

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06858

研究課題名（和文）低温シグナルによる炎症終息の分子実態の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanism of cold induced anti-inflammation

研究代表者

杉本 大樹（SUGIMOTO, Hiroki）

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：70515866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、マクロファージにおけるIL4-STAT6-Arg1シグナル系をモデルとして、温度依存的な炎症終息経路（Arginase1の発現増加）の分子実態解明を目的とした。シグナル系の制御因子候補としてE3 ligase Cbl-bに注目したが、siRNAによるCbl-b発現抑制は、Arginase1の発現増加を誘導しなかった。一方、Ca²⁺キレーターによってArginase1の発現は顕著に抑制された。従って、IL4-STAT6-Arg1シグナル系の制御因子として新たにCa²⁺シグナルを同定した。本経路が、温度依存的な炎症終息の解明に重大に役割を持つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、マクロファージにおけるIL4-STAT6-Arg1シグナル系をモデルとした低温依存的な炎症終息経路の解析を行い、新たにCa²⁺シグナルリングが関与することを明らかにした。今後、このCa²⁺シグナルリング経路に注目することで、低温シグナルが、炎症を終息させる機構の詳細を解明できると考えられる。低温依存的な炎症終息の機構の解明は、レイノー現象や肺高血圧症など外部環境温度によりその病態が影響を受ける様々な疾患に対する病態理解や新規治療アプローチの創出への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate the molecular mechanism underlying the temperature-dependent anti-inflammation effect, characterized by an increase in the expression of Arginase1, using the IL4-STAT6-Arg1 signaling pathway in macrophages as a model. While focusing on the E3 ligase Cbl-b as a candidate regulator of this signaling pathway, knockdown of Cbl-b by siRNA did not induce an increase in Arginase1 expression. Conversely, the expression of Arginase1 was significantly suppressed by a Ca²⁺ chelator. Therefore, a novel role of Ca²⁺ signaling as a regulator of the IL4-STAT6-Arg1 signaling pathway was identified. This pathway plays a significant role in the temperature-dependent anti-inflammation effect.

研究分野：細胞

キーワード：マウス 炎症 温度 低温 マクロファージ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

炎症プロセスは、古くからマクロファージを介して活性化されるものとして捉えられてきた。炎症プロセスの活性化において、マクロファージは、L-arginine を基質とする一酸化窒素合成酵素(iNOS)を発現し炎症メディエーターである一酸化窒素(NO)を放出する。そして、血管拡張作用を保つことで、局所的な温度上昇(熱感)を引き起こす。熱感、発赤、疼痛、腫脹と並ぶ炎症の四徴の一つである。しかしながら、炎症プロセスの活性化に対して、炎症プロセスを終息させる機構は、不明な点が多い。近年、抗炎症作用を有するマクロファージ亜集団(M2)が存在することが報告された。M2 マクロファージでは、iNOS と共通基質である L-arginine を利用する *Arginase1* が強発現し、尿素を生成する。すなわち *Arginase1* が競合的に NO 産生を抑制することで炎症プロセスを積極的に終息させる。この炎症終息の鍵として、低温環境(アイシング)が炎症治療に有効であることは古くから経験的に知られており、外的温度環境が炎症終息に大きく関与すると想起されてきた。しかしながら、その分子実態は全く不明であった。

私たちは、予備的知見として、M2 マクロファージにおいてサイトカイン(IL4)による STAT6 シグナル、*Arginase1* 発現誘導(IL4-STAT6-Arg1 シグナル系)について、37 °C、28 °C の温度環境における解析を行った。その結果、野生型マウスの M2 マクロファージでは、低温環境(28 °C)において IL4 刺激時に *Arginase1* 発現が顕著に増加すること、STAT6 欠損マウスの M2 マクロファージではその顕著な増加が消失していることを確認した(温度依存的 NO 産生システムの発見)。さらなる解析の結果、低温環境においてリン酸化 STAT6 タンパク質が増加していることを確認した。これらの結果は、IL4-STAT6-Arg1 シグナル系に温度感受性があり、低温シグナルによってより活性化し炎症プロセスを終息させることを強く示唆した。リン酸化 STAT6 の分解に関わる E3 ligase に着目し、E3 ligase *Cbl-b* 発現の温度依存的に減少すること、つまり低温でリン酸化 STAT6 の分解が抑制される可能性を示していた。さらに、私たちは、敗血症性ショック病態モデルマウスにおいて、低温環境が敗血症性ショックを軽減させることを明らかにした。本病態モデルマウスは、外気と直接接している肺胞内におけるマクロファージ浸潤および NO 産生の増加が主たる病態である。従って、この結果は低温シグナルが NO 産生を抑制する可能性を示した。また近年の報告から、マクロファージ活性化においてグルコース代謝や脂肪酸代謝が重要な役割を果たしている事が明らかにされていたが、低温シグナルが、細胞内代謝のレベルでマクロファージにどのように影響を与えるのかも全く調べられていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、マクロファージにおけるIL4-STAT6-Arg1シグナル系をモデルとして、温度依存的な炎症終息経路(温度依存的NO産生、細胞内代謝調節)の分子実態を明らかにすること、さらに温度依存的NO産生が病態において果たしている役割を明らかにすることを目的とする。温度は様々な生理機能に影響を与え、生体の恒常性維持において最も重要な因子の一つである。低温シグナルが、どのように炎症を終息機構の解明は、マクロファージのみならず免疫細胞、他の細胞種における温度依存的活性化プロセスの解明へつながる。

3. 研究の方法

野生型 C57BL/6J マウスあるいは STAT6 ノックアウトマウスの骨髄由来の単球細胞をマクロファージ分化培地で6日間培養し Bone marrow derived macrophage (BMDM) 細胞を用意した。BMDM 細胞への IL4 刺激による IL4-STAT6-Arg1 シグナル系の亢進もしくは抑制をリアルタイム qPCR あるいはウエスタンブロットにより評価した。BMDM 細胞への IL4 刺激に先がけて、培養温度(28 °C と 37 °C)、STAT6 阻害剤(AS1517499)処理、脱共役剤(FCCP と Valinomycin)処理、siRNA を用いた *Cbl-b* ノックダウン、細胞内カルシウムキレーター(BAPHA-AM)処理を随時行い、それぞれ IL4-STAT6-Arg1 シグナル系

における影響を評価した。細胞代謝への温度の影響をみるために細胞外フラックスアナライザー (XF) を用い各温度 (28 °C と 31 °C と 37 °C) でミトコンドリアストレス下の細胞の酸素消費量と細胞外酸性化速度を計測した。酸素消費量からミトコンドリア機能[基礎呼吸量、最大呼吸量、プロトンリーク(熱産生)、予備呼吸能(膜電位)]を計算し、細胞外酸性化速度から解糖系の働きを評価した。膜電位の変化は、電位依存的に蛍光強度が変化する MT-1 を BMDM 細胞に取り込ませ 28 °C と 37 °C で培養し、細胞質の蛍光強度で比較した。

4. 研究成果

低温で発現が減少する E3 ligase (Cbl-b) に着目し、STAT6 標的分子としての可能性を探るため、野生型マウスのマクロファージに対する STAT6 阻害薬 (AS1517499) 処理、そして STAT6 ノックアウトマウスの BMDM 細胞を用い Cbl-b の発現を調べた。リアルタイム qPCR で 37 °C で IL4 刺激時に Arginase1 と同様に Cbl-b の発現が阻害剤 (図 1a) あるいはノックアウトでも抑制されることを示した。CBL-B タンパク質の発現も同様に抑制された (図 1a)。Cbl-b は STAT6 依存的に発現が制御されることを示した。次に IL4-STAT6-Arg1 シグナル系において STAT6 の分解に関わる Cbl-b の減少が Arginase1 の発現亢進を導くかを Cbl-b RNAi を用いて評価した。しかしながら、Cbl-b のノックダウンによって IL4 刺激時に BMDM の Arginase1 の発現は亢進しなかった (図 1c)。このことは低温で Arginase1 発現亢進に Cbl-b ではない別のシグナルが関与する可能性を示唆した。

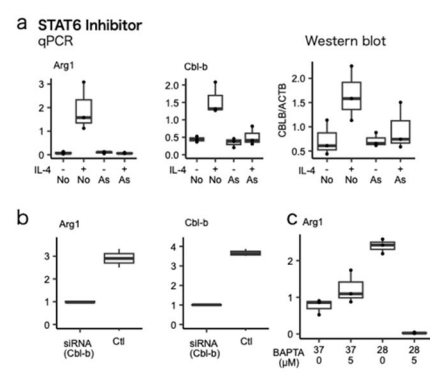


図 1 IL4-STAT6-Arg1シグナルの発現
a STAT6阻害剤による抑制
b Cbl-b KDによるArg1へ影響
c Ca²⁺キレーターによるArg1発現亢進の抑制

低温シグナルがマクロファージの細胞内代謝に与える影響を明らかにするために、温度可変型細胞代謝解析システムを用いて、低温環境におけるマクロファージ細胞内代謝(ミトコンドリア活性)をリアルタイムに計測した。37 °C、31 °C、28 °C で計測し、低温環境によりマクロファージの通常呼吸量、最大呼吸量、プロトンリーク(熱産生)、膜電位等のミトコンドリア活性が低下することを明らかにした(図 2a)。解糖系も低下することを示した。膜電位の低下は、電位依存的な蛍光色素でも確認した(図 2b)。さらに、この膜電位の低下が、Arginase1 の遺伝子発現に関与するかを明らかにするために、37 °C でミトコンドリア脱共役剤 (Valinomycin, FCCP) を BMDM 細胞に処理し膜電位を下げ 28 °C の状態を模して、その遺伝子発現を調べたところ、未処理と比べ Arginase1 の発現量の有意な増加はなかった。したがって、膜電位の低下は Arginase1 発現の著明な増加には関与しないことを確認した。

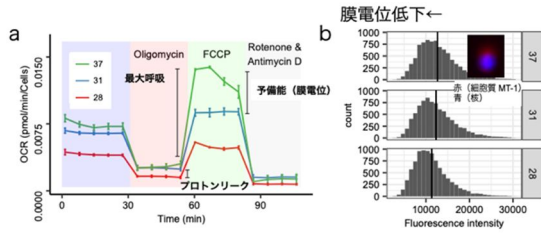


図 2 マクロファージ代謝への温度影響
a 低温による代謝低下
b 低温での膜電位低下

新たな IL4-STAT6-Arg1 シグナル活性化の因子を探すために、BAPTA-AM を用いて低温による Arginase1 発現への影響を見た。BAPTA-AM の添加によって 28 °C の Arginase1 の発現亢進が顕著に抑制された (図 1c)。このことは、IL4-STAT6-Arg1 シグナル系を介した温度依存的な炎症終息経路にカルシウムシグナリングの関与を示唆する。温度依存的なチャンネルとして TRP (陽イオン) チャンネルなどが知られ、TRP チャンネルなどが 28 °C で活性化され IL4-STAT6-Arg1 シグナル系に作用することで Arginase1 の発現を亢進させるのかもしれない。したがって、今後具体的なカルシウムシグナリング経路を明らかにすることで、低温シグナルが、炎症を終息させる機構の詳細を解明できると考えられる。温度依存的な炎症終息の機構の解明は、さまざまな温度依存的な疾患の病態解明へつながることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武田 憲彦 (TAKEDA Norihiko) (40422307)	自治医科大学・医学部・非常勤講師 (32202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関