

氏 名（本籍） 鈴 木 五 月

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 博 第 1 4 4 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 10 年 3 月 25 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

研 究 科 専 攻 東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科  
（博士課程）内科学系専攻

学 位 論 文 題 目 Mast cell-specific transcriptional regulation of  
mouse Histidine decarboxylase gene by CpG  
methylation in the promoter region.

（プロモーター領域の CpG 配列のメチル化による肥満細胞特異的なマウスヒスチジン脱炭酸酵素の転写制御機構）

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教 授 白 土 邦 男 教 授 小 野 哲 也

教 授 柴 原 茂 樹

# 論文内容要旨

## 【要 旨】

肥満細胞は、皮膚、結膜、腸管、気管支粘膜などに存在し、アレルギー反応、寄生虫感染、炎症反応などに深く関与する。肥満細胞の起原は造血幹細胞であり、前駆細胞として骨髄から流血中に入り、アレルギーおよび炎症反応の場である末梢組織で最終分化するといわれているが、その分化機構についてはいまだ不明な点も多い。肥満細胞に特異的な分泌顆粒中のケミカルメディエーターのいくつかは、肥満細胞の分化成熟に伴い増加することが知られており、その代表的なもののひとつであるヒスタミンも肥満細胞の分化成熟に伴い上昇することが知られている。ヒスチジン脱炭酸酵素（以下HDC）はヒスタミン合成を司る唯一の生体内酵素であることから、HDC 遺伝子の発現調節は、肥満細胞の分化に関わる可能性がある。そこで、肥満細胞の分化とHDC 遺伝子発現制御機構の関係を検討し、肥満細胞の分化機構を、HDC 遺伝子発現制御という観点からとらえたいと考えた。

個々の体細胞は、分化過程において特有の分化形質の発現を巧みに制御し、分化段階に特異的な機能を全うしている。それらの分化形質をコードしている遺伝子群の発現制御には、系列特異的な転写因子が重要であると考えられている。私たちのいままでの研究で、赤血球系に特異的な転写因子として知られる NF-E2 が転写活性化に関与することを明らかにしている。また、私たちは、マウス肥満細胞株 P815 を同系マウスの腹腔内で培養すると、HDC や MMCP-6 等を発現し始め、結合織型の肥満細胞へ分化傾向を示すことを明らかにし、その過程に関わる転写因子群とエンハンサーの解明を中心に研究を続けてきた。その一方で、遺伝子発現にプロモーター領域のメチル化が関与している例が多数報告され、遺伝子発現が遺伝子の構造変化によって影響される可能性が示唆され始めた。もちろん HDC 遺伝子でも同様に、構造変化やメチル化など遺伝子側の変化によって発現が影響される可能性が考えられる。そこで、肥満細胞の分化の系として、マウス肥満細胞株 P815 の腹腔内誘導モデルおよび種々の分化段階のマウス細胞株を用い、プロモーター領域のメチル化と HDC 遺伝子発現との関係に焦点をあてて研究を進めた。

まず、HDC 遺伝子プロモーター領域を中心とした塩基配列を、サイクルシーケンス法を用いて明らかにした。次に、HDC 遺伝子プロモーター活性を評価するために、プロモーター領域の種々の変異体を用いた遺伝子導入実験を行い、HDC 遺伝子の基本的な転写活性化には GC box を含む転写開始点から上流約 65 塩基が必要であることを明らかにした。プロモーター領域の遺伝子のメチル化を検討するために、DNA のメチル化により消化作用が異なる二つの制限酵素を用いて、GC box 付近を中心とした CCGG 配列のメチル化の程度をサザン法で評価した。その

結果、プロモーター領域の脱メチル化の程度と HDC 遺伝子発現には正の相関性があることが示唆された。プロモーター領域の遺伝子の脱メチル化の程度をさらに詳細に検討するために、CCGG 配列以外の CG 配列のメチル化の検討を行う必要があった。そこで、この領域の CG 配列のメチル化を、新しいメチル化の評価法である二亜硫酸・ゲノムシーケンス法を用い解析した。この解析により、HDC 発現が強く分化が進んだ細胞ほど、プロモーター領域が広範囲に脱メチル化されていることが判明した。さらに、遺伝子の脱メチル化と遺伝子発現の関連性を明らかにするために、P815 を脱メチル化剤の5-アザシチジンとともに培養してプロモーター領域の脱メチル化を促したところ、実際に HDC 遺伝子が発現し始めた。このことから、脱メチル化が機能的に HDC 遺伝子の発現に関与していることが示された。一方、腹腔内誘導モデルでは、誘導後 HDC 遺伝子を発現し始めたのにかかわらず、プロモーター領域の脱メチル化には大きな変化がなかった。このことから、このモデルでは、トランスの因子による調節機構の存在も考えられたため、遺伝子導入実験やゲルシフト法を中心にその検索を行ったが、未だ新たな調節機構は見出されていない。

以上より、肥満細胞特異的および分化段階特異的な HDC 遺伝子発現と遺伝子の脱メチル化には、正の相関性が見られ、HDC 遺伝子発現が強く分化の進んだ細胞ほど、プロモーター領域が、広範囲に脱メチル化されていたことと、脱メチル化が機能的に HDC 遺伝子の発現に関与していることが判明した。一方、マウス肥満細胞株 P815 の腹腔内誘導モデルでは、腹腔内培養前後での HDC 遺伝子の脱メチル化の変化は少なく、HDC 遺伝子発現にはトランスの因子による調節機構の存在も推測された。

## 審査結果の要旨

肥満細胞は、気管支喘息を含むアレルギー性疾患の発症およびその病態に中心的な役割を果たしている。肥満細胞の特徴として細胞内顆粒の存在が挙げられ、肥満細胞の分化・成熟に伴い、顆粒が増加かつ増大し、それに平行してその中に含まれるヒスタミン濃度も上昇することが知られている。ヒスチジン脱炭酸酵素（HDC）は、ヒスタミン合成を司る唯一の生体内酵素であることから、HDC 遺伝子の発現調節は、肥満細胞の分化過程に関わる可能性がある。いままでの肥満細胞の分化機構に関する知見では、肥満細胞の起源である造血幹細胞は、前駆細胞として骨髓から流血中に入り、アレルギーおよび炎症反応の場である末梢組織で最終分化すると考えられているが、いまだ不明な点も多い。そこで本研究では、HDC 遺伝子発現を指標とした肥満細胞の分化機構の解明を試みた。具体的には、さまざまな分化段階の細胞株および分化誘導モデルを用い、肥満細胞の分化と HDC 遺伝子発現制御機構との関係を、分子生物学的手法で検討した。

個々の遺伝子の発現調節には、転写因子群の関与、クロマチン構造の改変、遺伝子のメチル化などのさまざまな機序が考えられているが、本研究ではその中で、遺伝子のメチル化に着目し、メチル化による遺伝子側の変化と HDC 遺伝子発現調節機構の解析を行った。用いた方法として、遺伝子導入実験、サザン法、ノザン法および新しいメチル化の評価法である二亜硫酸・ゲノムシーケンシング法などを取入れ、HDC 遺伝子発現と遺伝子プロモーター領域の脱メチル化との関係を検討した。その結果、肥満細胞特異的および分化段階特異的な HDC 遺伝子発現と遺伝子の脱メチル化には、正の相関性が見られ、HDC 遺伝子発現が強く分化の進んだ細胞ほど、プロモーター領域が、広範囲に脱メチル化されていたことが判明した。さらに脱メチル化剤の 5-アザシチジンを用いた実験で、脱メチル化が機能的に HDC 遺伝子の発現に関与していることも明らかにした。一方、マウス肥満細胞株 P815 の腹腔内誘導モデルでは、腹腔内培養後に強い HDC 遺伝子発現が認められるのにもかかわらず、その前後での HDC 遺伝子の脱メチル化の変化は少なく、HDC 遺伝子発現にはトランスの因子による調節機構の存在も推測された。

本研究では、肥満細胞の分化誘導モデルとしての腹腔内誘導系を確立し、さらに HDC 遺伝子発現とプロモーター領域の脱メチル化の意義を世界に先駆けて見出しており、その独創性は極めて高い。本研究で得られた知見は、肥満細胞やヒスタミンが関与するアレルギー疾患の病態解明に役立つのみならず、その脱メチル化に注目した新しい治療法開発にも有用であると考えられる。従って本研究は、十分、学位論文に値すると考える。