

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：82801

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16259

研究課題名（和文）結核発病に関連する遺伝子MAFBの機能解析

研究課題名（英文）Functional characterization of MAFB gene associated with TB onset

研究代表者

引地 遥香（Hikichi, Haruka）

公益財団法人結核予防会 結核研究所・生体防御部・研究員

研究者番号：20829105

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）：MAFBは結核発病に関連する候補遺伝子として同定されている。研究代表者らは、これまでに結核菌感染ヒトマクロファージにおいてMAFBがインターフェロン応答を制御することを示している。本研究では、MAFBがヒトマクロファージにおいて直接制御する免疫応答関連遺伝子をChIPmentationによって同定した。さらに、マクロファージ特異的Mafb欠損マウスを用いて、Mafbがインターフェロン応答を制御し、結核菌感染マウスにおいて宿主防御的に機能することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

結核菌に感染したほとんどのヒトは、宿主免疫により結核菌を肉芽腫内に封じ込め、潜在性結核感染症（LTBI）の状態となる。活動性結核を発病しやすいLTBI患者を発見し治療、観察を行うため、結核発病を予測する生物学的指標が求められている。MAFBは、先行のゲノムワイド関連解析により結核発病との関連が示されたが、MAFBと結核感受性の関係およびその分子機構は不明であった。本研究により、Mafbがインターフェロン応答を制御し、結核菌感染に対して宿主防御的に機能することが分かった。さらなる解析により、結核発病を予測する生物学的指標の発見や、ワクチン開発に貢献する。

研究成果の概要（英文）：MAFB is a promising candidate gene associated with tuberculosis onset. Previously, we demonstrated that MAFB regulates interferon response in Mycobacteria tuberculosis (Mtb)-infected macrophages. Since MAFB is a transcription factor, in this study, we performed ChIPmentation and identified immune response controlled by genes that are directly associated with MAFB. Furthermore, we showed that Mafb protects host from Mtb infection by regulating interferon response in Mtb-infected mice. With detailed research, our finding will help identify potential biomarkers to predict disease onset or support vaccination development.

研究分野：免疫学

キーワード：結核 宿主免疫 インターフェロン 発病予測 ChIPmentation 遺伝子発現差解析 マクロファージ ノックアウトマウス

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

結核は世界の三大感染症の一つである。世界の十大死因のうち単一の病原体による感染症としては COVID-19 に次いで死者が多く、毎年約 140 万人が死亡している。結核の特徴の一つとして、感染した大部分のヒトでは結核菌は宿主免疫により封じ込められ、休眠状態となる。活動性結核を発病せず結核菌が潜伏感染している状態を、潜在性結核感染症(LTBI)という。活動性結核を発病しやすい LTBI 患者を発見し、早期治療を促すために、活動性結核の発病を予測する生物学的指標が求められている。タイ人と日本人集団におけるゲノムワイド関連解析によって、*MAFB* 遺伝子の近傍に結核発病に関連のある一塩基多型が発見されている(Mahasirimongkol S, J Hum Genet. 2012)。*MAFB* は、結核菌の感染の場であるマクロファージの分化に関わることから、結核発病に関連する有力な候補遺伝子である。これまでに研究代表者は、*MAFB* と結核免疫の関連を明らかにするため、結核菌感染ヒトマクロファージにおける *MAFB* の機能解析を行った。その結果、結核菌感染ヒトマクロファージにおいて、*MAFB* が I 型および II 型インターフェロン (IFN) 応答遺伝子群の発現を正に制御することを明らかにした (Hikichi *et al.*, Front. Microbiol, 2022)。しかし、*MAFB* による IFN 応答遺伝子の発現制御の詳細や、個体における *MAFB* による結核菌感染に対する宿主防御機構は解明されていない。

2. 研究の目的

ヒトマクロファージとマウスの両方の実験系において結核菌感染時における *MAFB* の機能を解析する。ヒトマクロファージ細胞における *MAFB* による IFN 応答遺伝子群の発現制御機構について明らかにする。また、マウスを用いて結核免疫における *Mafb* による感染防御機構について解析する。

3. 研究の方法

1. *MAFB* 結合配列の濃縮と網羅的解析

ヒトマクロファージを用いて抗 H3K4me3 抗体および抗 *MAFB* 抗体に対する ChIPmentation を行った。得られたシーケンスデータを用いて HOMER の Motif analysis により、配列モチーフを検出した。HOMER の Annotation of Peaks により、結合ピークを含む遺伝子を同定したのち、Gene Ontology 解析 (GO 解析) を行うことで、各抗体の結合部位近傍の遺伝子に特異的な生物学的機能を同定した。

2. マクロファージ特異的 *Mafb* 欠損マウスの結核菌感染実験

Mafb 欠損マウスは中枢性無呼吸により生後 24 時間以内に死亡する(Blanchi *et al.*, Nat Neuro, 2003)。本研究においては、高橋智教授(筑波大学)との共同研究により、マクロファージ特異的 *Mafb* 欠損 (*Mafb^{fl/fl}::LysM-Cre: Mafb-cKO*) マウスを用いて、結核菌感染実験を行った。

結核菌感染骨髄由来マクロファージの RNA シーケンス解析

野生型マウスと *Mafb-cKO* マウスの大腿骨由来マクロファージ (BMDM) に結核菌

を感染させた。RNA シークエンス解析により遺伝子発現プロファイルを野生型マウスと比較した。

生存時間分析

野生型マウスと *Mafb*-cKO マウスに結核菌を噴霧感染させ、315 日間観察した。 Kaplan-Meier 法により、生存時間分析を行った。

肺内菌数測定、肺病理組織像の観察

Mafb-cKO マウスに結核菌を噴霧感染させ、10 週後の肺内菌数を測定した。肺病理組織の HE 染色像の比較から、肉芽腫の形態を評価した。

感染肺の RNA シークエンス解析

Mafb-cKO マウスに結核菌を噴霧感染させ、10 週後の肺を用いて、RNA シークエンスを行った。遺伝子発現差解析による遺伝子発現プロファイルの比較し、Weighted Gene Coexpression Network 解析 (WGCNA) により共発現遺伝子モジュールを抽出した。

4. 研究成果

1. ヒトマクロファージにおける MAFB 結合配列の網羅的解析

抗 H3K4me3 抗体および抗 MAFB 抗体に対する結合ピークは、それぞれ 27627 個、143111 個検出した。免疫沈降効率は、各抗体においてそれぞれ 84.8%、3.23%であった。各抗体の結合ピークは 5205 個の重複したピークを含んだ。結合ピーク近傍の遺伝子群の GO 解析の結果、抗 H3K4me3 抗体は axonogenesis (GO:0007409)、regulation of cell morphogenesis (GO:0022604)、proteasomal protein catabolic process (GO:0010498)、抗 MAFB 抗体は、axonogenesis (GO:0007409)、regulation of cell morphogenesis (GO:0022604)、positive regulation of neurogenesis (GO:0050769) の生物学的機能を濃縮した。結合ピークに有意に存在した配列モチーフは、Kataoka らの報告した Maf 認識配列に一致した (Kataoka K, Mol Cell Biol. 1994)。

2. マクロファージ特異的 *Mafb* 欠損マウスの結核菌感染実験

結核菌感染骨髄由来マクロファージの RNA シークエンス解析

遺伝子発現差解析により、2607 個の発現変動遺伝子 (DEG) を同定した。DEG のうち、結核菌感染 *Mafb*-cKO BMDM において発現上昇した遺伝子は、1230 個、発現低下した遺伝子は 1377 個であった。それぞれの遺伝群の GO 解析の結果、結核菌感染 *Mafb*-cKO BMDM において ATP 合成およびエネルギー代謝が活性化し、インターフェロン応答が抑制されたことを明らかにした。この結果は、ヒトマクロファージを用いて行った RNA シークエンス解析の結果に一致した。

生存時間解析

生存時間解析の結果、*Mafb*-cKO マウスは、対照群に比べて有意に生存時間が短縮した。*Mafb*-cKO マウスは感染 20 週後から死亡し始め、観察期間内に全頭死亡し

た。

肺内菌数測定、肺病理組織像の観察

Mafb-cKO マウスの肺内菌数は対照群に比べて有意に増加した。対照群のマウス肺において、細胞が集積した肉芽腫が形成され、肉芽腫の周辺組織は正常な肺胞構造が保たれた (図 1 A,C)。一方、Mafb-cKO マウス肺においては、境界が不明瞭な肉芽腫が形成され、肉芽腫周辺の広い範囲で肺胞壁への細胞浸潤が観察された (図 1 B,D)。

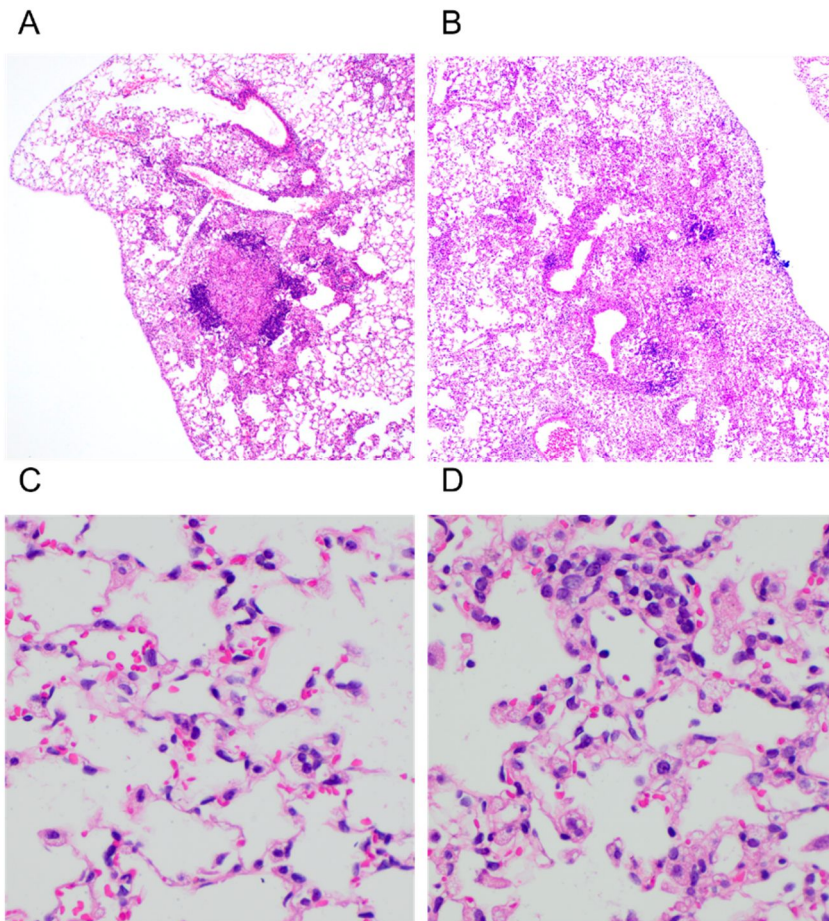


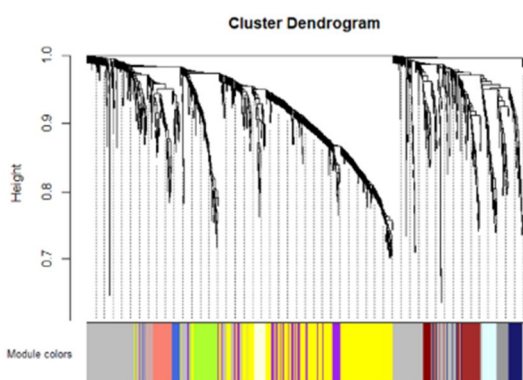
図 1 結核菌感染 10 週後の対照群マウス (A) と Mafb-cKO マウス (B) の肺病理組織 HE 染色像。対照群マウスの肉芽腫周辺の組織は、正常な肺胞構造を保つ (C)。Mafb-cKO マウスでは、肺胞壁への細胞浸潤が観察された (D)。

感染肺の RNA シークエンス解析

結核菌感染 Mafb-cKO マウスと対照群における遺伝子発現差解析により、307 個の DEG を同定した。結核菌感染 Mafb-cKO マウスに特異的に亢進および減弱する免疫遺伝子群が存在することを確認した。WGCNA により、22 個の共発現モジュールを同定した (図 2A, B)。各モジュールに含まれる遺伝子群の GO 解析から、結核菌感染 Mafb-cKO マウスにおいて特異的に共発現している免疫関連の遺伝子モジュールを検出した。

マクロファージ特異的 *Mafb* 欠損マウスは、肉芽腫形成が阻害され、結核菌感染に対して感受性を示した。マクロファージにおけるインターフェロン応答の減弱と遺伝子発現パターンの変化が、肉芽腫構造に影響を及ぼしたことが示唆される。免疫細胞の集積である肉芽腫は、構造的に結核菌を囲い込み、結核菌の増殖と拡散を防いでいる。*Mafb*-cKO マウスは、肉芽腫による結核菌の封じ込めに失敗し、菌が増殖・拡散したと考える。それゆえ、*Mafb* は結核菌感染時に宿主防御に機能することが示された。*Mafb* が関与する分子機構は、結核の発病抑制に重要な機構である。さらなる解析により、結核発病を予測する生物学的指標の発見や、発病を制御するワクチンの開発に貢献する。

A



B

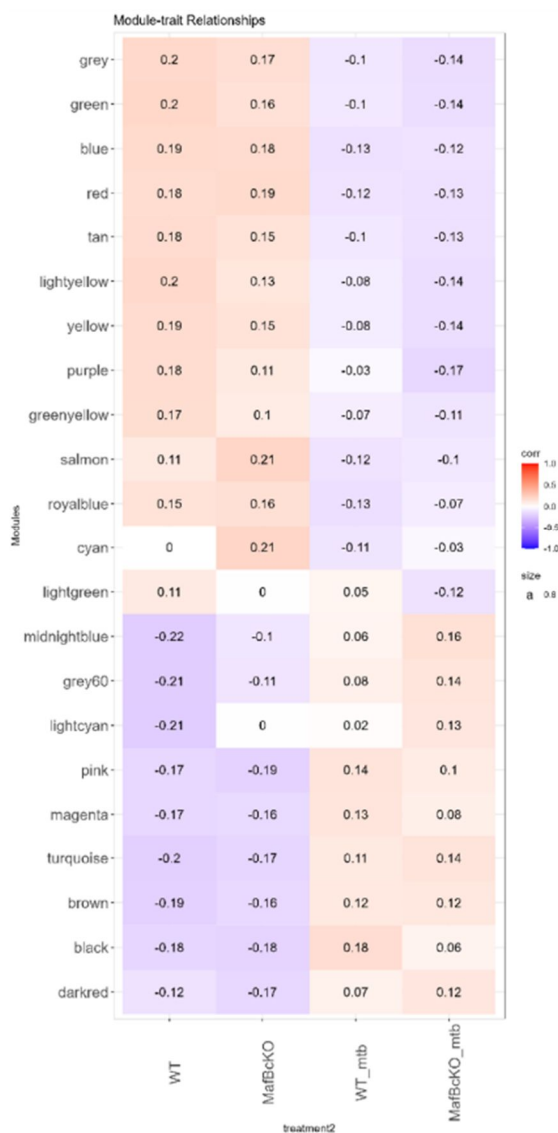


図 2 WGCNA により、22 個の共発現モジュールを同定した。クラスターデンドログラム (A)、各モジュールのサンプルと共発現の相関を示すヒートマップ (B)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hikichi Haruka, Seto Shintaro, Wakabayashi Keiko, Hijikata Minako, Keicho Naoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Transcription factor MAFB controls type I and II interferon response-mediated host immunity in Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.962306	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

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 引地遥香
2. 発表標題 結核感受性に関与する転写因子MafBによる結核肉芽腫形成の制御
3. 学会等名 第98回日本結核・非結核性抗酸菌症学会・学術講演会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 引地遥香
2. 発表標題 アジアの若年者結核の発病に関わる遺伝子MAFBの機能
3. 学会等名 第95回結核・非結核性抗酸菌症学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年～2021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
---------	---------