150　好塩基球の分子制御メカニズムの解明	二宮　一茂

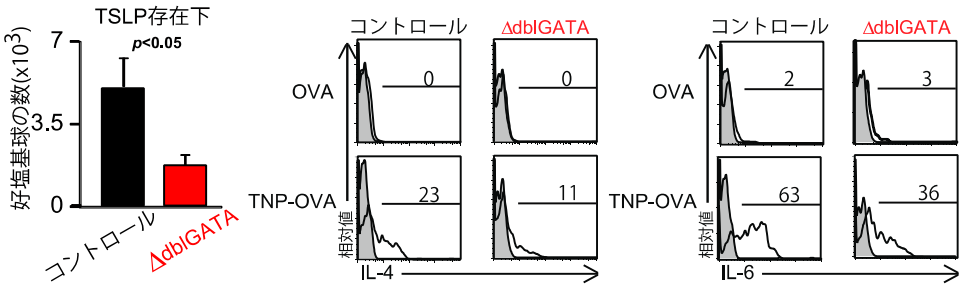
【目的】好塩基球は最も数の多い末梢血中でも 0.5%と非常に数の少ない細胞集団の一つであるが、近年我々を中心として好塩基球特異的な抗体、欠損マウスの樹立、好塩基球のイメージング技術が確立され、好塩基球がアレルギー疾患や寄生虫感染防御応答において重要な役割を果たしていることが明らかになった（Blood 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. 2013）。しかしながら、好塩基球の分子生物学的解析となると数の少なさがハードルとなり、まだまだ明らかになっていないことが多い。我々は、好塩基球を制御する転写制御因子の解析に取り組み、好塩基球の分子制御メカニズムを明らかにした。

【方法】1.［マウス］ BALB/c background の ΔdblGATA マウスを Jackson laboratory より購入し、実験に用いた。2.［定量 PCR 法（qRT-PCR）］フェノールクロロホルム法を用いて RNA を抽出し、cDNA を作製した。得られた cDNA を HPRT および GATA1 の遺伝子発現をサイバーグリーン法で測定し、相対値を測定した（Proc. Natl. Acad. Sci. 2013）。3.［フローサイトメトリー実験］CantoII（BD）にて解析した。4.［*in vivo* 試験］マウスに抗原特異的 IgE を投与して抗原を耳介皮内に投与後、耳介の厚さを経日的に測定した。

【結果】転写因子 GATA1 は赤血球および顆粒球の一つである好酸球の分化制御因子として知られているが、好塩基球の機能に GATA1 が関与するかについては十分に解析されていなかった。我々は、好塩基球は GATA1 を好酸球ほどではないが、好中球よりも強く発現していることを見出した。さらに、GATA1 の転写調節領域に遺伝子変異の入った ΔdblGATA マウスの好塩基球の GATA1 の発現が低下していること見出し、好塩基球の機能における GATA1 の機能を *in vivo* および *in vitro* で解析した。その結果、GATA1 の発現低下によって、好塩基球数の減少と、抗原刺激によるサイトカイン IL-4 および IL-6 の産生の低下に影響することを見出した。さらに、好塩基球誘導性の慢性アレルギー炎症のモデルでも炎症が低下した。

以上のことから、好塩基球の分子制御に関与する分子として、転写因子 GATA1 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。GATA1 は好塩基球の分化および機能を制御することが明らかとなり、通常好酸球欠損マウスとして用いられてきたΔdblGATA マウスが好塩基球も数の面でも機能の面でも欠損したマウスであることが明らかとなった。好塩基球はアレルギー疾患や寄生虫感染防御応答に深く関与することが知られていることから、GATA1 を利用したアレルギー疾患および寄生虫感染症の新たな治療薬、ワクチンの開発が非常に有意義であることが示唆された。また、この結果はΔdblGATA マウスによって見出される実験結果は好塩基球欠損マウスもしくはその他の好酸球欠損マウスで検討をすることが有意義であることを強く示唆した。

GATA1 の発現が低下する（ΔdblGATA）では好塩基球の形成と機能が抑制される



150. 好塩基球の分子制御メカニズムの解明

二宮　一茂

千葉大学 大学院医学研究院 先進気道アレルギー学寄附講座

Key words：アレルギー，好塩基球，寄生虫

緒　言

好塩基球は最も数の多い末梢血中でも 0.5%と非常に数の少ない細胞集団の一つであるが、近年我々を中心として好塩基球特異的な抗体、欠損マウスの樹立、好塩基球のイメージング技術が確立され、好塩基球がアレルギー疾患や寄生虫感染防御応答において重要な役割を果たしていることが明らかになった［1〜3］。しかしながら、好塩基球の分子生物学的解析となると数の少なさがハードルとなり、明らかになっていないことが多い。我々は、マウス好塩基球を制御する転写制御因子の解析に取り組み、分子制御メカニズムを明らかにした。

方　法

1. マウス

BALB/c background のΔdblGATA マウスを Jackson laboratory より購入し、実験に用いた。

2. 定量 PCR 法（qRT-PCR）

フェノールクロロホルム法を用いて RNA を抽出し、cDNA を作製した。得られた cDNA を *Hprt* および *Gata1* の遺伝子発現をサイバーグリーン法で測定し、相対値を測定した［2, 3］。

3. フローサイトメトリー実験

細胞を single cell suspension し、任意の抗体で染色後、CantoII（BD）にて解析を行った。データはソフトウェア FlowJo を利用した［2, 3］。

4. *in vivo* 試験

マウスにそれぞれ抗原特異的 IgE（抗 TNP-IgE）100 μg を静脈内投与し、翌日に抗原（TNP-OVA）およびコントロール抗原（OVA）30 μg をそれぞれ耳介皮内に投与し、耳介の厚さを経日的に測定した。値は（TNP-OVA 投与の耳の厚さ）－（OVA 投与の耳の厚さ）で示した［1］。

結　果

1. 好塩基球は GATA1 を発現する

転写因子 GATA1 は赤血球および顆粒球の一つである好酸球の分化制御因子として知られている［2］。しかしながら、好塩基球の機能に GATA1 が関与するかについては十分に解析されていなかった。

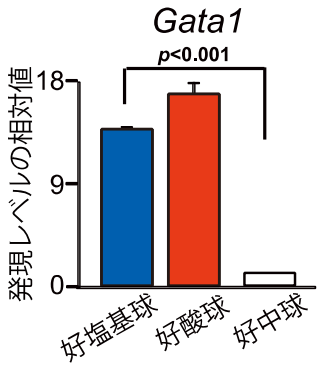


図 1. 好塩基球は GATA1 を発現する

正常マウスの骨髄細胞から好塩基球、好酸球、好中球を単離し、qRT-PCR にて GATA1 の発現を比較した。Student *t*-test。

そこで我々は、マウスより好塩基球を単離し、GATA1 の発現を好酸球および GATA1 を発現してないとされる好中球と比較した。その結果、好塩基球は GATA1 を好酸球ほどではないが、好中球よりも強く発現していることが明らかとなった（図 1）。

2. GATA1 の発現は好塩基球の分化に重要である

次に、GATA1 の転写調節領域に遺伝子変異の入った ΔdblGATA マウスを用いて好塩基球の GATA1 の発現を調べたところ、GATA1 の発現が低下していた。また、驚いたことに好塩基球の数が低下していることも見出した。

そこで、コントロールマウスおよび ΔdblGATA マウスの骨髄を *in vitro* においてサイトカインである TSLP 存在下で培養し、好塩基球の誘導実験を行った。TSLP は IL-33 と同様に非免疫系の細胞などから産生されることで知られている [4]。ΔdblGATA マウス由来の骨髄からは誘導される好塩基球の数が、正常マウス由来の骨髄に比べて著明に減少した（図 2）。また、ΔdblGATA マウスでは好塩基球の前駆細胞である BaP の数も減少していた。このことから、GATA1 は好塩基球の分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

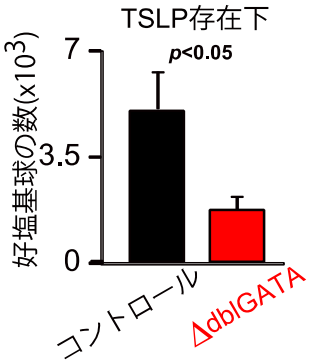


図 2. GATA1 の発現が低下すると、好塩基球の分化が抑制される。

コントロールマウスおよび ΔdblGATA マウスの骨髄細胞を TSLP 存在下で 5 日間培養し、好塩基球の細胞数をカウントした。Student *t*-test。

3. GATA1 の発現は *in vivo* および *in vitro* の好塩基球の機能に重要である

さらに、GATA1 による好塩基球の機能制御を調べる目的で、siRNA を用いて *Gata1* をノックダウンした好塩基球を抗原特異的 IgE と抗原で刺激した。その結果、control siRNA を投与した好塩基球に比べて、GATA1 をノックダウンした好塩基球では、抗原刺激によるサイトカイン IL-4 および IL-6 の産生が著しく低下し、脱顆粒率も低下した。

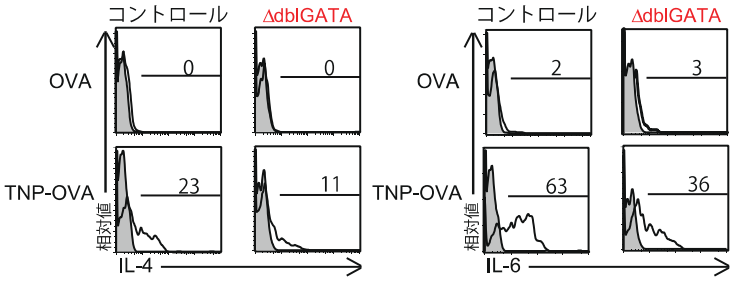


図 3. GATA1 の発現が低下すると、好塩基球の機能が抑制される

コントロールマウスおよびΔdblGATA マウス由来の好塩基球それぞれ抗原特異的 IgE（抗 TNP-IgE 抗体）および抗原（TNP-OVA）およびコントロール抗原（OVA）で刺激し、細胞内のサイトカイン量をフローサイトメトリーにて解析した。

このことはΔdblGATA マウス由来の好塩基球でも同様にコントロールマウスの好塩基球に比べてサイトカイン産生、脱顆粒反応が低下した（図 3）。以上のことから、GATA1 は好塩基球の機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。さらに、*in vivo* における GATA1 の好塩基球の機能制御について解析する目的で、すでに好塩基球依存性の反応が起こることが明らかとなっている IgE 誘導性慢性アレルギー性炎症（IgE-CAI）のモデルを用いて解析した[1]。

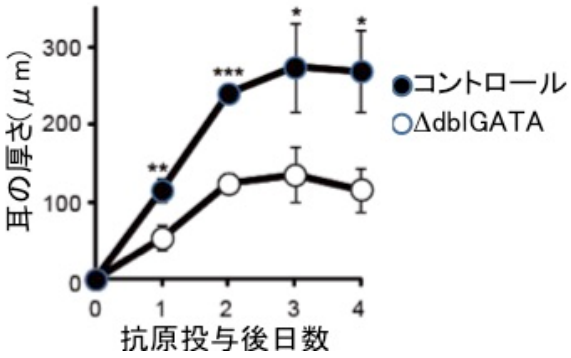


図 4. GATA1 の発現が低下した好塩基球は *in vivo* での機能が抑制される

コントロールマウスおよびΔdblGATA マウスにそれぞれ抗原特異的 IgE（抗 TNP-IgE）100 μg を静脈内投与し、翌日に抗原（TNP-OVA）およびコントロール抗原（OVA）30 μg をそれぞれ耳介皮内に投与し、耳介の厚さを経日的に測定した。値は（TNP-OVA 投与の耳の厚さ）－（OVA 投与の耳の厚さ）で示した。Student *t*-test。$*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$.

具体的にはΔdblGATA マウスとコントロールマウスを用いて IgE-CAI を誘導した。その結果、コントロールマウスに比べて、ΔdblGATA マウスでは IgE-CAI の炎症が優位に低下した（図 4）。以上のことから、GATA1 は数と機能の面から好塩基球の機能を制御していることがわかった。

考　察

好塩基球の分子制御に関与する分子として、転写因子 GATA1 を見出した。GATA1 は好塩基球の分化だけでなく、機能を制御することが明らかとなった。今回の研究から、好塩基球の GATA1 を利用したアレルギー疾患および寄生虫感染症の新たな治療薬、ワクチンの開発が非常に有意義であることが示唆された。

また、通常好酸球欠損マウスとして用いられてきたΔdblGATA マウスが好塩基球も数の面でも機能の面でも欠損したマウスであることが明らかとなった。このことから、ΔdblGATA マウスによって見出される実験結果は好塩基球欠損マウスもしくはその他の好酸球欠損マウスで検討をすることが有意義であることを強く示唆された。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科免疫アレルギー学分野の根井雄一郎、烏山一教授である。

文　献

1) Obata K, Mukai K, Tsujimura Y, Ishiwata K, Kawano Y, Minegishi Y, Watanabe N, and Karasuyama H.: Basophils are essential initiators of a novel type of chronic allergic inflammation. Blood. 2007;110(3):913-920. (doi: 10.1182/blood-2007-01-068718)

2) Nei Y, Obata-Ninomiya K, Tsutsui H, Ishiwata K, Miyasaka M, Matsumoto K, Nakae S, Kanuka H, Inase N, and Karasuyama H.: GATA-1 regulates the generation and function of basophils. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2013;110(46):18620-18625, *equally contributed (doi: 10.1073/pnas.1311668110)

3) Obata-Ninomiya K, Ishiwata K, Tsutsui H, Nei Y, Yoshikawa S, Kawano Y, Minegishi Y, Ohta N, Watanabe N, Kanuka H, and Karasuyama H.: The skin is an important bulwark of acquired immunity against intestinal helminthes. J Exp Med. 2013;210(12):2583-2595. (doi: 10.1084/jem.20130761)

4) Seki T.*, Obata-Ninomiya K.*, Shimogawara-Furushima R., Arai T., Akao N., Hoshino T., Ohta N.: IL-33/ST2 controbites to severe symptoms in Plasmodium chabaudi-infected BALB/c mice. Parasitol. Int., 2017;67(1):64-49, *equally contributed (doi: 10.1016/j.parint/.2017.03.008)