

Title	Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow derived dendritic cells
Author(s)	山田, 昌秀
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45342
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山田 昌秀
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18461 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Complement C1q regulates LPS-induced cytokine production in bone marrow derived dendritic cells (補体 C1q は LPS 刺激による骨髄由来樹状細胞のサイトカイン産生を制御する)
論文審査委員	(主査) 教授 金倉 譲 (副査) 教授 北村 幸彦 教授 平野 俊夫

論文内容の要旨

(目的)

マクロファージや樹状細胞は、LPSやCpGなどの病原微生物由来物質を認識する Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) を発現する。この TLR からのシグナルは、抗原提示や炎症性サイトカイン産生を誘導し、宿主免疫応答に深く関与する。近年、アディポネクチンや肺胞サーファクタントが LPS 刺激後のサイトカイン産生を抑制すると報告され、これら soluble defense collagen 分子群の宿主免疫調節作用が注目されている。今回私は、soluble defense collagen 分子の一つである補体 C1q の宿主免疫調節作用を明らかにするために、骨髄由来樹状細胞 (BMDC) を用いて、サイトカイン産生と TLR からのシグナルへの C1q の影響を解析した。

(方法ならびに成績)

1) LPS 刺激後のサイトカイン産生に対する C1q の影響

BMDC は、マウス骨髄細胞を GM-CSF 存在下で 6 日間培養し作製した。LPS で刺激した BMDC の培養上清中のサイトカイン濃度は ELISA にて測定した。C1q は IL-12p40 の産生を約 70% 抑制し、TNF- α の産生も抑制する傾向にあった。熱処理した C1q は IL-12p40 の産生を抑制せず、C1q の IL-12p40 産生抑制作用は抗 C1q 抗体により一部阻害された。IL-12p40 遺伝子発現を Northern blot にて解析すると、LPS 刺激後の IL-12p40 mRNA 増加は、C1q 添加により著明に抑制されていた。以上より、BMDC において C1q は LPS 刺激後 IL-12p40 産生を mRNA 転写レベルで抑制することが明らかとなった。

2) LPS 刺激によるシグナル伝達に対する C1q の影響

上記 C1q のサイトカイン産生抑制機構を明らかにするため、LPS 受容体 TLR4、TLR4 の細胞表面発現に必須の MD-2、シグナル伝達に重要な MyD88 に関し、C1q 処理前後の BMDC における遺伝子発現変化を Northern blot にて解析したが、これら 3 つの遺伝子発現は C1q により影響を受けなかった。LPS 刺激後の IL-12p40 遺伝子発現誘導には、NF- κ B や MAPK が重要であることが知られている。まず、IL-12p40 遺伝子プロモーター領域をプローブとした EMSA にて NF- κ B の活性化を解析した。LPS 刺激した BMDC では NF- κ B 結合領域に結合する蛋白 (少な

くとも p65 と c-Rel を含む) が誘導されたが、この結合は C1q 存在下で著明に抑制された。次に、LPS 刺激した BMDC の p38、JNK、ERK の活性化を Western blot にて解析した。LPS 刺激後に認められる p38、JNK、ERK の活性化は C1q 添加により抑制され、特に LPS 刺激早期 (10 分以内) の活性化抑制が著明であった。以上より LPS 刺激後の NF- κ B 活性化や MAPK 早期活性化を抑制することにより、C1q が IL-12p40 産生を抑制する可能性が示唆された。

3) MyD88 依存性および非依存性シグナル伝達経路に対する C1q の影響

MyD88 欠損マウスの解析より、LPS 刺激後の NF- κ B、MAPK の早期活性化に MyD88 が重要であること、C1q が LPS 刺激後の MAPK 早期活性化を抑制したことより、C1q の MyD88 依存性シグナル伝達経路に及ぼす影響を解析した。CpG 刺激後のサイトカイン産生には TLR9 及び MyD88 が必須であるため、この経路に対する C1q の影響を ELISA にて解析した。C1q は CpG 刺激後の IL-12p40 と TNF- α 産生を共に抑制した。MyD88 非依存性シグナル伝達経路に対する C1q の作用は、MyD88 欠損マウス由来の細胞を用いて解析した。C1q は、野生型マウス由来脾細胞が LPS に反応し形成する CFU-B コロニー数を約 20% 減少させたが、MyD88 欠損細胞の CFU-B コロニー形成には影響を及ぼさなかった。また、MyD88 欠損 BMDC では、LPS 刺激により誘導される CD40、CD86 の発現は C1q 添加により影響を受けなかった。以上より、C1q は MyD88 依存性シグナル伝達経路を主に抑制すると考えられた。

4) C1q のサイトカイン産生に及ぼす生体内作用

C1q 欠損マウスおよび野生型マウスに LPS を腹腔内注射し、血中 IL-12p40 と TNF- α を ELISA にて解析した。LPS 注射後の血清 IL-12p40、TNF- α 濃度は、野生型マウスと比較して C1q 欠損マウスで有意に高値であった。以上より、C1q による LPS 刺激後のサイトカイン産生抑制作用は、生体内においても認められることが判明した。

総括

補体 C1q は、TLR からのシグナルの制御に関与しており、BMDC に対して LPS 刺激後のサイトカイン産生を抑制する。

論文審査の結果の要旨

補体 C1q は、構造上 soluble defense collagen family に属し、健常人で約 70 μ g/ml の濃度で存在する血清蛋白である。本研究において申請者は、補体 C1q が骨髄由来樹状細胞に対して、LPS や CpG 刺激後のサイトカイン産生を抑制するという新しい C1q の生理作用を見いだした。さらに、C1q の作用機序として、LPS 受容体である Toll-like receptor 4 からのシグナルのうち MyD88 依存性シグナル伝達経路を抑制することを明らかにした。本研究による知見は、今後感染症や自己免疫疾患の病因や病態解明につながるだけでなく、C1q や soluble defense collagen 分子を中心とした新しい治療戦略確立に寄与すると考えられる。よって本研究は学位に値する。