

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：36102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07094

研究課題名(和文) マクロファージ分極化と機能調節におけるミトコンドリアCa<sup>2+</sup>制御機構の役割の解明研究課題名(英文) The roles of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transporters in the regulation of macrophage polarization and function

研究代表者

太田 紘也 (Ohta, Hiroya)

徳島文理大学・薬学部・助教

研究者番号：40638988

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨髄由来マクロファージのM1/M2分極化およびサイトカイン産生におけるミトコンドリアNa<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>交換輸送体(NCLX)の関与について検討した。その結果、IFN- $\gamma$ によるM1分極化およびIL-4によるM2分極化に対してNCLX阻害薬CGP-37157は影響しなかったことから、マクロファージの分極化にNCLXは関与しないと考えられた。また、LPS刺激で誘発されるM1マクロファージによるIL-6産生およびM2マクロファージによるIL-10産生に対してもCGP-37157は影響しなかったことから、マクロファージによる炎症反応の調節にNCLXが直接的に関与する可能性は低いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マクロファージの分極化制御機構の解明は、マクロファージの多様な生理機能や病態への関与を明らかにする上で重要な課題である。M2マクロファージでNCLX発現が増加していたことから、分極化や細胞機能へのNCLXの関与について検討したが、M1/M2分極化やサイトカイン産生はNCLX活性阻害により影響が見られなかった。しかしながら、M2マクロファージからのケモカイン産生を介した血管細胞との連関において、NCLXが関与する可能性を示す知見を得ている。この結果は、マクロファージのミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送が血管病変に関与する可能性を示すものであり、病態メカニズムの解明や治療への応用につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the involvement of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCLX) in M1/M2 polarization and cytokine production of bone marrow-derived macrophages. Our results showed that the NCLX inhibitor CGP-37157 had little effect on IFN- $\gamma$ -induced M1 polarization and IL-4-induced M2 polarization, suggesting that NCLX is not involved in macrophage M1/M2 polarization. CGP-37157 also had no effect on IL-6 production by M1 macrophages or IL-10 production by M2 macrophages induced by LPS stimulation, suggesting that NCLX is unlikely to be directly involved in the regulation of inflammatory responses by macrophages.

研究分野：薬理学

キーワード：マクロファージ Ca<sup>2+</sup> ミトコンドリアCa<sup>2+</sup>輸送体 M1/M2分極化 サイトカイン産生

## 1. 研究開始当初の背景

がんやメタボリック症候群などを引き起こす共通の病態として慢性炎症が注目されており、低いレベルで持続する炎症反応によってさまざまな臓器障害を生じる。この慢性炎症の惹起と収束の両面に、マクロファージが関与することが明らかになってきた。マクロファージはその表現型の違いによって、M1 マクロファージと M2 マクロファージに大別される。炎症の惹起には M1 マクロファージが関与しており、炎症性刺激によって活性化されると炎症性サイトカインの産生や異物の排除などを行う。一方、M2 マクロファージは抗炎症性サイトカインを産生するなど、抗炎症型の表現型を呈し、炎症の収束に寄与する。このように、マクロファージの M1/M2 分極化のバランスが変化することにより、マクロファージが炎症の惹起にも収束にも関与することができると考えられるが、マクロファージの分極化を制御する仕組みについては十分に解明されていない。

細胞内  $Ca^{2+}$  は、マクロファージ M1/M2 分極化および機能発現を制御する因子の一つである。細胞内  $Ca^{2+}$  濃度は細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入以外に細胞内小器官からの  $Ca^{2+}$  放出によって増加し、細胞外への排出と細胞内小器官への再取り込みによって低下する。ATP 産生を行うミトコンドリアは細胞内  $Ca^{2+}$  貯蔵部位としても働くことが知られており、ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  濃度の調節は、細胞質からミトコンドリアへの  $Ca^{2+}$  取り込みを担う  $Ca^{2+}$  ユニポーター (MCU) とミトコンドリアから細胞質への  $Ca^{2+}$  汲み出しを担うミトコンドリア  $Na^+/Ca^{2+}$  交換輸送体 (NCLX) によって行われている。研究代表者らは、NCLX 遺伝子発現量が M2 マクロファージで増加していることから、NCLX を介したミトコンドリア  $Ca^{2+}$  濃度変化が M1/M2 分極化や M2 マクロファージの機能に関与する可能性を考えた。ミトコンドリア  $Ca^{2+}$  動態とマクロファージの M1/M2 分極化の関連性を解明することは、マクロファージの多様な生理機能や病態への関与を明らかにする上で重要な課題である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ミトコンドリアから細胞質への  $Ca^{2+}$  汲み出しを担う  $Na^+/Ca^{2+}$  交換輸送体 (NCLX) が、マクロファージの M1/M2 分極化や細胞機能においてどのような役割をするのかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス骨髄由来マクロファージの調製

雄性 C57BL/6J マウス (8-16 週齢) の大腿骨、脛骨および上腕骨より骨髄を採取し、RBC Lysis Buffer で赤血球を溶解させ、100  $\mu$ m フィルターを通して骨髄細胞を得た。単離した骨髄細胞をマクロファージに分化させるために、マクロファージコロニー刺激因子 M-CSF (25 ng/mL) を添加した 20% FBS 含有 RPMI1640 培地で培養し、3 日後に培地交換を行い、6 日後に M0 マクロファージを得た。

### (2) BMDM の分極化誘導およびマーカー遺伝子発現量の解析

M0 マクロファージを IFN- $\gamma$  (20 ng/mL) を添加した 5% FBS-RPMI1640 培地で 24 時間培養することにより M1 分極化を、IL-4 (10 ng/mL) を添加して同様に培養することにより M2 分極化を誘導した。M1/M2 分極化マーカーの遺伝子発現量により、マクロファージの M1/M2 分極化を評価した。M1/M2 分極化誘導 24 時間後のマクロファージから total RNA を抽出し、逆転写反応で cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて分極化マーカー遺伝子 (M1 マーカー: iNOS、M2 マーカー: Arg1, Ym1) の発現量の解析を行った。NCLX 阻害薬 CGP-37157 (10  $\mu$ M, 30  $\mu$ M) は、分極化の誘導開始時に培地中に添加した。

### (3) BMDM によるサイトカイン産生の定量

M1 マクロファージに LPS (100 ng/mL) を 4 時間処置した後、細胞から total RNA を抽出して逆転写反応で cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法を用いて IL-6 の遺伝子発現量を測定した。また、M2 マクロファージに LPS を 12 時間処置し、同様にして細胞の IL-10 遺伝子発現量を測定した。CGP-37157 (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) は、LPS 添加と同時に培地中に添加した。

## 4. 研究成果

### (1) M1/M2 分極化に対する NCLX 阻害薬の影響

M0 マクロファージに M1/M2 分極化を誘導し、各分極化マーカー遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。M0 マクロファージに IFN- $\gamma$  を 24 時間処置すると、M1 分極化マーカーである iNOS の遺伝子発現量が増加したことから、M1 マクロファージへの分極化が確認された。NCLX 阻害薬 CGP-37157 を IFN- $\gamma$  と同時に処置した細胞では、iNOS 遺伝子発現量がさらに増加する傾向がみられた (図 1 左)。一方、M0 マクロファージに IL-4 を 24 時間処置した場合には、M2 分極化マーカーである Arg1 および Ym1 の遺伝子発現量は増加し、M2 マクロファージへの分極化が確認された。また、CGP-37157 を処置しても Arg1 および Ym1 の遺伝子発現量増加にはほとんど影響が見られなかった (図 1 中・右)。これらの結果より、CGP-37157 による NCLX 阻害は、マ

クロファージの M1/M2 分極化に影響しないことが示された。

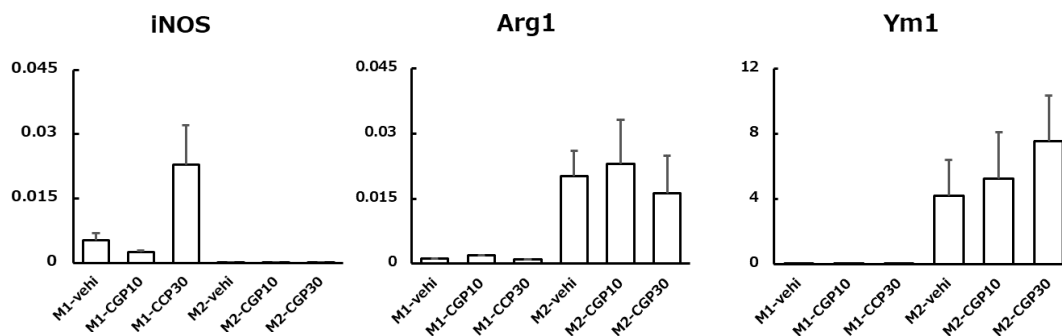


図1 M1/M2分極化マーカーの遺伝子発現量

(2) マクロファージによるサイトカイン産生に対する NCLX 阻害薬の影響

M1 マクロファージに LPS (100 ng/mL) を 4 時間処置したときの炎症性サイトカイン IL-6 の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定したところ、溶媒処置した M1 マクロファージと比較して増加が見られた。しかしながら、CGP-37157 は LPS 刺激による IL-6 遺伝子発現量の増加に影響しなかった (図 2 左)。一方、M2 マクロファージに LPS を 12 時間処置した場合には、抗炎症性サイトカイン IL-10 の遺伝子発現量の増加が見られた。この IL-10 遺伝子発現量の増加は、CGP-37157 を処置しても影響されなかった (図 2 右)。これらの結果より、CGP-37157 による NCLX 阻害は、マクロファージによるサイトカイン産生に影響しないことが示された。

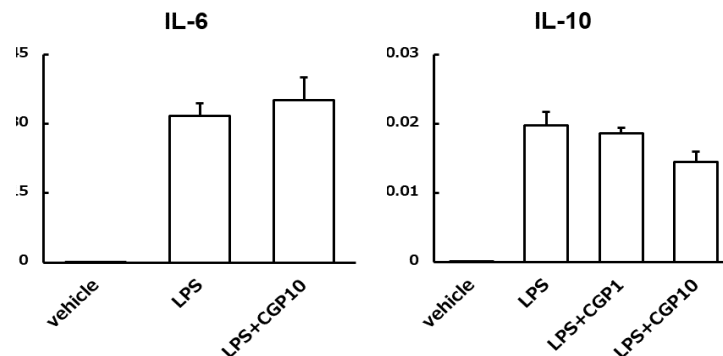


図2 サイトカインの遺伝子発現量

本研究において研究代表者らは、骨髄由来マクロファージの M1/M2 分極化および細胞機能における NCLX の関与について調べる目的で、NCLX 阻害薬を用いた検討を行った。その結果、M0 マクロファージから M1 あるいは M2 マクロファージへの分極化に対して、NCLX 阻害薬 CGP-37157 はほとんど影響しなかったことから、骨髄由来マクロファージの M1/M2 分極化に NCLX は関与しないものと考えられた。そこで次に、NCLX がマクロファージの細胞機能に関与する可能性について検討した。LPS は B 細胞、単球、マクロファージ等の免疫細胞を活性化するが、M1 マクロファージを LPS で刺激すると炎症性サイトカイン IL-6 産生が増加した。また、M2 マクロファージを LPS で刺激すると、抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生が増加した。しかしながら、CGP-37157 は M1 および M2 マクロファージによるサイトカイン産生に影響しなかったことから、マクロファージによる炎症反応の調節に NCLX が直接的に関与する可能性は低いと考えられた。

神経細胞などの興奮性細胞ではミトコンドリアからの  $Ca^{2+}$  汲み出しにおいて NCLX の寄与が大きいものに対して、肝細胞などの非興奮性細胞では  $H^+/Ca^{2+}$  交換輸送体の寄与が大きいことも報告されていることから、マクロファージでは  $H^+/Ca^{2+}$  交換輸送体の発現についても考慮する必要がある可能性が考えられる。また最近、マクロファージの分極化やサイトカイン産生に細胞外からの  $Ca^{2+}$  流入が関与するが、M1/M2 分極化はそれぞれ異なる  $Ca^{2+}$  流入経路を介することが報告されている。M2 分極化には *Orai1* を介した  $Ca^{2+}$  流入が必須であり、*Orai1* を欠損させると M2 マクロファージへの分極化が起こらなくなるが、このときにミトコンドリア機能が低下することが示されている。本研究では、NCLX 活性阻害によってマクロファージの分極化に影響が見られなかったが、NCLX を含めたミトコンドリア  $Ca^{2+}$  輸送体の発現変化によりミトコンドリア機能の低下が起こる条件下であれば、M2 マクロファージへの分極化に影響する可能性が考えられる。今回、マクロファージによる炎症性および抗炎症性サイトカインの産生には NCLX の関与は少ないと考えられたが、M2 マクロファージによるサイトカイン産生以外の機能に NCLX が関与することを示す知見を得ている。M2 マクロファージではケモカイン産生が促進されており、今後ミトコンドリアの  $Ca^{2+}$  動態との関連性について調べていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kurita K#, Ohta H# (Co-first author), Shirakawa I#, Tanaka M, Kitaura Y, Iwasaki Y, Matsuzaka T, Shimano H, Aoe S, Arima H, Ogawa Y, Ito A, Suganami T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Macrophages rely on extracellular serine to suppress aberrant cytokine production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11137
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-90086-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗田研人, 太田紘也, 白川伊吹, 伊藤綾香, 田中都, 有馬寛, 小川佳宏, 菅波孝祥
2. 発表標題 マクロファージのアミノ酸代謝による新たな炎症制御機構の解明
3. 学会等名 第93回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔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	喜多 紗斗美  (Kita Satomi)  (10461500)	徳島文理大学・薬学部・教授    (36102)	

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
---------	---------