

学位論文題名

Activation of connective tissue growth factor gene  
by the c-Maf and Lc-Maf transcription factors

(細胞分化に関する転写因子の役割に関する研究、  
特に Maf の CTGF 誘導に関する研究)

学位論文内容の要旨

転写因子 Maf の遺伝子はトリ肉腫ウイルス (ASV42) が持つ癌遺伝子として見いだされ、生体内の様々な組織の、主に発生や分化段階に発現している。ヒト多発生骨髄腫の 50% 近くにこの遺伝子の免疫グロビン遺伝子との融合が報告されているが、Maf の本来の機能はさまざまな組織の発生、分化への関与であると考えられる。Maf は bZip 構造を持ち、ホモ二量体のみならず他の多くの転写因子ともヘテロ二量体を形成し、様々な標的遺伝子を活性化する。c-Maf は軟骨分化の最終段階である肥大軟骨細胞に強く発現しているが、肥大軟骨細胞には結合組織成長因子 (Connective Tissue Growth Factor: CTGF) とよばれる軟骨分化に極めて重要な成長因子が発現していることが最近見いだされた。CTGF は骨分化制御、骨基質であるコラーゲンの誘導、あるいは骨髄形成時の血管新生などを促進するほか、繊維芽細胞の増殖促進等の生理的機能が知られており、創傷治癒や動脈硬化、肝硬変、がんなどさまざまな線維症にも関与することが報告されている。CTGF は非常に重要な成長因子であるが、その発現調節のメカニズムなどは不明な点が多い。現在までに TGF- $\beta$  を介する CTGF 誘導機序が詳細に報告されている。しかし、TGF- $\beta$  のみで CTGF が関与する細胞分化や疾患の機序については説明できない。

さて、マウス肥大軟骨組織に発現している c-Maf 及び CTGF の mRNA の発現を *in-situ* ハイブリダイゼーション法によって観察したところ、その局在は一致していた。そこで、c-Maf が CTGF の発現に関与しているかを調べるため、c-Maf ノックアウトマウスから樹立した胎児性繊維芽細胞を用い、RNase プロテクション法を用いて CTGF mRNA の発現を野生マウスの胎児性繊維芽細胞と比較した。その結果、c-Maf ノックアウトマウスの CTGF mRNA は減少していた。ノックアウトマウス細胞にアデノウイルスを用いて *c-maf* 遺伝子を導入したところ、CTGF mRNA 発現は回復した。また、マウス繊維芽細胞株 C3H10T1/2 に同様に c-Maf 遺伝子を導入すると CTGF の発現量は *c-maf* 遺伝子導入量に比例して増加した。ウェスタンブロッティング法を用い蛋白質を調べた結果でも同様に c-Maf によって CTGF 発現が著しく増加した。この結果、c-Maf は CTGF 遺伝子を活性化することが明らかとなった。

次に、CTGF の発現は TGF- $\beta$  によって活性化されることが知られているが、c-Maf による CTGF 遺伝子の活性化に TGF- $\beta$  が関与するのか、あるいは、TGF- $\beta$  には関与しない独立した機構なのかについて検討した。マウス繊維芽細胞を TGF- $\beta$  で 24 時間刺激し、RNase プロテクション法とウェスタンブロッティング法を用いて CTGF と *c-maf* の mRNA の発現、および

蛋白質の発現を検討した。その結果、TGF- $\beta$ 刺激によって CTGF mRNA、および蛋白質の発現増加が観察されたが、*c-maf* mRNA および蛋白質の発現量は変化が見られなかった。また、*c-Maf* 遺伝子をマウス繊維芽細胞に導入し、TGF- $\beta$  mRNA の発現を検討した結果、TGF- $\beta$  mRNA の発現増加は観察されなかった。これらの結果から、TGF- $\beta$  と *Maf* による CTGF 遺伝子の活性化の機構は独立した機構であることが示唆された。

*c-Maf* には *Lc-Maf* と呼ばれる、選択的スプライシングによって生ずるアイソタイプが存在する。*Lc-Maf* の存在は報告されていたがその塩基配列は不明であったので、この cDNA クローンを単離して *c-Maf* 及び *Lc-Maf* の発現ベクターを構築し、CTGF 遺伝子が *Maf* によって直接転写活性化されているかどうか、および *c-Maf* と *Lc-Maf* に活性の差があるかどうかを検討した。CTGF 染色体遺伝子をクローン化してプロモーター領域やエンハンサーなどの転写調節領域の解析をレポータートランスフェクション分析法によって行った。CTGF 遺伝子上流 3.6kbp から下流 3.8kbp のさまざまな領域をレポーター遺伝子につなぎ、*c-Maf* または *Lc-Maf* の発現ベクターと同時にマウス繊維芽細胞株に導入して転写制御領域の解析を行った。その結果、転写開始点付近でもっとも *Maf* による CTGF 遺伝子の転写活性化が促進され、*Lc-Maf* の方が *c-Maf* よりも 2-3 倍強い活性を示した。

クロマチン免疫沈降法を用いて、*in vivo* で CTGF プロモーターに *c-Maf* が結合しているかどうかを検討した。その結果、*c-Maf* は CTGF プロモーターに結合していることが明らかとなった。

以上の結果から、*Maf* は CTGF を誘導し、その活性化機構は TGF- $\beta$  には関与しない独立した機構であると考えられる。また、CTGF プロモーター領域の *Maf* の反応する領域は CTGF 遺伝子の転写開始点付近と示唆された。

*c-Maf* ノックアウトにおいて軟骨の分化異常が報告されており、特に肥大軟骨細胞の分化に異常が見られる。さらに、これらの異常は CTGF 遺伝子ノックアウトマウスにおける軟骨分化の異常の一部ときわめてよく似ている。この事は *c-Maf* が CTGF 遺伝子の転写制御を介して軟骨の分化に重要な働きをしていることを強く示唆しており、我々の研究結果を強く支持するものである。したがって、この研究はまったく新しい軟骨分化制御機構の解明につながる研究である。さらに、CTGF は多くの疾患とも関連しているが、我々の研究成果から CTGF は癌遺伝子産物である *Maf* によっても調節されることが示唆されたので、上述のような繊維化を伴う疾患を *Maf* によって説明し、そこから新しい治療法や予防法を開発できる可能性がある。さらに CTGF は血管新生を促進することも報告されていることから、癌の血管新生阻害の有効な治療法の開発にも応用できる可能性がある。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 畠 山 鎮 次  
副 査 教 授 笹 原 正 典  
副 査 助 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

## Activation of connective tissue growth factor gene by the c-Maf and Lc-Maf transcription factors

(細胞分化に関する転写因子の役割に関する研究、  
特に Maf の CTGF 誘導に関する研究)

本学位論文は、転写因子 Maf の結合組織増殖因子 (CTGF) 誘導について検討した論文である。その内容は c-Maf の局在はマウス肥大軟骨組織において CTGF と一致している。c-Maf ノックアウトマウスから樹立した胎児性線維芽細胞は野生マウスの胎児性線維芽細胞と比較して CTGF mRNA の発現が低下しており、アデノウイルスを用いて *c-maf* 遺伝子を導入したところ、CTGF mRNA 発現は回復した。マウス線維芽細胞株、C3H10T1/2 に c-Maf 遺伝子を導入すると CTGF の発現量は著明に増加した。CTGF の発現は TGF- $\beta$  によって活性化されることが知られているが、c-Maf による CTGF 遺伝子の活性化は TGF- $\beta$  には関与しない独立した機構である。Maf 発現ベクターを構築し、CTGF 遺伝子が Maf によって直接転写活性化されているかどうか、および c-Maf と Lc-Maf に転写促進活性の差があるかどうかをレポータートランスフェクション分析法によって検討したところ、転写開始点付近でもっとも Maf による CTGF 遺伝子の転写活性化が促進され、Lc-Maf の方が c-Maf よりも 2-3 倍強い活性を示した。クロマチン免疫沈降法の結果から、CTGF プロモーターに c-Maf が *in vivo* で結合していることを示した。これらの結果から、c-Maf が CTGF 遺伝子の転写制御を介して軟骨の分化に重要な働きをしていることを明らかにし、新しい軟骨分化制御機構の一部を解明した。また、繊維化を伴う多くの疾患が Maf によって説明できる可能性を示唆し、そこから新しい治療法や予防法を開発できる可能性も考えられるという内容であった。

質疑に関しては、副査の笹原正典教授から Lc-Maf が筋肉細胞で強く発現している意義についての問いに、不明であるが筋肉細胞の構成に何らかの影響を及ぼしている可能性があるかと回答した。また、ヒトでも発現しているかどうかについての問いには、Lc-Maf についての論文が少ないので不明であるが、おそらく発現しているであろうと回答した。また、CTGF プロモーターには Maf 結合配列、MARE は存在していないが、結合配列がないのに結合しているのはなぜかという問いには、他の転写因子とヘテロダイマーを形成して結合している可能性があるかと回答した。また、Lc-Maf は CTGF 以外にもターゲットがあるかという問いには、軟骨細胞においてコラーゲンを誘導しているという報告があると回答した。副査の田中一馬教授から CTGF プロモーターには MARE に類似した配列はあるの

かという問いには、類似した配列はあり、レポータートランスフェクション分析の実験結果と一致していると回答した。また、Maf はどのように転写活性化制御を行っているのかという問いには、リン酸化によって Maf は活性化する可能性があるかと回答した。Jun や Fos などが結合している可能性あるのかという問いには、ヘテロダイマーを形成することは可能であるが、Jun、Fos、ATF を用いたレポータートランスフェクション分析の実験を行った結果、これらは CTGF 誘導に関与していないと示唆されたと回答した。主査の畠山鎮次教授から、In situ ハイブリダイゼーション法による実験でもっと質の高い実験をすればどのようなものが考えられるかという問いには、多重染色や特異抗体による免疫染色が考えられると回答した。また、ノーザンブロットではなく、RNase プロテクションアッセイ法を用いたのはなぜかという問に対しては、Maf は GC リッチでありノーザンブロット法では検出が難しく、また Lc-Maf と明確に区別するのに適した方法だからであると回答した。また、トランスフェクション分析法において GST-P 遺伝子のプロモーターを用いた理由はなにかとの問いに対しては、プロモーターを持たない領域のエンハンサー活性を調べるためと回答した。また、c-Maf ノックアウトマウスは発生するか、どのような表現型が存在するかの問いには、発生するが出生しないか出生してもすぐに死亡し、目、特に水晶体が形成されず、骨が短くなると回答した。いずれの質問に対しても申請者は最新の学術論文や実験結果を引用して適切に回答した。

この論文は *Biochemical and Biophysical Research Communications* で高く評価され、今後の発展が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。