

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16124

研究課題名（和文）炎症時のマクロファージにおける新規マーカー分子の確立と疾病治療への応用

研究課題名（英文）Novel marker molecules in macrophages during inflammation and application to disease therapy

研究代表者

今 理紗子（Kon, Risako）

星薬科大学・薬学部・特任講師

研究者番号：90779943

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）：本研究では、マクロファージにおけるAQPの機能やその生理学的意義を解析することにより、炎症性疾患に対する新規予防法や治療法について提言することを目的として、種々検討を行った。その結果、マウス腹腔マクロファージにLPSを添加するとAQP9のみが有意に増加することがわかった。また、AQP9ノックアウトマウスの腹腔マクロファージは、野生型マウスと比べて高い貪食活性を示した。以上の結果から、マクロファージにおけるAQP9は、炎症応答を制御している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、マクロファージによる炎症応答の制御においてAQP9がターゲットとなる可能性が示唆された。近年、AQP9は炎症性疾患との関わりが示唆されており、関節リウマチや乾癬、潰瘍性大腸炎患者において、その発現が増強していることが報告されている。今後、詳細に解析することにより、これら疾患の予防や治療に有用な情報を提供できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the function of AQP expressed on macrophages and its physiological roles in order to propose new preventive and therapeutic methods for inflammatory diseases. As a result, AQP9 expression level in mouse peritoneal macrophages was significantly increased after LPS treatment. In addition, the peritoneal macrophages from AQP9 knockout mice showed higher phagocytic activity than those of wild-type mice. These results suggest that AQP9 may regulate inflammatory responses in macrophages.

研究分野：Gastroenterology

キーワード：アクアポリン マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

体内には多種多様な免疫細胞が存在しており、近年、この免疫細胞を標的とした疾患治療に注目が集まっている。例えば、ニボルマブ(オプジーボ®)やペムブロリズマブ(キイトルーダ®)は免疫チェックポイント阻害薬と呼ばれ、これはリンパ球の表面にある **CD28** ファミリー受容体の一つである **PD-1** に結合し、がん細胞によって機能が抑制された **T** 細胞を活性化させることにより抗腫瘍効果を発揮する。一方、これらの薬物は全てのがん患者に有効なわけではなく、効果を示さない症例や副作用が問題となる場合がある。この理由として、がん患者における免疫応答が多様であることに加えて、免疫細胞の表現型に個人差があることなどが原因と考えられている。しかしながら、その詳細は不明であり、疾患の予防や治療を行う上で、免疫細胞をターゲットとする際には、その特徴や機能を把握することが極めて重要である。

免疫細胞の一つであるマクロファージは、細菌などの異物を貪食し排除するとともに、炎症を惹起することにより獲得免疫の発動に関与している。マクロファージは血液中に存在するほか、脳のミクログリアや肝臓のクッパー細胞など様々なタイプが全身に局在している。以前よりマクロファージは、メタボリックシンドロームや動脈硬化、がんの転移などに関与している可能性が示唆されている¹⁾。また最近では、マクロファージの形態学的特徴と分化調節因子、膜マーカー分子を複合的に捉えた疾患特異的マクロファージが提唱され、注目を集めている²⁻⁴⁾。したがって、マクロファージの特徴や機能を解析し、疾患との関わりを明確にしていくことは、様々な疾患の予防や新しい治療薬の開発の一助になり得る。

このような背景のなか、申請者は、大腸に発現する水チャネル「アクアポリン (**aquaporin ; AQP**)」の機能解析を行うなかで、抗がん薬により大腸炎が発症した際には、大腸に発現する **AQP** ファミリーのうち、ほとんどの **AQP** が減少したのに対して、**AQP9** のみが著明に増加することを明らかにした。また、増加が認められた **AQP9** は大腸のマクロファージに由来することを見出した。さらに、マクロファージと **AQP** との関係の詳細を調べるため、マウスマクロファージ細胞株 **RAW264.7** 細胞に **LPS** を添加し炎症を惹起させたところ、**AQP9** が著明に増加することを見出している。これらの知見は、マクロファージに発現している **AQP** が炎症応答に関与している可能性を示唆するものであり、マクロファージにおける **AQP** の発現パターンおよびその生理的役割が明らかとなれば、これまでない観点からマクロファージの特性を把握することが可能となり、炎症性疾患に対して新たな予防法や治療法を提案できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、上述した背景をもとに、マクロファージにおける **AQP** の機能やその生理学的意義を解析することにより、炎症性疾患に対する新規予防法や治療法について提言することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス腹腔マクロファージを **LPS** 刺激した際の **AQP** の発現変化

8~12 週齢の雄性 **C57BL/6N** マウスの腹腔から常在性マクロファージを採取し、 8.0×10^5 cells/well の密度で **12 well-plate** に播種した。**LPS (10 ng/mL)** 添加 **10** 時間後におけるサイトカインおよび **AQP** ファミリーの発現量を **real-time PCR** により解析した。

(2) マウス肝細胞を **LPS** 刺激した際の **AQP** の発現変化

8~12 週齢の雄性 **C57BL/6N** マウスを開腹し、下大静脈から **collagenase type** を含む **buffer** を灌流した後、肝臓を摘出した。0.7 μ m のフィルターを通した後、**percoll solution** と混和し、遠心分離により肝細胞を得た。 2.5×10^5 cells/well の密度で **12 well-plate** に播種し、**LPS (0.1~100 ng/mL)** 添加 **10** 時間後におけるサイトカインおよび **AQP** ファミリーの発現量を **real-time PCR** により解析した。

(3) マウス腹腔マクロファージの貪食能における **AQP9** の役割

8~12 週齢の雄性 **C57BL/6N** 系統の野生型マウス (**AQP9^{+/+}**) および **AQP9** ノックアウトマウス (**AQP9^{-/-}**) の腹腔から常在性マクロファージを採取し、 4.0×10^4 cells/well の密度で **96 well-plate** に播種した。貪食物質として **zymosan** を添加し、**30** 分後における貪食量を **405 nm** の吸光度を測定することで評価した。

4. 研究成果

(1) マウス腹腔マクロファージを **LPS** 刺激した際の **AQP** の発現変化

マウス腹腔マクロファージの **primary culture** に **LPS** を添加し、**10** 時間後におけるサイトカ

インおよび AQP ファミリーの発現量を解析した。その結果、マクロファージに LPS を添加すると、TNF- α および MCP-1 の mRNA 発現量がコントロールと比べて有意に増加することがわかった。LPS 添加時には AQP2、AQP3 および AQP5 の mRNA 発現量が、コントロールと比較して有意に低下した。これに対して、AQP9 の mRNA 発現量は LPS 添加によりコントロールと比べて約 32 倍有意に増加した。

以上のことから、マウス腹腔マクロファージを LPS 刺激すると、炎症に伴って AQP9 が顕著に増加することが明らかとなった。

(2) マウス肝細胞を LPS 刺激した際の AQP の発現変化

LPS による AQP9 の発現増加がマクロファージ以外の細胞でも生じるかについて、AQP9 の発現が豊富である肝細胞を用いて検討した。

マウス肝細胞の primary culture に LPS を添加すると、TNF- α および MCP-1 の mRNA 発現量は LPS の濃度依存的に増加した。一方、AQP9 の mRNA 発現量については、LPS をいずれの濃度で添加しても有意な変化はみられなかった。なお、マウス肝細胞に LPS を添加した際の AQP ファミリーの発現量については、AQP11 のみ有意に低下した。

以上のことから、LPS による AQP9 の発現増加は、マクロファージのような免疫細胞においてのみ認められる可能性が示唆された。

(3) マウス腹腔マクロファージの貪食能における AQP9 の役割

マクロファージは、異物を貪食し除去するとともに炎症を惹起し、生体内の免疫応答を担っている。このうち貪食は、異物を認知し除去する過程で様々なサイトカインやケモカインが分泌され、自然免疫や獲得免疫の発動に寄与することが知られている。そこで、マクロファージの貪食能における AQP9 の影響について調べた。なお、貪食物質としては、貪食能を評価する際に頻用される酵母由来の多糖 zymosan を用いた。

野生型 (AQP9^{+/+}) および AQP9 ノックアウト (AQP9^{-/-}) マウスの腹腔マクロファージそれぞれにおいて、zymosan 貪食量が有意に増加したが、AQP9^{-/-} の方が AQP9^{+/+} よりも有意に高い貪食活性を示した。

以上のことから、AQP9 は腹腔マクロファージの貪食能を負に制御していることが明らかとなった。

近年、AQP9 は炎症性疾患との関わりが示唆されており、関節リウマチや乾癬、潰瘍性大腸炎患者において、その発現が増強していることが報告されている⁵⁾。今後、マクロファージにおける AQP9 の役割について詳細に解析することにより、これら疾患の予防や治療に有用な情報を提供できるものと考えられる。

【引用論文】

- 1) Wynn TA, Chawla A, Pollard JW: Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, **496**, 445-455 (2013).
- 2) Bowdridge S, Gause WC: Regulation of alternative macrophage activation by chromatin remodeling. *Nat Immunol*, **11**, 879-881 (2010).
- 3) Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S: Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature*, **495**, 524-528 (2013).
- 4) Satoh T, Nakagawa K, Sugihara F, Kuwahara R, Ashihara M, Yamane F, Minowa Y, Fukushima K, Ebina I, Yoshioka Y, Kumanogoh A, Akira S: Identification of an atypical monocyte and committed progenitor involved in fibrosis. *Nature*, **541**, 96-101 (2017).
- 5) Mesko B, Poliska S, Szegedi A, Szekanecz Z, Palatka K, Papp M, Nagy L: Peripheral blood gene expression patterns discriminate among chronic inflammatory diseases and healthy controls and identify novel targets. *BMC Med Genomics*, **3**, 15 (2010).

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

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