

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860205

研究課題名(和文) マクロファージにおけるMafBによる補体C1q転写制御機構の解明

研究課題名(英文) MafB regulate C1q genes in macrophage

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトでは毎秒100万個の細胞がアポトーシス(細胞死)を起こす。白血球の一つであるマクロファージはアポトーシス細胞をすみやかに認識し、アポトーシス細胞を除去する。本研究では転写因子MafBを欠損させるとマクロファージがアポトーシス細胞を認識できなくなることがわかった。その原因として、アポトーシス細胞認識に働く補体C1q遺伝子の減少が考えられた。遺伝子プロモーター解析からMafBはC1qを直接制御することでマクロファージが死細胞を貪食がすることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor MafB is specifically expressed in macrophages in hematopoietic cells. During the adult stage, both Mafb-deficient fetal liver cells that were transplanted into recipient mice and macrophage-specific Mafb conditional knock-out mice exhibited autoimmune phenotypes. Macrophage efferocytosis (apoptotic cells uptake) is important for inhibiting autoimmune disease. The efferocytosis ability of Mafb-deficient macrophages was strongly reduced. The expression of complement component-1q (C1q), which is known as the first protein in the classical complement pathway and for mediating efferocytosis, was reduced in Mafb-null macrophages. The promoter analysis of C1q genes showed that MafB directly regulates C1qa, C1qb, and C1qc promoter. Consistent with this result, the classical pathway was also decreased in Mafb-deficient mice analyzed by hemolysis assay. These results suggest that MafB primarily regulates C1q genes.

研究分野：分子生物学

キーワード：マクロファージ MafB C1q

1. 研究開始当初の背景

放置された死細胞は有害な細胞内容物を流出させ、炎症反応を誘導することから、死細胞除去は生体の恒常性維持に重要である。死細胞は通称「eat me」と呼ばれるシグナルを提示し、マクロファージや樹状細胞がこれを認識し、貪食すると考えられている。これまでに、細胞膜のリン脂質であるフォスファチジルセリン (Phosphatidylserine : PS) が「eat me」シグナルの有力な候補としてあげられている。PS を認識する因子としては可溶性分子である MFG-E8、C1q などが挙げられる。これらの遺伝子欠損マウスは体内にアポトーシスを起こした細胞が蓄積して自己抗原となり、ループス様自己免疫疾患を発症することがわかっている (Hanayama et al., *Science*. 2004, Botto et al., *Nat Genet*. 1998)。この他にも CD36 などのスカベンジャー受容体、Tim-4 などの表面分子も死細胞を認識することが示されている。これまで、これらの多数の死細胞認識因子の転写制御についてほとんど解明されていなかったが、近年核内受容体である LXR (Liver X Receptor)、PPAR (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) δ 、PPAR γ 、RXR (Retinoid X Receptor) α の欠損マクロファージにおいて様々な死細胞認識分子の発現が低下することが明らかとなった (A-Gonzalez Net al, *Immunity*, 2009、Mukundan et al., *Nat Med*. 2009、Rozser et al., *Jl*. 2010)。これらの核内受容体は脂肪細胞や肝細胞などで脂質代謝に重要であることが知られているが、どのようなメカニズムを介して食細胞特異的な機能を維持しているのかは不明である。

2. 研究の目的

核内受容体による MafB の発現制御、MafB による死細胞認識因子の発現制御メカニズムを明らかにし、死細胞認識因子が機能するためのシグナル伝達の全容を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *Mafb* 欠損マクロファージはアポトーシス細胞を貪食する能力が低下している。この表現型が死細胞認識因子の発現低下によるものが解明する。また *Mafb* 欠損マウスにおいて自己抗体の産生増加や自己免疫性腎炎が発症するか検討する。

(2) PPAR δ 、PPAR γ 、RXR α 、*Mafb* の各欠損マウスでは C1q 遺伝子群の発現が低下している。さらにマウスやヒトで C1q の単独の遺伝

子変異が自己免疫疾患の原因になることが知られている。このことから、核内受容体、MafB による C1q 遺伝子群の転写制御の解析が自己免疫疾患発症メカニズムの解明に繋がると考えられる。そこで、C1q 遺伝子を誘導する核内受容体シグナルが MafB 依存的かどうか検討した。

4. 研究成果

(1) *Mafb* 欠損マクロファージでは C1q が顕著に減少していた。血清中の C1q もマクロファージ由来であることから *Mafb* 欠損マウスの血液中の C1q は減少していると考えられる。C1q は補体の古典経路の最初に反応するタンパク質である。そこで *Mafb* 欠損マウスの古典経路に異常が見られるかどうかウサギ赤血球を用いた Hemolytic assay により検討した。その結果、野生型に比べて *Mafb* 欠損マウスでは古典経路の活性が有意に減少することが明らかとなった (図 1)。

また、生後 1 年経ったマウスの血清中に自己抗原ができていないかどうか確かめるため、抗 DNA 抗体及び抗核抗体を ELISA 法により測定した。その結果、*Mafb* 欠損マウスでは有意に自己抗体が増加していることが明らかとなった。

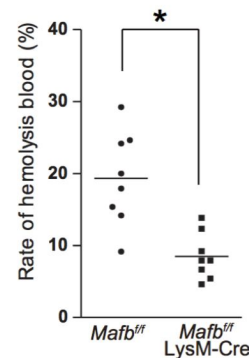


図 1 マクロファージ特異的に MafB を欠損したマウスの補体古典経路は異常をきたす。

(2) PPAR δ 、LXR、RXR、GR のアゴニストである GW0742、T1317、AtRA、Dexamethasone をマクロファージに加え、C1q 遺伝子群の発現を検討したところ、*Mafb* 欠損マクロファージでは全てのシグナル存在下で C1q の発現が減少した (図 2)。

以上の結果から MafB は C1q 遺伝子群の発現に最も重要な遺伝子の一つであると考えられる。また核内受容体からのマクロファージ特異的なシグナルは MafB を介することが明らかとなった。このことはマクロファージを標的とした疾患の治療に役立つものと考えられる。

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)

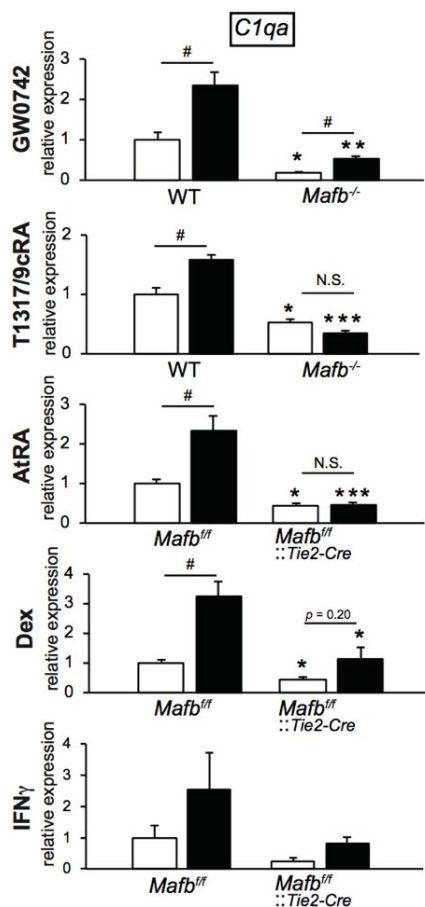


図2 Mafb欠損マクロファージに核内受容体のアゴニストを加えたところ、C1qaの発現が減少した。

[雑誌論文](計 7件)

1. Tran, M. T. N., Hamada, M., Nakamura, M., Jeon, H., Kamei, R., Tsunakawa, Y., et al. (2016). MafB deficiency accelerates the development of obesity in mice. *FEBS Open Bio*, In press, 査読あり
2. Daassi, D., Hamada, M., Jeon, H., Imamura, Y., Nhu Tran, M. T., & Takahashi, S. (2016). Differential expression patterns of MafB and c-Maf in macrophages in vivo and in vitro. *BBRC*. 473(1), 118-12, 査読あり
3. Koshida R, Oishi H, Hamada M, Takahashi S (2016). MafB antagonizes phenotypic alteration induced by GM-CSF in microglia. *BBRC*., 463(1-2), 109-15, 査読あり

4. Dieterich LC, Klein S, Mathelier A, Sliwa-Primorac A, Ma Q, Hong YK, Shin JW, Hamada M, Lizio M, Itoh M, Kawaji H, Lassmann T, Daub CO, Arner E, Carninci P, Hayashizaki Y, Forrest AR, Wasserman WW, Detmar M (2015). DeepCAGE Transcriptomics Reveal an Important Role of the Transcription Factor MAFB in the Lymphatic Endothelium. *Cell Rep*.17(13), 1493-504, 査読あり

5. Suzuki K, Numata T, Suzuki H, Raga DD, Ipulan LA, Yokoyama C, Matsushita S, Hamada M, Nakagata N, Nishinakamura R, Kume S, Takahashi S, Yamada G. (2014). Sexually dimorphic expression of MafB regulates masculinization of the embryonic urethral formation. *PNAS*, 111(46), 16407-16412, 査読あり

6. Morito N, Yoh K, Ojima M, Okamura M, Nakamura M, Hamada M, Shimohata H, Moriguchi T, Yamagata K, Takahashi S(2014). Overexpression of MafB in podocytes protects against diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 25(11):2546-57, 査読あり

7. Hamada M, Nakamura M, Tran MT, Moriguchi T, Hong C, Ohsumi T, Dinh TT, Kusakabe M, Hattori M, Katsumata T, Arai S, Nakashima K, Kudo T, Kuroda E, Wu CH, Kao PH, Sakai M, Shimano H, Miyazaki T, Tontonoz P, Takahashi S(2014). MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nature Commun*. 5, 3147, 査読あり

8. 濱田理人, 高橋智, MafB は泡沫細胞のアポトーシスを抑制し動脈硬化を促進する (2015) *医学のあゆみ*, 253, 249-250 査読無

9. 濱田理人, 高橋智, MafB は悪玉コレステロールによる刺激を伝え、泡沫細胞の蓄積を促進し動脈硬化の原因となる (2014) *バイオインダストリー*, 31, 19-25, 査読無

10. 高橋智, 濱田理人, 中村恵弥, 動脈硬化病変形成における MafB の機能、*THERAPEUTIC RESEARCH*, 35,794-795, 査読無

[学会発表](計 5件)

1. MafB はマクロファージにおける恒常性維持機能に重要である 濱田理人, Mai Thi Nhu Tran, 浅野圭吾, 中村恵弥, 全静孝, 工藤崇, 高橋智, BMB2015(第38回日本分子生物学会年会, 第88回日本生化学会大会 合同大会) 2W9-p-8 口頭発表 2015.12.2 神戸ポートアイランド

2. MafB は泡沫細胞のアポトーシスを抑制し、動脈硬化を促進する **濱田理人** 招待講演 奈良先端未来開拓コロキウム 2014.12.18 奈良先端科学技術大学院大学
3. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis **Michito Hamada**, Megumi Nakamura, Mai Thi Nhu Tran, Takashi Kudo and Satoru Takahashi 実験動物学会(ポスター発表) 2014.5.16, 札幌コンベンションセンター
4. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. **Michito Hamada**, Megumi Nakamura, Mai Thi Nhu Tran, Takashi Kudo and Satoru Takahashi 国際マクロファージ学会(ポスター発表) 2014.6.2 神戸商工会議所
5. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis **Michito Hamada**, Megumi Nakamura, Mai Thi Nhu Tran, Takashi Kudo and Satoru Takahashi 第2回東京理科大学筑波大学合同リトリート 口頭発表、ポスター、ポスター賞, 2014.3.28 筑波大学

〔図書〕(計 4 件)

Michito Hamada, Satoru Takahashi. Functions of the Large Maf Transcription Factors and Macrophages. *Macrophages: Biology and Role in the Pathology of Diseases*. 615 (509-517), Springer 2014

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/basic-med/anatomy/embryology/index.html>

6. 研究組織

(1) 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