

氏名	かわかみ ともや 川上 智也
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博薬第35号
学位授与の日付	令和2年3月7日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	重炭酸イオンがマクロファージの炎症応答に及ぼす 影響に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 藤本 陽子 (副査) 教授 林 哲也 (副査) 教授 藤森 功

論文内容の要旨

マクロファージは、様々な臓器・組織に広く分布し、病原体などから我々高等生物の身体を守る細胞として、サイトカインの分泌や病原体の排除、抗原提示などの多くの機能を持つ。また、マクロファージは、刺激の種類により、異なる機能を発揮するポピュレーションへと分極する。中でも M1 マクロファージは、T 細胞やナチュラルキラー細胞が分泌するサイトカインである interferon (IFN) γ やグラム陰性菌の外膜成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) などによって分化誘導され、interleukin (IL) 1β や IL-6、tumor necrosis factor (TNF) α などの炎症性サイトカイン、活性酸素や一酸化窒素 (nitric oxide: NO) などの細胞に障害を与える物質を産生し、細菌やウイルスなどに対する感染防御や炎症反応に関わる。その一方で、持続的な炎症によって組織の障害や慢性疾患の発症や進展にも関与することが知られている。そのため、M1 マクロファージの機能を調節・制御することは、恒常性の維持において重要である。しかしながら、細胞を取り巻く環境 (アミノ酸やイオンの量、pH など) が異なると、マクロファージの増殖や代謝などの生理的な機能が変化することが知られており、これらの変化は、マクロファージの炎症応答にも影響を与えている可能性がある。本研究は、慢性疾患などによる組織環境の変化が、マクロファージ

の機能に影響を与えていると考え、M1 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子を探索し、その影響を解析することを目的とした。

まず、細胞を培養する際に用いる培地の違いにより、マクロファージの応答性が変わるという知見から、M1 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子を培地から探索した。その結果、重炭酸ナトリウムがマクロファージの炎症応答に関わる NO や TNF- α の産生量を上昇させることが分かった。また、重炭酸ナトリウムの代わりに重炭酸カリウムを用いても、同様にマクロファージの NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量が上昇したことから、重炭酸イオンがマクロファージの炎症応答を促進する因子であることを明らかにした。

次に、重炭酸イオンによるマクロファージの炎症関連遺伝子の発現に対する影響、さらにその調節機構を調べた。LPS と IFN- γ を含む培地で培養したマウスマクロファージ RAW264.7 細胞を用いて、重炭酸イオンの影響を調べたところ、炎症関連遺伝子である IL-6 や誘導型 NO 合成酵素、シクロオキシゲナーゼ-2 の遺伝子発現レベルが、重炭酸イオン濃度の上昇に依存して増加し、IL-6 や NO、プロスタグランジン

(prostaglandin: PG) E2 の産生量も増加した。また、重炭酸イオン濃度を上昇させると、細胞外と細胞内の pH はいずれも上昇した。そこで、重炭酸イオンによる M1 マクロファージの調節機構を調べたところ、炎症関連遺伝子の発現に関与する signal transducers and activator of transcription (STAT) 1 の活性化が、重炭酸イオン濃度の上昇により増強されることが分かった。細胞内への重炭酸イオンの取り込みに関わるトランスポーターである、solute carrier family 4 member 7 (SLC4A7) を阻害すると、重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現レベル、細胞内の pH の上昇、さらに STAT1 の活性化の増強はいずれも抑制された。これらの結果から、RAW264.7 細胞の炎症関連遺伝子の発現には、SLC4A7 を介して重炭酸イオンが細胞内に取り込まれることにより STAT1 が活性化され、炎症関連遺伝子の発現が上昇することが示された。また、マウスの骨髄細胞から分化させたマクロファージ (bone marrow-derived macrophages: BMDMs) においても、重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現の上昇、STAT1 の活性化の増強が見られたことから、生体内のマクロファージに対しても同様に見られる現象であることが示唆された。

重炭酸イオンは、血液や組織内外の pH を調節する重要な因子であるが、様々な疾患や薬物治療、生活習慣によって濃度が変動することが知られている。本研究では、M1 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子として重炭酸イオンを見出し、細胞内への重炭酸イオンの取り込みが STAT1 の活性化を増強し、炎症応答に関わる IL-6

や NO、PGE2 の産生を促進させることを明らかにした。

本研究から、生体内における重炭酸イオンによってマクロファージの炎症応答が調節されていることを示すとともに、マクロファージの炎症応答が SLC4A7 を介した細胞内への重炭酸イオンの取り込みによって促進されるという新たな知見を得た。マクロファージの生体内における機能調節については不明な点が多いが、本研究の成果は、炎症性疾患の病態進展の解明に貢献できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

マクロファージは、生体内の様々な臓器や組織に分布しており、サイトカインの分泌や抗原提示による病原体の排除などの多様な機能により我々の身体を守っている。マクロファージは、それ自体が受ける刺激の種類によって異なる機能を有するポピュレーションへと分極する。炎症型の M1 マクロファージは、interferon (IFN) - γ やグラム陰性菌の外膜成分であるリポ多糖 (lipopolysaccharide: LPS) などによって分化誘導され、interleukin (IL) - 1β 、IL-6 や tumor necrosis factor (TNF) - α などの炎症性サイトカインや一酸化窒素 (nitric oxide: NO) などを産生し、病原体に対する感染防御や炎症反応に関わる。一方で、持続的な炎症において、組織の障害、慢性疾患の発症や進展に関与することが知られている。そのため、M1 マクロファージの機能を調節することは、生体の恒常性の維持において重要とされる。細胞を取り巻く環境 (温度、イオンの種類、濃度や pH など) が異なると、細胞の増殖や代謝などの生理的な機能に変化することが知られている。しかしながら、このような細胞を取り巻く環境の変化がマクロファージの炎症応答に及ぼす影響はほとんど分かっていなかった。

本学位論文は、マクロファージを取り巻く環境の変化による炎症応答への影響とその分子機構の解明を目的に、マクロファージの機能調節に関わる因子を探索し、その調節機構を解析したものである。本論文は、二章から構成され、その概要は以下の通りである。

第一章では、マウスマクロファージ J774.1/JA-4 細胞を用いて、IFN- γ と LPS で処理することにより M1 マクロファージへと分化誘導し、炎症応答に影響を与える因子を探索して解析を行った。その結果、重炭酸ナトリウムが、マクロファージの炎症応答に関わる NO、TNF- α や IL- 1β の産生量を上昇させることを明らかにした。

第二章では、重炭酸ナトリウムによるマクロファージの炎症応答とその調節機構について解析を行った。マウスマクロファージ RAW264.7 細胞を LPS と IFN- γ で処理して M1 マクロファージに分化誘導し、重炭酸イオン存在下における炎症関連遺伝子である IL-6、誘導型 NO 合成酵素(iNOS)やシクロオキシゲナーゼ-2 の遺伝子発現レベルの変化を調べた。その結果、重炭酸イオンの濃度上昇に依存して、いずれの遺伝子の発現も上昇し、それらの産物である IL-6、NO やプロスタグランジン (prostaglandin: PG) E2 の産生量も増加することを見出した。また、重炭酸イオンの濃度を上昇させると、マクロファージの細胞外と細胞内のいずれの pH も上昇した。そこで、重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現上昇には、細胞内に重炭酸イオンが取り込まれることが必要かを調べた。マクロファージでは、重炭酸イオンは solute

carrier family (SLC) 4A あるいは SLC26A を介して取り込まれることが知られている。RAW264.7 細胞における SLC4A と 26A ファミリーの発現解析と SLC 阻害剤を用いた検討から、SLC4A7 トランスポーターが重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現や細胞内の pH の上昇に関わることを示した。

次に、マクロファージにおける重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現上昇機構を調べたところ、重炭酸イオンの濃度上昇により、signal transducers and activator of transcription (STAT) 1 の活性化（リン酸化）が増強され、さらに、STAT1 のリン酸化酵素の阻害剤および SLC4A7 阻害剤は、重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現上昇を抑制した。以上の結果から、マクロファージにおける重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現上昇は、重炭酸イオンが SLC4A7 を介して細胞内へ取り込まれ、STAT1 シグナル伝達経路が活性化されることによるものと結論付けた。

さらに、マウスの骨髄から単離し分化させた骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages: BMDMs) を用いた解析から、重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現上昇、STAT1 の活性化の増強など、マクロファージ細胞株を用いた実験から得られた結果と同様の結果が得られた。この結果は、生体内のマクロファージにおいても同様の現象が見られることを示すものである。

重炭酸イオンは、血液や組織内外の pH の調節に関わっているが、様々な疾患、薬物治療や生活習慣によってその濃度が変動することが知られている。本学位論文では、重炭酸イオンがマクロファージの炎症応答を増強するという新たな知見を得た。さらに、重炭酸イオンが SLC4A7 トランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、STAT1 シグナル伝達経路を活性化することにより炎症性メディエーターの産生を促進し、炎症応答を増強する調節機構を明らかにした。マクロファージの炎症応答の調節については不明な点が多いが、本研究の成果は、重炭酸イオンがマクロファージの炎症応答を増強することを示すものであり、炎症性疾患の病態の解明の進展に貢献することが期待できる。

以上により、上記の論文は、博士(薬学)論文として適当と判断する。