

体内のアポトーシス細胞を除去するために転写因子 MafB がすること

浅野 圭吾 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

《 導入 》

生体内では1日に10億個のアポトーシス細胞が生じていると言われていたが、マクロファージが速やかにアポトーシス細胞を認識し、貪食するため、アポトーシス細胞が体内に蓄積することはない。しかし、何らかの理由でこの貪食機構が破綻し、アポトーシス細胞が体内で放置されると細胞内容物が放出され、その後自己抗体の産生が誘導されることで、自己免疫反応が生じる。つまり、マクロファージは体内のアポトーシス細胞を速やかに除去することで、自己免疫疾患の発症を防いでいると言える。

MafBは大Maf転写因子群に属するbZip型転写因子であり、ホモ二量体あるいはヘテロ二量体を形成して標的遺伝子のMaf認識配列(MARE)に結合し、転写制御を行う。また、血液細胞において、MafBは主にマクロファージに発現している。

アポトーシス細胞認識に関わる因子は今までに多数報告されているが、その転写制御メカニズムについては不明な点が多い。当研究室は、定量的RT-PCRやルシフェラーゼアッセイ、FACS解析などを用いた*in vitro*の実験系より、MafBはC1qa, C1qb, C1qcから構成される補体C1qの制御を介してマクロファージのアポトーシス細胞貪食に機能しており、MafB欠損によるC1qの発現の低下は、マクロファージのアポトーシス細胞貪食機構の破綻につながることを示唆された。しかし、実際にMafB欠損マウスが自己免疫疾患を発症するのか、またヒトの細胞でも同じメカニズムがあるのかはまだ証明されていない。

そこで本研究では、MafB欠損によるアポトーシス細胞貪食機構の破綻と自己免疫疾患の関連について調査し、さらにMafBによるC1qの転写制御メカニズムがマウス生体内(*In vivo*)及びヒトの単球・マクロファージの細胞株であるTHP-1でも起きているのかを検証した。

《 方法と結果 》

①MafB欠損マウスを用いた実験

*マウス

MafBを欠損させたマウスは生後間もなく死んでしまうため、成獣を用いた解析ができない。そこで、胎生14.5日のMafB欠損マウス胎児肝臓由来の血液細胞を、放射線照射した野生型マウスに移植することで、MafBが欠損した血液細胞を有するマウスを作製し、これをMafB欠損マウスとして解析を行った。また、マウスは全てC57BL/6J系統を使用した。

*自己免疫疾患との関連

自己免疫疾患を発症したマウスでは、抗核抗体や抗DNA抗体などの自己抗体の増加による糸球体腎炎が見られる。そこで、移植後20週経過したMafB欠損マウスの腎臓の切片をHE染色、PAS染色にて染色し、糸球体腎炎のスコアリン

グを行ったところ、MafB欠損マウスでは野生型に比べ、糸球体腎炎の症状が有意に見られた。

**In vivo*におけるMafB欠損マクロファージの解析

MafB欠損マウスの血液にはわずかながらレシピエントである野生型のマクロファージが存在しているため、MafB欠損マウスの脾臓細胞からMafB欠損マクロファージのみをセルソーターでソーティングし、C1qの遺伝子発現を定量的RT-PCRによって検証した。その結果、MafB欠損マクロファージではC1qa, b, cの遺伝子発現が顕著に低下していた。

②THP-1を用いた実験

*MAFBノックダウン

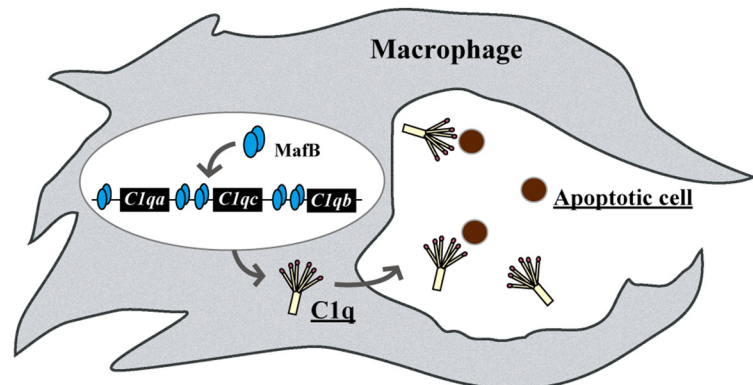
MAFBのmRNAを切断するように設計されたsiRNAをマクロファージへ分化誘導したTHP-1に導入することで、MAFBのノックダウンを行った。そして、このMAFBノックダウンによるC1Qの遺伝子発現の変化を定量的RT-PCRを用いて解析した結果、MAFBノックダウンによりC1Qの遺伝子発現量は低下することがわかった。

*クロマチン免疫沈降法

ヒトのC1QA, B, Cのプロモーター配列をEnsembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>)より獲得し、half-MARE(tgctgca)の探索を行った。結果、C1QAで2箇所、C1QBで2箇所、C1QCで3箇所のMAREを候補として選出した。

そこで、ホルムアルデヒドで固定したTHP-1のDNAに超音波をあて、500bpほどの断片にしたものに対して、抗MAFB抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った。得られたDNAは、候補として挙げたMAREを挟むように設計したプライマーを用いた定量的RT-PCRにより解析し、MAFBが直接結合しているか検証した。現在検証中であるため、結果は発表会にて報告する。

《 結論 》



MafBはC1qの発現制御を介してマクロファージのアポトーシス細胞貪食機構に関与している。また、マウスでこのメカニズムが崩壊すると、アポトーシス細胞の残存により自己免疫反応が引き起こされると考えられる。