The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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

【56】

氏　　名	武　田　吉　人（たけだ　よしと）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17626　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β2インテグリン抗体は単球同士の凝集を抑制したが、抗β1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は単球の触合を抑制する

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同性が高いので、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。