

78. マクロファージにおける MafB の機能解析

高橋 智

Key words : マクロファージ, 転写因子 MafB,
動脈硬化, アポトーシス細胞, 自己免疫疾患

筑波大学 医学医療系
(生命科学動物資源センター)

緒 言

Large Maf 転写因子は、日本で発見されたがん遺伝子の細胞性ホモログで、b-ZIP 型転写因子群ファミリーに属し、Maf 認識配列 (MARE) に結合する転写因子である。マウスおよびヒトでは、MafA, MafB, c-Maf, Nrl の4種類存在することが明らかにされている。Large Maf 群転写因子は様々な臓器における機能発現に重要であり、疾患の発症と関連していることが強く示唆されるが、その全容は十分には明らかにされていない。そこで本研究では、既に我々が作製した遺伝子改変マウスを用いて、Large Maf 群転写因子機能の全容を明らかにし、疾患発症との関連を解明しようと試みた。特に疾患の発症に直接関係するマクロファージにおける機能解析を中心に行った。

マクロファージは自然免疫系の中心的な細胞であり、様々な免疫応答に重要であるが、生体で蓄積する老廃物や死細胞の除去にも働き、恒常性を維持している。高コレステロール状態では、マクロファージが老廃物である酸化コレステロール (oxLDL) を取り込むとともに、マクロファージ自身のアポトーシスを抑制する Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) を産生しアポトーシス抵抗性になることで、マクロファージが血管内皮下に蓄積し、これが動脈硬化の原因となることが知られている¹⁾。また、ヒトでは1日に10億個の細胞死が誘導されるが、それらはマクロファージにより速やかに除去されて免疫寛容が誘導され、組織の恒常性が維持される。この機構が破綻して死細胞が遺残すると、自己抗体が誘導されて自己免疫疾患が誘発される。死細胞の認識には、補体 C1q が重要であることが報告されている²⁾。しかしながら、動脈硬化や自己免疫疾患にかかわるこれらの AIM および C1q 遺伝子の発現制御機構は未だ解明されていない。本研究では、動脈硬化に重要な AIM および C1q の構成遺伝子である *Clqa*, *Clqb*, *Clqc* の3つの遺伝子が、Large Maf 転写因子の一つである MafB によって直接転写活性化されること、マクロファージによる老廃物除去機能が MafB により制御されていることを明らかにし、動脈硬化、自己免疫疾患の統合的な予防や治療法開発のための分子基盤を確立することを目的とした。

方法および結果

1. 動脈硬化病巣マクロファージでの MafB の役割

AIM 欠損マウスに動脈硬化誘導食を与えると、動脈に蓄積するマクロファージ (泡沫細胞) が AIM 欠損の影響によりアポトーシスを起こすため、動脈硬化が改善することが報告されている。我々の作製した *Mafb* 欠損マウスに動脈硬化を誘導したところ、Oil Red O 染色で赤染される動脈硬化病巣の面積が著しく減少し、野生型に比べて有意に動脈硬化が改善する結果が得られた (図1)。

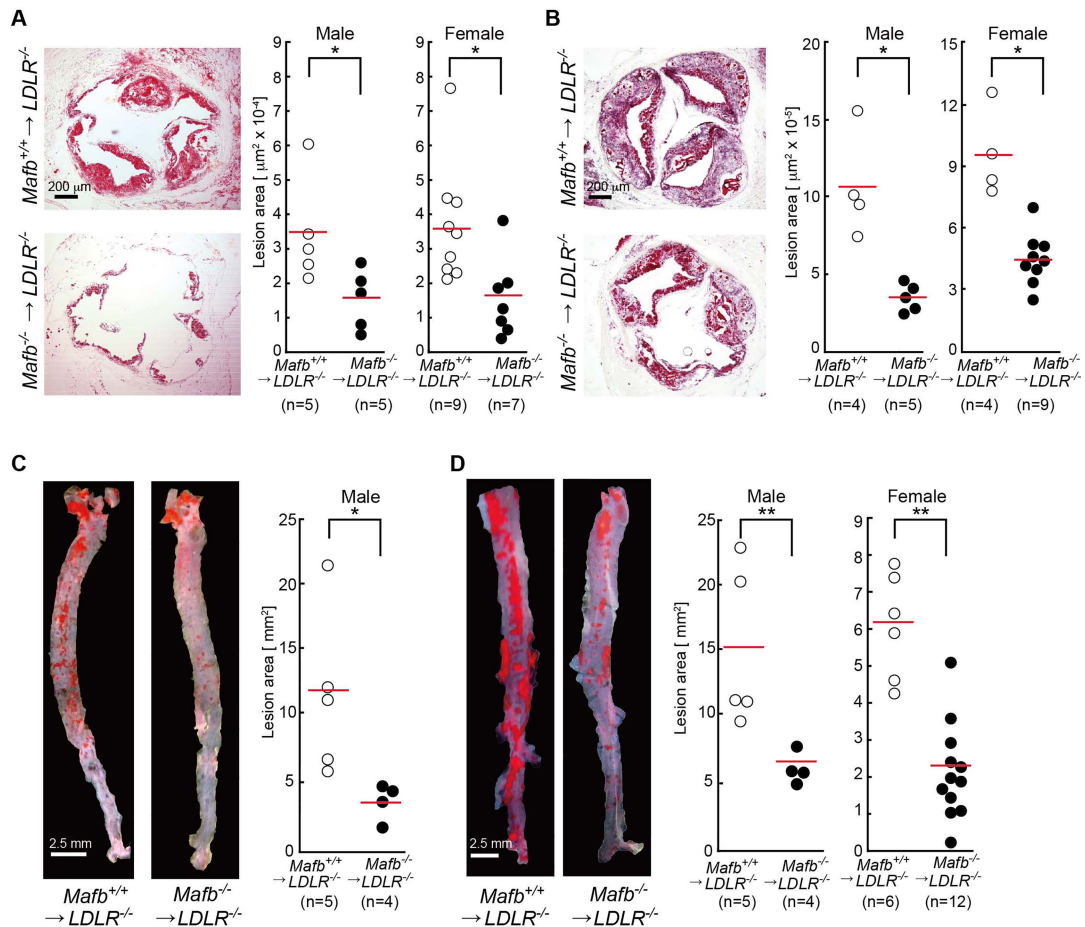


図1. *MafB* 欠損による動脈硬化病巣の改善.

野生型 ($Mafb^{+/+} \rightarrow LDL^{-/-}$) と *MafB* 欠損マウス ($Mafb^{-/-} \rightarrow LDL^{-/-}$) の骨髄細胞を動脈硬化発症モデルである *LDL* 受容体欠損マウスに移植して、動脈硬化を誘導した。A, B) 動脈硬化誘導から5週間および12週間後の大動脈弁領域を Oil Red O 染色し面積を測定した。C, D) 動脈硬化誘導から5週間および12週間後の大動脈を剖出し Oil Red O 染色を行い、染色部の面積を測定した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (student's t-test).

また、*AIM* 遺伝子プロモーター上には MARE および核内受容体型転写因子 LXR の結合配列が存在しており、*MafB* がどのように *AIM* 遺伝子を転写するのかを解析した。*AIM* 遺伝子にルシフェラーゼを導入したレポーター遺伝子を用いて、プロモーター解析を行ったところ、*AIM* プロモーター上の MARE をもつ構築では *MafB* の発現によりルシフェラーゼの活性が上昇したが、MARE に変異を導入した構築ではルシフェラーゼの活性の上昇は見られなかった。これらのことから、*MafB* は *AIM* プロモーター上の MARE を介して *AIM* の発現を制御することが示唆された (図2)。

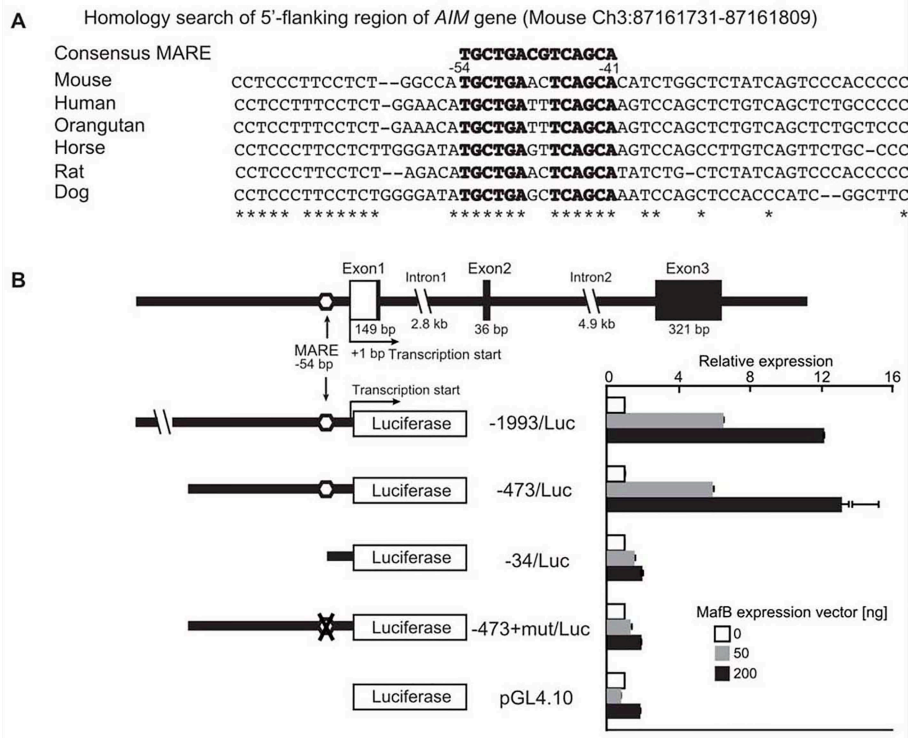


図2. MafBによる *AIM* 遺伝子の発現誘導。

A) *AIM* 遺伝子プロモーター上には哺乳類で保存された Maf 認識配列 (MARE) が存在する。B) *AIM* プロモーターにルシフェラーゼを連結させた構築を MafB 発現ベクターと H441 細胞株に共導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。MARE を持たない構築では MafB による転写活性化が観察されなかった。

一方 *AIM* は、核内受容体型転写因子である LXR/RXR のヘテロダイマーにより制御されていることが報告されている。LXR は酸化 LDL の分解産物であるオキシステロールの受容体であることがわかっている。そこで我々は、*MafB* が LXR/RXR に制御されているのではないかと考え、LXR/RXR のアゴニストをマクロファージに添加したところ、*Mafb* の発現が顕著に増加した。さらに、*LXR* 欠損マクロファージで *Mafb* の発現の減少がみられるかどうか検討したところ、*LXR* 欠損マクロファージでは、アゴニスト添加にも関わらず、*Mafb* の発現が顕著に減少することが明らかとなった。また、*Mafb* プロモーター領域にルシフェラーゼ遺伝子を連結させた DNA 構築をマクロファージ細胞株 RAW264.7 に遺伝子導入し、LXR/RXR のアゴニストを加えたところ、ルシフェラーゼの活性が増加した。このことから、*Mafb* は LXR/RXR のシグナルの下流に存在することが明らかとなった (図3)。

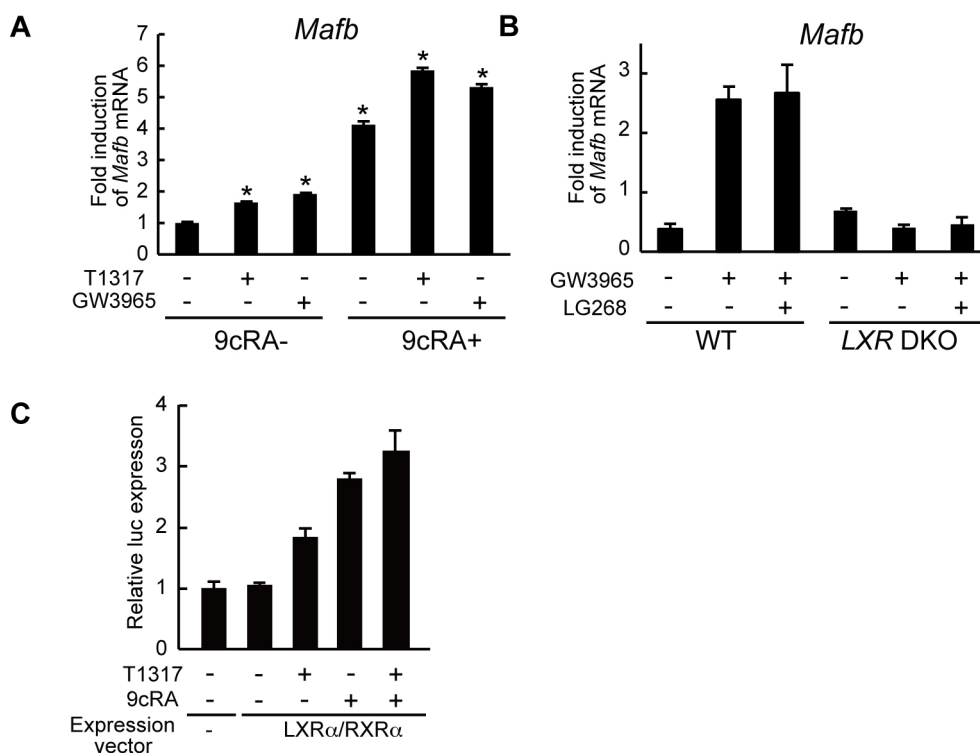


図3. 核内受容体型転写因子 LXR/RXR による *MafB* の発現誘導.

A) マクロファージ細胞株 RAW264.7 に LXR のアゴニスト (T1317, GW3965) および RXR のアゴニスト (9cRA) を加え qRT-PCR により *Mafb* の発現を解析した. * $p < 0.05$ (n=4, student's t-test). B) *LXR* 欠損マクロファージに LXR/RXR のアゴニストを加え, *Mafb* の発現を qRT-PCR により解析した. C) *Mafb* 遺伝子 5'側上流 6.5 kb にルシフェラーゼ遺伝子を連結させた構築および, LXR/RXR 発現ベクターを RAW264.7 にトランスフェクションし, LXR/RXR のアゴニストを加えてルシフェラーゼの活性を測定した.

2. *Clq* 遺伝子の転写制御を介したアポトーシス細胞除去における *MafB* の役割

Clq 欠損マウスは死細胞除去に異常が見られるため, 慢性炎症が誘導され, 自己免疫疾患を発症する²⁾. そこで, *Mafb* 欠損マウスが自己免疫疾患を発症するかをアポトーシス細胞投与実験により明らかにした. また, マクロファージに蛍光標識したアポトーシス細胞を加え, FACS 解析することにより貪食能の検討を行った.

その結果, *Mafb* 欠損マクロファージでは, アポトーシス細胞の貪食能が減少していることが明らかとなった. またこの貪食能の低下は, 正常血清の添加で回復するが, *Clq* 欠損マウスの血清では回復しないことが確認され, *Clq* 依存的な低下であることが明らかとなった (図4).

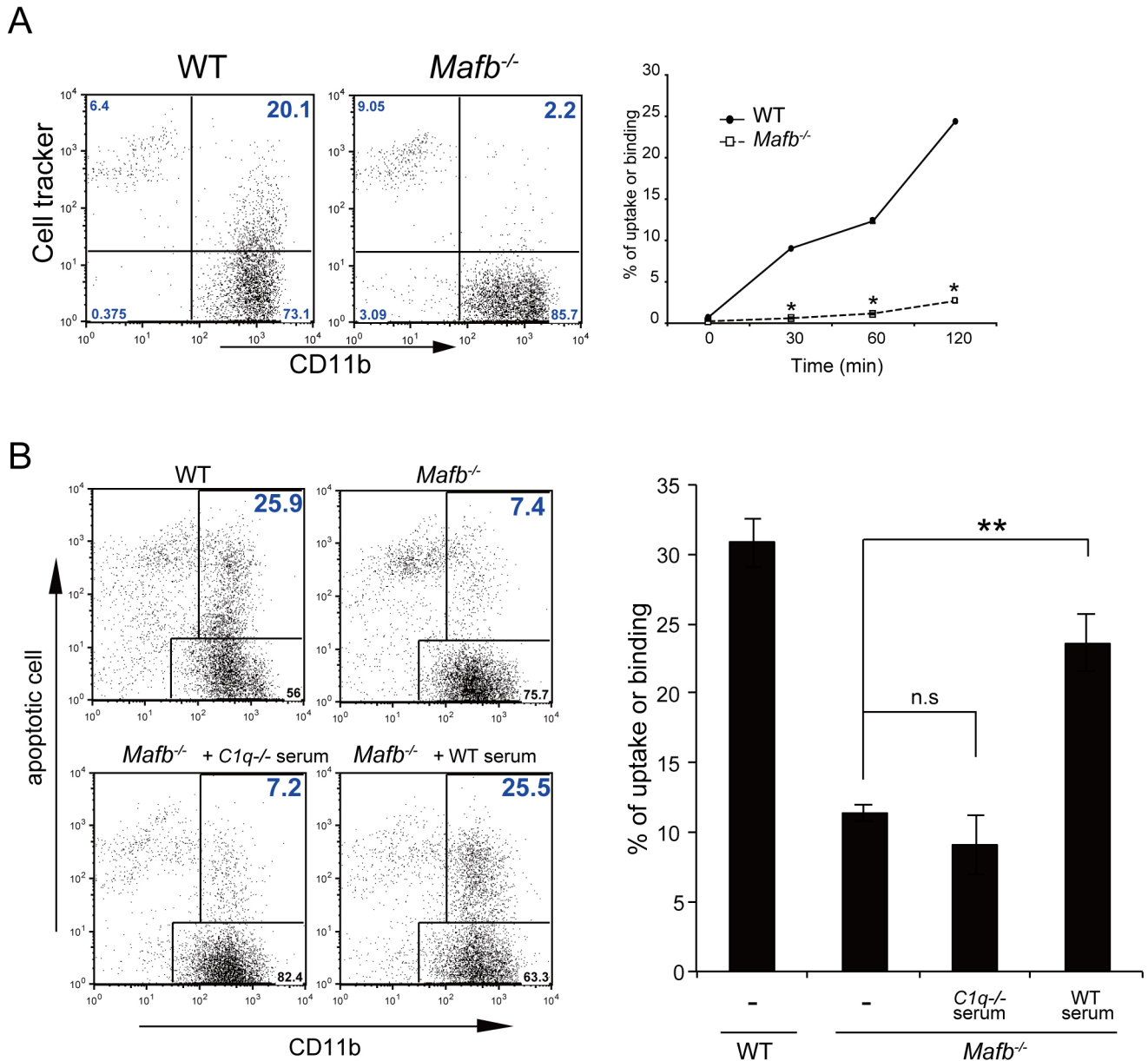


図4. *MafB*欠損によるアポトーシス細胞の貪食抑制。

A) dexamethasone によりアポトーシスを誘導したヒト T 細胞株 Jurkat を Cell tracker で蛍光標識し、マクロファージと同一試験管内で培養した後 FACS 解析を行った。マクロファージがアポトーシス細胞を取りこんだ場合、右上の分画にプロットされる。右のグラフはアポトーシスを取りこんだ割合を継時的に測定した。* $p < 0.05$ ($n=4$, student's t-test)。B) *Mafb* 欠損マクロファージに野生型マウスおよび *C1qa* 欠損マウス由来の血清を加え、同時に蛍光標識したアポトーシス細胞を加えた。** $p < 0.01$ (WT; $n=6$, *Mafb*^{-/-}; $n=10$, student's t-test)。

また、*C1qa*, *C1qb*, *C1qc* の遺伝子プロモーター上に MARE が存在するが、これらのプロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイを行い、MafB が直接 *C1q* 遺伝子群を制御するかどうかを検討した。その結果、*C1qa*, *C1qb*, *C1qc* の遺伝子プロモーターは全て MafB により活性化されること、その活性化は MARE 依存的であることが明らかとなった (図5)。

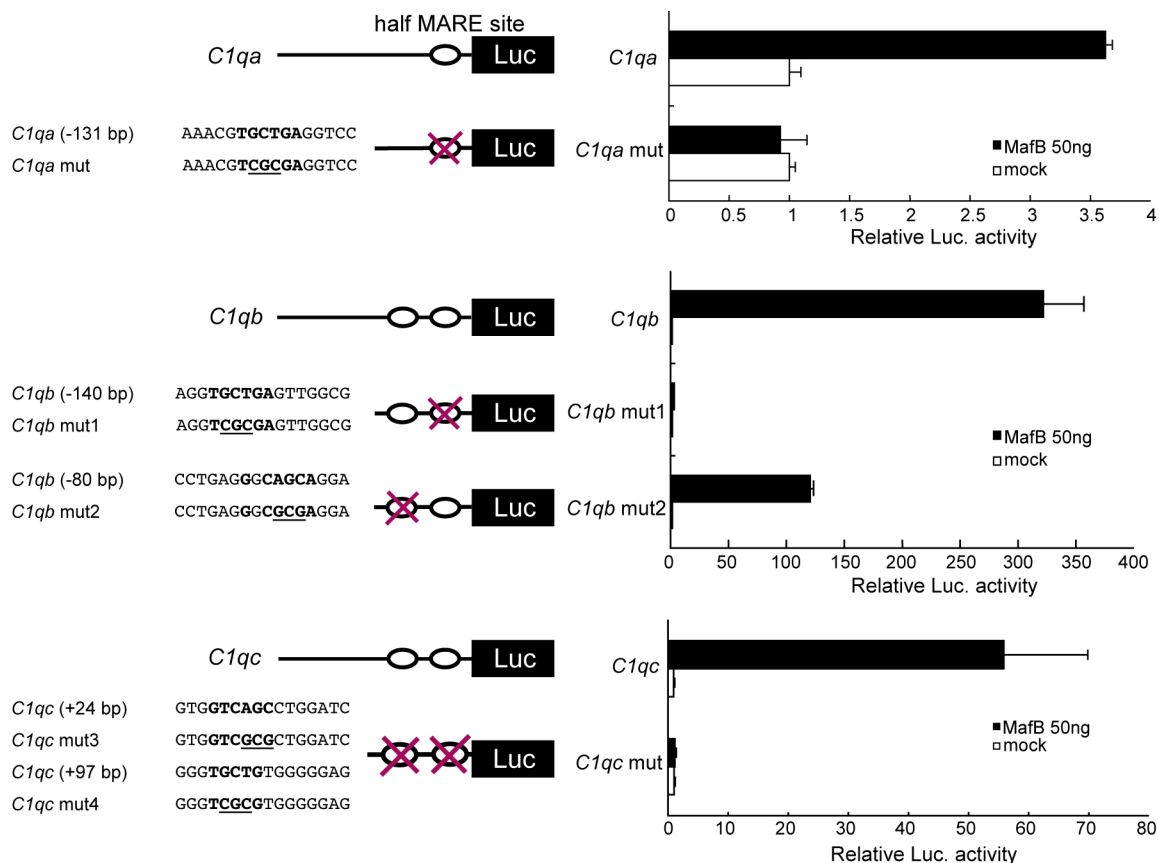


図5. MafBによる *Clq* 遺伝子群の発現誘導.

Clqa, *Clqb*, *Clqc* のプロモーターにそれぞれルシフェラーゼを連結させ、MafB 発現ベクターを RAW264.7 細胞にトランスフェクションした。MARE に変異を入れた場合、ルシフェラーゼの発現が顕著に減少した。

考 察

マクロファージは生体の恒常性維持に必須の細胞であり、機能的なレセプターやサイトカインが数多く同定されているが、それらを統括的に制御する転写メカニズムは未だに不明である。また、LXR, PPAR γ , PPAR δ などの核内受容体型転写因子はマクロファージで発現し、コレステロール代謝や死細胞認識に必要であるが、これらの転写因子は肝細胞や脂肪細胞にも発現しており、マクロファージ特異的な制御がこれらの因子によりなぜ誘導されるかは全く明らかにされていない。このことが核内受容体型転写因子をターゲットにした創薬が難しい原因となっている。本研究では、これまで不明であった恒常性維持に関わるマクロファージ特異的な遺伝子制御が Large Maf 転写因子の一つである MafB によって統括的に行われていることを世界で初めて明らかにしたものであり、マクロファージが重要な要因となる動脈硬化や自己免疫疾患の発症機構を解明できたとともに、マクロファージ機能の調節による新たな治療法が開発できる可能性がある³⁾。

共同研究者

本研究は、東京大学大学院医学系研究科の宮崎 徹教授およびカルフォルニア大学 Peter Tontonoz 教授との共同研究である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Arai, S., Shelton, J. M., Chen, M., Bradley, M. N., Castrillo, A., Bookout, A. L., Mak, P. A., Edwards, P. A., Mangelsdorf, D. J., Tontonoz, P. & Miyazaki, T.: A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spa/Ap16 in atherosclerosis development. *Cell Metab.*, 1: 201-213, 2005.

- 2) Botto, M., Dell'Agnola, C., Bygrave, A. E., Thompson, E. M., Cook, H. T., Petry, F., Loos, M., Pandolfi, P. P. & Walport, M. J. : Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.*, **19** : 56-59,1998.
- 3) Hamada, M., Nakamura, M., Tran, M. T., Moriguchi, T., Hong, C., Ohsumi, T., Dinh, T. T., Kusakabe, M., Hattori, M., Katsumata, T., Arai, S., Nakashima, K., Kudo, T., Kuroda, E., Wu, C. H., Kao, P. H., Sakai, M., Shimano, H., Miyazaki, T., Tontoz, P. & Takahashi, S. : MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. *Nat. Commun.*, **5** : 3147, 2014.