

令和元年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18398

研究課題名(和文) 転写因子MafBによる腫瘍随伴マクロファージ増殖の制御

研究課題名(英文) Regulation of Tumor associated macrophage number by transcription factor MafB

研究代表者

濱田 理人 (Hamada, Michito)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：20567630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍随伴マクロファージ(TAM)は、増殖因子、血管新生因子、免疫抑制因子などを発現することにより腫瘍増殖を促進する能力を持つ細胞群である。本研究では、転写因子MafBの新たな機能を解明し、脾臓におけるマクロファージを標的とした新たな癌治療法開発を目指す。マクロファージ特異的にMafbを欠損させたマウス(MafbCKO)にマウス肺がん細胞を皮下移植すると、腫瘍の大きさが顕著に大きくなるという結果が得られている。また腫瘍内のマクロファージ数を測定したところMafbCKOの腫瘍内のマクロファージ数は増加することが明らかとなった。これはMafBは腫瘍内のマクロファージ数を決定する因子であることを示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MafBを欠損した脾臓マクロファージは、IL-6の発現が亢進し、脾臓のHSCやマクロファージ前駆体のM-CSFの取り込みを促進させてしまうことによって、TAM数を増加させ、腫瘍成長を促進することが明らかとなった。この機構は、脾臓におけるTAMの産生メカニズムを明らかにした新しい発見であり、さらなる詳細な解析によって今後の新たながん治療の基盤確立にも繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：Tumor-associated macrophages (TAMs) have the ability to promote tumor growth by expressing growth factors, angiogenic factors, immunosuppressive factors. In this study, we elucidated the new function of transcription factor MafB and aim to develop new cancer therapeutics targeting macrophages in spleen. Subcutaneous transplantation of mouse lung cancer cells into a mouse (Mafb CKO) deficient in Mafb specifically for macrophages has shown that the size of the tumor is significantly increased. Moreover, in the tumor of Mafb CKO macrophage were increased. This indicates that MafB is a factor that determines the number of macrophages in a tumor.

研究分野：分子生物学

キーワード：MafB 腫瘍随伴マクロファージ 転写因子 悪性腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

腫瘍増殖促進作用を持つ TAM は、担がん患者の生命予後に深く関わる。実際に、悪性度が高いホジキンリンパ腫や脳腫瘍の組織では、TAM が多く含まれており、TAM が少ない患者は生存率が高いことが報告されている (Steidl et al., *N ENGL J MED*, 2010, Komohara et al., *J Pathol*, 2008)。

2011 年には、単球を誘引するケモカインである CCL2 の中和抗体により乳がん組織の TAM 浸潤を抑制することで、マウス乳がんの肺転移を減少させることに成功した (Qian et al., *Nature*, 2011)。一方、最近の報告では、抗 CCL2 抗体の投与を休止すると、逆に TAM が増加し転移が増え、死亡率が上がるということがわかってきている (Bonapace et al., *Nature*, 2014)。このように TAM や単球細胞の腫瘍への浸潤を抑制する治療は、現段階ではリスクが高い。

一方、Cortez-Retamozo らは、腫瘍内に浸潤する単球やマクロファージが、脾臓の造血幹細胞由来であることを脾臓細胞の移植実験により証明した。またヒトがん患者でも脾臓で造血能が上がっていることを示した。(Cortez-Retamozo et al., *PNAS*, 2012)。その後、AngiotensinII が脾臓からの TAM の増殖に必要であることを示している (Cortez-Retamozo et al., *Immunity* 2013)。これらのことから、脾臓でのマクロファージ前駆細胞の増殖を抑制し、腫瘍組織への TAM 浸潤を減弱させることは、新たながん治療の標的となりうると考えられる。しかし、脾臓のマクロファージ前駆細胞が、どのような遺伝的プログラムによって腫瘍組織に浸潤するマクロファージを生み出すのか全くわかっていない。

2. 研究の目的

腫瘍随伴マクロファージ (Tumor-associated macrophage: TAM) は、増殖因子、血管新生因子、免疫抑制因子などを発現することにより腫瘍増殖を促進する能力を持つ細胞群である。また、放射線治療や血管新生阻害剤などによる細胞障害が、TAM の誘導に働き、抗がん治療耐性の原因となっている (Palma et al., *Cancer Cell*, 2013)。このため TAM は新たながん治療の重要な標的の一つとして考えられている。本研究では、転写因子 MafB が未分化マクロファージ前駆細胞の分化を制御するメカニズムを解明し、脾臓におけるマクロファージ前駆細胞を標的とした TAM を減少させる治療法の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

マクロファージ特異的に *Mafb* を欠損させた、C57BL/6J 遺伝的背景の *LysM-Cre;;Mafb^{fl}* マウスを *Mafb* 欠損マウス (以下 MafBCKO) として用いた。

(1) マクロファージ除去実験

・クロドロン酸内包リポソーム 300 (片山化学工業) を用いて生体のマクロファージを除去しマウス肺癌細胞 (LLC) をマウス皮下に移植し腫瘍の解析を行った。

(2) 脾臓の解析

・脾臓を摘出、あるいは MafBCKO の脾臓を野生型に移植し、脾臓が腫瘍の大きさや TAM の数に影響を与えるか検討した。

4. 研究成果

(1) MafB は脾臓において腫瘍増殖を抑制する。

WT 及び *Mafb* CKO から脾臓を摘出し、1週間後に LLC を皮下移植し、形成された腫瘍の重量を測定し、FACS 解析にて腫瘍内の TAM 数を調べた。同様の操作で、脾臓を温存させた WT、*Mafb* CKO の腫瘍重量、腫瘍内の TAM 数の解析も行った。脾臓がある状態では、WT に比べ *Mafb* CKO で腫瘍重量が 7 倍にも増加したが、脾臓摘出マウスでは2週間後に形成された腫瘍重量が WT と *Mafb* CKO で有意な差が見られなかった(図1)。

WT または *Mafb* CKO の脾臓を野生型の *Mafb*^{+/+}マウスに移植し、WT^{spln} と、*Mafb* CKO^{spln} を作製した。これらのマウスに LLC を移植し、2週間後に腫瘍重量と腫瘍中の TAM 数の解析を行った。結果、*Mafb* CKO^{spln} において、WT^{spln} よりも腫瘍サイズの増加を示した(図2)。この結果より、MafB が脾臓での TAM の産生及び腫瘍成長に関わっていることが示唆された。

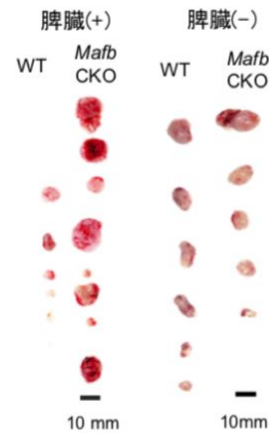


図1. 脾臓を摘出すると *Mafb*CKO と WT 間で腫瘍成長に差が見られない。

(2) *Mafb*欠損マクロファージを除去すると、腫瘍成長及び脾臓での TAM への造血が抑制される。

脾臓の TAM への分化機構には脾臓マクロファージが関与しているのではないかと仮説を立て、クロドロネイトリポソームによりマクロファージを除去する実験を行った。

脾臓内マクロファージが HSC の TAM への分化制御に重要であることを示すために、クロドロネイトリポソーム(クロドロネイトリポソーム(+))またはコントロールリポソーム(クロドロネイトリポソーム(-))を WT、*Mafb* CKO に投与し、その翌日に LLC を移植し、移植2週間後に、マウスから腫瘍及び脾臓を取り出し、脾臓中のマクロファージ数、腫瘍重量の解析を行った。その結果 *Mafb*CKO ではクロドロネイトリポソームを投与すると顕著に腫瘍サイズが減少することが明らかとなった(図3)。



図2. *Mafb*CKO の脾臓を移植したマウスは腫瘍成長が WT より促進する。

(3) *Mafb* 欠損マウスでは担がん状態における脾臓での IL-6 の発現が上昇し、IL-6 は脾臓中のマクロファージ前駆体の増殖に影響を及ぼす。

LLC を移植してから3週間経過した WT と *Mafb* CKO における脾臓での IL-6 の発現を、定量的 RT-PCR と免疫染色によって解析した。定量的 RT-PCR の結果、*Mafb* CKO では脾臓内の *Mafb* の発現が有意に下がるとともに、*IL-6* の発現が約 2.3 倍まで有意に増加した(図4左)。さらに、脾臓の免疫染色の結果、*IL-6* の発現が *Mafb* CKO で顕著に観察できた(図4右)。したがって、MafB は担がん状態における脾臓での *IL-6* の発現を抑制していることが示唆された。

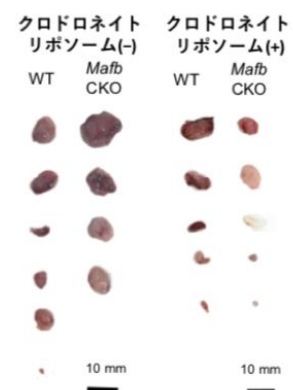


図3. クロドロネイトリポソームを投与すると *Mafb* CKO で腫瘍成長が抑制される。

以上より、MafBを欠損した脾臓マクロファージは、IL-6の発現が亢進し、脾臓のHSCやマクロファージ前駆体のM-CSFの取り込みを促進させてしまうことによって、TAM数を増加させ、腫瘍成長を促進することが明らかとなった(図5)。この機構は、脾臓におけるTAMの産生メカニズムを明らかにした新しい発見であり、さらなる詳細な解析によって今後の新たながん治療の基盤確立にも繋がると考える。

また、腫瘍を植えていない状態でも MafB CKO で脾臓中のマクロファージ前駆体やHSCが増加していたことにより、本研究で示されたメカニズムはがんだけでなく、マクロファージの増殖が亢進するような疾患のメカニズムにも関与するのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Kenta Kikuchi, Mayumi Iida, Naoki Ikeda, Shigetaka Moriyama, **Michito Hamada**, Satoru Takahashi, Hiroshi Kitamura, Takashi Watanabe, Yoshinori Hasegawa, Koji Hase, Takeshi Fukuhara, Hideyo Sato, Eri H. Kobayashi, Takafumi Suzuki, Masayuki Yamamoto, Masato Tanaka and Kenichi Asano Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. *J Immunol*, 2018, 201,635-651.(査読有り)
2. Yuki Tsunakawa, **Michito Hamada**, Yurina Matsunaga, Sayaka Fuseya, Hyojung, Jeon, Yuji Wakimoto, Toshiaki Usui, Maho Kanai, Seiya Mizuno, Naoki Morito, Satoru Takahashi. Mice harboring an MCTO mutation exhibit renal failure resembling nephropathy in human patients. *Experimental Animals*, 8(1):103-111 (責任著者)(査読有り)
3. Kaushalya Kulathunga, **Michito Hamada**, Yukiko Hiraishi, Mao Otake, Mai Thi Nhu Tran, Olivia Cheng, Junko Tanaka, Tomoki Sakasai, Shota Sakaguchi, Yuka Sugiyama, Bernd K. Fleischmann, Satoru Takahashi, Yoshihiro Miwa. A Novel iRFP-Incorporated in vivo Murine Atherosclerosis Imaging System. *Scientific Reports* volume 8, Article number: 14515, 2018 (筆頭、責任著者)(査読有り)
4. Naoki Morito, Keigyou Yoh, Toshiaki Usui, Hisashi Oishi, Masami Ojima, Akiko Fujita, Ryusuke Koshida, Hossam H. Shawki, **Michito Hamada**, Masafumi Muratani, Kunihiro Yamagata, Satoru Takahashi. Transcription factor MafB may play an important role in secondary hyperparathyroidism. *Kidney International* 93, 54-68, 2018(査読有り)
5. Mai Thi Nhu Tran, **Michito Hamada**, Hyojung Jeon, Risako Shiraishi, Keigo Asano, Motochika Hattori, Megumi Nakamura, Yuki Imamura, Yuki Tsunakawa, Risa Fujii, Toshiaki Usui, Kaushalya Kulathunga, Christina-Sylvia Andrea, Ryusuke Koshida, Risa Kamei, Yurina Matsunaga, Makoto Kobayashi, Hisashi Oishi, Takashi Kudo & Satoru Takahashi. MafB is a critical regulator of complement component C1q. *Nature Communications* volume 8, Article number: 1700, 2017 (筆頭、責任著者)(査読有り)
6. Jhang-Sian Yu, **Michito Hamada**, Shigeo Ohtsuka, Keigyou Yoh, Satoru Takahashi, Shi-Chuen Miaw, Differentiation of IL-17-Producing Invariant Natural Killer T Cells Requires Expression of the Transcription Factor c-Maf. *Front Immunol.* 2017; 8: 1399. (査読有り)

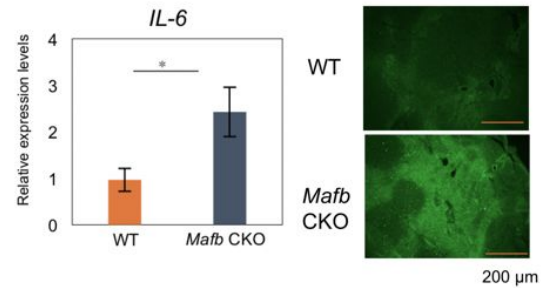


図4. MafBCKOではIL-6の発現が増加する。

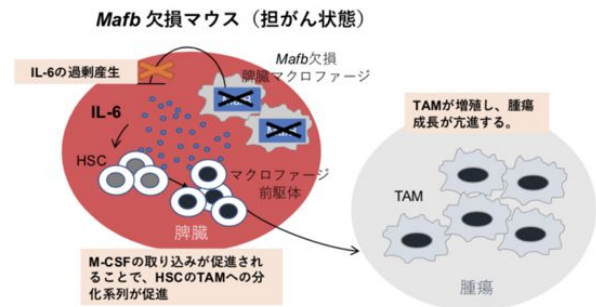


図5. 【結論】脾臓マクロファージに発現するMafBはIL-6を制御し、HSCのTAMへの分化を抑制することで、腫瘍成長を抑える。

7. Ryusuke Koshida, Hisashi Oishi, **Michito Hamada**, Yosuke Takei, Satoru Takahashi. MafB is required for development of the hindbrain choroid plexus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 483, Issue 1, Pages 288-293, 2017. (査読有り)
8. Masashi Miyai, **Michito Hamada**, Takashi Moriguchi, Junichiro Hiruma, Akiyo Kamitani-Kawamoto, Hajime Watanabe, Mariko Hara-Chikuma, Kenzo Takahashi, Satoru Takahashi, Kohsuke Kataoka. Transcription Factor MafB Coordinates Epidermal Keratinocyte Differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 136, 1848-1857, 2016(査読有り)
9. Mai Thi Nhu Tran, **Michito Hamada**, Megumi Nakamura, Hyojung Jeon, Risa Kamei, Yuki Tsunakawa, Kaushalya Kulathunga, Yuan-Yu Lin, Kumiko Fujisawa, Takashi Kudo and Satoru Takahashi. MafB deficiency accelerates the development of obesity in mice. *FEBS Open Bio*, 6, 540–547, 2016 (責任著者) (査読有り)
10. Dhouha Daassi, **Michito Hamada**, Hyojung Jeon, Yuki Imamura, Mai Thi Nhu Tran, Satoru Takahashi. Differential expression patterns of MafB and c-Maf in macrophages in vivo and in vitro. Daassi, D., Hamada, M., Jeon, H., Imamura, Y., Nhu Tran, M. T., & Takahashi, S. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 473(1), 118–124, 2016 (責任著者) (査読有り)

[学会発表](計17件)

1. Homeostatic function of MafB in Macrophage 濱田 理人 第91回日本生化学会 招待講演 2018年9月
2. Homeostatic function of MafB in macrophagep, Hamada Michito ISEH 2018 International Society for Experimental Hematology 2018年8月
3. 転写因子 MafB のマクロファージにおける機能解析 濱田 理人 第65回実験動物学会 2018年5月
4. MafB 欠損マウスにおけるマクロファージのアポトーシス細胞貪食機構の破綻 濱田 理人; Tran Mai; 全孝静; 高橋智 第123回 日本解剖学会総会・全国学術集会 /2018-3-28--2018-3-30
5. MafB inhibits tumor growth through regulating Tumor-Associated Macrophages in spleen 藤井梨沙; Hamada Michito; 井上由理; 今村優希; 崇 工藤; 高橋智、第46回日本免疫学会/2017-12-12--2017-12-14
6. MafB は脾臓における腫瘍随伴マクロファージ前駆体を制御し、がんを抑制する 藤井 理沙; 濱田 理人; 井上 由理; 今村 優希; 工藤 崇; 高橋 智 第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会 合同大会/2017-12-6--2017-12-9
7. MafB は腫瘍随伴マクロファージを抑制し腫瘍増殖を制御する 井上 由理; 藤井 理沙; 今村 優希; 濱田 理人; 工藤 崇; 高橋 智 第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会 合同大会/2017-12-06--2017-12-09
8. MafB inhibits tumor growth through regulating Tumor-Associated –Macrophages in spleen 藤井梨沙; Hamada Michito; 井上由理; 今村優希; 崇 工藤; 智高橋 Tsukuba Global Science Week (TGSW) 2017/2017-09-25--2017-09-27
9. MafB は補体 C1q のマスターレギュレーターである 濱田 理人; Tran Mai; 浅野 圭吾; 全 孝静; 高橋智 第3回日本骨免疫学会/2017-6-27--2017-6-29
10. MafB inhibits tumor growth through regulating the population of Tumor-associated macrophages 今村優希; 藤井梨紗; 井上由理; 濱田 理人; Tran Thi Nhu Ma... 15th international congress on Targeted anticancer therapies/2017-3-5--2017-3-8
11. MafB は腫瘍随伴マクロファージ数を制御し、がんを抑制する 今村優希; 藤井梨紗; 井上由理; 濱田 理人; Tran Thi Nhu Ma... 第45回日本免疫学会学術集会 /2016-12-5--2016-12-7

12. MafB は腫瘍随伴マクロファージ数を制御し、がんを抑制する 藤井梨紗; 濱田 理人; 今村優希; 井上由理; 工藤 崇; 高橋 智 第 39 回日本分子生物学会年会 /2016-11-30--2016-12-2
13. The role of MafB in Tumor-associated macrophages and tumor growth 今村優希; 藤井梨紗; 濱田 理人; Tran Thi Nhu Mai; 中根 彩... 第 39 回日本分子生物学会年会 /2016-11-30--2016-12-2
14. MafB deficiency accelerates the development of obesity in mice Hamada Michito; Tran Thi Nhu Mai; 全静孝; 綱川 祐貴; Kula... 第 8 9 回日本生化学会大会 /2016-9-25--2016-9-27
15. Transcription factor MafB is indispensable for homeostatic function of macrophages Hamada Michito 第 2 4 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム /2016-6-4--2016-6-5
16. MafB is the primary regulator of complement component C1q Hamada Michito 日本免疫学会学術集会/2016-12-5--2016-12-7

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。