

Title	Tetraspanin CD9 Negatively Regulates Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Activation and Lung Inflammation
Author(s)	鈴木, 真優美
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/54097">https://hdl.handle.net/11094/54097</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	鈴木 真優美
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 23432 号
学位授与年月日	平成21年11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	Tetraspanin CD9 Negatively Regulates Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Activation and Lung Inflammation (テトラスパニンCD9はLPSによるマクロファージ活性化と肺の炎症に対し負の調節をする)
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 青笹 克之 教授 奥村明之進

## 論文内容の要旨

## [ 目的 ]

肺の炎症、すなわちマクロファージなどの炎症細胞の浸潤と、サイトカインやプロテアーゼなどの炎症性メディエーターの産生が、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) など、多くの炎症性肺疾患において重要である。

グラム陰性菌の細胞壁成分である LPS は、強い肺の炎症惹起物質であり、CD14 の発現を増強し、CD14 と TLR4 を脂質に富むラフトと呼ばれる膜マイクロ領域に集めてレセプター複合体を形成させ、NF $\kappa$ B 経路などを介してマクロファージを活性化し、TNF- $\alpha$ などの炎症性メディエーターを産生させる。急性肺障害を引き起こすことで知られるが、COPD などにも関与する。よって LPS による炎症の調節因子の究明は、COPD などの炎症性肺疾患の病態解明に有用である。

一方、膜タンパクであるテトラスパニンは、インテグリンなどと会合し細胞運動などを調節していることが知られているが、テトラスパニン CD9 と CD81 のダブルノックアウト (KO) マウスの肺を解析すると、COPD 肺のように、気腫性変化を認め、肺泡マクロファージと MMP 活性が増加していることが明らかになった。CD9 あるいは CD81KO マウスにおいても顕著ではないが気腫化の傾向を認め、両者が炎症を抑制していると考えられるがメカニズムは明らかでない。最近では CD9 とラフトとの会合の可能性が示唆されており、LPS によるマクロファージの活性化および肺の炎症における CD9 の関与について検討した。

## [ 方法ならびに成績 ]

*in vitro* では、マクロファージの培養株である RAW264.7、マウス骨髄由来マクロファージ(BMDM)あるいは肺泡マクロファージを採取し LPS で刺激した。*in vivo* では、LPS を経鼻投与後のマウス肺胞洗浄

液 (BALF) を解析した。膜分子の発現はウエスタンブロット法、分子間の会合は免疫沈降法、細胞膜上の分布はシヨ糖密度勾配法を用いて解析した。マクロファージ活性化の指標として、形態、TNF- $\alpha$  産生、MMP の発現と活性を用いた。MMP 活性は Gelatin Zymography、MMP 発現量は Reverse Transcriptase-PCR 法、TNF- $\alpha$  は ELISA 法を用いて解析した。

LPS の刺激による RAW264.7 と BMDM の活性化に伴い、CD9 の発現は一過性に低下したことから、LPS によるマクロファージ活性化への CD9 の関与が示唆された。

抗体あるいは siRNA 処理により CD9 の機能をブロックした状態の RAW264.7 や、CD9KO マウスの BMDM あるいは肺胞マクロファージを LPS で刺激すると、TNF- $\alpha$  の産生、MMP の発現および活性が増強していたことから、CD9 は LPS によるマクロファージ活性化に対し抑制的に寄与していることが示唆された。

CD9KO マウス BMDM では、LPS 刺激後の CD14 発現が増強し、CD14 と TLR4 の会合が増加していたことから、CD9 は CD14 に作用して CD14/TLR4 複合体形成を抑制している可能性が示唆された。

BMDM での膜上の分布を検討すると、CD9KO マウスでは CD14 および TLR4 が LPS による刺激前後でラフト領域に多く存在し、CD14/TLR4 の下流シグナルである NF $\kappa$ B の活性化を表す I $\kappa$ B $\alpha$  分解促進が増加していた。ラフト領域の CD9 は LPS の刺激により増加し、同領域において CD9 と CD14 の会合を認めた。ラフト形成を抑制すると、CD9KO マウスでの LPS 刺激による TNF- $\alpha$  産生増強は消失した。以上より、CD9 はラフトにおいて CD14 に作用し、LPS 刺激による CD14/TLR4 複合体形成とそれに続く NF $\kappa$ B を介するシグナルを抑制している可能性が示唆された。

LPS の経鼻投与により CD9 KO マウスでは、BALF 中のマクロファージ、TNF- $\alpha$  は増加し、マクロファージの強い形態変化、MMP 活性増加を認めた。in vivo においても CD9 が LPS によるマクロファージ活性化と肺の炎症に抑制的に働いていることが確認された。

[ 総括 ]

LPS による肺の炎症は CD9 の機能が損なわれると増強した。そのメカニズムの一つとして、CD9 がラフトにおいて、CD14 依存的にレセプター複合体形成に対し抑制的に働くことにより、マクロファージの活性化に対し負の調節をしていることが示唆された。

CD9 機能不全が COPD などの炎症性肺疾患の一因である可能性がある。

#### 論文審査の結果の要旨

肺の炎症を惹起する LPS は、CD14 と TLR4 などによる複合体を形成させてマクロファージを活性化し、TNF $\alpha$  や MMP を産生させる。病態の詳細が明らかでない慢性閉塞性肺疾患 (COPD) などに関与することが知られている。

テトラスパニン CD9 のノックアウト (KO) マウスのマクロファージを LPS で刺激すると、ワイルドタイプに比べ TNF $\alpha$  産生と MMP 活性が増強し、CD14/TLR4 複合体形成が亢進していた。さらに CD9KO マウスに LPS を投与すると、肺のマクロファージ浸潤、すなわち肺の炎症と、TNF $\alpha$  産生および MMP 活性が亢進した。したがって CD9 は LPS によるマクロファージ活性化と肺の炎症に対し、CD14/TLR4 複合体形成を抑制することにより、負の調節をすると考えられた。

CD9 の機能不全が COPD などの一因である可能性が示唆され、その病態解明と治療に寄与するものであり学位に値すると考える。