

厚生労働科学研究費補助金（感覚器障害研究事業）
「難治性内眼炎の発症機序解明と新しい免疫治療に関する研究」
分担研究報告書

『Maf 関連遺伝子の研究』

分担研究者 酒井 正春 北海道大学大学院医学研究科分子生物学分野

研究要旨

転写因子 Maf は目の発生、特に水晶体発生に関与しているが、他のさまざまな組織の発生分化にも関与している事が明らかになってきている。本年度は Maf の軟骨分化に関する機能について検討を加えた。Maf は軟骨分化過程の肥大軟骨細胞に強く特異的に発現しているが、この領域に発現して、軟骨分化に重要な働きを持つ結合組織増殖因子 (CTGF) 遺伝子を制御している事を明らかにした

A. 研究目的

転写因子 Maf は目の発生、特に水晶体発生に関与しており、先天性白内障、小眼球症、虹彩欠損の原因遺伝子の一つと考えられている。c-Maf ノックアウトマウスは水晶体分化に異常が見られ、L-Maf (MafA) は目の発生に関与することが知られている。我々は c-Maf、MafB、Small-Maf などの Maf 関連転写因子の遺伝子をクローニングしそれらの発現、機能について研究してきた。これらの転写因子はさまざまな組織の分化、発生に強く関与している事が知られてきたが、我々は c-Maf および MafB が軟骨分化過程の肥大軟骨細胞に特異的に強く発現している事を見いだした。本年度は主にこの転写因子の軟骨分化に関わる機能を解析する。

B. 研究方法

c-Maf および MafB が強く発現している肥大軟骨細胞と同じ領域に発現している遺伝子を探索した結果、結合組織増殖因子 (Connective tissue growth factor, CTGF) 遺伝子が同じ領域に発現し

ている事がわかった。この遺伝子が Maf によって直接転写制御を受けているかを、アデノウイルスによる *c-maf*、*mafB* 遺伝子の導入、CTGF 遺伝子のクローニング、クロマチン免疫沈降分析、レポーターアッセイ、ゲルシフト分析などで解析する。

C. 研究結果

軟骨に分化する事ができる未分化繊維芽細胞株、C3H10T1/2 に、アデノウイルスを用いた *c-maf.mafB* 遺伝子の導入を行った。その結果どちらの遺伝子を過剰発現させても CTGF 遺伝子の強い誘導がおこる事がわかった。CTGF 遺伝子の活性化が直接 c-Maf または MafB による転写活性化によるものかを確認するため、抗 c-Maf 抗体を用いたクロマチン免疫沈降分析を行った。この結果、c-Maf が直接 CTGF 遺伝子のプロモーター領域に結合している事が明らかとなった。レポーター分析では、CTGF 遺伝子のさまざまな領域をレポーター遺伝子につなぎ、C3H10T1/2 細胞に導入すると、プロモーター、転写開始点

下流に Maf によって転写活性化される領域が存在した。c-Maf 強制発現細胞からの核抽出液を用いたゲルシフト分析でも、同じ領域に c-Maf が結合す配列の存在を確認した。これらの事から c-Maf, MafB は肥大軟骨細胞において、CTGF 遺伝子に結合し、活性化する事が明らかとなった。

D. 考察

分子生物学的、細胞生物学的な手法を用いて c-Maf が CTGF 遺伝子に結合し、活性化している事を明らかにした。しかし、c-maf 遺伝子破壊マウスでの CTGF 発現は MEF 細胞ではやや減少しているものの軟骨組織では顕著ではなかった。これは MafB やその他の因子が相補しているものと考えられる。CTGF 遺伝子破壊マウスは軟骨形成において多くの異常な点がみられるが、このいくつか、肥大軟骨細胞領域の増加や脛骨の骨化異常など、は c-maf 遺伝子破壊マウスの形質と共通しており、Maf が CTGF を介して軟骨形成、骨形成に重要な働きをしていると考えられる。

E. 結論

未分化繊維芽細胞, C3H10T1/2 を用いた遺伝子導入、レポーター導入、クロマチン免疫沈降などの実験から転写因子 Maf が CTGF 遺伝子の発現を活性化している事を明らかにした。

F.

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1, Ogata A, Shimizu T, Abe R, Shimizu H, and Sakai M: Expression of *c-maf* and *mafB* genes in the skin during rat embryonic development. *Acta histochemica*. 106, 65-67 (2004)
- 2, Ikeda, H., Nishi, S., and Sakai, M. Transcription

factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis. *Biochemical J*. 380, 515-521 (2004)

- 3, Nakabayashi H, Koyama Y, Suzuki H, Li HM, Sakai M, Miura Y, Wong NC, Nishi S. Functional mapping of tissue-specific elements of the human alpha-fetoprotein gene enhancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 318, 773-785 (2004)
 - 4, Imaki J, Tsuchiya K, Mishima T, Onodera H, Kim JI, Yoshida K, Ikeda H, Sakai M. Developmental contribution of *c-maf* in the kidney: distribution and developmental study of *c-maf* mRNA in normal mice kidney and histological study of *c-maf* knockout mice kidney and liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 320, 1323-1327 (2004)
 - 5, Kase S, Imaki J, Harada T, Harada C, Ohgami K, Shiratori K, Sakai M, Nishi S, Ohno S, Yoshida K. Expression of *maf-B* mRNA in the epithelium around the eyelid closure of the mouse eye at embryonic day 18. *Anat Embryol (Berl)*. 209, 153-156 (2004).
 - 6, Dong, J., Fujii, S., Li, H., Nakabayashi, H., Sakai, M., Nishi, S., Goto, D., Furumoto, T., Imagawa, S., Zaman T.A.K.M., and Kitabatake, A. Interleukin-6 and Mevastatin Regulate Plasminogen Activator Inhibitor-1 Through CCAAT/Enhancer-Binding Protein-d. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25, 1078-1084 (2005)
 - 7, Sakai, M., and Muramatsu, M. Regulation of GST-P gene expression during hepatocarcinogenesis. *Methods in Enz*. 389 (2005) in press
- ##### 2. 学会発表
- 1, Kuroki, K., Yamaguchi Y., Imaki J., Sakai M., Ikeda H., Mishima T., Ui-Tei, K., Hamada T: Expression of DDAH I in chick and rat Embryo.

第77回日本精化学会（横浜 2004）

- 2, 表山和樹、酒井正春、池田裕美、西信三：転写因子 Maf の軟骨分化に関する標的因子。第 27 回日本分子生物学会（神戸 2004）
- 3, Sakai M: Regulation of rat GST-P gene during hepatocarcinogenesis -Positive and negative controls-. International Symposium of Molecular Mechanism of Environmental Response to Food and Oxygen. (Tukuba 2005)

IV. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shiratori K, Ohgami K, Ilieva B.I, Xue-Hai Jin, Koyama Y, Miyashita K, Yoshida K, Kase S, Ohno S	Effects of fucoxanthin on lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo				in press
Kase S, Nakayama I K, Nakayama K, Ikeda H2, Harada T, Harada C, Ohgami K, Shiratori K, Ohno S, Yoshida K	Phosphorylation of p27(KIP1) in the developing retina and retinoblastoma.	Int J Mol Med			in press
Kase S, Ikeda H, Harada T, Harada C, Imaki J, Ohgami K, Shiratori K, Nakayama K I., Nakayama K, Ohno S, Yoshida K	Disappearance of p27(KIP1) and increase in proliferation of the lens cells after extraction of most of the fiber cells of the lens.	Cur Eye Res			in press
Ariga T, Shimada Y, Shiratori K, Ohgami K, Yamazaki S, Tagawa Y, Kikuchi M, Miyakita Y, Fujita K, Ishiko H, Aoki K, Ohno S	Five new genome types of adenovirus type 37 caused epidemic keratoconjunctivitis in Sapporo, Japan, for more than 10 years.	J Clin. Microbio	43	726-732	2005
Harada C, Harada T, Hun-Meng A. Q, Namekata K, Yoshida K, Ohno S, Tanaka K, L.F.Parada	Role of neurotrophin-4/5 in neural cell death during retinal development and ischemic retinal injury in vivo.	Invest. Ophthalmol Vis Sci	46	669-673	2005
Ohgami K, Ilieva B.I, Shiratori K, Koyama Y, Xue-Hai Jin, Yoshida K, Kase S, Kitaichi N, Suzuki Y, Tanaka T, Ohno S	Anti-inflammatory effects of aronia extract on rat endotoxin-induced uveitis.	Invest Ophthalmol Vis Sci	46	275-281	2005
Kase S, Imaki J, Harada T, Harada C, Ohgami K, Shiratori K, Sakai M, Nishi S, Ohno S, Yoshida K	Expression of maf-B mRNA in the epithelium around the eyelid closure of the mouse eye at embryonic day 18	Anat Embryol	209	153-156	2004
Ohno S, Nakamura S, Hori S, Shimakawa M, Kawashima H, Mochizuki M, Sugita S, Ueno S, Yoshizaki K, Inaba G	Efficacy, safety, and pharmacokinetics of multiple administration of infliximab in Behcet's disease with refractory uveoretinitis.	J Rheumatol	31	1362-1368	2004
Ilieva B.I, Ohgami K, Shiratori K, Koyama Y, Yoshida K, Kitamei H, Takemoto Y, Yazawa K, Ohno S	The effects of Ginkgo Biloba Extract on Lipopolysaccharide-induced inflammation in vitro and in vivo.	Exp Eye Res	79	181-187	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yoshida K, Kase S, Nakayama K, Nagahama H, Harada T, Ikeda H, Harada C, Imaki J, Ohgami K, Shiratori K, Iliyana B I, Ohno S, Nishi S, Nakayama KI	Involvement of p27KIP1 in the Proliferation of the Developing Corneal Endothelium.	Invest Ophthalmol Vis Sci	45	2163- 2167	2004
Yoshida K, Kase S, Nakayama K, Nagahama H, Harada T, Ikeda H, Harada C, Imaki J, Ohgami K, Shiratori K, Ohno S, Nakayama KI	: Distribution of p27(KIP1), cyclin D1, and proliferating cell nuclear antigen after retinal detachment.	Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol	242	437- 441	2004
Yoshida K, Nakayama K, Kase S, Nagahama H, Harada T, Ikeda H, Harada C, Imaki J, Ohgami K, Shiratori K, Ohno S, Nishi S, Nakayama KI	Involvement of p27(KIP1) in proliferation of the retinal pigment epithelium and ciliary body.	Anat Embryol			2004
Kase S, Aoki K, Harada T, Harada C, Ohgami K, Shiratori K, Nishi S, Ohno S, Yoshida K	Activation of nuclear factor-kappa B in the conjunctiva with the epithelial scraping of the mouse cornea and human epidemic keratoconjunctivitis.	Br J Ophthalmol	88	947- 949	2004
Ariga T, Shinmada Y, Ohgami K, Tagawa Y, Ishiko H, Aoki K, Ohno S	New genome type of adenovirus serotype 4 caused nosocomial infections associated with epidemic conjunctivitis in Japan.	J Clin Microbiolo	42	3644- 3648	2004
Kaneko H, Mori S, Suzuki O, Iida T, Shigeta S, Abe M, Ohno S, Aoki K, Suzutani T	The cotton rat model for adenovirus ocular infection : antiviral activity of cidofovir.	Antivir Res	61	63-66	2004
Shimada Y, Ariga T, Tagawa Y, Aoki K, Ohno S, Ishiko H	Molecular diagnosis of human Adenoviruses D and E by a phylogeny-based classification method using a partial hexon sequence.	J Clin Microbiol	42	1577- 1584	2004
Nishida T, Miyata S, Itoh Y, Mizuki N, Ohgami K, Shiratori K, Iliyana B I, Ohno S, Andrew W T	Anti-inflammatory effects of alpha- melanocyte-stimulating hormone against rat endotoxin-induced uveitis and the time course of inflammatory agents in aqueous humor.	Int Immunopharmac ol	4	1059- 1066	2004
Harada C, Harada T, Mitamura Y, Quah A H-M, Ohtsuka K, Kotake S, Ohno S, Wada K, Takeuchi S, Tanaka K	Diverse NF- κ B expression in epiretinal membranes after human diabetic retinopathy and proliferative vitreoretinopathy.	Molecular Vision	10	31-36	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Minami, K., Yanagawa, Y., Shinohara, N., Harabayashi, T., Nonomura, K. and Onoe, K.	Negative feed back regulation of T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine balance via dendritic cell and natural killer T cell interactions.	Blood			in press
Kikuchi, K., Yanagawa, Y. and Onoe, K.	CCR7 ligands-enhanced phagocytosis of various antigens in mature dendritic cells—Time course and antigen distribution different from phagocytosis in immature dendritic cells	Microbiol. Immunol.			in press
Yanagawa, Y., and Onoe, K.	CCR7 ligands induce interconnected ruffles of actin filaments in mature dendritic cells that are associated with vigorous endocytosis.	J. Clin. Exp. Hematopathol.			in press
Mitsubishi, S., Shima, H., Tanuma, N., Sasa, S., Onoe, K., Ubukata, M., and Kikuchi, K.	Protein phosphatase type 2A, PP2A, is involved in degradation of gp130.	Mol. Cell Biochem.		183- 269 187	2005
Diao, H., Kon, S., Iwabuchi, K., Kimura, C., Morimoto, J., Ito, D., Segawa, T., Maeda, M., Hamuro, J., Nkayama, T., Taniguchi, M., Yagita, H., Van Kaer, I., Onoe, K., Denhardt, D., Rittling, S., and Uede, T.	Osteopontin as a mediator of NKT cell function in T cell mediated liver diseases.	Immunity		539- 21 550	2004
Nakai, Y., Iwabuchi, K., Fujii, S., Ishimori, N., Wtano, K., Mishima, T., Iwabuchi, C., Tanaka, S., Dashtsoodol, N., Nakayama, T., Taniguchi, M., Miyake, S., Yamamura, T., Kitabatake, A., Joyce, S., Van Kaer, L., and Onoe, K.	Natural killer T cells accelerate atherogenesis in mice.	Blood		2051- 104 2059	2004
Aranami, T., Iclozan, C., Iwabuchi, K., and Onoe, K.	IL-7 dependent homeostasis proliferation in the presence of a large number of T cells in gld mice.	Microbiol. Immunol.		477- 48 484	2004
Takagi, D., Iwabuchi, K., Iwabuchi, C., Nakamaru, Y., Maguchi, S., Ohwatari, R., Furuta, Y., Fukuda, S., Joyce, S. and Onoe, K.	Immunoregulatory defects of V ₂₄ +V ₁₁ + NKT cells in development of Wegener's granulomatosis and relapsing polychondritis	Clin. Exp. Immunol.		591- 136 600	2004
Onoe, K., Iwabuchi, K. and Good, R.A.	T cell differentiation in allogeneic bone marrow chimeras.	Detection and Prevention		153- S 154	2004
Nagashima, T., Aranami, T., Iclozan, C. and Onoe, K.	Analysis of T cell responses to a superantigen, staphylococcal enterotoxin B.	J. Clin. Exp. Hematopathol.		44 25-32	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Shimada, S., Kato, E.H., Morikawa, M., Iwabuchi, K., Nishida, R., Kishi, R., Onoe, K., Minakami, H. and Yamada, H.	No difference in natural killer or natural killer T-cell population, but aberrant T-helper cell population in the endometrium of women with repeated miscarriage.	Hum. Reprod.	19	1018-1024	2004
Yamada, H., Shimada, S., Kato, E., Morikawa, M., Iwabuchi, K., Kishi, R., Onoe, K. and Minakami, H.	Decrease in a specific killer cell immunoglobulin-like receptor on peripheral natural killer cells in women with recurrent spontaneous abortion of unexplained etiology.	Am. J. Reprod. Immunol.	51	241-247	2004
Suzuki M, Tamura Y, Maeno M, Tochinali S, Iyaguchi D, Tanaka I, Nishihira J, Ishibashi T.	Xenopus laevis macrophage migration inhibitory factor is essential for axis formation and neural development.	J Biol Chem.		[Epub ahead of print]	2004
Onodera S, Nishihira J, Yamazaki M, Ishibashi T, Minami A.	Increased expression of macrophage migration inhibitory factor during fracture healing in rats.	Histochem Cell Biol.	121	209-217	2004
Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Honda A, Ishibashi T,	Macrophage migration inhibitory factor is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells.	J Biol Chem.	279	13729-13737	2004
Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, Abe R, Ishibashi T, Shimizu H.	Cetirizine, an H1-receptor antagonist, suppresses the expression of macrophage migration inhibitory factor: its potential anti-inflammatory action.	Clin Exp Allergy.	34	103-109	2004
Sakai. M., and Muramatsu, M.	expression during hepatocarcinogenesis.	Methods in Enz	389		in press
Dong, J., Fujii, S., Li, H., Nakabayashi, H., Sakai, M., Nishi, S., Goto, D., Furumoto, T., Imagawa, S., Zaman T.A.K.M., and Kitabatake, A.	Interleukin-6 and Mevastatin Regulate Plasminogen Activator Inhibitor-1 Through CCAAT/Enhancer-Binding Protein-d.	Arterioscler Thromb Vasc Biol	25	1078-1084	2005
Ogata A, Shimizu T, Abe R, Shimizu H, and Sakai M	Expression of c-maf and mafB genes in the skin during rat embryonic development.	Acta histochemica	106	65-67	2004
Ikeda, H., Nishi, S., and Sakai, M	Transcription factor Nrf2/MafK regulates rat placental glutathione S-transferase gene during hepatocarcinogenesis.	Biochemical J	380	515-521	2004
Nakabayashi H, Koyama Y, Suzuki H, Li HM, Sakai M, Miura Y, Wong NC, Nishi S.	Functional mapping of tissue-specific elements of the human alpha-fetoprotein gene enhancer.	Biochem Biophys Res Commun	318	773-785	2004

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Imaki J, Tsuchiya K, Mishima T, Onodera H, Kim JI, Yoshida K, Ikeda H, Sakai M.	Developmental contribution of c- maf in the kidney: distribution and developmental study of c-maf mRNA in normal mice kidney and histological study of c-maf knockout mice kidney and liver.	Biochem Biophys Res Commun		1323- 1327	2004

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
1. Ben Ezra D, Alio L J, Baudouin C, Behar-Cohen F, Dua S H, Donshik P, Filipiec M, Ohno S, Pleyer U	Ocular Surface Inflammation. In: Ocular Surface Inflammation		Highlights of Ophthalmology International City of Knowledge		Panama	2003	1-266
2. Onoe K, Kitaichi N, Ohno S, Iwabuchi C, Iwabuchi K	NK and NK-T cells possibly involved in Behcet's disease.	Zierhut M and Ohno S	Immunology of Behcet's disease	Swets & Zeitlinger	Netherlands	2003	63-72
3. Nishida T, Ohno S	T cells in Behcet's disease.	Zierhut M and Ohno S	Immunology of Behcet's disease	Swets & Zeitlinger	Netherlands	2003	57-61
4. Kimura M, Kimura T, Sato M, Watanabe T, Ohno S, Inoko H, Nomura E	An attempt to create a Behcet's disease model in mice.	Zierhut M and Ohno S	Immunology of Behcet's disease	Swets & Zeitlinger	Netherlands	2003	87-96
5. Mizuki N, Ohno S, Inoko H	Microsatellite mapping of the pathogenic gene of Behcet's disease.	Zierhut M and Ohno S	Immunology of Behcet's disease	Swets & Zeitlinger	Netherlands	2003	139-143
6. Nakamura S, Ohno S	The efficacy of Anti-TNF-Alpha antibody in the treatment of uveitis patients with Behcet's disease.	Zierhut M and Ohno S	Immunology of Behcet's disease	Swets & Zeitlinger	Netherlands	2003	151-154
小野江和則	CD3, CD16, CD2, CD25, CD23, CD8, CD4, CD45, 鑄型説, ウィン試験, 可溶性抗原抗体複合体, 感作細胞, 血清学, サイログロブリン, 自己と非自己, 植物マイトジェン, SCIDマウス, 側鎖説, 体細胞変異説, 同系の, ナイーブ細胞, 認識部位, ネットワーク説, 非自己, プファイファー現象, ポークウィードマイトジェン, レパトア.	伊藤正男	医学大辞典	医学書院	東京	2003	
Onoe K, Kitaichi N, Ohno S, Iwabuchi C and Iwabuchi K.	NK and NK-T cells possibly involved in Behcet's Disease	Zierhut, M. and Ohno, S.	Immunology of Behcet's Disease	Swets & Zeitlinger	Lisse, The Netherlands	2003	63-72
小野江和則	自己免疫疾患の成立機構.	大野重昭, 水流忠彦, 吉田晃敏	New Mook眼科, 眼の自己免疫疾患	金原出版	東京	2003	1-10
岩淵和也, 小野江和則	第6項 脾臓	森脇和郎, 山村研一, 米川博通	モデル動物の作成と維持	エル・アイ・シー	東京	2004	
小野江和則	免疫反応と免疫異常.	菊地浩吉	病態病理学	南山堂	東京	2004	243-259
小野江和則	免疫寛容.	藤堂 省	肝臓移植の実際	日本医京		印刷中	