

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006 ～ 2008

課題番号：18390081

研究課題名（和文）単球・マクロファージ系列の細胞分化における大 Maf 群転写因子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of large Maf transcription factors in Mono-Macrophage lineage cells development.

研究代表者

高橋 智（TAKAHASHI SATORU）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授

研究者番号：50271896

研究成果の概要：

単球・マクロファージ系列の細胞分化における大 Maf 群転写因子の機能解析を行った。その結果、大 Maf 群転写因子は単球／マクロファージ系列への分化方向の決定には影響を及ぼさないが、マクロファージの食食機能に必要な分子の発現や、免疫制御に必要な分子の発現を制御していることが明らかとなった。また動脈硬化病巣の泡沫細胞の形成に必須の転写因子であることが解明された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2006 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総 計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：大 Maf 群転写因子、マクロファージ、血球分化、遺伝子改変マウス、c-Maf、MafB

1. 研究開始当初の背景

細胞分化の制御機構の解明は、現代の分子生物学的研究のフロンティアを形成してきた。血液細胞は個々の細胞が単独で機能を有すること、浮遊状態で細胞分化が進行すること等の利点があり、そのため、血液細胞の分化に伴う細胞表面抗原や遺伝子発現動態については、非常に詳細に解析されており、細胞分化の制御機構の分子メカニズムを解析するには、最も有用な実験系の一つと考えられる。その一方で、単球・マクロファージ系列

の細胞分化は、初期の分化過程において PU.1 が必須の転写因子であることが明らかにされているが、後期の分化過程に関与する転写因子や、近年明らかになりつつあるマクロファージのサブポプレーションの形成に関わる分子機構の詳細は未だに明らかになっていない。またマクロファージは、組織内で独自に分化することが知られており、この独特の分化様式のために、個体での解析が必要であり、そのために、他の血液系の細胞の解析と比較して、その解明が遅れていた。本研究

課題では、研究が遅れているマクロファージの機能的分化に注目して研究を実施した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスにおける単球・マクロファージ系列の細胞分化・機能発現における大 Maf 群転写因子の機能解析を行うことであった。大 Maf 群転写因子は、ニワトリ由来の細胞を用いた試験管内の解析系において、単球・マクロファージ分化に必須の転写因子であることが報告されていたが、マウスを含めた高等ほ乳類での単球・マクロファージ分化における機能は、未だに明らかになっていなかった。本研究課題では、大 Maf 群転写因子の単独欠損マウス、複合欠損マウスを作製することにより、マウスにおける単球・マクロファージ系列の細胞分化・機能発現における大 Maf 群転写因子の機能の全体像の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 大 Maf 群転写因子欠損マウスにおける血球分化の解析

これまでのニワトリ由来の細胞培養系を用いた実験より、単球系細胞の分化には MafB、c-Maf 等の大 Maf 転写因子群が必須であることが示唆されているが、マウスでの詳細な解析はなされていない。研究担当者らは、MafA、MafB、c-Maf 遺伝子欠損マウスの作製を終了しているので、MafA、MafB、c-Maf 欠損マウスの血液系の異常を組織解析及びコロニーアッセイにより詳細に解析し、単球・マクロファージ系列細胞における各因子の発現状態・表現型を同定する。また、マクロファージはそれぞれの組織局所において分化成熟する特性を有しており、それぞれの組織におけるマクロファージの分布を、それぞれの欠損マウスについて明らかにする。MafB 欠損マウスには GFP が、MafA 欠損マウスについては nls-LacZ が、また c-Maf には LacZ が挿入されているので、それらの発現を指標として組織マクロファージの分布を解析する。

(2) microarray による単球・マクロファージ系列細胞における標的遺伝子の解析

MafB 単独欠損マウス、c-Maf 単独欠損マウスにおけるマクロファージ系列細胞の異常は、まだ十分解析されておらず、標的遺伝子の解析を行うことにより、大 Maf 群転写因子の機能の全体像を明らかにすることが出来ると考えられる。そこで、マウス全遺伝子に対する microarray 解析を行い、MafB および c-Maf の特異的な標的遺伝子を明らかにする。同定された遺伝子についてノーザンブロット解析を行い、発現量の変化を確定する。

(3) MafB+/-:c-Maf+/-重複ヘテロ欠損マウスの解析

これまでの研究で、MafB および c-Maf が単球・マクロファージ系列の細胞に発現していることが明らかにされている。また、これら2つの転写因子間に相補的な作用が存在することが示唆されている。それぞれの単独欠損マウスは、出生直後に死亡してしまうため、現状では成体での解析を行うことができない。そこで相補的作用を証明するために、重複ヘテロ欠損マウスを作製し、解析する。

(4) microarray による MafB および c-Maf に共通する単球・マクロファージ系列細胞における標的遺伝子の解析

MafB/c-Maf 重複ヘテロ欠損マウスでは、マクロファージおよび樹状細胞の異常増殖が観察されるが、その分子機構は現在のところ全く不明である。そこで、単独欠損マウスと同様に、マウス全遺伝子に対する microarray 解析を行い、MafB および c-Maf に共通する標的遺伝子を明らかにする。同定された遺伝子についてノーザンブロット解析を行い、発現量の変化を確定する。

(5) MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスの解析

以前の解析で、c-Maf/MafB 重複完全欠損マウスを作製し、その表現型を解析した。その結果、重複完全欠損マウスは胎生 12.5 日前後で造血不全により重度の貧血を来とし、死亡することが明らかとなった。胎生期の造血は卵黄嚢で開始される一次造血と、胎児肝臓を主要な場とする二次造血により形成されるが、重複完全欠損マウスでは、一次及び二次造血の両方が障害されていると考えられた。しかも大変興味深いことに、胎生期の主要な造血である赤血球の造血が障害されていることが示唆された。我々の解析結果では、大 Maf 群転写因子は赤血球系列の細胞では発現しておらず、これまでニワトリ由来の細胞で解析されていたような、大 Maf 群転写因子と Ets 転写因子群、GATA 転写因子群のバランスにより血球分化の方向が赤血球系とマクロファージ系に規定されているという仮説は支持されないと考えられるが、どのようにして赤血球系造血が障害されるかのメカニズムは不明である。現在最も可能性が高いと考えられる仮説は、マクロファージは造血組織において造血の微小環境（血島：Blood island）を形成しており、マクロファージの分化異常により造血の微小環境が破綻し、造血障害により単独欠損では見られない胎生中期致死になるというものである。この仮説を検証するために、死亡直前の胎児の組織解析を行い、マクロファージマーカーや赤血球マーカー、さらには挿入した GFP や LacZ を用いて、マクロファージと赤血球の相互作用

の解析を行う。

(6) MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスの胎児肝臓における microarray 解析

MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスでは、重篤な造血障害を起こし胎生 12.5 日までに全ての重複欠損マウスが死亡する。その原因を明らかにするために、11.5 日の MafB/c-Maf 重複完全欠損マウス、MafB/c-Maf 重複ヘテロ欠損マウス、野生型マウスの肝臓より mRNA を抽出し、microarray による解析を行う。重篤な造血障害の原因となっている標的遺伝子は、大 Maf 転写因子の量が減少するに従って、発現量が減少もしくは亢進していると考えられるので、造血障害に関与していると考えられる遺伝子を同定する。これまでの予備的な実験により、重複欠損マウスのマクロファージでは、一酸化窒素 (NO) の産生が亢進しているというデータが得られているので、NO の産生に関与する遺伝子群の発現が上昇しているかどうかを重点的に解析し、その分子メカニズムを同定する。

(7) 成体における大 Maf 群転写因子の機能解析

MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスは、胎生致死である。そのため成体における大 Maf 群転写因子の機能解析を行うことが現時点では不可能である。そこで、T 細胞の機能解析に RAG1/2 欠損マウスが、単球・マクロファージ系列の細胞の一つである破骨細胞の解析に c-fos 欠損マウスが使用されているように、単球・マクロファージ系列の細胞が著しく減少している M-CSF (CSF-1) 受容体欠損マウスをレシーピエントとする単球・マクロファージの再構築実験を行う。M-CSF 受容体欠損マウスは単球・マクロファージ系列細胞の増殖に必須な M-CSF 受容体を欠損するため、完全欠失ではないもの、これらの細胞数が著しく減少している。この M-CSF 受容体欠損マウスに、MafB/c-Maf 重複欠損マウスの胎児肝臓細胞を移入することにより、MafB/c-Maf を重複欠損した単球・マクロファージ系列の細胞を再構築し、その表現系を解析する。

(8) レトロウイルス遺伝子導入によるレスキュー実験

上記の実験により同定された、単球・マクロファージ系列細胞における大 Maf 群転写因子の標的遺伝子が、実際の表現型の責任遺伝子であることを証明するために、その標的遺伝子をレトロウイルスにより再導入し、表現型が回復するかどうかを確認することで、直接証明する。

4. 研究成果

(1) 大 Maf 群転写因子欠損マウスにおける血

球分化の解析

MafA、MafB および c-Maf 欠損マウスの血液系の異常を、組織解析およびコロニーアッセイにより詳細に解析し、単球・マクロファージ系列細胞における各因子の発現状態・表現型を同定した。その結果、MafB 欠損マウス、c-Maf 欠損マウスでは、F4/80 陽性のマクロファージの数が減少することが明らかとなった。同時に Mac-1 陽性細胞数を解析したが、Mac-1 陽性細胞数については変化が見られず、大 Maf 群転写因子の欠損は、マクロファージ系列への分化決定には影響が無いことが明らかとなった。MafA 欠損マウスについては、明らかな血球分化・機能異常は

(2) microarray による単球・マクロファージ系列細胞における標的遺伝子の解析

マウス全遺伝子に対する microarray 解析を行い、MafB および c-Maf の特異的な標的遺伝子を明らかにした。また、同定された遺伝子について Realtime-PCR 解析を行い、発現量の変化を確定した。その結果、MafB 欠損マウスでは、抗アポトーシス活性を有している AIM 遺伝子の発現が顕著に減少していることが明らかとなった。AIM は酸化ストレスや脂質ストレスに対してマクロファージの細胞死を抑制する遺伝子である。一方、免疫反応に重要な補体成分である C1q の発現が、前述した F4/80 の発現とともに、MafB および c-Maf 欠損マウスで減少していることが明らかとなった。AIM、C1q、F4/80 が MafB および c-Maf の直接の標的遺伝子であることを明らかにするために、それらの遺伝子のプロモーター解析を行った結果、プロモーター上流に、様々な生物種間で大 Maf 群転写因子の結合配列が保存されており、その配列依存的に転写が活性化されることが明らかとなった。

AIM は動脈硬化病巣での泡沫細胞のアポトーシスを抑制する因子として同定されており、AIM 欠損マウスでは、動脈硬化病巣の形成が、著明に抑制される。そこで、動脈硬化病巣形成における MafB の機能を、培養細胞、動物個体を用いてさらに解析した。MafB 欠損マウスは出生直後に死亡するため、MafB 欠損の胎児肝臓細胞を移植した LDLR 欠損マウスに、高カロリー食を与えて、動脈硬化病巣の発症を解析した。その結果、MafB 欠損の胎児肝臓の細胞を移植したマウスでは、野生型の細胞を移植したマウスと比較して、動脈硬化病巣の拡大が有為に抑制されていた。それらの病巣では AIM の発現が著しく減少しており、マクロファージでのアポトーシスが促進していた。以上の結果から、MafB は動脈硬化病巣での泡沫細胞の生存に必須の転写因子であることが明らかとなった。

(3) MafB⁺/:-:c-Maf⁺/:-重複ヘテロ欠損マウスの解析

129 と C57BL/6 マウスの遺伝的背景で重複ヘテロマウスを作製した。重複ヘテロ欠損マウスは生存可能で、しかも生殖も可能であった。このマウスを解析したところ、単独ヘテロ欠損マウスでは見られなかった表現型として、加齢とともに脾腫およびリンパ節腫脹が観察され、その原因はマクロファージ及び樹状細胞の異常増殖であった。さらにこれらのマウスでは、自己抗体の産生を伴う自己免疫疾患を発症することが明らかとなった。それぞれの遺伝子破壊時に挿入したマーカー遺伝子である GFP と LacZ は、増殖しているマクロファージと樹状細胞に発現しており、これらの細胞がこの自己免疫疾患発症の原因であると考えられた。これらのマクロファージでの遺伝子発現を解析したところ、C1q の発現が減少していることが明らかとなった。C1q はアポトーシス細胞の食事に重要な分子であり、C1q 欠損マウスでは 129 と C57BL/6 マウスの遺伝的背景で、自己免疫疾患を発症することが、以前報告されている。これらの事実から、重複ヘテロマウスの自己免疫疾患発症原因の一つに、C1q の発現減少があるもとと考えられた。

(4) microarray による MafB および c-Maf に共通する単球・マクロファージ系列細胞における標的遺伝子の解析

前述のように、重複ヘテロマウスでは C1q の発現が減少していることが明らかとなった。発現量を定量的 PCR で確認したところ、野生型のほぼ半分まで減少していることが確認された。

(5) MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスの解析

MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスでは、重篤な造血障害を起こし胎生 12.5 日までに全ての重複欠損マウスが死亡する。その死因を解析するために、胎児肝臓での造血の微小環境（血島：Blood island）を解析した。胎児肝臓での MafB および c-Maf の発現細胞を同定するために、免疫染色を行ったところ、いずれもマクロファージ特異的に発現していることが確認された。さらに試験管内での血島の再構成実験を行ったところ、重複欠損マウスではマクロファージの異常により血島の形成異常があることが明らかとなった。血島の形成異常は C57BL/6 マウスの戻し交配した c-Maf 単独欠損マウスにも観察されることが明らかとなった。

(6) MafB/c-Maf 重複完全欠損マウスの胎児肝臓における microarray 解析

血島形成異常および死因を明らかにする

ために、11.5 日の MafB/c-Maf 重複完全欠損マウス、MafB/c-Maf 重複ヘテロ欠損マウス、野生型マウスの肝臓より mRNA を抽出し、microarray による解析を行った。その結果、アポトーシス細胞除去に係わるいくつかの接着分子の発現が著しく低下していること、IL-1、IL-6、TNF- α 等の炎症性サイトカイン遺伝子の発現が上昇していることが明らかとなった。これらの炎症性サイトカインの上昇により、胎生中期に死亡することが予想された。

(7) 成体における大 Maf 群転写因子の機能解析

成体での大 Maf 群転写因子の解析を行うために、骨髄移植マウスを作製し、解析した。当初の予定では、単球・マクロファージ系列の細胞が著しく減少している M-CSF (CSF-1) 受容体欠損マウスをレシーピエントとする予定であったが、Ly5.1/5.2 のモニターシステムを用いることにより、ドナー側のマクロファージで置換されていることが追跡可能となったので、Ly5.1/5.2 のマウスを用いて骨髄移植を行った。その結果、c-Maf 欠損マウスの胎児肝臓の造血細胞を移植したマウスでは、胎生期と同様に F4/80 陽性マクロファージが減少していた。しかし、正常の状態では、胎生期に認められる貧血は確認されなかった。

(8) レトロウイルス遺伝子導入によるレスキュー実験

レトロウイルスにより遺伝子導入系を確立するために、レトロウイルスベクターに c-Maf cDNA を挿入し、レトロウイルスを作製した。コントロール実験として、正常の骨髄細胞に c-Maf を導入し、遺伝子の発現が維持されるか、造血に異常を起こさないかを確認した。現在経時変化を追跡中であるが、これまでのところ遺伝子発現が観察され、明らかな異常は認められないため、遺伝子導入系が確立できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

1. Sultana DA, Tomita S, Hamada M, Iwanaga Y, Kitahama Y, Khang NV, Hirai S, Ohigashi I, Nitta S, Amagai T, Takahashi S, Takahama Y. Gene expression profile of third pharyngeal pouch reveals role of mesenchymal MafB in embryonic thymus development. *Blood*. 113, 2976-2987 2009. (査読有り)
2. Idate-Murakami Y, Yatabe Y, Sakaguchi T, Sasaki E, Yamashita Y, Morito N, Yoh Y, Fujioka

Y, Matsuno F, Hata H, Mitsuya H, Imagawa S, Suzuki A, Esumi H, Sakai M, **Takahashi S**, Mori N. c-Maf expression in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Am J Surgical Pathol.* 31, 1695-1702, 2007. (査読有り)

3. Moriguchi T, Hamada M, Morito N, Terunuma T, Hasegawa K, Zhang C, Yokomizo T, Esaki R, Kuroda E, Yoh K, **Kudo T**, Nagata M, Greaves DR, Engel JD, Yamamoto M, **Takahashi S**. MafB is essential for renal development and F4/80 expression in macrophage. *Mol Cell Biol.* 26, 5715-5727, 2006. (査読有り)

〔学会発表〕(計5件)

1. 中村恵弥、濱田理人、**工藤崇**、**高橋智** MafBは動脈硬化発症において泡沫細胞の生存に重要である 分子生物学会／生化学会合同会 12. 9～12. 12, 2008. (神戸)

2. 日下部学、鈴木宏奈、長谷川和輝、濱田理人、**工藤崇**、**高橋智** 転写因子c-Mafの胎児造血における機能解析 分子生物学会／生化学会合同会 12. 9～12. 12, 2008. (神戸)

3. 服部 元親、濱田 理人、森戸 直記、**工藤 崇**、**高橋 智** 転写因子 $mafB/c-maf$ 二重欠損マウスはSLE様自己免疫疾患を自然発症する 分子生物学会／生化学会合同会 12. 9～12. 12, 2008. (神戸)

4. 鈴木宏奈、長谷川和輝、濱田理人、日下部学、**工藤崇**、**高橋智** 胎児造血におけるc-Mafの役割 分子生物学会／生化学会合同会 12. 11～12. 15, 2007. (横浜)

5. **高橋 智** 大Maf群転写因子による細胞のがん化機構の解明 癌学会 9. 28～9. 30, 2006 (横浜)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：50271896

(2) 研究分担者

工藤 崇 (KUDO TAKASHI)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号：20288062

(3) 連携研究者

なし