

論文内容要旨

論文題目

Altered phenotypes of macrophages in dominant negative MafB transgenic mice

(ドミナントネガティブ MafB トランスジェニックマウスのマクロファージにおける表現型の変化についての解析)

責任講座： 内科学第一講座

氏名： 西脇 道子

【内容要旨】 (1,200 字以内)

【背景】 肺胞マクロファージ (AM) は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の病態に重要な役割を果たしている。我々は以前、喫煙曝露マウスの AM で転写因子 MafB が発現亢進し、アポトーシスを抑制していることを報告した。また、重喫煙者 COPD 患者でも、AM で MafB 発現が亢進しており、一秒率と負の相関関係を認めることを示した。しかし MafB 欠損マウスは致死的であり、これまで遺伝子改変マウスを用いて AM における MafB の役割を検討した報告や、疾患モデルに応用した報告はない。

【目的】 MafB の機能を検討するため、Dominant negative MafB トランスジェニック (DN MafB TG) マウスを作製し、マクロファージの表現型と貪食能を解析した。

【方法】 DN として作用する N 末端側を除いた Truncated MafB の cDNA と Macrophage Scavenger receptor enhancer-promoter (MSR E-P) を遺伝子工学的に合成し、マクロファージ特異的に DN MafB を発現するマウスを作製した (MSR-DN MafB TG マウス)。DN MafB の発現は、RT-PCR、免疫染色、reporter assay で確認した。また、気管支肺胞洗浄 (BAL) の細胞分画、電子顕微鏡による AM の組織像、フローサイトメトリーによる細胞表面マーカー発現と貪食能の検討を行った。

【結果】 DN MafB の遺伝子発現を、肺胞および腹腔マクロファージ、肝組織で確認した。免疫染色によって、肝 Kupffer 細胞、腎糸球体足細胞およびボーマン嚢細胞、脾赤脾髄細胞、AM で DN MafB 蛋白質の存在を確認した。骨髓由来マクロファージでのレポーターアッセイにて、DN MafB が MafB 活性を抑制していることを確認した。BAL 細胞濃度およびマクロファージ分画は DN MafB TG マウスで有意に減少していた。AM の RT-PCR では caspase-3 が DN MafB TG マウスで有意に増加しており、脾臓の TUNEL 染色では TUNEL 陽性細胞を多数認めた。透過電子顕微鏡では核内の高電子密度領域 (ヘテロクロマチン) が DN MafB TG マウスで有意に増加しており、走査電子顕微鏡では偽足の形態が膜状に変化していた。また、DN MafB TG マウスのチオグリコレート誘発腹腔マクロファージでは、F4/80、CD11b の発現がともに減弱していたが、無刺激状態の AM ではこれらの発現に変化を認めなかった。AM の貪食能は、DN MafB TG マウスで有意に低下していた。

【考察】DN MafB TG マウスのマクロファージの解析から、MafB が肺胞マクロファージの数、細胞形態、分化、機能に影響を及ぼしていることが示された。当マウスを用いた検討により、COPD などの肺胞マクロファージが関与する肺疾患の病態における MafB の役割が解明されることが期待される。

平成 23 年 / 月 25 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 西脇 道子

論文題目： Altered phenotypes of macrophages in dominant negative MafB transgenic mice

審査委員：主審査委員

中島 修

印

副審査委員

加藤 丈夫



副審査委員

浅尾 裕信



審査終了日：平成 23 年 / 月 24 日

【 論文審査結果要旨 】

西脇道子氏は、肺胞マクロファージ (AM) における転写因子 MafB の役割を解明することを目的として、dominant-negative MafB 変異体をマクロファージ特異的に発現させたトランスジェニックマウス (MSR-DN MafB TG) を作製し、マクロファージ特異的に MafB 機能を破壊したマウスを確立して、その表現型解析を行った。

ライン化された MSR-DN MafB TG において、トランスジーン (DNMafB) のマクロファージ特異的発現、および、*in vivo* における DN MafB による内在性 MafB の転写活性化能の阻害を確認し、企図通り、マクロファージにおける MafB 機能破壊を確認した。

相同組み換えによる MafB 遺伝子破壊マウスが出生直後、呼吸不全で死亡し、AM の解析が不可能であるのに対し、MSR-DN MafB TG は、成体まで成長し、マクロファージ解析が可能であり、以下の4点について、MSR-DN MafB TG において、野生型と異なる表現型を見出した。

1. MSR-DN MafB TG では、肺胞洗浄液 (BAL) に含まれるマクロファージ数は、野生型と比べ、ほぼ半減し、AM でアポトーシスマーカーである Caspase3 mRNA レベルが上昇しており、さらに、マクロファージが局在する赤脾髄での TUNEL 陽性細胞が増加している。
2. MSR-DN MafB TG では、マクロファージの分化マーカーである F4/80, CD11b 発現が、腹腔マクロファージで著減しており、また、BAL 中の細胞に、形態観察では分類不能で、マクロファージの分化成熟が障害されていると推測される単核細胞の集団が著増する。
3. 走査型電子顕微鏡による形態観察から、野生型の AM では棍棒状の偽足が、MSR-DN MafB TG の AM では、偽足が膜状の異常な形態を示す。
4. AM による IgG-coated beads に対する貪食能が、MSR-DN MafB TG では、著しく低下している。

以上の解析結果から、本研究により、マクロファージにおいて、そのアポトーシス、分化成熟、形態形成、貪食能に対して、MafB が深く関与することが示唆された。特に偽足形成と貪食能の異常は、これまでに報告が無く、MafB の生理機能の新たな側面を明らかにしたものであり、大変意義深いと考えられる。

本研究は、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) 患者 AM における転写因子 MafB の発現レベルが、肺機能と負の相関関係にあることを示した臨床研究を基に着想され、先行した MafB 遺伝子破壊マウスモデルの欠点を克服して、成体における AM での MafB の役割を解析可能としており、今後、MSR-DN MafB TG を喫煙暴露系への応用することにより、MafB を COPD 治療標的として検証することも期待される。

以上から、主・副審査委員は、本研究は学位授与に値すると判断した。

(1, 200 字以内)