

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590359

研究課題名(和文) GATA因子による成熟マスト細胞の機能制御機構の解明

研究課題名(英文) Roles of GATA transcription factors in the development and function of mast cells

研究代表者

大根田 絹子 (Ohneda, Kinuko)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号：50323291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：マスト細胞の分化と機能におけるGATA因子の役割を解明するために、成体マウスでGata1を誘導的に欠失させた。その結果、骨髄由来マスト細胞(BMMC)は正常に分化し、末梢組織マスト細胞もほぼ正常であった。BMMCのマイクロアレイ解析では、トリプターゼ遺伝子群の発現が減少していたが、多くのマスト細胞関連遺伝子の発現はGATA1発現低下の影響を受けなかった。一方、BMMCでGATA2を誘導的に機能欠失すると、フローサイトメトリーでマスト細胞の分画が著明に減少した。これらの結果は、マスト細胞分化形質の維持にはGATA2がより重要であり、GATA1の欠失はGATA2によって代償されたことを示している。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrates that targeted deletion of Gata1 has a minimal effect on the number and distribution of peripheral tissue mast cells in adult mice. Bone marrow derived mast cells (BMMCs) prepared from Gata1-null mice differentiated normally without affecting their degranulation activity. Microarray analyses showed that GATA1 knockdown BMMCs have a small impact on the mast cell-specific gene expression in most cases. However, the expression levels of mast cell tryptases in the mouse chromosome 17A3.3 were uniformly reduced in the GATA1 knockdown cells. In contrast to the observations in the Gata1-null BMMCs, GATA2 deficiency in BMMCs resulted in a significant loss of the mast cell fraction and a reduced expression of several mast cell-specific genes. Collectively, GATA2 plays a more important role than GATA1 in the regulation of most mast cell-specific genes, while GATA1 might play specific roles in mast cell functions.

研究分野：分子生物学

キーワード：転写因子 細胞分化 マスト細胞

1. 研究開始当初の背景

マスト細胞は造血幹細胞を起源とし、末梢組織で分化成熟する。造血組織を離れたマスト細胞は、皮膚、腹腔、消化管粘膜などに生着し、末梢組織の微小環境の影響を受けて異なる遺伝子群を発現し、局所での免疫応答に必要な機能を獲得する。個体の免疫応答におけるマスト細胞の役割を包括的に理解するためには、その成熟過程における遺伝子発現プログラミングの分子機序を解明する必要がある。

マスト細胞には4つの造血系転写因子(GATA1、GATA2、Scl、PU.1)が発現している。これらの因子はマスト細胞以外の異なる細胞系列、分化段階で発現しており、ときに拮抗的に作用することが知られている。特に、GATA1とPU.1は、造血発生において骨髄球系の共通前駆細胞であるCMPから顆粒球系前駆細胞GMPと赤血球・巨核球の前駆細胞MEPとに分かれる過程で、お互いの発現を抑制し、標的遺伝子に対しても拮抗的に作用することが知られている。赤血球系列においては、GATA1とGATA2が分化段階特異的に発現制御され、未分化な段階で機能するGATA2は遅れて発現するGATA1の機能を代償できない。マスト細胞にはこれらの因子が同時に発現していることから、他の細胞系列でこれまでに報告されていたものとは異なる転写因子相互の発現制御や役割分担が存在していることを示唆している。

本研究は、平成21-23年度に行った基盤研究C「成熟マスト細胞におけるGATA1の機能解析」(課題番号21590318)の研究成果を基にして行った。この研究において、研究代表者らは、GATA1とGATA2の発現様式が赤血球とマスト細胞とでは異なっており、相互の遺伝子発現を制御する機構がみられないこと、マウス骨髄由来のマスト細胞(BMMC)でGATA1を完全に欠失させても、際立った表現型の変化は観察されないことを見出した(論文リスト#11)。しかしながら、この時点ではマウス個体の末梢組織マスト細胞でのGATA1の機能欠失解析が十分に行われておらず、マスト細胞分化におけるGATA1とGATA2の役割の相違についても、分子レベルでの解析が十分に行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、造血系転写因子によるマスト細胞分化の遺伝子発現調節機構を解明することを目的として行った。本研究では特にGATA1とGATA2に注目し、マスト細胞分化における両者の機能分担を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 誘導的GATA1欠失マウスにおける組織マスト細胞の解析

背景の項で述べたように、以前の研究では、誘導的GATA1欠失マウスの骨髄から作成した

BMMCに4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)を加えて細胞レベルでGATA1の発現を完全に欠失させた。その結果、サイトスピンによる細胞形態、フローサイトメトリー(FACS)でのマスト細胞マーカーであるc-KitとFcεR1αの発現は野生型と変わらなかった。本研究では、条件付きGATA1ノックアウトマウスにタモキシフェンを投与して、マウス個体でGATA1を欠失させ、骨髄からBMMCを作成して解析した。また、皮下や消化管に存在する末梢組織マスト細胞の数や分布に変化がみられるかどうか、観察した。

(2) マイクロアレイによるBMMCにおけるGATA1標的遺伝子の探索

siRNAでGATA1をノックダウンしたBMMCとcontrol siRNAを導入したBMMCからRNAを採取し、マイクロアレイによる網羅的RT-PCR解析を行った。

(3) マスト細胞関連遺伝子の制御におけるGATA1とGATA2の役割

siRNAでGATA1とGATA2のいずれか、または両方をノックダウンしたBMMCを用いて、マスト細胞関連遺伝子の定量的RT-PCR解析を行った。また、野生型BMMCを用いて、マスト細胞関連遺伝子へのGATA1とGATA2の結合を、クロマチン免疫沈降法(ChIP assay)により解析した。

4. 研究成果

(1) 誘導的GATA1欠失マウスにおける組織マスト細胞の解析

条件付きGATA1ノックアウトマウスにタモキシフェン(Tx)を投与すると、赤血球造血障害のためマウスは進行性の貧血を呈した。ヘマトクリットと体重でモニターしながら経過観察し、Tx投与28日後のマウス骨髄からBMMCを作成し、耳の皮下、胃、腹腔の末梢組織マスト細胞を組織染色(トルイジンブルー・アルシアンブルー/サフラニン染色)にて観察した。その結果、GATA1欠失マウスの骨髄からは、BMMCが大きな異常なく分化し(図C左)、抗原刺激による脱顆粒反応も野生型と同様であった。皮下・消化管・腹腔に存在する末梢組織マスト細胞の数および分布も、野生型マウスと同様であった。一方、GATA1欠失マウスの骨髄細胞をメチルセルロース・コロニーアッセイで解析すると、野生型細胞にはみられない低密度で増殖能の高いコロニーが観察され、この細胞はFACSでc-KitとFcεR1αが陽性であった(CFU-Mastと命名)。GATA1欠失状態におけるこのような異常コロニーの形成は、方法は若干異なるが、以前に報告されている結果とよく一致していた(Metcalf *et al.*, PNAS., 2007)。

(2) マイクロアレイによるBMMCにおけるGATA1標的遺伝子の探索

GATA1ノックダウンBMMCのマイクロアレイ解析では、GEO解析で、炎症関連遺伝子群の発現低下が認められた。大部分のマスト細胞関

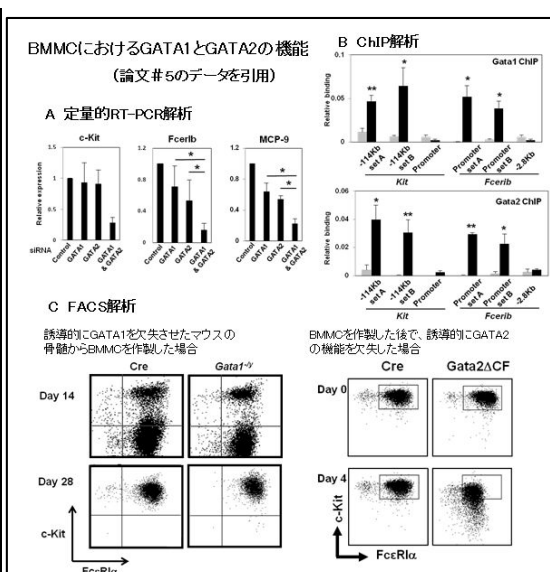
連遺伝子の発現は変化していなかったが、17番染色体に存在するトリプターゼ遺伝子群の発現は有意に低下していた。この遺伝子座には、7か所に保存されたGATA結合配列が存在する約500bpの領域(RegionAと命名)が存在し、この領域にGATA1が結合していることがChIP assayで確認された。

(3) マスト細胞関連遺伝子の制御におけるGATA1とGATA2の役割

siRNAを用いたノックダウンBMMCにおいて、Q-PCRを行ったところ、GATA1とGATA2の両方を同時にノックダウンしたときに、どちらか一方をノックダウンしたときよりも顕著なマスト細胞特異的遺伝子発現の低下が観察された(図A)。野生型BMMCを用いたChIP解析では、マスト細胞関連遺伝子である*Kit*と*Ms4a2*遺伝子の制御領域に、GATA1とGATA2がともに結合していた(図B)。これらの結果から、BMMCのマスト細胞関連遺伝子発現において、GATA1とGATA2が共に機能していることが示唆された。そこで、GATA2の機能的貢献を評価するために、GATA2のDNA結合ドメイン(CF)を誘導的に欠失するマウス(GATA2^{del taCF})の骨髄から作製したBMMCにおいて、4-OHT処理してGATA2の機能を消失させた。その結果、FACSでc-kitの顕著な発現低下が観察され(図C右)、Q-PCRで複数のマスト細胞関連遺伝子の発現が低下した。

(4) まとめと考察

これらの結果は、BMMCにおいてGATA1とGATA2はともにマスト細胞特異的遺伝子の一部を正に制御しており、機能的相補性を有しているが、GATA2がより主要な役割を担っていることを示唆している。このことから、GATA1の欠失はGATA2によって代償されたと考えられる。研究代表者は、以前、BMMC形成過程では、GATA2の発現が顕著に増加するのに対して、GATA1の発現は赤血球と比較して低いレベルでほとんど変化しないことを見出している(論文#11)。このことから、マスト細胞特異的な遺伝子の発現制御に関して、GATA1の機能的貢献がGATA2よりも小さいのは、主にGATA1とGATA2の発現量の相違によるものと考えられる。しかしながら、17番染色体に存在するトリプターゼ遺伝子群の発現に関しては、GATA1の貢献が明らかであり、複数のトリプターゼ遺伝子が同程度に低下していた。この結果は、今回見出したRegionA領域がグロビン遺伝子のLCRのような機能を有し、複数の遺伝子を統括的に制御している可能性を示唆している。マスト細胞トリプターゼは、炎症性腸疾患などにおいて、サイトカインを部分分解し、炎症の強さを制御しているという報告がある。マイクロアレイ解析でも複数の炎症関連遺伝子が変化していたことから、GATA1は炎症時などの病態下で特殊な機能を有している可能性が示唆された。



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 12件)

- 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, 3306-15. doi: 10.1182/blood-2014-11-612465. 査読有り
- Moriguchi T, Yu L, Takai J, Hayashi M, Satoh H, Suzuki M, Ohneda K, Yamamoto M. the human GATA1 gene retains a 5' insulator that maintains chromosomal architecture and GATA1 expression levels in splenic erythroblasts. *Mol Cell Biol*, 2015, 35, 805-15. doi:10.1128/MCB.00011-15. 査読有り
- Kobayashi S, Yamashita T*, Ohneda K*, Nagano M, Kimura K, Nakai H, Poellinger L, Ohneda O. Hypoxia-inducible factor-3 α promotes angiogenic activity of pulmonary endothelial cells by repressing the expression of the VE-cadherin gene. *Genes Cells*, 2015, 20, 224-41 (*; equally contributed). doi: 10.1111/gtc.12215. 査読有り
- Moriguchi T, Suzuki M, Yu L, Takai J, Ohneda K, Yamamoto M. Progenitor Stage-Specific Activity of a cis-Acting Double GATA Motif for Gata1 Gene Expression. *Mol Cell Biol*, 2015, 35, 805-15. doi: 10.1128/MCB.01011-14. 査読有り
- 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, 1812-1826. doi: 10.1128/MCB.01524-13. 査読有り
- 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.*, 2014, 4, 18-24. doi: 10.1016/j.fob.2013.11.004. 査読有り

7. Takai J, Moriguchi T, Suzuki M, Yu L, Ohneda K, Yamamoto M. The *Gata1* 5' region harbors distinct cis-regulatory modules that direct gene activation in erythroid cells and gene inactivation in HSCs. *Blood*, 2013, 122, 3450-60. doi: 10.1182/blood-2013-01-476911. 査読有り

8. 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, 921-933. doi: 10.1111/gtc.12086. 査読有り

9. 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, 886-898. doi: 10.1111/gtc.12084. 査読有り

10. Mori T, Okamoto K, Tanaka Y, Teye K, Umata T, Ohneda K, Tokuyama K, Okabe M, Tsuneoka M. Ablation of Mina53 in mice reduces allergic response in the airways. *Cell Struct Funct*. 2013, 38, 155-67. https://www.jstage.jst.go.jp/browse/csf/38/0/_contents 査読有り

11. Ohmori S, Takai J, Ishijima Y, Suzuki M, Moriguchi T, Philipsen S, Yamamoto M, Ohneda K. Regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages, *Mol Cell Biol.*, 2012, 32, 4742-55. doi: 10.1128/MCB.00718-12. 査読有り

12. Ishijima Y, Ohmori S, Uenishi A, Ohneda K: GATA transcription factors are involved in IgE-dependent mast cell degranulation by enhancing the expression of phospholipase C- γ 1, *Genes Cells.*, 2012, 17, 285-301. doi: 10.1111/j.1365-2443.2012.01588.x. 査読有り

〔学会発表〕(計 15 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である. 第 37 回日本分子生物学会年会, 3P-0588, パシフィコ横浜(横浜), 11/25-27, 2014.

2. 石嶋康史, 大森慎也, 池田翔, 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(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, 茨城大学(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, 茨城大学(水戸), 6/14, 2014.

5. 高木美紀, 石嶋康史, 大森慎也, 池田翔, 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, 茨城大学(水戸), 6/14, 2014.

6. 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, 神戸国際展示場(神戸), 12/3-6, 2013.

7. 森哲哉, 岡本健吾, 田中祐司, Teye Kwesi, 馬田敏幸, 大根田絹子, 徳山研一, 岡部勝, 常岡誠. Mina53 ノックアウトは気道でのアレルギー応答を減弱する. 第 36 回日本分子生物学会年会, 3P-0750, 神戸国際展示場(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, 1P-304, パシフィコ横浜(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. 日本薬学会第 133 年会, 30pmC-375, パシフィコ横浜(横浜), 3/27-30, 2013.

10. Moriguchi T, Takai J, Suzuki M, Ohneda K, Yamamoto M. The upstream double GATA-binding site of Gata1 gene is essential for GATA1 expression in hematopoietic progenitors. 第 35 回日本分子生物学会年会, 3ST6-020, 3P-0560, 福岡国際会議場(福岡), 12/11-14, 2012.

11. Takai J, Moriguchi T, Suzuki M, Lei Y, Ohneda K, Yamamoto M. Gata1 GdC region harbors two-way regulatory modules that direct erythroid-specific gene activation and gene inactivation in hematopoietic stem cells. 第 35 回日本分子生物学会年会, 3ST6-019, 3P-0543, 福岡国際会議場(福岡),

12/11-14, 2012.

12. Ohneda K, Ohmori S, Ishijima Y, Moriguchi T, Yamamoto M. GATA2 is essential for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2ST6-028, 2P-0524, 福岡国際会議場 (福岡), 12/11-14, 2012.

13. Ohmori S, Ishijima Y, Moriguchi T, Yamamoto M, Ohneda K. GATA1 is dispensable for maturation of mast cells derived from mouse bone marrow. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2ST6-027, 2P-0523, 福岡国際会議場 (福岡), 12/11-14, 2012.

14. 戸野倉知佳, 石嶋康史, 大森慎也, 大根田絹子. doubleGATA マウスにおけるマスト細胞の性状解析. 平成 24 年度日本生化学会関東支部例会, P-34, 群馬大学 (前橋), 6/23, 2012.

15. 中島可絵, 大森慎也, 石嶋康史, 大根田絹子. 骨髄マスト細胞 (BMDCs) の増殖と生存に GATA1 は必須ではない. 平成 24 年度日本生化学会関東支部例会, P-33, 群馬大学 (前橋), 6/23, 2012.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.takasaki-u.ac.jp/dept/yaku/labo/details.php?L=1460>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大根田 絹子 (OHNEDA KINUKO)

高崎健康福祉大学・薬学部・教授

研究者番号: 50323291

(2) 研究分担者

石嶋 康史 (ISHIJIMA YASUSHI)

高崎健康福祉大学・薬学部・講師

研究者番号: 10433640

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