

博士論文

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

2019 年度

大阪薬科大学大学院薬学研究科

川上 智也

目次

序論	1
第一章 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子の探索	4
1.1. 背景	4
1.2. 実験材料および実験方法	5
1.3. 結果と考察	10
1.4. まとめ	29
第二章 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とその調節機構の解析	31
2.1. 背景	31
2.2. 実験材料および実験方法	32
2.3. 結果と考察	38
2.4. まとめ	49
結論	52
論文目録	56
謝辞	57
参考文献	58

序論

マクロファージは、免疫系細胞の一種であり、ほぼすべての臓器や組織に分布している。マクロファージは、19世紀にロシアの研究者である Elie Metchnikoff により発見されて以来、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などの異物の貪食、抗原提示などの多くの機能を持つことが明らかにされてきた¹。組織に分布するマクロファージ（組織常在型マクロファージ）は、貪食能を有するという共通点を持つものの、起源や機能、形態が異なることから、存在する組織によってそれぞれ固有の名称で呼ばれている^{2,3}。例えば、肝臓のクッパー細胞や脳のマクログリア、骨の破骨細胞、表皮のランゲルハンス細胞などが挙げられる。これらのマクロファージは、それぞれの組織に常在し、免疫応答や組織修復などの組織環境の維持などに関わると考えられている³。一方、骨髄の造血幹細胞由来の単球は、様々な刺激に応じて血管中から組織に遊走してマクロファージに分化し、特異的な機能を持つポピュレーションへと分極する⁴⁵。この分極化は、M1型（classical activation）とM2型（alternative activation）の2つの型に大別され、感染防御や炎症の応答、収束などに関わっている⁶。M1マクロファージは、T細胞やナチュラルキラー細胞などの免疫系細胞が分泌するサイトカインであるインターフェロン（interferon: IFN） γ やグラム陰性菌の外膜の構成成分であるリポ多糖（lipopolysaccharide: LPS）などにより分化誘導され、炎症性サイトカインや活性酸素種の産生によって細菌やウイルスなどの病原体に対する感染防御や炎症応答などの役割を担う⁷⁻⁹。しかしながら、M1マクロファージへの分極化が長期に続くと、炎症に伴う組織の線維化や障害が引き起こされることがある¹⁰。M1マクロファージの炎症反応を収束、回避するために、2型ヘルパーT細胞が分泌するインターロイキン（interleukin: IL）-4やIL-13などのサイトカインにより、抗炎症や組織修復機能を持つM2マクロファージが分化誘導される^{11,12}。よって、M1マクロファージとM2マクロファージの分極のバランスは、局所の組織における炎症反応や病態の進展に重要であると考えられている¹³。

生体内の環境は、外部環境の変化や多種多様な食物の摂取などの影響を受けるにも関わらず、体温や血糖値、血圧、pHなどはほぼ一定の範囲内に保たれている¹⁴。これは恒常性の維持（ホメオスタシス）によるものである。恒常性の維持では、3つの制御システム（免疫系、内分泌系、中枢

神経系)が中心的な役割を担うことが知られている¹⁵。しかし、加齢や疾患などにより組織や臓器の機能が低下すると、恒常性の維持機構が崩れることがある。例えば、心拍出量の増加や塩分の過剰摂取などによる循環血液量の増加は血圧の上昇につながる¹⁶。膵臓からのインスリンの分泌障害やインスリン抵抗性の状態では、血糖値が低下しにくくなる¹⁷。また、腎機能の低下や電解質の量的な変化によって起こる酸塩基平衡の異常により、血液の pH を正常な範囲内に維持することができなくなることがある。血液は全身に行きわたっていることから、血液の pH の異常は全身に影響を及ぼし、時には生命の危機に陥ることもある¹⁸。血液の pH の調節は、ほとんどが呼吸 (PCO₂: 二酸化炭素分圧) と代謝 (HCO₃⁻: 重炭酸イオン) によって行われており、血液の pH を正常の範囲内に維持するためには、血液中の二酸化炭素分圧と重炭酸イオンのバランスが重要である¹⁹。これらのバランスに加えて、ヘモグロビンや血漿タンパク質によるタンパク質緩衝系、リン酸緩衝系などによっても pH は調節されている²⁰。しかしながら、血液の pH は、利尿剤の投与などによる腎臓からの酸の喪失や腎機能異常による重炭酸イオンの排泄障害などにより上昇し、一方で、腎機能の低下による重炭酸イオンの再吸収量の減少などにより低下する¹⁸。このように、生体内の種々の異常や環境の変化などによって生じる種々の平衡バランスの崩壊、つまり、恒常性の維持機構の破綻は、組織の機能障害や疾患を引き起こす要因となる。

このような生体内の組織や器官、細胞を取り巻く環境の変化を解析することは、疾患の発症や進展を考える上で重要である。現在の生化学や細胞生物学の研究では、生体から取り出して培養した細胞を用いて細胞機能の解析や疾患の発症機序の解明などが行われる。細胞の培養には、細胞の種類によって、または同じ名称の細胞であっても、研究者や実験条件などにより異なる培養液 (培地) が用いられることがある。通常、細胞の培養に用いられる培地には、糖やアミノ酸、ビタミン、無機塩、微量元素などが含まれている。さらに、アルブミンや細胞増殖因子などのタンパク質やホルモンなどを含む血清を添加する。細胞を培養する培地としては、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) や Minimum Essential Media (MEM)、Ham's F-12、DMEM/F-12、RPMI-1640 などが用いられる。これらの培地は生体内の組成を考慮して作られているため、成分の含有量に違いはあっても、栄養因子の種類自体には大きな違いはない。しかし、培地の種類の違いにより細胞の機能に変化が生じることがある。例えば、ハイブリドーマ細胞のグルタミン消費量²¹や胃がん細胞のアミ

ノ酸などの代謝量²²、歯根膜や歯髄の細胞の増殖や分化^{23, 24}、骨膜由来細胞の分化²⁵、マクロファージの増殖速度やアミノ酸消費量²⁶などは、用いる培地が異なることで違う結果を生じることが報告されている。私自身、マクロファージの機能解析を進める中で、用いる培地の種類により、炎症性サイトカインや活性酸素種の産生量など、M1 マクロファージの炎症応答に違いが生じることに気付いた。つまり、培地に含まれる特定の成分の量的な違いが、M1 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす可能性があると考えた。そこで、M1 マクロファージを用いて、炎症応答に影響を及ぼす因子を培地の成分から同定し、さらにその影響について詳細に解析することとした。

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の同定ならびにその作用機序を解明することを目的とした。本論文の第一章では、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の成分から探索し、重炭酸ナトリウム (NaHCO_3) を見出した。第二章では、重炭酸イオン (HCO_3^-) による培養細胞ならびに骨髄由来の M1 マクロファージの炎症応答への影響、さらにその調節機構を解析した。

第一章 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子の探索

1.1. 背景

マクロファージは、免疫系細胞の一種であり、IFN- γ や LPS などにより、IL-1 β や IL-6、tumor necrosis factor (TNF) - α などの炎症性サイトカインおよび活性酸素 (O_2^-) 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するようになる^{7,8}。この反応には、M1 マクロファージが関わっており、M1 マクロファージが分泌するこれらの物質は、細菌やウイルスなどの病原体に対する感染防御や炎症反応などにおいて重要な役割を果たしている。一方で、M1 マクロファージは様々な疾患の発症や進展にも関与している^{7,9}。例えば、関節リウマチ²⁷やアテローム性動脈硬化症²⁸、がん悪液質²⁹、糖尿病³⁰などの、いわゆる慢性疾患の病態の制御に関わ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制御機構の解明や機能を抑制する化合物の探索が行われている³¹。

血液中の単球は血管外（細胞間質）に遊走してマクロファージへと分化し、炎症応答や組織の修復などの機能を発揮する。しかし、マクロファージが存在する環境が異なれば、違う反応を示すことがある。加齢や疾患の慢性化はその一例であり、恒常性の維持機構が崩れることが原因と考えられている。例えば、血圧や血糖値の上昇、酸塩基平衡の異常などは全身の組織で影響が見られる¹⁶⁻¹⁸。そのため、生体内の恒常性の維持機構が崩れることで、マクロファージによる炎症応答に違いが生じる可能性が考えられる。実際、肥満や高血圧では、組織のマクロファージの M1 マクロファージと M2 マクロファージの分極のバランスが変わってしまう^{32,33}。また、生体内の組成を考慮して作られた様々な培地の成分の違いによっても、増殖や分化、アミノ酸の代謝量などの細胞の機能に影響を及ぼすことが知られている²¹⁻²⁶。私は M1 マクロファージの機能解析を進める中で、培地の種類の違いにより、M1 マクロファージの炎症応答に違いが生じることに気付いた。このことから、生体内の組成を考慮して作られている培地の中に、M1 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子が含まれていると考えた。

本章では、M1 マクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子の同定を目的に研究を行った。

1.2. 実験材料および実験方法

1.2.1. 実験材料

LPS (*Escherichia coli* 055:B5) と phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、cytochrome *c*、superoxide dismutase (SOD)、組換え型マウス inducible NO synthase (iNOS) は Sigma (St. Louis, MO, USA) から購入した。2,3-Diaminonaphthalene (DAN) は同仁化学研究所から購入した。NaHCO₃ と KHCO₃ は富士フィルム和光純薬から購入した。一次抗体として以下のものを用いた。Anti-iNOS/NOS Type II 抗体 (610329) は BD Biosciences (San Jose, CA, USA)、anti-TNF- α 抗体 (P350) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)、anti-IL-1 β /IL-1F2 抗体 (AF-401) は R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)、anti- β -actin 抗体 (A5316) は Sigma から、それぞれ購入した。また、二次抗体である、Horseradish peroxidase (HRP) -linked anti-rabbit IgG (#7074) と HRP-linked anti-mouse IgG (#7076) は Cell Signaling (Danvers, MA, USA) から購入した。組換え型マウス IFN- γ は東レより分与して頂いた。

1.2.2. 細胞培養

マウスマクロファージ系細胞株、J774.1/JA-4 細胞³⁴および RAW264.7 細胞 (American Type Culture Collection: ATCC; Manassas, VA, USA) は、非働化した 10%(v/v)ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS; Thermo Fisher Scientific)、50 units/mL ペニシリンと 50 μ g/mL ストレプトマイシン (ナカライテスク) を含む Ham's F-12 Nutrition Mixture (F-12) 培地 (Thermo Fisher Scientific)、DMEM (Thermo Fisher Scientific)、NaHCO₃ 不含の F-12 培地 (富士フィルム和光純薬) あるいは NaHCO₃ 不含の DMEM (富士フィルム和光純薬) を用いて、37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。

1.2.3. O₂⁻の産生量の測定

マクロファージは、LPS などにより NADPH 酸化酵素活性が上昇し、O₂⁻の産生が亢進する³⁵。O₂⁻

の産生量の測定には、cytochrome *c* 還元法を用いた。まず、F-12 培地に懸濁した J774.1/JA-4 細胞を培養ディッシュに播種し、37°C、CO₂ インキュベーターで培養した。2~4 時間後に培地を除去し、100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を含む F-12 培地あるいは DMEM を加え、37°C、CO₂ インキュベーターで 20 時間培養した。培養終了後、細胞を phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗い、1 mg/mL cytochrome *c* と 10 μ g/mL SOD、1 μ g/mL PMA を含む Hanks' balanced salt solution (HBSS) あるいは SOD を含まない HBSS 中で細胞を、37°C、CO₂ インキュベーターで 1.5 時間培養した。氷冷して反応を停止させ、培養上清を回収し、分光光度計 (UV-1700; 島津製作所) を用いて吸光度 (550 nm) を測定した。SOD の添加群と非添加群の吸光度の測定値の差から、1 OD = 47.4 nmol O₂⁻ としてマクロファージが産生した O₂⁻ の量を計算した³⁶。また、Lowry 法によりタンパク質濃度を測定し、タンパク質あたりの O₂⁻ の産生量として算出した。

1.2.4. NO の産生量の測定

マクロファージは、LPS などにより iNOS を発現し NO を産生する³⁷。NO は速やかに安定な NO₂ に酸化されるため、培地中の NO₂ 量を測定することにより、NO の産生量を見積もった。測定には、Griess 法あるいは蛍光法を用いた。まず、細胞の培養液を遠心分離 (4°C, 11,000 \times g, 1 min) し、その上清を測定試料とした。Griess 法では、まず、試料と 60 mg/mL Griess Romijin 試薬 (富士フイルム和光純薬) が 1:1(v/v) になるように混合した。5 分後に 550 nm と 630 nm の吸光度を測定し、550 nm の測定値から 630 nm の測定値を差し引いた。蛍光法では、まず、測定試料を滅菌水で 10 倍希釈し、さらに緩衝液 (100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA) を希釈した試料の 1/4 倍量加えた。次に、10%(v/v) になるように 0.62 M HCl に溶かした 50 μ g/mL DAN を加え、10 分間反応させた。その後、10%(v/v) になるように 0.7 M NaOH を加えて反応を停止させ、反応液を滅菌水で 10 倍希釈し、マイクロプレートリーダー (EnSpire 2300; PerkinElmer; Waltham, MA, USA) を用いて 365 nm の励起波長による 450 nm の蛍光波長を測定した。それぞれの測定では、NaNO₂ を標準試料として検量線を作成し、NO₂ 濃度を決定した。

1.2.5. TNF- α および IL-1 β の産生量の測定

細胞の培養液を遠心分離（4°C, 11,000 $\times g$, 1 min）し、その上清を試料とした。試料中の TNF- α の量は Mouse TNF- α Quantikine ELISA Kit（R&D systems）、IL-1 β の量は Mouse IL-1 β Quantikine ELISA Kit（R&D systems）を用いて定量した。操作方法は、当該キット添付のプロトコールに従った。

1.2.6. タンパク質の発現解析

培養後の細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、1%(v/v)プロテアーゼ阻害剤カクテル（ナカライテスク）を加えた細胞破碎液 [1%(v/v) Triton X-100, 10%(v/v) glycerol, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4] で懸濁し回収した。懸濁した細胞は密閉式超音波破碎装置（ELESTEIN 05-01; エレコン科学）を用いて破碎し、遠心分離（4°C, 11,000 $\times g$, 5 min）後の上清を試料とした。タンパク質濃度は Pierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定した。タンパク質（25 μ g/lane）を SDS-PAGE サンプルバッファー [40 mM Tris-HCl, pH6.8, 2%(w/v) SDS, 8%(v/v) glycerol, 5%(v/v) 2-mercaptoethanol, 0.01%(w/v) bromophenol blue] で調製し、95°C で 5 分間加温した後に、5-20%のポリアクリルアミドゲル（e-PAGEL; アトー）を用いて電気泳動を行った。電気泳動したゲルからタンパク質を Immobilon polyvinylidene fluoride（PVDF）膜（Merck Millipore; Burlington, MA, USA）へ転写した。転写後の膜を 0.05%(v/v) Tween 20 を含む Tris-buffered saline（TBS-T）に溶解した 30 mg/mL スキムミルク（雪印メグミルク）中で 30 分間、振とうした。その後、TBS-T で希釈したそれぞれの一次抗体あるいは二次抗体を用いて抗原抗体反応を行った。反応後の膜を Pierce Western Blotting Substrate（Thermo Fisher Scientific）あるいは LumiGLO Chemiluminescent Substrate（Cell Signaling）を用いて反応させ、化学発光は LAS-3000 mini（富士フイルム）により検出した。発光シグナルの解析と定量は Image J software を用いた³⁸。

1.2.7. 遺伝子の発現レベルの解析

細胞からの RNA 抽出には、Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics; Mannheim, Germany) あるいは Sepasol-RNA I Super G (ナカライテスク) を用いた。操作方法は、当該試薬添付のプロトコールに従った。抽出した RNA は、NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific) を用いて濃度を測定し、1%(w/v)アガロースゲル電気泳動により純度を確認した。その後、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡) を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA (complementary DNA: cDNA) を得た。cDNA と目的遺伝子に特異的なプライマー、Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を混合し、StepOnePlus Real-time PCR system (Thermo Fisher Scientific) を用いて $\Delta\Delta C_t$ 法により各種遺伝子の発現レベルを解析した。用いたプライマーは表 1-1 に示した。遺伝子の発現レベルの定量および解析は、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をリファレンス遺伝子とし、StepOne software V2.2.2 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。

表 1-1. 遺伝子の発現レベルの解析に用いたプライマーのヌクレオチド配列

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
IL-1 β	5'-AGTTGACGGACCCCAAAAG-3'	5'-AGCTGGATGCTCTCATCAGG-3'
TNF- α	5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3'	5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'
iNOS	5'-CTTTGCCACGGACGAGAC-3'	5'-TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC-3'
GAPDH	5'-CAAGGAGTAAGAAACCCTGGACC-3'	5'-CGAGTTGGGATAGGGCCTCT-3'

1.2.8. 細胞内の NADPH 量の測定

細胞内の NADPH 量は、SensoLyte NADP/NADPH Assay Kit (AnaSpec; Fremont, CA, USA) を用いて測定した。測定方法は、当該キット添付のプロトコールに従った。

1.2.9. NOS 活性の測定

組換え型マウス iNOS タンパク質の NOS 活性は、Ultra Sensitive Assay for Nitric Oxide Synthase (Oxford Biomedical Research; Rochester Hills, MI, USA) を用いて測定した。この測定キットの溶液に、さらに、Nitric Oxide Synthase Cofactors [1 μ M flavin adenine dinucleotide (FAD), 1 μ M flavin mononucleotide (FMN), 0.1 μ M calmodulin in HEPES buffer; Oxford Biomedical Research] と 10 μ M (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin dihydrochloride (Sigma)、100 μ M dithiothreitol (Sigma)、0.25 units の組換え型マウス iNOS タンパク質を加え反応液を調製した。この反応液に種々の濃度の NaHCO_3 を加え、37°C、 CO_2 インキュベーターで 3 時間反応させた。溶液中に含まれる NO (NO_2^-) 量は蛍光法により測定した。蛍光法の操作方法は、「1.2.4. NO の産生量の測定」の記載に従った。

1.2.10. 培地の pH の測定と調整

培地の pH は、pH メーター (D-52T; 堀場製作所) を用いて測定した。培地の酸性化には HCl を、アルカリ化には NaOH を添加、あるいはインキュベーターの CO_2 濃度を 5% から 3.5% に下げて行った。調製した培地は、2 時間以上 CO_2 インキュベーター内に置いて pH を安定化させ、その後の実験に使用した。

1.2.11. 統計解析

実験の結果は、3 回以上独立した実験を行い、それらの平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) あるいは平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test、3 群以上の間の比較には Tukey method を用い、*p* 値が 0.05 未満のものを有意な差があるとした。

1.3. 結果と考察

1.3.1. 組成の異なる培地で培養した J774.1/JA-4 細胞の形態の違い

IFN- γ 、LPS あるいは LPS と IFN- γ の存在下で培養した J774.1/JA-4 細胞の細胞形態の変化を調べた。細胞を F-12 培地あるいは DMEM で培養したところ、いずれの培地においても細胞は円形状の形態を示した (図 1-1)。また、IFN- γ で処理した場合でも、細胞のほとんどが円形状の形態を示し、培地の違いによる影響は認められなかった (図 1-1)。一方、LPS あるいは LPS と IFN- γ の存在下で培養した場合には、いずれの培地においても紡錘状の形態をした細胞が認められたが、培地の違いによる差異はなかった (図 1-1)。これらの結果から、F-12 培地と DMEM のいずれの培地で培養しても、マクロファージの細胞形態には差異がないことが分かった。

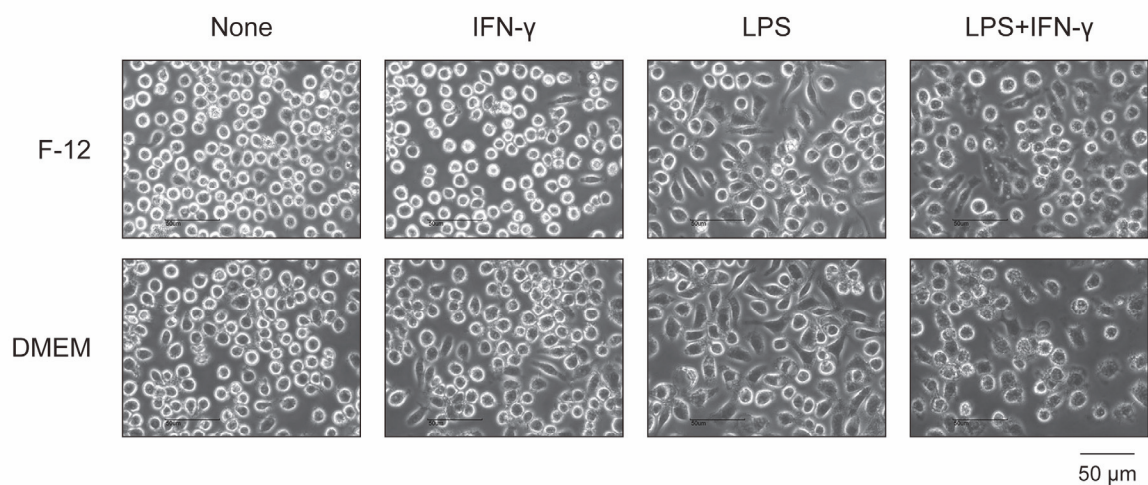


図 1-1. IFN- γ 、LPS あるいは LPS と IFN- γ の存在下で培養した J774.1/JA-4 細胞における形態変化

J774.1/JA-4 細胞を 10 units/mL IFN- γ 、100 ng/mL LPS、または LPS と IFN- γ を加えた F-12 培地あるいは DMEM で 20 時間培養した。独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。いずれの処理もしていない細胞を None として表した。

1.3.2. 組成の異なる培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における炎症応答の違い

マクロファージは様々な刺激を受けることで、 O_2^- や NO などの細胞障害性因子や TNF- α や IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生する^{7,8}。そこで、マクロファージからの O_2^- や NO、TNF- α 、IL-1 β の産生における培地の違いの影響を調べた。J774.1/JA-4 細胞における O_2^- の産生量は、いずれの培地で培養した場合も、IFN- γ 、LPS あるいは LPS と IFN- γ の存在下で上昇した (図 1-2A)。しかし、LPS および LPS と IFN- γ を含む培地で培養した時では、F-12 培地で培養した場合より DMEM で培養した方が O_2^- の産生量は明らかに低かった (図 1-2A)。また、J774.1/JA-4 細胞の培養上清中に産生される NO の量を測定したところ、いずれの処理においても培地の違いによる影響は認められなかった (図 1-2B)。一方で、TNF- α の産生量は、F-12 培地で培養した場合と比較して、いずれの処理においても DMEM で培養した方が高かった (図 1-2C)。また、IL-1 β の産生量は、LPS および LPS と IFN- γ の存在下では、F-12 培地で培養した場合よりも DMEM で培養した方が高かった (図 1-2D)。これらの結果から、J774.1/JA-4 細胞における細胞障害性因子や炎症性サイトカインの産生などの炎症応答は、LPS や IFN- γ を含む培地の違い、つまり生育環境の違いにより変化することが分かった。

培地の違いによるマクロファージの炎症応答への影響をさらに詳しく解析するために、組成の異なる培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量を経時的に調べた。LPS と IFN- γ の存在下で培養した J774.1/JA-4 細胞における NO と TNF- α の産生量は、培養開始 12 時間目までは F-12 培地と DMEM のいずれを用いた場合においても明らかな違いは認められなかったが、16 時間目から、DMEM で培養した場合の方が F-12 培地よりも上昇傾向にあった (図 1-3A, B)。一方で、IL-1 β の産生量は、F-12 培地で培養した場合は経時的に上昇したが、DMEM で培養した時には培養開始 12 時間目までは上昇がみられず、16 時間目から大きく上昇した (図 1-3C)。

次に、NO の産生に関わる iNOS や TNF- α 、IL-1 β の遺伝子の発現レベルを解析した。LPS と IFN- γ の存在下で培養した J774.1/JA-4 細胞における iNOS 遺伝子の発現レベルは、培養開始 4 時間目、8 時間目のいずれにおいても、DMEM で培養した場合の方が F-12 培地で培養した時よりも有意に高かった (図 1-3D)。一方で、TNF- α 遺伝子の発現レベルは、培養に用いた培地の違いによる影響

は認められなかった (図 1-3D)。また、IL-1 β 遺伝子の発現レベルは、培養開始 4 時間目では、F-12 培地で培養した場合の方が DMEM で培養した時よりも有意に高かったが、8 時間目においては、ほぼ同じレベルとなった (図 1-3D)。細胞内の iNOS タンパク質および IL-1 β 前駆体タンパク質の経時的な発現レベルの変化は、それぞれの遺伝子の発現レベルの結果と一致していたが、TNF- α 前駆体タンパク質の経時的な発現レベルは、TNF- α 遺伝子の発現レベルの結果と異なり、F-12 培地で培養した場合の方が DMEM で培養した時よりも上昇傾向にあった (図 1-3E)。

次に、組成の異なる培地で J774.1/JA-4 細胞を LPS と IFN- γ を加えて培養した時、iNOS の遺伝子およびタンパク質の発現レベルに違いがあるにもかかわらず、NO の産生量に明らかな変化が認められなかったことについて調べた。iNOS は、NADPH と酸素分子の存在下で、L-アルギニンを酸化して NO と L-シトルリンを合成する³⁷。F-12 培地と DMEM の組成を比較すると、F-12 培地の方が DMEM よりも L-アルギニンが約 0.6 mM 多く含まれていた (表 1-2)。そこで、まず、iNOS の発現における L-アルギニンの含有量による影響を調べた。DMEM に F-12 培地に含まれる L-アルギニンの量と同量になるように L-アルギニンを添加した培地を作製し、J774.1/JA-4 細胞を LPS と IFN- γ の存在下で培養したが、NO の産生量に変化は認められなかった (図 1-4A)。次に、細胞内の NADPH 量の変化を調べた。その結果、J774.1/JA-4 細胞を F-12 培地で培養した場合よりも、DMEM で培養した方が細胞内の NADPH 量は有意に低かった (図 1-4B)。これらの結果から、J774.1/JA-4 細胞において、iNOS の発現は DMEM で培養した場合の方が F-12 培地の時より高くなった。しかし、細胞内の NADPH 量が少ないため、結果として NO の産生量に明らかな変化が見られなかったと考えられた。

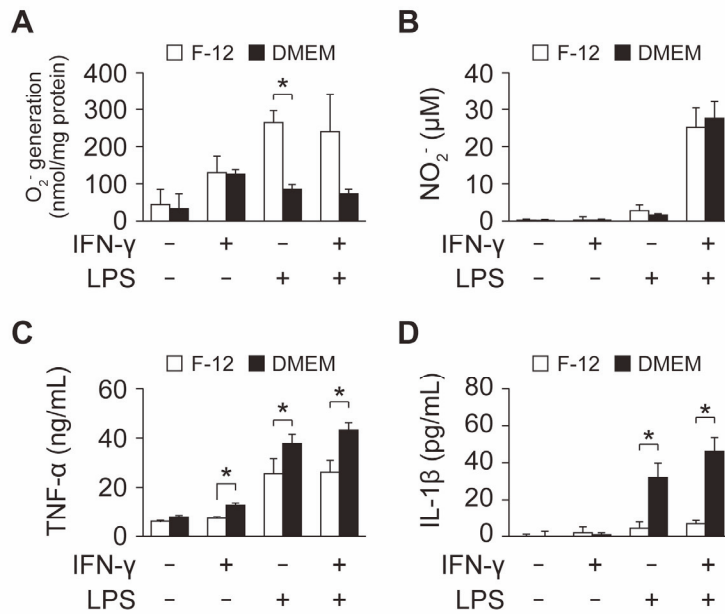


図 1-2. 組成の異なる培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における炎症応答の違い

(A) O₂⁻の産生量。10 units/mL IFN-γ、100 ng/mL LPS、または LPS と IFN-γ を含む F-12 培地あるいは DMEM で J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養し、O₂⁻の産生量を測定した。結果は独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は* $p < 0.05$ として表した。(B) NO の産生量、(C) TNF-α の産生量、(D) IL-1β の産生量。図 1-2(A)に記載の方法で J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養し、培養上清を用いてそれぞれを定量した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は* $p < 0.05$ として表した。

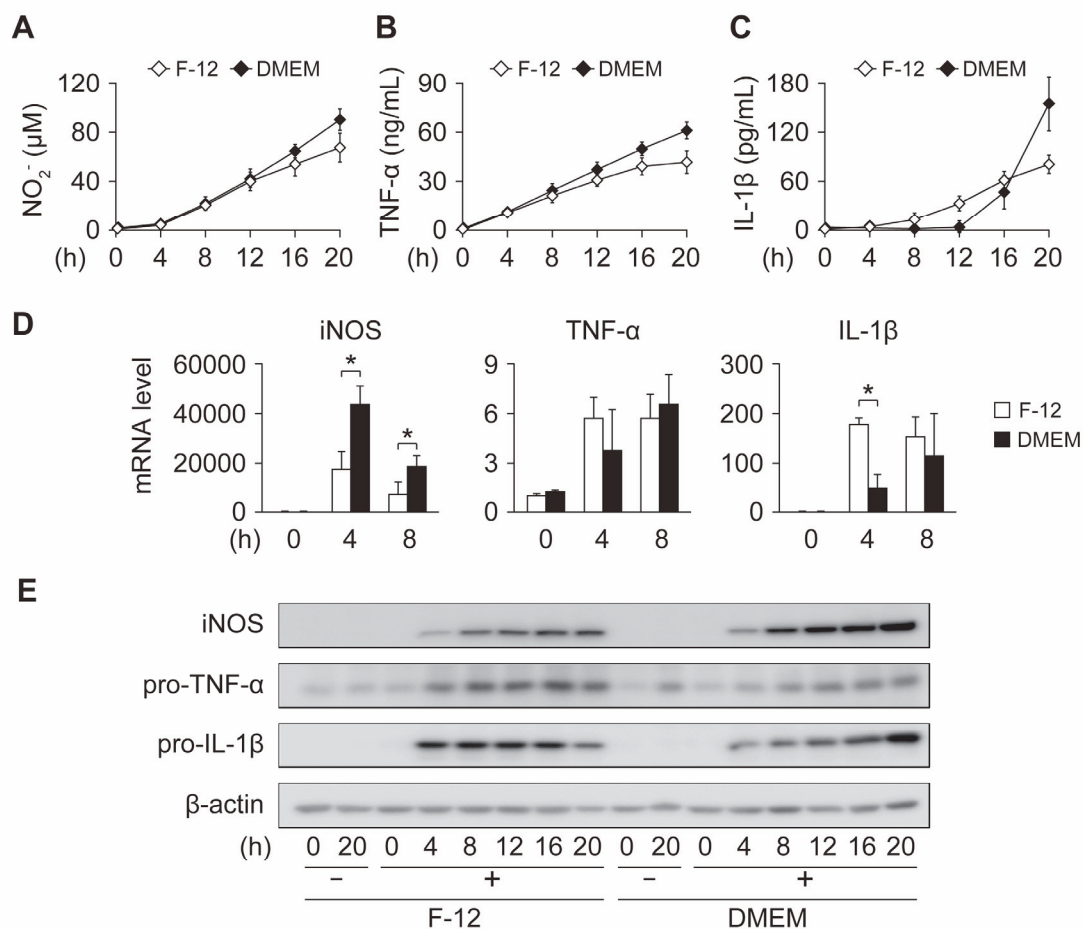


図 1-3. 組成の異なる培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量とその関連遺伝子とタンパク質の発現レベルの変化

(A) NO の産生量、(B) TNF- α の産生量、(C) IL-1 β の産生量。100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を含む F-12 培地あるいは DMEM で J774.1/JA-4 細胞を 0~20 時間培養した。培養上清を用いてそれぞれを定量した。結果は独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。(D) iNOS、TNF- α および IL-1 β の遺伝子の発現レベル。100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を含む F-12 培地あるいは DMEM で J774.1/JA-4 細胞を 0、4 あるいは 8 時間培養した。それぞれの遺伝子の発現レベルは、F-12 培地の 0 時間目におけるそれぞれの遺伝子の発現レベルを 1 とし、相対値で表した。有意差は * p <0.05 として表した。

(E) iNOS、TNF- α の前駆体 (pro-TNF- α) および IL-1 β の前駆体 (pro-IL-1 β) タンパク質の発現。100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を含む F-12 培地あるいは DMEM で J774.1/JA-4 細胞を 0~20 時間培養した。独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。

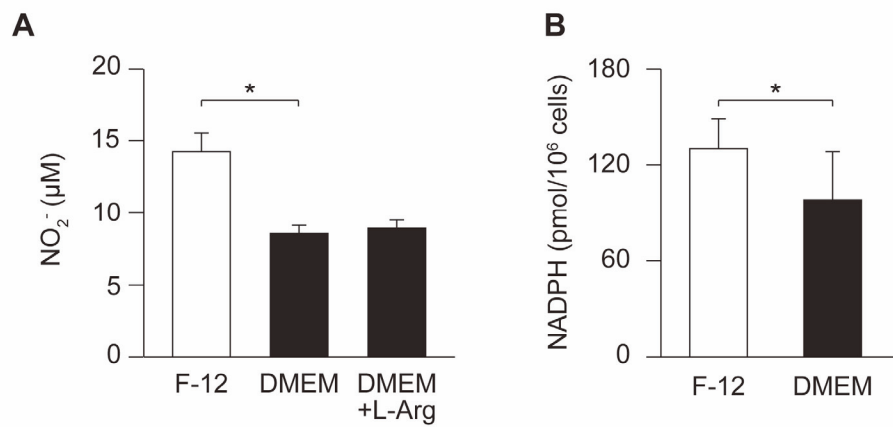


図 1-4. 組成の異なる培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における NO の産生量および細胞内の NADPH 量

(A) NO の産生量。100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を含む F-12 培地で J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養した。PBS で細胞を洗浄後、F-12 培地、DMEM あるいは 0.6 mM L-アルギニン (L-Arg) を加えた DMEM に交換し、6 時間培養後に培養上清を回収した。結果は独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D. として示した。有意差は* p <0.05 として表した。(B) 細胞内の NADPH 量。100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を含む F-12 培地あるいは DMEM で J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養し、細胞内の NADPH 量を定量した。結果は、独立して行った 7 回の実験の平均値 \pm S.E.として示した。有意差は* p <0.05 として表した。

表 1-2. F-12 培地および DMEM の組成表 (Sigma が公表しているデータを mM に換算)

Components	F-12 (mM)	DMEM (mM)
Amino acids		
Glycine	0.100	0.400
L-Alanine	0.100	-
L-Arginine hydrochloride	1.000	0.398
L-Asparagine-H ₂ O	0.100	-
L-Aspartic acid	0.100	-
L-Cysteine hydrochloride-H ₂ O	0.200	-
L-Cystine 2HCl	-	0.201
L-Glutamic acid	0.100	-
L-Glutamine	1.000	4.000
L-Histidine hydrochloride-H ₂ O	0.100	0.200
L-Isoleucine	0.031	0.802
L-Leucine	0.100	0.802
L-Lysine hydrochloride	0.199	0.798
Methionine	0.030	0.201
L-Phenylalanine	0.030	0.400
L-Proline	0.300	-
L-Serine	0.100	0.400
Threonine	0.100	0.798
L-Tryptophan	0.010	0.078
L-Tyrosine disodium salt dihydrate	0.030	0.398
L-Valine	0.100	0.803
Vitamins		
Biotin	0.00003	-
Choline chloride	0.1000	0.0286
D-Calcium pantothenate	0.0010	0.0084
Folic acid	0.0029	0.0091
Niacinamide	0.0003	0.0328
Pyridoxine hydrochloride	0.0003	0.0194
Riboflavin	0.0001	0.0011
Thiamine hydrochloride	0.0009	0.0119
Vitamin B ₁₂	0.0010	-
i-Inositol	0.1000	0.0400
Inorganic salts		
Calcium chloride (CaCl ₂) (anhyd.)	0.3	1.8
Cupric sulfate (CuSO ₄ ·5H ₂ O)	0.00001	-
Ferric sulfate (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0.003	-
Ferric nitrate (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	-	0.0002
Magnesium chloride (anhyd.)	0.6023	-
Magnesium sulfate (MgSO ₄) (anhyd.)	-	0.8139
Potassium chloride (KCl)	3.0	5.3
Sodium bicarbonate (NaHCO ₃)	14.0	44.0
Sodium chloride (NaCl)	131.0	110.3
Sodium phosphate dibasic (NaHPO ₄) (anhyd.)	1.0	-
Sodium phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	-	0.9058
Zinc sulfate (Zn·7H ₂ O)	0.003	-
Other components		
D-Glucose	10.0	25.0
Hypoxanthine Na	0.0300	-
Linoleic acid	0.0003	-
Lipoic acid	0.0010	-
Phenol red	0.0032	0.0399
Putrescine 2HCl	0.0010	-
Sodium pyruvate	1.0	-
Thymidine	0.0029	-

1.3.3. 培地に含まれるマクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子の探索

これまでの結果から、培地の組成の違いがマクロファージの炎症応答に変化を生じさせている可能性が考えられた。中でも、iNOS の遺伝子とタンパク質の発現レベルは、F-12 培地で培養した場合よりも DMEM で培養した方が高かった (図 1-3)。表 1-2 に示すように、F-12 培地と DMEM の組成を比較すると、F-12 培地より DMEM の方がアミノ酸やビタミン、グルコース、塩化カルシウム、重炭酸ナトリウム、フェノールレッドなどが多く含まれていることが分かる。そこで、DMEM と比べて F-12 培地に含まれる量が少ない成分を加えた F-12 培地を作製し、それらの改変培地を用いて培養することにより、iNOS の発現レベルを上昇させる因子を探索した。その結果、NaHCO₃ を加えた F-12 培地で J774.1/JA-4 細胞を LPS と IFN- γ を加えて培養すると、iNOS タンパク質の発現レベルが増加した (図 1-5)。一方、その他の成分では、iNOS の発現において明らかな影響は認められなかった。したがって、J774.1/JA-4 細胞において、NaHCO₃ が iNOS の発現に影響を及ぼしていることが示された。

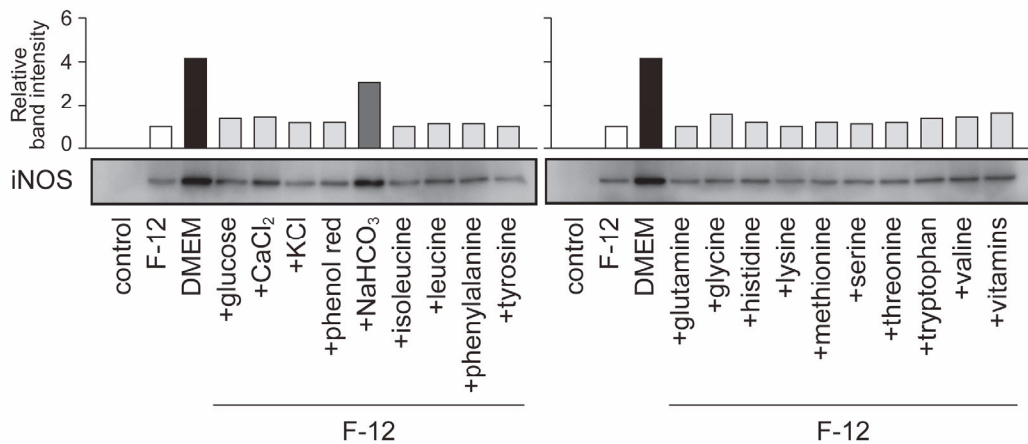


図 1-5. J774.1/JA-4 細胞の iNOS タンパク質の発現に影響を及ぼす因子の探索

iNOS タンパク質の発現レベル。F-12 培地、DMEM あるいは F-12 培地に図中に記したそれぞれの成分を加えて DMEM に含まれる量と同じになるように改変した培地に、100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を加え、J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養した。ウェスタンブロット解析で得られた結果とそれらのバンドの強度の定量結果を示した。F-12 培地に LPS と IFN- γ を加えずに培養した結果を control とした。それぞれのバンドの強度は、F-12 培地に LPS と IFN- γ を加えた結果 (白色の棒グラフ) を 1 とし、相対値で表した。独立して行った 2 回の実験結果の平均値を示した。

1.3.4. NaHCO₃の濃度変化が J774.1/JA-4 細胞の iNOS の発現および NO の産生に及ぼす影響

培地に含まれる NaHCO₃ は、一般に培地の pH の維持を目的として加えられている。表 1-2 に示すように、NaHCO₃ は、F-12 培地には 14 mM、DMEM には 44 mM、それぞれ添加されている。そこで、NaHCO₃ 不含の培地を用いて、LPS と IFN- γ を含む培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における iNOS タンパク質の発現と NO の産生に与える NaHCO₃ の影響を解析した。その結果、F-12 培地と DMEM のいずれの培地を用いた場合でも、NaHCO₃ の添加濃度の上昇に依存して、iNOS タンパク質の発現レベル (図 1-6A) および NO の産生量 (図 1-6B) は増加した。これらの結果から、培地に含まれる NaHCO₃ が、J774.1/JA-4 細胞における iNOS の発現および NO の産生に影響を及ぼすことが示された。

次に、異なる濃度の NaHCO₃ を含む F-12 培地を作製し、LPS と IFN- γ を添加して培養した J774.1/JA-4 細胞における iNOS のタンパク質および遺伝子の発現レベルの経時的な変化を調べた。NaHCO₃ を 14 mM 含む F-12 培地で培養するよりも、44 mM 含む方が iNOS タンパク質の発現レベルは高く、また、その発現レベルは経時的に上昇した (図 1-7A, B)。培養開始後 4 時間目、8 時間目において、iNOS 遺伝子の発現レベルは、NaHCO₃ 濃度が高い培地で培養した方が有意に高かった (図 1-7C)。これらの結果から、培地に含まれる NaHCO₃ 濃度の違いによって iNOS の発現レベルが変化することが示された。

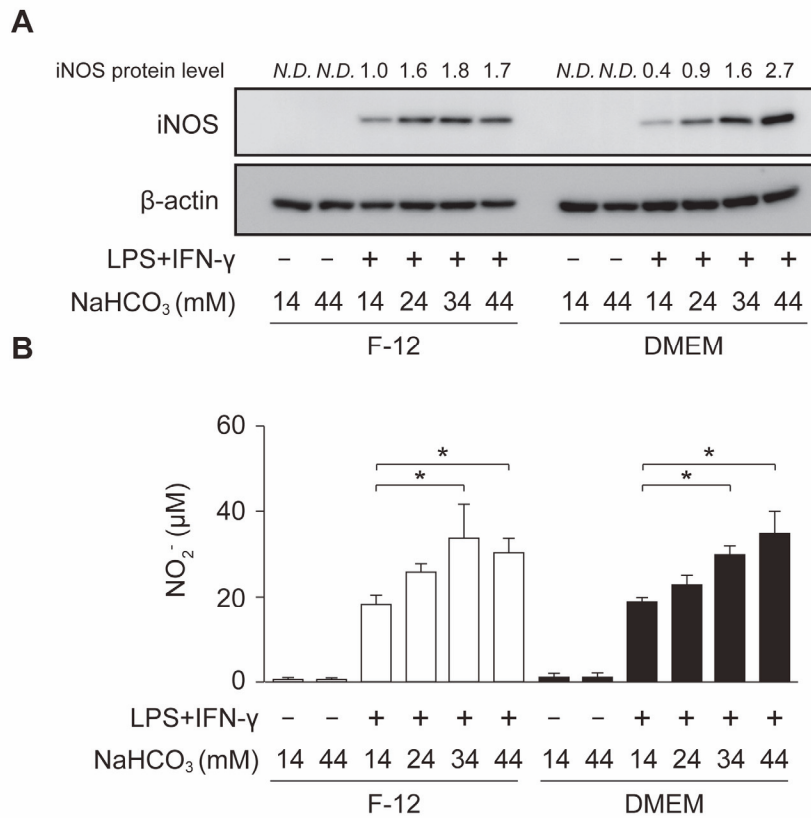


図 1-6. 異なる濃度の NaHCO₃ を含む培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における iNOS タンパク質の発現レベルと NO の産生量

(A) iNOS タンパク質の発現。14~44 mM の NaHCO₃ を含む F-12 培地あるいは DMEM に 100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN-γ を加え、J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養した。独立して行った 3 回の実験から得られた結果のうち、代表的な結果を示した。iNOS タンパク質の発現レベルを β-actin タンパク質の発現レベルで補正し、14 mM NaHCO₃ と LPS、IFN-γ を含む F-12 培地で培養した細胞の iNOS タンパク質の発現レベルを 1 とし、それぞれの相対値を図の上に示した。N.D.: not detected。(B) NO の産生量。図 1-6(A)に記載した方法で細胞を培養した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は **p*<0.05 として表した。

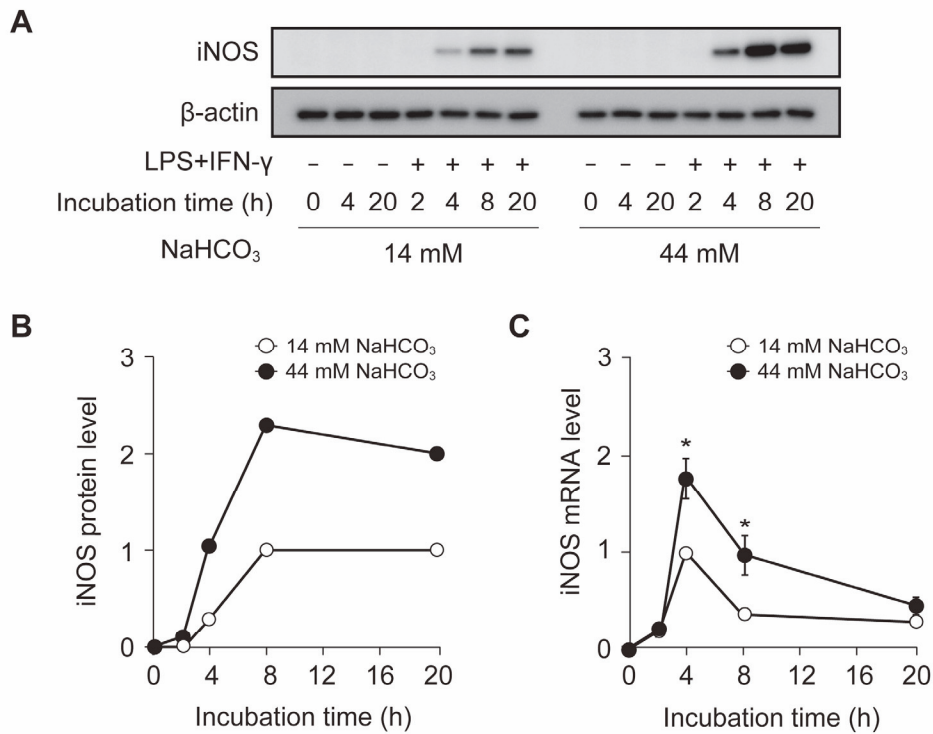


図 1-7. 異なる濃度の NaHCO₃ が J774.1/JA-4 細胞における iNOS のタンパク質および遺伝子の発現レベルに及ぼす影響

(A) iNOS タンパク質の発現。14 mM あるいは 44 mM の NaHCO₃ を含む F-12 培地に 100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を加え、J774.1/JA-4 細胞を 0~20 時間培養した。独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。(B) (A) のウェスタンブロット解析の結果の定量。iNOS タンパク質の発現レベルを β -actin タンパク質の発現レベルで補正した。14 mM の NaHCO₃ を添加した培地で 20 時間培養した際の結果を 1 とし、それぞれの発現レベルを相対値で表した。(C) iNOS 遺伝子の発現レベル。図 1-7(A) に記載した方法で細胞を培養した。14 mM の NaHCO₃ を添加した F-12 培地で 4 時間培養した際の結果を 1 とし、それぞれ相対値で表した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D. とした。有意差は * p <0.05 とした。

1.3.5. マウスマクロファージ RAW264.7 細胞の炎症応答における NaHCO_3 の影響

NaHCO_3 が J774.1/JA-4 細胞における iNOS の発現レベルや NO の産生量に影響を及ぼすことが分かった。そこで、マクロファージにおける NaHCO_3 による炎症応答への影響が、J774.1/JA-4 細胞に特異的かどうかを調べるために、別のマウスマクロファージ系細胞株である RAW264.7 細胞を用いて同様の検討を行った。J774.1/JA-4 細胞を用いた時に得られた結果と同様に、 NaHCO_3 濃度を变化させた F-12 培地と DMEM のいずれの培地で RAW264.7 細胞を LPS と $\text{IFN-}\gamma$ を加えて培養しても、培地に含まれる NaHCO_3 濃度が 14 mM の場合よりも 44 mM の方が iNOS タンパク質の発現レベル (図 1-8A) は高く、NO の産生量 (図 1-8B) も多かった。さらに、 $\text{TNF-}\alpha$ の産生量も、 NaHCO_3 濃度が高い培地の方が有意に多かった (図 1-8C)。これらの結果から、 NaHCO_3 による iNOS の発現や NO、 $\text{TNF-}\alpha$ の産生への影響は、J774.1/JA-4 細胞だけでなく、RAW264.7 細胞においても同様に認められることが分かった。

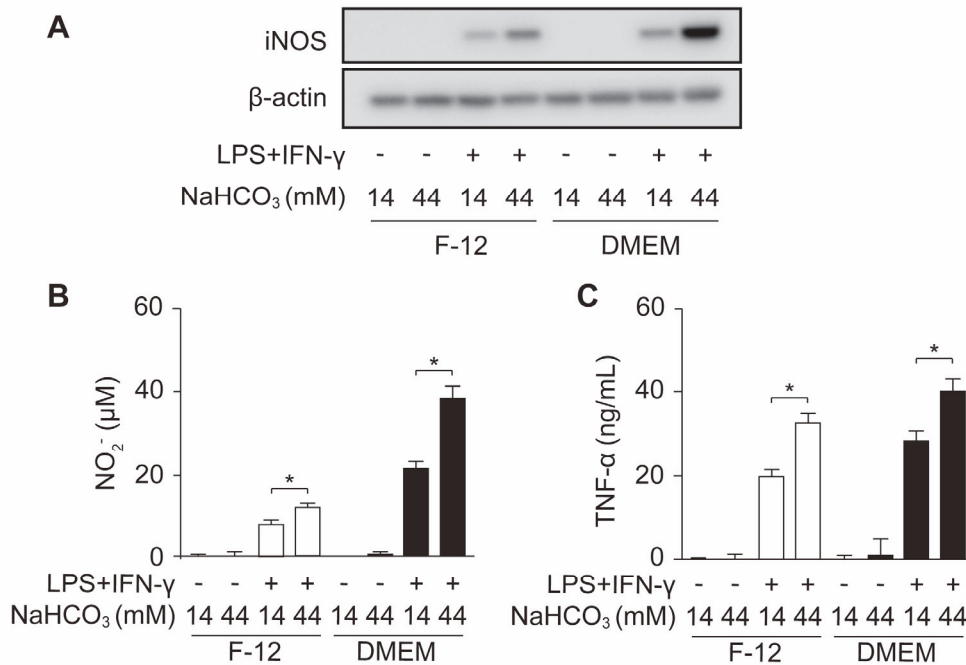


図 1-8. RAW264.7 細胞の炎症応答に対する NaHCO₃ 濃度の影響

(A) iNOS タンパク質の発現。14 mM または 44 mM の NaHCO₃ を添加した F-12 培地あるいは DMEM に 100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を加え、RAW264.7 細胞を 20 時間培養した。独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。(B) NO の産生量、(C) TNF- α の産生量。図 1-8(A)に記載した方法で細胞を培養した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は* p <0.05 として表した。

1.3.6. NaHCO₃ が iNOS の NOS 活性に及ぼす影響

これまでの解析から、マクロファージにおいて、NaHCO₃ が iNOS の遺伝子とタンパク質の発現レベルに影響を及ぼすことが明らかとなった。次に、NaHCO₃ が iNOS タンパク質の酵素活性自体に影響を及ぼすのかを調べるために、組換え型マウス iNOS タンパク質を用いて *in vitro* で NOS 活性を評価した。NOS の酵素活性は、0~10 mM の NaHCO₃ 存在下では変化はなかったが、10~50 mM の NaHCO₃ では濃度の上昇に依存して低下した (図 1-9)。これらの結果から、マクロファージにおいて、NaHCO₃ 濃度の上昇は、iNOS の遺伝子とタンパク質の発現レベルを上昇させる一方で、NOS の酵素活性は低下させることが分かった。

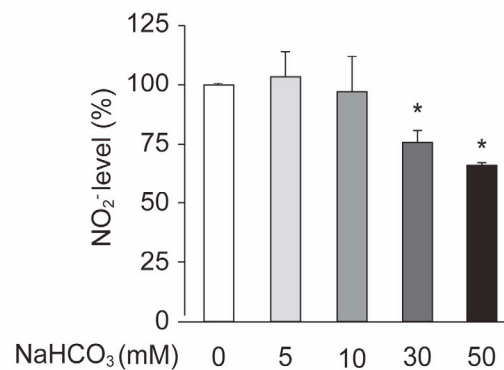


図 1-9. NaHCO₃ が NOS の酵素活性に及ぼす影響

組換え型マウス iNOS タンパク質を、0~50 mM NaHCO₃ を含む反応液で 3 時間反応させ、NO の産生量を測定した。NO (NO₂⁻) の量の測定は蛍光法により行い、0 mM NaHCO₃ の時に産生される NO₂⁻ の量を 100%と、それぞれのレベルを相対値で表した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は 0 mM NaHCO₃ の条件の結果と比較し、**p*<0.05 として表した。

1.3.7. NaHCO₃による培地の pH の変動による影響

培地に含まれる NaHCO₃ の主な作用は培地の pH の維持であることから、NaHCO₃ 濃度の違いによるマクロファージの炎症応答の変化が、培地の pH の変化に起因するのではないかと考えた。まず、14 mM あるいは 44 mM の NaHCO₃ を含む F-12 培地で J774.1/JA-4 細胞を培養した時の培地の pH の経時的変化を調べた。14 mM NaHCO₃ を含む F-12 培地では、培養開始時の pH は約 7.3、44 mM NaHCO₃ を含む培地では約 7.8 であった (図 1-10)。LPS と IFN- γ を含む培地で細胞を培養した時、4 時間後では、いずれの培地においても pH に大きな変化は認められなかったものの、20 時間後では 14 mM の NaHCO₃ を含む培地の pH は培養開始時と比べて約 0.5 低下していた (図 1-10)。一方で、44 mM の NaHCO₃ を含む培地では、pH に大きな変化は認められなかった (図 1-10)。これらの結果の違いは、細胞を LPS と IFN- γ で処理した際に産生される物質や代謝の変化によって産生される有機酸などの影響が、緩衝能のより低い 14 mM の NaHCO₃ を添加した培地で現れたものと考えられた。

そこで、培地の pH を変化させ、NaHCO₃ 濃度の違いにより現れたマクロファージの炎症応答の変化が培地の pH が変化したことによるかどうかを調べた。その結果、14 mM NaHCO₃ を含む F-12 培地に NaOH を添加して pH を上昇させた場合、NaOH を添加していない時と比較して、iNOS の発現レベルが大きく上昇した (図 1-11A)。しかしながら、44 mM NaHCO₃ を添加した培地に HCl を添加して pH を低下させた時も、HCl を添加していない場合と比較して iNOS の発現レベルは上昇した (図 1-11A)。次に、インキュベーター内の CO₂ 濃度を変化させることで培地の pH を変化させたところ、CO₂ 濃度を下げて培地の pH を上昇させたにも関わらず、iNOS タンパク質の発現レベル (図 1-11A) および NO₂⁻ の量 (図 1-11B) に明らかな変化は認められなかった。これらの結果より、培地の pH 変化と iNOS タンパク質の発現レベルおよび NO の産生の間に明らかな相関は認められなかったものの、ある条件での pH の変化では相関が見られたことから、マクロファージの炎症応答が細胞外の pH 変化によって影響を受けている可能性が考えられた。

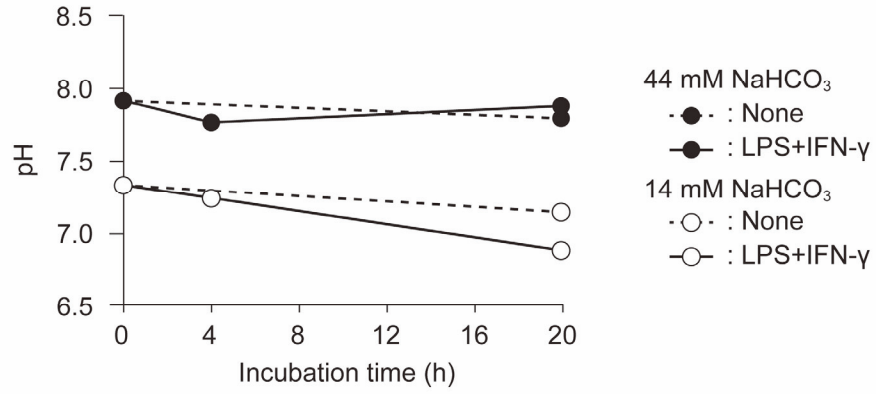


図 1-10. NaHCO₃による培地の pH の変化

14 mM あるいは 44 mM の NaHCO₃ を含む F-12 培地に 100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN-γ を加え、J774.1/JA-4 細胞を 0~20 時間培養し、培地の pH を測定した。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。LPS と IFN-γ を加えていない培地で培養した細胞をそれぞれ None とした。

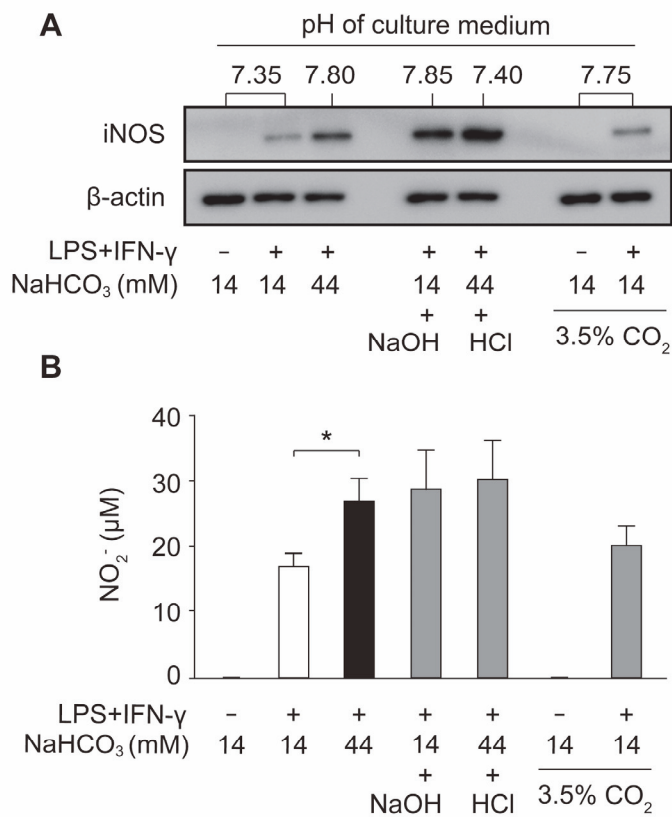


図 1-11. 培地の pH の変化による J774.1/JA-4 細胞における iNOS タンパク質の発現レベルおよび NO の産生量への影響

(A) iNOS タンパク質の発現。14 mM または 44 mM の NaHCO₃ を含む F-12 培地を用い、NaOH、HCl の添加あるいは CO₂ 濃度の変化により培地の pH を調整した。作製した培地に 100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN-γ を加え、J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養した。独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。(B) NO の産生量。図 1-11(A)に記載した方法で細胞を培養した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は* $p < 0.05$ として表した。

1.3.8. 重炭酸イオンがマクロファージの NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量に及ぼす影響

マクロファージの炎症応答における NaHCO₃ の影響をさらに明らかにするために、重炭酸イオンやナトリウムイオンの濃度の変化によるマクロファージの炎症応答への影響を解析した。14 mM NaHCO₃ を含む F-12 培地に 30 mM NaHCO₃、30 mM KHCO₃、30 mM NaCl あるいは 30 mM KCl を加えた培地を作製し、さらに LPS と IFN- γ を添加して J774.1/JA-4 細胞を培養した。LPS と IFN- γ を処理した細胞において、14 mM NaHCO₃ を含む培地で培養した時と比較すると、NaHCO₃、KHCO₃、NaCl あるいは KCl をさらに加えた場合、いずれの条件においても NO の産生量が増加した (図 1-12A)。一方で、LPS と IFN- γ を含む培地で培養した J774.1/JA-4 細胞における TNF- α の産生量は、30 mM NaHCO₃ および 30 mM KHCO₃ を加えた培地で培養した時に有意に上昇した (図 1-12B)。また、IL-1 β の産生量は、30 mM NaHCO₃ を加えた培地を用いた場合のみ有意に上昇し、KHCO₃ を加えた培地では上昇傾向であった (図 1-12C)。しかしながら、LPS と IFN- γ を含まない培地で培養した時では、NaHCO₃、KHCO₃、NaCl あるいは KCl のいずれを添加した場合も、NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量に変化は認められなかった (図 1-12A-C)。これらの結果から、LPS と IFN- γ を加えた培地で培養した J774.1/JA-4 細胞において、NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量は重炭酸イオンによって変化することが示された。

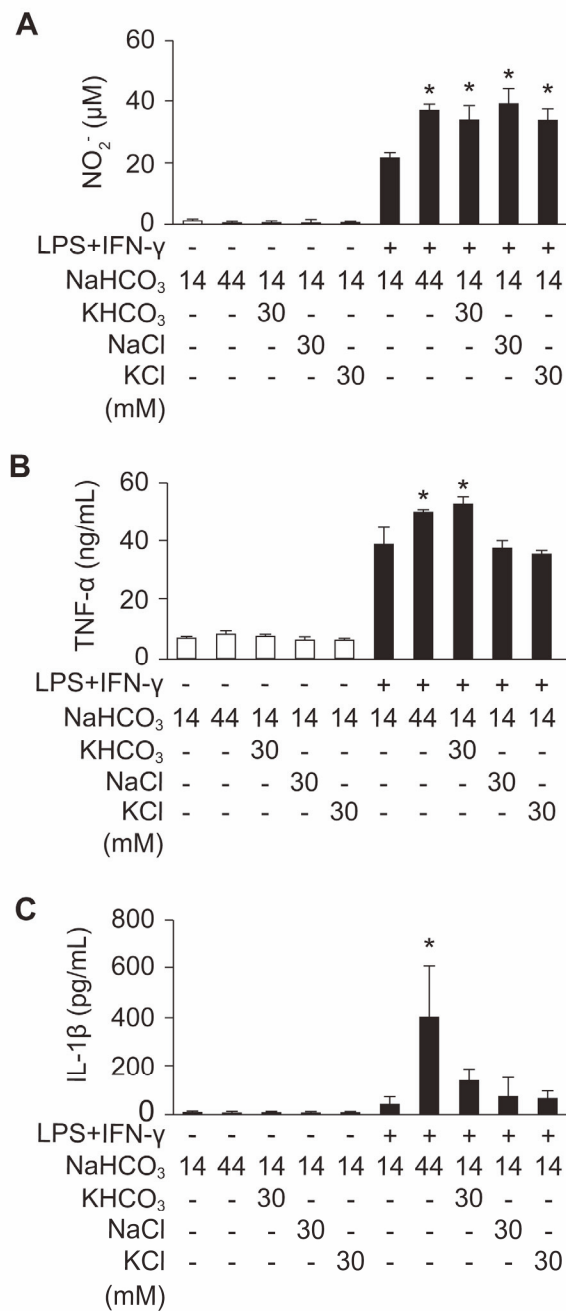


図 1-12. 培地中に含まれるナトリウムイオンやカリウムイオン、重炭酸イオンが J774.1/JA-4 細胞における NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量に及ぼす影響

(A) NO の産生量、(B) TNF- α の産生量、(C) IL-1 β の産生量。14 mM NaHCO₃ を含む F-12 培地に、それぞれ 30 mM の濃度で NaHCO₃、KHCO₃、NaCl あるいは KCl を添加し、100 ng/mL LPS と 10 units/mL IFN- γ を加えて J774.1/JA-4 細胞を 20 時間培養した。培養上清中の NO₂⁻ や TNF- α 、IL-1 β の量を測定した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は、14 mM NaHCO₃ と LPS、IFN- γ を含む F-12 培地で培養して得られた結果と比較して、* p <0.05 として表した。

1.4. まとめ

本研究は、免疫系で重要な役割を果たすマクロファージの炎症応答に影響を及ぼす因子に着目したものである。マクロファージは全身に分布し、様々な環境で働くと考えられている。生体内は恒常性の維持により、その環境は大きな変化がないように調節されている。しかし、疾患などにより生体内の環境は変化することがある。実際、加齢や疾患の慢性化などによって生体内の恒常性の維持機構が崩れ、血圧の変化や血糖値の上昇、酸塩基平衡の異常などにより組織の環境は変化する¹⁶⁻¹⁸。血糖値の上昇やアシドーシスによりマクロファージの炎症応答が変化することが報告されており、細胞を取り巻く環境がマクロファージの機能制御に重要であると考えられている^{39, 40}。また、生体内の組成を反映して作られた、細胞培養に用いる培地の組成の違いによっても、マクロファージの増殖速度やアミノ酸代謝量が変化することが報告されている²⁶。これまでの研究においても、組成の異なる培地を用いると、マクロファージにおける炎症応答に違いが生じることを見出していた。そこで、本章では 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中から探索した。

組成の異なる 2 種類の培地に IFN- γ 、LPS あるいは LPS と IFN- γ を加えてマクロファージ細胞株 J774.1/JA-4 細胞を培養し、O₂⁻や NO、TNF- α 、IL-1 β の産生量、またそれらの関連遺伝子やタンパク質の発現レベルへの影響を調べた (図 1-2, 1-3)。その結果、培地の組成が異なると、J774.1/JA-4 細胞における iNOS の遺伝子やタンパク質の発現レベルが変化することが分かった。そこで、J774.1/JA-4 細胞を用いて iNOS タンパク質の発現レベルの変化を指標とし、J774.1/JA-4 細胞の炎症応答に影響を及ぼす因子を培地から探索したところ、重炭酸ナトリウム (NaHCO₃) が iNOS の発現を上昇させることが分かった (図 1-5)。重炭酸ナトリウムの濃度を変化させた培地を作製して、J774.1/JA-4 細胞における iNOS の発現および NO の産生に対する影響を調べたところ、重炭酸ナトリウムの濃度の上昇に依存して、iNOS の発現レベルや NO の産生量が上昇することが分かった (図 1-6)。また、重炭酸ナトリウムによる iNOS の発現レベルや NO の産生量の上昇の亢進は、J774.1/JA-4 細胞だけでなく、RAW264.7 細胞を用いた場合にも見られたことから (図 1-8)、この現象は *in vitro* でマクロファージに普遍的に見られる現象であると推測された。

細胞を用いた機能解析や疾患の機序解明などでは、多くの場合、それぞれに適した細胞の培養条

件が設定される。一般的に、細胞の培養に用いられる培地は、生体内の環境を考慮し、その環境に近い成分が含まれている。今回、解析に用いた F-12 培地には 1.2 g/L (14 mM)、DMEM には 3.7 g/L (44 mM) の重炭酸ナトリウムが含有されている (表 1-2)。また、細胞培養実験で汎用される RPMI-1640 培地には 2 g/L (24 mM)、MEM には 2.2 g/L (26 mM) の重炭酸ナトリウムが含有されている。培地中の重炭酸ナトリウムの主な作用は、培地のアルカリ化と CO₂ インキュベーターを用いた際に pH の緩衝能を持たせることである。実際、F-12 培地に含まれる重炭酸ナトリウムの濃度を 14 mM から 44 mM に変化させると、培地の pH は約 0.5 上昇した (図 1-10)。細胞外の pH 変化は、マクロファージの NO⁴¹ や TNF- α ⁴²、IL-1 β の産生量⁴³、また、免疫機能を変化させるという報告がある⁴⁴。そこで、培地の pH を変化させてマクロファージの炎症応答性を調べた。実際、細胞外の pH 変化により J774.1/JA-4 細胞の iNOS の発現レベルや NO の産生は変化したものの、それらに有意な相関性は認められなかった (図 1-11)。重炭酸ナトリウムは水溶液中では速やかに重炭酸イオンとナトリウムイオンに解離するため、重炭酸イオンとナトリウムイオンの影響を調べたところ、J774.1/JA-4 細胞の NO の産生量は、重炭酸イオンだけでなく、ナトリウムイオンによる制御も受けていることが示された (図 1-12)。実際に、ナトリウムイオンの上昇がマクロファージの M1、M2 型のマクロファージへの分極に影響を及ぼすという報告がある⁴⁵⁻⁴⁷。しかしながら、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、J774.1/JA-4 細胞の NO や TNF- α 、IL-1 β の産生量は上昇したことから、マクロファージにおける炎症応答は、重炭酸イオンによって変化すると考えられる。細胞培養液中の重炭酸イオンは細胞外だけでなく細胞内の pH も変化させるため、今後は細胞内への重炭酸イオンの取り込みおよび重炭酸イオンによる細胞内 pH の変化がマクロファージの炎症応答に関与しているかどうかを調べる必要がある。

本章の結果から、細胞培養における培地の選択は、細胞の機能に影響を及ぼす、つまり M1 マクロファージの炎症応答に変化を生じさせることが分かった。また、培地に含まれる重炭酸イオンの濃度は、マクロファージの iNOS の発現および NO や TNF- α 、IL-1 β の産生に影響を及ぼすことが明らかとなった。これらの結果は、細胞培養時の培地中の重炭酸ナトリウム濃度はもちろんのこと、医薬品や食品添加物からの重炭酸ナトリウムの摂取量や生体内の重炭酸イオン濃度の変化が細胞の機能、ひいては炎症応答などの生体の機能に影響を及ぼす可能性を示すものである。

第二章 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と その調節機構の解析

2.1. 背景

生体内の環境は常に変化しているものの、恒常性の維持によってある一定の範囲内になるように調節されている。しかし、加齢や疾患など、生体に起こる環境の変化や異常により組織や臓器の機能が低下し、恒常性の維持機構が崩れることがある¹⁴。組織や血液中の環境変化の一つに、酸塩基平衡のアンバランスによる pH 変化がある¹⁸。生体内の pH の調節は、大部分が呼吸（二酸化炭素分圧）と代謝（重炭酸イオン）によって行われていることから、二酸化炭素分圧と重炭酸イオンのバランスが正常な pH の維持に重要である¹⁹。血液の pH の調節が異常になると、その影響は全身に及び、遺伝子の発現レベルや酵素活性、トランスポーター活性など、細胞の様々な機能に影響を及ぼすことが知られている⁴⁸。また、酸塩基平衡の崩れにより起こる酸塩基障害（acid-base disorders）は、血液中の水素イオン（ H^+ ）と重炭酸イオン（ HCO_3^- ）の濃度の異常により、アシドーシスとアルカローシスに分類される⁴⁹。代謝性アシドーシスは重炭酸イオンの減少により起こり、ケトン体や乳酸の蓄積、腎不全や腎臓からの重炭酸イオンの喪失などによって生じる。一方で、代謝性アルカローシスは、重炭酸イオンの増加により起こり、腎機能の低下による重炭酸イオンの排泄障害などによって生じる。これらの重炭酸イオンの濃度の変動による酸塩基障害により、生体の機能を正常に維持することが難しくなり、疾患の発症や進展につながる。このような酸塩基障害は全身に影響し、生体の機能に重大な影響を及ぼす。しかし、重炭酸イオンの濃度の変動が、免疫系、また、マクロファージの機能に与える影響についてはほとんど分かっていない。

重炭酸イオンは、細胞外の pH を調節するだけでなく、細胞内の pH も制御している⁵⁰。細胞内の pH の調節は、体内に取り込まれた二酸化炭素が重炭酸イオンへと変換され、細胞膜を介して細胞内に取り込まれることによって行われる。細胞内への重炭酸イオンの取り込みは細胞膜に存在するトランスポーターを介して行われ、SLC（solute carrier）トランスポーターの SLC4 ファミリーと SLC26 ファミリーが知られている⁵¹。これらのトランスポーターによる細胞内への重炭酸イオンの

取り込みは、細胞の生理的な機能調節において重要である⁵⁰。一方、生体内の重炭酸イオンの濃度は、加齢や病態により変動することが知られており^{52,53}、細胞内へ取り込まれる重炭酸イオンの量も変化すると考えられる。また、最近、SLC4A7 を介したマクロファージへの重炭酸イオンの取り込みが、食食に関わる小胞であるファゴソームの酸性化に関わっていることが明らかとなった⁵⁴。しかし、細胞内の重炭酸イオンの濃度や pH の変化がマクロファージの機能、つまり炎症応答に及ぼす影響については分かっていない。

第一章では、細胞培養液中の重炭酸イオンの濃度が、マクロファージにおける iNOS の発現や NO の産生に影響を及ぼすことを明らかにした。本章では、重炭酸イオンによる M1 マクロファージの炎症応答への影響、さらにその調節機構を解析した。

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. 実験材料

第一章に記載したものに加え、以下のものを用いた。4,4'-Diisothiocyanato-2,2'-stilbenedisulfonic acid disodium salt (DIDS) は Sigma から購入した。S0859 は Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA) から購入した。2',7'-Bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF-AM) と tofacitinib は Abcam (Cambridge, UK) から購入した。一次抗体として以下のものを用いた。Anti-phospho-STAT1 抗体 (Tyr701; AF2894) は R&D System から、anti-STAT1 抗体 (66545-1-Ig) は Proteintech (Rosemont, IL, USA) から、anti-phospho-I κ B α (Ser32/36; #9246)、anti-I κ B α (#9242)、anti-phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182; #9211)、anti-p38 MAPK (#9212)、anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2; Thr202/Tyr204; #9101)、anti-p44/42 MAPK (Erk1/2; #9102)、anti-phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185; #9251)、anti-SAPK/JNK (#9252) の抗体は Cell Signaling から、それぞれ購入した。また、二次抗体である HRP-linked anti-mouse IgG (sc-2371) は Santa Cruz Biotech (Dallas, TX, USA)、HRP-linked anti-rabbit IgG (4030-05) は SouthernBiotech (Birmingham, AL, USA) から購入した。

2.2.2. 細胞培養

マウスマクロファージ系細胞株、RAW264.7 細胞は、10%(v/v) FBS、50 units/mL ペニシリンと 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加した DMEM (Sigma) あるいは NaHCO_3 不含の DMEM (Sigma) を用い、37 °C、 CO_2 インキュベーターで培養した。

2.2.3. マウス骨髄由来マクロファージの調製と培養

C57BL/6J マウス (5~7 週齢、雄 ; 日本エスエルシー) から骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages: BMDMs) を調製した⁵⁵。まず、マウスから骨髄細胞を回収し、30%(v/v)のマウス L929 細胞の培養上清 (L929 細胞由来の macrophage colony-stimulating factor が含まれている)、10%(v/v) FBS、50 units/mL ペニシリンと 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加した RPMI-1640 培地 (Sigma) に細胞を懸濁し、ペトリディッシュで 2 日間、37 °C、 CO_2 インキュベーターで培養した。浮遊している細胞を細胞培養用ディッシュに移し、30%(v/v) L929 細胞の培養上清を含む RPMI-1640 培地でさらに約 10 日間培養した。ディッシュの底面に接着した細胞を BMDMs として、以後の実験に用いた。マクロファージの鑑別は、集細胞遠心装置サイトスピン (Thermo Fisher Scientific) によりシランコーティングしたスライドガラス上に BMDMs の単層塗抹標本を作製し、ディフ・クイック染色により行った。なお、動物を用いた実験の実施は、大阪薬科大学動物実験委員会により承認されており (承認番号 第 21 号)、本学および関連の規程に従った。

2.2.4. 定量 PCR による遺伝子の発現レベルの解析

RNA 抽出には RNAiso Plus (タカラバイオ) を用いた。操作方法は、当該試薬添付のプロトコールに従った。抽出した RNA は NanoDrop Lite を用いて濃度測定し、1%(w/v)アガロースゲル電気泳動により純度を確認した。抽出した RNA を用いて、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix により逆転写反応を行い、cDNA を得た。cDNA と目的遺伝子に特異的なプライマー、Power SYBR Green PCR Master Mix を混合し、LightCycler 96 System (Roche Diagnostics) を用いて、各種遺伝子の発現レベ

ルを $\Delta\Delta Ct$ 法により解析した。用いたプライマーは表2-1に示した。遺伝子の発現レベルの定量は、GAPDHをリファレンス遺伝子として行った。

表 2-1. 定量 PCR による遺伝子の発現レベルの解析に用いたプライマーのヌクレオチド配列

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
IL-6	5'-GCTACCAAAGCTGGATATAATCAGGA-3'	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
iNOS	5'-CTTTGCCACGGACGAGAC-3'	5'-TCATTGTACTCTGAGGGCTGAC-3'
COX-2	5'-GATGCTCTTCCGAGCTGTG-3'	5'-GGATTGGAACAGCAAGGATTT-3'
IL-1 β	5'-TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA-3'	5'-TTGTCTAATGGGAACGTCACAC-3'
TNF- α	5'-TCTTCTCATTCTGCTTGTGG-3'	5'-GGTCTGGGCCATAGAAGTGA-3'
MCP-1	5'-CCATCAGTCCTCAGGTATTGG-3'	5'-CTTCCGGACGTGAATCTTCT-3'
GAPDH	5'-GGAAAGCTGTGGCGTGATG-3'	5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3'

2.2.5. PCR による遺伝子発現の検出

PCRによる遺伝子発現の検出は、Taq DNA polymeraseを含むGoTaq Green Master Mix (Promega; Madison, WI, USA)と目的遺伝子に特異的なプライマー、RAW264.7細胞のcDNAを用いて行った。用いたプライマーは表2-2に示した。PCRはサーマルサイクラー (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)を用いて下記の条件で行った。95°Cで2分間反応させた後に、95°Cを30秒間、55°Cを30秒間、72°Cを10秒間を1サイクルとして30サイクル行い、最後に72°Cで2分間反応させた。得られたPCR産物は、2%(w/v)アガロースゲル電気泳動により分離した。PCR産物の検出は、GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium; Fremont, CA, USA)を含むアガロースゲルを用い、紫外線照射によりDNAを可視化した。

表 2-2. PCR に用いたプライマーのヌクレオチド配列

遺伝子	Forward primer	Reverse primer	増幅サイズ (bp)
SLC4A1	5'-GCAGCAACTCTCATGACAGAAA-3'	5'-AGCACCAGGCTACAGTCCA-3'	110
SLC4A2	5'-CATGTGGCCTCACTGCTCT-3'	5'-CAGGCAGGGTCTGCTGAT-3'	97
SLC4A3	5'-CAGGGATGTGCCTGGAGT-3'	5'-AGACACGGAGTGTGTTGTAATGA-3'	104
SLC4A4	5'-AGGATGTTTAGCAACCCTGATAAT-3'	5'-CTGGTTTATCAGAAATGTCATTGAG-3'	91
SLC4A5	5'-CAGAGAAGGAGGTGGCAATG-3'	5'-CCATGGGGATCTTTACAACCTG-3'	60
SLC4A7	5'-CAGATGAAATGGCCAAAACCTG-3'	5'-TTGGCATTCTCAGTATTCATGG-3'	61
SLC4A8	5'-CCCGAGCAAGTGTAGACCTC-3'	5'-TGTCCCAGCTCACTAGTCACA-3'	61
SLC4A9	5'-GAGGGCATTGTCCTGCTAGA-3'	5'-TCCCCACTGACTACCTGCTC-3'	71
SLC4A10	5'-GAGGGACAGAGAGAGATTCG-3'	5'-AAGAATAAACTGCACCCTCTGC-3'	88
SLC26A3	5'-TTGTGTTTCAGGACCCAATTC-3'	5'-CACTTCGGCATAATTCCTTTTATTC-3'	92
SLC26A4	5'-TCTGTCTCGAACGGCTGTC-3'	5'-GATGGCAACCATCACAATCA-3'	88
SLC26A6	5'-GAGATCTTGAAGGAGGGGAGA-3'	5'-CTGATGTGTCCCTTGGTCTG-3'	149
SLC26A7	5'-CTATGCAATAGGACCTCTGCTG-3'	5'-CCTTCAGGCCCAACAATA-3'	74
SLC26A8	5'-GGTGTCTGTGACTGTGAAGAACT-3'	5'-CCTGTCTGTTTTCATATCGCTCT-3'	75
SLC26A9	5'-CCAGACCGCAACTTCCAT-3'	5'-TGGGACCTTCCTCTTCTGAGT-3'	73
SLC26A11	5'-TGGCTTTGGACAGATCAAGA-3'	5'-GATGTGGAGGAAGGTGTGGT-3'	88

2.2.6. IL-6 の産生量の測定

細胞の培養液を遠心分離（4°C, 11,000×g, 1 min）し、その上清を測定試料とした。試料中の IL-6 の量は、Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit（R&D Systems）を用いて定量した。操作方法は、当該キット添付のプロトコールに従った。

2.2.7. NO の産生量の測定

培養上清中の NO₂ 量を蛍光法により測定した。操作は、「1.2.4. NO の産生量の測定」に記載の方法と同様にして行った。

2.2.8. プロスタグランジン E₂ (PGE₂) の産生量の測定

細胞の培養液を遠心分離 (4°C, 11,000×g, 1 min) し、その上清を測定試料とした。試料中の PGE₂ の量は Prostaglandin E₂ Express ELISA Kit (Cayman Chemical) を用いて定量した。操作方法は、当該キット添付のプロトコールに従った。

2.2.9. 細胞外および細胞内の pH の測定

細胞外 pH (pHe) は pH メーターを用いて測定した。細胞内 pH (pHi) は pH 感受性色素である BCECF-AM を細胞に取り込ませて測定した。まず、5 μM BCECF-AM を加えた HEPES 緩衝液 (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose) 中に細胞を懸濁し、37°C で 30 分間反応させた。HEPES 緩衝液で細胞を洗浄し、DMEM で細胞を懸濁して培養ディッシュに播種した。4 時間培養後、培地を測定用の緩衝液 (10 mM HEPES, pH 6.8, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 5-40 mM NaHCO₃) に交換して、37°C で 30 分間培養した。マイクロプレートリーダー (EnSpire 2300) を用いて 500 nm の励起波長による 530 nm の蛍光波長を測定した。pHi の算出には、Intracellular pH Calibration Buffer Kit (Thermo Fisher Scientific) により作成した検量線を用いた。

2.2.10. タンパク質の発現解析

培養後の細胞を氷冷した PBS で 2 回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤カクテル [1%(v/v); ナカライテスク] とホスファターゼ阻害剤 (5 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 50 μM Na₂MO₄) を加えた RIPA 緩衝液 [50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1%(v/v) Nonidet P-40, 1%(v/v) Triton X-100, 0.1%(w/v) SDS, 0.5%(w/v) sodium deoxycholate] で懸濁した。細胞懸濁液を Handy Sonic 超音波発生機 (UR-20P; トミー精工) を用いて氷中で 2 回、10 秒間破碎し、遠心分離 (4°C, 11,000×g, 5 min) で得られた上清をタンパク質抽出液とした。BCA 法によりタンパク質抽出液のタンパク質濃度を測定した。一定量のタンパク質を 2.5%(v/v) 2-mercaptoethanol を含む Laemmli サンプルバッファー (Bio-Rad Laboratories) で調製し、95°C で 5 分間加温した後に、10%のポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL)

を用いて電気泳動を行った。電気泳動後のゲルからタンパク質を Immobilon PVDF 膜へ転写した。転写後の膜は、Immobilon Signal Enhancer (Merck Millipore) を用いて室温で 1 時間振とう後、Immobilon Signal Enhancer で希釈した各種一次抗体を用いて 4 °C で一晩反応させた。二次抗体を用いた反応は室温で 1 時間振とうして行った。抗体との反応後の膜を Pierce Western Blotting Substrate と反応させ、LAS-3000 mini を用いて化学発光を検出した。結果の定量には Multi Gauge software (富士フイルム) を用いた。

2.2.11. 統計解析

実験の結果は、3 回以上独立した実験を行い、それらの平均値±標準偏差 (S.D.) で示した。2 群間の比較には Student's *t*-test、3 群以上の間の比較には Tukey method を用い、*p* 値が 0.05 未満のものを有意な差があるとした。

2.3. 結果と考察

2.3.1. RAW264.7 細胞における炎症関連遺伝子の発現に対する重炭酸イオンの影響

IFN- γ 、LPS あるいは LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞での炎症関連遺伝子の発現における NaHCO₃ の影響を調べた。10~40 mM の NaHCO₃ と LPS、IFN- γ を加えた培地で RAW264.7 細胞を 6 時間培養したところ、IL-6 や iNOS、cyclooxygenase (COX) -2 の遺伝子の発現レベルは NaHCO₃ 濃度の増加に依存して上昇した (図 2-1A)。一方で、IFN- γ あるいは LPS のみを加えた培地で培養した細胞では、これらの炎症関連遺伝子の発現レベルは変化しなかった (図 2-1A)。また、0~40 mM の NaHCO₃ と LPS、IFN- γ を含む培地を用いて RAW264.7 細胞を培養したところ、IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルは、NaHCO₃ 濃度が高くなるほど上昇することが分かった (図 2-1B)。また、LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞における IL-6 や NO、PGE₂ の産生量を調べたところ、10 mM NaHCO₃ を含む培地で培養した場合と比較して、40 mM NaHCO₃ の時では、IL-6 や NO、PGE₂ の産生量がいずれも有意に上昇した (図 2-1C-E)。一方で、IL-1 β や TNF- α 、monocyte chemoattractant protein-1 [MCP-1; chemokine (C-C motif) ligand 2: CCL2] の遺伝子の発現は、NaHCO₃ 濃度を上昇させても促進されることはなかった。しかし、LPS を含む培地で培養した細胞において、MCP-1 の遺伝子発現レベルは低下した (図 2-2)。また、NaHCO₃ により遺伝子の発現レベルが変化した IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルは、NaHCO₃ の代わりに KHCO₃ を添加した場合においても、同様に上昇した (図 2-3)。これらの結果から、重炭酸イオン (HCO₃⁻) が LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞において、IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルを上昇させ、IL-6 や NO、PGE₂ の産生量を増加させることが分かった。

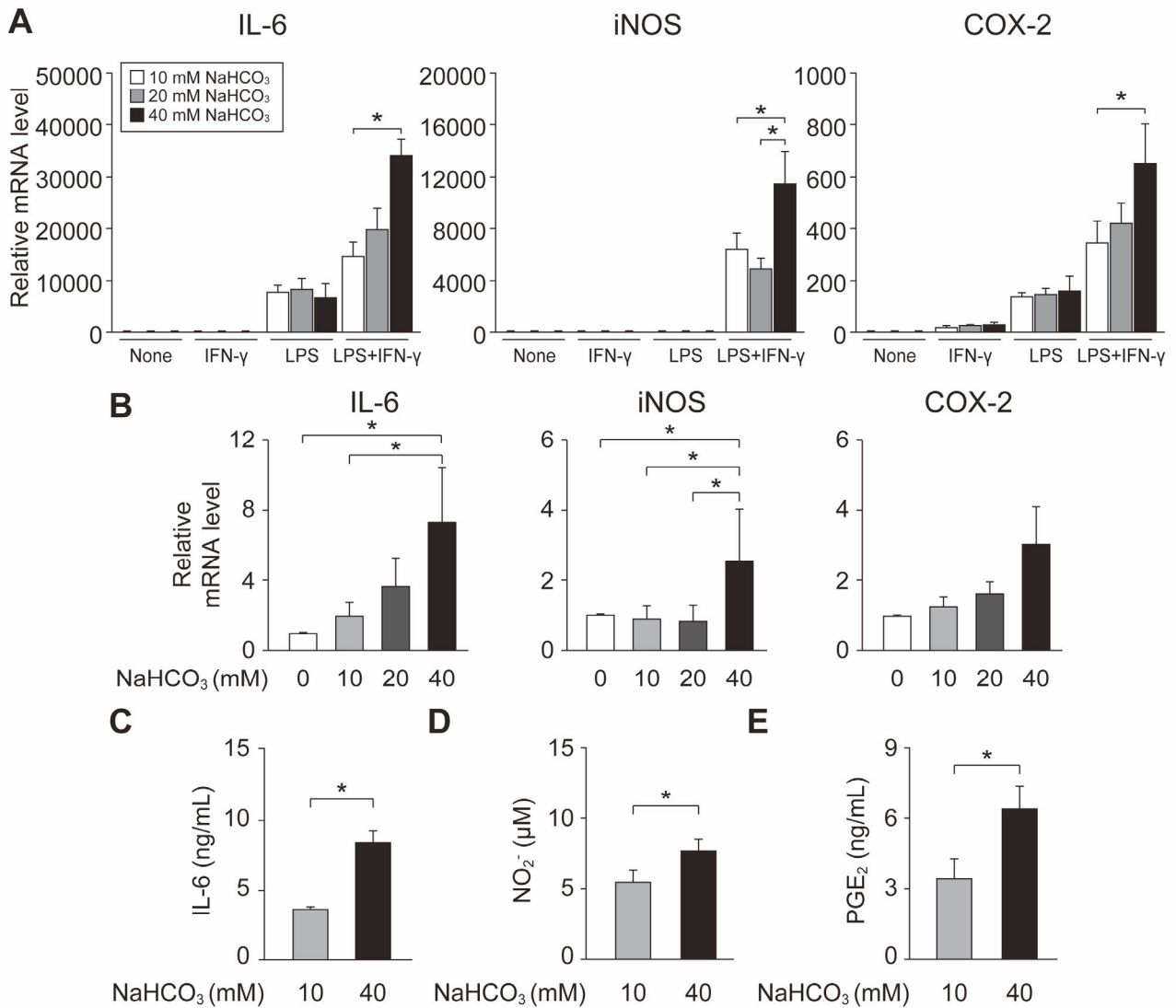


図 2-1. RAW264.7 細胞における炎症関連遺伝子の発現レベルおよびそれらの産物の産生量への NaHCO₃ の影響

(A, B) 遺伝子の発現レベルの変化。0~40 mM の NaHCO₃ を含む DMEM に 10 units/mL IFN- γ や 100 ng/mL LPS を加え、RAW264.7 細胞を 6 時間培養した。遺伝子の発現レベルは定量 PCR により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は* p <0.05 として表した。(C) IL-6 の産生量。10 mM あるいは 40 mM の NaHCO₃ を含む DMEM に 10 units/mL IFN- γ と 100 ng/mL LPS を加え、RAW264.7 細胞を 8 時間培養した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は、* p <0.05 として表した。(D) NO の産生量。図 2-1(C)に記載した方法で細胞を培養した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は* p <0.05 として表した。(E) PGE₂ の産生量。図 2-1(C)に記載した方法で細胞を 6 時間培養した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は* p <0.05 として表した。

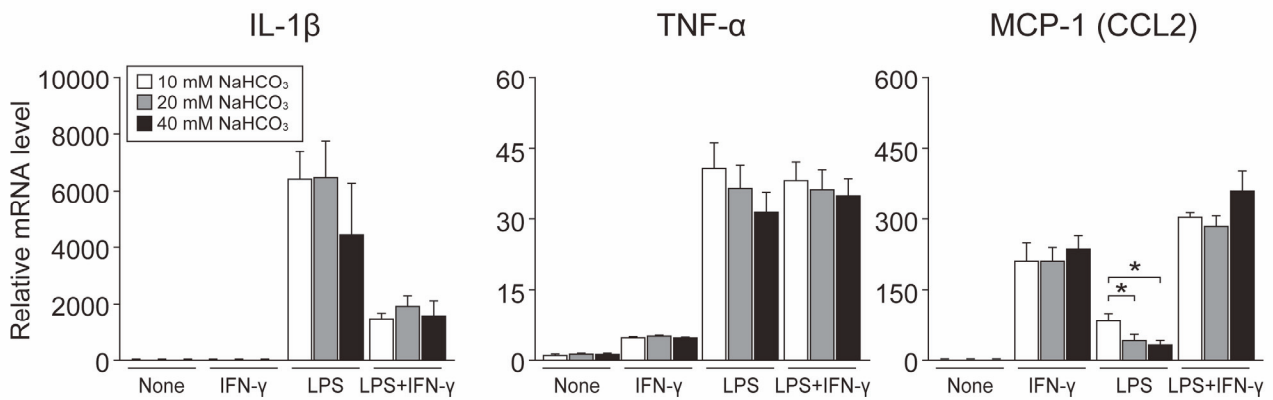


図 2-2. RAW264.7 細胞における炎症関連および走化性因子の遺伝子の発現レベルへの NaHCO₃ の影響

10~40 mM の NaHCO₃ を含む DMEM に 10 units/mL IFN- γ や 100 ng/mL LPS を加え、RAW264.7 細胞を 6 時間培養した。遺伝子の発現レベルは定量 PCR により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は $*p < 0.05$ として表した。

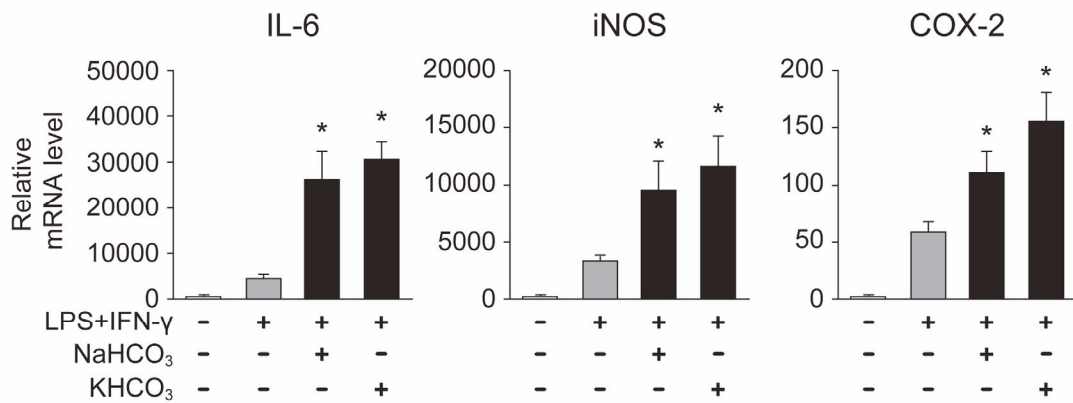


図 2-3. RAW264.7 細胞における炎症関連遺伝子の発現レベルに対する NaHCO₃ や KHCO₃ の影響

40 mM NaHCO₃ あるいは 40 mM KHCO₃ を含む DMEM に 10 units/mL IFN- γ と 100 ng/mL LPS を加え、RAW264.7 細胞を 6 時間培養した。遺伝子の発現レベルは定量 PCR により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は、LPS と IFN- γ を含む DMEM で培養した RAW264.7 細胞の結果と比較し、 $*p < 0.05$ として表した。

2.3.2. 重炭酸イオンの細胞内への取り込みが RAW264.7 細胞の炎症応答に及ぼす影響

重炭酸イオンの細胞内への取り込みおよび細胞外への排出には、細胞膜に局在する SLC トランスポーターである SLC4 ファミリーと SLC26 ファミリーが関わっている⁵⁰。そこで、RAW264.7 細胞における SLC4 ファミリーと SLC26 ファミリーの発現を調べた。PCR を用いた解析から、RAW264.7 細胞では、SLC4 ファミリーの SLC4A2 と SLC4A7 および SLC26 ファミリーの SLC26A6 と SLC26A11 が発現していることが分かった (図 2-4)。

LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞における重炭酸イオンの細胞内への取り込みを調べるために、SLC トランスポーターを阻害する DIDS あるいは SLC4A7 を特異的に阻害する S0859 を用いて解析した。あらかじめ DIDS を含む培地で培養した RAW264.7 細胞を LPS と IFN- γ 、NaHCO₃ を加えて培養したところ、NaHCO₃ による IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルの上昇は、DIDS の濃度の上昇に依存して抑制された (図 2-5A)。また、NaHCO₃ によるこれら炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇は、あらかじめ S0859 を含む培地で培養することによっても抑制された (図 2-5A)。一方で、DIDS と S0859 は、LPS と IFN- γ を添加した NaHCO₃ を含まない培地で培養した RAW264.7 細胞では、IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルに目立った影響を及ぼさなかった (図 2-5A)。これらの結果から、LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞における NaHCO₃ による炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇は、SLC4A7 を介した細胞内への重炭酸イオンの取り込みが関わることを示唆された。

次に、培地に NaHCO₃ を添加した場合の細胞外 pH (pHe) と細胞内 pH (pHi) の変化を調べた。様々な濃度の NaHCO₃ を含む培地で培養した時の pHe および pHi は、いずれも NaHCO₃ の濃度を増加させることで上昇した (図 2-5B)。さらに、NaHCO₃ による RAW264.7 細胞の pHi の上昇は、DIDS や S0859 などの SLC トランスポーター阻害剤であらかじめ処理しておくことによって抑えられた (図 2-5B)。これらの結果から、RAW264.7 細胞における NaHCO₃ による炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇には、重炭酸イオンが SLC4A7 を介して細胞内に入り、pHi が上昇することが関わっていることが示された。

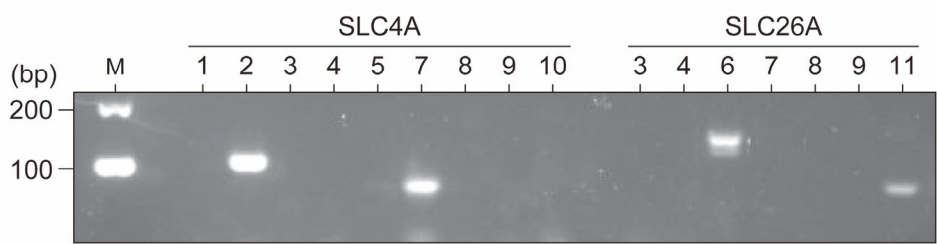


図 2-4. RAW264.7 細胞における SLC4 および SLC26 ファミリー遺伝子の発現

RAW264.7 細胞における SLC4 および SLC26 ファミリーの遺伝子の発現を PCR により解析した。PCR 産物は、2%(w/v)アガロースゲル電気泳動により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。“M”は分子量マーカを示し、その分子量のサイズ (bp) を結果の左側に記した。

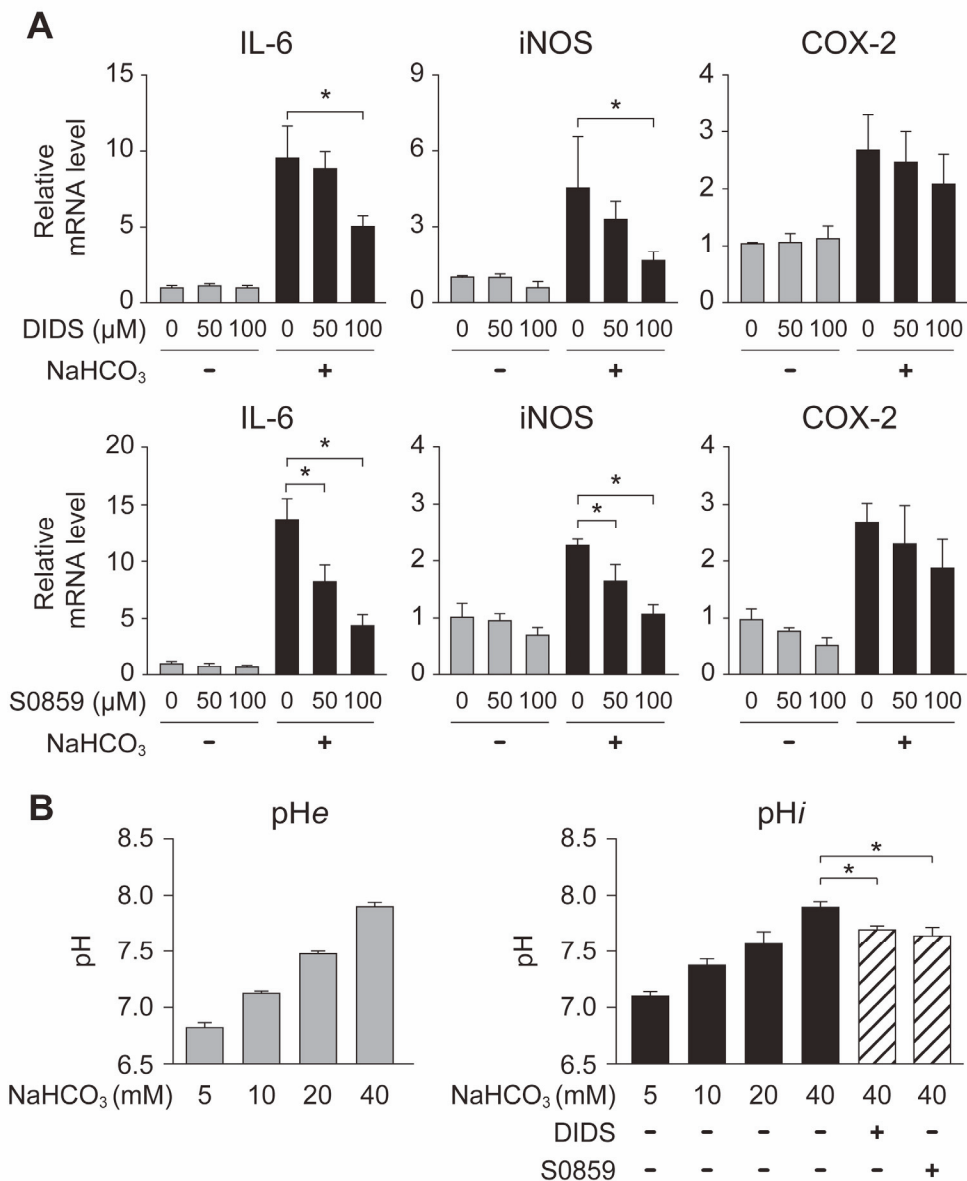


図 2-5. 重炭酸イオンによる RAW264.7 細胞における炎症関連遺伝子の発現レベルと SLC トランスポーター阻害剤の影響

(A) SLC トランスポーター阻害剤による炎症関連遺伝子の発現レベルの変化。RAW264.7 細胞を SLC トランスポーター阻害剤である DIDS (0-100 μM) あるいは SLC4A7 の特異的な阻害剤である S0859 (0-100 μM) で 30 分間、あらかじめ NaHCO₃ 不含の DMEM で培養した。0 mM あるいは 40 mM NaHCO₃ と 10 units/mL IFN-γ、100 ng/mL LPS を含む培地で RAW264.7 細胞を 6 時間培養した。遺伝子の発現レベルは定量 PCR により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は **p*<0.05 として表した。(B) pHe と pHi の測定。RAW264.7 細胞を 5 μM BCECF を含む HEPES 緩衝液中で 30 分間 37 °C でインキュベートした後、DMEM で細胞を懸濁し、96 穴プレートに播種して 4 時間培養した。100 μM DIDS あるいは 100 μM S0859 で細胞を 30 分間あらかじめ培養し、次いで 5~40 mM の NaHCO₃ を含む HEPES 緩衝液中で 30 分間処理した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値±S.D.として示した。有意差は **p*<0.05 として表した。

2.3.3. 重炭酸イオンが LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞の細胞内シグナル伝達に及ぼす影響

次に、LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞における重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇に至る機構を解析した。マクロファージは、LPS や IFN- γ により、Janus kinase/signal transducers and activator of transcription (JAK/STAT) や nuclear factor-kappa B (NF- κ B)、mitogen-activated protein kinase (MAPK) [p38 MAPK や p44/42 (extracellular signal-regulated kinase 1/2: Erk1/2)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)などを介する経路]などのシグナル伝達経路が活性化される^{56,57}。

10 mM あるいは 40 mM の NaHCO₃ と LPS、IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞において、STAT1 のリン酸化 (p-STAT1) レベルが、培養開始後 15 分と 30 分で一過的に上昇し、その後 120 分まで徐々に減少した (図 2-6A)。培養開始 15 分後と 30 分後における p-STAT1/STAT1 の比は、40 mM の NaHCO₃ を含む培地で培養した場合の方が 10 mM NaHCO₃ の時より高かった (図 2-6B)。一方、p-I κ B α /I κ B α や p-p38/p38、p-p44/42/p44/42、p-JNK/JNK の比に明らかな変化は見られなかった (図 2-6A, B)。

LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞において、NaHCO₃ による炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇に JAK/STAT 経路が関与しているかを調べるために、JAK の阻害剤である tofacitinib を用いて解析を行った。RAW264.7 細胞をあらかじめ tofacitinib を含む培地で培養した後、LPS と IFN- γ を含む培地で培養し、NaHCO₃ によって発現レベルが上昇する炎症に関連する IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルを調べた。Tofacitinib を含む培地であらかじめ培養しておくことによって、いずれの炎症関連遺伝子の発現レベルは低下した (図 2-7A)。さらに、NaHCO₃ によって上昇する p-STAT1/STAT1 の比は、DIDS や S0859 であらかじめ処理することにより低下した (図 2-7B)。これらの結果から、RAW264.7 細胞における NaHCO₃ による炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇は、SLC4A7 を介した重炭酸イオンの細胞内への取り込みにより JAK/STAT 経路が活性化されることによることが示された。

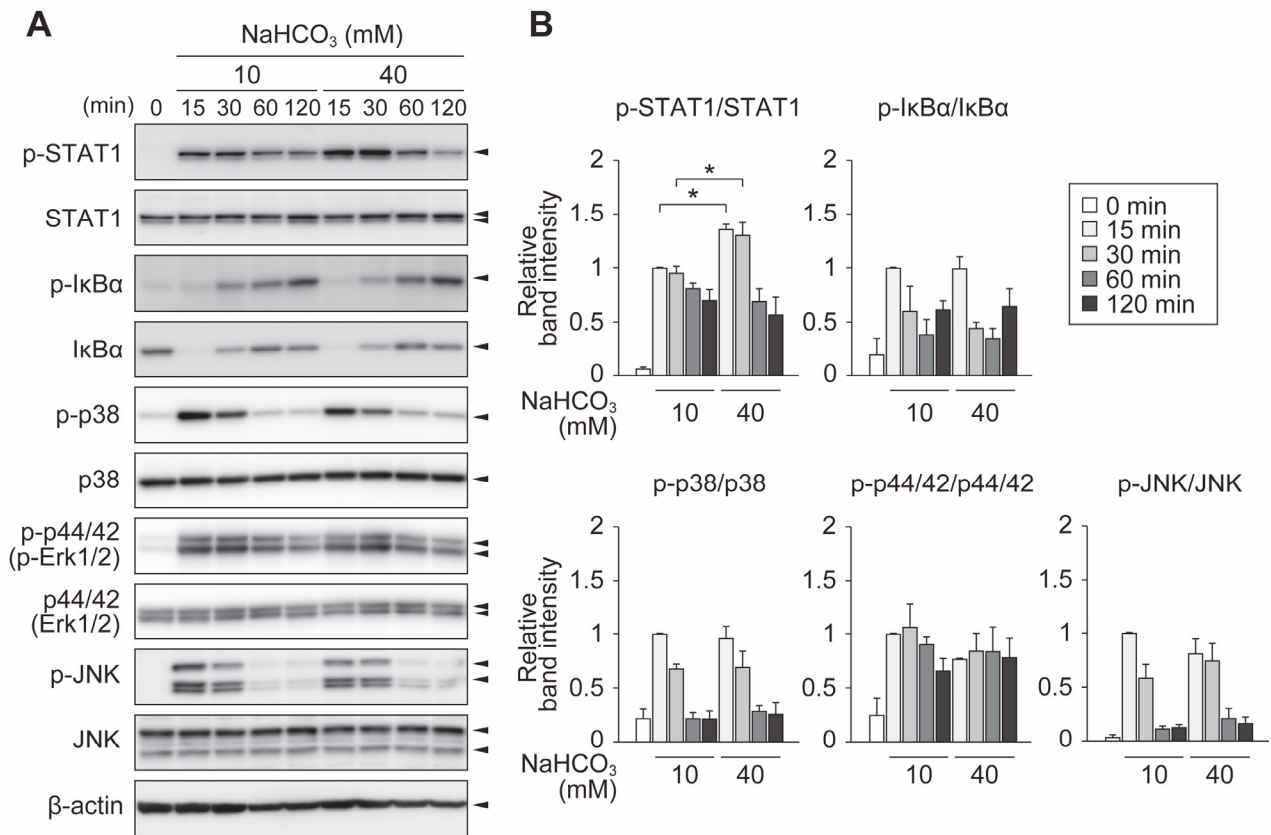


図 2-6. 重炭酸イオンによる STAT1 や IκBα、p38、p44/42、JNK の活性化の検討

(A) 各シグナル伝達経路のタンパク質の発現およびリン酸化レベルの変化。10 mM あるいは 40 mM の NaHCO₃ と 10 units/mL IFN-γ、100 ng/mL LPS を含む DMEM で、RAW264.7 細胞を 0~120 分間培養した。15 μg/lane で解析し、β-actin タンパク質を内部標準とした。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的なものを示した。(B) ウェスタンブロット解析の結果の定量。図 2-6(A)で行った 3 回の実験結果を定量し、それぞれのリン酸化レベルの比を算出した。10 mM NaHCO₃ と LPS、IFN-γ を含む培地で 15 分間培養した場合の結果を 1 とし、その相対値の平均値±S.D.として示した。有意差は*p<0.05 として表した。

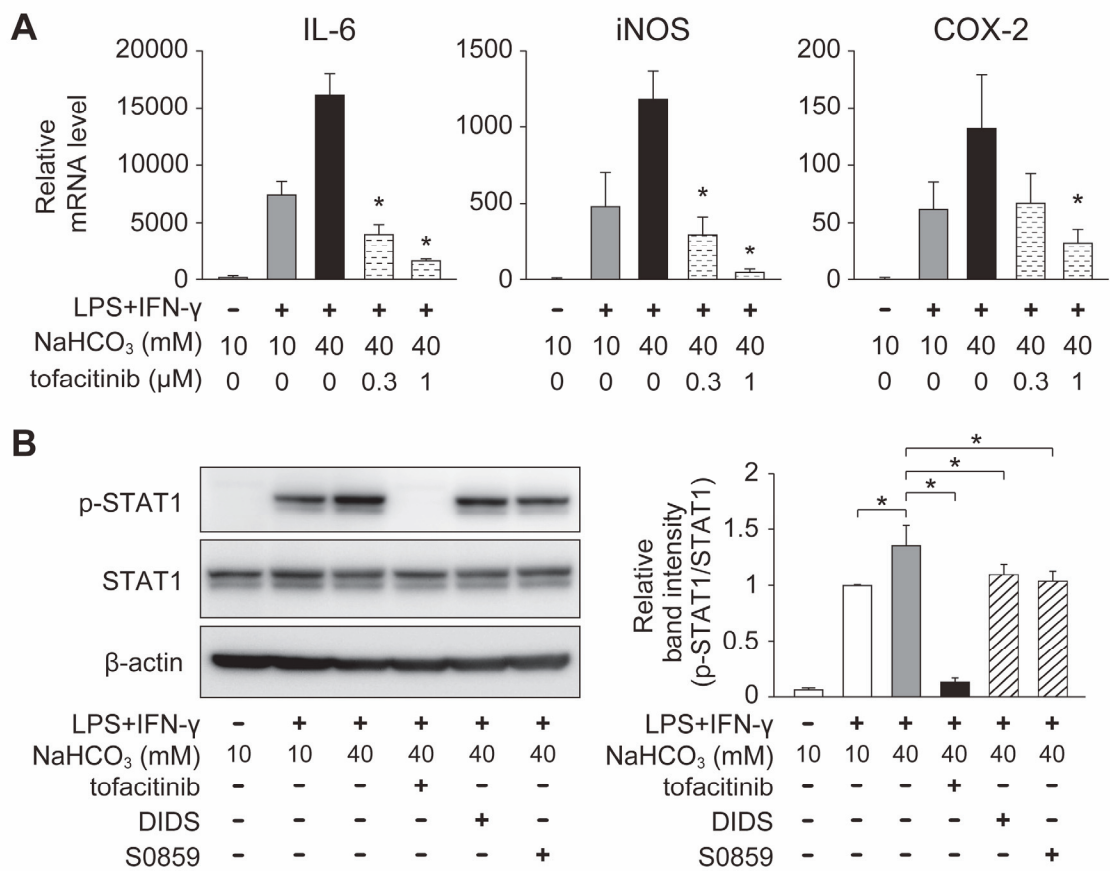


図 2-7. 重炭酸イオンによる JAK/STAT 経路の活性化の検討

(A) JAK の阻害剤による遺伝子の発現レベルの変化。Tofacitinib (0-1 μ M) を加えた NaHCO₃ 不含の DMEM で RAW264.7 細胞を 60 分間前処理後、10 mM あるいは 40 mM の NaHCO₃ と 10 units/mL IFN- γ 、100 ng/mL LPS を含む培地で RAW264.7 細胞を 6 時間培養した。遺伝子の発現レベルは、定量 PCR により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は、40 mM NaHCO₃ と LPS、IFN- γ を含む溶液で培養した RAW264.7 細胞の結果（黒の棒グラフ）と比較し、* p <0.05 として表した。(B) STAT1 のタンパク質の発現およびリン酸化レベル。NaHCO₃ 不含の DMEM を用い、1 μ M tofacitinib で 60 分間あるいは 100 μ M DIDS や 100 μ M S0859 で 30 分間、RAW264.7 細胞を前処理し、その後 10 units/mL IFN- γ と 100 ng/mL LPS を含む培地で 30 分間培養した。15 μ g/lane で解析し、 β -actin タンパク質を内部標準とした。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的な結果を示した。3 回の実験結果を定量し、p-STAT1/STAT1 の比を算出した。10 mM NaHCO₃ と LPS、IFN- γ を含む培地で培養した条件を 1 とし、それぞれの相対値の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は* p <0.05 として表した。

2.3.4. BMDMs における重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現レベルの変化と JAK/STAT 経路の活性化

重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現レベルの上昇が、骨髄由来のマクロファージである BMDMs においても見られるのかを調べた。マウスから骨髄細胞を回収し、BMDMs へと分化させた。分化させた BMDMs の 99%以上がマクロファージであることをディフ・クイック染色により鑑別し、均一な細胞集団であることを確認した (図 2-8)。10 mM あるいは 40 mM の NaHCO_3 および LPS、 $\text{IFN-}\gamma$ を含む培地で BMDMs を培養した。40 mM NaHCO_3 を添加した培地では、10 mM NaHCO_3 の場合と比べ、IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子の発現レベルが上昇した (図 2-9A)。また、10 mM あるいは 40 mM の NaHCO_3 を含む培地で培養したところ、全体の STAT1 レベルは変化しなかったものの、p-STAT1 レベルは 40 mM NaHCO_3 を添加して培養した時の方が 10 mM NaHCO_3 で培養した時より上昇した (図 2-9B)。また、p-STAT1/STAT1 の比は、10 mM NaHCO_3 を含む培地で培養した場合より 40 mM NaHCO_3 の方が上昇した (図 2-9B)。これらの結果から、BMDMs において、重炭酸イオンが JAK/STAT 経路の活性化を介して炎症関連遺伝子の発現レベルを上昇させることが分かった。

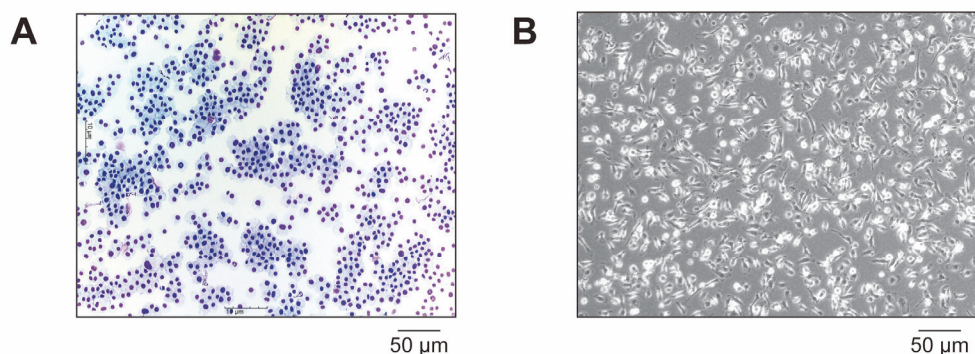


図 2-8. BMDMs の形態観察

(A) BMDMs のディフ・クイック染色。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的なものを示した。(B) BMDMs の細胞の形態。BMDMs を培養ディッシュに播種し、一晚経過後に撮影した。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的なものを示した。

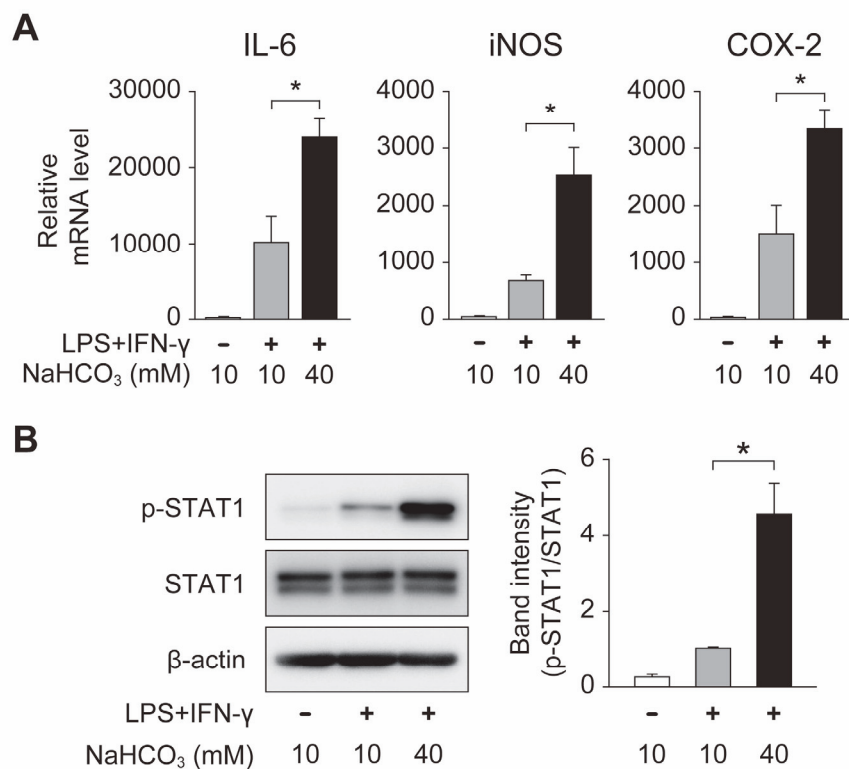


図 2-9. BMDMs における NaHCO₃ による炎症関連遺伝子の発現レベルの変化と JAK/STAT 経路の活性化

(A) 遺伝子の発現レベルの変化。10 mM あるいは 40 mM の NaHCO₃ を含む DMEM/F-12 培地に 10 units/mL IFN- γ と 10 ng/mL LPS を加え、BMDMs を 6 時間培養した。遺伝子の発現レベルは、定量 PCR により解析した。結果は、独立して行った 3 回の実験の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は $*p<0.05$ として表した。(B) STAT1 タンパク質の発現、リン酸化レベル。図 2-9(A)で記した条件で、BMDMs を 30 分間培養した。それぞれのレーンには 7.5 μ g のタンパク質を用い、 β -actin タンパク質を内部標準とした。結果は、独立して行った 3 回の実験のうち、代表的なものを示した。3 回の実験の結果を定量し、p-STAT1/STAT1 の比を算出した。10 mM NaHCO₃ と LPS、IFN- γ で含む培地で培養した条件を 1 とし、その相対値の平均値 \pm S.D.として示した。有意差は $*p<0.05$ として表した。

2.4. まとめ

マクロファージの炎症応答は、病原体や組織の異常などから我々の身体を守る重要な反応の一つであり、炎症性のサイトカインや細胞を障害する物質の分泌を介して起こる。一方で、これらの物質は、組織の線維化や障害を起こす原因になることがある¹⁰。そのため、マクロファージの炎症応答は、生体内の恒常性を維持するために、厳密に制御されていなければならない。しかしながら、マクロファージの炎症応答や可塑性は、細胞周囲の pH やイオン濃度などの環境変化によって影響を受けることが知られている。第一章では、細胞外の重炭酸イオンが、マクロファージの iNOS の発現および NO や TNF- α 、IL-1 β の産生に影響を及ぼすことを明らかにした。そこで、本章では、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への影響、さらにその調節機構を解析した。

マクロファージが産生する IL-6 や NO、PGE₂ などの物質は、生体内における炎症応答や病原体の排除において重要な役割を果たす。IL-6 は炎症性サイトカインの一つであり、炎症が起こった際にマクロファージなどの免疫細胞から速やかに分泌され、周囲の細胞に対してさらなる炎症反応を促す役割を持つ。また、関節リウマチやクローン病などの自己免疫疾患の病態の進展にも関与している⁵⁸。NO は高い反応性を示すガス状の物質であり、マクロファージにおける iNOS による NO の産生は、細菌などの病原体の感染防御において重要である⁵⁹。一方で、NO の過剰産生は宿主の細胞や組織を障害し、酸化ストレス反応を引き起こす要因にもなる⁶⁰。PGE₂ は細胞膜を構成するリン脂質由来のアラキドン酸から生成される生理活性物質であり、マクロファージにおいて COX-2 により生成される PGE₂ は、炎症や発熱の応答などに関与している⁶¹。

酸塩基平衡は、恒常性の維持に重要であり、その不均衡は細胞の機能を変化させることがある⁴⁰。⁴⁸。酸塩基障害は血液の水素イオン (H⁺) あるいは重炭酸イオン (HCO₃⁻) の濃度により、アシドーシスとアルカローシスに分類される。局所環境の酸性化は、虚血や炎症、固形がんなどの病態でしばしば見られる^{62, 63}。細胞外の酸性化は、免疫細胞の炎症性遺伝子の発現低下やサイトカイン産生の減弱などを引き起こすことが報告されており、免疫応答に不利益が生じると考えられている⁶⁴。⁶⁵。一方で、アルカローシスは、持続的な下痢や嘔吐、低カリウム血症、利尿剤の使用などが原因

となって起こるが、局所環境の免疫細胞に与える影響はほとんど分かっていない。本研究では、細胞外の重炭酸イオン濃度を上昇させた際に生じる細胞内外の pH の上昇が、マクロファージからの炎症応答に関わる物質の産生に及ぼす影響を調べた。

重炭酸イオンは、血液などの体液や細胞内の pH を調節するはたらきを持つ重要な因子であり、細胞内外への重炭酸イオンの取り込みや排出には、SLC4 ファミリーと SLC26 ファミリーのトランスポーターが関与している⁵¹。哺乳動物の SLC4 ファミリーは、10 種類 (SLC4A1-5, 7-11) に分類される⁶⁶。機能的に分類すると、Cl⁻/HCO₃⁻の交換輸送体と Na⁺/HCO₃⁻の共輸送体、Na⁺/B(OH)₄⁻の共輸送体に分けられ、9 種類 (SLC4A1-5, 7-10) が重炭酸イオンの取り込みや排出に関わっている^{67, 68}。一方で、SLC26 ファミリーは、11 種類 (SLC26A1-11) に分類され、Cl⁻や HCO₃⁻、SO₄²⁻、C₂O₄²⁻などの交換輸送体があり、そのうちの 7 種類 (SLC26A3-4, 6-9, 11) が HCO₃⁻の取り込みや排出に関わっている⁶⁹。RAW264.7 細胞では、SLC4A2 と SLC4A7、SLC26A6、SLC26A11 の 4 つが発現していた (図 2-4)。細胞は、様々な要因による pHe の変動に応じて、各種トランスポーターを介した pH_i の制御を行っている。本研究では、細胞外の重炭酸イオン濃度の上昇により、RAW264.7 細胞の pHe および pH_i の上昇だけでなく、炎症関連遺伝子である IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子発現レベルが上昇することを明らかにした (図 2-1, 2-5B)。また、重炭酸イオンのトランスポーターである SLC4A7 に特異的な阻害剤である S0859 により、IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子発現レベルの上昇および pH_i の上昇はいずれも抑えられた (図 2-5)。これらの結果から、重炭酸イオンによる RAW264.7 細胞の IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子発現は、SLC4A7 を介した重炭酸イオンの細胞内への取り込みにより制御されていることが示された。

マクロファージは、LPS や IFN- γ により、JAK/STAT や NF- κ B、MAPK などのシグナル伝達経路が活性化され、炎症性サイトカインや細胞を障害する物質の分泌が亢進する^{56, 57}。中でも、JAK/STAT 経路の一つである STAT1 経路は、主に IFN により活性化する経路であり、IFN 受容体の細胞質側にある JAK の自己リン酸化によって活性化することでシグナルが伝達される⁷⁰。活性化した JAK により STAT1 タンパク質がリン酸化され、その後、炎症関連遺伝子の発現が誘導される。同時に、サイトカインのシグナル伝達経路を抑制する suppressor of cytokine signaling (SOCS) 分子の発現にも関わっており、炎症応答を制御する重要な経路の一つである⁷¹。さらに、この経路の活

性化は、多くの細胞のストレスに応答したアポトーシスにも関わっている^{71,72}。マクロファージの JAK/STAT 経路の活性化は、IL-6 や iNOS、COX-2 などの炎症関連遺伝子の発現レベルを上昇させるが、このシグナル伝達経路は LPS によってさらに増強されることが分かっている⁷³⁻⁷⁶。今回、重炭酸イオンにより、LPS と IFN- γ を含む培地で培養した RAW264.7 細胞の iNOS や IL-6、COX-2 の遺伝子発現レベルは上昇したものの、IL-1 β や TNF- α 、MCP-1 (CCL2) の遺伝子の発現レベルは上昇しなかった (図 2-1A, 2-2)。この結果から、重炭酸イオンによるマクロファージへの効果は、JAK/STAT 経路に関わる遺伝子の発現に強く影響が見られることが考えられた。また、RAW264.7 細胞と同様に、マウスの骨髄細胞から分化させたマクロファージ (BMDMs) においても、重炭酸ナトリウムによる iNOS や IL-6、COX-2 の遺伝子発現および JAK/STAT 経路の活性化の増強が確認された (図 2-9)。さらに、これらの遺伝子発現と STAT1 の活性化は、JAK 阻害剤である tofacitinib により減弱した (図 2-7A, B)。これらの結果から、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の増強は、JAK/STAT 経路の活性化を介していることが示された。

重炭酸イオンのマクロファージに対する影響には、pHe と pHi の上昇が考えられる。本研究では、SLC4A7 を介した細胞内への重炭酸イオンの取り込みによる pHi の上昇が、マクロファージの炎症応答を増強することを示した。これらの結果から、生体内における重炭酸イオンの濃度の変動により、マクロファージの炎症応答が制御されることを示唆する。今後、生体内の局所における重炭酸イオンの炎症応答への影響など、動物個体を用いた解析を行う必要がある。

結論

マクロファージは、全身に広く分布する免疫系の細胞であり、組織の環境や刺激に応じて異なる機能を発揮するポピュレーションへと分極する⁷⁷。細菌やウイルスなどの感染防御や炎症の促進反応を担うマクロファージは、いわゆる M1 マクロファージに分類される。M1 マクロファージは、IFN- γ や LPS などにより誘導され、IL-1 β や IL-6、TNF- α などの炎症性サイトカインおよび O₂⁻ や NO などの細胞障害性物質を産生する⁸。M1 マクロファージが産生するこれらの物質は、炎症反応などの免疫応答に重要な役割を示すが、慢性疾患などの病態の進展にも関わる。そのため、M1 マクロファージの機能を制御することは、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）が変わると、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²⁶。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、第一章は、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の中から探索した。具体的には、マクロファージ J774.1/JA-4 細胞を用いて、組成の異なる 2 種類の培地に IFN- γ 、LPS あるいは LPS と IFN- γ を加え、O₂⁻ や NO、TNF- α 、IL-1 β の産生やその関連遺伝子およびタンパク質の発現に対する影響を調べた。その結果、培地の違いにより、マクロファージの iNOS の遺伝子およびタンパク質の発現レベルが変化することが分かった。そこで、培地から J774.1/JA-4 細胞の iNOS 発現に影響を及ぼす因子を探索したところ、重炭酸ナトリウムが iNOS 発現を上昇させることが分かった。一方で、iNOS の酵素活性は、重炭酸ナトリウムの濃度の上昇に伴い低下することも分かった。一般的に、培地への重炭酸ナトリウムの添加は、pH の上昇（アルカリ化）と維持を目的としている。そこで、培地の pH を変化させ、J774.1/JA-4 細胞の iNOS 発現に対する影響を調べた。しかし、J774.1/JA-4 細胞における iNOS 発現の変化と培地の pH の変化との間に相関が認められなかったため、細胞外の pH の変化が直接的な影響を及ぼすわけではないことが考えられた。

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 J774.1/JA-4 細胞の 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が明らかとなった。

次いで第二章では、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解析した。LPS と IFN- γ を含む溶液で培養した RAW264.7 細胞を用いて重炭酸イオンの影響を調べたところ、重炭酸イオン濃度の上昇に依存して炎症関連遺伝子である IL-6 や iNOS、COX-2 の遺伝子発現レベルが上昇し、IL-6 や NO、PGE₂ の産生量も増加した。また、重炭酸イオン濃度の増加により、RAW264.7 細胞の pHe と pH_i 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、主に IFN- γ により活性化する JAK/STAT 経路が、重炭酸イオンの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 SLC4A7 の阻害剤 (S0859) によって、重炭酸イオンによる炎症関連遺伝子の発現レベルや pH_i の上昇、さらに JAK/STAT 経路の活性化の増強はいずれも減弱した。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 JAK/STAT 経路が活性化されて、炎症関連遺伝子の発現が上昇することが示された。また、マウスの骨髄由来のマクロファージである 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上昇、JAK/STAT 経路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おいても同様に見られる現象であることが示唆された。

生体内の pH や体温、血糖値、血圧などは、恒常性の維持によりほぼ一定の範囲内に保たれている。しかし、加齢や疾患に伴う血液中の水素イオン (H⁺) と重炭酸イオン (HCO₃⁻) の不均衡により血液の pH が変化し、酸塩基障害が生じる⁴⁹。この障害はアシドーシス (pH の低下) とアルカローシス (pH の上昇) に分けられる。局所環境の pH の低下は、炎症や虚血、固形がんなどの病態で見られるが、その環境に曝された免疫細胞の機能は低下しやすい^{62,65}。一方で、樹状細胞の抗原提示能は酸性条件の方が起こりやすく⁷⁸、マクロファージからの NO の産生は弱酸性条件下 (pH 7.0-7.2) で NF- κ B 経路の活性化を介して上昇することも分かっている^{41,79}。このように、局所における pH の低下は、一方向性ではないものの、免疫応答に様々な影響を及ぼしている。これまでの報告の多くは、細胞外の pH の上昇 (アルカリ化) よりも pH の低下 (酸性化) に焦点を当てたもの

が多い。これは、炎症、腫瘍あるいは細胞の代謝物により、局所環境の pH が酸性に傾きやすいことが一因であると考えられる。しかし、血液の pH は、腎機能の低下による重炭酸イオンの排泄障害や重炭酸塩の連続投与、嘔吐や利尿剤などによる酸の喪失などにより上昇し、結果として代謝性アルカローシスを生じる¹⁸。また、生体内の pH を調節する重炭酸イオンは、加齢や食事内容、疾患によっても変動することが分かっている^{53,80}。細胞内外への重炭酸イオンの取り込みや排出には、SLC4 ファミリーと SLC26 ファミリーのトランスポーターが関与するが、今回、マクロファージの炎症応答が、SLC4 ファミリーに属する SLC4A7 による細胞内への重炭酸イオンの取り込みにより制御されることを示した。今後、SLC4A7 以外のトランスポーターの関与を調べるとともに、SLC4A7 によるマクロファージに対する影響をさらに調べるために、ゲノム編集による遺伝子破壊や RNA 干渉による遺伝子ノックダウンを用いた検討が考えられる。

臨床では、重度腎不全により生じたアシドーシスの治療に、高濃度の重炭酸イオンを含む透析液が持続的に用いられる場合がある。この人工透析が長期に続くと、それに伴い血液の pH と重炭酸イオン濃度の上昇が生じ、生命の危機に陥ることもあるため、高濃度の重炭酸イオンを含む透析液の使用を問題視する声がある⁸¹。実際、2013 年に報告された国際共同研究 (Dialysis Outcomes and Practice Patterns: DOPPS) の結果では、高濃度の重炭酸イオンを含む透析液を用いた患者の死亡率と入院率は、低濃度の透析液を用いた患者よりも高く、感染症 (肺炎や敗血症) による死亡者数が多くなることが指摘されている⁸²。この要因については、血液の pH が上昇したことで、免疫細胞の応答性が変化したのではないかと述べられているが、pH の上昇による細胞の機能への影響はほとんど明らかとなっていないため、詳しいことは分かっていない。本研究では、細胞周辺の重炭酸イオン濃度の上昇がマクロファージにおける IL-6 や NO、PGE₂ などの炎症関連物質の産生を増加させることを明らかにし、pH の変化と炎症応答に関する新たな知見を示した。これらの結果は、これまで報告がほとんどなかった、pH の上昇 (アルカリ化) が細胞の機能を変化させることを示すものであり、様々な疾患や生活習慣による生体内の局所環境の変化において、重炭酸イオンがマクロファージの炎症機能を制御する可能性を示すものである。今後は、生体内の組織における重炭酸イオン濃度の変動が炎症応答に及ぼす影響を調べるために、動物個体を用いた検討を行う必要がある。

以上、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。

論文目録

本論文は、下記の論文をもとに作成した。

1. Kawakami, T., Kawamura, K., Fujimori, K., Koike, A. & Amano, F. Influence of the culture medium on the production of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase by activated macrophages in vitro. *Biochemistry and Biophysics Reports* **5**, 328-334 (2016)
2. Kawakami, T., Koike, A. & Amano, F. Sodium bicarbonate regulates nitric oxide production in mouse macrophage cell lines stimulated with lipopolysaccharide and interferon γ . *Nitric Oxide* **79**, 45-50 (2018)
3. Kawakami, T., Koike, A., Maehara, T., Hayashi, T. & Fujimori, K. Bicarbonate enhances the inflammatory response by activating JAK/STAT signaling in LPS+IFN- γ -stimulated macrophages. *The Journal of Biochemistry*, in press (2020)

参考論文は下記の通りである。

1. Kawakami, T., Koike, A. & Amano, F. Induction of different activated phenotypes of mouse peritoneal macrophages grown in different tissue culture media. *Cytotechnology* **69**, 631-642 (2017)

以上

謝辞

本論文は、著者が大阪薬科大学大学院薬学研究科薬学専攻博士課程に在籍中の研究成果をまとめたものである。同専攻の指導教員である循環病態治療学研究室の林哲也教授、研究の場を提供していただいた病態生化学研究室の藤森功教授には、本研究の遂行にあたって御指導、御鞭撻を賜りました。ここに深謝の意を表します。元大阪薬科大学教授の天野富美夫先生には、本論文にまとめた研究のきっかけを与えて戴き、愛情あふれる御指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。同専攻の藤本陽子教授には、本論文審査の主査として御助言を戴くとともに本論文の細部にわたり御指導を戴きました。ここに深謝の意を表します。同大学循環病態治療学研究室の井尻好雄准教授、加藤隆児准教授ならびに病態生化学研究室の小池敦資助教、前原都有子助教には、研究遂行にあたり日頃より有益な御助言を戴きました。ここに感謝の意を表します。本研究に対して数々の御協力を戴きました、循環病態治療学研究室と病態生化学研究室、旧生体防御学研究室の研究室員の方々に御礼申し上げます。

また、研究活動を御支援して戴きました、日本薬学会長井記念薬学研究奨励支援事業に厚く御礼申し上げます。

最後に、これまで温かく見守り支えてくれた家族に心から感謝申し上げます。

参考文献

1. Kaufmann, S.H. Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nature Immunology* **9**, 705 (2008).
2. Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guillemins, M. & Misharin, A. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity* **38**, 79-91 (2013).
3. Epelman, S., Lavine, K.J. & Randolph, G.J. Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity* **41**, 21-35 (2014).
4. Mosser, D.M. The many faces of macrophage activation. *Journal of Leukocyte Biology* **73**, 209-212 (2003).
5. Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdt, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., Locati, M., Mantovani, A., Martinez, F.O., Mege, J.-L., Mosser, D.M., Natoli, G., Saeij, J.P., Schultze, J.L., Shirey, K.A., Sica, A., Suttles, J., Udalova, I., van Ginderachter, J.A., Vogel, S.N. & Wynn, T.A. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14-20 (2014).
6. Martinez, F.O. & Gordon, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* **6**, 13-13 (2014).
7. Duffield, J.S. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clinical Science* **104**, 27-38 (2002).
8. Mosser, D.M. & Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* **8**, 958-969 (2008).
9. Forman, H.J. & Torres, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **166**, S4-S8 (2002).
10. Tacke, F. & Zimmermann, H.W. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis. *Journal of Hepatology* **60**, 1090-1096 (2014).
11. Stein, M., Keshav, S., Harris, N. & Gordon, S. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine* **176**, 287-292 (1992).

12. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* **3**, 23-35 (2003).
13. Wang, N., Liang, H. & Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Frontiers in Immunology* **5**, 614 (2014).
14. Cannon, W.B. Organization for physiological homeostasis. *Physiological Reviews* **9**, 399-431 (1929).
15. Besedovsky, H.O. & del Rey, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews* **17**, 64-102 (1996).
16. Sacks, F.M., Svetkey, L.P., Vollmer, W.M., Appel, L.J., Bray, G.A., Harsha, D., Obarzanek, E., Conlin, P.R., Miller, E.R. & Simons-Morton, D.G. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. *New England Journal of Medicine* **344**, 3-10 (2001).
17. Rangwala, S.M., Rich, A.S., Rhoades, B., Shapiro, J.S., Obici, S., Rossetti, L. & Lazar, M.A. Abnormal glucose homeostasis due to chronic hyperresistinemia. *Diabetes* **53**, 1937-1941 (2004).
18. Adrogué, H.J. & Madias, N.E. Management of life-threatening acid–base disorders. *New England Journal of Medicine* **338**, 26-34 (1998).
19. Pierson, D.J. Respiratory considerations in the patient with renal failure. *Respiratory Care* **51**, 413-422 (2006).
20. Ellison, G., Straumfjord, J.V. & Hummel, J. Buffer capacities of human blood and plasma. *Clinical Chemistry* **4**, 452-461 (1958).
21. Ozturk, S.S. & Palsson, B.O. Chemical decomposition of glutamine in cell culture media: effect of media type, pH, and serum concentration. *Biotechnology Progress* **6**, 121-128 (1990).
22. Huang, Z., Shao, W., Gu, J., Hu, X., Shi, Y., Xu, W., Huang, C. & Lin, D. Effects of culture media on metabolic profiling of the human gastric cancer cell line SGC7901. *Molecular BioSystems* **11**, 1832-1840 (2015).
23. Hou, L.T., Li, T.I., Liu, C.M., Liu, B.Y., Liu, C.L. & Mi, H.W. Modulation of osteogenic potential by recombinant human bone morphogenic protein-2 in human periodontal ligament cells: effect of serum, culture medium, and osteoinductive medium. *Journal of Periodontal Research* **42**, 244-252 (2007).
24. Lopez-Cazaux, S., Bluteau, G., Magne, D., Lieubeau, B., Guicheux, J. & Alliot-Licht, B. Culture medium modulates the behaviour of human dental pulp-derived cells: technical note. *European Cells & Materials* **11**, 35-42 (2006).

25. Wu, X., Lin, M., Li, Y., Zhao, X. & Yan, F. Effects of DMEM and RPMI 1640 on the biological behavior of dog periosteum-derived cells. *Cytotechnology* **59**, 103-111 (2009).
26. Thet, M.M., Yokote, Y., Chu, Q., Wang, Q.T., Kishino, K., Tamura, N., Shimada, J., Amano, O., Kanda, Y., Kunii, S., Takekawa, F., Hatano, H., Shimada, C., Hasegawa, H. & Sakagami, H. Non-apoptotic cell death induced by nutritional starvation in J774.1 mouse macrophage-like cell line. *Anticancer Research* **29**, 5083-5088 (2009).
27. Brennan, F.M. & McInnes, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. *The Journal of Clinical Investigation* **118**, 3537-3545 (2008).
28. Moore, K.J., Sheedy, F.J. & Fisher, E.A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology* **13**, 709-721 (2013).
29. Porporato, P. Understanding cachexia as a cancer metabolism syndrome. *Oncogenesis* **5**, e200 (2016).
30. Spranger, J., Kroke, A., Möhlig, M., Hoffmann, K., Bergmann, M.M., Ristow, M., Boeing, H. & Pfeiffer, A.F. Inflammatory cytokines and the risk to develop type 2 diabetes: results of the prospective population-based European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Diabetes* **52**, 812-817 (2003).
31. Wang, Y., Smith, W., Hao, D., He, B. & Kong, L. M1 and M2 macrophage polarization and potentially therapeutic naturally occurring compounds. *International Immunopharmacology* **70**, 459-466 (2019).
32. Lumeng, C.N., Bodzin, J.L. & Saltiel, A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *The Journal of Clinical Investigation* **117**, 175-184 (2007).
33. Harwani, S.C. Macrophages under pressure: the role of macrophage polarization in hypertension. *Translational Research* **191**, 45-63 (2018).
34. Amano, F. & Akamatsu, Y. A lipopolysaccharide (LPS)-resistant mutant isolated from a macrophagelike cell line, J774. 1, exhibits an altered activated-macrophage phenotype in response to LPS. *Infection and Immunity* **59**, 2166-2174 (1991).
35. Sasada, M., Pabst, M. & Johnston, R. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 9631-9635 (1983).

36. Rest, R.F. Measurement of human neutrophil respiratory burst activity during phagocytosis of bacteria, in *Methods in Enzymology*, Vol. 236 119-136 (Elsevier, 1994).
37. Aktan, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences* **75**, 639-653 (2004).
38. Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **9**, 671-675 (2012).
39. Sharma, K., Danoff, T.M., DePiero, A. & Ziyadeh, F.N. Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase in murine macrophages and glomerular mesangial cells by elevated glucose levels: possible mediation via protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **207**, 80-88 (1995).
40. Riemann, A., Wußling, H., Loppnow, H., Fu, H., Reime, S. & Thews, O. Acidosis differently modulates the inflammatory program in monocytes and macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* **1862**, 72-81 (2016).
41. Bellocq, A., Suberville, S., Philippe, C., Bertrand, F., Perez, J., Fouqueray, B., Cherqui, G. & Baud, L. Low environmental pH is responsible for the induction of nitric-oxide synthase in macrophages. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 5086-5092 (1998).
42. Heming, T.A., Tuazon, D.M., Davé, S.K., Chopra, A.K., Peterson, J.W. & Bidani, A. Post-transcriptional effects of extracellular pH on tumour necrosis factor- α production in RAW 246.7 and J774 A. 1 cells. *Clinical Science* **100**, 259-266 (2001).
43. Jancic, C.C., Cabrini, M., Gabelloni, M.L., Rodrigues, C.R., Salamone, G., Trevani, A.S. & Geffner, J. Low extracellular pH stimulates the production of IL-1 β by human monocytes. *Cytokine* **57**, 258-268 (2012).
44. Lardner, A. The effects of extracellular pH on immune function. *Journal of Leukocyte Biology* **69**, 522-530 (2001).
45. Binger, K.J., Gebhardt, M., Heinig, M., Rintisch, C., Schroeder, A., Neuhofer, W., Hilgers, K., Manzel, A., Schwartz, C. & Kleinewietfeld, M. High salt reduces the activation of IL-4–and IL-13–stimulated macrophages. *The Journal of Clinical Investigation* **125**, 4223-4238 (2015).
46. Amara, S., Whalen, M. & Tiriveedhi, V. High salt induces anti-inflammatory M Φ 2-like phenotype in peripheral macrophages. *Biochemistry and Biophysics Reports* **7**, 1-9 (2016).
47. Jantsch, J., Schatz, V., Friedrich, D., Schröder, A., Kopp, C., Siegert, I., Maronna, A., Wendelborn, D., Linz, P. &

- Binger, K.J. Cutaneous Na⁺ storage strengthens the antimicrobial barrier function of the skin and boosts macrophage-driven host defense. *Cell Metabolism* **21**, 493-501 (2015).
48. Berend, K., de Vries, A.P. & Gans, R.O. Physiological approach to assessment of acid–base disturbances. *New England Journal of Medicine* **371**, 1434-1445 (2014).
49. Hamilton, P.K., Morgan, N.A., Connolly, G.M. & Maxwell, A.P. Understanding acid-base disorders. *The Ulster Medical Journal* **86**, 161 (2017).
50. Cordat, E. & Casey, J.R. Bicarbonate transport in cell physiology and disease. *Biochemical Journal* **417**, 423-439 (2009).
51. Alka, K. & Casey, J.R. Bicarbonate transport in health and disease. *IUBMB Life* **66**, 596-615 (2014).
52. Raphael, K.L., Murphy, R.A., Shlipak, M.G., Satterfield, S., Huston, H.K., Sebastian, A., Sellmeyer, D.E., Patel, K.V., Newman, A.B. & Sarnak, M.J. Bicarbonate concentration, acid-base status, and mortality in the health, aging, and body composition study. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **11**, 308-316 (2016).
53. Amodu, A. & Abramowitz, M.K. Dietary acid, age, and serum bicarbonate levels among adults in the United States. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **8**, 2034-2042 (2013).
54. Sedlyarov, V., Eichner, R., Girardi, E., Essletzbichler, P., Goldmann, U., Nunes-Hasler, P., Srndic, I., Moskovskich, A., Heinz, L.X., Kartnig, F., Bigenzahn, J.W., Rebsamen, M., Kovarik, P., Demaurex, N. & Superti-Furga, G. The bicarbonate transporter SLC4A7 plays a key role in macrophage phagosome acidification. *Cell Host & Microbe* **23**, 766-774.e765 (2018).
55. Weischenfeldt, J. & Porse, B. Bone marrow-derived macrophages (BMM): isolation and applications. *Cold Spring Harbor Protocols* **2008**, pdb. prot5080 (2008).
56. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. & Schreiber, R.D. How cells respond to interferons. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 227-264 (1998).
57. Chan, E.D. & Riches, D.W. IFN- γ + LPS induction of iNOS is modulated by ERK, JNK/SAPK, and p38 mapk in a mouse macrophage cell line. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **280**, C441-C450 (2001).
58. Rose-John, S. Interleukin-6 family cytokines. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **10**, a028415 (2018).
59. Fang, F.C. Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial

- activity. *The Journal of Clinical Investigation* **99**, 2818-2825 (1997).
60. Murphy, M.P. Nitric oxide and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1411**, 401-414 (1999).
 61. Barberà-Cremades, M., Baroja-Mazo, A., Gomez, A.I., Machado, F., Di Virgilio, F. & Pelegrín, P. P2X7 receptor-stimulation causes fever via PGE₂ and IL-1 β release. *The FASEB Journal* **26**, 2951-2962 (2012).
 62. Vaupel, P., Kallinowski, F. & Okunieff, P. Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Research* **49**, 6449-6465 (1989).
 63. Keibel, A., Singh, V. & Sharma, M.C. Inflammation, microenvironment, and the immune system in cancer progression. *Current Pharmaceutical Design* **15**, 1949-1955 (2009).
 64. El-Kenawi, A., Gatenbee, C., Robertson-Tessi, M., Bravo, R., Dhillon, J., Balagurunathan, Y., Berglund, A., Visvakarma, N., Ibrahim-Hashim, A. & Choi, J. Acidity promotes tumour progression by altering macrophage phenotype in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 1-11 (2019).
 65. Kato, Y., Ozawa, S., Miyamoto, C., Machata, Y., Suzuki, A., Maeda, T. & Baba, Y. Acidic extracellular microenvironment and cancer. *Cancer Cell International* **13**, 89 (2013).
 66. Romero, M.F., Chen, A.-P., Parker, M.D. & Boron, W.F. The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Molecular Aspects of Medicine* **34**, 159-182 (2013).
 67. Gorbatenko, A., Olesen, C.W., Boedtkjer, E. & Pedersen, S.F. Regulation and roles of bicarbonate transport in cancer. *Frontiers in Physiology* **5**, 130 (2014).
 68. Choi, I. SLC4A transporters, in *Current Topics in Membranes*, Vol. 70 77-103 (Elsevier, 2012).
 69. Alper, S.L. & Sharma, A.K. The SLC26 gene family of anion transporters and channels. *Molecular Aspects of Medicine* **34**, 494-515 (2013).
 70. Platanias, L.C. Mechanisms of type-I-and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology* **5**, 375 (2005).
 71. Rawlings, J.S., Rosler, K.M. & Harrison, D.A. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science* **117**, 1281-1283 (2004).
 72. O'Shea, J.J., Schwartz, D.M., Villarino, A.V., Gadina, M., McInnes, I.B. & Laurence, A. The JAK-STAT pathway: impact on human disease and therapeutic intervention. *Annual Review of Medicine* **66**, 311-328 (2015).

73. Darnell, J.E., Kerr, I.M. & Stark, G.R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421 (1994).
74. Faggioli, L., Merola, M., Hiscott, J., Furia, A., Monese, R., Tovey, M. & Palmieri, M. Molecular mechanisms regulating induction of interleukin-6 gene transcription by interferon- γ . *European Journal of Immunology* **27**, 3022-3030 (1997).
75. Pine, R. Convergence of TNF α and IFN γ signalling pathways through synergistic induction of IRF-1/ISGF-2 is mediated by a composite GAS/ κ B promoter element. *Nucleic Acids Research* **25**, 4346-4354 (1997).
76. Kovarik, P., Stoiber, D., Novy, M. & Decker, T. Stat1 combines signals derived from IFN- γ and LPS receptors during macrophage activation. *The EMBO Journal* **17**, 3660-3668 (1998).
77. Stout, R.D. & Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *Journal of Leukocyte Biology* **76**, 509-513 (2004).
78. Vermeulen, M., Giordano, M., Trevani, A.S., Sedlik, C., Gamberale, R., Fernández-Calotti, P., Salamone, G., Raiden, S., Sanjurjo, J. & Geffner, J.R. Acidosis improves uptake of antigens and MHC class I-restricted presentation by dendritic cells. *The Journal of Immunology* **172**, 3196-3204 (2004).
79. Huang, C.-J., Haque, I.U., Slovin, P.N., Nielsen, R., Fang, X. & Skimming, J.W. Environmental pH regulates LPS-induced nitric oxide formation in murine macrophages. *Nitric Oxide* **6**, 73-78 (2002).
80. Baronzio, G., Schwartz, L., Kiselevsky, M., Guais, A., Sanders, E., Milanesi, G., Baronzio, M. & Freitas, I. Tumor interstitial fluid as modulator of cancer inflammation, thrombosis, immunity and angiogenesis. *Anticancer Research* **32**, 405-414 (2012).
81. Noh, U., Yi, J.-H., Han, S.-W. & Kim, H.-J. Varying dialysate bicarbonate concentrations in maintenance hemodialysis patients affect post-dialysis alkalosis but not pre-dialysis acidosis. *Electrolyte & Blood Pressure* **5**, 95-101 (2007).
82. Tentori, F., Karaboyas, A., Robinson, B.M., Morgenstern, H., Zhang, J., Sen, A., İközler, T.A., Rayner, H., Fissell, R.B. & Vanholder, R. Association of dialysate bicarbonate concentration with mortality in the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). *American Journal of Kidney Diseases* **62**, 738-746 (2013).