

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700963

研究課題名(和文)新規転写因子MafB遺伝子改変マウスを用いたマクロファージ腫瘍免疫機構の探究

研究課題名(英文) Investigation of role of MafB for tumor immunity

研究代表者

山内 啓子 (YAMAUCHI, Keiko)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：30536967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：当教室にて作成されたマクロファージ特異的Dominant-Negative MafB遺伝子改変マウス(TG)を用いて、転写因子MafBが腫瘍免疫で演じている役割を検討した。癌細胞移植モデルとして、メラノーマ細胞株を尾静脈からTGマウスと野生型マウスに投与したところ、両群間で生存率に差を認めず、腫瘍内・周辺に存在するマクロファージ数に差は認められなかった。無処置で飼育した場合の両群間の生存率にも差は認めず、ウレタン腹腔内投与後6ヶ月後に発症してくる肺結節・過形成病変に関しても両群で有意差を認めなかった。以上より、転写因子MafBは腫瘍免疫に関しては重要な役割を演じていないことが理解された。

研究成果の概要(英文)：Role of macrophage transcription factor MafB for tumor immunity was investigated using mice that specifically express dominant negative (DN) MafB in macrophages. B16-F10 melanoma cells were administered to the mice from tail vein. Survival rate was not significantly different between wild type mice and DN-MafB transgenic mice (TG). The number of macrophages in tumors and those around tumors were not different between two groups. Survival rate of untreated mice were similar in both groups. In addition, 6 months after intraperitoneal urethane treatment, the sizes of lung tumors, such as nodules and hyperplasia lesions, were measured. Both sizes of lung nodules and hyperplastic lesions were not significantly different between TG and wild type mice. This study revealed that transcription factor MafB does not play important roles for tumor immunity in mice.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：MafB 腫瘍免疫 マクロファージ 転写因子 遺伝子改変マウス 癌

1. 研究開始当初の背景

マクロファージは組織内において多彩な役割を演じている。病原微生物などの異物を認識・貪食し病原体を除去する役割や、炎症性サイトカインを産生し、炎症反応の起点となって抗原提示作用を発揮する。また、アポトーシスを起こした細胞などの残骸を処理することで、組織の修復を促進する。さらには癌細胞のサーベイランスを行い、それを排除する腫瘍免疫の働きも担っている。

近年、マクロファージにはM1系(classically activated)とM2系(alternatively activated)という分化の異なる表現型が存在することが明らかとなり、M1が炎症促進的に働くのに対して、M2は炎症性抑制的に働いていることが理解されるようになった。そして癌組織内においては、M2の亜型である腫瘍随伴マクロファージ(TAM)が、癌細胞への増殖因子を産生し、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を産生し、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)を産生することにより、腫瘍免疫作用とは逆に癌細胞の増殖・進展・転移に深く関与することが報告されている。

我々は慢性閉塞性肺疾患(COPD)において肺マクロファージの数と機能に変化が生じていることに着目し、マクロファージ分化誘導転写因子の中で、MafBの発現が有意に亢進していることを発見した(Machiya et al. *Am J Respir Mol Cell Biol* 2007)。さらに培養マクロファージ細胞にMafBを強制発現させると、MMP発現が抑制されることを確認した。

MafB欠損マウスは生後すぐに死亡するため、MafBの機能を生体内で検討するには新規の遺伝子改変マウスが必要とされた。そこで我々はdominant Negative(DN)MafBをスカベンジャーレセプタープロモーター(SR-P; Horvai A et al. *PNAS* 1995)制御下でマクロファージ特異的に発現させるマウスを作製した(MSR-DNMafBマウス)。この遺伝子改変マウスのマクロファージでは、レポーター解析でMafBの転写活性は高度に抑制され、肺マクロファージ数がコントロールに比して有意に減少し、マクロファージ細胞表面分化マーカー(F4/80, CD11b)の発現が変化

していることが観察された。

転写因子MafBはマクロファージの分化に関与するため、腫瘍免疫にも深く関与していること、すなわち、TAMの形成に関与していることが想定された。本遺伝子改変マウスを検討することは、MafBの未知なる抗腫瘍機能の解明に直結することが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、MafBが腫瘍免疫に及ぼす影響をMSR-DNMafBマウスを用いて解明することであった。本遺伝子改変マウスと野生型マウスを長期飼育し悪性腫瘍の無処置下またはウレタン腹腔内投与下における自然発生率を比較し、腫瘍細胞移植モデルにおける腫瘍進展の違いを検討することにより、転写因子MafBが腫瘍免疫にどのように関わっているかという点を検討した。

3. 研究の方法

- 1) MafB活性抑制が癌細胞移植における腫瘍病変の進展におよぼす影響の検討: MSR-DNMafBマウスとコントロールマウスに培養がん細胞(メラノーマ細胞株B16-F10, Lewis Lung carcinoma cellなど)を皮下投与する。一定期間飼育後に転移の程度を病理学的に比較評価する。さらに、両マウスにおける生存率を比較評価する。
- 2) MafB活性抑制が悪性腫瘍の発生におよぼす影響の検討: MSR-DNMafBマウスとコントロールマウスを無処置下で長期に飼育・観察する。そして、その予後ならびに死亡時の死因を病理学的に比較検討する。また、ウレタンを腹腔内に投与し、6か月後に発症してくる肺腫瘍のサイズについて病理学的に検討を行う。

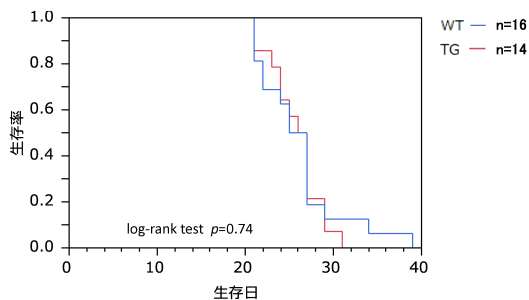
4. 研究成果

- 1) 癌細胞株のマウス尾静脈投与: 12週齢のDN-MafBマウスとコントロールマウスに対して、対数増殖期にあるB16-F10メラノーマ細胞を尾静脈から注入した。生存を解析したところ、両群ともに投与後

20日から、死亡を認めるようになり、30日から40日にかけて、急速に生存率が低下し死滅した。Kaplan-Meier 曲線は両群でほぼ同一の曲線を描き、log rank test $P=0.74$ と生存率に関して有意差を認めなかった(図1)。

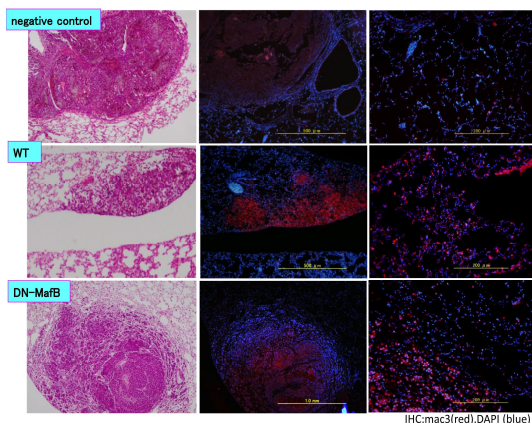
図1 Kaplan-Meier 曲線

メラノーマ腫瘍内ならびにその周辺に存在する腫瘍関連マクロファージ数を



Mac3 による蛍光免疫染色で検討したが、両群間で明らかな差を指摘することはできなかった(図2)。

図2 免疫染色 赤 Mac3、青 DAPI 原因としてメラノーマ細胞自体の腫瘍増殖速度が速すぎるために、マクロファージ



ジによる腫瘍免疫機構が関与する間もなくマウスが死滅してしまうことも考えられた。現在移植癌細胞を Lewis Lung carcinoma cell に変更し、腫瘍病変の進展に及ぼす MafB の影響について検討を進めている。

- 2) 原発性肺癌モデルでの検討：両群の無処置下での生存を比較したが差を認めず、特に腫瘍病変の発症の増加は観察されなかった。12週齢の DN-MafB マウスとコ

ントロールマウスに対して、マウス1gあたり1mgのウレタンを腹腔内投与し、6か月後にマウスを屠殺し、肺組織の病理組織標本を作製し、発生してくる肺腫瘍(結節・過形成)のサイズについて検討を行った。肺結節のサイズ(図3)ならびに肺過形成病変のサイズ(図4)に両群間で差を認めなかった。

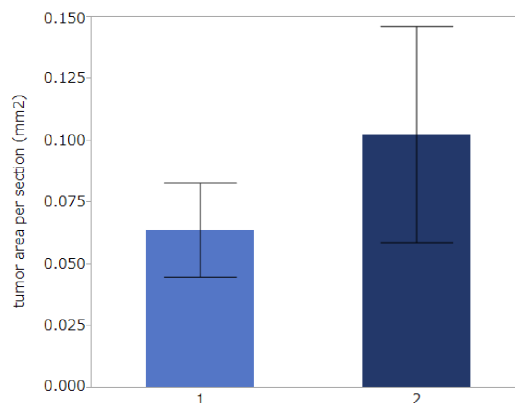


図3 肺結節病変の平均面積

1, 野生型 2, TG

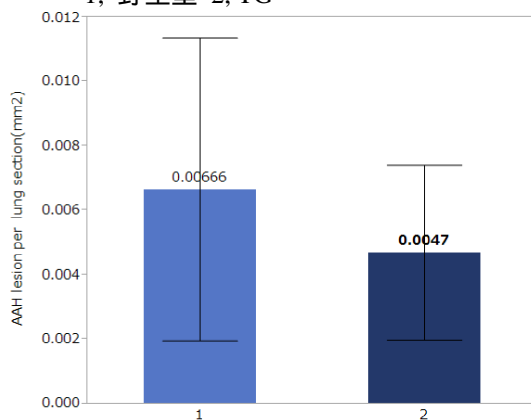


図4 肺過形成病変の平均面積

1, 野生型 2, TG

以上、本研究から転写因子 MafB は腫瘍免疫において重要な役割は演じていないことが理解された。

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12件)

1. Nunomiya K, Yamauchi K et al. Relationship between Serum Level of Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1 and Prognosis in Patients with Lung Cancer. J Cancer 2014;5: 242-247, 査

- 読有
2. Sato M, Yamauchi K et al. Retrospective analysis of the relationship between decline in FEV₁ and abdominal circumference in male smokers: The Takahata Study Int J Med Sci 2013;10:1-7, 査読有
 3. Nunomiya K, Yamauchi K et al. Hyperhomocysteinaemia predicts the decline in pulmonary function in healthy male smokers Europ Respir J 2013;42:18-27, 査読有
 4. Shibata Y, Yamauchi K et al. Relationship between Plasma Fibrinogen Levels and Pulmonary Function in the Japanese Population: The Takahata Study. Int J Med Sci 2013;10:1530-1536, 査読有
 5. Sato-Nishiwaki M, Yamauchi K et al. Reduced Number and Morphofunctional Change of Alveolar Macrophages in MafB Gene-Targeted Mice. PLoS One 2013;8: e73963, 査読有
 6. Shibata Y, Yamauchi K et al. Elevated Serum Iron Is a Potent Biomarker for Spirometric Resistance to Cigarette Smoke among Japanese Males: The Takahata Study. PLoS One 2013;8:e74020, 査読有
 7. Nakano H, Yamauchi K et al. Relationships between Values of Antibodies to Several Connective Tissue Disease Autoantigens and Pulmonary Function in a Japanese General Population: The Takahata Study. PLoS One 2013;8: e81678, 査読有
 8. Shibata Y, Yamauchi K et al. A lower level of forced expiratory volume in 1 second is a risk factor for all-cause and cardiovascular mortality in a Japanese population: the Takahata Study. PLoS One 2013;8: e83725, 査読有
 9. Kimura T, Yamauchi K et al. Oxidized phospholipid, 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-glycerophosphocholine (PON-GPC), produced in the lung due to cigarette smoking, impairs immune function in macrophages Lung 2012;190:169-182, 査読有
 10. Aida Y, Yamauchi K et al. The Relationship between Serum Uric Acid and Spirometric Values in Participants in a Health Check: The Takahata Study. Int J Med Sci. 2011;8: 470-478 査読有
 11. Shibata Y, Yamauchi K et al. Impairment of Pulmonary Function is an Independent Risk Factor for Atrial Fibrillation: The Takahata Study. Int J Med Sci. 2011;8:514-522, 査読有
 12. Nemoto T, Yamauchi K et al. Impact of cigarette smoking on maximal expiratory flow in a general population: the Takahata Study Intern Med 2011;50:2547-2555, 査読有
- 〔学会発表〕(計 24 件)
1. Aida Y, Yamauchi K et al. Dominant-Negative MafB Suppresses Elastase-Induced Pulmonary Emphysema In Mouse. ATS2014, Poster discussion, 05/20/2014, San Diego USA, (San Diego Convention Center)
 2. Sato M, Yamauchi K et al. The Difference In The Expression Of Ern1 And The Formation Of Granulomas In SPC-CCL1 Tg Mice. ATS 2014, Poster presentation, 05/18/2014, San Diego USA, (San Diego Convention Center)
 3. Sato K, Yamauchi K et al. Low Grade Oxygenation In Arterial Blood Gas Is Associated With Calcification Of Coronary Artery In Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. ATS2014, Poster discussion, 05/18/2014, San Diego USA, (San Diego Convention Center)
 4. 會田康子、山内啓子他 マウス気腫肺モデルにおいて転写因子 MafB が気腫化に及ぼす影響の検討 第 54 回日本呼吸器学会 ミニシンポジウム 平成 26 年 4 月 26 日 大阪(大阪国際会議場)
 5. 佐藤建人、山内啓子他 日本人における血清フィブリノーゲン値と呼吸機能の関連 第 54 回日本呼吸器学会 ミニシンポジウム 平成 26 年 4 月 26 日 大

- 阪（大阪国際会議場）
6. 柴田陽光、山内啓子他 Elevated serum iron is a potent biomarker for spirometric resistant to cigarette smoke among Japanese males: The Takahata Study 第54回日本呼吸器学会 学術部会賞候補演題発表会 平成26年4月25日 大阪（大阪国際会議場）
 7. 中野寛之、山内啓子他 抗核抗体価と非喫煙男性における混合性換気障害との関連について 第54回日本呼吸器学会ポスター 平成26年4月25日 大阪（大阪国際会議場）
 8. Shibata Y, Yamauchi K et al. Elevated serum iron as a marker for spirometric resistance to cigarette smoke: The Takahata study ERJ2013, Poster presentation, 09/10/2013, Barcelona Spain, (Barcelona Convention Center)
 9. Nakano H, Yamauchi K et al. The significant relationship between ANA prevalence and male never-smokers with mixed ventilation disorders. ERJ2013, Poster presentation, 09/10/2013, Barcelona Spain, (Barcelona Convention Center)
 10. Sato M, Yamauchi K et al. The Relationship Between Decline In FEV1 And Abdominal Circumference In Male Smokers, Retrospective Analysis Of The Takahata Study. ATS2013, Poster presentation, 05/22/2013, Philadelphia USA, (Pennsylvania Convention Center)
 11. Aida Y, Yamauchi K et al. Dominant-Negative MafB Alters RhoA- GTPase-Dependent Actin Polymerization And Suppresses Phagocytic Activity In Alveolar Macrophages. ATS2013, Poster presentation, 05/21/2013, Philadelphia USA, (Pennsylvania Convention Center)
 12. Nunomiya K, Yamauchi K et al. Serum Level Of Lymphatic Vessel Endothelial Hyaluronan Receptor-1 Predicts Distant Metastasis In Lung Cancer. ATS2013, Poster discussion, 05/20/2013, Philadelphia USA, (Pennsylvania Convention Center)
 13. 會田康子、山内啓子他 Dominant negative (DN) MafB トランスジェニックマウスではマクロファージの貪食能が変化する 第53回日本呼吸器学会ミニシンポジウム 平成25年4月21日 東京（東京国際フォーラム）
 14. 布宮慶子、山内啓子他 呼吸機能低下は一般住民における心房細動の独立した危険因子である 第53回日本呼吸器学会ポスター 平成25年4月21日 東京（東京国際フォーラム）
 15. 太田隆仁、山内啓子他 当院における慢性閉塞性肺疾患患者の気道可逆性に関する検討 第53回日本呼吸器学会ポスター 平成25年4月20日 東京（東京国際フォーラム）
 16. 五十嵐朗、山内啓子他 COPD患者のインダカテロール吸入前後での肺機能の変化についての検討 第53回日本呼吸器学会ポスター 平成25年4月19日 東京（東京国際フォーラム）
 17. 佐藤正道、山内啓子他 男性喫煙者におけるFEV1の低下と腹囲の関連の後ろ向き分析：高畠研究 第53回日本呼吸器学会ポスター 平成25年4月19日 東京（東京国際フォーラム）
 18. Nunomiya K, Yamauchi K et al. Elevated Level Of Plasma Homocysteine Predicts The Decline Of FEV1 In Healthy Male Smokers: The Takahata Cohort Study. ATS2012, Mini Symposium, 05/22/2012 San Francisco USA, (Moscone Convention Center)
 19. Aida Y, Yamauchi K et al. MafB Suppresses Acute Inflammatory Responses In Lipopolysaccharide -Stimulated Lung Injury In Mice. ATS2012, Poster presentation, 05/20/2012, San Francisco USA, (Moscone Convention Center)
 20. Kishi H, Yamauchi K et al. Lung-Specific CCL1 Overexpression Decreases Alveolar Macrophages In Murine BAL. ATS2012, Poster presentation, 05/20/2012, San Francisco USA, (Moscone Convention Center)

21. 布宮慶子、山内啓子他 喫煙一般住民において血清ホモシステイン(Hcy)高値は一秒量値の急速低下を予測する 第 52 回日本呼吸器学会 ミニシンポジウム 平成 24 年 4 月 22 日 神戸(神戸コンベンションセンター)
22. 會田康子、山内啓子他 Dominant negative (DN) MafB トランスジェニックマウスを用いた急性肺障害モデルの検討 第 52 回日本呼吸器学会 ミニシンポジウム 平成 24 年 4 月 22 日 神戸(神戸コンベンションセンター)
23. 布宮慶子、山内啓子他 肺癌患者における血清 LYVE-1 濃度の検討 第 52 回日本呼吸器学会 ポスター 平成 24 年 4 月 21 日 神戸(神戸コンベンションセンター)
24. 岸宏幸、山内啓子他 肺特異的 CCL1 高発現マウスにおける生体内細胞分画の検討 第 52 回日本呼吸器学会 ポスター 平成 24 年 4 月 20 日 神戸(神戸コンベンションセンター)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

山内 啓子 (YAMAUCHI, Keiko)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：305336967