, Kato Y, Kawabata H, Ohmori S, Arakawa H, Ogiwara T. Different regulation of P-glycoprotein function between Caco-2 and Caki-1 cells by ezrin, radixin and moesin proteins. *J Pharm Pharmacol. J Pharm Pharmacol.* 2016;68(3): 361-367 (査読あり)

2) 大森慎也, 大根田絹子: GATA2 によるマスト細胞の分化と維持, 臨床免疫・アレルギー科, 第 64 巻, 第 4 号, P352-365, 2015. (査読なし)

[学会発表] (計 11 件)

1) 大森慎也, 島武志, 養田真理, 石嶋康史, 大根田絹子: BMMCs において *Cebpa* は GATA 因

子と PU.1 の相互作用によって制御される, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 1P-0739, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日.

2) 石嶋康史, 大井田晃莉, 大森慎也, 大根田絹子: CRISPR/Cas9 法による *Gata2*-136K 領域を欠失した 3T3-L1 細胞の作製とその解析, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 1P-0748, 神戸, 2017 年 12 月 6-9 日.

3) 島武志, 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子: マウス骨髄由来マスト細胞における GATA 因子による *Cebpa* 転写抑制機序の解析, 平成 29 年度日本生化学会関東支部例会, P-19, 東京, 2017 年 6 月 17 日.

4) 和田圭祐, 大森慎也, 丸山恭平, 石嶋康史, 大根田絹子: マウス皮下組織由来脂肪前駆細胞の分化過程における転写因子 GATA2 の機能解析, 平成 29 年度日本生化学会関東支部例会, P-51, 東京, 2017 年 6 月 17 日.

5) 大森慎也, 和田圭祐, 鈴木美穂, 風間由紀子, 石嶋康史, 大根田絹子: マウス脂肪組織由来脂肪前駆細胞の分化過程における転写因子 GATA2 の機能解析, 日本薬学会 第 137 年会, 26PB-pm029, 仙台, 2017 年 3 月 24-27 日.

6) 大森慎也, 掛野晶, 石嶋康史, 大根田絹子: マウス骨髄由来マストにおける GATA2、PU.1、RUNX1 による *Cebpa* 抑制メカニズムの解析. 第 89 回日本生化学会大会, 3P-221, 仙台, 9/25-27, 2016 年 9 月 25-27 日.

7) 石嶋康史, 大森慎也, 采女愛, 青木佑介, 小堀美樹, 大根田絹子: 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化において Glucocorticoid 受容体の活性化が GATA2 の発現抑制をもたらす, 第 89 回日本生化学会大会, 3P-219, 仙台, 2016 年 9 月 25-27 日.

8) 掛野晶, 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子: マスト細胞における GATA2 の *Cebpa* 転写抑制メカニズムの解析—CRISPR/Cas9 法による *Cebpa*+37K 領域の機能的貢献の解析—. 平成 28 年度日本生化学会関東支部例会—生命科学に基づく診断と治療—, P-02, 栃木 (自治医科大学 医学部 教育研究棟), 2016 年 6 月 11 日.

9) 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子: マスト細胞分化過程における GATA2 を介した *Cebpa* 遺伝子の発現抑制メカニズムの解析, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 2P-1020, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.

10) 石嶋康史, 大森慎也, 青木佑介, 采女愛, 丹野志保, 前川悠理, 大根田絹子: 脂肪

細胞分化における GATA 因子の発現抑制機構の解析, 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 1P-0679, 神戸, 2015 年 12 月 1-4 日.

11) 大森慎也: マスト細胞分化における GATA2 の機能と役割, 第 11 回 麒麟塾 (血液学若手研究者勉強会), 品川, 2015 年 7 月 11 日.

[その他]  
ホームページ等

研究内容紹介  
[http://www.takasaki-u.ac.jp/p\\_yaku\\_lab0/yaku-02-01/](http://www.takasaki-u.ac.jp/p_yaku_lab0/yaku-02-01/)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大森 慎也(OHMORI SHINYA)  
高崎健康福祉大学・薬学部・助教  
研究者番号:10509194