

MafB はマクロファージを介してがんを抑制する ; 腫瘍悪性化メカニズムの探究

今村 優希 (筑波大学 生物学類)

指導教員 : 高橋 智 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

「がん」とは、突然変異によって生じた不死細胞が免疫の攻撃をかいくぐって生き残り、無限に増え続けたもので、日本においては最も死亡率の高い疾患である。「がん」を抑制するためには、不死細胞を取り除く免疫系が重要である。

免疫細胞の 1 つであるマクロファージは、外界から侵入した細菌などに対して防御的に働き、体内の老廃物などを取り除く。腫瘍が形成された際には、マクロファージは主に免疫反応を促進し、腫瘍の抑制に働くと考えられてきた。しかし近年、マクロファージが、腫瘍細胞の増殖や転移の促進、免疫抑制などを誘発し、むしろ腫瘍を悪性化させることが分かってきた。前者のような、免疫亢進に働くマクロファージは M1 マクロファージ、後者のような、免疫抑制に働くマクロファージは M2 マクロファージと分類されている。

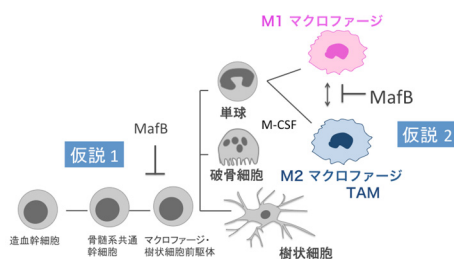
腫瘍内のマクロファージは、TAM (Tumor-associated macrophage [腫瘍随伴マクロファージ]) と呼ばれる。この TAM をターゲットとしたがん治療薬の開発も進められており、これからのがん研究においては、TAM の分子メカニズムを明らかにすることが重要となる。

当研究室の先行研究において、マクロファージに発現する転写因子 *MafB* の欠損したマウスでは腫瘍が大きくなることが示された。このことから、MafB は TAM の増殖を抑制する働きをもつと考えられる。しかし、その分子メカニズムは未だ明らかではない。そこで本研究では、腫瘍悪性化における転写因子 MafB の働きを明らかにすることを目的とし、TAM に着目して、その役割を検証した。

MafB が TAM の増殖を抑制するメカニズムとして、2 つの仮説が考えられる【図】。一方は、「マクロファージ前駆体の増殖抑制」である。マクロファージは造血幹細胞から、様々な前駆体を介してマクロファージに分化する。その分化の過程で、MafB による調節を受けている可能性がある。もう一方は、「腫瘍における、M1/M2 マクロファージの局在調節」である。腫瘍において、MafB が、免疫抑制に働く M2 マクロファージの増加を抑制している可能性がある。

本研究では、この 2 つの仮説について検証した。

【図】 MafB による TAM 増殖抑制の仮説



【材料・方法】

1. マウス

本研究にあたり、2 種類のマウスを用いた。

(1) *MafB*-GFP ノックインマウス - 当研究室にて作製されたマウスで、*MafB* アレルに GFP 遺伝子がノックインされている。この *MafB* 欠損マウスは、生後すぐ死亡するため、成体での解析が行えない。そこで、胎児肝臓由来の造血幹細胞を放射線照射したマウス (C57BL/6J) に移植して血液の再構築を行い、*MafB* 欠損マウス (以下 *MafB*^{-/-}マウス) を作製した。

(2) 8~10 週齢の野生型マウス (C57BL/6J)

2. 肺がん細胞 Lewis Lung Carcinoma (LLC) の移植

LLC を上記の 2 種類のマウスに皮下注射し、形成された腫瘍の大きさと重さを計測した。また、*MafB*^{+/+}マウスの腫瘍を免疫染色し、GFP およびマクロファージマーカーの発現を確認した。同様の解析を、T 細胞リンパ腫株 RMA、メラノーマ株 B16 のそれぞれを移植した *MafB*^{+/+}マウスでも行った。

3. マクロファージ前駆体の増殖抑制の検討

仮説 1 を検証するため、造血幹細胞のコロニーアッセイを行った。野生型マウスと *MafB*^{-/-}マウスの脾臓細胞を、コロニーを可視化できる培地にて培養し、マクロファージへと分化誘導した。1 週間後、コロニーを計数した。同様の解析を、LLC 移植後の野生型マウスおよび *MafB*^{-/-}マウスでも行った。

4. 腫瘍内における、M1/M2 マクロファージの局在調節

仮説 2 を検証するため、野生型マウスおよび *MafB*^{-/-}マウスに LLC を移植し、摘出した腫瘍を分離した。腫瘍細胞のうち、マクロファージマーカー陽性細胞のみをソーティングし、M2 マクロファージマーカー遺伝子の発現を RT-PCR にて確認した。

また、腫瘍細胞をマクロファージマーカー、2 種類の M2 マクロファージマーカー、M1 マクロファージマーカーの計 4 種の抗体で標識したのち、FACS にて腫瘍内の M1/M2 マクロファージそれぞれの割合を調べた。

【結果】

1. *MafB*^{-/-}マウスでは、野生型マウスよりも腫瘍が大きくなった。免疫染色により、LLC、RMA、B16 のどのがん細胞株においても、形成された腫瘍内にはマクロファージがあることが確認できた。また、GFP 陽性細胞も同様に見られたことから、MafB が発現している可能性も示された。
2. LLC 未移植時、移植後ともに、*MafB*^{-/-}脾臓細胞は野生型より多くのマクロファージ前駆体のコロニーを形成した。
3. *MafB*^{-/-} TAM における M2 マクロファージマーカーの発現は、野生型とほとんど変わりがなかった。また、腫瘍内の M1/M2 マクロファージの割合もほぼ同じ値を示した。

【考察】

以上の結果より、MafB は脾臓ではマクロファージ前駆体の増殖を抑制していると考えられる。一方、腫瘍内では、MafB は M1/M2 マクロファージ局在に関与しない可能性がある。したがって、MafB によるマクロファージ数の制御が腫瘍増殖に関与すると考えられる。