

氏名	越田 隆介
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	博甲第 7842 号
学位授与年月	平成 28 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	ミクログリアにおける MafB の機能解析

主査	筑波大学教授	医学博士	加藤 光保
副査	筑波大学教授	医学博士	二宮 治彦
副査	筑波大学講師	博士 (理学)	梶 和子
副査	筑波大学講師	博士 (医学)	田原 聡子

## 論文の内容の要旨

### (目的)

ミクログリアは中枢神経系に存在する組織マクロファージである。近年の Fate mapping によって、ミクログリアは、造血幹細胞由来のマクロファージとは発生系譜が異なり、卵黄嚢由来であることが明らかになっている。また、特有の遺伝子発現プロファイルを示しており、独自の分子ネットワークが形成されていることが示唆されている。granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) は骨髄球系細胞の増殖と分化に関わるサイトカインであり、ミクログリアに対しては細胞増殖を刺激するとともに、樹状細胞様に形態を変化させる。しかし、ミクログリアの細胞内で GM-CSF シグナルがどのように調節されているかについては、不明な点が多く残されている。MafB は bZip 型転写因子であり、単球・マクロファージ系列で高度に発現している。ミクログリアにおいても MafB の発現は認められていたが、その機能についてはこれまで不明であった。

本研究では、ミクログリアにおける MafB の役割を明らかにすることを目的とした。特に、MafB と GM-CSF シグナルとの関連について検証した。

### (対象と方法)

*Mafb* 遺伝子欠損マウス (*Mafb* の遺伝子座に GFP がノックインされている) の脳を用いて、混合グリア培養を行い、そこから初代培養ミクログリアを得た。その際、M-CSF (10 ng/ml) または GM-CSF (10 ng/ml) 存在下で培養を行い、ミクログリアの細胞増殖、分化・成熟マーカーの発現、細胞形態に対する作用を検討した。また *in vivo* における MafB の発現を評価するために、*Mafb*-GFP ノックイン (=

*Mafb*ヘテロ接合体) マウスを用いて、脳の免疫組織学的解析を行った。

(結果)

GM-CSF 存在下で混合グリア培養を行うと、GM-CSF の濃度依存的にミクログリアの増殖が促進した。一方、M-CSF 存在下では、ミクログリアの増殖に変化を与えなかった。また、GM-CSF 存在下では、単球・マクロファージ系列の分化マーカーである CD11b の発現が大きく減弱したが、M-CSF 存在下ではわずかに減弱したのみであった。以上の結果によって、GM-CSF は M-CSF よりも強く増殖を促進させるだけでなく、細胞接着を変化させることを明らかにした。

脳の免疫組織学的解析では、胎生期の未成熟ミクログリアでは *MafB* の発現が低い、成体の成熟ミクログリアでは、その発現が上昇していた。次に、M-CSF または GM-CSF 存在下で混合グリア培養を行ったところ、GM-CSF によって、ミクログリアにおける *MafB* の発現が低下した。GM-CSF または M-CSF 存在下で培養すると、GM-CSF 存在下では、*Mafb* 遺伝子欠損細胞は、野生型の細胞よりも高い増殖能を示した。また、GM-CSF 存在下では、*Mafb* 遺伝子欠損細胞において CD11b の発現や、ミクログリアの成熟マーカーである *P2ry12* の発現が、野生型よりも大きく低下していた。一方、M-CSF 存在下では、遺伝子型による明らかな表現型の違いは認められなかった。

次に、GM-CSF で培養したミクログリアの細胞形態を比較した。正常型では半分程度が偽足形成を示したが、*Mafb* 遺伝子欠損細胞では、90%程度が円形のままであった。その際、*Mafb* 遺伝子欠損細胞では、野生型よりも RhoA が活性化していた。さらに *Mafb* 遺伝子欠損細胞に ROCK 阻害剤を添加すると、伸展細胞が増加した。以上の結果によって、*Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアは、RhoA の活性化を介して、円形の細胞形態を示すことが明らかになった。

(考察)

本研究によって、ミクログリアにおいて *MafB* が GM-CSF シグナルに拮抗することを示した。一方、マクロファージや造血幹細胞を用いた先行研究において、*MafB* は M-CSF に対する感受性を抑制するが、GM-CSF に対しては影響を与えないことが報告されている。マクロファージとミクログリアで結果が異なる理由は明らかではないが、これはミクログリアの「独自性」によるのかもしれない。ミクログリアは、造血幹細胞由来のマクロファージとは発生系譜が異なり、異なった分子ネットワークが形成されている。トランスクリプトーム解析でもミクログリアは特有の遺伝子発現プロファイルを示している。今後は、網羅的データを詳細に解析することで、ミクログリアにおける独自の分子ネットワークの解明につながることを期待される。

また本研究では、GM-CSF 存在下で *Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアの偽足形成が抑制されており、これは RhoA の過剰な活性化が一因であることを明らかにした。Rho GTPase は細胞の形態や運動性だけでなく、ミクログリアの活性化にも関与することが示唆されている。今後は、GM-CSF が多量に産生される疾患モデル（実験的自己免疫性脳脊髄炎など）において、*Mafb* 遺伝子欠損ミクログリアが異常な活性化を示すか否か検証することでミクログリアにおける *MafB* の機能についてさらに明らかにすることが期待される。

## 審査の結果の要旨

### (批評)

本研究は、*Mafb* 遺伝子欠損マウスを用いて、ミクログリアにおける MafB の機能を解析し、MafB の欠損は GM-CSF による細胞増殖を亢進させる一方で、細胞接着、偽足形成、成熟マーカー遺伝子である *P2ry12* の発現を抑制することを明らかにし、ミクログリアの GM-CSF 依存的な増殖を抑制し、分化・成熟を誘導していることを明らかにした点で独創性のある優れた研究である。

平成 28 年 1 月 12 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）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。