The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The nuclear lκB protein lκBNS selectively inhibits LPS-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria
Author(s)	廣谷, 友範
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45467
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

【61】

氏　　名	廣　谷　友　範（ひろ たに とも のり）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１９２９４　号
学位授与年月日	平成 17 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	The nuclear IκB protein IκBNS selectively inhibits LPS-induced IL-6 production in macrophages of the colonic lamina propria **（大腸粘膜固有層のマクロファージにおいて、IκBNS は LPS にて誘導される IL-6 の産生を選択的に抑制する）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　川瀬　一郎 （副査） 教　授　平野　俊夫　　教　授　吉崎　和幸

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　　的〕

大腸における炎症の制御にマクロファージは重要な役割をはたしているが、その分子メカニズムの詳細は明らかにはなっていない。IL-10 ノックアウトマウスは Th1 反応優位な慢性腸炎を発症することが知られている。また、マクロファージと好中球に特異的に IL-10 のシグナル伝達分子である Stat3 を欠損させたマウスは、同様の慢性腸炎を発症する。この Stat3 ノックアウトマウスの慢性腸炎は LPS を認識する Toll-1ike-receptor 4（TLR4）をさらに欠損させることにより発症を抑制することができる。以上の現象より野生型のマウスでは IL-10 によって誘導される分子が、LPS のシグナルを抑制していることが推測される。この仮説を証明するため、我々はマウスの大腸粘膜固有層のマクロファージを解析することとした。

〔方法ならびに成績〕

野生型マウスの大腸粘膜固有層から CD11b 陽性細胞を単離した。このマクロファージは IL-10 を恒常的に産生していたが、LPS や CpG 刺激による炎症性サイトカインの産生亢進や共刺激因子の発現誘導は見られなかった。野生型マウスにおいて LPS のシグナル伝達を抑制性に制御する遺伝子の発現の関与が示唆されたため、cDNA Microarray にて検索を行った。発現の増強している遺伝子を RT-PCR にて確認したところ、IκB ファミリータンパクである IκBNS、Bcl-3 や IL-10 により誘導される細胞膜タンパクである Msr2、CD163 等の遺伝子発現を認め、IκBNS について検討することとした。

IκBNS は腹腔マクロファージや RAW264.7 細胞において IL-10 依存的に誘導された。レンチウイルスにより IκBNS を RAW264.7 細胞に過剰発現させ、LPS 刺激による TNFα、IL-6 等の炎症性サイトカインの産生について検討した。ELISA では IκBNS 発現細胞で IL-6 の産生が特異的に減少していた。同様に Northern blot でも IL-6 の発現は特異的に低下していた。

IκBNS が、どの段階で LPS のシグナル伝達を抑制しているかを明らかにするため、IκBα の推移と p38 や ERK1/2 の活性化を Western blot にて検討したが、IκBNS 発現細胞において変化は見られなかった。次に IL-6 プロモータ

一のNF-kB結合領域とNF-kBの結合能をGel shift assayにて検討したところIκBNS発現細胞ではLPS刺激前から転写活性化能のないp50/p50のホモダイマーがIL-6プロモーターに結合しておりp50との関係が示唆された。そこでIκBNSとp50、p65との結合を免疫沈降にて確認したところ、IκBNSはp65とは会合せず、p50との会合を認めた。

さらに、どのようにIκBNSがIL-6を特異的に抑制するか明らかにするため、Reporter gene assayを行った。LPS刺激でTNFαとIL-6プロモーターの活性は増強し、IL-6プロモーターの活性はIκBNSの濃度依存的に低下した。Chromatin immunoprecipitation assayでもIκBNS発現細胞ではIκBNSとp50はLPSによる刺激にかかわらずIL-6プロモーターと会合していた。

次にRAW264.7細胞を用いてsiRNAによるIκBNSの発現抑制下において、LPS刺激による炎症性サイトカインの産生について検討した。Northern blotではIL-6の誘導は亢進し、ELISAでもIL-6の産生は増加した。Reporter gene assayによりIκBNSによるIL-6、TNFαプロモーターの活性を検討したところ、IL-6プロモーターの活性は上昇した。

〔総　　括〕

1．大腸粘膜固有層のマクロファージは、恒常的にIL-10を産生するが、LPS刺激による炎症性サイトカインの産生の増加は見られなかった。

2．大腸粘膜固有層のマクロファージは、IL-10依存的に誘導されるIκBNSを発現していた。

3．IκBNSは、p50/p50のホモダイマーと結合し、IL-6プロモーターの活性を抑制することで、LPS誘導性のIL-6の産生を特異的に抑制すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

マウスにおいて、IL-10欠損マウスとIL-10のシグナル分子であるSTAT3をマクロファージに特異的に欠損させたSTAT3変異マウスは、慢性腸炎を自然発症する。人のクローン病において、マクロファージの産生する炎症性サイトカインであるTNF-αやIL-6の作用を遮断する治療が行われ、よい効果を得ている。このように大腸粘膜のマクロファージは慢性腸炎の発症に重要であるが、これまで充分な機能解析がなされていなかった。本論文では、大腸粘膜固有層のマクロファージの単離法を確立し、その機能を解析した。野生型マウスの大腸粘膜固有層のマクロファージはIL-10を恒常的に産生し、グラム陰性菌の構成成分であるLPSの刺激に対し、炎症性サイトカインを全く産生しなかった。しかし、IL-10欠損マウスとSTAT3変異マウスのマクロファージはLPSの刺激に対し、炎症性サイトカインの産生が亢進し、腸炎発症との関連が明らかとなった。さらに野生型マウスの大腸で炎症性サイトカインを産生しないメカニズムの一端をになうIκBNSという分子を同定し、この分子がLPS刺激に対しIL-6の産生を特異的に抑制することを明らかとした。このことは、大腸には常在菌が存在するがこの細菌による腸炎を発症しないというメカニズムの解明に貢献し、さらにはクローン病の病因解明にも役立つと考えられる。

以上より、本論文は学位に値するものと認める。