

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07499

研究課題名(和文) 転写因子MafBによる恒常性維持に関わるマクロファージの制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the regulatory mechanism of macrophages involved in homeostasis by the transcription factor MafB

研究代表者

濱田 理人 (Hamada, Michito)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：20567630

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：単球-マクロファージは組織修復や免疫恒常性維持に必要であり、慢性的な障害などでこれらの機能が損なわれるとマクロファージ自体が病的要因となる。動脈硬化や心筋梗塞、腫瘍ではマクロファージの組織修復機能が逆に病態を悪化させてしまうことがある。これらの病巣に浸潤する単球のほとんどは脾臓由来であることが近年明らかになり、このメカニズムが新たな治療ターゲットとして注目されている。本研究課題では転写因子MafBが脾臓での単球-マクロファージの産生に必要であることを示し、マクロファージが関わる様々な病態の新たな治療標的を探索することを目的とし研究を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は脾臓から病変部や組織に浸潤するマクロファージ数を決定するメカニズムが脾臓マクロファージにあることを明らかにするという点で独自性、創造性が高いと考えている。このメカニズムが明らかとなり、転写因子MAFBの発現をコントロールすることによりマクロファージ数を制御することができれば、腫瘍だけではなく、心筋梗塞、急性腎障害などマクロファージが関わる疾患に対して効果を持つ、これまででない薬剤の開発に役立つものと思われる

研究成果の概要(英文)：Monocytes-macrophages are necessary for tissue repair and maintenance of immune homeostasis, and when these functions are impaired by chronic disorders, macrophages themselves become a pathological factor. In atherosclerosis, myocardial infarction, and tumors, the tissue repair function of macrophages may inversely aggravate the disease state. It has recently become clear that most of the monocytes infiltrating these lesions originate from the spleen, and this mechanism is attracting attention as a new therapeutic target. In this research project, we will demonstrate that the transcription factor MafB is required for the production of monocytes-macrophages in the spleen, and conduct research with the aim of searching for new therapeutic targets for various macrophage-associated pathologies.

研究分野：分子生物学

キーワード：MAFB マクロファージ 恒常性

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは貪食細胞として定義され、様々な物質を取り込み、炎症を惹起したり、抑制したりする。また、炎症反応だけではなく、老化、代謝異常、創傷治癒、腫瘍など様々な病的現象にも重要な役割を果たしている。マクロファージは、組織に存在する在住マクロファージと単球から組織に浸潤する滲出性マクロファージに大きく分かれる。近年になり、組織に損傷が生じた場合は脾臓から単球が浸潤し、炎症や組織修復に重要であることが明らかとなっており、単球のソースとしての脾臓の機能が注目されている (Swirski et al., *Science*. 2009)。ヒトでは脾臓摘出患者において冠状動脈内のマクロファージの分布が減少し、動脈硬化が抑制されることや、急性心筋梗塞患者では心臓において脾臓により産生された単球の蓄積が促進し、組織損傷、心筋機能衰弱を引き起こすことが示されている (Li, et al., *Cardiovasc. Pathol.* 2016, Laan et al., *Eur. Heart. J.* 2014)。しかし、脾臓からどのように、どのようなタイプのマクロファージが産生されるのか、そのメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では脾臓マクロファージに発現する MafB がどのように脾臓からの単球の産生を制御するのか明らかにし、腫瘍、創傷治癒、急性腎障害などマクロファージが浸潤する病態への関わりを調べる。

3. 研究の方法

研究の目的を達成するために、マクロファージ特異的に MafB を欠損させた MafB^{fl/fl}:LysM-Cre (conditional knock out : cKO) マウスを用いて、以下の解析を行った。

1) 創傷治癒モデルにおける MAFB 欠損マウス、脾臓移植による表現型解析

イソフルラン麻酔下で野生型マウス、cKO マウスに直径 5 mm の円形ナイフを用いて皮膚を取り除き、約 10 日で完治する創傷治癒実験を行う。創傷後 3 日目でフローサイトメトリー解析や遺伝子発現解析を行う。また、cKO マウスの脾臓を野生型に移植し創傷することで脾臓による創傷の効果を検討した。

2) 急性腎障害モデルにおける MAFB 欠損マウスの表現型解析

イソフルラン麻酔下で野生型マウス、cKO マウスの腎動静脈をクリップで 60 分虚血させ、急性腎障害を誘導した。また、cKO マウスの脾臓を野生型に移植し急性腎障害を誘導し脾臓の効果を検討した。

4. 研究成果

1) 創傷治癒モデルの解析

まず最初に cKO と野生型マウスで創傷治癒に差が見られるかどうか解析した (図 1)。その結果、野生型マウス群は創傷後 3 日目で約 30% まで傷口が減少するが、cKO では 50% であり、その後も治癒が遅延した。創傷後 3 日目、5 日目の組織を採取し、パラフィン切片を作製し、マッソントリクローム染色を行ったところ、傷口の線維化が遅延していることが明らかとなった。また、創傷部位の肉芽組織を採取し RT-PCR 解析を行ったところ、CCL2, CCL12 などのケモカイン産生が減少し、マクロファージでは Arg1 の発現が減少することが明らかとなった (未発表)。これらのデータについては現在論文を作成している。更に cKO 及び野生型の脾臓を野生型レシピエントの大網内に移植し 2 ヶ月経過したマウスに創傷し、治癒過程を観察したところ、cKO では有意に治癒が遅延することが明らかとなった (図 2)。現在はこのメ

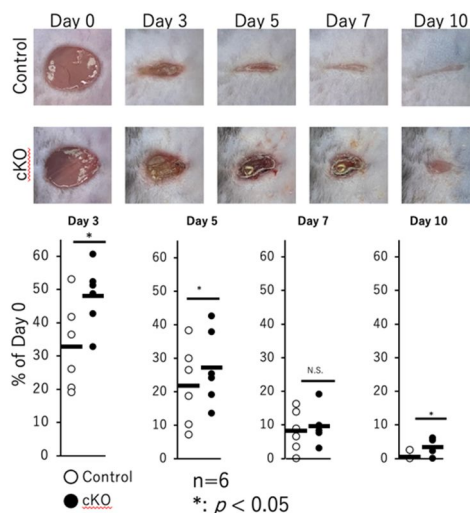


図 1 cKO は Control マウスに比べて創傷治癒が遅延する

カニズムについて詳細な解析を行っている。

2) 虚血性腎障害の解析

次に、虚血性腎障害において MAFB が関与するかどうか解析した。腎臓動静脈を 60 分クリップで虚血させ、その後 1 日おきに血液を採取し、血清中の尿素窒素 (BUN) およびクレアチニン (Cre) を測定した。その結果、cKO マウスを腎臓の虚血後 2 日後から死亡個体が観察され、有意に生存率が低くなることが明らかとなった (図 3 左)。また、BUN, Cre に関しても腎虚血後 2 日以降で cKO で有意に高いことが確認された (図 3 中央、右)。このことから cKO では虚血後の回復に異常があり、腎機能が低下していることが示唆された。このほか、PAS 染色の結果、急性尿細管壊死 (ATN) スコアが有意に高く、また TUNEL 染色により、死細胞が cKO で有意に多くなることが明らかとなった (未発表)。

これは MAFB 欠損マクロファージによる死細胞認識異常や、Damage associated molecular patterns (DAMPs) の除去異常に関係すると思われる (Shichita T et al, *Nat Med*, 2017, Tran MTN and Hamada M et al, *Nat Commun*, 2017)。これらのデータについては現在論文を作成している。

さらに、この急性腎障害において、cKO の脾臓からのサイトカインシグナルや細胞が関与する可能性を探るために、cKO と野生型マウスの脾臓を野生型レシピエントマウスに移植し、虚血性腎障害を誘導した。その結果死亡率、血清 BUN、血清 Cre において、CKO の脾臓を移植した個体のほうが、有意な差は得られなかったが、悪化する傾向が見られた。このことから虚血性腎障害に関しては脾臓による影響は大きくないものの、虚血からの回復に脾臓が貢献する可能性が示唆された。今後さらなる解析が必要になるとと思われる。

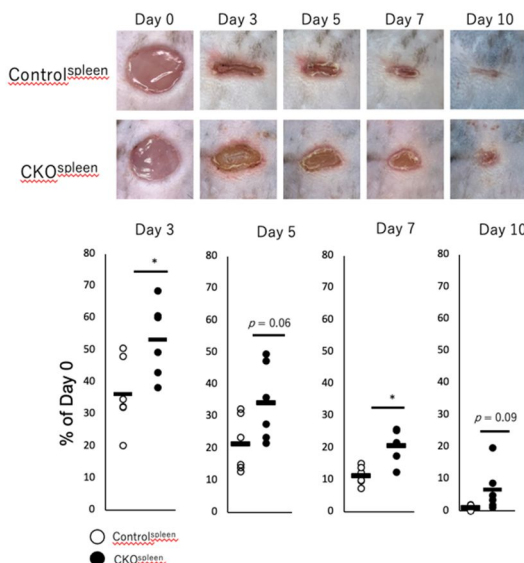


図 2 cKO の脾臓を移植したマウスは創傷治癒が遅延した

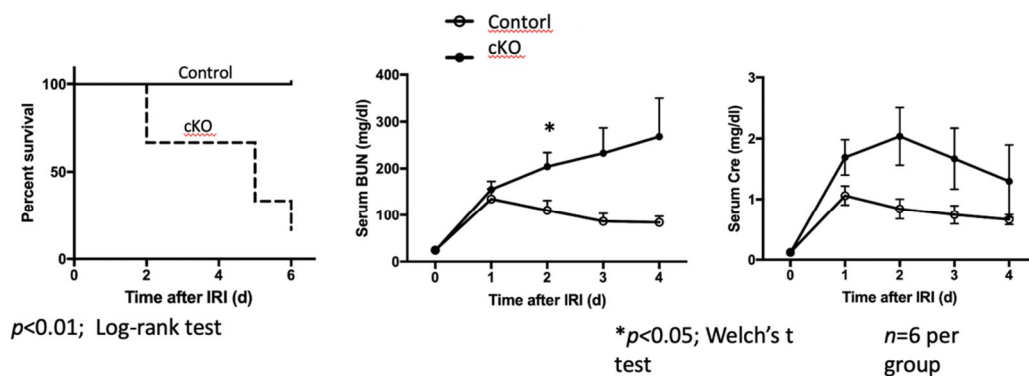


図 3 CKO は虚血性腎障害が control に比べて悪化する

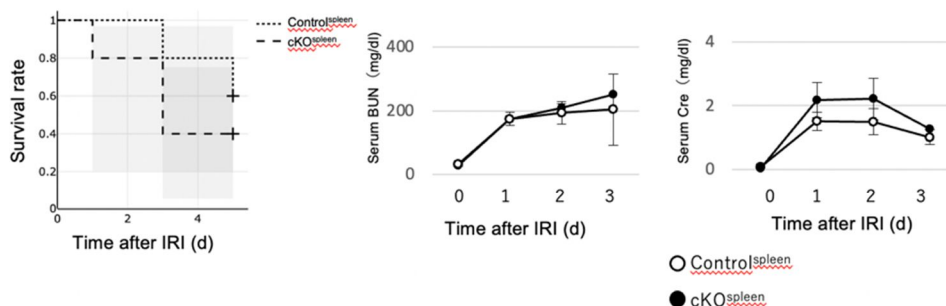


図 4 cKO および野生型の脾臓を移植したレシピエントマウスの虚血性腎障害誘導結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jeon Hyojung, Asano Keigo, Wakimoto Arata, Kulathunga Kaushalya, Tran Mai Thi Nhu, Nakamura Megumi, Yokomizo Tomomasa, Hamada Michito, Takahashi Satoru	4. 巻 11
2. 論文標題 Generation of reconstituted hemato-lymphoid murine embryos by placental transplantation into embryos lacking HSCs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4374
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83652-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hamada Michito, Tsunakawa Yuki, Jeon Hyojung, Yadav Manoj Kumar, Takahashi Satoru	4. 巻 69
2. 論文標題 Role of MafB in macrophages	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 1～10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/exanim.19-0076	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yadav Manoj Kumar, Inoue Yuri, Nakane-Otani Aya, Tsunakawa Yuki, Jeon Hyojung, Samir Omar, Teramoto Akari, Kulathunga Kaushalya, Kusakabe Manabu, Nakamura Megumi, Kudo Takashi, Takahashi Satoru, Hamada Michito	4. 巻 521
2. 論文標題 Transcription factor MafB is a marker of tumor-associated macrophages in both mouse and humans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 590～595
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.10.125	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kanai Maho, Jeon Hyojung, Ojima Masami, Nishino Teppei, Usui Toshiaki, Yadav Manoj Kumar, Kulathunga Kaushalya, Morito Naoki, Takahashi Satoru, Hamada Michito	4. 巻 523
2. 論文標題 Phenotypic analysis of mice carrying human-type MAFB p.Leu239Pro mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 452～457
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.12.033	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上由理; 濱田, 理人; 綱川祐貴; 高橋智
2. 発表標題 創傷治癒における転写因子MafBの機能解析
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上由理; 濱田, 理人; 綱川祐貴; 高橋智
2. 発表標題 Identifying the function of MafB expressed in macrophages during wound healing
3. 学会等名 Tsukuba conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------