

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660230

研究課題名(和文)非興奮性細胞におけるNCXを介した細胞機能調節の新規可能性

研究課題名(英文)New function of NCX on non-excitatory cells

研究代表者

東 泰孝 (Azuma, Yasu-Taka)

大阪府立大学・生命環境科学研究科(系)・准教授

研究者番号：50298816

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)は興奮性細胞である神経細胞、心筋細胞および血管平滑筋細胞における役割は明らかにされつつあるものの、免疫系細胞などの非興奮性細胞におけるNCXの役割は全く不明である。そこで、免疫系細胞であるマクロファージにおけるNCXの役割を解明するために、NCX遺伝子欠損マウスを用いて解析を行った。NCX1遺伝子ヘテロ欠損マウス、NCX2遺伝子ヘテロ欠損マウスおよびNCX3遺伝子ホモ欠損マウスの骨髄由来マクロファージは野生型マウス骨髄由来マクロファージと比べて、LPS刺激に伴う炎症性サイトカイン産性能は同程度であることが明らかとなった。

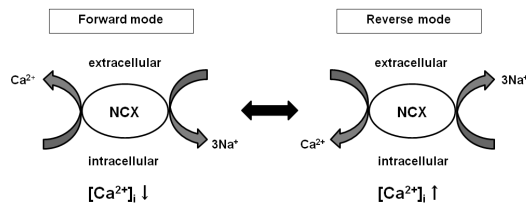
研究成果の概要(英文)：In order to demonstrate roles of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) on macrophages function, we determined whether NCX deficiency affects the cytokine production in bone marrow-derived macrophages response to LPS in vitro. Macrophages from NCX1 heterozygote mice, NCX2 heterozygote mice and NCX3 homozygote mice produced similar levels of pro-inflammatory cytokines in macrophages from wild-type.

研究分野：薬理学

キーワード：トランスポーター

1. 研究開始当初の背景

生体において Ca^{2+} は重要なセカンドメッセンジャーの 1 つであり、神経や筋の興奮、免疫反応、遺伝子発現および種々の代謝反応に参与する。細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) は主に細胞膜に存在する Ca^{2+} チャンネルからの流入、および、小胞体に存在する Ca^{2+} 放出チャンネルからの動員によって上昇し、細胞膜および小胞体の Ca^{2+} トランスポーターによって減少する。近年、生理学的観点から、 Ca^{2+} トランスポーターの 1 つである $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX) が注目されている (挿入図参照)。NCX は細胞膜を隔てた Na^+ の濃度勾配および膜電位に依存し、3 つ



の Na^+ と 1 つの Ca^{2+} を交換輸送する両方向性のトランスポーターである。NCX は細胞内から Ca^{2+} を排出し (forward mode; 挿入図左)、上昇した $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を速やかに元の状態に戻す働きの一部に参与することで、シグナルの鎮静化に参与する。一方、 Ca^{2+} チャンネルと同様に細胞内へ Ca^{2+} の流入を行い (reverse mode; 挿入図右)、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させ、筋収縮などの種々の反応を引き起こすとの報告もある。これまで、高血圧症における解析から forward mode は生理的役割において重要であり、reverse mode は病態発症に参与すると報告されていた。しかしながら、近年、reverse mode が血管における生理的な NO 放出に参与するとの報告もあることから、NCX の 2 つの mode が生理または病態機能のさまざまな場面に参与することが明らかとなりつつある。

哺乳類には 3 種類の NCX isoforms (NCX1, NCX2, NCX3) が見出されており、心筋細胞、神経細胞、平滑筋細胞をはじめさまざまな細胞において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の調節に参与することが見い出されている。NCX1 は種々の臓器に発現するが、特に心筋において高発現しており、T 管膜にそって局在し、筋小胞体から動員される Ca^{2+} を細胞外へくみ出す役割を担っている。一方、膜電位が急激に変化する活動電位のオーバーシュート時には NCX1 を介する Ca^{2+} 流入が起こり、興奮-収縮連関に部分的に参与するとの報告がある。膀胱では平滑筋の活性化を引き起こし、血管平滑筋では正常血圧の維持に参与することが知られている。脳には NCX の全ての isoforms が発現しているが、特に NCX2 が大脳皮質、小脳および海馬に多く、神経系

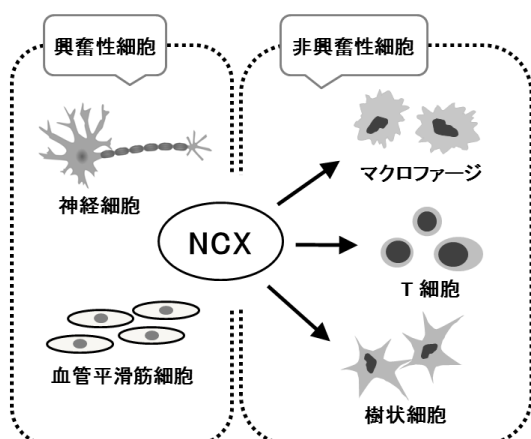
細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節に重要な働きを持つと考えられている。事実、NCX2 ノックアウトマウスを用いた実験により、NCX2 が行う $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節がシナプス可塑性の形成に重要であることが報告されている。NCX3 は主に脳や骨格筋に発現している。NCX3 ノックアウトマウスでは骨格筋線維の壊死および神経筋接合部の神経伝達障害が認められ、運動神経終末および骨格筋線維の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節において NCX3 が重要な役割を担うと考えられる。

以上は生理機能に参与する NCX の役割であるが、病態時における関与も報告されている。血管平滑筋では、塩分過多の食餌を続けることで NCX1 による異常な Ca^{2+} 流入が起き食塩感受性高血圧の発症に結びつくという報告がある。心肥大や心虚血が起こると心臓における NCX1 の発現が増加すると報告されている。脳において、重症な脳神経疾患患者に高酸素療法を行った際に認められる皮質下部の NCX1 発現増加が治療に寄与することや、脳卒中モデルである中大脳動脈永久閉塞では、NCX2 の forward mode が神経細胞保護的に働くことが報告されている。ハムスター腎に存在する NCX3 は農薬成分がもたらす毒性に対して感受性が高く、悪化傾向を示す。また、腎虚血再灌流障害では、NCX1 もしくは NCX2 をヘテロ欠損したマウスにおいて、NCX1 を欠損させたマウスでは保護的に、NCX2 を欠損させたマウスでは悪化傾向が見られるなど分子種特異的な違いがあることも明らかになっている。このように NCX は全身の各種組織細胞において $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 調節を介して生体内機能に重要な役割を担っている。

2. 研究の目的

研究代表者は、消化管運動に関わる腸神経系と消化管平滑筋における NCX の生理学的役割解明に関する研究活動 (Azuma et al. Neurogastroenterol. Motil. 2012) のなかで、消化管粘膜側の粘膜固有層において NCX 発現細胞が存在するという事実を見出した。周知の通り、粘膜固有層には神経や筋細胞は存在しないこと、さらに、文献的にも免疫系細胞を含めた非興奮性細胞における NCX など Ca^{2+} が移動する対向輸送体の関与の報告は国内外とも全くない。上記「1. 研究開始当初の背景」のところ述べてのように、NCX の役割に関する報告は数多くなりつつあるものの、いずれも、興奮性細胞である神経細胞、心筋細胞および血管平滑筋細胞における報告である。本課題では、これまで全く着目されてこなかった、免疫系細胞などの非興奮性細胞における NCX の役割を解明することを目的とした。非興奮

性細胞として免疫細胞を取り上げるが，本研究課題では，代表的な免疫細胞として T 細胞，マクロファージおよび樹状細胞を扱うこととした（下，挿入図参照）。



3. 研究の方法

野生型マウスと NCX1, NCX2, NCX3 の各遺伝子欠損マウスを用いて，T 細胞，マクロファージ，および樹状細胞における NCX1, NCX2, NCX3 の発現量を調べる．発現が認められる場合には，刺激に伴う細胞内 Ca 濃度，ならびに，サイトカイン産生能などの測定を行う．そのために，以下の実験方法を採用した．

1) NCX 発現の解析

【マクロファージ調製】野生型マウス，および NCX1, NCX2, NCX3 の各遺伝子欠損マウスの骨髄細胞を採取後，M-CSF を用いて 5 日間培養し，分化誘導によりマクロファージを調製する．

【CD4 陽性 T 細胞単離】野生型マウス，および NCX1, NCX2, NCX3 の各遺伝子欠損マウスの脾臓より抗 CD4 抗体によるポジティブセレクション，および，抗 CD8 抗体のネガティブセレクションにより CD4 陽性 T 細胞を単離する．

【T 細胞分化誘導】上記 T 細胞を予め抗 CD3 抗体を固着させたプレート中にて，抗 CD28 抗体を加えて 3 日間培養する．これを Th0 細胞とする．このとき，同時にリコンビナント IL-12 および抗 IL-4 抗体を加えて培養することで T 細胞を Th1 細胞へと分化させる．これを Th1 細胞とする．または，同時にリコンビナント IL-4 および抗 IFN-g 抗体を加えて培養することで T 細胞を Th2 細胞へと分化させる．これを Th2 細胞とする．

【樹状細胞調製】野生型マウス，および NCX1, NCX2, NCX3 の各遺伝子欠損マウスの骨髄細胞を採取後，GM-CSF を用いて 7 日間培養し，分化誘導により樹状細胞を調製する．

【定量 PCR】上記 Th0, Th1, Th2 の各 T 細胞，マクロファージおよび樹状細胞より mRNA を精製した後，NCX1, NCX2, NCX3 の発現をリアルタイム定量 PCR により定量解析する．

2) 細胞内 Ca 濃度測定

【細胞内 Ca 濃度】上記 Th0, Th1, Th2 の各 T 細胞，マクロファージおよび樹状細胞内の Ca 濃度を fluo-4/AM 試薬を用いて既存備品である Cellomics ArrayScan VT1 HCS Reader により測定する．刺激剤は thapsigargin あるいは LPS を用いる．

3) 細胞機能の変動

【サイトカイン産生能】上記【T 細胞分化誘導】における 3 日間の培養ののち，各 Th0, Th1, Th2 細胞の培養上清中に産生された IFN-gamma および IL-4 を ELISA キットにより測定する．マクロファージおよび樹状細胞を用いて，LPS で刺激したのち培養上清中に産生される TNF-alpha, IL-1beta, IL-6, IL-12 および IL-10 を ELISA キットにより測定する．

【細胞表面マーカー】上記マクロファージおよび樹状細胞を LPS で刺激した後，細胞表面上の MHC class II, CD80, および CD86 の発現レベルを既存備品であるフローサイトメトリーを用いて解析する．

【細胞内シグナル伝達経路】上記マクロファージおよび樹状細胞を LPS で刺激した後，細胞内シグナル伝達経路をウエスタンブロットティングにより解析する．シグナル伝達経路は各種存在するが，まず，STAT1 および STAT3 に対する特異的抗体を用いて発現変動を解析する．

4. 研究成果

(1) H26 年度

H26 年度は研究計画実施に向けた各種方法の技術的課題をまずは克服することとした．特に，T 細胞およびマクロファージを用いた細胞内 Ca²⁺濃度の測定について注力した．その結果，野生型マウスの脾臓およびリンパ節より調製した T 細胞ならびにマウス骨髄由来マクロファージを用いて，細胞内の Ca²⁺濃度の測定条件を見出すことができた．T 細胞およびマクロファージの細胞内 Ca²⁺濃度測定について実施経験が乏しかったものの，今回の成果により実験条件を試行錯誤することで，測定可能な実施条件を得ることができた．

しかしながら，3 種の NCX 欠損マウスの繁殖が上手くいかず，各種実験に用いるマウスの匹数を十分に確保することができなかった．3 種の NCX 欠損マウスを繁殖させ

る期間を有効活用するために、野生型マウスを用いて、各種方法を習得および習熟することに主眼を置いた。その結果、野生型マウスの脾臓より抗 CD4 抗体によるポジティブセレクション、および、抗 CD8 抗体のネガティブセレクションにより CD4 陽性 T 細胞を単離できることを確認した。さらに、これら CD4⁺T 細胞を予め抗 CD3 抗体を固層化させたプレート中にて、抗 CD28 抗体を加えて 3 日間培養し、このとき、同時にリコンビナント IL-12 および抗 IL-4 抗体を加えて培養することで T 細胞を Th1 細胞へと分化させた。同時に、リコンビナント IL-4 および抗 IFN- γ 抗体を加えて培養することで T 細胞を Th2 細胞へと分化させた。これら培養上清中に産生された IFN- γ および IL-4 について ELISA を用いて測定を行い、各々 Th1 細胞および Th2 細胞に分化させられていることを確認できた。続いて、野生型マウスの骨髄細胞を採取後、M-CSF を用いて 5 日間培養し、分化誘導によりマクロファージを調製し、LPS 刺激に伴い炎症性である TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および IL-12 の各種サイトカイン産生が増大することを ELISA アッセイにより確認した。

(2) H27 年度

H27 年度は、NCX 遺伝子欠損マウスより調製した細胞を用いて野生型マウスと比較することで、NCX の役割解明を目指した。NCX1 および NCX2 遺伝子欠損マウスはホモ欠損では胎生致死がみられたため、ヘテロ欠損マウスを使用した。NCX3 遺伝子についてはホモ欠損マウスを使用した。はじめに、これら 3 種類の NCX 遺伝子欠損マウスについて、一年齢まで飼育を行ったが、食事量、飲水量、体重変動、排便量および排便数に野生型と比べて明確な相違は認められなかった。次に、3 種類の NCX 遺伝子欠損マウスより骨髄由来マクロファージを調製したのち、グラム陰性菌外膜成分である LPS 刺激応答に伴う炎症性サイトカイン産生能を測定したところ、3 種類いずれの遺伝子欠損マウスにおいても野生型マウス骨髄由来マクロファージとの間に明確な変動は認められないことが明らかとなった。マクロファージのサイトカイン産生能に著変が認められなかったことから、NCX は炎症への関与は低い可能性が示唆される。

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)

〔その他〕

ホームページ等への記載なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東 泰孝 (AZUMA YASUTAKA)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：50298816

(2) 研究分担者

倉本 展行 (KURAMOTO NOBUYUKI)
摂南大学・薬学部・准教授

研究者番号：60324092