

氏名	大森 慎也			
学位の種類	博士 (医学)			
学位記番号	博乙第 2776 号			
学位授与年月	平成 28 年 2 月 29 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
審査研究科	人間総合科学研究科			
学位論文題目	GATA2 is critical for the maintenance of cellular identity in differentiated mast cells derived from mouse bone marrow (マウス骨髄由来マスト細胞における GATA2 の機能解析)			
主査	筑波大学教授	医学博士	高橋 智	
副査	筑波大学教授	博士 (医学)	中村 幸夫	
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	小原 直	
副査	筑波大学講師	博士 (理学)	小林麻己人	

論文の内容の要旨

(目的)

転写因子 GATA2 は、マスト細胞を含む各血球系列の前駆細胞で発現し、造血幹細胞からマスト細胞への分化決定に必要であることが知られている。しかしながら、分化決定後のマスト細胞における GATA2 の詳細な役割は明らかにされていなかった。そこで本論文では、Cre/LoxP システムによって 4-Hydroxytamoxifen(4-OHT)誘導的に GATA2 の DNA 結合ドメイン (C-Finger:CF) を欠失するマウス (*Gata2*^{flox} マウス) から BMMCs を調整し、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て解析を行った。

(対象と方法)

Gata2^{flox} マウスを交配により作成し、BMMCs を調整した。c-Kit⁺ FcεRIα⁺ 両陽性となることで定義されるマスト細胞の割合をフローサイトメトリー (FACS) で確認した。4-OHT を培養液中に添加し、*In vitro* で GATA2 の機能を欠失させ、FACS、顕微鏡による形態学的観察、定量的 RT-PCR (Q-PCR)、ウエスタンブロット、クロマチン免疫沈降 (ChIP assay)、トランスクリプトーム解析を駆使し解析を行った。

(結果)

Gata2^{flox} マウスから作成した BMMCs に 4-OHT を添加し FACS 解析を行った結果、時間依存性に c-Kit の発現が大きく減少し、FcεRIα の発現が減少している細胞が出現した。同時に c-Kit⁻CD11b⁺

Ly6G/C(+)を示す細胞の割合が増加しており、形態を観察したところ、細胞内顆粒が失われ骨髄球様の形態を呈していた。これらの結果から BMMCs で GATA2 の機能を欠失させると、細胞はマスト細胞としての形質を失い、未熟な状態に変化する、すなわち「脱分化する」と考えられた（以後この細胞を G2ΔCF-BMMCs とした）。次に G2ΔCF-BMMCs を用いて Q-PCR を行った結果、顆粒球の分化で重要な転写因子 *Cebpa* の発現が大きく上昇した。また骨髄球から単球・マクロファージへの分化で重要な転写因子 *Sfp1*(PU.1)や、骨髄球マーカーである *Itgam*、*Mpo*、複数の増殖因子受容体(G/M-/GM-CSFR、IL-5R、IL-6R) mRNA の発現が増加した。さらに、この細胞を骨髄球系のサイトカインカクテル存在下で培養したところ、食食能を有する機能的な好中球やマクロファージに分化転換した。次に 4-OHT 処理後 4 日目の G2ΔCF-BMMCs を用いてトランスクリプトーム解析 (RNA-Sequence) を行ったところ、マスト細胞関連遺伝子の発現が広範に低下していた。一方、野生型 BMMCs に対して *Cebpa* の過剰発現を行ったところ、G2ΔCF-BMMCs の表現型がほぼ再現された。次に GATA2 が *Cebpa* の転写を直接抑制しているのかどうかを解析した。その結果、BMMCs において GATA2 が直接 *Cebpa* を転写レベルで抑制している可能性が示唆された。最後に、より分化が進行していると考えられている腹腔マスト細胞 (PMCs) を *Gata2* flox マウスから調整し、培養系で GATA2 を欠失させ解析を行った。その結果、BMMCs での結果とは異なり、PMCs で GATA2 を欠失させても *Cebpa* の発現上昇は認められず、脱分化も起きなかった。

(考察)

細胞分化は、幹細胞の運命が多段階的に制限されていくことによって進行し、いったん細胞系列が決定した後は不可逆的に進むと考えられている。本論文により、BMMCs で GATA2 の機能を欠失させるとマスト細胞の形質を失って脱分化し、サイトカインカクテルの添加よりマクロファージや好中球に分化転換できることを明らかにした。G2ΔCF-BMMCs の発現解析に加え、*Cebpa* の過剰発現実験によって、マスト細胞の分化過程において GATA2 と C/EBPα が拮抗的に働いている可能性を見いだした。これまでに、MITF、IKAROS、HES1 が好塩基球・マスト細胞前駆細胞 (pre-BMP) において、それぞれ異なる機序で *Cebpa* の転写を抑制していることが報告されているが、本解析結果を併せて考えると、*Cebpa* はマスト細胞の分化過程において、複数の因子によって様々な機序により抑制されていることが示唆された。

審査の結果の要旨

(批評)

本論文では、GATA2 にはマスト細胞特異的な遺伝子を正に制御する役割と、C/EBPα の発現を転写レベルで抑制し、マスト細胞の分化形質を維持する 2 つの役割があることを明らかにした。この結果は造血細胞の新たな分化制御機構を明らかにしたものとして、高く評価できる。

平成 28 年 1 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、学力の確認を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。