

筑波大学

博士（医学）学位論文

**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)

2015

筑波大学

大森 慎也

目次

要旨

略語一覧

第一章 序論	P. 1
1-1 マスト細胞について	P. 1
1-2 マスト細胞の起源・分化経路・サブタイプ	P. 3
1-3 GATA 転写因子とマスト細胞の分化について	P. 7
1-4 目的	P. 12
第二章 材料と方法	P. 13
第三章 結果	P. 22
3-1 BMMCs で GATA2 を欠失するとマスト細胞の分化形質が 失われる	P. 22
3-2 GATA2 を欠失した BMMCs は、未熟な骨髓球様の形質を 呈する	P. 23
3-3 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、好中球やマクロファージに類似 した細胞に分化するが、好酸球には分化しない	P. 25
3-4 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、マスト細胞関連遺伝子の発現が 減少し、骨髓球系遺伝子の発現が上昇する	P. 27
3-5 <i>Cebpa</i> の発現上昇は、GATA2 欠失 BMMCs の脱分化に 必須である	P. 29
3-6 GATA2 は、 <i>Cebpa</i> 遺伝子座の+37 k エンハンサー領域に 結合する	P. 31
3-7 Δ CF/ Δ CF-PMCs では、 <i>Cebpa</i> の発現上昇が起こらない	P. 32

第四章 考察	P. 33
4-1 Δ CF/ Δ CF-BMMCs のリプログラミング	P. 33
4-2 マスト細胞分化過程における <i>Gata2</i> と <i>Cebpa</i> の互いの発現制御	P. 34
第五章 結論	P. 37
参考文献	P. 38
図	P. 47
表	P. 64
謝辞	P. 67

要旨

転写因子 GATA2 はマスト細胞の分化決定に必須であることが知られている。本研究で私は、GATA2 が分化決定後のマスト細胞においても、その分化形質の維持に必須であることを明らかにした。骨髓由来マスト細胞 (BMMCs) で GATA2 の DNA 結合領域を欠失させ (Δ CF/ Δ CF-BMMCs) 性状解析を行った結果、BMMCs はマスト細胞の形質を失い、骨髓球系の細胞表面マーカーである CD11b と Ly6G/C を発現する細胞の割合が増加した。 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は骨髓球系サイトカイン存在下で培養するとマクロファージ様または好中球様の細胞に変化したが、好酸球には変化しなかった。また好塩基球に関しては、Q-PCR により好塩基球特異的な複数の遺伝子発現の増加が認められたが、フローサイトメトリー解析では好塩基球マーカーである CD49b の発現は認められなかった。

次に Δ CF/ Δ CF-BMMCs でトランスクリプトーム解析を行った結果、骨髓球に発現する転写因子である C/EBP α の発現量が増加していた。野生型マウスの BMMCs に対し C/EBP α の過剰発現を行った結果、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs の表現型がほぼ再現された。興味深いことに GATA2 と C/EBP α を共に欠失させると、マスト細胞で高発現している c-Kit mRNA の発現量は減少したが、CD11b と Ly6G/C の発現上昇は認められなかった。次に GATA2 が直接 *Cebpa* 遺伝子の転写を抑制しているのか否か調べるために、クロマチン免疫沈降法を行った。その結果、GATA2 は *Cebpa* +37K 領域に直接結合し、RUNX1 と PU.1 の同領域に対する結合を阻害した。最後に、培養した腹腔マスト細胞を用いて同様の

方法で **GATA2** の機能欠失解析を行った。その結果、**GATA2** 欠失に伴う *Cebpa* の発現上昇は認められなかったが、**c-Kit** と他のマスト細胞関連遺伝子の発現減少が認められた。以上の結果から、**GATA2** はマスト細胞関連遺伝子の正の制御因子であり、**GATA2** による *Cebpa* の転写抑制が **BMMC**s の分化形質維持に重要であることが示唆された。

略語一覽

2-ME	2-mercaptoethanol
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
7-AAD	7-amino-actinomycin D
AML-1	acute myeloid leukemia 1
BMCPs	basophil-mast cell progenitors
BMMCs	bone marrow-derived mast cells
BPB	bromophenol blue
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine
c-Kit	kit oncogene
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha
CAGE	cap analysis of gene expression
<i>Cebpb</i>	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
ChIP assay	chromatin immunoprecipitation assay
<i>Cma1</i>	chymase 1
CTMC	connective tissue type mast cells
DKO	GATA2·C/EBP α double conditional knockout
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DP 細胞	c-Kit(+)Fc ϵ RI α (+) cells
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
<i>Epx</i>	eosinophil peroxidase
Fc ϵ RI	Fc epsilon receptor I
FCM	flow cytometry
FDR	false discovery rate
FITC	fluorescein isothiocyanate
Flt3L	fms-related tyrosine kinase 3 ligand
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
G1CKO	<i>Gata1</i> conditional knockout
G2CKO	<i>Gata2</i> conditional knockout
GATA1	GATA binding protein 1
GATA2	GATA binding protein 2

GM-CSF	granulocyte/macrophage colony-stimulating factor
GMPs	granulocyte-macrophage progenitors
GO	gene ontology
H1R	histamine H1 receptor
HEPES	2[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
IgE	immunoglobulin E
<i>Ikzf1</i>	IKAROS family zinc finger 1
IL-	interleukin-
<i>Il5ra</i>	interleukin 5 receptor, alpha
<i>Il4ra</i>	interleukin 4 receptor, alpha
IRES	internal ribosomal entry site
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MC _C	tryptase-negative, chymase-positive mast cells
MC _{CT}	tryptase-positive, chymase-positive mast cells
MCP	mast cell progenitor
MC _T	tryptase-positive, chymase-negative mast cells
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MMC	mucosal mast cell
MPO	myeloperoxidase
MPPs	multipotent progenitors
N/C 比	nuclear/cytoplasm 比
ncRNA	non-coding RNA
PBS	phosphate buffered saline
PMCs	peritoneal mast cells
Pre-BMPs	pre-basophil/mast cell progenitors
PU.1	spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene
PVDF	polyvinylidene difluoride
RPKM	reads per kilobase of exon per million mapped reads
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
rRNA	ribosomal RNA
RUNX1	runt-related transcription factor 1
SCF	stem cell factor

SCL/tal1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
siRNA	small interfering RNA
SL-CMPs	Sca-1 ^{lo} common myeloid progenitors
SP 細胞	c-Kit(-)FcεRIα(+) cells
TB	toluidine blue
TBS-T	Tris Buffered Saline, 0.1% Tween 20
Th2	T helper 2
tRNA	transfer RNA
Tx	tamoxifen
WG	Wright-Giemsa

第一章

■ 序論

1-1) マスト細胞について

マスト細胞は、生体内の各組織に分布し細胞質に多種の顆粒を有することを特徴とする血球系細胞である。顆粒内には、炎症性メディエーターであるヒスタミンなどをはじめとし、プロテアーゼ、セロトニン、ヘパリン、また、脂質メディエーターであるプロスタグランジン D₂ やロイコトリエン B₄、C₄、D₄、E₄などが貯蔵されている（図1）。

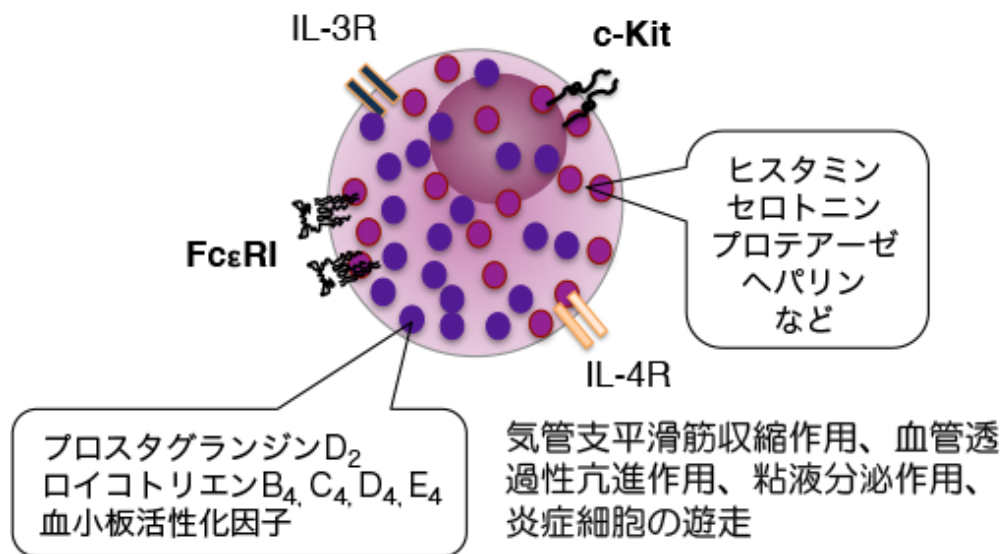


図1 マスト細胞内に含まれる顆粒成分と作用

マスト細胞の細胞表面上には「高親和性 IgE 受容体 (FcεRI)」が発現しており、Th2 サイトカインである IL-4 によって刺激を受けた B 細胞 (形質細胞) が産生した免疫グロブリン E (IgE) と結合する。その後アレルゲンによって FcεRI

が架橋されることによりシグナルが伝わり、顆粒が微小管に沿って細胞表面へ輸送され、放出される（脱顆粒）。脱顆粒によって放出されたこれらのケミカルメディエーターは、知覚神経の刺激、平滑筋の収縮、血管透過性の亢進などを引き起こし、その結果、即時型いわゆる I 型アレルギー症状が誘発されると同時に遅発型のアレルギー反応を惹起する。

現在、薬物療法による治療として、抗ヒスタミン薬を含むケミカルメディエーター受容体拮抗薬、ケミカルメディエーター遊離抑制薬、Th2 サイトカイン（IL-4、IL-5、IL-13）阻害・中和薬、自律神経作用薬などが用いられる。なかでも中心的な薬剤であるアレグラ®、アレジオン®、エバステル®、タリオン®などの第二世代抗ヒスタミン薬（ヒスタミン H1 拮抗薬）は、ヒスタミンとその受容体であるヒスタミン H1 受容体（H1R）の結合を阻害するだけでなく、H1R の発現を抑制することでアレルギー反応を弱めることで効果を発揮する。また、2009 年から保険適応が認められている Omalizumab（ゾレア®）は、ヒト化マウス抗ヒト IgE モノクローナル抗体製剤であり、重症喘息患者に用いられる。ゾレアは、血中で遊離している IgE の受容体結合部位（Cε3）に結合し、FcεRI との結合を阻害することにより脱顆粒そのものを抑制する。これらの治療薬は、複合的に使用することによりマスト細胞から産生されたメディエーターをアレルギー発症に至るいずれかの過程で阻止することによって治療効果を発揮している。しかしながら、いずれにおいても対症療法であるため、異なるアプローチによって原因療法と成り得るマスト細胞を標的としたより効果的な治療法の確立が必要である。

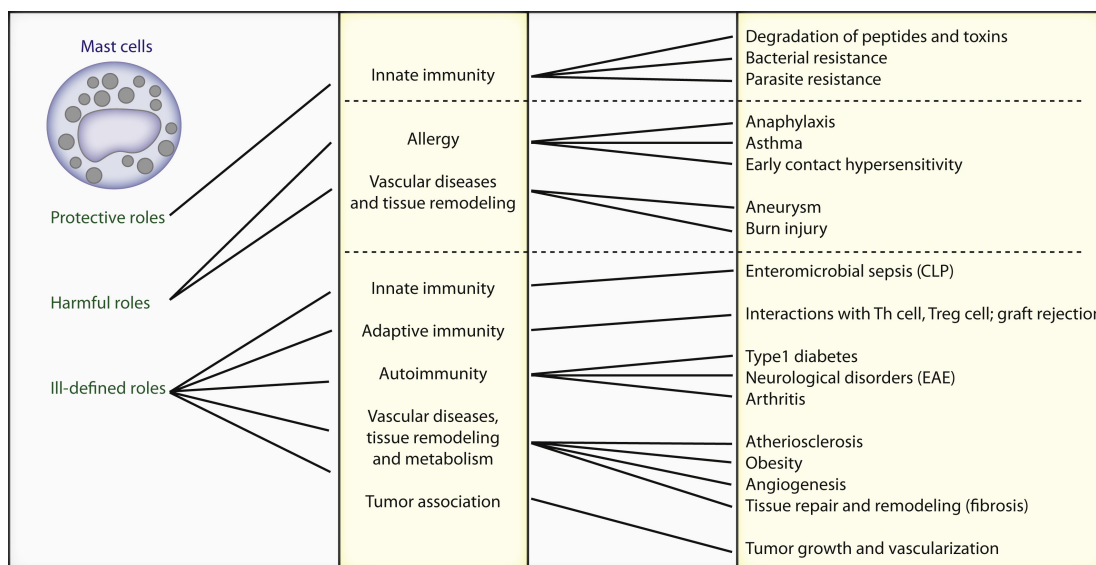


図2 マスト細胞の多彩な機能

(文献 11、Rodewald and Feyerabend. Immunity. 2012 より引用)

マスト細胞の脱顆粒によって起こる生体反応は、I型アレルギー反応のみならず、IV型アレルギーに分類される接触性皮膚炎における炎症応答の抑制¹や、T細胞との相互作用²、病原性細菌に対する生体防御反応³⁻⁵、同種皮膚移植時の免疫寛容への関与⁶、創傷治癒^{7, 8}、ヘビ・ミツバチ毒の分解⁹、多発性硬化症¹⁰、アテローム性動脈硬化症¹⁰など、様々な生命現象や疾患に関与していることが報告されている¹¹ (図2)。しかしながら、これらの多彩な機能のうち、リウマチ性関節炎¹²⁻¹⁵については、実験に使用したマウスの系統やマスト細胞欠損マウスの種類によって異なる結果が報告されている¹⁶⁻¹⁸。このように、古くから研究されているI型アレルギーに対する作用以外のマスト細胞の生理作用については、いまだ議論が多い。

1-2) マスト細胞の起源・分化経路・サブタイプ

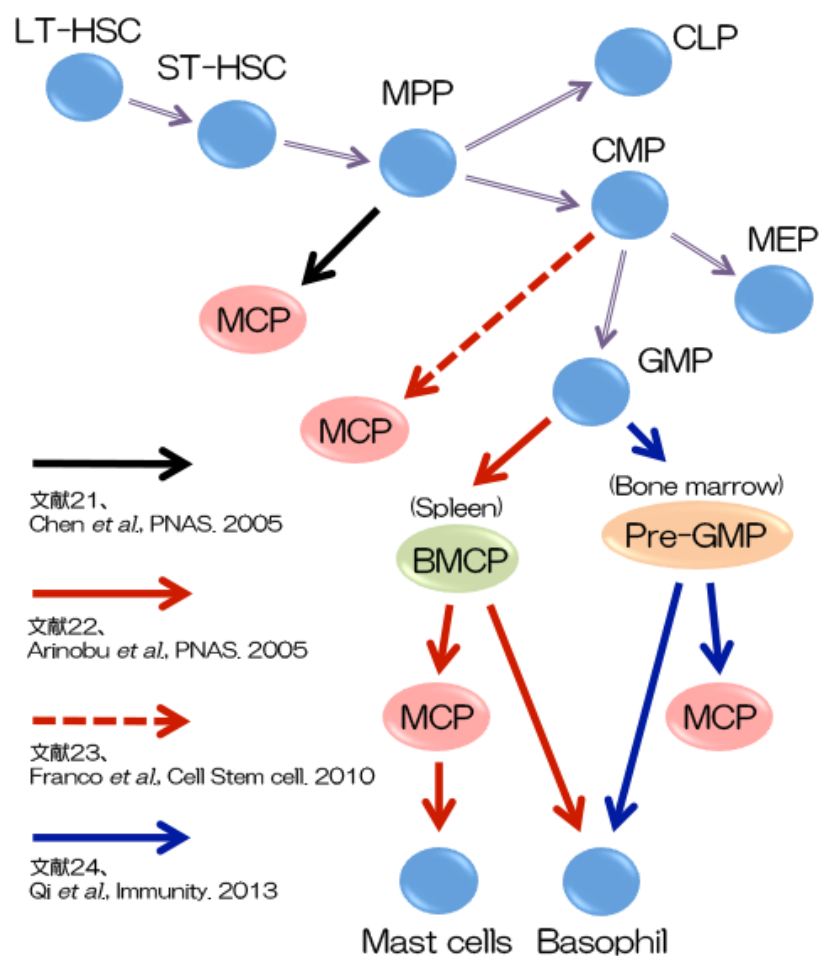


図3 マスト細胞の分化経路

(文献 26、Schmetzer *et al.*, Eur J Pharmacol. 2015 より改変)

これまでに、マスト細胞の機能に関しては多くの知見が得られているが、一方でマスト細胞の分化機構については不明な点が多い。他の血球細胞と同様に造血幹細胞を起源とするマスト細胞は、前駆細胞の段階で造血組織を離れ、皮膚、腹腔、消化管粘膜などに生着する。その後、末梢組織の微小環境の影響を受けることにより異なる遺伝子を発現し、局所で免疫応答に必要な機能を獲得（成熟）すると考えられている^{19, 20}。しかしながら、マスト細胞の前駆細胞及び分化経路についてはいまだ様々な議論がなされており、明白な答えが得られていない。こうした状況の中、近年複雑な細胞表面マーカーの組み合わせによって

マウスにおけるマスト細胞の前駆細胞が相次いで同定された (図3)。

まず 2005 年に Chen らは、骨髄由来のマスト細胞前駆細胞 (mast cell progenitors; MCP, Lin(-)c-Kit(+))Sca-1(-)Ly6c(-)FcεRIα(-)CD27(-)β7(+))T1/ST2 (+)) を同定した。Chen らは、MCP がほぼ 100%の割合でマスト細胞に分化誘導されることを報告し、加えてマスト細胞の起源は、これまで考えられていた顆粒球・マクロファージ前駆細胞 (granulocyte-macrophage progenitors; GMPs) ではなく、自己複製能を失った多能性前駆細胞 (multipotent progenitors; MPPs) であるというモデルを提唱した²¹。一方、同時期に Arinobu らは、好塩基球とマスト細胞に分化する bipotent な前駆細胞として、好塩基球/肥満細胞共通前駆細胞 (basophil-mast cell progenitors; BMCPs, Lin(-)c-kit(+))FcγRII/III(hi)β7(hi)) を脾臓から単離した²²。その後 2010 年に Franco らは、シングルセルレベルで解析を行い、骨髄細胞の SL-CMPs と名付けられた分画 [lin(-)Sca-1(lo)c-Kit(+))CD27(+))Flk-2(-)] にマスト細胞前駆細胞が存在することを示した²³。さらに、2013 年に Qi らは、骨髄細胞から単離した FcεRIα陰性の GMP が高率にマスト細胞と好塩基球にすることを報告し、pre-basophil/mast cell progenitors (pre-BMPs) と命名した²⁴。このように、マスト細胞の分化経路については現在のところ混沌としているが、マスト細胞は前駆細胞の段階で末梢へ移行し分化形質を獲得することを考えると、生体内においては複数の分化経路があり何れの説も正しい可能性も考えられる。今後はインビトロの分化系と細胞表面マーカーの利用だけでなく、マスト細胞特異的な遺伝子発現を利用したレポーターマウスの解析やシングルセルレベルでの解析などを中心に、更なる解析が必要である^{25, 26}。

一方、末梢組織に局在する成熟したマスト細胞に関しても、その分化形質を明らかにするために広く解析が行われている。齧歯類において、生体内のすべてのマスト細胞は、マスト細胞の表面マーカーである **c-Kit** と高親和性受容体 **FcεRIα** を発現している (図 1)。しかし、染色性や顆粒内物質の構成が大きく異なっていることから、現在は、結合組織型マスト細胞 (**connective tissue-type mast cell ; CTMC**) と粘膜型マスト細胞 (**mucosal mast cell ; MMC**) の 2 つのサブタイプに分けて考えられている²⁷。CTMC は皮下組織や腹腔に局在し、線維芽細胞から産生される **stem cell factor (SCF)** や L 型プロスタグランジン **D₂** 合成酵素によって成熟することが示唆されている²⁸。細胞内には、多くのヘパリンやヒスタミンを含む顆粒が観察され、**Tryptase (Mcpt4, Mcpt5, Mcpt6)** や **Chymase (Cma1)** を発現していることを特徴とする。一方 MMC は、消化管や気道粘膜に局在し、**interleukin-3 (IL-3)** によってその機能や生存が制御されていると考えられている²⁹。CTMC とは異なり、**Tryptase** である **Mcpt1** と **Mcpt2** の発現していることが指標となっている³⁰。ヒスタミン含量は比較的低く、**compound 48/80** に対する反応も比較的弱い。他方、ヒトのマスト細胞も肺、気道皮膚、滑膜など局在する場所によって **MC_T**、**MC_C**、**MC_{CT}** (**T**; **Tryptase**、**c**; **Chymase**) と呼ばれる 3 つのサブタイプに分類され、周囲の細胞やマトリクス、液性因子との相互作用により刺激応答性や遺伝子発現が異なる事が報告されている³¹。これらの知見からマスト細胞は、**M1/M2** マクロファージと同様に、局在する組織や環境によって機能や性質が異なっていると考えられる³²。したがって、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の分子基盤を解明する必要がある。

1-3) GATA 転写因子とマスト細胞の分化について

Zinc finger 型転写因子 GATA2 は、造血幹細胞をはじめ、各系列の前駆細胞、および巨核球、好酸球、好塩基球、マスト細胞で発現していることが知られている³³⁻³⁶。GATA2 ノックアウトマウスは、造血発生に著しい障害をきたし、胎生 11.5 日 (E11.5) までに致死となるが³⁶、致死となる以前の卵黄嚢を用いた分化誘導実験により、GATA2 はマスト細胞の分化決定に必須であることが示されている³⁶。しかしながら、分化決定後の役割については明らかとなっていない。先行研究において私は、培養液に IL-3 と SCF を添加し、1 ヶ月間培養することで得られるマウス骨髄由来マスト細胞 (Bone marrow derived mast cells ; BMMCs) の生成過程で、培養日数を追うごとに GATA2 mRNA の発現量が有意に上昇し、BMMCs が樹立されてからもその発現量が維持されていることを報告した³⁷ (図 4)。

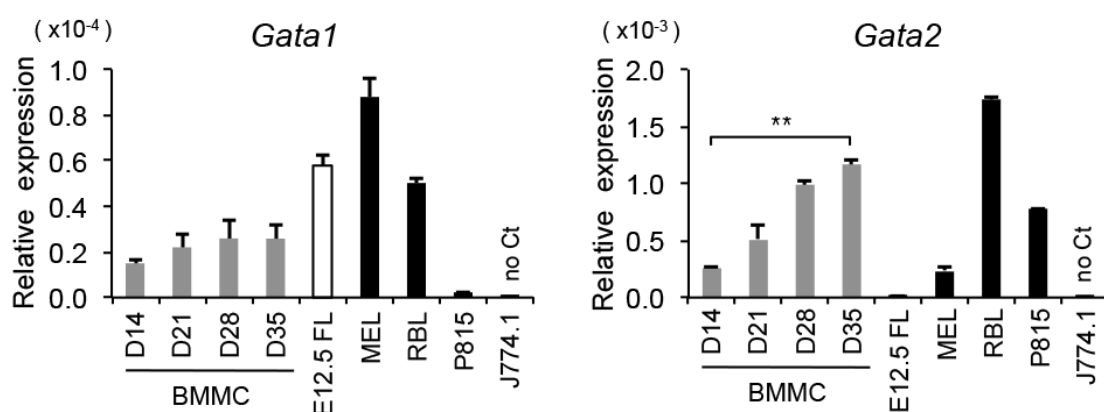


図 4 マスト細胞における GATA 因子の発現

BMMCs の樹立過程における GATA 因子の発現。D14-D35 ; 骨髄細胞の培養日数。E12.5FL ; 胎生 12.5 日の胎児肝臓。MEL ; マウス赤白血病細胞株。RBL ; ラット好塩基球様細胞株。P815 ; マウス肥満細胞腫。J774.1 ; 単球・マクロファージ様細胞株。(文献 37、Ohmori *et al.*, Mol Cell Biol. 2012 より引用)

この結果は、分化決定したマスト細胞においても GATA2 が中心的な役割を担っている可能性を示唆している。実際に、GATA2 はマウス末梢組織に存在する分化したマスト細胞で発現が認められている³⁸。

一方、同じ GATA family に属する GATA1 もまた、マスト細胞をはじめ、赤血球、巨核球、好酸球、樹状細胞に発現しており、*Gata1* ノックアウトマウスは胎生 12.5 日までに胎児型赤血球の分化障害のため致死となる³⁹。これまでに BMMCs において GATA1 と GATA2 が様々なマスト細胞関連遺伝子を制御していることが報告されている⁴⁰⁻⁴²。しかし、私達は、GATA1 の全翻訳領域を欠失する *Gata1* conditional knockout (G1CKO) マウスを用いた解析を行なったが、成体マウスにおいて GATA1 を完全に欠失させても BMMCs の形態や細胞表面マーカーの発現、細胞増殖能、生体内のマスト細胞の数に明らかな異常を見出すことはできなかった⁴³ (次頁、図 5 A-C)。この結果に対して、*Gata2* conditional knockout (G2CKO) マウスから樹立した BMMCs で 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) 誘導的に GATA2 の機能を欠失させると、c-Kit と FcεRIα を共に発現する BMMCs が有意に減少した⁴³ (図 5 D)。これらの結果は、GATA2 は BMMCs の分化形質維持において GATA1 よりも重要な役割を担っている可能性を示唆している。

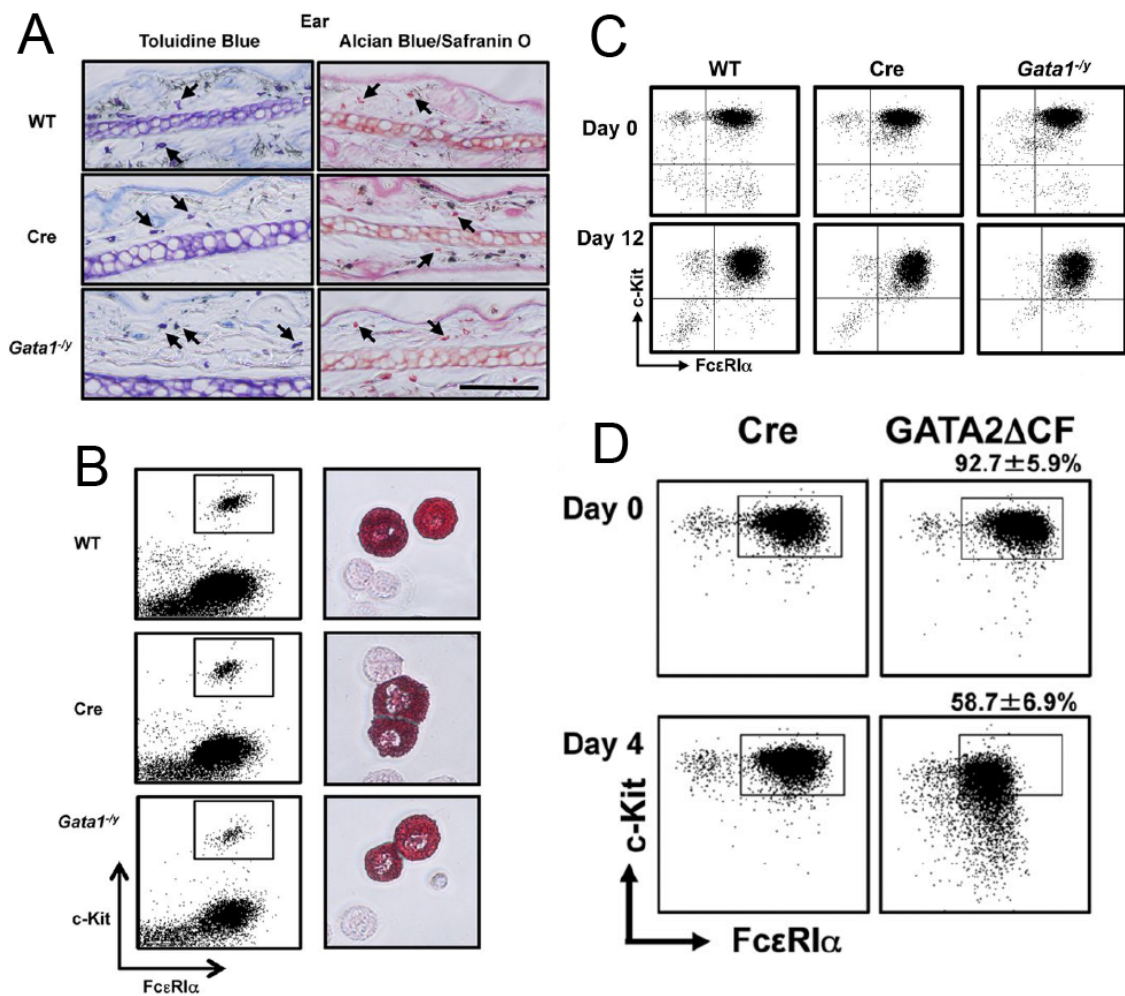


図5 GATA1 欠失マウスの解析

A) タモキシフェン (Tx) 投与により GATA1 を欠失した、G1CKO マウス (以下、Tx-G1CKO マウス) の耳におけるマスト細胞。WT ; 野生型マウス。Cre ; Cre リコンビナーゼを発現するマウス。Gata1(-/-) ; G1CKO マウス。B) Tx-G1CKO マウスの腹腔マスト細胞。C) G1CKO マウスから BMBCs を樹立した後、4-OHT 処理を行い c-Kit と FcεRIαの発現をフローサイトメーター (FCM)によって解析した。D) G2CKO マウスから BMBCs を樹立した後、4-OHT 処理をおこない c-Kit と FcεRIαの発現を FCM によって解析した。GATA2 ΔCF ; GATA2 欠失 BMBCs。Day ; 4-OHT 処理後の経過日数。(文献 43、Ohneda *et al.*, Mol Cell Biol. 2012 より改変)

マスト細胞には GATA1 や GATA2 のほかに、microphthalmia-associated transcription factor (MITF)、runt related transcription factor 1 (AML1)、T cell acute lympho-cytic leukemia 1 (SCL/tal1)、そして spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene (PU.1)などの転写因子が発現しており、各因子がマスト細胞の分化や機能に関与することが報告されている⁴⁴⁻⁴⁷。しかしながら、マスト細胞におけるこれらの転写因子間の相互作用の有無、またどの因子が最もマスト細胞の分化に影響を及ぼすのかについては明らかとなっていない。

本研究では、先行研究で用いた Cre/LoxP システムによって 4-OHT 誘導的に GATA2 の DNA 結合ドメインを欠失するマウス (*Gata2*^{fllox::CreER^{T2} 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ため、解析を行った。その結果、GATA2 を欠失した BMMCs (Δ CF/ Δ CF-BMMCs) は、c-Kit(-)/Fc ϵ RI α (-/+)/CD11b(+)の細胞に変化し、骨髄球の分化過程で重要な機能を果たすこと知られている、CCAAT/enhancer binding protein alpha (C/EBP α)^{48, 49} の有意な発現上昇を示した。興味深いことに、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs を骨髄球系サイトカインカクテル存在下で培養すると、機能的な好中球やマクロファージに類似した細胞に分化転換した。最後に、腹腔由来マスト細胞 (Peritoneal mast cells ; PMCs) で GATA2 を欠失させた結果、*Cebpa* の発現上昇は認められなかったが、*Kit* や他のマスト細胞関連遺伝子の発現減少は BMMCs と同様に認められた。以上の結果から、GATA2 はマスト細胞系列への分化を促し複数のマスト細胞特異的遺伝子に対する正の制御因子であることが明らかとなった。また、GATA2 による *Cebpa* の転写抑制は}

BMMCs の分化形質維持に重要であることが示唆された。

1-4) 目的

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する。

第二章

■ 材料と方法

マウス

Gata2^{flox/flox} マウス⁵⁰ (図 6 A) は、ミシガン大学 Sally A. Camper 博士より分与して頂いた。全身で 4-OHT 誘導的に CreER^{T2} を発現する *Rosa26*-CreER^{T2} マウスは、オランダ Netherlands Cancer Institute の Anton Berns 博士より分与して頂いた。*Cebpa*^{flox/flox} マウス⁵¹ はジャクソン研究所から購入した (Stock Number:006447)。全てのマウスを用いた実験は、高崎健康福祉大学実験動物委員会が定めた「高崎健康福祉大学動物実験等の実施に関する規定」を遵守して実施した。

BMMCs の樹立、分化誘導、Cre recombinase の誘導

BMMCs を得るために、8 から 12 週齢マウスの大腿骨から全骨髄細胞を採取した。得られた全骨髄細胞は、Hypotonic Buffer [15 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 1 mM EDTA]によって赤血球を除去した後、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培地 (ナカライテスク) /10% ウシ胎児血清 (Thermo), 1% streptomycin/penicillin (Life Technologies) (以後 10%基本培地と呼ぶ)、10 ng/ml recombinant murine IL-3 (Peprotech) を含む培地で 2 週間培養した。その後 IL-3 とともに recombinant murine SCF (Peprotech) を 10 ng/ml となるように培地に加え、さらに 2 週間から 3 週間培養を行った。その後、抗 c-Kit

抗体と抗 FcεRIα抗体を用いて染色を行い、フローサイトメトリーによって 95% 以上が c-Kit と FcεRIαの発現が共に陽性となったことを確認した。4-OHT による *Gata2* 第 5 エクソンの欠失確認は、CreERT2 を発現する *Gata2*^{flx/flx} マウス (*Gata2*^{flx/flx::CreERT2} マウス) から樹立した BMDCs (*Gata2*^{flx/flx::Rosa26CreERT2}-BMDCs) を用いて行った。具体的には、得られた *Gata2*^{flx/flx::Rosa26CreERT2}-BMDCs に対し、4-OHT (0.5 μM) を添加し Cre recombinase によるゲノム DNA の組換えを誘導した。4-OHT 処理を行った *Gata2*^{flx/flx::Rosa26CreERT2}-BMDCs からゲノム DNA を抽出し PCR を行った結果、4-OHT 処理後 5 日目において完全にゲノム DNA の組換えが起きていた (図 6 B)。さらに、*Gata2* の第 5 エクソンを増幅するプライマーセットを用いて定量 PCR を行った結果、第 5 エクソンを有する GATA2 mRNA は 5 日目において完全に消失していた (図 6 C)。PMCs は、8 から 12 週齢のマウスから腹腔細胞を採取し、IL-3 (10 ng/ml) と SCF (10 ng/ml) を含む 10% 基本培地で 2 週間培養を行った。

マスト細胞以外への分化誘導として、4-OHT 処理後 10 日目の BMDCs をサイトカインカクテル [IL-3 (10 ng/ml) , G-CSF (10 ng/ml ; Peprotech) , M-CSF (10 ng/ml ; Peprotech) , GM-CSF (40 ng/ml ; Peprotech) , IL-5 (10 ng/ml ; R&D Systems) , Flt3L (40 ng/ml ; MBL) , IL-6 (40 ng/ml ; MBL)] を含む 10% 基本培地で培養を行った⁵²。好中球への分化誘導は、4-OHT 処理後 10 日目の BMDCs を 5×10⁵ cells/ml の濃度で播種し、RPMI1640/20% ウシ胎児血清/1% streptomycin/penicillin (Gibco)、25 mM HEPES、1× nonessential amino acids (ナカライテスク)、1 mM sodium pyruvate (ナカライテスク)、50

mM 2-ME (Wako)培地 (以後 20%調整培地と呼ぶ) に IL-3 (10 ng/ml) と G-CSF (10 ng/ml) を添加して培養を行った。単球・マクロファージへの分化誘導を行うために、20%調整培地に IL-3 (10 ng/ml) と M-CSF (10 ng/ml) を添加して培養を行った。好酸球への分化誘導は、20%調整培地に IL-3 (10 ng/ml) と IL-5 (10 ng/ml ; R&D Resarch) を添加して培養を行った。

RNA 抽出と定量-PCR (Q-PCR)

全 RNA の抽出は、NucleoSpin RNA II (TaKaRa)を用いて説明書に従い行った。cDNA 合成は、抽出された 500 ng の RNA を鋳型にし、ReverTra Ace qPCR RT kit (TOYOBO) を用いて説明書に従い行った。Q-PCR は Go Taq qPCR master mix (Promega) および、Mx3000P real-time PCR system (Stratagene) を用いて行った。mRNA 発現解析における各遺伝子の定量は、18S rRNA の定量値を内部標準として算出した。各遺伝子の発現量は、平均±標準偏差で示した。本解析で用いたプライマーセットの配列は、表 1 に示した。

ウェスタンブロッティング

培養細胞に 4× SDS buffer [312.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10% SDS (v/v), 25% sucrose (v/v), 0.01% BPB, 20% 2-ME]を添加し、100°Cで 5 分間保温して溶解した。細胞溶解液を 10% SDS-PAGE により分離し、Immobilon-P PVDF 膜 (Millipore) に転写した。転写された PVDF 膜を TBS-T [150 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM NaCl, 0.05% Tween20 (v/v)]で洗浄後、5%スキムミルク/TBS-T でブロッキングを行い、一次抗体を添加して 4°Cで一昼夜反応させた。

反応後、TBS-T で洗浄を行い、5%スキムミルク/TBS-T に二次抗体を添加して 60 分反応させた。TBS-T で三回洗浄後、Immobilon Western (Millipore) を用いて化学発光法により検出を行った。本解析で用いた 1 次抗体及び 2 次抗体は、表 2 に示した。

細胞学的解析

サイトスピン標本は、Shandon Cytospin4 centrifuge (Thermo Electron Corp.) を用いて作成した。サイトスピン標本に対し、Wright-Giemsa 染色、toluidine blue 染色または Diff-Quik (Sysmex)染色を行い正立顕微鏡で観察及び撮影を行った。核と細胞質の面積比 (N/C ratio) は、Image J software program (アメリカ国立衛生研究所) を用いて解析した。

フローサイトメトリー (FCM) 解析

細胞液 (1×10^6 cells/200 μ l) に目的の蛍光標識一次抗体を 1 μ L 加え、氷上で 30 分間静置した。PBS で 2 回洗浄後、2% ウシ胎児血清/PBS で再懸濁し、Propidium Iodide (1 mg/mL) を 1/100 量加え FACSCanto II flow cytometer (ベクトン・ディッキンソン) 及び FACSDivaTM Software (ベクトン・ディッキンソン) で解析を行った。細胞の分取は、FACSJazz cell sorter (ベクトン・ディッキンソン) 及び BD FACSTM Software (ベクトン・ディッキンソン) を用いて行った。用いた 1 次抗体は表 2 に示した。

定量的クロマチン免疫沈降法 (Q-ChIP assay)

BMMCs (5×10^6 cells) を 15 mL tube に回収し、1% ホルマリンを含む培地で室温 10 分間固定した。125 mM になるように Glycine を加えて遠心し、PBS で細胞塊を 2 回洗浄した。固定した細胞塊は Complete mini protease inhibitor cocktail (Roche) を含む Lysis buffer [20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA] で溶解し、超音波破碎機 (TOMY UD-201) により破碎した。15000 rpm で 3 分間遠心後、上清を ChIP dilution buffer [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% SDS, 1 mM EDTA] を用いて 5 倍希釈し、クロマチン免疫沈降に用いた。精製された DNA サンプルは、Go Taq qPCR master mix (Promega) および、Mx3000P real-time PCR system (Stratagene) を用いて定量解析を行った。

統計解析

データは、関連二群の平均値の差を検定し、平均 \pm 標準偏差で示した。全ての解析において、p 値が 0.05 未満である場合 * で示し、p 値が 0.01 未満である場合 ** で示した。

顕微鏡写真

倒立顕微鏡は Nikon ECLIPSE Ti Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) に CFI Eyepiece Lens (10 \times /22) と S Plan Fluor objective lens (20 \times /0.45) を装着して使用した。正立顕微鏡は Nikon ECLIPSE 80i Microscope (Nikon, Tokyo, Japan) に CFI Eyepiece Lens (10 \times /22) and Plan Fluor objective lens (40 \times /0.75) を装着して使用した。顕微鏡デジタル写真の倍率は 各図の説明文中

に記載した。画像データは DXM1200C digital camera を各々の顕微鏡に装着し、ACT-1C for DXM1200C software (Nikon)を用いて取り込みを行った。画像イメージは Microsoft PowerPoint:mac for mac 2011 (Microsoft, Redmond,USA)を用いて画像調整を行った。

細胞増殖、死細胞、細胞周期の解析

細胞増殖測定、及びトルイジンブルー染色による死細胞数の算定は血球計算盤を用いて行った。細胞周期解析は、FITC BrdU Flow kit (BD Pharmingen) を用いて説明書に従い実施した。

small interfering RNA (siRNA) の遺伝子導入

BMMCs (2×10^6 cells) を 1.5 mL tube に回収し、PBS で2回洗浄後、200 μ L の OPTI-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) で再懸濁した。siRNA を最終濃度が 2 μ M となるように加え、Nucleofector (Lonza) を用いてエレクトロポレーション法により導入を行った (プログラム# Y-001)。24 時間後に細胞を回収し、サンプルとした。siRNA はそれぞれ以下を用いた。コントロール siRNA ; MISSION siRNA Universal Negative Control (SIGMA)。 *Gata1* siRNA ; Stealth siRNAs #RSS303126 (Thermo Fisher Scientific Inc.)。 *Gata2* siRNA ; Stealth siRNAs #RSS303126 (Thermo Fisher Scientific Inc.)

発現プラスミド DNA の構築

Cebpa の発現プラスミド DNA は、マウス骨髄 cDNA プールを鋳型として PCR

法にて増幅した全長 *Cebpa* cDNA を、pBAT12 IRES eGFP vector (CMV プロモーター) の EcoRI site と NotI site の間に挿入し構築した。また、レトロウイルスによる過剰発現実験を行うために、前述した *Cebpa* の全長 cDNA を pMXs IG vector の EcoRI site と NotI site の間に挿入した。

レトロウイルスの産生と遺伝子導入

レトロウイルスパッケージング細胞株である PlatE 細胞と pMXs IG vector は、東京大学医科学研究所 北村俊雄先生に供与して頂いた^{53, 54}。PlatE 細胞は、high glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; ナカライテスク)、10%ウシ胎児血清、1% streptomycin/penicillin、1 µg/ml puromycin (ナカライテスク)、10 µg/ml Blasticidin S (ナカライテスク) で培養した。レトロウイルスを産生させるために、レトロウイルス発現ベクターを Lipofectamine 2000 (Life Technologies) または FuGENE6 (Promega)を用いて説明書に従い遺伝子導入し、48 時間に培養上清を回収した。BMMCs にレトロウイルスを感染させるために、レトロウイルスを含む 500 µl のウイルス上清を BMMCs に添加し、IL-3 (10 ng/ml)、SCF (50 ng/ml) および polybrene (10 µg/ml ; Sigma-Aldrich) を含む培地で 4 時間培養した (細胞密度 : 5×10^5 cells/ml)。GFP の蛍光を利用した FCM 解析を行ったところ、1-3%の BMMCs で遺伝子が導入されたことを示す GFP の発現が認められた。

ファゴサイトーシスアッセイ

G-CSF または M-CSF 存在下で培養した Δ CF/ Δ CF-BMMCs を polystyrene

round-bottom tubes (BD Falcon) に 5×10^5 cells/ml になるように分注し、各チューブに Alexa Fluor 488-conjugated Escherichia coli BioParticles:K-12 strain (Invitrogen) または、FluoSphere- 1.0 mm(505/515) (Molecular Probes) を添加した。10 分間氷上で静置した後、 37°C 、5% CO_2 の条件下でインキュベートした。PBS で細胞を洗浄し、フローサイトメーターにより蛍光を発する貪食した細胞を計数した。

次世代シーケンス解析

BMMCs の全 RNA 抽出は、NucleoSpin RNA II (TaKaRa) を用いて行った。得られた全 RNA は、TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina) を用いてサンプル調整を行った。シーケンスは、Genome Analyzer IIx (Illumina) を使用し、36-bp シングルリードで行った。得られたシーケンスデータは、マウスゲノミックシーケンス (mm10 per the UCSC Genome Browser) に対し、Eland sequence alignment program (Illumina) を用いてゲノムマッピングを行い、得られた reads per kilobase of exon per million mapped sequence reads (RPKM) 値を基に発現解析を行った。

初めに、4-OHT(-)-CreERT2、4-OHT(+)-CreERT2、4-OHT(-)-*Gata2*^{flx/flx}-BMMCs #1、4-OHT(+)-*Gata2*^{flx/flx}-BMMCs#1、4-OHT(-)-*Gata2*^{flx/flx}-BMMCs#2、4-OHT(+)-*Gata2*^{flx/flx}-BMMCs#2 の 6 サンプルすべてにおいて RPKM 値が比較的低い遺伝子 (RPKM=5.0 以下) を除外し、残った各遺伝子の RPKM 値を用いて 4-OHT(-) と 4-OHT(+)の比を算出した (以下、4-OHT(-)/(+)比)。次に、Cre recombinase による遺伝子発現の影響を除くため、CreERT2 (コントロール細胞) における

4-OHT(-)/(+)比が 2.0 以上または、0.5 以下の遺伝子を除外した。次に、*Gata2*^{fl^{ox}/fl^{ox}}-BMMCs における 4-OHT(-)/(+)比が 2.0 以上または、0.5 以下の遺伝子をそれぞれ抽出した。その結果、GATA2 欠失によって発現が上昇したと考えられる 217 遺伝子、および発現が減少したと考えられる 169 遺伝子を同定した。これらの遺伝子群は、DAVID software program (<https://david.ncifcrf.gov>) を用いて、gene ontology (GO) 解析を行った。

第三章

■ 結果

3-1) BMMCs で GATA2 を欠失するとマスト細胞の分化形質が失われる

マスト細胞における GATA2 の役割を明らかにするため、*Gata2^{flx/flx}::Rosa26* CreER^{T2} マウスから BMMCs を調整した（以後、この細胞を *Gata2^{flx/flx}-BMMCs* と呼ぶ）。培養開始から 30 日目に 4-OHT を添加し *Gata2* を欠失させた（以後、この細胞を Δ CF/ Δ CF-BMMCs と呼ぶ）。その結果、以前の報告と同様に、日を迫うごとに c-Kit と FcεRIα が共に陽性の細胞（以後、この細胞を DP 細胞と呼ぶ）が減少し⁴³、4-OHT 添加後 9 日目では $7.9 \pm 1.5\%$ に減少した（図 7 A）。4-OHT 添加後 10 日目における細胞の形態を位相差顕微鏡で観察したところ、対照とした *Rosa26*CreER^{T2} マウスから調整した BMMCs（CreER^{T2}）に比べマスト細胞とは異なる形態の細胞が多く認められた（図 7 B：左）。これらの細胞からサイトスピン標本を作成し、ライト・ギムザ染色とトルイジンブルー染色を施し観察したところ、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs ではマスト細胞の顆粒が失われ、N/C 比が高い細胞が数多く認められた（図 7 B：中、右）。しかしながら、細胞数の増加率と死細胞の割合については、4-OHT 添加後 3 日目、6 日目において、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs と対照との間に差は認められなかった（図 7 C, D）。さらに 4-OHT 添加後 4 日目、8 日目における Δ CF/ Δ CF-BMMCs を 5-bromo-2'-deoxyuridine（BrdU）と 7-amino-actinomycin D（7-AAD）で染色し、細胞周期解析を行った。その結果、4-OHT 処理日数の経過に伴い G0/G1 期の細胞が減少し、S 期に進行する細胞が増加していた（図 7 E）。これらの結

果から、*Gata2*^{flox/flox}-BMMCs の大部分を占める DP 細胞の分化形質が GATA2 の欠失によって失われた可能性と、僅かに存在していた未成熟な前駆細胞の増殖が GATA2 欠失によって刺激された可能性とが考えられた。そこで、セルソーターを用いて培養開始から 30 日目の *Gata2*^{flox/flox}-BMMCs から DP 細胞のみを分取し、4-OHT 添加後 3 日目、6 日目、9 日目における DP 細胞の割合を調べた。その結果、図 2 A で示した結果と同様に、4-OHT 添加後 9 日目において、DP 細胞は 6.0±1.0%にまで減少していた(図 7 F)。よって、*Gata2*^{flox/flox}-BMMCs は、GATA2 欠失によってマスト細胞としての分化形質を失うと考えられた。

3-2) GATA2 を欠失した BMMCs は、未熟な骨髄球様の形質を呈する

より詳細に Δ CF/ Δ CF-BMMCs の性状を解析するために、骨髄球マーカーを用いて FCM 解析を行った(図 8)。その結果、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs では単球・顆粒球のマーカーである CD11b の発現が増加しており、その一部の細胞では Ly6G/C の発現が認められた(図 8 A)。Ly6G/C(-)/CD11b(+); (RI) と Ly6G/C(+)/CD11b(+); (RII) で示す細胞をセルソーターによって分取し、形態を比較したところ、両分画の間で明らかな相違は認められず、両者に様々な形態を呈する細胞が混在していた。しかしながら、RI と RII で出現した細胞の N/C 比を比較したところ、RII の細胞は RI の細胞よりも N/C 比が低いことから、比較的成熟した細胞が RII の分画には含まれていると考えられた(図 8 B)。次に、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs がマスト細胞以外の細胞系列に変化した可能性を調べるため、他系列の分化マーカーを用いて FCM 解析を行った。その結果、Ly6G/C、CD11b に加え、好酸球マーカーである Siglec-F とマクロファージのマーカーで

ある F4/80 の発現が中程度に増加していた。しかし、成熟好中球を定義する MHCclassII(-)/Ly6G(+)/Ly6G/C(+)細胞⁵⁵、単球・マクロファージを定義する CD11b(high)/F4/80(+) 細胞⁵⁶⁻⁵⁸、好塩基球を定義する c-Kit(-)/FcεRIα(+)/CD11b(int)/CD49b(+) 細胞、好酸球を定義する CD34(-)/CD11b(int)/CCR3(+)/Siglec-F(+)細胞の出現は、4-OHT 処理後 5 日目、10 日目いずれにおいても認められなかった (図 8 C)。次に、これらの細胞での遺伝子発現を調べるため、Q-PCR 解析を行った。その結果、FCM 解析の結果と一致して c-Kit mRNA (*Kit*) の減少と CD11b mRNA (*Itgam*) の発現上昇が認められた (図 8 D)。また、BMMCs の増殖・生存に必要なサイトカインである IL-3 に対する受容体 (*Csf2rb*) の発現量に変化は認められなかった。特記すべきことに、骨髓球で重要な役割を果たす転写因子 C/EBPα (*Cebpa*) と PU.1 (*Sfpi1*)²²⁻²⁴、PU.1 の標的遺伝子である myeloperoxidase (*Mpo*)⁵⁹ の発現が大きく上昇していた。一方、マスト細胞の分化を制御することが報告されている *Gata1*⁶⁰ と *Mitf*^{47, 61, 62} の発現は、細胞の形質が著しく変化していたにも関わらず、4-OHT 処理後 10 日目にわずかな減少がみられたのみであった。これらの結果は、Western blot 法によるタンパク質レベルの解析においても同様であった (図 8 E)。

ΔCF/ΔCF-BMMCs では、DNA 結合能を持たない GATA2ΔCF 変異タンパク質が発現している。これまでに得られた結果が、この変異タンパク質の作用ではなく、GATA2 の欠失が要因であることを確認するために、野生型 BMMCs に GATA2 に対する siRNA を導入して *Cebpa* の発現を Q-PCR で解析した。そうしたところ、ΔCF/ΔCF-BMMCs と同様に、*Cebpa* の発現上昇が観察された (図

8 G)。さらに、GATA2 cDNA を同時に導入すると、*Cebpa* の発現上昇はわずかに抑制された。これらの結果から、少なくとも *Cebpa* の発現上昇は GATA2 の欠失によるものであると考えられた。また、GATA1 に対する siRNA を導入した細胞では *Cebpa* の発現上昇が観察されなかったことから、*Cebpa* の発現抑制は、GATA2 に特異的な作用であると考えられた。

過去の報告で、C/EBP α は、好塩基球とマスト細胞とのバイポテンシャルな前駆細胞において、好塩基球への分化決定に重要であることが示されている^{22, 24, 63}。 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、FCM 解析では好塩基球のマーカーである CD49b の発現が認められなかったが、Q-PCR による遺伝子発現解析では C/EBP α の標的因子と考えられている複数の好塩基球関連遺伝子²⁴ が有意に上昇していた。特に、好塩基球特異的マーカーとして用いられる *Mcpt8*⁶⁴ の発現は、比較的早期に著しい発現増加が認められた (図 8 F)。

3-3) Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、好中球やマクロファージに類似した細胞に分化するが、好酸球には分化しない

次に、4-OHT 添加後に経時的に細胞を回収し、Q-PCR によって骨髓球系サイトカイン受容体の mRNA 発現を調べた (図 9 A)。その結果、マスト細胞で発現していることが知られている IL-4 受容体 (*Il4ra*)⁶⁵ の発現が 4-OHT 処理後有意に減少していた。一方、マスト細胞にはほとんど発現していない *Il5ra*、*Il6ra*、*Csf3r*、*Csf1r*、*Csf2ra* の発現量がいずれも上昇していた。これらの結果から、骨髓球系サイトカインの添加により、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs が他の骨髓球系列の細胞に分化する可能性が考えられた。この可能性を検証するために、4-OHT 添加

後 10 日目の Δ CF/ Δ CF-BMMCs に対し、IL-3、granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)、granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)、IL-5、IL-6 を含むサイトカインカクテルを培養液に添加し、更に 15 日間培養した。その結果、サイトカインカクテル添加後 5 日目では多くの細胞が浮遊細胞であったが、日を追うごとに接着細胞の割合が多くを占め、15 日後には大部分の細胞が接着していた。浮遊細胞から作成したサイトスピン標本に対し Diff-Quik 染色を行い形態観察したところ、マクロファージ様の細胞または、分葉核を持った好中球様の細胞などが混在しており、特にマクロファージ様の細胞は日を追うごとに大型の細胞に変化した (図 9 B)。この時出現した浮遊細胞の FCM 解析を行った結果、サイトカインカクテル添加前は成熟好中球 [MHC Class II(-)/Ly6G(+)/Ly6G/C (+)] は認められなかったが、添加後に成熟好中球の増加が認められた (図 9 F)。またサイトカインカクテル添加後 15 日目において、単球・マクロファージ [CD11b(high)/MHC Class II(+)/F4/80(+)/CD11c (+)] の割合が有意に増加し (図 9 F: 右上)、同時に出現した接着細胞の $99 \pm 1.0\%$ が同じ細胞表面マーカーを発現する細胞であった (図 9 F: 右下)。一方、好塩基球 [c-Kit(-)/Fc ϵ RI α (+)/CD11b(int)/CD49b(+)] と好酸球 [CD34(-)/CD11b(int)/CCR3(+)/Siglec-F(+)] は、今回行ったサイトカインカクテルによる培養では出現しなかった (図 9 F: 左下)。

次に、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs には好酸球マーカーである Siglec-F の発現が弱く観察されていたため (図 8 C)、培養条件を変更し、骨髄由来好酸球を調整するための培養条件下での培養を試みた (図 9 C)。しかし、野生型マウスの骨髄細胞

を用いた培養では、培養開始から3日目に CD34(-)/CD11b(int)/CCR3(+)/Siglec-F(+)の好酸球が認められ、Diff-quick 染色による赤色の顆粒を持った好酸球が確認されたのに対し、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs を用いた培養ではそれらの細胞は出現しなかった。さらに Q-PCR により好酸球マーカーである *Il5ra*、*Cebpb*、*Epx* の発現確認を行ったが、FCM 解析の結果と一致して、それらの発現上昇は認められなかった (図 9 G)。以上の結果から、好酸球への分化には GATA2 が必須であると考えられる。次に、好中球またはマクロファージの培養に適した条件下で、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs を培養した (図 9 D-E) ^{52, 66-69}。培養開始から6日目において、Ly6G(+)/Ly6G/C(+)の成熟好中球 ($59 \pm 3.7\%$)、CD11b(hi)/F4/80(+)のマクロファージ ($23 \pm 3.8\%$) がそれぞれの至適培養条件下で出現した (図 9 D-E : 上段)。これらの Ly6G(+)/Ly6G/C(+) または CD11b(hi)/F4/80(+)細胞は、形態上、好中球またはマクロファージに類似していた (図 9 D-E : 中段右)。また、これらの細胞は、貪食能を有していた (図 9 D-E : 下段)。以上の結果から、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、機能的な好中球またはマクロファージに類似した細胞に形質転換できることが明らかとなった。

3-4) Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、マスト細胞関連遺伝子の発現が減少し、骨髓球系遺伝子の発現が上昇する

次に、BMMCs における GATA2 の標的遺伝子を網羅的に解析するために、トランスクリプトーム解析を実施した (図 10)。この解析では、二次的な影響を避けるために、GATA2 を欠失してから比較的早期 (4-OHT 処理後4日目) の Δ CF/ Δ CF-BMMCs を用いて RNA シークエンシングを行い、得られたデータ

について Gene Ontology (GO) 解析を行った。まず RNA シークエンシングで、GATA2 欠失により有意に発現量が低下した 169 遺伝子を同定した。この 169 遺伝子について、GO 解析を行ったが、有意な GO term (false discovery rate ; FDR<0.01) を見出すことは出来なかった。一方、GATA2 欠失により有意に発現量が増加した 217 遺伝子について、GO 解析を行った結果、「biological process」のカテゴリーにおいて、ncRNA/rRNA/tRNA 等の RNA の代謝やプロセッシングに関連した GO term が見出された。また「cellular component」のカテゴリーでは、nucleolus 等の GO term が見出された。しかしながら「molecular function」のカテゴリーでは、有意差を持った GO term は見出すことができなかった (表 3)。本研究では、今回得られた GO term に関連する Δ CF/ Δ CF-BMMCs の形質変化は見出されなかったため、今後より詳細な解析が必要であると思われる。

最近、Motakis らによって、ヒト由来マスト細胞を用いて cap analysis of gene expression (CAGE) 法を用いたトランスクリプトーム解析が行われ、GATA1 あるいは GATA2 と同様の発現プロファイルを示す 50 個のマスト細胞関連遺伝子が同定された⁷⁰。本解析の RNA シークエンシングデータと比較した結果、前述した 50 遺伝子のうち 24 遺伝子が GATA2 の欠失によって影響を受けており、24 遺伝子のうち 18 遺伝子の発現が減少し、6 遺伝子の発現が上昇していた (図 10A; *)。次に、RNA シークエンスデータの Reads Per Killobases per Million (RPKM) 値を指標にマスト細胞関連遺伝子について解析したところ、マスト細胞トリプターゼをコードする *Tpsg1* や *Tpsb2* など、複数のマスト細胞関連遺伝子の発現量が GATA2 の欠失によって減少していた (図 10B: 中段)。一方、

マスト細胞の分化に関与することが報告されている転写因子である *Scl*、*Mitf*、*Runx1*、*Gata1*、*Sfp1*、*Ikzf1* の発現に影響は認められなかった。また、*Cebpa* の発現量は本解析においても *GATA2* の欠失によって大きく増加していた (図 10B: 下段)。RNA シークエンスの結果を確かめる為に、4-OHT 添加前、5 日後、10 日後におけるマスト細胞関連遺伝子の発現を Q-PCR によって解析した。その結果、*GATA2* の欠失による発現量の減少は、Q-PCR でも再現性よく認められた (図 10C)。

3-5) *Cebpa* の発現上昇は、*GATA2* 欠失 BMMCs の脱分化に必須である

次に、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs の形質変化が C/EBP α の発現増加に依存しているのかどうか検証するために、野生型マウスの BMMCs に対してレトロウイルスを用いて C/EBP α を過剰発現し、FCM 解析を行った。その結果、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs と同様に、DP 細胞の割合が大きく減少し、CD11b、Ly6G/C、F4/80 陽性細胞の割合が増加した (図 11A)。次に、C/EBP α の発現増加による遺伝子発現変化を調べるために、internal ribosomal entry site (IRES) EGFP を有する C/EBP α の発現プラスミドを BMMCs にエレクトロポレーション法によって導入し、セルソーターにより EGFP の発現強度別に細胞を分取し、Q-PCR を行った。その結果、C/EBP α の発現量は、EGFP の発現強度と相関していることが確認された。また、興味深いことに、内在性の *GATA2* mRNA の発現量は、C/EBP α の発現量と逆相関していた (図 11B: 上段)。これらの結果は、BMMCs において、*GATA2* が C/EBP α を抑制しているのみならず、異所性に過剰発現した C/EBP α もまた *GATA2* を抑制し、両者の間で互いの抑制機構が存在している可

能性を示唆している。一方、サイトカイン受容体である *Csf2ra*、*Il5ra*、*Csf1r* の発現は、*Cebpa* の発現量に相関して上昇していた (図 1 1 B : 下段)。

次に、C/EBP α の発現増加に依存しない Δ CF/ Δ CF-BMMCs の表現型の有無を調べるために、*Cebpa* conditional knockout (*Cebpa*^{fllox}) マウスと *Gata2*^{fllox}::*Rosa26CreERT2* マウスを交配し、*Gata2/Cebpa* conditional double knockout (DKO) マウスを作出した。DKO マウスから樹立した BMMCs (DKO-BMMCs) に 4-OHT を処理し、解析を行ったところ、DKO-BMMCs では、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs と比べて少なかったものの、明らかな DP 細胞の減少が認められた (図 1 1 C : 左)。しかしながら、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs とは異なり、DKO-BMMCs では Ly6G/C(+)/CD11b(+)細胞は出現しなかった (図 1 1 C : 右)。さらに興味深いことに、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs では、c-Kit(-)Fc ϵ RI α (+)細胞 (Single positive : SP 細胞) の出現が認められていたのに対して、DKO-BMMCs では顕著な Fc ϵ RI α の発現低下が認められ、SP 細胞の頻度は有意に少なくなっていた (Δ CF/ Δ CF : $43.0 \pm 2.1\%$ 、DKO : $2.0 \pm 0.6\%$)。この結果は、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs における Fc ϵ RI α の発現は、C/EBP α に依存している可能性を示している。さらにこれらの細胞を用いて Q-PCR を行ったところ、骨髓球関連遺伝子 (*Itgam*、*Mpo*) の発現は C/EBP α 依存的な発現様式を示す一方で、マスト細胞関連遺伝子 (*Kit*、*Tpsb2*) の発現量は、DKO-BMMCs でも減少していた (図 1 1 D)。これらの結果から、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs における遺伝子発現の変化は、GATA2 の欠失のみによって引き起こされるマスト細胞関連遺伝子の発現量低下と、C/EBP α の発現増加に依存した骨髓球関連遺伝子の発現増加とに分けられると考えられた。

3-6) GATA2 は、*Cebpa* 遺伝子座の+37 k エンハンサー領域に結合する

Cebpa の発現を GATA2 が直接制御しているのか否か明らかにするために、*Cebpa* 遺伝子座に存在する GATA 結合配列 (WGATAR) を検索した。その結果、*Cebpa* の転写開始点から+2 kb と+37 kb に、ヒトとの間に保存された GATA 結合配列が有ることを見出した (図 1 2 A)。この 2ヶ所のうち、特に+37 kb 領域は、骨髄球系細胞株である 32Dcl3 細胞において、RUNX1 が結合し *Cebpa* の発現を正に制御するエンハンサー領域として報告されている⁷¹⁻⁷³。この領域を詳細に調べた結果、GATA 結合配列の前後合わせて 34 塩基対の間に RUNX と PU.1 の結合配列が近接して存在していた (図 1 2 E)。そこで、*Gata2*^{fllox}::*Rosa26*CreER^{T2}-BMMCs を用いて Chromatin immune precipitation assay (ChIP assay) を行ったところ、確かに+37 k エンハンサー領域に GATA2 の結合が認められ、その結合は 4-OHT 処理によって減少した (図 1 2 B)。そこで、+37 k エンハンサー領域における三者の相互作用が *Cebpa* の発現調節に関与している可能性を検証するため、GATA2 欠失時における RUNX1 と PU.1 の結合を調べた。その結果、+37 k エンハンサー領域に対する RUNX1 と PU.1 の結合量は、GATA2 の消失に伴い増加した (図 1 2 C)。また興味深いことに、GATA2 の消失により、+37 k エンハンサー領域のみならず、プロモーターおよび+2 k 領域のヒストン H3 のアセチル化が亢進した (図 1 2 D)。以上の結果から、BMMCs において+37 k エンハンサー領域に対する GATA2 の結合は、RUNX1 や PU.1 の同領域に対する結合を抑制していることが示唆された (図 1 3)。

3-7) Δ CF/ Δ CF-PMCs では、*Cebpa* の発現上昇が起こらない

最後に、BMMCs を用いて得られたこれまでの結果が、由来の異なるマスト細胞でも起こるのか否か、PMCs を用いて検証した (図 1 4)。その結果、 Δ CF/ Δ CF-PMCs では、4-OHT 処理後 9 日目において、頻度は少ないが BMMCs と同様に DP 細胞の割合が減少した ($59.3 \pm 7.0\%$)。しかし驚いたことに、 Δ CF/ Δ CF-PMCs では Δ CF/ Δ CF-BMMCs に較べて明らかに SP 細胞の出現頻度が低く、CD11b(int)細胞も出現しなかった (図 1 4 A) また、CD49b(+)細胞の出現も認められなかった。次に、これらの結果が DKO-BMMCs の結果と類似していた事から (図 1 1 C)、 Δ CF/ Δ CF-PMCs では GATA2 が欠失しているにも関わらず *Cebpa* の発現が上昇していないのではないかと考え、Q-PCR 解析を行った。その結果、予想通り *Cebpa*、*Itgam*、*Mpo* の発現は上昇していなかった。対照的にマスト細胞関連遺伝子である *Kit*、*Tpsb2*、*Tpsg1* の発現は、BMMCs と同様に GATA2 欠失により減少していた (図 1 4 B)。これらの結果から、GATA2 による *Cebpa* の発現抑制はすべてのマスト細胞で見られる事象ではないことが明らかとなった。一方、マスト細胞関連遺伝子に関しては、BMMCs のみならず PMCs においても、GATA2 が正に制御している可能性が示唆された。

第四章

■ 考察

4-1) Δ CF/ Δ CF-BMMCs のリプログラミング

本研究では、マスト細胞における GATA2 の役割を明らかにするために BMMCs と PMCs を用いて解析を行った。私は、本研究において、以下に記述する 2 つの知見が特に重要であると考えている。第一に、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs が他の細胞系列へリプログラミングするという知見である。 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、細胞系列別に適したサイトカイン存在下で培養すると、好中球やマクロファージに類似した細胞に分化するが、好酸球様の細胞には分化しなかった。一方、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs で出現した細胞の一部は、好塩基球の特徴を示す c-Kit(-)/FcεRIα(+)/CD11b(int)であり、Q-PCR 解析において複数の好塩基球特異的な遺伝子が増加していた。ところが、好塩基球マーカーとして広く使用されている CD49b (clone : DX5) の発現は認められなかった。さらに、好塩基球で発現が消失することが報告されている転写因子 MITF の発現は、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs で維持されていた。好塩基球とマスト細胞のいずれかに分化する前駆細胞 (BMCP) において、C/EBPα は好塩基球への分化を促進することが報告されている⁶³。しかしながら、正常な好塩基球には、C/EBPα とともに GATA2 も発現している。今回得られた結果は、正常な好塩基球への分化には、C/EBPα の発現上昇のみでは不十分であり、GATA2 が必要であることを示唆している。

Iwasaki らは、骨髓球系前駆細胞において、GATA2 と C/EBP α の発現増加の順序が、好酸球、マスト細胞、好塩基球への分化決定に重要であることを報告している⁶³。今回得られた結果は、これらの細胞系列への分化における GATA2 の貢献度を示している。すなわち、好酸球への分化には GATA2 が絶対的に必要であり、正常な好塩基球への分化にも GATA2 が必要である。一方、好中球やマクロファージの分化に対する GATA2 の貢献度は低いと考えられる (図 1 4 C)。本研究で認められた Δ CF/ Δ CF-BMMCs の細胞系列転換は、血球の前駆細胞に共通して発現している c-Kit の発現が低いまま、分化形質を失って他の細胞系列に分化するものであった。このことから、正常な血球分化を再現するものではないと考えられるが、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、正常な骨髓球系の細胞系列における GATA2 の機能的貢献度を再現し得る興味深いモデルであると考えられた。

4-2) マスト細胞分化過程における *Gata2* と *Cebpa* の互いの発現制御

第 2 の特記すべき知見は、BMMCs では GATA2 と C/EBP α の発現が逆相関していたことである (図 1 4 D)。最近、Qi らによって GMP に含まれるマスト細胞・好塩基球前駆細胞 (pre-BMPs) において、C/EBP α と MITF が互いに転写を抑制しあうことが報告された²⁴。また、他の報告では、マウス骨髓由来の細胞において、リンパ球・骨髓球系細胞で機能する転写因子 IKAROS と、その下流で機能する HES1 が、エピジェネティックな機序により *Cebpa* の発現を抑制し、好塩基球への分化を制限することが示されている⁷²。これらの報告は、*Cebpa* 遺伝子の発現を抑制する因子は GATA2 以外にも複数存在することを示

唆している。本研究では、BMMC においては、GATA2 が欠失し C/EBP α が過剰発現した細胞においても、これらの因子の発現が変化することはなかった。複数の C/EBP α 抑制機構がどのように使い分けられているのかは不明である。私は、マスト細胞のすべての分化過程で、C/EBP α の発現が抑制されていることから、C/EBP α を抑制する因子が、マスト細胞の分化過程で入れ替わっていくのではないかと考えている。先に述べたように、今回の結果は、GATA2 が正常な好塩基球の分化に必要であることを示しており、好塩基球には C/EBP α と GATA2 がともに発現している。よって、C/EBP α と GATA2 が相互に発現抑制する機構が正常な血球分化の過程で存在するのであれば、それはマスト細胞と好塩基球との分岐点よりも早い分化段階で機能するのではないかと考えられる。一方、MITF や IKAROS は、好塩基球には発現していない因子であり、マスト細胞と好塩基球との分岐点で *Cebpa* 遺伝子の発現を抑制していると考えても矛盾しない。 Δ CF/ Δ CF-BMMCs が単球や好中球様の細胞に分化転換したことを考え合わせると、GATA2 は、より未熟な分化段階で *Cebpa* 遺伝子を抑制し、単球や好中球への分化を制限している可能性が考えられる。このようなマスト細胞分化過程における *Cebpa* 抑制因子の‘stepwise replacement’については、さらなる検証が必要である。

これまでの結果をまとめると、本研究によって、GATA2 が、マスト細胞において2つの独立した機能を有することが示唆された。一つは、c-Kit やマスト細胞特異的な遺伝子群を正に制御していることである。もう一つは、BMMCs で観察されたように、*Cebpa* の転写を抑制することにより、他の骨髓球系列への分化を抑制し、マスト細胞の分化形質を維持していることである。マスト細胞

は、生体内の末梢組織に広汎に存在し、組織局所の微小環境下で生体防御反応に寄与している。今後は、個体レベルで **GATA2** の機能を解析する系を構築し、今回得られた知見を生体内のマスト細胞で検証したい。

第五章

■ 結論

本研究により、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/EBP α 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。

■ 参考文献

1. Grimbaldston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol.* 2007;**8**(10):1095-1104.
2. Piconese S, Gri G, Tripodo C, Musio S, Gorzanelli A, Frossi B, Pedotti R, Pucillo CE, Colombo MP. Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40L axis toward Th17-cell differentiation. *Blood.* 2009;**114**(13):2639-2648.
3. Dawicki W, Marshall JS. New and emerging roles for mast cells in host defence. *Curr Opin Immunol.* 2007;**19**(1):31-38.
4. Echtenacher B, Männel DN, Hültner L. Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature.* 1996;**381**(6577):75-77.
5. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature.* 1996;**381**(6577):77-80.
6. Lu LF, Lind EF, Gondek DC, Bennett KA, Gleeson MW, Pino-Lagos K, Scott ZA, Coyle AJ, Reed JL, Van Snick J, Strom TB, Zheng XX, Noelle RJ. Mast cells are essential intermediaries in regulatory T-cell tolerance. *Nature.* 2006;**442**(7106):997-1002
7. Trautmann A, Toksoy A, Engelhardt E, Bröcker EB, Gillitzer R. Mast cell involvement in normal human skin wound healing: expression of monocyte chemoattractant protein-1 is correlated with recruitment of mast cells which synthesize interleukin-4 in vivo. *J Pathol.* 2000;**190**(1):100-106.
8. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M. Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J.*

- 2006;**20**(13):2366-2368.
9. Metz M, Piliponsky AM, Chen CC, Lammel V, Abrink M, Pejler G, Tsai M, Galli SJ. Mast cells can enhance resistance to snake and honeybee venoms. *Science*. 2006;**313**(5786):526-530.
 10. Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, MacFarlane LA, Mallen-St Clair J, Shi GP. Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med*. 2007;**13**(6):719-724.
 11. Rodewald HR, Feyerabend TB. Widespread immunological functions of mast cells: fact or fiction?. *Immunity*. 2012;**37**(1):13-24.
 12. Crisp AJ, Chapman CM, Kirkham SE, Schiller AL, Krane SM. Articular mastocytosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1984;**27**(8):845-851.
 13. Malone DG, Irani AM, Schwartz LB, Barrett KE, Metcalfe DD. Mast cell numbers and histamine levels in synovial fluids from patients with diverse arthritides. *Arthritis Rheum*. 1986;**29**(8):956-963.
 14. Tetlow LC, Woolley DE. Mast cells, cytokines, and metalloproteinases at the rheumatoid lesion: dual immunolocalisation studies. *Ann Rheum Dis*. 1995;**54**(11):896-903.
 15. Lee DM, Friend DS, Gurish MF, Benoist C, Mathis D, Brenner MB. Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis. *Science*. 2002;**297**(5587):1689-1692.
 16. Zhou JS, Xing W, Friend DS, Austen KF, Katz HR. Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *J Exp Med* 2007;**204**: 2797-802.
 17. Mancardi DA, Jonsson F, Iannascoli B, Khun H, Van Rooijen N, Huerre M, et al. Cutting edge: the murine high-affinity IgG receptor FcγRIV is sufficient for autoantibody-induced arthritis. *J Immunol* 2011;**186**:

1899-1903.

18. Feyerabend TB, Weiser A, Tietz A, Stassen M, Harris N, Kopf M, et al. Cre-mediated cell ablation contests mast cell contribution in models of antibody and T cell-mediated autoimmunity. *Immunity* 2011;**35**: 832-844.
19. Kitamura Y. Heterogeneity of mast cells and phenotypic change between subpopulations. *Annu Rev Immunol.* 1989;**7**:59-76.
20. Hallgren J, Gurish MF. Pathways of murine mast cell development and trafficking: tracking the roots and routes of the mast cell. *Immunol Rev.* 2007;**217**:8-18.
21. Chen CC, Grimbaldston MA, Tsai M, Weissman IL, Galli SJ. Identification of mast cell progenitors in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;**102**(32):11408-11413.
22. Arinobu Y, Iwasaki H, Gurish MF, et al. Developmental checkpoints of the basophil/mast cell lineages in adult murine hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;**102**(50):18105-18110.
23. Franco CB, Chen CC, Drukker M, Weissman IL, Galli SJ. Distinguishing mast cell and granulocyte differentiation at the single-cell level. *Cell Stem Cell.* 2010;**6**(4):361-368.
24. Qi X, Hong J, Chaves L, et al., Antagonistic regulation by the transcription factors C/EBPalpha and MITF specifies basophil and mast cell fates. *Immunity.* 2013;**39**(1):97-110.
25. Arinobu Y, Iwasaki H, Akashi K. Origin of basophils and mast cells. *Allergol Int.* 2009;**58**(1):21-28.
26. Schmetzer O, Valentin P, Church MK, Maurer M, Siebenhaar F. Murine and human mast cell progenitors. *Eur J Pharmacol.* 2015;pii: S0014-2999(15)30145-X.
27. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. *Physiol Rev.*

1997;77(4):1033-1079.

28. Taketomi Y, Ueno N, Kojima T, Sato H, Murase R, Yamamoto K, Tanaka S, Sakanaka M, Nakamura M, Nishito Y, Kawana M, Kambe N, Ikeda K, Taguchi R, Nakamizo S, Kabashima K, Gelb MH, Arita M, Yokomizo T, Nakamura M, Watanabe K, Hirai H, Nakamura M, Okayama Y, Ra C, Aritake K, Urade Y, Morimoto K, Sugimoto Y, Shimizu T, Narumiya S, Hara S, Murakami M. Mast cell maturation is driven via a group III phospholipase A2-prostaglandin D2-DP1 receptor paracrine axis. *Nat Immunol.* 2013;14(6):554-563.
29. Lantz CS, Boesiger J, Song CH, Mach N, Kobayashi T, Mulligan RC, Nawa Y, Dranoff G, Galli SJ. Role for interleukin-3 in mast-cell and basophil development and in immunity to parasites. *Nature.* 1998;392(6671):90-93.
30. Tsuchiya S, Tachida Y, Segi-Nishida E, Okuno Y, Tamba S, Tsujimoto G, Tanaka S, Sugimoto Y. Characterization of gene expression profiles for different types of mast cells pooled from mouse stomach subregions by an RNA amplification method. *BMC Genomics.* 2009;10:35
31. Moon TC, St Laurent CD, Morris KE, Marcet C, Yoshimura T, Sekar Y, Befus AD. Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal Immunol.* 2010;3(2):111-128.
32. Gurish MF, Austen KF. Developmental origin and functional specialization of mast cell subsets. *Immunity.* 2012;37(1):25-33.
33. Minegishi N, Ohta J, Suwabe N, Nakauchi H, Ishihara H, Hayashi N, Yamamoto M. Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. *J Biol Chem.* 1998;273(6):3625-3634.
34. Nagai T, Harigae H, Ishihara H, Motohashi H, Minegishi N, Tsuchiya S, Hayashi N, Gu L, Andres B, Engel JD, et al. Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human

- leukemia-derived cell lines. *Blood*. 1994;**84**(4):1074-1084.
35. Tsai FY, Keller G, Kuo FC, Weiss M, Chen J, Rosenblatt M, Alt FW, Orkin SH. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. *Nature*. 1994;371(6494):221-226.
 36. Tsai FY and Orkin SH. Transcription factor GATA-2 is required for proliferation/survival of early hematopoietic cells and mast cell formation, but not for erythroid and myeloid terminal differentiation. *Blood*. 1997;**89**(10):3636-3643.
 37. Ohmori S, Takai J, Ishijima Y, et al. Regulation of GATA factor expression is distinct between erythroid and mast cell lineages. *Mol Cell Biol*. 2012;**32**(23):4742-4755.
 38. Masuda A, Hashimoto K, Yokoi T, et al. Essential role of GATA transcriptional factors in the activation of mast cells. *J Immunol*. 2007;**178**(1):360-368.
 39. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;**93**(22):12355-12358.
 40. Maeda K, Nishiyama C, Tokura T, et al. Regulation of cell type-specific mouse Fc epsilon RI beta-chain gene expression by GATA-1 via four GATA motifs in the promoter. *J Immunol*. 2003;**170**(1):334-340.
 41. Nishiyama C, Yokota T, Okumura K, Ra C. The transcription factors Elf-1 and GATA-1 bind to cell-specific enhancer elements of human high-affinity IgE receptor alpha-chain gene. *J Immunol*. 1999;**163**(2):623-630.
 42. Zon LI, Gurish MF, Stevens RL, et al. GATA-binding transcription factors in mast cells regulate the promoter of the mast cell carboxypeptidase A gene. *J Biol Chem*. 1991;**266**(34):22948-22953.

43. Ohneda K, Moriguchi T, Ohmori S, et al. Transcription factor GATA1 is dispensable for mast cell differentiation in adult mice. *Mol Cell Biol.* 2014;**34**(10):1812-1826.
44. Walsh JC, DeKoter RP, Lee HJ, et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. *Immunity.* 2002;**17**(5):665-676.
45. Salmon JM, Slater NJ, Hall MA, et al. Aberrant mast-cell differentiation in mice lacking the stem-cell leukemia gene. *Blood.* 2007;**110**(10):3573-3581.
46. Mukai K, BenBarak MJ, Tachibana M, et al. Critical role of P1-Runx1 in mouse basophil development. *Blood.* 2012;**120**(1):76-85.
47. Tshori S and Nechushtan H. Mast cell transcription factors--regulators of cell fate and phenotype. *Biochim Biophys Acta.* 2012;**1822**(1):42-48.
48. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;**94**(2):569-574.
49. Dahl R, Walsh JC, Lancki D, et al. Regulation of macrophage and neutrophil cell fates by the PU.1:C/EBPalpha ratio and granulocyte colony-stimulating factor. *Nat Immunol.* 2003;**4**(10):1029-1036.
50. Charles MA, Saunders TL, Wood WM, et al. Pituitary-specific Gata2 knockout: effects on gonadotrope and thyrotrope function. *Mol Endocrinol.* 2006;**20**(6):1366-1377.
51. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* 2004;**21**(6):853-863.
52. Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells.

- Blood. 1993;**81**(11):2844-2853.
53. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol*. 2003;**31**(11):1007-1014.
54. Morita S, Kojima T, Kitamura T. Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther*. 2000;**7**(12):1063-1066.
55. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 2008;**83**(1):64-70.
56. Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol*. 1979;**9**(4):301-306.
57. Austyn JM and Gordon S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol*. 1981;**11**(10):805-815.
58. Hume DA, Robinson AP, MacPherson GG, Gordon S. The mononuclear phagocyte system of the mouse defined by immunohistochemical localization of antigen F4/80. Relationship between macrophages, Langerhans cells, reticular cells, and dendritic cells in lymphoid and hematopoietic organs. *J Exp Med*. 1983;**158**(5):1522-1536.
59. Ford AM, Bennett CA, Healy LE, Towatari M, Greaves MF, Enver T. Regulation of the myeloperoxidase enhancer binding proteins Pu1, C-EBP alpha, -beta, and -delta during granulocyte-lineage specification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;**93**(20):10838-10843.
60. Migliaccio, A.R., Rana, R.A., Sanchez, M., Lorenzini, R., Centurione, L., Bianchi, L., Vannucchi, A.M., Migliaccio, G., and Orkin, S.H.. GATA-1 as a regulator of mast cell differentiation revealed by the phenotype of the

- GATA-1low mouse mutant. *J. Exp. Med.* 2003;**197**(3):281–296.
61. Kitamura, Y., Morii, E., Jippo, T., and Ito, A. Regulation of mast cell phenotype by MITF. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2002;**127**(2):106–109.
62. Takemoto, C.M., Lee, Y.-N., Jegga, A.G., Zablocki, D., Brandal, S., Shahlaee, A., Huang, S., Ye, Y., Gowrisankar, S., Huynh, J., and McDevitt, M.A. Mast cell transcriptional networks. *Blood Cells Mol. Dis.* 2008;**41**(1):82–90.
63. Iwasaki H, Mizuno S, Arinobu Y, et al. The order of expression of transcription factors directs hierarchical specification of hematopoietic lineages. *Genes Dev.* 2006;**20**(21):3010-3021.
64. Poorafshar M, Helmby H, Troye-Blomberg M, Hellman L. MMCP-8, the first lineage-specific differentiation marker for mouse basophils. Elevated numbers of potent IL-4-producing and MMCP-8-positive cells in spleens of malaria-infected mice. *Eur J Immunol.* 2000;**30**(9):2660-2668.
65. Brown MA, Pierce JH, Watson CJ, Falco J, Ihle JN, Paul WE. B cell stimulatory factor-1/interleukin-4 mRNA is expressed by normal and transformed mast cells. *Cell.* 1987;**50**(5):809-818.
66. Gutierrez L, Nikolic T, van Dijk TB, et al. Gata1 regulates dendritic-cell development and survival. *Blood.* 2007;**110**(6):1933-1941.
67. Dyer KD, Moser JM, Czapiga M, Siegel SJ, Percopo CM, Rosenberg HF. Functionally competent eosinophils differentiated ex vivo in high purity from normal mouse bone marrow. *J Immunol.* 2008;**181**(6):4004-4009.
68. Fleetwood AJ, Dinh H, Cook AD, Hertzog PJ, Hamilton JA. GM-CSF- and M-CSF-dependent macrophage phenotypes display differential dependence on type I interferon signaling. *J Leukoc Biol.* 2009;**86**(2):411-421.
69. de la Luz Sierra M, Sakakibara S, Gasperini P, et al. The transcription

- factor Gfi1 regulates G-CSF signaling and neutrophil development through the Ras activator RasGRP1. *Blood*. 2010;**115**(19):3970-3979.
70. Motakis E, Guhl S, Ishizu Y, et al. Redefinition of the human mast cell transcriptome by deep-CAGE sequencing. *Blood*. 2014;**123**(17):e58-67.
71. Guo H, Ma O, Speck NA, Friedman AD. Runx1 deletion or dominant inhibition reduces Cebpa transcription via conserved promoter and distal enhancer sites to favor monopoiesis over granulopoiesis. *Blood*. 2012;**119**(19):4408-4418.
72. Rao KN, Smuda C, Gregory GD, Min B, Brown MA. Ikaros limits basophil development by suppressing C/EBP-alpha expression. *Blood*. 2013;**122**(15):2572-2581.
73. Guo H, Ma O, Friedman AD. The Cebpa +37-kb enhancer directs transgene expression to myeloid progenitors and to long-term hematopoietic stem cells. *J Leukoc Biol*. 2014;**96**(3):419-426.

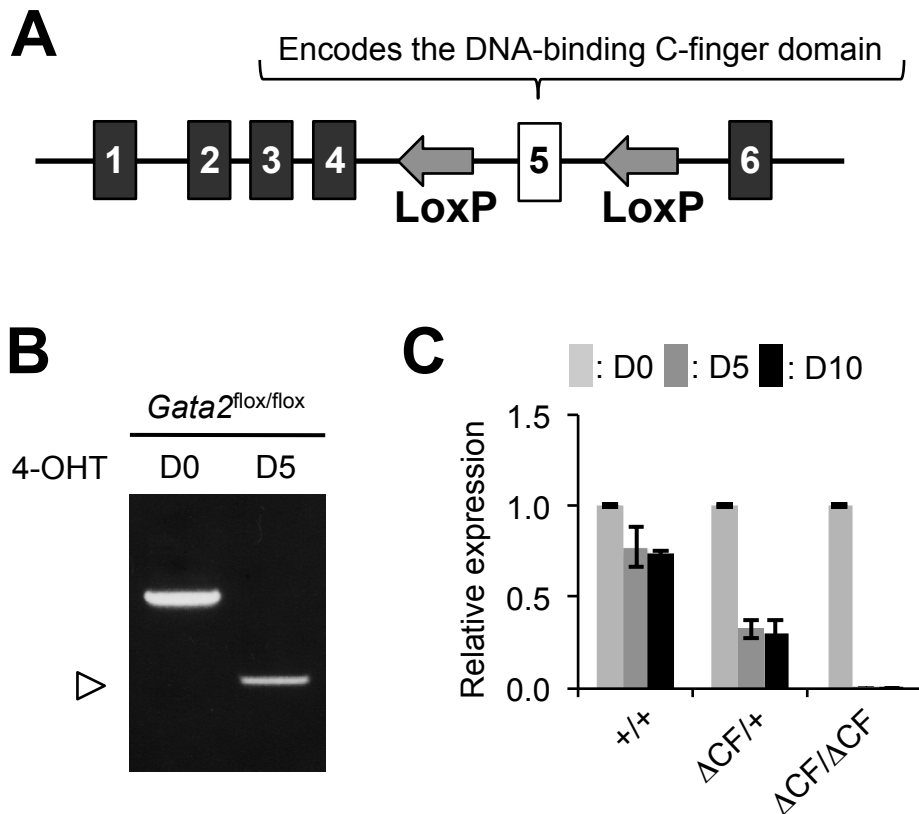


図6 Cre recombinase による *Gata2* 遺伝子組み換え

(A) 本研究で用いた *Gata2*^{flox/flox} マウスの *Gata2* 遺伝子座の模式図。数字はエクソンを示す。(B) 4-OHT 処理前 (D0) と 5 日後 (D5) の *Gata2*^{flox/flox}-BMMCs からゲノム DNA を抽出し、PCR を行った。白三角は第 5 エクソンを欠失した *Gata2* 遺伝子座由来の PCR 産物を示す。(C) 4-OHT 処理前 (D0)、5 日後 (D5)、10 日後 (D10) における GATA2 mRNA の発現。第 5 エクソンに設計したプライマーセットを用いて Q-PCR を行った。+/+ ; *Gata2*^{+/+}::*Rosa26CreERT2* マウス由来の BMMCs。ΔCF/+ ; *Gata2*^{flox/+}::*Rosa26CreERT2* マウス由来の BMMCs。ΔCF/ΔCF ; *Gata2*^{flox/flox}::*Rosa26CreERT2* マウス由来の BMMCs。

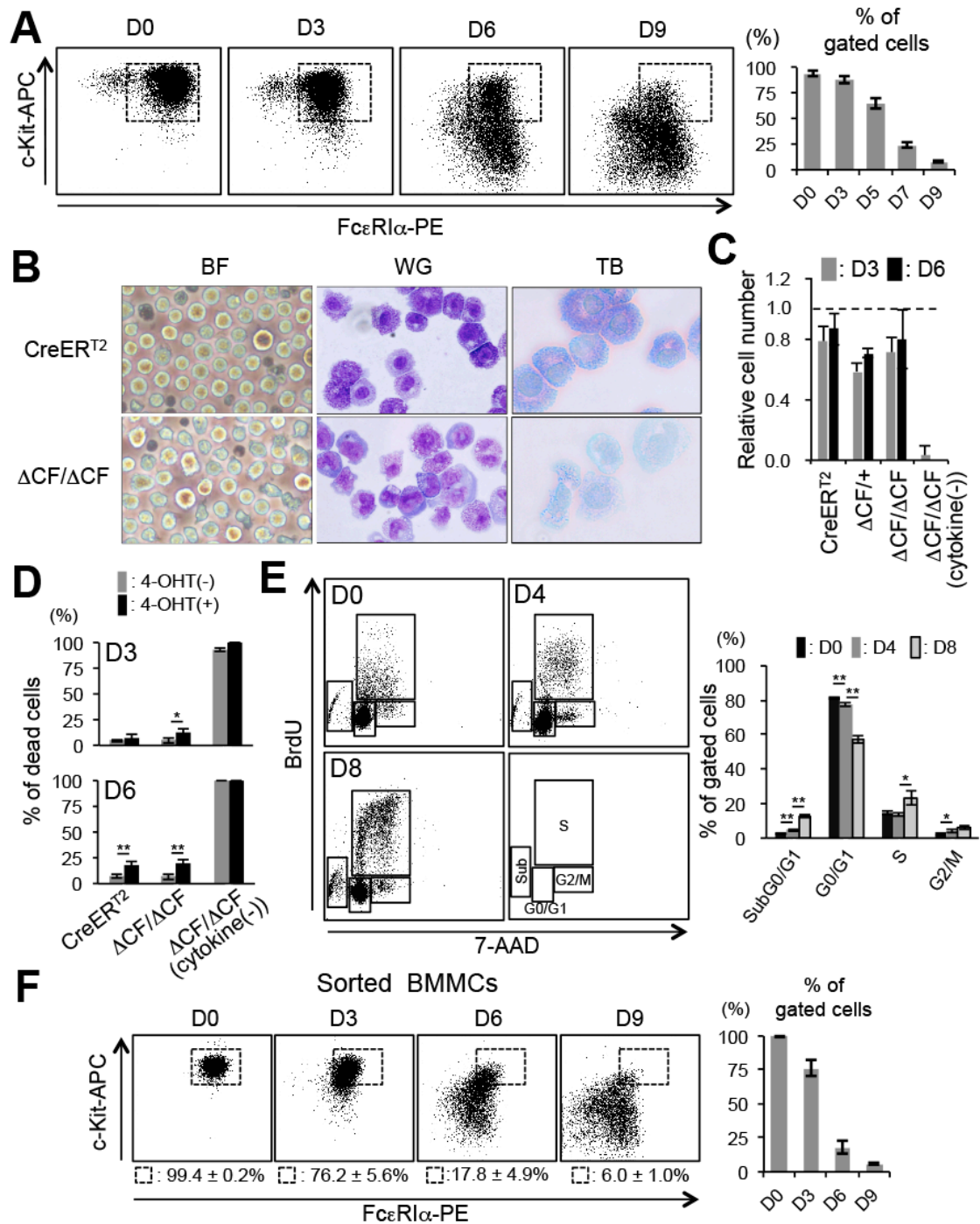
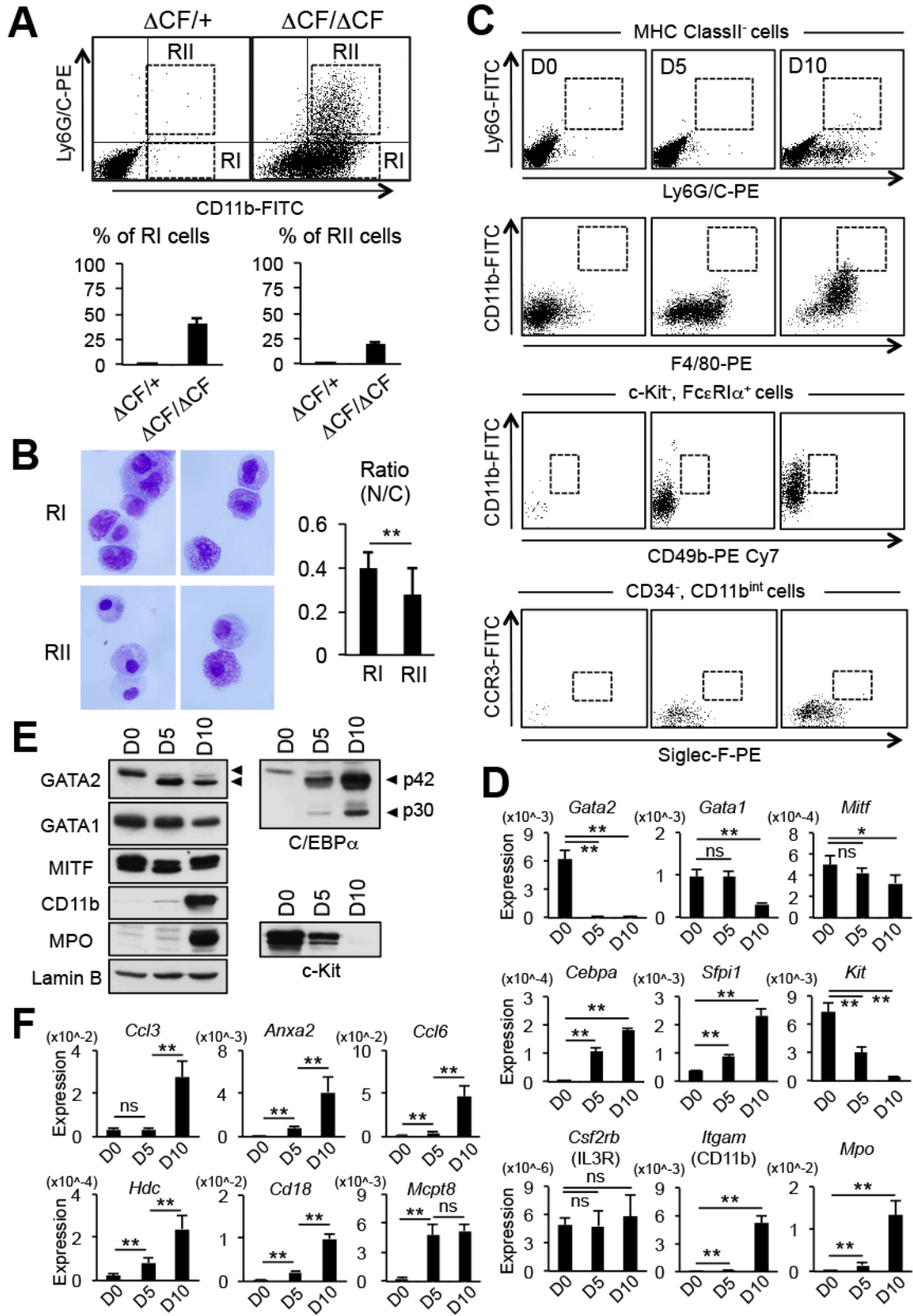


図7 GATA2欠失によりマスト細胞の分化形質が失われる

(A) (左) *Gata2*欠失後のBMDCsにおけるマスト細胞マーカーの発現変化をFCMによって経時的に解析した。D0、D3、D6、D9は、4-OHT処理後の経過日数を示す。(右) 左図の破線枠内の細胞の割合(%)。N=9。(B) 4-OHT (0.5

μM) 処理後 10 日目における細胞の形態。CreER^{T2}; *Gata2*^{+/+}::*Rosa26CreER*^{T2} マウス由来の BMMCs。 $\Delta\text{CF}/\Delta\text{CF}$; *Gata2*^{flx/flx}::*Rosa26CreER*^{T2} マウス由来の BMMCs。(左) BF; 位相差観察画像。倍率: 200 倍。(中、右) サイトスピン標本のライト・ギムザ (WG) 染色像 (中) とトルイジンブルー (TB) 染色像 (右) を示す。倍率: 各 400 倍。(C) 各遺伝子型の細胞増殖に対する影響。灰色棒は 4-OHT 処理 3 日後、黒色棒は 4-OHT 処理 6 日後の細胞数を、それぞれ 4-OHT 処理前の細胞数を 1 として示した。Cytokine(-); IL-3 と SCF を添加していない条件で培養したもの。(D) 各遺伝子型の細胞死に対する影響。灰色棒; 4-OHT 処理なし。黒色棒; 4-OHT 処理あり。4-OHT 処理開始から 3 日目と 6 日目における死細胞の割合を示す。(E) (左) *Gata2*^{flx/flx}::*Rosa26CreER*^{T2} マウス由来の BMMCs に 4-OHT 処理を行い、各経過日数 (D0、D4、D8) における BrdU の取り込みを FCM で解析した。(右); 実線で囲まれた各領域に含まれる細胞の割合。*; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 。N=4。(F) (左) セルソーターで分取した *Gata2*^{flx/flx}-BMMCs 由来 DP 細胞に対して 4-OHT 処理を行い、FCM 解析を行なった。(右) 左図破線枠内の細胞の割合。N=4。



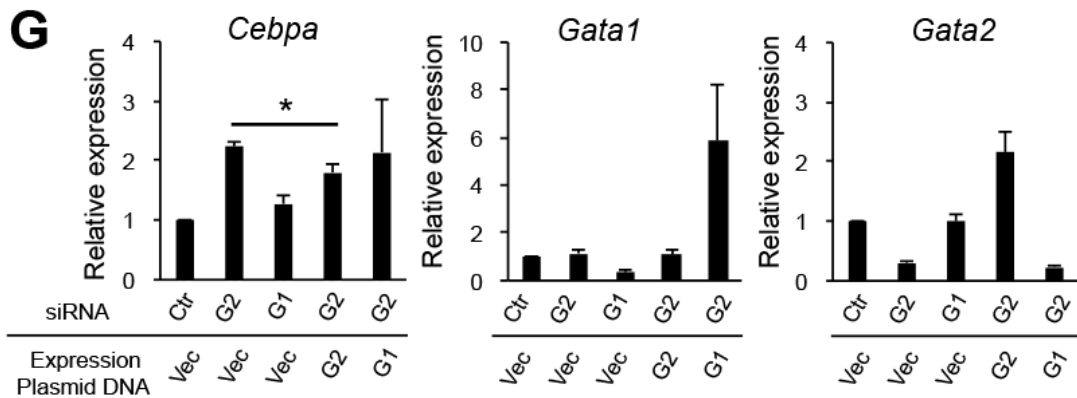
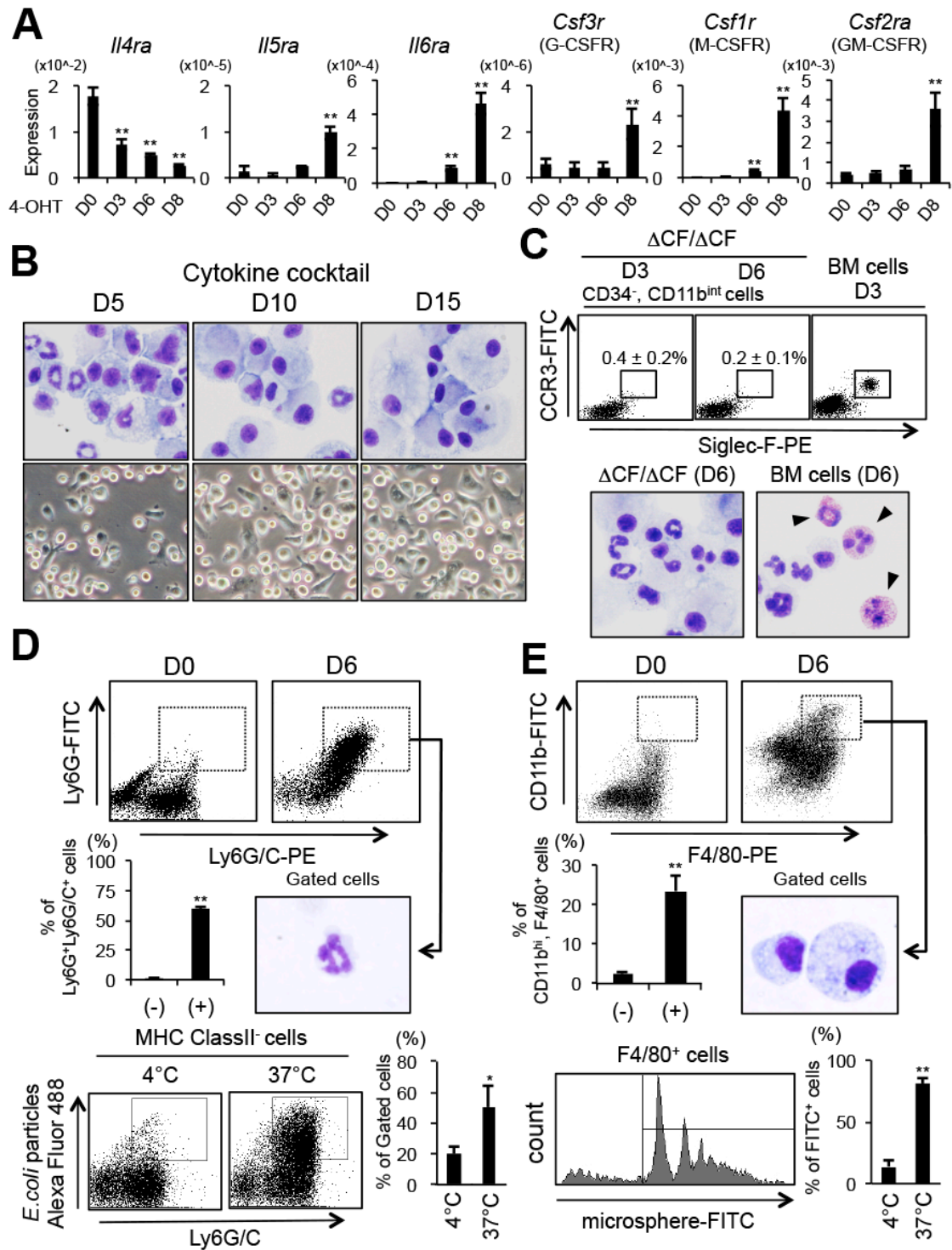


図8 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は未熟な骨髓球の形質を示す

(A) 上段; 4-OHT 処理後 10 日目における骨髓球マーカーを用いた FCM 解析。RI は CD11b(+)/Ly6G/C(-)細胞、RII は CD11b(+)/Ly6G/C(+)細胞を示す。下段左 ; RI 分画に含まれる細胞の割合 (Δ CF/+BMMCs ; $0.2\% \pm 0.2\%$ 、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs ; $40.7\% \pm 5.8\%$)。下段右 ; RII 分画に含まれる細胞の割合 (Δ CF/+BMMCs ; $0.3\% \pm 0.1\%$ 、 Δ CF/ Δ CF-BMMCs ; $19.7\% \pm 1.5\%$)。N=4。

(B) 左パネル ; RI 分画または RII 分画に含まれる細胞のライト・ギムザ染色。倍率 ; 400 倍。右グラフ ; RI 分画と RII 分画に含まれる各細胞の N/C 比。N=30。

(C) Δ CF/ Δ CF-BMMCs における分化系列マーカーの発現。D0、D5、D10 は、4-OHT 処理後の経過日数を示す。MHC classII(-)/Ly6G(+)/Ly6G/C(+); 好中球、CD11b(high)/F4/80(+); マクロファージ、c-Kit(-)/FcεRIα(+)/CD11b(int)/CD49b(+); 好塩基球、CD34(-)/CD11b(int)/CCR3(+)/Siglec-F(+); 好酸球、を解析した。(D) Q-PCR による Δ CF/ Δ CF-BMMCs の遺伝子発現解析。N=4。(E) ウェスタンブロッティング法による Δ CF/ Δ CF-BMMCs の経時的なタンパク質発現解析。Lamin-B はローディングコントロールとして用いた。左側の黒矢印は、野生型 GATA2 タンパク質と Δ CF-GATA2 タンパク質を、右側の黒矢印は、C/EBPα のアイソフォームである p42・p30 を示す。(F) Δ CF/ Δ CF-BMMCs の好塩基球関連遺伝子の発現解析。N=4。(G) siRNA による GATA 因子のノックダウン実験。野生型 BMMCs に対し、siRNA (2 μ M) または発現プラスミド DNA (2 μ g) を電ポレーション法により導入し、24 時間後に細胞を回収した。Ctrl ; コントロール siRNA。G2 ; *Gata2* siRNA または GATA2 発現プラスミド DNA。G1 ; *Gata1* siRNA または GATA1 発現プラスミド DNA。Vec ; 発現プラスミド DNA。N=4。* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 。ns ; not significant。



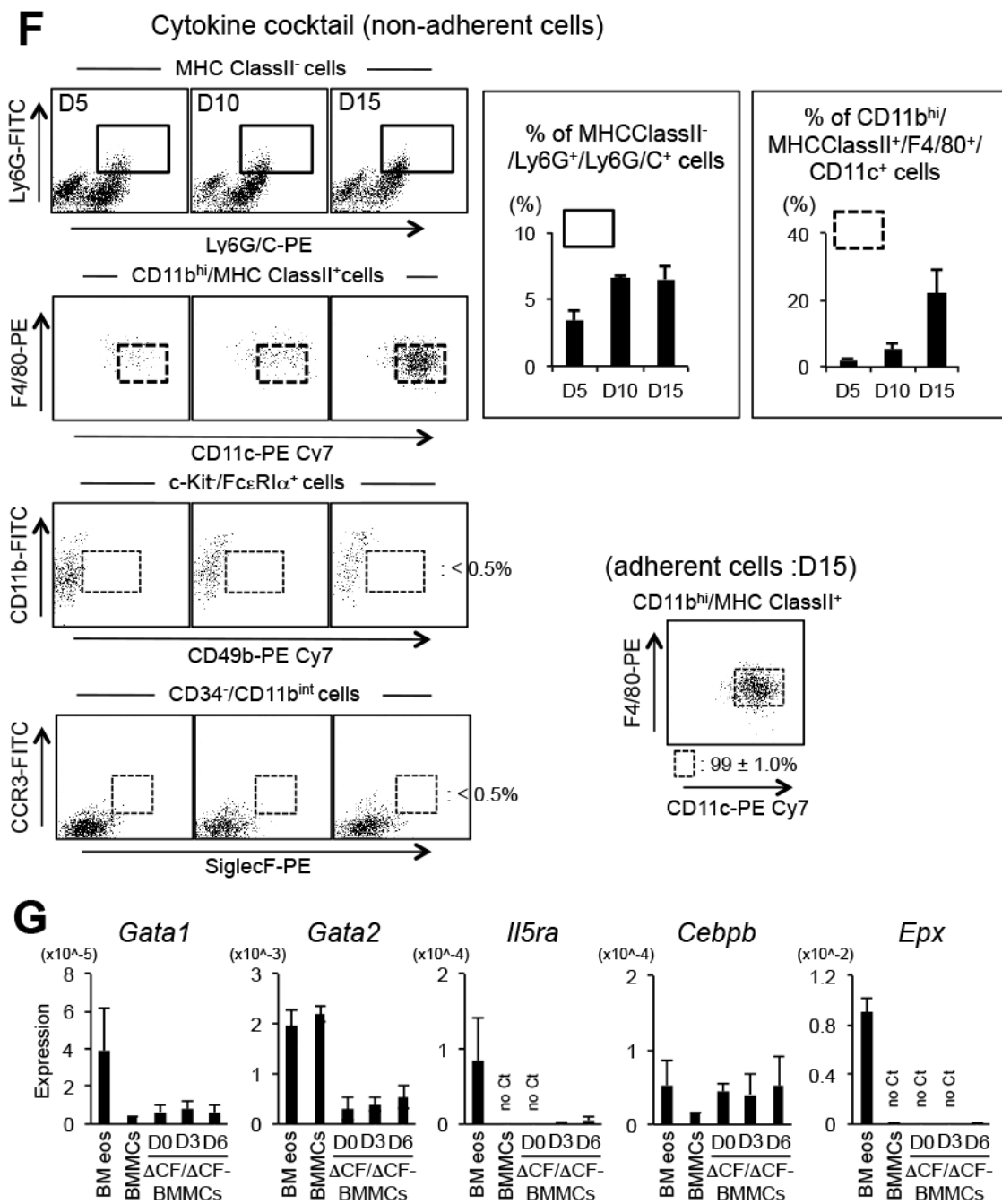


図9 GATA2欠失BM MCsは、機能的な好中球様、マクロファージ様の細胞に分化するが好酸球様の細胞には分化しない

(A) ΔCF/ΔCF-BM MCsにおける骨髓球系サイトカイン受容体の発現。D0、D3、D6、D8は、4-OHT処理後の経過日数を示す。N=4。(B) サイトカインカ

クテル添加後 5 日目 (D5)、10 日目 (D10)、15 日目 (D15) における位相差観察画像 (接着細胞、倍率: 各 200 倍) と、サイトスピン標本の Diff-Quick 染色 (浮遊細胞、倍率: 各 400 倍)。 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は 4-OHT 処理後 10 日目の細胞を用いた。(C) Δ CF/ Δ CF-BMMCs または骨髓細胞 (BM cells) に IL-5 (20 ng/ml) 添加して培養した。上段; 添加後 3 日目 (D3) と 6 日目 (D6) における FCM 解析。N=3。下段; 6 日後に作成したサイトスピン標本の Diff-quick 染色。黒三角は顆粒が染色された好酸球を示す (倍率: 各 400 倍)。(D) Δ CF/ Δ CF-BMMCs を IL-3 (10 ng/ml) と G-CSF (10 ng/ml) を添加して培養した。上段; サイトカイン添加前 (D0) と 6 日後 (D6) の FCM 解析。中段; G-CSF 添加後 6 日目における破線内 (Ly6G(+)/Ly6G/C(+)) の細胞の割合と、分取した細胞のライト・ギムザ染色像。(倍率: 400 倍) 下段; MHC class II(-)Ly6G/C(+)細胞のファゴサイトーシスアッセイ。サイトカイン添加後 6 日目に Alexa Fluor 488-conjugated *E. coli* bioparticles を添加し、4°C または 37°C で培養した。フローサイトメトリーを用いて MHC class II 陰性細胞について解析した結果を示す。右グラフ; 破線内に含まれる貪食細胞の割合を示す。(E) Δ CF/ Δ CF-BMMCs を、IL-3 (10 ng/ml) と M-CSF (10 ng/ml) で培養した。上段; サイトカイン添加前 (D0) と 6 日後 (D6) の FCM 解析。中段; M-CSF 添加後 6 日目における破線内 (CD11b(high)/F4/80(+)) の細胞の割合と、分取した細胞のライト・ギムザ染色像。(倍率: 400 倍) 下段; F4/80 陽性細胞のファゴサイトーシスアッセイ。サイトカイン添加後 6 日目に microsphere-FITC を添加し、4°C または 37°C で培養した。フローサイトメトリーを用いて F4/80 陽性細胞について解析した結果を示す。右グラフ; 陽性領域内に含まれる貪食細胞の割合を示す。(F) 左パネル; (B) で示した細胞の分化系列マーカーを用いた FCM 解析。右上; 実線または破線で示す分画内に含まれる細胞の割合。N=4。右下; サイトカインカクテル添加後 15 日目 (D15) の Δ CF/ Δ CF-BMMCs (接着細胞) を用いた FCM 解析。N=4。(G) Q-PCR による好酸球関連遺伝子の mRNA 発現解析。BM eos; 骨髓由来好酸球。BMMCs; 野生型 BMMCs。骨髓由来好酸球 (BM eos) は、IL-5 添加後 6 日目の細胞を用いた。 Δ CF/ Δ CF-BMMCs は、IL-5 添加前 (D0)、3 日目 (D3)、6 日目 (D6) のサンプルを用いた。no Ct; 検出限界以下。N=3。

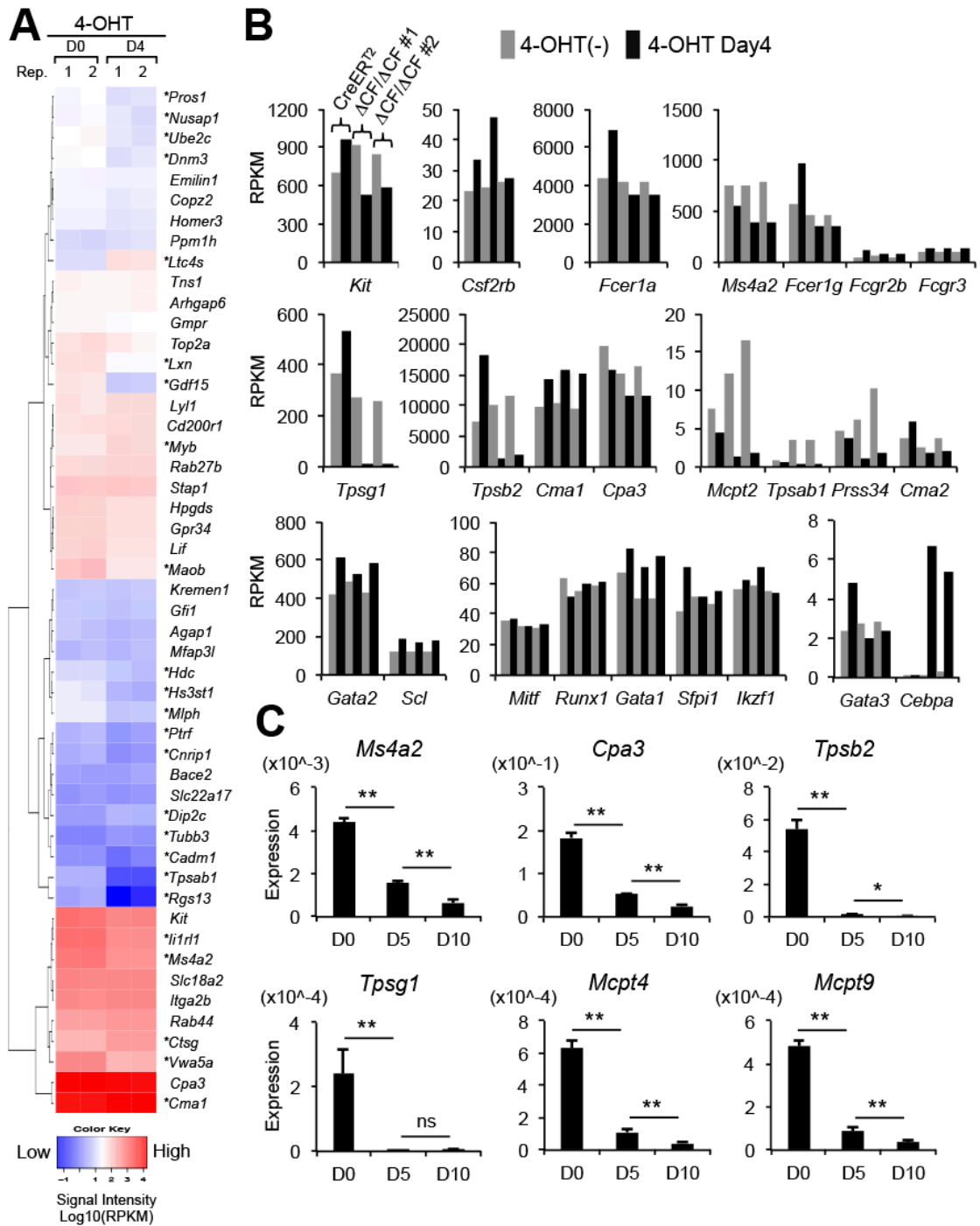


図 10 Δ CF/ Δ CF-BMBCs の網羅的な遺伝子発現解析

(A) GATA2 欠失前 (D0) と欠失後 (D4) における、ヒトマスト細胞関連遺伝子の発現。RPKM 値は異なる 2 個体由来の Δ CF/ Δ CF-BMBCs から得た値を

示す (Rep. 1/2)。赤；相対的に RPKM 値が高い遺伝子を示す。青；相対的に RPKM 値が低い遺伝子を示す。白；相対的に RPKM 値が中程度の遺伝子を示す。*；4-OHT 処理前の RPKM 値に対する 4-OHT 処理後 4 日目の RPKM 値の比が、0.5 以下または 0.5 以上となった遺伝子を示す。(B) マスト細胞関連遺伝子の発現解析。灰色は 4-OHT 処理前の RPKM 値、黒色は 4-OHT 処理後の RPKM 値を示す。(C) Q-PCR による $\Delta CF/\Delta CF$ -BMMCs でのマスト細胞関連遺伝子の発現。D0、D5、D10 は、4-OHT 処理後の経過日数を示す。*； $P < 0.05$ 、**； $P < 0.01$ 。N=4。

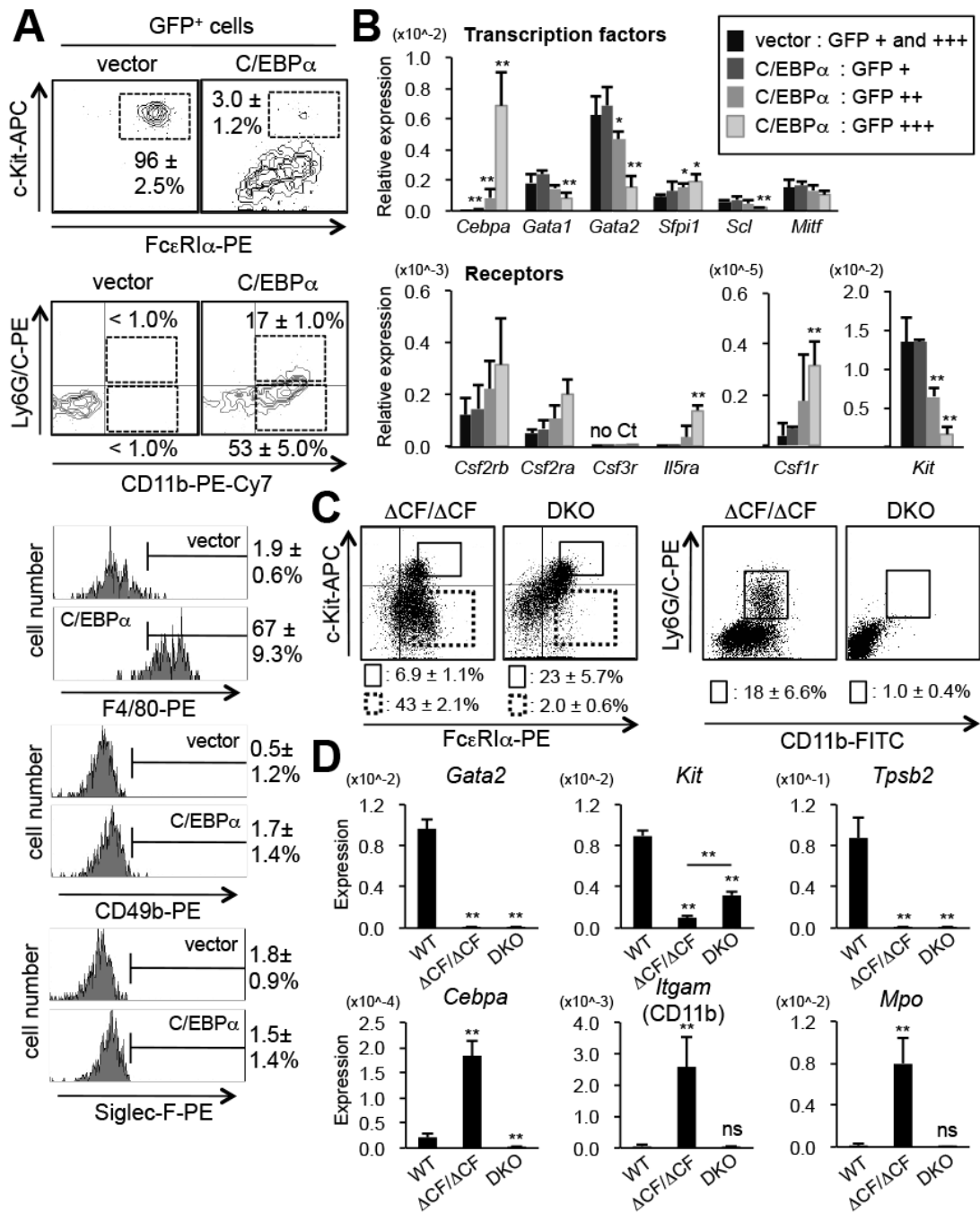
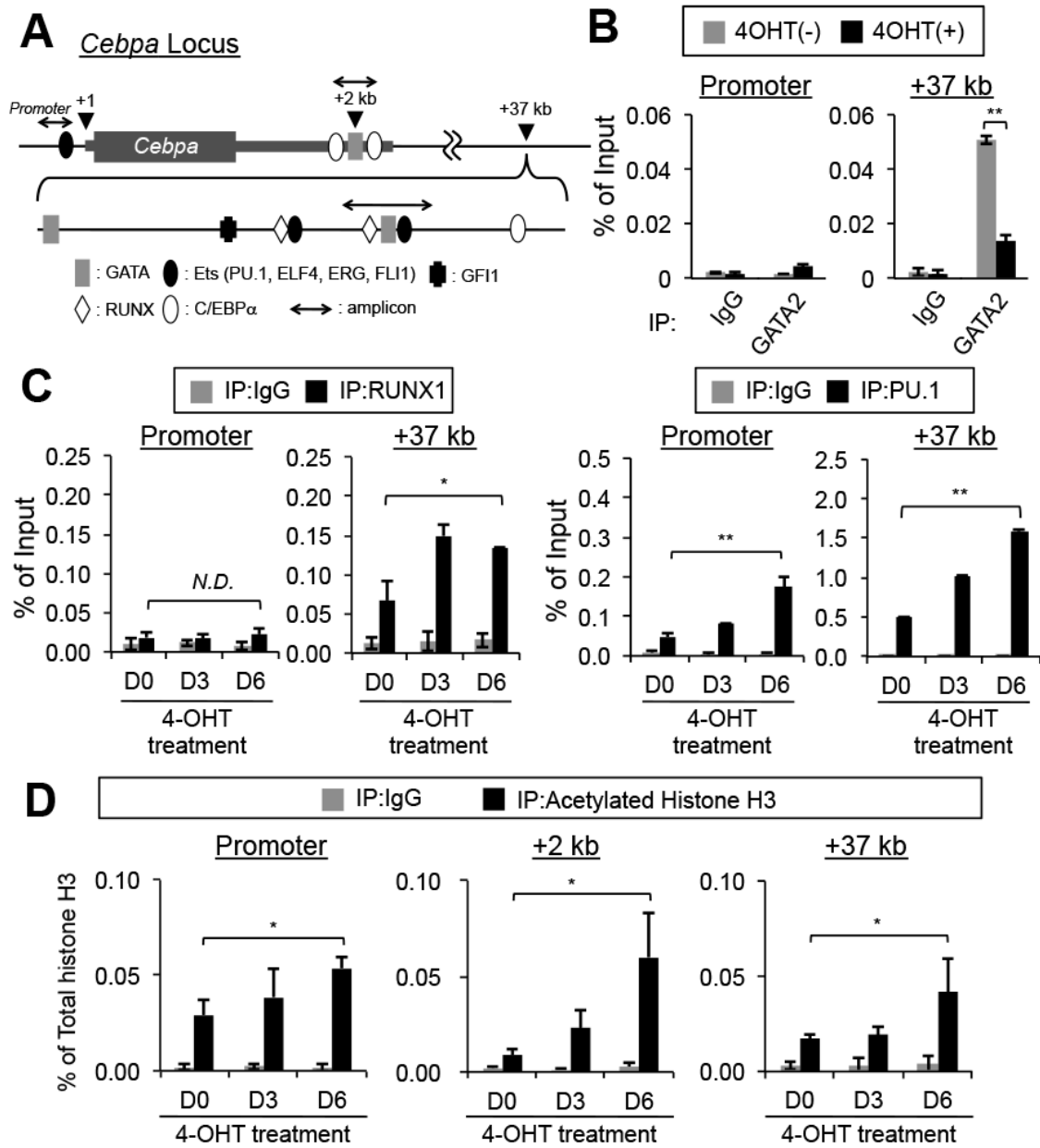


図 1 1 C/EBP α を過剰発現したBMMCsは、 Δ CF/ Δ CF-BMMCsの表現型を再現する

(A) C/EBP α 過剰発現BMMCsのFCM解析。pMXs IG vector (vector) 17またはpMXs IG *Cebpa* (C/EBP α) を用いて作出したレトロウイルスを用いて野生型BMMCsに導入し、GFP陽性となった細胞のみを解析した。(B) 発現プラス

ミトDNAによりC/EBP α を過剰発現したBMMCsのmRNA発現解析。上段；転写因子。下段；サイトカイン受容体。野生型BMMCsに対し、pBAT12 IRES eGFP vector (vector) またはpBAT12 *Cebpa* IRES eGFP (C/EBP α) を導入し、GFPの発現強度別に細胞を分取し解析した。vector (コントロール) はGFPを発現する全ての細胞を分取しサンプルとした。* ; $P<0.05$ 、** ; $P<0.01$ 。N=4。(C) 4-OHT 処理後9日目における Δ CF/ Δ CF-BMMCsと Δ CF/ Δ CF::*Cebpa*^{-/-} double-knockout (DKO) BMMCsのFCM解析。実線枠内と破線枠内の細胞の割合を平均 \pm 標準偏差で示した。N=4。(D) 4-OHT 処理後9日目の Δ CF/ Δ CF-BMMCsとDKO-BMMCsの遺伝子発現解析。WT ; 野生型BMMCsを示す。* ; $P<0.05$ 、** ; $P<0.01$ 。N=4。ns ; not significant



E

```

mouse TGCCCCCCC-CATGCCCTGACTACCGGCGACCACAGGAAGTGCTGCCCTAGCTCAGTACT
||||| ||||| || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
human TGCCCCCCTGATGCCCTGCCTGCCG-CGACCACAGGAAGCACTGCCCCAGCTCAGCACT

mouse TCCCGTTTCTGAAATCTGCCCCAGCAGCCTGGTGGCCAGGGAAGGCAGACTTCCCGCTG
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
human TCCCTTTTCTGAAATCTGCCCCAGCAGCCGGTGGCCAGGGAAGACAGACTTCCCGCTG

mouse CCTCCACCCTGGGCTCTTCCACCAGGTCACAAGTGGTTTGTTCCT-----GGGTA
|| || ||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
human CC-CC-CCCCGGGCTCTTCCACCAGGTCACAAGTGGTTTGTTCCTGAGCTTCCCTGGGCA

mouse GAGGTGACCTTCTTGCCACAACCACACATCAGTTATTTATCAGAACAGGAAAGATGGCAC
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
human GAGGTGACCTTCTTGCCACAACCACAGATCAGTTATTTATCAGAACAGGAAAGATGGCAC

mouse CAGAGATATGTCCTACCCCGCCCAGGAGGGCCTGACCTGCTCCAACGACCACACTCCTG
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
human CAGAGATATGTCCTACCCCGCCCAGGAGGGCCTGGCCTGCTCCAACGACCACAGCCCCG

mouse TTCCCCACATCACACGGGGCCTGCTCACCACATCACATAGAGG-G-GTGTGGCTGGCACG
||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
human TTCCCCACATCATACGGGGCCTGCTCACCACATCACACAGACGTGCGTGTGGCTGGCGCG

mouse TGCCAGCGGGGCTGCATTGTGGGGTGGGCAGAGCAGGAGGTCTGGTGGGCAGGTATGGT
|| || ||||| || ||| ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || |||||
human TGTGTGCAGGGCTGCACCA-GGGAG-GGGCCGGTGGGAGGCCTCGTGGGCAGATCGGGT

```

図 1 2 GATA2 は *Cebpa* +37 kb に結合する

(A) マウス *Cebpa* 遺伝子座の模式図。各転写因子の結合配列部位を示す。矢印は PCR 産物の領域 (Promoter、+2 kb、+37 kb) を示す。(B) ChIP assay による Promoter、+37 kb への GATA2 の結合解析。灰色 ; 4-OHT 処理前。黒色 ; 4-OHT 処理後 3 日目。IgG ; ネガティブコントロール。N=4。(C) ChIP assay による *Cebpa* Promoter または +37 kb 領域に対する RUNX1(左)と PU.1(右) の結合。サンプルは、4-OHT 添加前 (D0)、3 日目 (D3)、6 日目 (D6) の *Gata2*^{flx/flx}-BMMCs を用いた。(D) *Gata2* 欠失による *Cebpa* 遺伝子座のアセチル化への影響。*Cebpa* Promoter、+2 kb、+37 kb 領域について pan-anti-acetylated histone H3 抗体を用いて ChIP assay を行った。サンプルは、4-OHT 添加前 (D0)、3 日目 (D3)、6 日目 (D6) の *Gata2*^{flx/flx}-BMMCs を用いた。IgG ; ネガティブコントロール。N=4。* ; $P < 0.05$ 、** ; $P < 0.01$ 。(E) ヒトとマウスにおける *Cebpa* +37 kb 領域のアライメントと RUNX1、GATA1、PU.1 の結合配列。矢印は ChIP assay に用いたプライマーセットを示す。

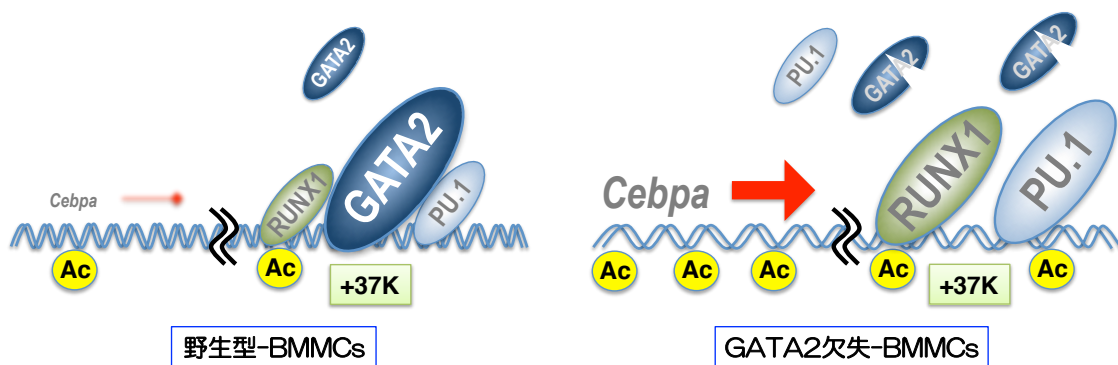


図 1 3 BMMCs における GATA2 による *Cebpa* 転写抑制機構の仮説
 (左) 野生型-BMMCs では、*Cebpa* 遺伝子座の+37 k 領域に GATA2 が結合することにより、RUNX1 と PU.1 による転写活性を拮抗的に阻害している。(右) GATA2 欠失-BMMCs では、*Cebpa* 遺伝子座の+37 k 領域に GATA2 が結合できないため、RUNX1 と PU.1 の結合が増加する。その結果、*Cebpa* 遺伝子座が広くアセチル化され、*Cebpa* の転写が亢進する。

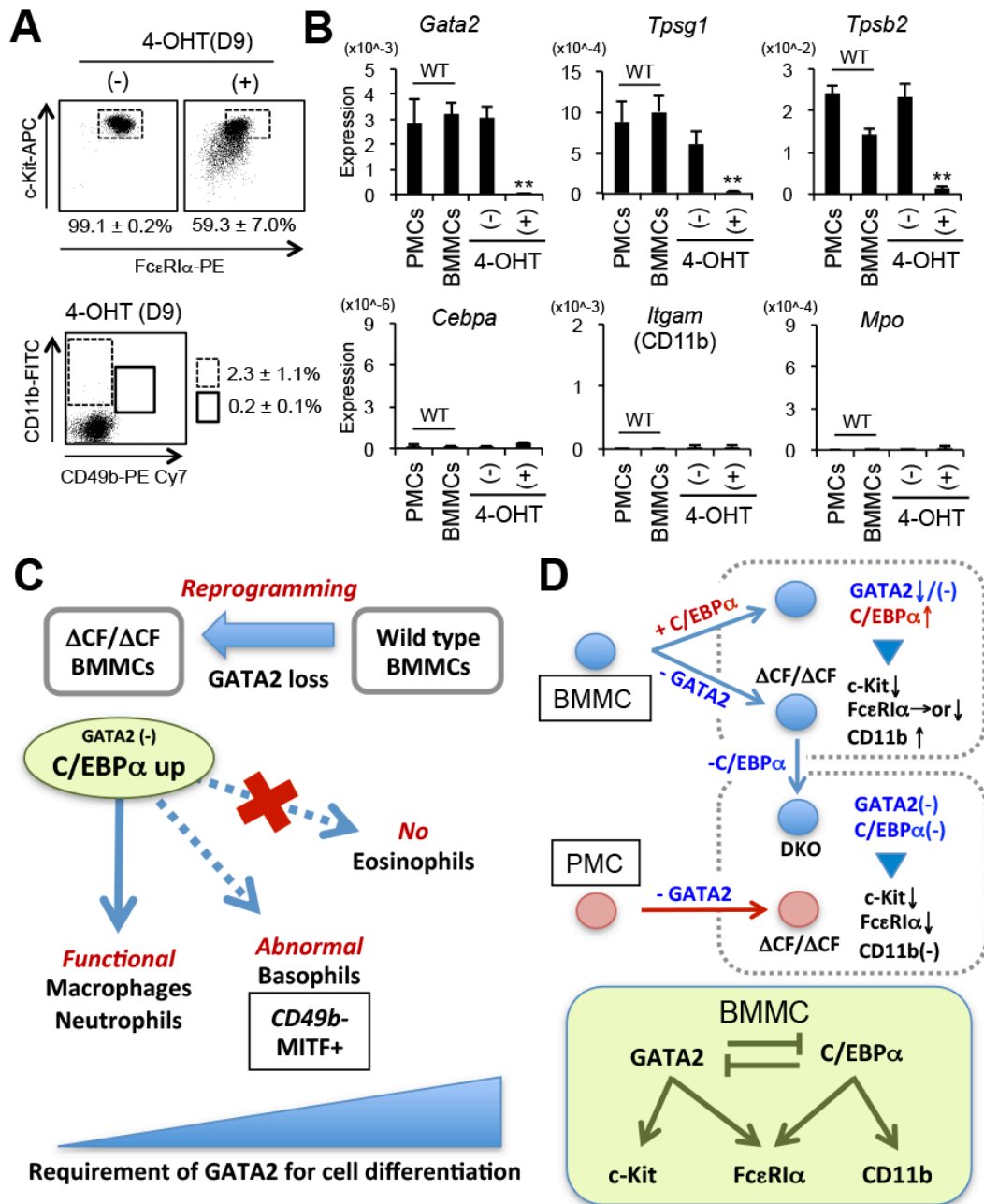


図 1 4 ΔCF/ΔCF-PMCs では *Cebpa* の発現上昇が起こらない

(A) ΔCF/ΔCF-PMCs における FCM 解析。 *Gata2*^{flx/flx::Rosa26CreER^{T2}} マウスから腹腔細胞を採取し、IL-3 と SCF で 14 日間培養後、4-OHT を添加した。

(-) ; 4-OHT 添加なし。(+) ; 4-OHT 添加後 9 日目。実線枠内と破線枠内の細胞の割合は平均±標準偏差で示した。N=4。(B) ΔCF/ΔCF-PMCs の mRNA 発現解析。PMCs ; IL-3 と SCF で 14 日間培養した野生型マウスから採取した腹腔マスト細胞。BMMCs ; 野生型マウスから作出した BMMCs。N=4。* ; $P < 0.05$ 、

** ; $P < 0.01$ 。(C) 本研究で明らかとなった Δ CF/ Δ CF-BMMCsにおけるリプログラミングと GATA2 の必要性を図で示す。(D) 本研究で明らかとなった BMMCs と PMCs における *Gata2* 欠失と *Cebpa* の発現を図で示す。下段；本研究で明らかとなった BMMCs の分化過程における GATA2 と C/EBP α の転写制御における関係を図で示す。

■ 表

表 1. プライマーセットの配列

gene	Forward primer (5'_3')	Reverse primer (5'_3')	Experiment
18S	aca tcc aag gaa ggc agc ag	tcg tca cta cct ccc cgg	Q-PCR
<i>Gata1</i>	cag aac cgg cct ctc atc c	tag tgc att ggg tgc ctg c-3	Q-PCR
<i>Gata2(ex5/ex6)</i>	gca cct gtt gtg caa att gt	gcc cct ttc ttg ctc ttc tt	Q-PCR
<i>Mitf</i>	gct gga gat gca ggc tag ag	tga tga tcc gat tca cca ga	Q-PCR
<i>Cebpa</i>	aaa gcc aag aag tcg gtg gac	ctt tat ctc ggc tct tgc gc	Q-PCR
<i>Cebpb</i>	atc gac ttc agc ccc tac ct	tag tcg tcg gcg aag agg	Q-PCR
<i>Epx</i>	acc agt tca gga gag cca ga	tga aga tgt ccc tcg aaa cc	Q-PCR
<i>Sfp1</i>	aga agc tga tgg ctt gga gc	gcg aat ctt ttt ctt gct gcc	Q-PCR
<i>Scl</i>	ata gcc tta gcc agc cgc tc	gcc gca cta ctt tgg tgt ga	Q-PCR
<i>kit</i>	agc aat ggc ctc acg agt tct a	cca gga aaa gtt tgg cag gat	Q-PCR
<i>Csf2rb</i>	gaa ggg cag gga cat ctt t	aga ggg aga gcg act gga at	Q-PCR
<i>Itgam</i>	gac tca gtg agc ccc atc at	aga tcg tct tgg cag atg ct	Q-PCR
<i>Mpo</i>	cgg ttc tcc ttc ttc act gg	ctg cca ttg tct tgg aag cg	Q-PCR
<i>Ccl3</i>	cct ctg tca cct gct caa ca	gat gaa ttg gcg tgg aat ct	Q-PCR
<i>Anxa2</i>	ggg gtg aag agg aaa gga ac	ttg atg ctc tcc agc atg tc	Q-PCR
<i>Ccl6</i>	gag gat gag aaa ctc caa gac	agc agc agt ctg aag aag tgt	Q-PCR
<i>Hdc</i>	ttc cag cct cct ctg tct gt	ggt atc cag gct gca cat tt	Q-PCR
<i>Cd18</i>	gtg gtg cag ctc atc aag aa	gcc atg acc ttt acc tgg aa	Q-PCR
<i>Mcpt8</i>	gtg gga aat ccc agt gag aa	gac aac cat acc cca gga tg	Q-PCR
<i>Il4ra</i>	gag tgg agt cct agc atc acg	cag tgg aag gcg ctg tat c	Q-PCR
<i>Il5ra</i>	cat tct gaa gag cag cca tac a	gta acc gag gtt cca gga ga	Q-PCR
<i>Il6ra</i>	gca agt cca gcc aca acg	act cgg gtc cca ggt ctc a	Q-PCR
<i>Csf3r</i>	ggg atc ccc aga gag tgg	gct gct gga gca gtt gtg	Q-PCR
<i>Csf1r</i>	gac tgg aga agc cac tgt cc	cga ggg aga ctc cag cta ca	Q-PCR
<i>Csf2ra</i>	gcg ggc gac acg agg atg aag cac	cta ggg ctg cag gag gtc ctt cct	Q-PCR
<i>Ms4a2</i>	agg cta ccc att ctg ggg tg	ggc tgc ctc tca cca gat ac	Q-PCR
<i>Cpa3</i>	gct aca cat tca aac tgc ctc ct	gag aga gca tcc gtg gca a	Q-PCR
<i>Tpsb2</i>	cga cat tga taa tga cga gcc tc	aca ggc tgt ttt cca caa tgg	Q-PCR
<i>Tpsg1</i>	ggt cac act gtc tcc cca ct	gca tcc cag ggt aga agt ca	Q-PCR
<i>Mcpt4</i>	cat gct ttg ttg aac cca agg	gaa gtg aaa agc ctg acc tgc	Q-PCR
<i>Mcpt9</i>	ggg tgg ccc atg gta ttg ta	cgg gtg aag att gca ggg	Q-PCR
<i>Cebpa promoter</i>	cca aca ttc tct ctc caa acg	ccc act tcc agc caa cac	qChIP
<i>Cebpa +2 kb</i>	ccg ctg ttg ctg aag gaa ctt gaa	tta gca tag acg tgc aca ctg cca	qChIP
<i>Cebpa +37 kb</i>	aca agt ggt ttg ttc ctg gg	gtg gtc gtt gga gca ggt ca	qChIP

表 2. 抗体リスト

Antibody	Clone or Cat#	Application	Dilution	Fluorochrome	Source
GATA-1	N6	Western blot analyses	1/1000	-	Santa Cruz Biotechnology
GATA-2	C-20	Western blot analyses	1/2000	-	Santa Cruz Biotechnology
MITF	[C5]ab12039	Western blot analyses	1/3000	-	Abcam
CD11b	ab75476	Western blot analyses	1/6000	-	Abcam
myeloperoxidase	ab9535	Western blot analyses	1/1000	-	Abcam
C/EBP α	14AA	Western blot analyses	1/2000	-	Santa Cruz Biotechnology
c-Kit	3074	Western blot analyses	1/3000	-	Cell Signaling Technology
Lamin-B	M-20	Western blot analyses	1/2000	-	Santa Cruz Biotechnology
histone H3	ab1791	qChIP assay	2 μ g / IP	-	Abcam
histone H3ac(pan-acetyl)	39139	qChIP assay	2 μ g / IP	-	Active Motif
GATA-2	H116	qChIP assay	2 μ g / IP	-	Santa Cruz Biotechnology
RUNX1/AML1	ab23980	qChIP assay	2 μ g / IP	-	Abcam
PU.1	T-21	qChIP assay	2 μ g / IP	-	Santa Cruz Biotechnology
normal rabbit IgG	sc-2027	qChIP assay	2 μ g / IP	-	Santa Cruz Biotechnology
CD117	2B8	FACS	1/200	APC	BD Pharmingen
CD11b	M1/70	FACS	1/200	FITC	BD Pharmingen
CD11b	M1/70	FACS	1/200	PE-Cy7	BD Pharmingen
Ly-6G/C	RB6-8C5	FACS	1/200	PE	BD Pharmingen
Ly-6G	1A8	FACS	1/200	FITC	BD Pharmingen
Siglec-F	E50-2440	FACS	1/200	PE	BD Pharmingen
Fc ϵ R1	MAR-1	FACS	1/200	PE	eBioscience
CD49b(Integrin α 2)	DX5	FACS	1/200	PE	eBioscience
CD49b(Integrin α 2)	DX5	FACS	1/200	PE-Cy7	eBioscience
CD34	RAM34	FACS	1/200	e-Fluor 660	eBioscience
CD11c	N418	FACS	1/200	PE-Cy7	eBioscience
F4/80	BM8	FACS	1/200	PE	eBioscience
MHC II(I-A/I-E)	M5/114.15.2	FACS	1/200	APC	eBioscience
CCR3	FAB729F	FACS	1/200	FITC	R&D SYSTEMS
isotype control	553991	FACS	1/200	APC	BD Pharmingen
isotype control	553988	FACS	1/200	FITC	BD Pharmingen
isotype control	553989	FACS	1/200	PE	BD Pharmingen
isotype control	eB149/10H5	FACS	1/200	PE-Cy7	eBioscience

表 3. GATA2 欠失 BMMCs の gene ontology (GO) 解析

Category	Term	Count	%	P-Value	FDR
Cellular component	GO:0005730 nucleolus	28	13.4	2.2.E-17	2.7E-14
	GO:0031974 membrane-enclosed lumen	36	17.2	1.8.E-08	2.2E-05
	GO:0031981 nuclear lumen	30	14.4	4.8.E-08	5.9E-05
	GO:0070013 intracellular organelle lumen	33	15.8	2.8.E-07	3.5E-04
	GO:0043233 organelle lumen	33	15.8	3.0.E-07	3.7E-04
	GO:0043231 intracellular membrane-bounded organelle	108	51.7	2.0.E-06	2.4E-03
	GO:0043227 membrane-bounded organelle	108	51.7	2.1.E-06	2.6E-03
	GO:0044428 nuclear part	33	15.8	2.1.E-06	2.6E-03
GO:0044422 organelle part	57	27.3	4.8.E-05	5.9E-02	
Biological process	GO:0034660 ncRNA metabolic process	18	8.6	2.4.E-11	3.8E-08
	GO:0042254 ribosome biogenesis	14	6.7	1.1.E-10	1.7E-07
	GO:0034470 ncRNA processing	15	7.2	7.6.E-10	1.2E-06
	GO:0022613 ribonucleoprotein complex biogenesis	14	6.7	1.4.E-09	2.2E-06
	GO:0006364 rRNA processing	9	4.3	8.2.E-07	1.3E-03
	GO:0016072 rRNA metabolic process	9	4.3	9.1.E-07	1.5E-03
	GO:0006399 tRNA metabolic process	9	4.3	2.0.E-05	3.2E-02

■ 謝辞

本研究は、高崎健康福祉大学・薬学部・分子生体制御学研究室の大根田絹子教授のもとで遂行されました。大根田絹子先生には、研究に対する取り組み方や姿勢をはじめ、論文の進め方やまとめ方に至るまで、大変親身なご指導と叱咤激励を賜りました。また同時に、大学教員としてのあり方という観点においても懇切丁寧なご指導を賜りましたことを心より厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行・論文執筆にあたり、山本雅之教授(現東北大学大学院医学系研究科 医化学分野)、大根田修教授(筑波大学大学院 人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 再生幹細胞生物学研究室)、森口尚講師(現東北大学大学院医学系研究科 医化学分野)には、多くのご指導とご提言をいただきました。深く感謝いたします。また、石嶋康史講師(高崎健康福祉大学・薬学部)、James Douglas Engel 教授(ミシガン大学 医学部)、鈴木未来子講師(現東北大学 医学部 ラジオアイソトープセンター)、Yu Lei 博士研究員(東北大学大学院医学系研究科 医化学分野)には、セミナーの場などを通し、技術的な支援また多くのご助言をいただきました。心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、北村俊雄教授(東京大学 医科学研究所先端医療研究センター細胞療法分野)には、レトロウイルスベクター及びパッケージング細胞を分与していただきました。また、稲葉俊哉教授(広島大学 原爆放射線医科学研究所 がん分子病態研究分野)、金井昭助教(広島大学 原爆放射線医科学研究所 がん分子病態研究分野)には、次世代シーケンス解析を行うにあたり大変なご支援を頂きました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業(若手 B、研究課題番号: 25860221) よりサポートをいただき、遂行することができました。深く感謝いたします。