

Title	The nuclear κ B protein κ BNS 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、 〈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	ひろ たに ともしのり 廣 谷 友 範
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 9 2 9 4 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 I κ B protein I κ BNS 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、I κ BNS 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-like-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的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、I κ B ファミリータンパクである I κ BNS、Bel-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、I κ BNS について検討することとした。

I κ BNS 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 I κ BNS を RAW264.7 細胞に過剰発現させ、LPS 刺激による TNF α 、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 I κ BNS 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。

I κ BNS 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、I κ B α の推移と p38 や ERK1/2 の活性化を Western blot にて検討したが、I κ BNS 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- κ B 結合領域と NF- κ B の結合能を Gel shift assay にて検討したところ I κ BNS 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 I κ BNS と p50、p65 との結合を免疫沈降にて確認したところ、I κ BNS 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 I κ BNS 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 TNF α 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 I κ BNS の濃度依存的に低下した。Chromatin immunoprecipitation assay でも I κ BNS 発現細胞では I κ BNS 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 I κ BNS 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 I κ BNS による IL-6、TNF α 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 I κ BNS を発現していた。
3. I κ BNS 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、これまで十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 I κ BNS 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。