

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461498

研究課題名(和文)結核菌感染に対するマクロファージの初期感染防御機構における転写因子MafBの役割

研究課題名(英文)A role of MafB transcription factor in the host defense against Mycobacterium tuberculosis infection

研究代表者

阿部 修一 (ABE, Shuichi)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：40400543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺マクロファージは結核に対する局所での感染免疫において重要な役割を担っており、Fcレセプターなどの細胞表面受容体を介して結核菌を細胞内に取り込む。マクロファージ細胞株RAW264.7において転写因子MafB遺伝子発現をshRNAにより抑制したところ、コントロール細胞株に比べて貪食能が低下した。また、MafBの抑制によりFcレセプターを構成するFcgr3の発現はコントロールと比べて有意に低下した。そこで、MafB抑制細胞にFcgr3を強制発現させると貪食能が回復した。すなわち、MafBは細胞表面のFcgr3発現を誘導することで、マクロファージの貪食能を制御していることが証明された。

研究成果の概要(英文)：Alveolar macrophage plays important roles in host defense against Mycobacterium tuberculosis (TB) infection in the lungs, including Fc receptor-mediated phagocytosis of TB. MafB is a transcription factor that regulates a variety of functions of macrophages. In order to assess the role of MafB in the mechanisms of phagocytosis in macrophages, we established the MafB gene-silenced macrophage cell line by gene transduction of MafB-shRNA to the macrophage cell line RAW264.7 (RAW264.7-MafB-shRNA). Fc receptor-mediated phagocytosis was suppressed by MafB gene silencing in RAW264.7 cells. Fcgr3 expression was significantly decreased in RAW264.7-MafB-shRNA compared to control cells. Forced expression of the Fcgr3 gene recovered Fc receptor-mediated phagocytosis in RAW264.7-MafB-shRNA. Our data suggested that MafB transcription factor should promote cell surface Fcgr3 expression and regulate Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages.

研究分野：感染症内科学

キーワード：MafB マクロファージ 貪食能 Fcgr3

## 1. 研究開始当初の背景

結核は全世界の人口の約 1/3 が感染する、世界最大の感染症である。全世界で毎年 800 万人以上の新規結核患者が発生しており、そのうち 100~200 万人が結核により命を落としている。さらに、多剤耐性結核や HIV 感染との合併などの問題もあり、依然として結核は世界的に重要な感染症の一つである。

結核菌は通常、飛沫核感染により伝播される。気道から吸入された結核菌は、肺胞まで到達して感染が成立する。ところが、結核菌の分裂、増殖は緩徐であるため、感染してもそのまま発病しない状態が数年間続くことが多い(潜在性結核感染)。その後、宿主の免疫能の低下などを契機として結核を発病する。一般に結核菌に感染した場合、生涯を通じて結核を発病する割合は、約 10%といわれる。例えば、関節リウマチなどに対して投与される TNF- 阻害薬を始めとする生物製剤は、結核の発病リスクを増加させることが知られている。その一方で、結核感染者の約 1/3 は無治療のままでもやがて菌が陰性化することもある。このように、結核に感染するかどうか、発病するかどうかを決定する要因は、宿主の免疫状態によって大きく左右される。

結核の感染防御において最も重要な役割を担う細胞は、マクロファージである。結核菌は宿主の体内に侵入してから、マクロファージ表面の Fc レセプター、補体レセプター、マンノースレセプター、スカベンジャーレセプターなどの細胞表面レセプターを介して、マクロファージの細胞内に取り込まれる。このとき結核菌が細胞内に侵入しても、マクロファージの細胞内殺菌機構や Th1 サイトカインの産生は誘導されないため、結核菌は殺菌を免れてマクロファージ細胞内感染が成立する。一般にファゴソームはリソソームと融合してファゴリソソームに成熟して殺菌的に作用するが、感染した結核菌はファゴソーム膜上の Phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) を脱リン酸化させて、ファゴリソソームの形成を阻害する。このようにして、マクロファージ細胞内に感染した結核菌はファゴソームの内部で生存、増殖していく。

これに対して、生体側の初期感染防御機構の一つとして、TNF- などを介して結核菌に感染したマクロファージのアポトーシスが誘導されることにより、感染した結核菌も死滅させることがわかっている。また、結核菌が感染したマクロファージにオートファジーが誘導されると、同様に細胞内の結核菌が死滅することも明らかになっている。さらに、結核菌感染の病巣部にマクロファージを中心とする肉芽種が形成されることで、感染

拡大が抑制される。ところが、病原性が高い結核菌は IL-4 などを通して感染したマクロファージのアポトーシスを抑制し、代わりにネクローシスを誘導して、菌自身はさらに生存することが報告されている。また、結核菌は感染した

## 2. 研究の目的

転写因子 MafB により制御されるマクロファージの貪食能が、どのような分子生物学的な機序の基づくものであるのかを、特に細胞表面における貪食関連の受容体に着目して検討する。

これらにより、感染症に対するマクロファージの初期感染防御機構における MafB の役割を明らかにしていく。

## 3. 研究の方法

マクロファージ細胞株における MafB silencing のオプソニン化ビーズ貪食に対する影響

以前当科で樹立された RAW264.7-MafB-shRNA 細胞を用いて、オプソニン化蛍光ビーズに対する貪食を蛍光顕微鏡ならびにフローサイトメトリーで検討した。

マクロファージ細胞株における MafB silencing の Fcgr 発現に対する影響

RAW264.7-MafB-shRNA 細胞における貪食促進作用を有する Fcgr3 と抑制作用を有する Fcgr2b の発現を RT-PCR とフローサイトメトリーにて検討した。

RAW264.7-MafB-shRNA 細胞における Fcgr3 強制発現のオプソニン化蛍光ビーズに対する貪食への影響

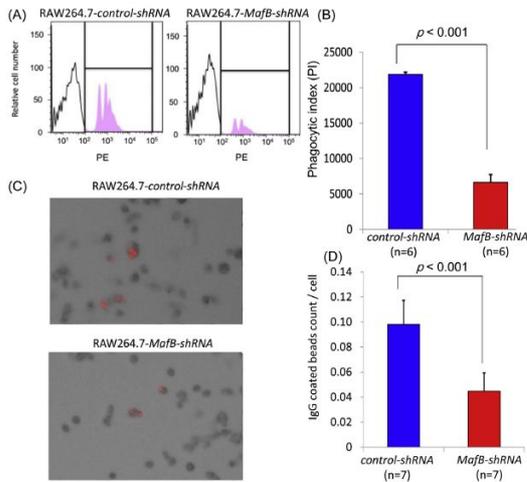
RAW264.7-MafB-shRNA 細胞に Fcgr3 発現するプラスミドベクターをトランスフェクションし、その貪食に及ぼす影響をフローサイトメトリーで検討した。

## 4. 研究成果

マクロファージ細胞株における MafB silencing のオプソニン化ビーズ貪食に対する影響

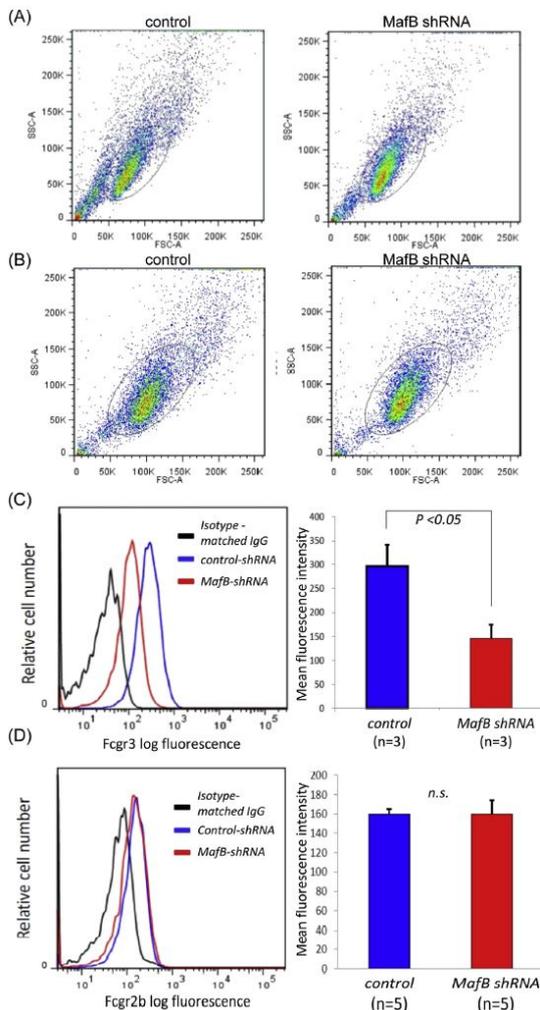
フローサイトメトリーでオプソニン化蛍光ビーズに対する貪食を評価したところ、RAW 264.7-MafB-shRNA 細胞では RAW264.7-control-shRNA 細胞に比して、貪食が低下していることが示された(図 1 A、B)。蛍光顕微鏡での評価においても、RAW264.7-MafB-shRNA 細胞では RAW264.7-control-shRNA 細胞に比してビーズの貪食が低下していた(図 1、C、D)。

図 1



マクロファージ細胞株における MafB silencing の Fcgr 発現に対する影響

図 2



フローサイトメトリーでマクロファージ細胞表面 Fcgr3 と Fcgr2b 蛋白質量を定量したところ、Fcgr3 発現が RAW264.7-MafB-shRNA

細胞ではコントロールに比して低下しているのに対して (図 2 C)、Fcgr2b 発現はコントロールと有意な差は観察されなかった (図 2 D)。

細胞より、total RNA を抽出し、RT-PCR によりこれらの発現を評価したところ、やはり Fcgr3 発現は RAW264.7-MafB-shRNA 細胞ではコントロールに比して低下し (図 3 A)、Fcgr2b 発現はコントロールと有意な差は観察されなかった (図 3 B)。

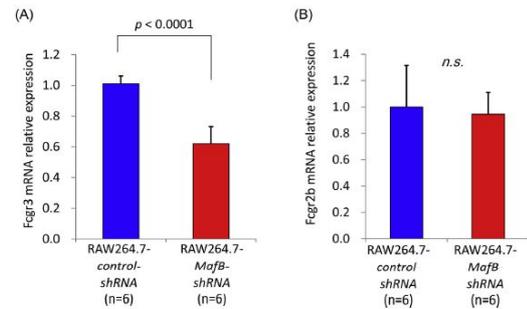


図 3

RAW264.7-MafB-shRNA 細胞における Fcgr3 強制発現のオプソニン化蛍光ビーズに対する貪食への影響

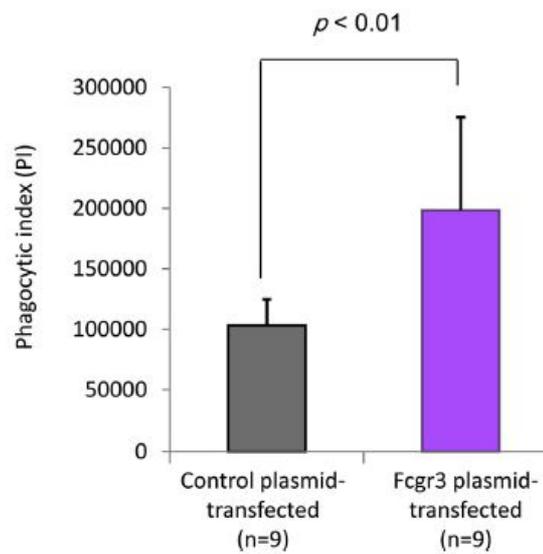


図 4

MafB silencing による Fcgr3 発現の低下が RAW264.7-MafB-shRNA 細胞におけるオプソニン化ビーズ貪食の原因であるのかどうかを検討するために、本細胞に対して Fcgr3 を強制発現するプラスミドベクターを遺伝子導入して、ビーズ貪食能が改善されるかどうかを検討した。図 4 に示したように、Fcgr3 を強制発現は RAW264.7-MafB-shRNA 細胞へのビーズ貪食を改善した。

すなわち、MafB は細胞表面の Fcgr3 発現を誘導することで、マクロファージにおける貪

食能を制御していることが証明された。

## 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 7 件)

1) Nemoto T, Shibata Y, Inoue S, Igarashi A, Tokairin Y, Yamauchi K, Kimura T, Sato M, Sato K, Nakano H, Abe S, Nishiwaki M, Kubota I., MafB enhances the phagocytic activity of RAW264.7 macrophages by promoting Fcgr3 expression, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 482, 375-381, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.11.070 査読有

2) Kishi H, Sato M, Shibata Y, Sato K, Inoue S, Abe S, Kimura T, Nishiwaki M, Yamauchi K, Nemoto T, Igarashi A, Tokairin Y, Nakajima O, Kubota I, Role of chemokine C-C motif ligand-1 in acute and chronic pulmonary inflammations, **Springerplus**, 5, 1241, 2016.

doi: 10.1186/s40064-016-2904-z. 査読有

3) Hasegawa H, Watanabe T, Kato S, Toshima T, Yokoyama M, Aida Y, Nishiwaki M, Kadowaki S, Narumi T, Honda Y, Otaki Y, Honda S, Shunsuke N, Funayama A, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Miyamoto T, Abe S, Shibata Y, Kubota I., The role of macrophage transcription factor MafB in atherosclerotic plaque stability, **Atherosclerosis**, 250, 133-143, 2016. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.05.021. 査読有

4) Inoue S, Shibata Y, Kishi H, Hasegawa H, Nitobe J, Iwayama T, Yashiro Y, Nemoto T, Sato K, Nakano H, Sato M, Nunomiya K, Aida Y, Yamauchi K, Igarashi A, Abe S, Kubota I., Low arterial blood oxygenation is associated with calcification of the coronary arteries in patients with chronic obstructive pulmonary disease, **Respiratory Investigation**, 53, 111-116, 2015. doi: 10.1016/j.resinv.2015.01.002. 査読有

5) Aida Y, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Kimura T, Igarashi A, Yamauchi K, Nunomiya K, Kishi H, Nemoto T, Sato M, Sato-Nishiwaki M, Nakano H, Sato K, Kubota I., Inhibition of elastase-pulmonary emphysema in dominant-negative MafB transgenic mice, **International Journal of Biological Sciences**, 10, 882-894, 2014. doi: 10.7150/ijbs.8737. 査読有

6) Sato K, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Aida Y, Nunomiya K, Nakano H, Sato M, Kimura T, Nemoto T, Watanabe T, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I, Association between plasma adiponectin levels and decline in forced expiratory volume in 1 s in a general Japanese population: the Takahata study,

**International Journal of Medical Sciences**, 11, 758-764, 2014. doi: 10.7150/ijms.8919 査読有

7) Nunomiya K, Shibata Y, Abe S, Inoue S, Igarashi A, Yamauchi K, Kimura T, Aida Y, Nemoto T, Sato M, Kishi H, Nakano H, Sato K, Kubota I. Relationship between serum level of lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 and prognosis in patients with lung cancer, **Journal of Cancer**, 5, 242-247, 2014. doi: 10.7150/jca.8486. 査読有

〔学会発表〕(計 8 件)

1) Sato M et al., Pulmonary functions of air-exposed and cigarette smoke-exposed dominant-negative MafB transgenic mice, American Thoracic Society International Conference 2015, Denver (America), 2015/5/15-20.

2) Sato K et al., Effect of iron deficiency on pulmonary iron concentration, American Thoracic Society International Conference 2015, Denver (America), 2015/5/15-20.

3) 佐藤正道等, SPC-CCL1 Tg マウスにおける遺伝子発現および肉芽腫の形成の違い, 第55回日本呼吸器学会学術講演会、東京国際フォーラム(東京都千代田区), 2015/4/17-19

4) Sato K et al., Association of plasma adiponectin level with pulmonary function in a general Japanese population, ERS International Congress 2014, Munich, (Germany), 2014/9/6-10.

5) Aida Y et al., Dominant-negative MafB suppresses elastase-induced pulmonary emphysema in mouse, American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (America), 2014/5/16-21.

6) Sato M et al., The difference in the expression of Ern1 and the formation of granulomas in Spc-Ccl1 Tg mice, American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (America), 2014/5/16-21.

7) Sato K et al., Low grade oxygenation in arterial blood gas is associated with calcification of coronary artery in patients with chronic obstructive pulmonary disease, American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (America), 2014/5/16-21.

8) 中野寛之等, 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性について, 第54回日本呼吸器学会学術講演会、大阪国際会議場(大阪府大阪市), 2014/4/25-27

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等: なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

阿部 修一 (ABE, Shuichi)

山形大学・医学部・非常勤講師

研究者番号: 40400543

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

柴田 陽光 (SHIBATA, Yoko)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 60333978

木村 友美 (KIMURA, Tomomi)

山形大学・医学部・医員

研究者番号: 50536935

### (4)研究協力者

根本 貴子 (NEMOTO, Takako)

佐藤 正道 (SATO, Masamichi)

佐藤 建人 (SATO, Kento)