

## 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：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390220

研究課題名(和文)新規遺伝子改変マウスを用いた転写因子MafBの気腫化肺形成に関わる機序の探究

研究課題名(英文) Investigation of role for MafB in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease using MafB gene targeted mice

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子MafBのCOPDにおける役割を動物実験モデルにて検討した。MSR promoter dominant negative MafB遺伝子改変(TG)マウスと野生型マウスに対し、気管内に豚膵エラスターゼを1.5単位投与した。21日目には両群で肺泡間距離の増加を認めたが、TG群で有意に抑制されていた。野生型に比しTG群ではエラスターゼ投与後に、成熟マクロファージに相当する偽足を有する肺泡マクロファージ数は有意に減少し、さらにFACS解析でF4/80中等度陽性・CD11b弱~中等度陽性細胞数が有意に減少していた。気腫化の進展に関与するMMP-9、-12の発現もTG群で有意に減っていた。

研究成果の概要(英文)：Role of MafB in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) was investigated using macrophage scavenger receptor promoter dominant negative-MafB transgenic (MSR-DN-MafB TG) mice. Mean linear intercept after intratracheal administration of elastase was significantly reduced in TG mice compared to the wild type mice (WT). In TG mice, number of alveolar macrophages (AMs) with projected pseudopods was significantly reduced. In addition, number of F4/80 intermediately positive and CD11b weakly or intermediately positive AMs, considerable cell subsets of matured AMs, decreased in BAL cells of DN-MafB Tg mice. Furthermore, the expression of MMP-9 and -12 was suppressed significantly in BAL cells of DN-MafB Tg mice. Because MMPs exacerbate emphysema, MafB may be involved in pulmonary emphysema pathogenesis through altering the maturation of macrophages and the expression of MMPs.

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：COPD MafB マクロファージ 喫煙 転写因子 マトリックスメタロプロテアーゼ エラスターゼ肺気腫

## 1. 研究開始当初の背景

COPD は主に喫煙によって気道と肺胞に慢性炎症が生じることで発症する。病理学的には末梢気道壁の肥厚・狭窄、肺胞壁の破壊、肺胞マクロファージ数の増加などを特徴とする。当教室による疫学研究 Takahata Study では健診受診者の 10% が呼吸機能検査にて気流閉塞を有しており (Osaka et al. *Intern Med* 2010) わが国では約 500 万人の COPD 患者が潜在していると考えられている。統計学的な予測においても今後患者数は増加の一途を辿るとされており、本疾患の病態を理解し新しい治療法を確立することが急務であると言える。

COPD の病態においては肺胞マクロファージが重要な役割を演じている。そして、肺胞マクロファージの機能は転写因子によって制御されている。当教室では、マウスに 6 ヶ月間喫煙負荷を施し COPD を発症させ、肺胞マクロファージ機能調節転写因子群の発現を解析したところ、転写因子のなかで唯一 MafB の発現が有意に亢進していた (Machiya et al. *Am J Respir Mol Cell Biol* 2007)。さらにマクロファージ細胞株に遺伝子工学的に MafB が強制発現される細胞株を作成したところ、その細胞株でアポトーシス関連の遺伝子発現が大きく変動していることが観察された。さらにこの細胞株を喫煙濃縮液で刺激したところ、アポトーシスが有意に抑制されることが分かった (Machiya et al. *Am J Respir Mol Cell Biol* 2007)。

次に我々はヒト COPD 患者における MafB の発現を、臨床切除肺標本で検討した。非・軽喫煙者、COPD 非合併重喫煙者 ( $BI \geq 800$ )、COPD 合併重喫煙者 ( $BI \geq 800$ ) の MafB 発現を免疫染色にて比較したところ、重喫煙者では非・軽喫煙者よりもその発現が強く、さらに COPD 合併症例では非合併症例よりも有意に強く発現していた。特筆すべき点は、肺胞マクロファージでの MafB 染色強度と呼吸機能 1 秒率には負の相関関係が認められたことである (Sato et al. *Respirology* 2011)。

当教室では生体内で MafB の役割を検討するため、マクロファージのみで (特異的に) MafB の機能が抑制させる遺伝子改変マウスを作成した。それはスカベンジャーレセプタープロモーター (MSR-P) (Horvai A et al. *PNAS* 1995) 制御によりマクロファージ特異的に dominant Negative (DN: 遺伝子工学的に蛋白質の活性部位を除いた変異蛋白質) を発現させ、その機能を抑制するものである (MSR-DN-MafB マウス)。

## 2. 研究の目的

疾患肺、特に COPD における転写因子 MafB の機能を明らかにすることである。本遺伝子改変マウスと野生型マウスに気管内エラストーゼ投与または長期喫煙曝露を行うことによって、病理的な気腫化病変の程度、炎症反応の強さ、マトリックスメタロプロテアーゼ

(MMP) に代表される蛋白分解酵素の発現の程度、炎症性サイトカインの発現の程度などの差を比較評価することによって、転写因子 MafB が COPD の病因にどのように関わっているのかという点を理解しようとするものである。

## 3. 研究の方法

### (1) マクロファージ特異的 DN-MafB 発現マウスのマクロファージの機能の検討

A) 刺激に対する炎症反応: 本遺伝子改変マウスと野生型マウスに LPS を気管内投与し、気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行した。BAL 細胞数、肺組織の炎症細胞数をカウントし、炎症性サイトカインの発現を real time RT-PCR と ELISA 法にて測定した。

B) 貪食能: 気管支肺胞洗浄で本遺伝子改変マウスと野生型マウスから肺胞マクロファージを回収し培養した。そこに蛍光標識されたマイクロビーズを上清に加え貪食させ、フローサイトメトリー法でその差を解析した。さらにその分子生物学的機序を検討した (低分子量 GTPase の定量解析、細胞骨格構成因子の解析など)。

### (2) マクロファージ特異的 DN-MafB 発現マウスへのエラストーゼ気管内投与

この遺伝子改変マウスとコントロールマウスに豚豚エラストーゼ投与 (1.5 単位)

を行い、肺気腫を形成させた。これらの負荷をかけた遺伝子改変マウスとコントロールマウスを屠殺して以下の項目に関して検討した。

A) 病理学的な肺気腫の形成程度の比較: COPD 形成の程度を肺胞腔の mean liner intercept を計測し、比較することにより評価した。

B) 肺の炎症: BAL 液中の炎症性サイトカイン濃度を ELISA 法で定量した。BAL 細胞から RNA を抽出し、炎症性サイトカイン発現を real time RT-PCR で定量した。

C) BAL 細胞総数、細胞分画、マクロファージ分化の評価: 遺伝子改変マウスとコントロールマウスで負荷後の細胞総数、細胞分画、マクロファージ分化度に変化があるかどうかを FACS 解析などで検討した。

D) 蛋白分解酵素発現: BAL 細胞を MMP 抗体にて免疫染色した。

## 4. 研究成果

(1) A): LPS 気管内投与後 6 時間の BAL 総細胞数、IL-1 $\beta$ 、MIP2 の発現はコントロールに比し遺伝子改変マウスで有意に減少していた。投与 24 時間後では肺組織切片中の好中球数は減少し、72 時間後には BAL 中の肺胞マクロファージ数は有意に増加した。MafB はマクロファージの免疫応答に寄与する可能性が高いことが示された。

B): MafB 遺伝子改変マウスとコントロール

マウスより、マクロファージを回収し、IgGでオプソニン化マイクロビーズに対する貪食能をFACSにて比較定量的した。その結果、遺伝子改変マウスでは貪食能が有意に低下していることが証明された。よってMafBはマクロファージの貪食能に寄与することが理解された。さらに、低分子量GTPaseファミリーの活性を評価したところ、RhoAの活性が遺伝子改変マウスで低下していることが示された(図1)。電子顕微鏡的な形態の観察では、コントロールマウスの肺泡マクロファージが細胞表面上に棒状の偽足を多数有しているのに対し、本マウスの偽足は膜状に形態が変化した。ファロイジンにて重合アクチンを蛍光染色したところ、本マウスでは重合したアクチンが減少していることが観察された。よってMafBはマクロファージの細胞骨格の制御に関与することが理解された。

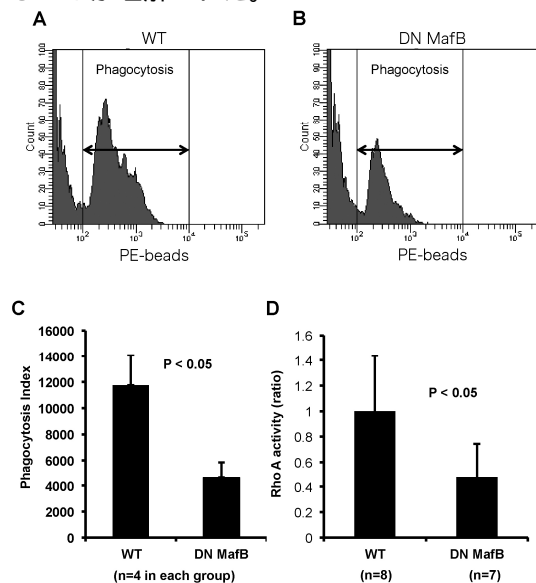


図1

(2) A): エラスターゼ誘導肺気腫形成モデルの評価; 病理学的に気腫性変化の評価を行った。コントロールマウスでは有意な気腔の開大を認めたが、この変化が遺伝子改変マウスでは有意に抑制されていた(図2)。

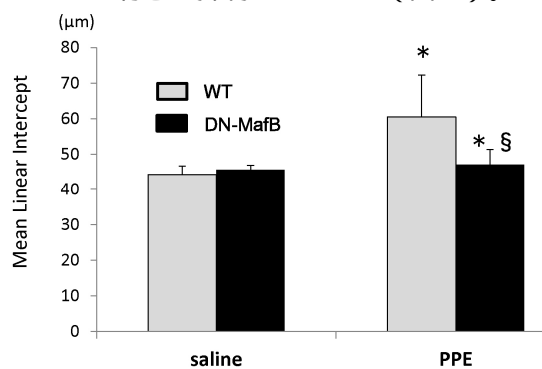


図2

B, C & D): エラスターゼ投与後 0、7、21日後にBALを行ったところ、投与7日

目に両群にて細胞数の増加は認められたが、両群間で総細胞数ならびに白血球分画に有意差を認めなかった。光学顕微鏡で偽足の認められる肺泡マクロファージ数は、エラスターゼ投与7日目に両群で有意に増加していたが、コントロールに比しDN-MafBマウスで有意に減少していた(図3)。

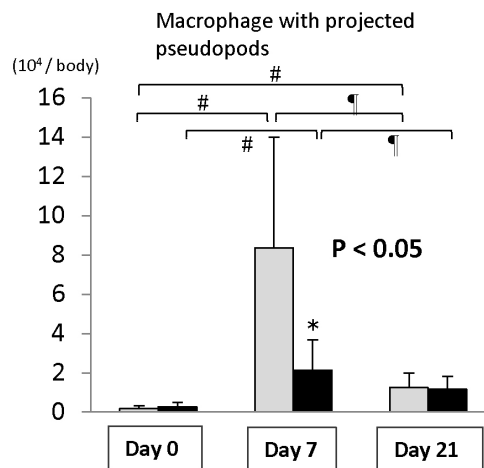


図3

フローサイトメトリーを用いて、エラスターゼ投与後7日目のBAL細胞の解析を行ったところ、成熟型肺泡マクロファージと考えられるF4/80中等度陽性・CD11b低・中等度陽性細胞数がDN-MafBマウスにて有意に減少していた(図4)。

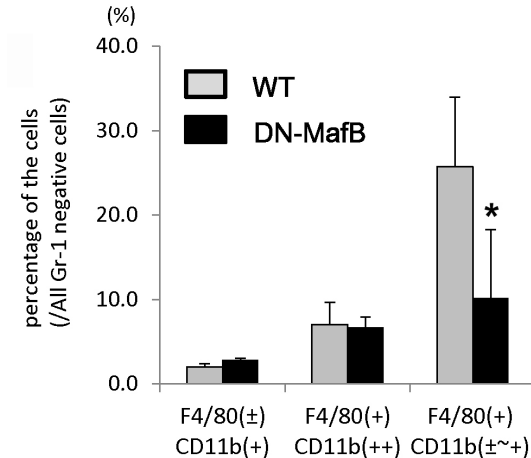


図4

エラスターゼ肺気腫マウスモデルでは、マクロファージから産生されるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)がその病理形成に関与しているとされている。エラスターゼ投与後7日目のBAL細胞に対する免疫染色では、コントロールマウスで多くの細胞がMMP-9, MMP-12が陽性であるのに対して、DN-MafBマウスでは明らかに陽性細胞は減少していた(図5, MMP-12)。一方、肺実質の炎症をBAL液のTNF-alpha, IL-6 蛋白濃度で評価したが両群で有意差を認めなかった。以上の結果より、DN-MafBマウスでは、肺泡マクロファージの成熟過程の障害のために、エラスターゼ投

与後にマクロファージから産生されるMMPが減少するため肺の気腫化形成が阻害されることが示された。

#### MMP-12

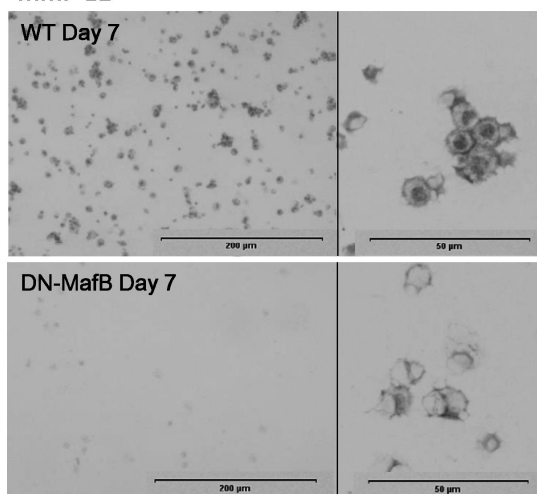


図 5

#### (2) その他

現在、遺伝子改変マウスとコントロールマウスに対して喫煙曝露（20本/日×6ヶ月間）を実施中である。本マウスモデルに対しても、エラストーゼ肺気腫モデルと同様の解析ならびにマウス呼吸機能の解析を施行する予定である。

#### 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 16 件)

1. Yamagata University Genomic Cohort Consortium (YUGCC). Pleiotropic effect of common variants at ABO glycosyltransferase locus in 9q32 on plasma levels of pancreatic lipase and angiotensin converting enzyme PLoS One 2014;9: e55903, 査読有
2. Sato M, Shibata Y et al. Retrospective analysis of the relationship between decline in FEV<sub>1</sub> and abdominal circumference in male smokers: The Takahata Study Int J Med Sci 2013;10:1-7, 査読有
3. Nunomiya K, Shibata Y et al. Hyperhomocysteinaemia predicts the decline in pulmonary function in healthy male smokers Europ Respir J 2013;42:18-27, 査読有
4. Suzuki S, Shibata Y et al. Long pentraxin PTX3 exacerbates pressure overload-induced left ventricular dysfunction. PLOS ONE 2013;8:e53133, 査読有
5. Inoue S, Shibata Y et al. Influence of corticosteroid therapy on the serum antibody response to influenza vaccine in elderly patients chronic pulmonary diseases EXCLI J 2013;12: 760-765, 査読有
6. Shibata Y 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

7. Sato-Nishiwaki M, Shibata Y et al. Reduced Number and Morphofunctional Change of Alveolar Macrophages in MafB Gene-Targeted Mice. PLoS One 2013;8:e73963, 査読有
8. Shibata Y 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
9. Nakano H, Shibata Y 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
10. Shibata Y 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
11. Yamagata University Genomic Cohort Consortium (YUGCC). Constructing a contemporary gene-environmental cohort: study design of the Yamagata Molecular Epidemiological Cohort Study J Hum Genet. 2013;58:54-6, 査読有
12. Kimura T, Shibata Y 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
13. Aida Y, Shibata Y 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
14. Shibata Y 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
15. Nemoto T, Shibata Y 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
16. Inoue S, Shibata Y et al. Two cases of bronchiolitis obliterans organizing pneumonia syndrome after postoperative irradiation for breast cancer EXCLI J 2011;10:246-251, 査読有

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Aida Y, Shibata Y 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, Shibata Y 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, Shibata Y 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、柴田陽光他 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、柴田陽光他 日本人における血清フィブリン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、柴田陽光他 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 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, Shibata Y 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, Shibata Y 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, Shibata Y 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, Shibata Y 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、柴田陽光他 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 (東京国際ファールム)
  14. 布宮慶子、柴田陽光他 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 (東京国際ファールム)
  15. 太田隆仁、柴田陽光他 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 (東京国際ファールム)
  16. 柴田陽光 モストグラフは COPD に有用か 第 53 回日本呼吸器学会 イブニングシンポジウム 4 平成 25 年 4 月 19 日 東京 (東京国際ファールム)
  17. 五十嵐朗、柴田陽光他 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 (東京国際ファールム)
  18. 佐藤正道、柴田陽光他 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: 高島研究 第 53 回日本呼吸器学会 ポスター 平成 25 年 4 月 19 日 東京 (東京国際ファールム)
  19. Nunomiya K, Shibata Y 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)
  20. Aida Y, Shibata Y 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)
  21. Kishi H, Shibata Y et al. Lung-Specific CCL1 Overexpression Decreases Alveolar Macrophages In Murine BAL. ATS2012, Poster presentation, 05/20/2012, San Francisco USA, (Moscone Convention Center)

22. 布宮慶子、柴田陽光他 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)
23. 會田康子、柴田陽光他 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)
24. 布宮慶子、柴田陽光他 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)
25. 岸宏幸、柴田陽光他 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

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

黒谷 玲子 (KUROTANI, Reiko)  
山形大学・大学院理工学研究科・助教  
研究者番号：00453043

### (3)連携研究者

阿部修一 (ABE, Shuichi)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：40400543

井上純人 (INOUE, Sumito)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号：70466621