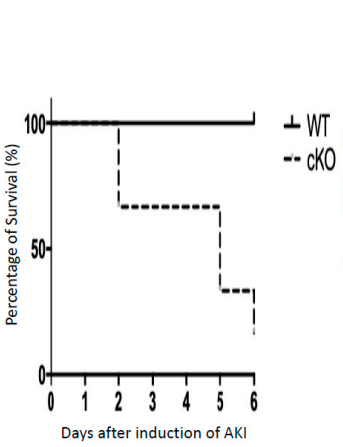
50　マクロファージにおけるMaf転写因子の機能解析	高橋　智

【目的】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。その中で、MafB および c-Maf は、血球系ではマクロファージ系細胞に多く発現していることが報告されていたが、その機能の詳細は明らかにされていなかった。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、成体で蓄積する老廃物や死細胞の除去にも働き、プロフェッショナルな貪食細胞として成体の恒常性を維持している。本研究では、*MafB* および *c-Maf* の欠損マウスおよびマクロファージ特異的な欠損マウスを用いて、各組織に存在するマクロファージのプロフェッショナル貪食細胞としての機能を包括的に解明すること目的とした。

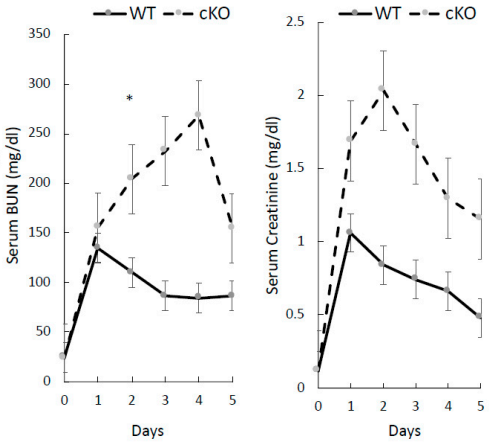
【方法】MafB および c-Maf のマクロファージでの機能を明らかにする目的で、MafB および c-Maf を誘導的に全身で欠損できるマウス（MafB cKO：CAG-CreERTM、c-Maf cKO：CAG-CreERTM）を作製して、成体マウスで *MafB* または *c-Maf* を欠損させ、その全身の表現型およびマクロファージの表現型を解析するとともに、マクロファージ特異的に欠損するマウス（MafB cKO：LyM-Cre、c-Maf cKO：LyM-Cre）を作製して、急性虚血性腎不全における病態を解析した。

【結果】*c-Maf* を成体マウスで欠損させたところ、腎性尿糖を発症することを見出した。詳細な解析から c-Maf が腎臓の近位尿細管での SGLT2 の発現を制御していることが明らかとなった。*MafB* や *c-Maf* の欠損はマクロファージの数には影響を与えないことが明らかとなった。急性虚血性腎不全モデルでは、マクロファージでの *MafB* の欠損（cKO）により、野生型のマウス（WT）と比較して生存率が著しく低下することが明らかとなり、急性虚血性腎不全からの回復にマクロファージでの MafB の発現が重要であることが示唆された。

急性虚血性腎不全におけるマクロファージ特異的 *MafB* 欠損の影響



図a. 急性虚血性腎不全後の生存率



図b. 急性虚血性腎不全後の腎機能指標

50. マクロファージにおける Maf 転写因子の機能解析

高橋　智

筑波大学 医学医療系 解剖学・発生学研究室

Key words：Large Maf 転写因子，マクロファージ，創傷治癒，M1/M2，スカベンジャー受容体

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。その中で、MafB および c-Maf は、血球系ではマクロファージ系細胞に多く発現していることが報告されていたが、その機能の詳細は明らかにされていなかった。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、成体で蓄積する老廃物や死細胞の除去にも働き、プロフェッショナルな貪食細胞として成体の恒常性を維持している。このプロフェッショナルな貪食機能は病的状態においても重要であり、例えば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）を産生することで、大量の脂質を貪食しても生存し、泡沫細胞として局所での酸化コレステロール処理を行うことが報告されている。一方で、この泡沫細胞の集積が動脈硬化の初期では病巣拡大の原因となることも知られていた［1］。我々は以前の研究で、泡沫細胞での AIM の誘導に MafB が必須であり、*MafB* 欠損マクロファージでは AIM が誘導されず、泡沫細胞にアポトーシスが誘導されて動脈硬化病巣が拡大しないことを明らかにした［2］。この論文は、動脈硬化病巣抑制の新たな可能性を示したものとして高く評価されている。また、脳梗塞では多量の死細胞が誘導されるが、それらの死細胞から細胞成分が放出され、Damage-associated molecular patterns（DAMPs）を形成することが知られている。この DAMPs がシグナルとなり、マクロファージなどの貪食細胞の集積を促進して組織修復を開始させるが、DAMPs の受容体は同定されてはいなかった。我々は、慶応大学の吉村教授との共同研究で、DAMPs の受容体がマクロファージ系細胞に発現している MSR1 や MARCO などのスカベンジャー受容体群であり、その発現に MafB が必須であることを明らかにした［3］。さらに、ヒトでは正常の状態でも 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が、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［4］。補体 C1q は主にマクロファージで産生されるが、その産生は MafB により制御されていることを明らかにした［5］。このように MafB は、プロフェッショナル貪食細胞としてのマクロファージ機能を包括的に制御している可能性があるが、その全体像は明らかにできてはいない。一方 c-Maf は、様々な組織マクロファージで発現状態が異なっており、組織特異的なマクロファージ機能に貢献している可能性が示唆されるが、機能的な証明はなされていない［6］。そこで本研究では、*MafB* および *c-Maf* の欠損マウスおよびマクロファージ特異的な欠損マウスを用いて、各組織に存在するマクロファージのプロフェッショナル貪食細胞としての機能を包括的に解明すること目的とした。

方　法

1.　c-Maf の成体マウスでの機能解析

我々の研究グループは *c-Maf* 欠損マウスを作製していたが、完全欠損マウスは出生前後で致死となるために、c-Maf の成体マウスでの機能の全容は明らかにされていなかった。そこで、c-Maf cKO マウスの全身で誘導的に Cre を活性化できる CAG-CreERTM マウスと交配して、c-Maf cKO：CAG-CreERTM マウスを作製し、成体マウスの全身で *c-Maf* 欠損を誘導して、c-Maf の成体マウスにおける機能およびマクロファージにおける機能を解析した。また、*c-Maf* 欠損マウスの造血細胞移植マウスを用いて、炎症時における c-Maf のマクロファージにおける機能を解析した。

2.　急性虚血性腎不全モデルでのマクロファージにおける MafB の機能解析

急性虚血性腎不全は致死性の高い重篤な疾患であるが、その組織障害および回復には、マクロファージが重要な機能を有していることが報告されていた。そこで、急性虚血性腎不全におけるマクロファージの機能に MafB がどのように関連しているかをマクロファージ特異的に *MafB* を欠損する MafB cKO : LyM-Cre（cKO）マウスを用いて解析した。MafB cKO : LyM-Cre（cKO）マウスで腎動脈を一過性に結紮することにより急性腎虚血を誘導し、その後の組織障害および回復過程を解析した。

3. 肺胞マクロファージにおける MafB および c-Maf の機能解析

肺胞では、通常の状態では GM-CSF によって誘導される MafB を発現していない肺胞マクロファージが常在しており、肺胞内に侵入した異物を免疫反応を誘導することなしに処理している。しかし喫煙や粉塵の暴露などにより多量の異物が侵入した場合は、MafB 陽性のマクロファージが誘導され、粉塵の処理を行うことが知られているが、肺胞マクロファージにおける MafB 及び c-Maf の機能解析は十分には行われていなかった。そこで、MafB cKO : CAG-CreERTM および c-Maf cKO：CAG-CreERTM マウスにおける肺胞マクロファージの正常状態における機能解析を行った。

結果および考察

1.　c-Maf の成体マウスでの機能解析

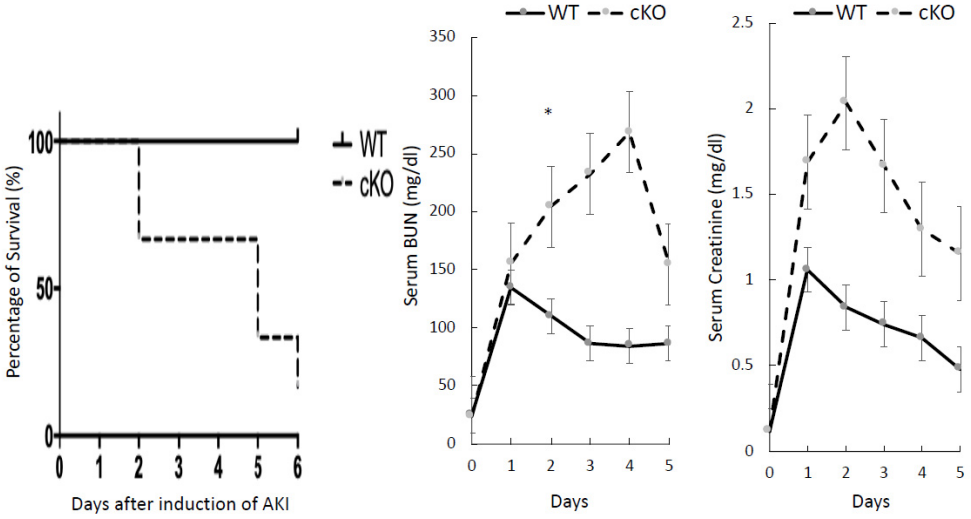
8 週齢の c-Maf cKO : CAG-CreERTM マウスにタモキシフェンを 75 mg/kg で 5 日間連続投与して、全身性に *c-Maf* 欠損を誘導した。*c-Maf* 欠損を尾部から抽出した DNA で確認し、表現型を観察した。*c-Maf* 欠損を誘導したマウスでは、タモキシフェン投与終了後 9 日目より尿糖が出現し、10 日目には 300 mg/day になることが明らかとなった。詳細な解析を行ったところ、c-Maf は腎臓の近位尿細管に発現しており、尿からのグルコースの再吸収の大部分を担っている SGLT2 の発現を直接制御していることが明らかとなった。SGLT2 は近位尿細管で特異的に発現しており、尿中のグルコース再吸収の 90%を担っており、近年新たな糖尿病治療の標的分子として注目を集めているが、その発現制御機構は解明されておらず、c-Maf が SGLT2 を直接制御していることの発見は、非常に重要な発見と考えられた。また成体での *c-Maf* 欠損マウスでは、時間経過とともに白内障を発症することが確認された。*c-Maf* 完全欠損マウスは、発生期に水晶体の形成異常を起こすこと、またヒト先天性白内障の原因遺伝子として同定されていることから、c-Maf が水晶体形成に重要であることは知られていたが、この結果から、c-Maf が水晶体の維持にも重要であることが示唆された。一方マクロファージについては、c-Maf cKO：CAG-CreERTM マウスでは抹消のマクロファージの数には特に異常が認められないことが明らかとなった。一方で *c-Maf* 欠損マウスの造血細胞の移植マウスの解析から、CD169 陽性のマクロファージでの炎症反応の誘導に重要な機能を有していることが明らかとなった［7］。この結果は、c-Maf がマクロファージでのサイトカインの産生に重要であるというこれまでの報告と一致する結果であると考えられる。今後、マクロファージ特異的な *c-Maf* 欠損マウスを用いて、病的状態でのマクロファージにおける c-Maf の機能解析を行いたい。

2.　急性虚血性腎不全モデルでのマクロファージにおける MafB の機能解析

MafB cKO：LyM-Cre（cKO）マウスで、腎動脈を一過性に結紮することにより急性腎虚血を誘導し、その後の組織障害および回復過程を解析した。その結果、マクロファージ特異的な *MafB* 欠損（cKO）マウスでは、腎機能の指標が野生型（WT）マウスと比較して 有意に悪化し、腎虚血からの回復が遅れて死亡率が高くなることが確認された。我々のこれまでの解析から、MafB はマクロファージにおける貪食機能の制御に重要であることが明らかになっているので、障害された腎臓組織の貪食による修復に重要な機能を有していることが想定される。

3. 肺胞マクロファージにおける MafB および c-Maf の機能解析

MafB cKO：CAG-CreERTM マウスおよび、c-Maf cKO：CAG-CreERTM マウスの成体に、タモキシフェン投与により全身性に *MafB* および *c-Maf* を欠損させて、通常状態における肺胞マクロファージを組織学的に解析した。その結果、*MafB* 欠損マウスおよび *c-Maf* 欠損マウスでは、野生型マウスと比較して、肺胞マクロファージの数や形態に有意な異常は認められなかった。上述のように c-Maf は炎症に対するマクロファージの反応誘導に重要であることから、粉塵暴露による炎症の反応時には差が認められものと考えられ、今後実験を行う予定である。



図a. 急性虚血性腎不全後の生存率

図b. 急性虚血性腎不全後の腎機能指標

図 1. 急性虚血性腎不全におけるマクロファージ特異的 *MafB* 欠損の影響

a) 急性虚血性腎不全後の生存率を野生型マウス（WT）とマクロファージ特異的 *MafB* 欠損マウス（cKO）で解析した。マクロファージ特異的 *MafB* 欠損マウスでは生存率が低下した。

b) それぞれのマウスの腎機能を解析した。血清 BUN およびクレアチニン量はマクロファージ特異的 *MafB* 欠損マウス（cKO）マウスで有意に上昇した。Welch の t-test で検定をおこなったが、2 日目以降はマウスが死亡したため、数が少なく統計学的な優位差は得られていない。
n = 6、* p < 0.05

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京薬科大学生命科学部免疫制御学研究室の田中正人教授、浅野謙一准教授である。また、本ご支援をいただいた上原記念生命科学財団に感謝いたします。

文 献

1) Arai S, Shelton JM, Chen M, Bradley MN, Castrillo A, Bookout AL, Mak PA, Edwards PA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P, Miyazaki T. A role for the apoptosis inhibitory factor AIM/Spalpha/Api6 in atherosclerosis development. Cell Metab. 2005 Mar;1(3):201-13. PMID:16054063

2) 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. MafB promotes atherosclerosis by inhibiting foam-cell apoptosis. Nat Commun. 2014;5:3147. doi: 10.1038/ncomms4147. PMID:24445679

3) Shichita T, Ito M, Morita R, Komai K, Noguchi Y, Ooboshi H, Koshida R, Takahashi S, Kodama T, Yoshimura A. MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. Nat Med. 2017 Jun;23(6):723-732. doi: 10.1038/nm.4312. Epub 2017 Apr 10. PMID:28394332

4) Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ. Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. Nat Genet. 1998 May;19(1):56-9. PMID:9590289

5) Tran MTN, Hamada M, Jeon H, Shiraishi R, Asano K, Hattori M, Nakamura M, Imamura Y, Tsunakawa Y, Fujii R, Usui T, Kulathunga K, Andrea CS, Koshida R, Kamei R, Matsunaga Y, Kobayashi M, Oishi H, Kudo T, Takahashi S. MafB is a critical regulator of complement component C1q. Nat Commun. 2017 Nov 22;8(1):1700. doi: 10.1038/s41467-017-01711-0. PMID:29167450

6) Daassi D, Hamada M, Jeon H, Imamura Y, Nhu Tran MT, Takahashi S. Differential expression patterns of MafB and c-Maf in macrophages in vivo and in vitro. Biochem Biophys Res Commun. 2016 Apr 22;473(1):118-124. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.03.063. Epub 2016 Mar 17. PMID:26996125

7) Kikuchi K, Iida M, Ikeda N, Moriyama S, Hamada M, Takahashi S, Kitamura H, Watanabe T, Hasegawa Y, Hase K, Fukuhara T, Sato H, Kobayashi EH, Suzuki T, Yamamoto M, Tanaka M, Asano K. Macrophages Switch Their Phenotype by Regulating Maf Expression during Different Phases of Inflammation. J Immunol. 2018 Jul 15;201(2):635-651. doi: 10.4049/jimmunol.1800040. Epub 2018 Jun 15. PMID:29907708