



Title	テトラスパニンCD9, CD81は単球／マクロファージの融合を抑制する
Author(s)	武田, 吉人
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43925
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	武 田 吉 人
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 6 2 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学 位 論 文 名	テトラスパニン CD9、CD81 は単球/マクロファージの融合を抑制する
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 川瀬 一郎 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 宮坂 昌之

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

テトラスパニンは CD9、CD37、CD63、CD81、CD82 や CD151 等を含む 28 種類のメンバーからなり、細胞膜を 4 回貫通する構造を持つタンパクファミリーである。テトラスパニンは他の膜タンパクやインテグリンと複合体を形成することにより細胞の活性化、増殖、分化、遊走、アポトーシスに関わっている。最近テトラスパニンは精子-卵子の融合、筋芽細胞同士の融合、ウィルス感染細胞の融合を促進していることが報告された。一方多核巨細胞 (Multinucleated Giant Cells、以下 MGC) や破骨細胞は単球やマクロファージが融合して形成されることが知られている。MGC は結核、真菌、ウィルスなどの感染症やサルコイドーシス、クローン病などの肉芽腫性疾患や悪性疾患で見られる肉芽腫に特徴的な病理所見とされる。しかし破骨細胞を除けば MGC の生理的な意義や形成のメカニズムについての詳細は不明である。そこで今回我々は、MGC 形成における単球/マクロファージの融合にテトラスパニンが関与しているか検討した。

【方法ならびに成績】

1. MGC 形成におけるテトラスパニンの発現

末梢血から単離した単球に Concanavalin A (ConA) を加えると、3 日をピークに多核巨細胞が形成される。その際 CD9、CD81、CD63 のタンパクの発現変化を Western blotting により検討した。単球を通常条件下で培養すると CD9、CD81、CD63 の発現亢進がみられた。しかし ConA 投与下では CD9 と CD81 の発現の亢進が抑制された。一方 CD63 の発現は ConA 投与下ではさらなる亢進が観察された。

2. 抗テトラスパニン抗体は単球/マクロファージの融合を促進する

多核巨細胞が形成される時のテトラスパニンの機能を調べるために、ConA を含む融合条件下で抗 CD9、CD81 抗体を加えた。抗 CD9 抗体、抗 CD81 抗体を加えると、コントロールの IgG と比較して融合率は各々 3.5 倍、4 倍に亢進した。また抗 CD9、CD81 抗体は濃度依存性に融合を亢進させた。さらに抗 CD9、CD81 抗体を同時に加えると単球融合の相加効果が観察された。

3. 抗 CD9、CD81 抗体は細胞の凝集には影響を与えない

MGC が形成するまでの凝集の過程で抗テトラスパニン抗体、抗インテグリン抗体が影響するかどうか検討した。

凝集実験では抗 $\beta 2$ インテグリン抗体は単球同士の凝集を抑制したが、抗 $\beta 1$ インテグリン抗体や抗CD9、CD81抗体は凝集に影響を与えなかった。

4. 可溶性 glutathione-S-transferase (GST)-CD9 は単球の融合を抑制する

テトラスパニンの単球融合への関与をさらに確認するために、CD9の2番目の細胞外ドメインとGSTとの融合タンパクを使って検討した。GST-CD9は濃度依存性に単球の融合を抑制したが、GST単独では抑制効果はみられなかった。

5. CD9(-/-)マウス、CD81(-/-)マウス肺胞マクロファージは *in vitro*、*in vivo* で多核巨細胞の形成が増加する

CD9(-/-)マウスとCD81(-/-)マウスを使って、テトラスパニンがMGC形成に関与しているかさらに検討を加えた。CD9(-/-)マウスとCD81(-/-)マウスの肺胞マクロファージは野生型に比べ各々3倍、4倍の多核巨細胞が形成された。次に*in vivo*でもCD9やCD81がMGC形成を抑制するか*P. acnes*で誘導する肺の炎症モデルを使って検討した。*P. acnes*を投与してから7日目に気管支肺胞洗浄で回収した細胞を調べると、野生型に比べCD9(-/-)、CD81(-/-)マウスでは各々6倍、3倍の多核巨細胞が形成された。

6. CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスの肺では自発的に MGC が形成される

CD9、CD81のアミノ酸配列は非常に相溶性が高いので、CD9(+/-)/CD81(+/-)マウスをかけあわせて、CD9(-/-)/CD81(-/-)マウスを作成した。CD9(-/-)/CD81(-/-)マウスの肺胞腔内には無刺激にもかかわらず、マクロファージを主体とした炎症細胞浸潤とエオジン好性の多核巨細胞が観察された。

【総括】

テトラスパニン CD9、CD81 は精子-卵子の融合や筋芽細胞の融合を促進する。一方多核巨細胞 (MGC) は、活性化された単球やマクロファージが融合して形成される。そこでテトラスパニンが MGC 形成に関与するかどうか、単球を Concanavalin A で刺激して検討した。Western blotting により単球が活性化し融合する際に CD9 と CD81 の発現亢進が抑制された。さらに抗 CD9、CD81 抗体は単球の凝集に影響を与えることなく、濃度依存性に MGC 形成を促進した。さらに CD9(-/-)マウスと CD81(-/-)マウスの肺胞マクロファージを *in vitro*、*in vivo* で刺激すると、野生型に比べ MGC の形成が亢進した。さらに CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスの肺胞腔内には無刺激にもかかわらず多くの MGC が観察された。以上よりテトラスパニン CD9、CD81 は受精や筋肉形成とは異なり、単球/マクロファージの融合を抑制していることが確かめられた。

論文審査の結果の要旨

テトラスパニン CD9、CD81 は精子-卵子の融合や筋芽細胞の融合を促進する。一方多核巨細胞 (MGC) は、活性化された単球やマクロファージが融合して形成される。そこでテトラスパニンが MGC 形成に関与するかどうか、単球を Concanavalin A で刺激して検討した。Western blotting により単球が活性化し融合する際に CD9 と CD81 の発現亢進が抑制された。さらに抗 CD9、CD81 抗体は単球の凝集に影響を与えることなく、濃度依存性に MGC 形成を促進した。さらに CD9(-/-)マウスと CD81(-/-)マウスの肺胞マクロファージを *in vitro*、*in vivo* で刺激すると、野生型マウスに比べ MGC の形成が亢進した。さらに CD9(-/-)/CD81(-/-)マウスの肺胞腔内には無刺激にもかかわらず多くの MGC が観察された。以上よりテトラスパニン CD9、CD81 は受精や筋肉形成とは異なり、単球/マクロファージの融合を抑制していることが確かめられた。

本研究により CD9、CD81 は、他の細胞と異なりマクロファージの融合を抑制していることが示された。さらに CD9(-/-)、CD81(-/-)マウスだけでなく CD9(-/-)/CD81(-/-)マウスの重要かつ新たな phenotype が初めて示された。

よって本研究は、博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。