



Title	Cell type-specific Deficiency of c-kit Gene Expression in Mutant Mice of mi/mi Genotype
Author(s)	礒崎, 耕次
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38983
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	いそ ぎさ こう じ 磯 崎 耕 次
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 7 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Cell type-specific Deficiency of c-kit Gene Expression in Mutant Mice of <i>mi/mi</i> Genotype (<i>mi/mi</i> 突然変異マウスにおける c-kit 遺伝子の細胞種特異的な発現異常)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北村 幸彦 (副査) 教 授 西宗 義武 教 授 青笹 克之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

mi 遺伝子は basic-helix-loop-helix-leucin zipper 構造を持つ転写因子 (*mi* 転写因子) をコードしている。この *mi* 遺伝子座に 2 個の突然変異遺伝子を持つ *mi/mi* マウスでは小眼球症、骨大理石症という症状に加え、メラノサイト欠損とマスト細胞の産生低下が認められる。*mi/mi* マウス由来の培養マスト細胞 (CMC) では正常対照 (+/+) マウス由来の CMC に比較して有意に c-kit 遺伝子の発現が低下しており、そのため c-kit レセプターのリガンドである stem cell factor (SCF) による増殖刺激に反応しないことが明らかになっている。本研究の目的は、*mi/mi* マウスの組織中のマスト細胞においても c-kit 遺伝子の発現異常がみられるのかどうかを調べるとともに、マスト細胞以外の細胞における c-kit 遺伝子の発現を調べることで *mi* 転写因子による c-kit 遺伝子の発現調節を検討することである。

【方法ならびに成績】

1) 胎生18日と生後20日の +/+ マウス, *mi/mi* マウスの皮膚をアルシアンブルーで染色し、皮膚 1 cm あたりのマスト細胞数を算定した。胎生18日の皮膚のマスト細胞数は *mi/mi* マウスでは同年令の +/+ マウスの 7 % と著しい減少がみられるのに対して、生後20日の *mi/mi* マウスでは同年令の +/+ マウスの 35 % にまでマスト細胞数は増加した。マスト細胞と赤血球はともに多分化能血液幹細胞の子孫であるが、胎生18日と生後20日の *mi/mi* マウスの赤血球数は +/+ マウスと比較して有意な減少はみられず、また生後20日の *mi/mi* マウスの骨髓細胞中の多分化能血液幹細胞 (脾コロニー形成細胞) 数も +/+ マウスの場合と比べて有意差がなかった。

2) 胎生18日と生後20日の +/+ マウス, *mi/mi* マウスの皮膚マスト細胞における c-kit mRNA の発現を in situ ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。皮膚のマスト細胞は mast cell carboxypeptidase A (MC-CPA) の mRNA を発現していることがわかっているため MC-CPA mRNA の発現をコントロールとして用いた。胎生18日、生後20日の +/+ マウスおよび *mi/mi* マウスでは、ほぼすべての皮膚マスト細胞が MC-CPA の mRNA を発現していた。c-kit mRNA は胎生18日の +/+ マウスにおいては 47 % のマスト細胞に発現していたが、胎生18日の *mi/mi* マウスにおいてはわずか 1 % のマスト細胞にしか発現していなかった。生後20日の *mi/mi* マウスでは c-kit mRNA を発現しているマスト細胞の割合が 3 % に増加したにすぎなかったが、生後20日の +/+ マウスで c-kit mRNA を発現しているマスト細胞の割合が約 30 % に減少したため +/+ マウスと *mi/mi* マウスの差が減少した。

3) マスト細胞における *c-kit* 蛋白の発現を *c-kit* レセプターの細胞外ドメインを認識する ACK 2 モノクローナル抗体 (MoAb) を用いた免疫組織化学染色により検討した。胎生18日, 生後20日の+/+マウスでは, ほぼすべての皮膚マスト細胞が *c-kit* 蛋白を発現していた。*mi/mi* マウスにおいては胎生18日で12%のマスト細胞しか *c-kit* 蛋白を発現していなかったが, 生後20日ではその数は37%に増加した。

4) さらに, FITC でラベルした ACK 2 MoAb を用いて皮膚標本を免疫組織化学染色し, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。胎生18日と生後20日の+/+マウスの皮膚マスト細胞はいずれも強い蛍光を示した。一方, 胎生18日の *mi/mi* マウスの皮膚マスト細胞は極めて弱い蛍光強度しか示さなかったが, 生後20日の *mi/mi* マウスでは同年令の+/+マウスに比べると明らかに弱いものの胎生18日の *mi/mi* マウスに比べて蛍光強度の増強が認められた。

5) メラノサイトの前駆細胞とメラノサイトは *c-kit* 遺伝子を発現している。そこで胎生18日の *mi/mi* マウスの皮膚内にメラノサイトの前駆細胞あるいはメラノサイトがいるのかどうかを DOPA 反応と ACK 2 MoAb を用いた免疫組織化学染色により検討した。*mi/mi* マウスの皮膚内にはわずかに *c-kit* 蛋白陽性細胞を認めたが, これらの細胞のほとんどはアルシアンブルー陽性でありマスト細胞と考えられた。したがって, *mi/mi* マウスの皮膚内には *c-kit* 蛋白を発現しているメラノサイトの前駆細胞はいないと考えられた。また, +/+マウスの毛嚢にはメラノサイトと思われる DOPA 反応陽性細胞, *c-kit* 蛋白陽性細胞がみられたのに対して *mi/mi* マウスの毛嚢にはこれらの陽性細胞はみられなかった。

6) マスト細胞と赤血球前駆細胞は共に多分化能血液幹細胞に由来し, メラノサイトと後根神経節は共に神経冠に由来する。そこで ACK 2 MoAb を用いた免疫組織化学染色により胎仔肝の赤血球前駆細胞および後根神経節における *c-kit* 蛋白の発現を検討したところ, *mi/mi* マウスにおいてもこれらの細胞における *c-kit* 蛋白の発現は+/+マウスの場合と比べて同程度であった。

7) 小脳の籠細胞・ゴルジ細胞と精巣の精原細胞・ライディッヒ細胞は *c-kit* 遺伝子を発現していることが知られている。そこで生後20日の *mi/mi* マウスにおいて, これらの細胞の *c-kit* の発現に異常がみられるのかどうか *in situ* ハイブリダイゼーション法と ACK 2 MoAb を用いた免疫組織化学染色により検討した。その結果 *c-kit* の発現は *mi/mi* マウスと同年令の+/+マウスの間に差を認めなかった。

8) さらに, *mi/mi* マウスの精巣細胞と CMC における *c-kit* 蛋白の合成を調べるために免疫沈降分析を行った。+/+マウスと *mi/mi* マウスの精巣細胞と CMC を [³⁵S] 標識メチオニン存在下で培養し細胞溶解後, ACK 2 MoAb と Protein-G sepharose beads を用いて免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-ポリアクリルアミドゲルで解析し, オートラジオグラフィーを行った。*mi/mi* マウスの精巣細胞において145-Kd と125-Kd の *c-kit* 蛋白の合成は+/+マウスの場合と同程度であった。+/+マウスのCMC は145-Kd と125-Kd の *c-kit* 蛋白を合成していたが, *mi/mi* マウスのCMC は125-Kd の *c-kit* 蛋白をわずかに合成しているのみであった。

【総括】

1) *mi/mi* マウスの皮膚マスト細胞における *c-kit* 遺伝子の発現は+/+マウスと比べて明らかに低いものの生後増加する。その結果生後20日の *mi/mi* マウスにおいて皮膚のマスト細胞数が増加するのではないかと考えられた。すなわち, *mi* 転写因子は年齢依存的にマスト細胞の *c-kit* 遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。

2) *mi/mi* マウスにおいて皮膚マスト細胞の *c-kit* 遺伝子の発現が低下し, さらにメラノサイトは欠損していた。一方, 赤血球前駆細胞, 後根神経節, 小脳の籠細胞・ゴルジ細胞と精巣の精原細胞・ライディッヒ細胞における *c-kit* 遺伝子の発現は *mi/mi* マウスにおいても正常であった。以上の結果より, *mi* 転写因子はマスト細胞, メラノサイトで特異的に *c-kit* 遺伝子の転写調節に関与していると考えられた。

論文審査の結果の要旨

マウスの *mi* 遺伝子座は転写因子の basic-helix-loop-helix-leucine zipper 蛋白ファミリーの新しいメンバーをコードしている。(以降 *mi* 転写因子と呼ぶ) 小眼球症, 骨大理石症, メラノサイト欠損に加えて, *mi/mi* マウスではマスト細胞数が減少する。*c-kit* レセプター・チロシンキナーゼはマスト細胞の分化に重要な役割をしており, ま

た *mi/mi* マウス由来の培養マスト細胞における *c-kit* の発現は mRNA、蛋白レベル両者で低下していることから、*mi/mi* マウスのマスト細胞の欠損は少なくとも一部分は *c-kit* の発現低下に起因すると考えられる。しかしながら *c-kit* の発現が *mi/mi* マウスの組織においても低下しているのかどうかについては調べられていない。今回、磯崎耕次君は *in situ* ハイブリダイゼーション法、免疫組織化学染色法を用いて *mi/mi* マウスの皮膚マスト細胞における *c-kit* の発現を調べた。さらに、*mi/mi* マウスの組織中のマスト細胞以外の種々の細胞における *c-kit* の発現についても調べた。磯崎耕次君は *mi/mi* マウスにおいて *c-kit* の発現がマスト細胞で低下しているが赤血球系前駆細胞、精巢の生殖細胞、神経細胞では低下していないことを見出した。つまり、*mi* 転写因子による *c-kit* 転写の制御は細胞種特異的であると考えられた。*mi/mi* マウスは個体レベルで転写因子の機能を解析するのに有用なモデルと思われる。本研究により *mi* 転写因子による *c-kit* 遺伝子の発現調節機構の一端が明らかとなったので、これは学位論文に値すると思われる。