

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860221

研究課題名(和文)成熟マスト細胞におけるGATA2の機能解析

研究課題名(英文)The functional analysis of GATA2 in mature mast cells

研究代表者

大森 慎也(Ohmori, Shin'ya)

高崎健康福祉大学・薬学部・助手

研究者番号：10509194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞におけるGATA2の役割を明らかにするために、骨髄由来マスト細胞(BMMCs)を用いてCre-LoxPシステムによりGata2遺伝子を欠失し、性状解析を行った。その結果、GATA2の機能欠失によりマスト細胞の分化形質が失われ、次いで骨髄球のマーカーであるCD11bとLy-6G/Cおよび骨髄球の分化決定に重要なC/EBP $\beta$ の発現上昇を伴い脱分化が引き起こされることを明らかにした。本解析によりGATA2によるCebpaの発現抑制が、マスト細胞分化形質の維持にきわめて重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify roles GATA2 plays in the BMMCs, the DNA binding C-finger domain of GATA2 was genetically disrupted by Cre-LoxP system in BMMCs (G2<sup>CF</sup>-BMMCs). We found that deletion of GATA2 CF results in a loss of mast cell identity of BMMCs, whereas the expression of Mac1- and/or Ly-6G/C-positive cells was significantly increased in G2<sup>CF</sup>-BMMCs. Furthermore, GATA2 ablation led to a significant upregulation of C/EBP $\beta$ , a key player of myeloid cell differentiation, and forced expression of C/EBP $\beta$  in wild-type BMMCs phenocopied the GATA2<sup>CF</sup> cells. Our findings suggest that the repression of Cebpa by GATA2 is essential for maintaining mast cell identity in BMMCs.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 Gata2 Cebpa 細胞分化 マスト細胞 脱分化 分化転換

## 1. 研究開始当初の背景

血球系細胞において、転写因子 GATA1 は、赤血球、巨核球、好酸球、マスト細胞で発現し、GATA2 は造血幹細胞、赤血球前駆細胞、巨核球、好酸球、マスト細胞で発現している。両 GATA 因子は各分化系列においてその分化進行や機能に重要な役割を担っており、特にマスト細胞では分化決定に必要であることが報告されている。

これまでに、血球細胞における GATA1 と GATA2 の関係は赤血球分化過程をモデルにした発現・機能解析で比較的詳しく調べられており、正常な赤血球分化過程には 'GATA switch' と呼ばれる分化進行に伴う GATA2 から GATA1 へ発現の入れ替わりが必須である事が赤血球系細胞株やマウス個体を用いた解析で示されている。この 'GATA switch' は細胞分化過程における転写因子ネットワークを理解する上で有用なモデルとなっており、非血球系の栄養芽細胞の分化過程においても GATA2 と GATA3 間で類似の機序が報告されている。しかしながら、マスト細胞の分化過程における両 GATA 因子の発現制御機構は不明であった。

そこで研究代表者らは、マウスの全骨髄細胞を IL-3 と SCF を用いて1ヶ月間培養し得られるマスト細胞 (BMMCs) の成熟過程における、両因子の発現様式の解析を行った。その結果、マスト細胞では両 GATA 因子の発現は互いに非依存的であること、マスト細胞では赤血球よりも GATA1 の発現量が低く、一部のエンハンサーがクロマチン修飾レベルで不活性化されていること、GATA2 の発現は、骨髄細胞がマスト細胞に成熟する過程で増加し、分化決定後も高い発現量を維持していることを見いだした (Ohmori et al, 2012)。これらの結果は、GATA1 と GATA2 の遺伝子発現制御の分子機序は、マスト細胞と赤血球とで異なっていることを示すものである。

これまでに GATA1 は、マスト細胞特異的な遺伝子発現を制御することが報告されていたが、前述した①~③の知見から研究代表者らは *Gata1* コンディショナルノックアウトマウスから樹立した BMMCs を用いて GATA1 の全翻訳領域を欠失させ、分化したマスト細胞における GATA1 の必要性を知るために解析を実施した。その結果、BMMCs で GATA1 を欠失させても形態や細胞表面マーカーの発現、細胞増殖能などに顕著な変化は認められなかった (Ohneda et al, 2013)。このことから、これまで主に GATA1 に制御されていると報告されていた MCPPA、c-Kit、FcεR1α などのマスト細胞特異的な遺伝子は、実際には GATA2 によって制御されているのではないかと推察した。そこで研究代表者らは先行研究として *Gata2* コンディショナルノックアウトマウス (G2CKO マウス) から樹立した BMMCs で薬剤誘導的に GATA2 の機能を欠失させ、性状解析

を行った。その結果、マスト細胞マーカーである c-Kit と FcεR1α の発現は大きく減少し、細胞内顆粒が失われ骨髄球様の形態を呈していた。さらに驚いたことに、骨髄球マーカーである CD11c と Ly6G/C、および G-/M-/GM-CSFR、IL-5R、IL-6R の発現上昇が認められた。この結果から GATA2 欠失により BMMCs が脱分化したと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では先行研究結果に続き、より詳細な解析を行うことで、分化決定後のマスト細胞における GATA2 の役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 1) GATA2ΔCF-BMMCs の性状解析

G2CKO マウスの骨髄から BMMCs を樹立し、4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) により Cre-LoxP システムで *Gata2* を欠失させる (GATA2ΔCF-BMMCs)。具体的には以下の解析を実施する。細胞表面マーカーの発現変化をフローサイトメトリー (FCM) で解析する。また、サイトスピン標本の作製と顆粒染色により形態的解析を行う。サイトカイン添加により GATA2ΔCF-BMMCs が好中球やマクロファージ、好酸球等への分化能を有しているかどうかを検討する。他細胞系列に分化した場合、それらの細胞が機能的であるかどうか検討する。トランスクリプトーム解析 (RNA-Seq) により GATA2 機能欠失に伴う遺伝子発現変化を網羅的に調べる。

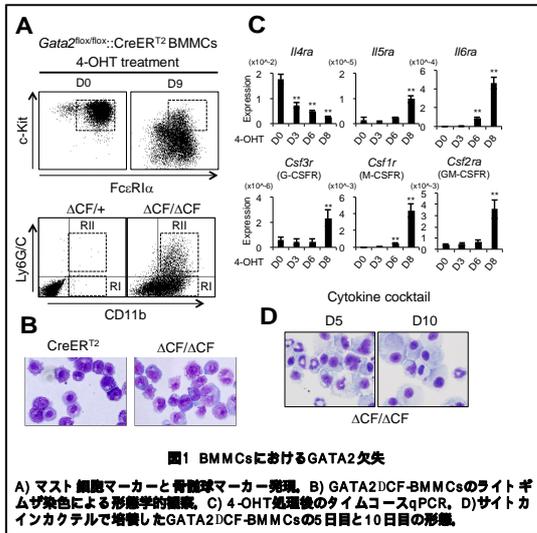
2) 野生型 BMMCs に対する *Cebpa* の過剰発現と *Gata2*・*Cebpa* の二重欠失 BMMCs を作製し解析することにより、細胞系列転換に *Cebpa* の発現上昇が必要か否か検討する。さらに、GATA2 が直接 *Cebpa* 遺伝子を直接抑制しているのか否かについて、クロマチン免疫沈降法を中心に解析を行う。

## 4. 研究成果

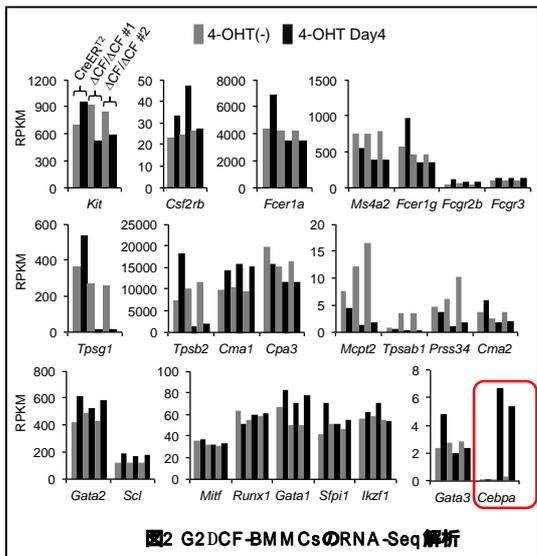
### 1) GATA2 CF-BMMCs の性状解析

GATA2ΔCF-BMMCs を FCM によって解析した結果、c-Kit と FcεR1α の発現が減少すると同時に CD11b と Ly6G/C の発現上昇が認められた (図 1A)。形態学的観察を行った結果、マスト細胞に特徴的な顆粒が失われ、核が大きく骨髄球様の形態を呈していた (図 1B)。

さらに、GATA2ΔCF-BMMCs は、顆粒球に発現する G-/GM-/M-CSFR や IL-5R の発現が上昇し (図 1C)、サイトカインカクテルによって機能的な好中球様またはマクロファージ様の細胞に形質転換した (図 1D)。以上の結果は、BMMCs で GATA2 の機能を欠失させることにより脱分化が引き起こされること示している。



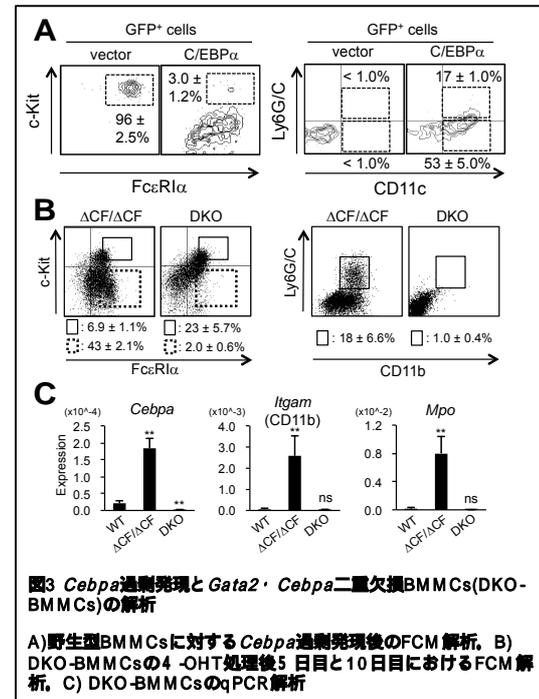
BMDCsにおけるGATA2欠失の影響をRNAレベルで網羅的に調べる為 G2ΔCF-BMDCsでRNA-Seq解析を行った。その結果、マスト細胞関連遺伝子の発現が広範に減少し、さらに骨髄球において分化決定に重要であることが知られている *Cebpa* の発現が脱抑制されていた (図2)。



## 2) *Cebpa* の脱抑制による BMDCs の脱分化。

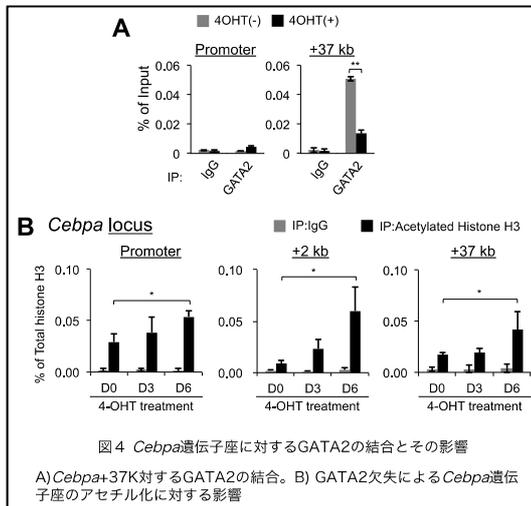
これまでに、*Cebpa* の過剰発現によって B 細胞や赤血球前駆細胞がマクロファージに分化転換することが報告されているため、野生型 BMDCs に対しレトロウイルスによって *Cebpa* の過剰発現を行った。その結果、G2ΔCF-BMDCs と同様に c-Kit と FcεRIα の発現が減少し、CD11b と Ly6G/C の発現上昇が認められた (図3A)。さらに *Gata2*・*Cebpa* 二重欠失 BMDCs(DKO) を作製し、細胞系列転換に *Cebpa* の発現上昇が必要か否か検討した。その結果、DKO では CD11b や Ly6G/C の発現上昇は認められず、骨髄球マーカーである Myeloperoxidase の発現上昇も起こらなかった (図3B,C)。以上のことから GATA2 が *Cebpa*

を発現抑制することがマスト細胞の分化形質を維持するために必要であることが示唆された。



過去の報告で *Cebpa* 遺伝子座には 32Dc13 細胞 (骨髄球系細胞株) におけるエンハンサー領域として、'+37K 領域' が同定されている。この領域には RUNX1 と PU1 が結合する事が報告されていたが GATA 因子の結合については明らかとなっていなかった。研究代表者らが配列を調べた結果、RUNX1 と PU.1 の結合配列の間に挟まれるように GATA 結合配列 (TTATC) を見出した。GATA2 が直接 *Cebpa* 遺伝子を抑制しているのか否かについて調べる為に、クロマチン免疫沈降法を行った結果、この領域に GATA2 が結合すること (図4A)、また GATA2 欠失により広く *Cebpa* 遺伝子座がアセチル化されることを見出した (図4B)。この結果は BMDCs において GATA2 はクロマチン修飾レベルで直接 *Cebpa* を抑制していることを示唆している。

本研究課題により GATA2 が *Cebpa* を発現抑



制することがマスト細胞の分化形質を維持するために必要であることが示唆された。

#### 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 5 件)

1. Ohmori S, Moriguchi T, Noguchi Y, Ikeda M, Kobayashi K, Tomaru N, Ishijima Y, Ohneda O, Yamamoto M, Ohneda K. GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow. *Blood*. 2015,125(21):3306-3315 査読有り

2. Ohneda K, Moriguchi T, Ohmori S, Ishijima Y, Satoh H, Philipsen S, Yamamoto M. Transcription factor GATA1 is dispensable for mast cell differentiation in adult mice. *Mol Cell Biol*. 2014, 34(10):1812-1826. 査読有り

3. Ishijima Y, Ohmori S, Ohneda K. Mast cell deficiency results in the accumulation of preadipocytes in adipose tissue in both obese and non-obese mice. *FEBS Open Bio*. 2013, 28(4):18-24. 査読有り

4. Suzuki M, Kobayashi-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. *Genes Cells*. 2013, 18(11):921-933. 査読有り

5. Mukai HY, Suzuki M, Nagano M, Ohmori S, Otsuki A, Tsuchida K, Moriguchi T, Ohneda K, Shimizu R, Ohneda O, Yamamoto M. Establishment of erythroleukemic GAK14 cells and characterization of GATA1 N-terminal domain. *Genes Cells*. 2013, 18(10):886-898. 査読有り

[学会発表](計 9 件)

1. 大森慎也、登丸菜月、石嶋康史、森口尚、山本雅之、大根田絹子： GATA2 が Cebpa の転写を抑制することが骨髄マスト細胞の分化形質維持に必要な。第 37 回日本分子生物学会年会，3P-0588，パシフィコ横浜，11/25-27，2014。

2. 石嶋康史、大森慎也、池田翔汰、高木美紀、前川悠理、大根田絹子： 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化における GATA 因子の機能解析。第 37 回日本分子生物学会年会，3P-0581，パシフィコ横浜，11/25-27，2014。

3. 小林浩太、大森慎也、石嶋康史、森口尚、

山本雅之、大根田絹子： マスト細胞における GATA2 による Cebpa 遺伝子の発現抑制機構の解析，平成 26 年度日本生化学会関東支部例会，P-18，水戸，6/14，2014。

4. 野口由紀、大森慎也、石嶋康史、森口尚、山本雅之、大根田絹子： GATA2 欠失マスト細胞の分化転換能の解析，平成 26 年度日本生化学会関東支部例会，P-22，水戸，6/14，2014。

5. 高木美紀、石嶋康史、大森慎也、池田翔汰、前川悠理、大根田絹子：脂肪細胞分化における GATA 転写因子の機能解析。平成 26 年度日本生化学会関東支部例会，P-24，水戸，6/14，2014。

6. 大森慎也： GATA2 による Cebpa 遺伝子の発現抑制が骨髄マスト細胞の分化形質の維持に必須である，新学術領域「細胞運命制御」若手の会，浜松，4/18-19，2014。

7. 大森慎也、石嶋康史、野口由紀、森口尚、山本雅之、大根田絹子： GATA2 による cebpa 遺伝子の発現抑制が骨髄マスト細胞の分化形質の維持に必須である，第 36 回日本分子生物学会年会，1P-0619，神戸，12/3-6，2013。

8. 大森慎也、石嶋康史、森口尚、山本雅之、大根田絹子： GATA2 はマスト細胞の分化形質の維持に必須である，第 86 回日本生化学会大会，1T14a-08 及び 1P-304，パシフィコ横浜，9/11-13，2013。

9. 石嶋康史、大森慎也、大根田絹子： マスト細胞欠損マウスにおける脂肪前駆細胞マーカー遺伝子の発現解析。第 86 回日本生化学会大会，3ST6-020 及び 3P-0560，パシフィコ横浜，9/11-13，2013。

[その他]

[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・助手

研究者番号：10509194