

氏名(本籍)	なかむらめぐみ 中村恵弥(兵庫県)			
学位の種類	博士(医学)			
学位記番号	博甲第6593号			
学位授与年月日	平成25年3月25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 promotes atherosclerosis by inhibiting foam cell apoptosis (MafBは泡沫細胞のアポトーシスを抑制することによって動脈硬化を促進する)			
主査	筑波大学教授	医学博士	久武幸司	
副査	筑波大学教授	医学博士	長田道夫	
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	鈴木浩明	
副査	筑波大学講師	博士(農学)	中川嘉	

論文の内容の要旨

(目的)

動脈硬化発症の過程においてマクロファージ (Mφ) は酸化 LDL を取り込み、泡沫化して蓄積することから重要な役割を果たしている。しかし、この泡沫細胞の生存、維持における分子機構については不明な点が多い。一方、大 Maf 群転写因子 MafB は Maf 認識配列 (MARE) への結合を介して、遺伝子発現を制御する。また血球系において単球-マクロファージに特異的に発現しているが、*in vivo* における詳細な機能は不明である。しかし近年、動脈硬化モデルマウスの骨髄由来 Mφ において *Mafb* の発現が上昇していることが報告された。また、Mφ における MafB 欠損の影響を網羅的に調べるために、*Mafb* 欠損マウス由来の Mφ を使用してマイクロアレイ解析を行った。その結果、MafB 欠損 Mφ では AIM (Apoptosis Inhibitor expressed by Macrophage) の発現が顕著に減少していた。この AIM は核内受容体型転写因子の LXR (liver X receptor) / RXR (retinoid X receptor) のヘテロ二量体による制御を受ける。また、AIM 欠損マウスは動脈硬化発症において泡沫細胞のアポトーシスが促進し、初期病変の進展が抑制されることが報告されている。従って、本研究では AIM の制御を介した動脈硬化発症における MafB の機能を解析することを目的とした。

(対象と方法)

生体で MafB が動脈硬化発症に関与するか調べるため、動脈硬化モデルマウス (*LDLR*^{-/-}) に *Mafb* 欠損マウス胎仔肝由来の造血幹細胞を移植して血液の再構築を行った後、動脈硬化を誘導して免疫学的、組織学的解析を行った。次に *Mafb* 欠損マウスは生後間もなく死亡するため、胎仔肝臓細胞から分化誘導した Mφ を用いて real time RT-PCR で遺伝子の発現変化を検討した。また、MafB による AIM の発現制御機構を調べるために、Luciferase assay、gel shift assay、ChIP assay によるプロモーター解析を行った。さらに、AIM はアポトーシス抑制機能を持つことから、Mφ のアポトーシスに対する MafB 欠損の影響を検討するために、アポトーシス誘導実験、並びに LXR/RXR のアゴニスト、AIM タンパクを用いてレスキュー実験を行った。また、LXR/RXR による MafB の発現制御機構を調べるため、siRNA を用いて培養 Mφ で LXR をノックダウンし、*Mafb* の発現変化を調べた。

(結果)

最初に、動脈硬化モデルマウス (*LDLR^{-/-}*) に *Mafb* 欠損マウスの胎仔肝臓細胞を移植して血液を再構築し、組織学的解析を行った。その結果、野生型に比べて *Mafb* 欠損マウスでは病変部が著しく減少した。また、病変部中の *Mafb* 欠損マウス由来の M ϕ では AIM の発現が減少し、アポトーシス細胞が増加していた。次に、M ϕ のアポトーシスに対する MafB 欠損の影響を検討するため、酸化 LDL、またはサイトカイン欠乏によるアポトーシス誘導実験を行ったところ、MafB 欠損 M ϕ ではアポトーシス細胞が野生型に比べて増加した。また、このアポトーシスは AIM タンパクの添加によってレスキューされた。このことから、MafB 欠損 M ϕ では AIM の発現が誘導されないために、野生型に比べてアポトーシスが促進することが示唆された。

これまで AIM は LXR/RXR による制御を受けるとされていたことから、野生型、MafB 欠損、siRNA を用いて LXR をノックダウンした M ϕ に LXR のアゴニストである T1317、RXR のリガンドである 9-*cis*-retinoic acid を添加し、real time RT-PCR で *Mafb*、AIM の発現変化を確認した。その結果、LXR/RXR の活性化によって MafB が誘導され、MafB が AIM の発現を制御することが明らかとなった。また、AIM 遺伝子のプロモーター領域をデータベース解析したところ、哺乳類で保存性の高い MARE が存在した。そこで、AIM のプロモーター解析を行った結果、*MafB* が AIM のプロモーター中に存在する MARE を介して発現を直接正に制御することが分かった。

(考察)

動脈硬化モデルマウスを用いた解析により、*Mafb* 欠損マウスでは動脈硬化病変部が減少することが分かった。これは AIM 欠損マウスと同様の表現型である。一方、この *Mafb* 欠損マウスの血清コレステロール分画、チオグリコレート刺激による腹腔 M ϕ の細胞数等に変化が見られなかったことから、MafB が欠損すると AIM が減少し、泡沫細胞のアポトーシスが促進することで動脈硬化が改善されることが示唆された。

また、同じ大 Maf 群転写因子に属する *c-Maf* も M ϕ に発現しているが、野生型 M ϕ への LXR/RXR アゴニスト刺激時の *c-Maf* の発現、*c-Maf* 欠損 M ϕ における AIM の発現に変化が見られなかったことから、本研究により明らかとなった動脈硬化病変部中の M ϕ における AIM の制御には MafB が重要な役割を果たしていると考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は、MafB 転写因子の *in vivo* での機能解析、特に M ϕ 内での解析を中心に行っている。ノックアウトマウス等の詳細な解析から、M ϕ 内での LXR/RXR、MafB および AIM の機能的相互関係を明らかにしており、高く評価できる。特に、MafB による泡沫細胞のアポトーシス制御機構の解析を通して、動脈硬化のメカニズムの一端を明らかにしたことは特筆に値する。

平成 25 年 1 月 9 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

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。