

氏名(本籍)	はま だ みち と (茨城県) 濱 田 理 人 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 4418 号		
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	MafB is essential for F4/80 and AIM expression in macrophage (MafB はマクロファージにおける F4/80, AIM の発現に必要である)		
主 査	筑波大学教授	医学博士	住 田 孝 之
副 査	筑波大学教授	医学博士	今 川 重 彦
副 査	筑波大学助教授	薬学博士	伊 東 進
副 査	筑波大学講師	博士(医学)	清 水 律 子

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的) MafB (Musculoaponeurotic fibrosarcoma B) はニワトリの筋腱膜線維肉腫を引き起こすレトロウイルス AS42 から単離された癌原遺伝子 *v-Maf* の細胞関連遺伝子であり、大 Maf 転写因子群に属している。その中で、MafB は血液系細胞株を用いた解析から、骨髓芽球から単球-マクロファージ系列への細胞運命決定に必須の因子であると考えられてきた。しかしながら、血球系では、in vivo での解析は行われておらず、MafB の生体内での生理機能は未だ明らかでない。そこで、本研究では、*MafB* 欠損マウスを作製し、血球における MafB の機能を解明することを目的とした。

(対象と方法) 生体内における MafB の機能を解析するために、まず、MafB 遺伝子座に GFP レポーターを挿入した *MafB* 欠損マウス (GFP ノックインマウス) を作製した。このマウスは生後 24 時間以内に死亡するため、成体マウスの解析をすることができない。そこでまず *MafB* 欠損マウス新生仔の脾臓、末梢血、胎生 14 日目の胎児肝臓を用い、FACS にて各種血液 lineage marker の発現解析を行った。この胎児肝臓由来細胞から、M-CSF を用いたマクロファージの分化誘導を行い、分化マクロファージ特異的な機能の解析と遺伝子発現パターン、変化を、FACS を用いて解析した。また、マイクロアレイを用いて *MafB* 欠損により影響を受ける下流の標的遺伝子の同定を試みた。同定した二つの遺伝子に関して、定量的リアルタイム RT-PCR により、*MafB* 欠損マクロファージにおける発現の変化を確認して、さらに培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより、その遺伝子のプロモーター解析を行った。

(結果) 胎生 14.5 日目の肝臓の細胞、新生児の末梢血、脾臓の細胞の FACS 解析の結果、*MafB* 欠損マウスでは、マクロファージの最終分化マーカーである F4/80 の発現が有為に減少していた。次に、胎児肝臓から M-CSF をもちいてマクロファージへの分化誘導を行ったところ、非付着性ディッシュ上での培養条件で *MafB* 欠損マウス由来のマクロファージでの F4/80 の発現が劇的に減少した。F4/80 遺伝子のプロモーターと *MafB* の発現ベクターを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、*MafB* 共導入による F4/80 プロモーターの活性化が観察された。また、F4/80 プロモーター上に存在する動物種間で配列の保存された、

MafB の結合配列 (Maf Recognition Element: MARE) に変異を入れたレポーター構築では、プロモーターの活性は減少した。

MafB 欠損マウスと野生型マウスの胎児肝マクロファージを用い、マイクロアレイ解析を行ったところ、AIM (Apoptosis Inhibitor expressed by Macrophage) の発現が顕著に減少していることを見いだした。AIM は、核内レセプター型転写因子である LXR (Liver X receptors) および RXR (Retinoid X receptors) のヘテロダイマーに制御をうけていることが知られている。定量的リアルタイム RT-PCR の結果、RXR/LXR のリガンドを加えたマクロファージにおいて、MafB の発現が増加した。一方、マクロファージに発現している別の大 Maf 転写因子群メンバーである c-Maf の発現は変化しなかった。さらに、AIM 遺伝子のプロモーターと MafB の発現ベクターを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、MafB 共導入による AIM プロモーターの活性化が観察された。また、AIM 遺伝子プロモーター上に存在する動物種間で配列の保存された、MARE に変異を入れたレポーター構築では、MafB 共導入によるプロモーターの活性化は減少した。

(考察) 抗原提示細胞 (APC) に発現する F4/80 は、免疫寛容を誘導する際 NKT 細胞と直接相互作用するための結合分子として働き、免疫応答を負に制御する制御性 T 細胞の誘導に必須であることが、F4/80 ノックアウトマウスの解析から明らかになっている。特に、末梢血や脾臓での F4/80 陽性 APC が免疫寛容の誘導に重要な働きをすることから、MafB が APC における F4/80 の発現を制御することを介して、免疫寛容のメカニズムに深く関与している可能性が示唆された。

AIM ノックアウトマウスを、動脈硬化を自然発症するマウス系統と交配すると、動脈硬化の原因となる酸化 LDL を取り込んだマクロファージ (泡沫細胞) が AIM 欠損の影響によりアポトーシスを起こしてしまうため、動脈硬化が悪化せず、改善することがわかっている。LXR/RXR のリガンドを加えると MafB と AIM の発現が増加し、MafB 欠損マウスでは LXR/RXR のリガンドによる AIM の誘導が減少することから、MafB は LXR/RXR の下流のシグナルに存在し、AIM の発現制御を行うことが考えられる。このことから、MafB は動脈硬化病変での泡沫細胞のアポトーシスを、AIM を介して抑制することにより、動脈硬化病変進行させる機能を持つ可能性があることが示唆された。

(結論) 本研究において、我々は、MafB が直接的に制御すると考えられる新しいターゲット遺伝子を二つ同定した。一つは末梢の免疫寛容の誘導に必要な F4/80 と、もう一つは動脈硬化の発症に重要な役割を持っている AIM である。このように、MafB は免疫寛容の誘導や、動脈硬化の発症機序に深く関与している可能性がある。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、MafB の機能を明らかにすることを目的として、MafB ノックアウトマウスを作成して解析した。その結果、MafB は、F4/80 分子と AIM 分子の発現調節に関わっていることを明らかにした。これらの分子は、免疫寛容や動脈硬化発症に関連していることから、MafB が免疫異常や動脈硬化の制御に重要なターゲットであることが判明した。本研究は世界的にも高く評価されている。

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