

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：84420

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06650

研究課題名(和文) マスト細胞分化におけるGfi1の役割

研究課題名(英文) The role of Gfi1 in the differentiation of mast cells

研究代表者

山口 朋子 (YAMAGUCHI, Tomoko)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 幹細胞制御プロジェクト・研究員

研究者番号：50580130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アレルギー疾患において重要な役割を担うマスト細胞は、骨髄中の造血幹細胞に由来し、結合組織や粘膜などの末梢組織において最終分化するが、末梢組織での分化・成熟化のメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、目的遺伝子の遺伝子欠損マウスを作成し、マスト細胞の分化・成熟化における役割を明らかにすることを目的とした。その結果、目的遺伝子欠損マウスでは、マスト細胞前駆数が減少することで、CTMC数が減少することを明らかにした。また、遺伝子欠損マウス由来骨髄細胞をマスト細胞欠損マウスに移植した群では、腹腔内にCTMCが観察されなかったことから、目的遺伝子は、マスト細胞の分化を制御することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、マスト細胞分化の分子機構の一端が解明できれば、将来的にはマスト細胞の分化・成熟化を標的としたこれまでとは異なった作用機序を有する新規アレルギー治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Mast cells are primary effectors not only in allergic disorders, but also in other immune diseases such as chronic inflammatory disorders. Mast cells are generally classified into two phenotypically distinct populations: mucosal-type mast cells (MMCs) and connective tissue-type mast cells (CTMCs). However, the molecular basis determining the different characteristics of the mast cell subclasses still remains unclear. In this study, we generate knock-out (KO) mice and analyze the number of mast cells in the KO mice. Our results showed that the number of mast cell progenitors and CTMCs was decreased in KO mice. In addition, engraftment of WT bone marrow cells in w-sh/w-sh recipients restored the generation of CTMCs to normal levels. In contrast, engraftment of KO bone marrow cells in w-sh/w-sh mice failed to restore mast cell generation. These results showed that differentiation of CTMCs might be regulated by Gfi1.

研究分野：薬学

キーワード：マスト細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喘息、アトピー性皮膚炎、花粉症などのいわゆるアレルギー疾患は、現代の国民病とも言うべき広がりを見せており、アレルギー疾患の病態解明と、有効かつ根源的な治療法の開発は、医学研究の急務といえる。アレルギー疾患の発症および進展に中心的な役割を担っている細胞として、マスト細胞が知られている。マスト細胞は、前駆細胞として骨髄から遊離し、末梢組織中へ浸潤した後、最終的な分化を遂げる。したがって、末梢組織中のマスト細胞はその分化・成熟化の過程において、周辺の微小環境の影響を強く受けると考えられる。しかし、末梢組織中のどのようなシグナルにより、マスト細胞が分化・成熟化しているのかについては明らかになっていない。また、マスト細胞への初期分化には GATA-1 や PU.1 等の転写因子が関与することが知られているが、成熟化の過程で機能する転写因子は MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 等わずかし報告されていない。さらには、Swiss 3T3 線維芽細胞株との共培養系を利用し、未熟マスト細胞である骨髄由来マスト細胞 (BMDC) を *in vitro* で成熟化させても MITF の発現は上昇しないことが知られており、マスト細胞の成熟化には他の転写因子も関与している可能性が高い。

2. 研究の目的

花粉症やアトピー性皮膚炎等の各種アレルギー疾患の発症や増悪化において中心的な役割を担う細胞として「マスト細胞」が知られている。これまでに、マスト細胞は、GATA-1 や GATA-2、PU.1 など、他の細胞系列で相補的な発現様式や拮抗的な役割を示す複数の転写因子が同時に発現していることが知られている。また、マスト細胞には、他の血液細胞系列にはみられない独自の転写因子ネットワークが存在していることが示唆されているが、その詳細は明らかになっていない。そこで、本研究では、マスト細胞がどのような分子機構を介して分化・成熟化するのかについて検討する。特に、ある転写因子に着目し、遺伝子欠損マウスを作出後、マスト細胞への分化・成熟化決定を制御する転写因子ネットワークの解明を試みる。

3. 研究の方法

1) 遺伝子欠損マウスの作出

本研究では遺伝子欠損マウスの作出を行う。エクソン 3 から 5 を LoxP 配列で挟む設計のターゲティングベクターを用いて樹立したマウス ES 細胞をマウス胚盤孔にインジェクションすることで、キメラマウスを得る。得られたマウスを CAG プロモーター下で Cre リコンビナーゼを発現するマウスと交配することで、Gfi1 遺伝子を欠損したマウスの作出を行う。

2) 遺伝子欠損マウスの解析

・遺伝子欠損マウスにおける各種血液細胞 (造血幹細胞、各種血液前駆細胞、マスト細胞等) の数をフローサイトメーターで解析する。

・遺伝子欠損マウスにおける結合組織型マスト細胞の機能を検討するため、IgE 依存的な脱顆粒応答能を血管透過性試験にて評価する。

・野生型あるいは遺伝子欠損マウス由来造血幹細胞やマスト細胞前駆細胞をマスト細胞欠損マウス (C57BL/6^{w-sh/w-sh} マウス) に移植する。

・前述したように、マスト細胞はその存在場所により結合組織型マスト細胞と粘膜型マスト細胞に大別される。そこで、結合組織 (耳、腹腔) あるいは粘膜組織 (小腸) 中のマスト細胞数についてフローサイトメーターを用いて解析する。

・遺伝子欠損マウスにおける粘膜型マスト細胞の機能を検討するため、マスト細胞が発症や増悪化に関与することが知られている DSS 誘導性炎症性腸疾患を誘導し、体重を測定する。

4. 研究成果

まず、上記の方法により、遺伝子欠損マウスを作出した。作出した遺伝子欠損マウスを用いて、各種血液細胞の数をフローサイトメーターで解析した。その結果、遺伝子欠損マウスでは、造血幹細胞数の増加が観察された。本結果は、過去に報告されている本遺伝子欠損マウスの表現型と一致していた。次に、アレルギー性疾患において重要な役割を担うマスト細胞について検討を行

った。マスト細胞は、抹消組織に浸潤して存在しており、存在する組織によって、粘膜型マスト細胞（MMC）と結合組織型マスト細胞（CTMC）の2種のサブクラスに分類される。遺伝子欠損マウスを用いて、MMC及びCTMC数を検討した結果、腸管に存在するMMC数に有為な差は観察されなかった。一方、耳介組織や腹腔内に存在するCTMC数はGfi1遺伝子欠損マウスで有為に減少していた。さらに、マスト細胞と近縁関係にある好塩基球の前駆細胞やマスト細胞前駆細胞の割合などについて検討した。その結果、好塩基球前駆細胞数には有為な差は観察されなかった。一方、マスト細胞前駆細胞数は遺伝子欠損マウスで有為に減少していた。以上の結果から、マスト細胞前駆数が減少することで、耳介組織や腹腔内に存在するCTMC数が減少したことが示唆された。さらに、野生型あるいは遺伝子欠損マウス由来骨髓細胞をマスト細胞欠損マウス（C57BL/6^{w-sh/w-sh}マウス）に移植することで、目的遺伝子がマスト細胞分化に及ぼす影響についてさらに詳細に検討した。その結果、野生型マウスの骨髓細胞を移植した群では、腹腔内にCTMCが存在していたのに対し、遺伝子欠損マウス由来骨髓細胞を移植した群では、腹腔内にCTMCが観察されなかった。また、遺伝子欠損マウスにおける結合組織型マスト細胞の機能を検討するため、IgE依存的な脱顆粒応答能を血管透過性試験にて評価した結果、遺伝子欠損マウスではIgE依存的な脱顆粒応答能が抑制されていた。以上の結果から、目的遺伝子は、マスト細胞の分化を制御することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yamaguchi T., Ikeda Y., Tashiro K., Ohkawa Y., Kawabata K.	4. 巻 50
2. 論文標題 The role of galanin in the differentiation of mucosal mast cells in mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Eur. J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 110-118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/eji.201848061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口朋子、田中智之、西島美妙江、長竹貴広、國澤純、川端健二
2. 発表標題 マスト細胞分化における転写因子Gfi1の役割
3. 学会等名 第68回日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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