

機関番号：11501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20590892

研究課題名（和文）転写因子 MafB 遺伝子改変マウス作成による喫煙肺気腫の病態研究

研究課題名（英文） Study for the pathogenesis of pulmonary emphysema induced by cigarette smoking using newly developed transcription factor MafB gene targeted mouse.

研究代表者

柴田 陽光（SHIBATA YOKO）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：60333978

研究成果の概要（和文）：ドミナントネガティブを用いてマクロファージ特異的に転写因子 MafB の活性を抑制する遺伝子改変マウスを作製した(MSR-DN MafB TG マウス)。この TG マウスにおいて、肺泡マクロファージ数が減少しておりアポトーシスの亢進によるものと考えられた。さらに、本 TG マウスでは細胞の形態や、貪食能などにも変化が観察された。よって、転写因子 MafB の生体における様々な機能（アポトーシスの抑制、細胞形態の制御、貪食能などの機能制御）が明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We generated the macrophage scavenger receptor enhancer-promoter dominant negative (DN) MafB TG mice that could repress MafB transcription activity only in macrophages. In this TG mouse, alveolar macrophages decreased, possibly due to enhanced apoptosis. Furthermore, the alteration of cell shapes and the reduction of phagocytic capacity were observed in this TG mouse. This study revealed that the various in vivo role of transcription factor MafB, such as suppression of apoptosis, maintenance of cell shape, and regulation of phagocytic function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：MafB、喫煙、肺気腫、転写因子、遺伝子改変マウス

## 1. 研究開始当初の背景

これまで当教室は、喫煙負荷慢性閉塞性肺疾患（COPD）マウスの肺泡マクロファージ（AM）で転写因子 MafB が強発現していることを見出した。さらに新たに樹立した MafB 強制発現細胞株からの検討で MafB は喫煙ストレスで惹起されるアポトーシスを抑制し、その survival に寄与することを示した。臨床検体である外科的切除肺を用いた検討では、MafB は重喫煙者では非・軽喫煙者よりも発

現が強く、さらに明らかに COPD を合併している症例では合併していない症例よりも強く発現していた。すなわち MafB は喫煙肺 AM の survival に深く関与し、COPD 病態形成に深く関与していることが想定された。しかし MafB 欠損マウスは致死的であり、これまで遺伝子改変マウスを用いて AM における MafB の役割を検討した報告や、疾患モデルに応用した報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究は MafB のドミナントネガティブ (DN) をマクロファージ特異的に発現する遺伝子改変マウスを作製し、MafB の機能をより深く検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

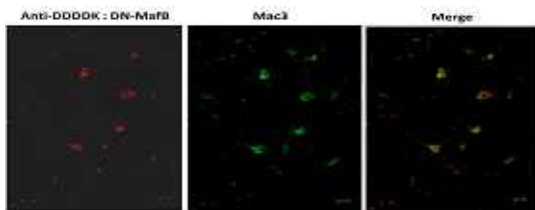
DN として作用する N 末端側を除いた Truncated MafB の cDNA と Macrophage Scavenger receptor enhancer-promoter (MSR E-P) を遺伝子工学的に合成し、マクロファージ特異的に DN MafB を発現するマウスを作製した (MSR-DN MafB TG マウス)。DN MafB の発現は、RT-PCR、免疫染色、reporter assay で確認した。また、気管支肺胞洗浄 (BAL) 細胞の細胞分画、電子顕微鏡による肺泡マクロファージの組織像、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー発現と貪食能の検討を行った。

## 4. 研究成果

DN MafB の遺伝子発現を、肺泡および腹腔マクロファージ、肝組織で確認した。免疫染色によって、肝 Kupffer 細胞、腎系球体足細胞およびボーマン嚢細胞、脾赤脾髄細胞、肺泡マクロファージで DN MafB 蛋白質の存在を確認した (図 1)。

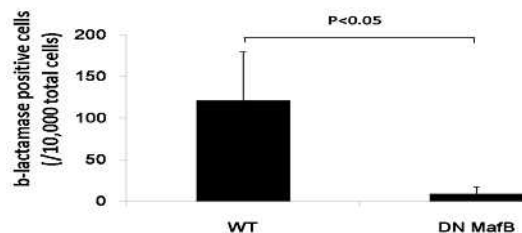
### 図 1: 肺泡マクロファージにおける DN-MafB の発現

Red: DN-MafB, Green: Mac-3, Yellow: merge



さらに骨髄由来マクロファージでのレポーターアッセイにて、DN MafB が MafB 活性を抑制していることを確認した (図 2)。

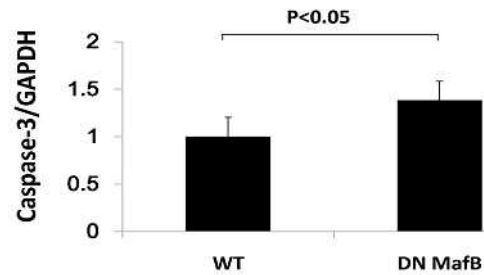
### 図 2: 骨髄由来マクロファージにおける DN-MafB による MafB 転写活性の抑制



BAL 細胞濃度およびマクロファージ分画は DN MafB-TG マウスで有意に減少していた。AM の RT-PCR では caspase-3 が DN MafB-TG マウスで有意に増加しており (図 3) 脾臓の

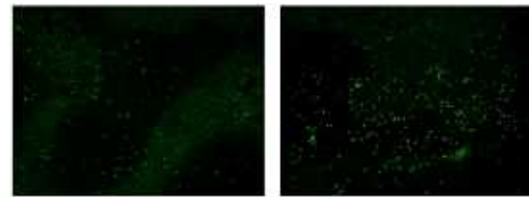
TUNEL 染色では TUNEL 陽性細胞を多数認めた (図 4)。

### 図 3: DN-MafB 肺泡マクロファージにおける caspase-3 発現の亢進



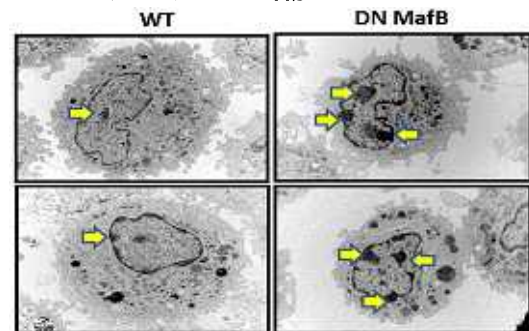
### 図 4: DN-MafB マクロファージにおける TUNEL 陽性細胞の増加

左: コントロール、右: DN-Maf マウス

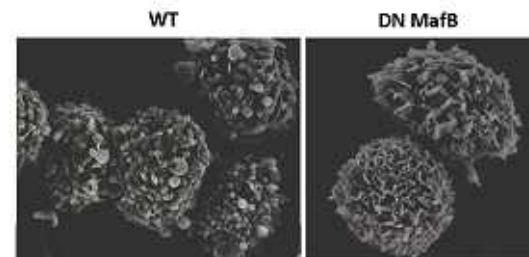


透過電子顕微鏡では核内の高電子密度領域 (ヘテロクロマチン) が DN MafB-TG マウスで有意に増加しており (図 5)。走査電子顕微鏡では偽足の形態が膜状に変化していた (図 6)。

### 図 5: DN-MafB 肺泡マクロファージにおけるヘテロクロマチンの増加

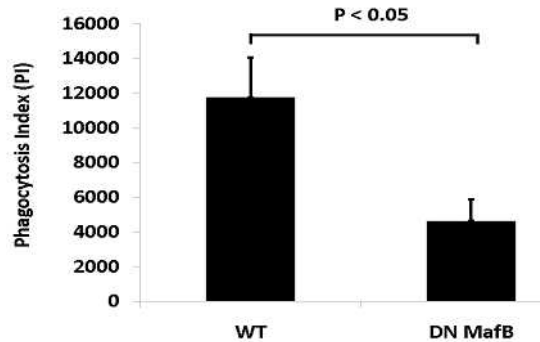


### 図 6: DN-MafB 肺泡マクロファージにおける偽足形態の膜状変化



また、DN MafB-TG マウスのチオグリコレート誘発腹腔マクロファージでは、F4/80、CD11b の発現がともに減弱していたが、無刺激状態の AM ではこれらの発現に変化を認めなかった。また、AM の貪食能は、DN MafB-TG マウスで有意に低下していた ( 図 7 )。

図 7 : DN-MafB 肺胞マクロファージにおける貪食能の低下



以上の結果より、DN MafB-TG マウスのマクロファージの解析から、MafB がアポトーシス制御して肺胞マクロファージの生存を維持し、細胞形態や貪食能などの機能にも影響を及ぼしていることが示された。今後、当マウスを喫煙負荷実験などに応用することにより、生体における MafB の機能がさらに明らかになることが期待される。

#### 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 10 件 )

- Osaka D, Shibata Y, Kanouchi K, Nishiwaki M, Kimura T, Kishi H, Abe S, Inoue S, Tokairin Y, Igarashi A, Yamauchi K, Aida Y, Nemoto T, Keiko Nunomiya1, Koji Fukuzaki K, Kubota I. Soluble Endothelial Selectin in Acute Lung Injury Complicated by Severe Pneumonia. *Int J Med Sci*. In Press 査読有
- Sato M, Shibata Y, Kimura T, Yamauchi K, Abe S, Inoue S, Kishi H, Oizumi H, and Kubota I: Immunohistochemical staining for transcription factor MafB in alveolar macrophages is correlated with spirometric measures of airflow limitation in smokers: *Respirology* 2011 16: 12-130. 査読有
- Kishi H, Shibata Y, Osaka D, Abe S, Inoue S, Tokairin Y, Igarashi A, Yamauchi K, Kimura T, Sato M, Aida Y, Watanabe T, Konta T, Kawata S, Kato T, Kubota I: FEV<sub>6</sub> and FEV<sub>1</sub>/FEV<sub>6</sub> in Japanese participants of community-based annual health check: the

Takahata Study: *Intern Med* 2011 50: 87-93. 査読有

- Osaka D, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Tokairin Y, Igarashi A, Yamauchi K, Kimura T, Sato M, Kishi H, Takabatake N, Sata M, Watanabe T, Konta T, Kawata S, Kato T, and Kubota I: Relationship between habit of cigarette smoking and airflow limitation in healthy Japanese individuals: the Takahata Study: *Intern Med* 2010 49: 1489-1499. 査読有
- Inoue S, Nakamura H, Shibata Y, Abe S, Takabatake N, Sata M, Takeda H, Kubota I.: Effect of antibiotic therapy on the inflammatory responses during streptococcal pneumonia in emphysematous mice. *EXCLI J* 2009;8:50-57 査読有
- Takabatake N, Toriyama S, Igarashi A, Tokairin Y, Takeishi Y, Konta T, Inoue S, Abe S, Shibata Y, Kubota I.: A novel polymorphism in CDC6 is associated with the decline in lung function of ex-smokers in COPD. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;381(4):554-9 査読有
- Igarashi A, Shibata Y, Yamauchi K, Osaka D, Takabatake N, Abe S, Inoue S, Kimura T, Yamaguchi Y, Ishizaki J, Hanasaki K, Kubota I.: Gly80Ser polymorphism of phospholipase A2-IIID is associated with cytokine inducibility in A549 cells. *Respiration*. 2009;78(3):312-21 査読有
- Yamauchi K, Shibata Y, Kimura T, Abe S, Inoue S, Osaka D, Sato M, Igarashi A, Kubota I.: Azithromycin suppresses interleukin-12p40 expression in lipopolysaccharide and interferon-gamma stimulated macrophages. *Int J Biol Sci*. 2009;5(7):667-78 査読有
- Shibata Y, Abe S, Inoue S, Takabatake N, Igarashi A, Takeishi Y, Sata M, Kubota I: Altered expression of antimicrobial molecules in cigarette smoke-exposed emphysematous mice lungs. *Respirology*. 2008;13(7):1061-5 査読有
- Yamauchi K, Ishikawa T, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Takabatake N, Kubota I.: Enhanced interleukin-10 signaling with 14-member macrolides in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *EXCLI J* 2008;7:169-176 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 24 件 )

- 柴田陽光 : ミニシンポジウム COPD の自然歴をめぐって 講演 3 一般住民対象の疫学研究から : 喫煙が肺機能に及ぼす悪影響と気流閉塞進展に關与する因子の検討 ( 高島研究 ) 第 8 2 回閉塞性肺

- 疾患研究会 平成23年1月22日 東京
2. 岸宏幸、柴田陽光等 慢性閉塞性肺疾患患者の運動耐容能を規定する因子の検討 第50回日本呼吸器学会 平成22年4月23日 京都
  3. 佐藤道子、柴田陽光等 ミニシンポジウム Dominant negative (DN) MafB トランスジェニックマウスでは肺胞マクロファージ数が減少する 第50回日本呼吸器学会 平成22年4月24日 京都
  4. 小坂太祐、柴田陽光等 喫煙が呼吸機能に及ぼす影響(高畠町住民健診の疫学解析) 第50回日本呼吸器学会 平成22年4月24日 京都
  5. Kishi H, Shibata Y et al. Exercise tolerance in patients with chronic obstructive pulmonary disease is independent of resting pulmonary or cardiac functions. ATS2010, May 19, 2010 New Orleans USA
  6. Sato M, Shibata Y et al. Dominant negative MafB reduces the numbers of murine alveolar macrophages. ATS2010, May 18, 2010 New Orleans USA
  7. Osaka D, Shibata Y et al. Cigarette smoking causes airflow limitation in Japanese healthy individuals: Takahata Study. ATS2010, May 17, 2010 New Orleans USA
  8. 小坂太祐、柴田陽光等 初回検査時の血中可溶性E-selectin値が肺炎患者における急性肺障害発症の予測因子となる第49回日本呼吸器学会 平成21年6月13日 東京
  9. 佐藤道子、柴田陽光等 喫煙者の肺胞マクロファージにおける MafB 発現と呼吸機能の関係 第49回日本呼吸器学会 平成21年6月12日 東京
  10. 山内啓子、柴田陽光等 アジスロマイシンは炎症刺激に対するマクロファージのIL-12p40の産生を抑制する 第49回日本呼吸器学会 平成21年6月12日 東京
  11. Igarashi A, Shibata Y et al. Functional Analysis of the Single Nucleotide Polymorphism in Secretory Phospholipase A2-IIID. ATS 2008, May 18, 2008, Toronto Canada
  12. Ishikawa T, Shibata Y et al. LPS/IFN-gamma-Induced TNF-alpha Production Is Inhibited by 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl) -glycerophosphocholine (PONPC) in RAW264.7 Cell. ATS 2008, May 20, 2008, Toronto Canada
  13. Takabatake N, Shibata Y et al. A Nonfunctioning Single Nucleotide Polymorphism in Olfactory Receptor Gene Family Is Associated with the Forced Expiratory Volume in the First Second / The Forced Vital Capacity Values of Pulmonary Function Test in a Japanese Population. ATS 2008, May 21, 2008, Toronto Canada
  14. 柴田陽光: シンポジウム7 COPDの新たな診断・治療ターゲット — 4 .COPD患者の遺伝子型による急性増悪の予知と予防— 第48回日本呼吸器学会 平成20年6月16日 神戸
  15. 五十嵐朗、柴田陽光等 肺細胞における分泌型ホスホリパーゼ A2-IIID の第80番目のアミノ酸多型とサイトカイン誘導能との関係 第48回日本呼吸器学会 平成20年6月15日 神戸
  16. 山内啓子、柴田陽光等 マクロファージにおけるアジスロマイシンの抗炎症効果についての検討 第48回日本呼吸器学会 平成20年6月17日 神戸
  17. 佐藤道子、柴田陽光等 喫煙者の肺胞マクロファージにおける MafB 発現の亢進 第48回日本呼吸器学会 平成20年6月17日 神戸
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
柴田 陽光 (SHIBATA YOKO)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号: 60333978
- (2)研究分担者  
渡邊 哲 (WATANABE TETSU)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号: 40359568
- 阿部 修一 (ABE SHUICHI)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 40400543