

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590897
 研究課題名 (和文) テトラスパニンノックアウトマウスを用いた肺炎症メカニズムの解析
 研究課題名 (英文) Mechanisms of lung inflammation in tetraspanin-knockout mice
 研究代表者
 立花 功 (TACHIBANA ISAO)
 大阪大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：60324761

研究成果の概要 (和文)：われわれは以前に、テトラスパニン CD9 と CD81 とのダブルノックアウトマウスが、肺の炎症性疾患であるヒト COPD 様の病態を示すことを報告した。今回、CD9 が *in vitro* で LPS による肺胞マクロファージの活性化を負に調節し、*in vivo* で LPS による肺での炎症を抑制することを見出した。COPD 患者の末梢血単球において、CD9 発現は減少していた。CD9 の低下が COPD 発症の一因であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：We previously reported that mice doubly deficient in tetraspanins CD9 and CD81 reveal a phenotype mimicking human COPD, an inflammatory lung disease. In this study, we found that CD9 negatively regulates LPS-induced macrophage activation *in vitro* and prevents lung inflammation *in vivo*. Expression of CD9 was decreased in peripheral blood monocytes in patients with COPD. These indicate that CD9 decrease may be a pathogenetic factor to COPD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

慢性閉塞性肺疾患 (COPD) のメカニズム解明や治療法の開発は最重要課題である。その病態生理は肺でのマクロファージを主体とする炎症細胞浸潤と炎症性メディエータの放出である。しかし、肺での基本病態生理である炎症細胞浸潤のメカニズムは未だよく解明されていない。

2. 研究の目的

われわれは、膜タンパクであるテトラスパニ

ン CD9 と CD81 のダブルノックアウト (KO) マウスが肺に炎症を自然発症することを見出した。本研究では、
 (1) KO マウスを用いて肺に炎症の起こるメカニズムを明らかにする。

(2) ヒト肺の炎症に CD9 や CD81 の異常が関与していないかを検討する。

を目的とする。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ培養株 RAW264.7 細胞や、ワイルドタイプ (WT) マウスおよび CD9 KO マウスから分離したマクロファージを用いて、LPS 刺激時の炎症性メディエータ産生を調べた。

(2) WT マウスおよび CD9 KO マウスを LPS で経鼻刺激し、肺での炎症を評価した。

(3) ヒト COPD 患者の末梢血単球を分離し、CD9 の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) LPS 刺激時のマクロファージ培養株 RAW264.7 におけるテトラスパニン CD9 の発現をイムノブロッティングで検討した。CD9 は RAW264.7 で発現しており、LPS 刺激による形態学的な細胞の活性化に一致してやや発現が減弱した (図 1)。

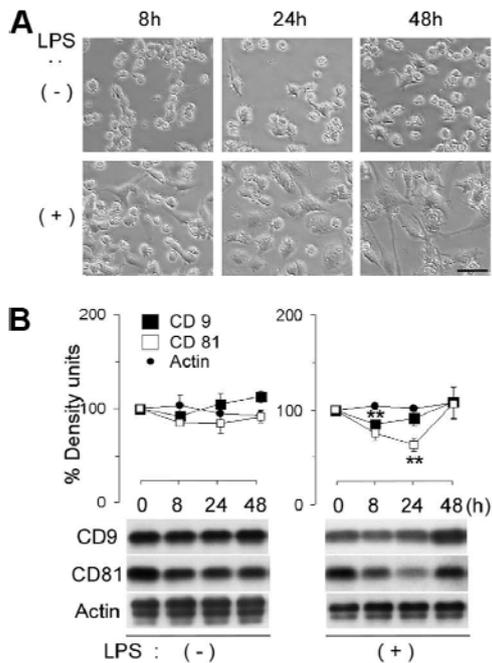


図 1 LPS 存在、非存在下でのマクロファージ CD9、CD81 の発現

(A) RAW264.7 マクロファージ培養株を 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 存在 (+)、非存在下 (-) で培養した。LPS 存在下では、時間経過とともに spread した細胞が観察された。(B) CD9、CD81 の発現をイムノブロッティング (下パネル) で調べ、デンストメトリー (上パネル) で解析した。LPS 存在下では細胞の spreading を起こすのに一致して CD9、CD81 の発現低下を認めた。★, $p < 0.05$ vs 0 h; ★★, $p < 0.01$ vs 0 h。

(2) RAW264.7 細胞を LPS で刺激時、抗体や siRNA で CD9 の機能を抑制すると、炎症性

サイトカイン TNF- α とプロテアーゼ matrix metalloproteinase (MMP)-9 の産生が亢進することが分かった (図 2)。

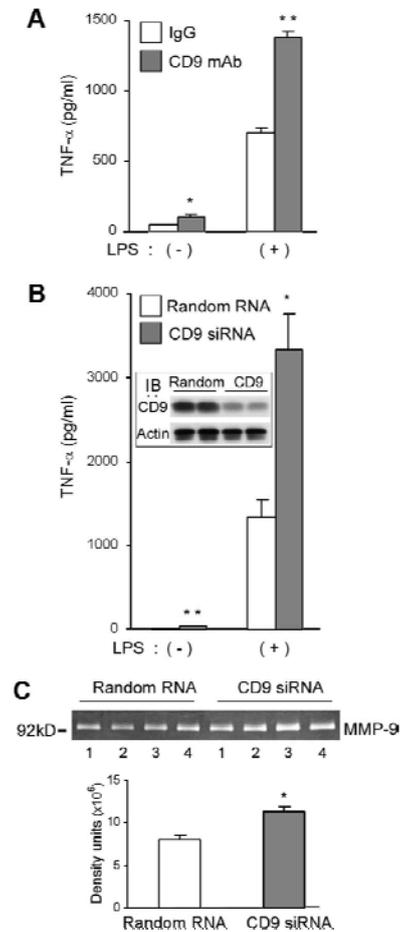


図 2 CD9 に対する抗体あるいは siRNA 処理したマクロファージは TNF- α 、MMP-9 を過剰産生する。

(A) RAW264.7 細胞を抗 CD9 抗体 (CD9 mAb) またはコントロール抗体 (IgG) 処理し、LPS 存在 (+)、非存在下 (-) で培養した。培養上清中の TNF- α を ELISA で測定した。(B) RAW264.7 細胞を CD9 siRNA または random RNA でトランスフェクションし、CD9 タンパクの減少をイムノブロッティングで確認した (差込み図)。LPS 存在 (+)、非存在下 (-) で培養し、培養上清中の TNF- α を ELISA で測定した。(C) RAW264.7 細胞を CD9 siRNA または random RNA でトランスフェクションし、LPS 存在 (+)、非存在下 (-) で培養した。トランスフェクションは 4 回 (1-4) 別々に行った。培養上清中の MMP-9 活性をゼラチンザイモグラフィで測定し (上パネル)、デンストメトリーで定量化した (下パネル)。★, $p < 0.05$ vs コントロール; ★★, $p < 0.01$ vs コントロール。

(3) CD9 KO マウスから分離したマクロファージを LPS で刺激した場合も TNF- α と MMP-9、MMP-2 の産生亢進を認めた (図 3)。

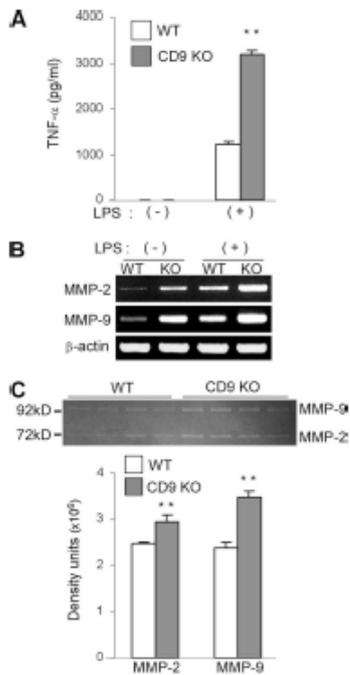


図 3 CD9 KO マクロファージは TNF- α 、MMP を過剰産生する。

(A) WT と CD9 KO マウスの骨髄由来マクロファージを、LPS 存在 (+)、非存在下 (-) で培養し、培養上清中の TNF- α を ELISA で測定した。(B) マクロファージから RNA を抽出後 RT-PCR により MMP-2、MMP-9 の発現を調べた。 β -actin はコントロール。(C) LPS 刺激後の培養上清中の MMP 活性をゼラチンゼイモグラフィ (quadruplicate) で測定し (上パネル)、デンスitomетリーで定量化した (下パネル)。★★, $p < 0.01$ vs WT。

(4) LPS 受容体である CD14/Toll-like receptor 4 (TLR4) の発現をウェスタンブロットで検討したところ、CD9 KO マクロファージでは WT マクロファージに比べ、LPS 刺激後の CD14 の発現増強が見られた。またシヨ糖密度勾配遠心後のブロットの解析で CD14 と TLR4 のラフト様脂質膜マイクロ領域への分布と複合体形成が増強していた。一方 I κ B の消失は早まっており、NF κ B を介した炎症反応が亢進していることが示唆された (図 4)。

図 4 CD9 KO マクロファージでは CD14 発現、CD14 と TLR4 との複合体形成、CD14 と TLR4 の脂質ラフトへの分布が増強する。

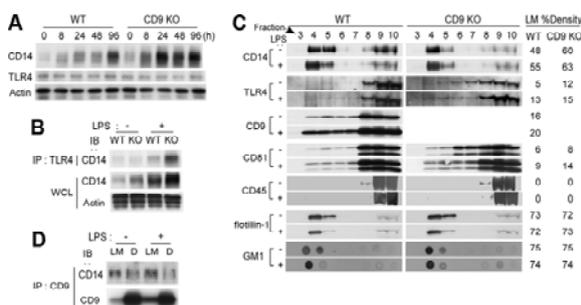
(A) マウスから骨髄由来マクロファージを分離し、LPS で刺激した。TLR4 の発現に差は認められなかったが、CD9 KO マクロファージでは CD14 の発現が WT マクロファージに比べて増強していた。(B) LPS 負荷後には、CD14 と TLR4 との複合体形成も亢進していることが、免疫沈降 (IP) と immunoblotting (IB) により示された。(C) CD9 KO マクロファージでは、LPS 刺激前から CD14 と TLR4 の分布が膜マイクロ領域である脂質ラフトに相当する light membrane (LM) fractions (fraction 4-5) にシフトしており、% Density を見ると LPS 刺激後も WT マクロファージに比べて脂質ラフトへの分布が増強している。(D) WT マクロファージで見ると、CD9 は dense (D) fractions (fractions 9-10) よりもむしろ LM fractions で CD14 と会合している。

以上の結果より、CD9 は *in vitro* で LPS 刺激によるマクロファージの炎症反応を負に調節していることが分かった。

(5) CD9 が *in vivo* においても LPS によるマクロファージの活性化を制御するかどうか、WT マウスと CD9 KO マウスに LPS を経鼻投与して検討した。LPS 投与 4 日後の肺の形態に組織学的な差は見られなかったが、KO マウスでは気管支肺胞洗浄液中の細胞数、特にマクロファージの増加を認めた (図 5)。

(6) 肺から分離したマクロファージを培養すると、CD9 KO マウスでは活性化して spread したマクロファージを多く観察された。

(7) CD9 KO マウスでは、肺胞洗浄液中の TNF- α と MMP-2、-9 活性の上昇も認めた。網羅的解析の結果、KO 肺では TNF- α だけではなく、(有意差は検出されなかったが) MIP-1 α 、G-CSF、IL-6、IL-12 など他のマクロファージサイトカインの上昇傾向を認めた。



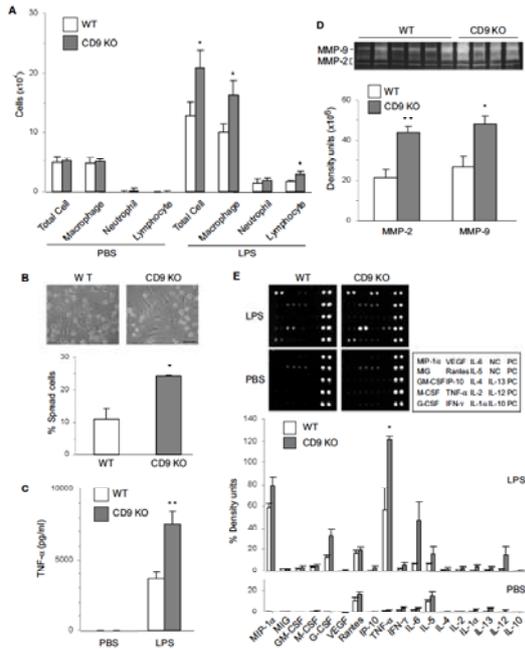


図5 LPS 負荷により、CD9 KO マウスは WT マウスに比べて肺の強い炎症を起こす。

(A) PBS の経鼻投与では差がなかったが、LPS を投与すると CD9 KO マウスでは肺の炎症細胞数が WT マウスに比べ増加しており、その大部分はマクロファージであった。(B) 回収した肺胞マクロファージを *in vitro* で培養すると、CD9 KO マウスでは形態的に活性化したマクロファージ (spread cells) が多かった。(C) LPS 投与後の気管支肺胞洗浄液中の TNF- α 濃度は WT に比べて 2 倍に上昇していた。(D) LPS 投与後、それぞれのマウスの洗浄液中の MMP-2、MMP-9 活性をゼラチンザイモグラフィ (上パネル) で測定し、デンストメトリー (下パネル) で定量すると、CD9 KO マウスでの活性上昇を認めた。(E) さらにサイトカイン抗体アレイにて複数のサイトカインの発現を検討し (上パネル)、デンストメトリー (下パネル) で定量したところ、(C) の結果に一致して LPS 負荷後の TNF- α 上昇があった他、有意差はみられなかったものの MIP-1 α 、G-CSF、IL-6、IL-12 などマクロファージサイトカインが WT に比べて増加傾向にあった。★, $p < 0.05$ vs WT; ★★, $p < 0.01$ vs WT。

これらの結果から、CD9 は *in vivo* においても肺胞マクロファージの活性化に対して負の調節をしていることが示された。

(8) ヒト COPD 患者から末梢血単球を分離し、CD9 の発現をフローサイトメトリで検討したところ、他の呼吸器疾患患者に比べ発現低

下していた (図6)。

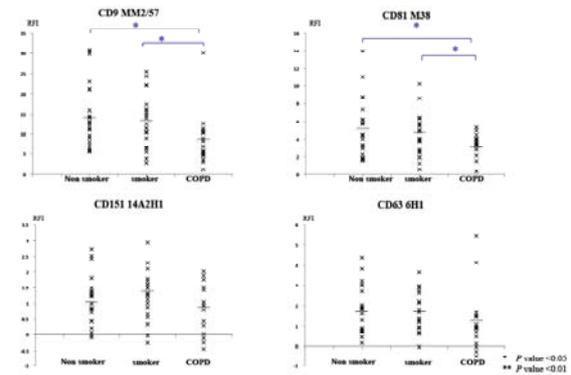


図6 末梢血単球におけるテトラスパニンの発現
COPD 患者では非喫煙者、非 COPD 喫煙者と比べ、末梢血単球 CD9、CD81 発現が有意に低下していた。一方、他のテトラスパニンである CD151、CD63 には差を認めなかった。

以上から、CD9 はマクロファージの活性化と肺の炎症を抑制しており、その低下はヒト COPD 発症の一因である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Suzuki M, Tachibana I, Takeda Y et al. Tetraspanin CD9 negatively regulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation and lung inflammation. *J Immunol* 182:6485-6493, 2009. 査読有

2. 武田吉人 COPD モデルとしてのテトラスパニン CD9/CD81 ダブルノックアウトマウスの解析. *International Review of Asthma & COPD* 11:31-36, 2009. 査読無

3. 立花 功 分子オーガナイザ CD9 と CD81 ダブルノックアウトマウスにおける肺気腫と骨量減少. *呼吸* 29:194-210, 2010. 査読無

4. 立花 功、鈴木真優美、武田吉人他 マクロファージの活性化における CD9 (tetraspanin) の役割. *臨床免疫・アレルギー科* 53:214-220, 2010. 査読無

5. 武田吉人、鈴木真優美、立花 功. COPD におけるテトラスパニンの役割. *The Lung perspective* 18:291-298, 2010. 査読無

[学会発表] (計 2 件)

1. 立花 功 肺の炎症と気腫化におけるテトラスパニン CD9/CD81 の役割. 第 82 回日本生化学会 2009 年 10 月 21 日 神戸

2. 立花 功 肺がんと肺の炎症における分子オーガナイザ CD9 と CD81 の役割. 第 32 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 12 日 横浜

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/im-ed3/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立花 功 (TACHIBANA ISAO)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号：60324761

(2) 研究分担者

武田 吉人 (TAKEDA YOSHITO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：40452388

(3) 連携研究者

()

研究者番号：