

水輸送タンパク質による新規炎症制御メカニズムの解析

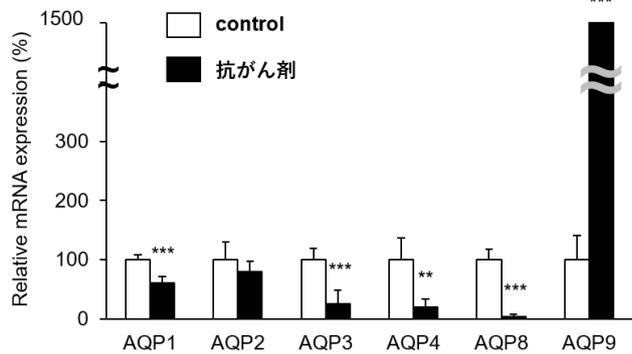
星薬科大学 生体分子薬理学研究室

今 理 紗 子

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病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 programmed death receptor-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。しかしながら、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、疾病の治療や予防を行う上で、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が、最近では、マクロファージの新概念として、そ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^{1,2)}。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、我々はこれまでに、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、抗がん剤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³⁾、AQP9 のみが著明に増加することを明らかにした（右図；未発表データ）。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。



図：抗がん剤誘発大腸炎における大腸AQPの発現変化

AQP は、AQP0～AQP12 までの異なるサブタイプが全身の様々な細胞に発現している。一般に、AQP は水の移動が活発な器官の細胞、例えば腎臓尿細管細胞や大腸上皮細胞などにおいて重要な役割を担っているものと考えられている。マクロファージは、これら細胞と比べて生体内の水の移動には無関係であると捉えられがちであるが、細胞体積が「水」により維持されていること、ならびに異物の貪食や炎症惹起の際にマクロファージの体積が大きく変化することから、水チャネル AQP の発現や機能はマクロファージの免疫応答において重要な役割を担っているものと考えられる。しかしながら、マクロファージにおける AQP の発現特性やその生理的意義については不明な点が多く残っていた。そこで本研究では、マクロファージにおける AQP の役割とその生理的意義について解析するとともに、大腸炎における疾患特異的マクロファージのマーカー分子としての AQP の有用性を検討することとした。

1. M1/M2 マクロファージにおける AQP の発現特性の解析

マクロファージによる免疫応答には、M1 および M2 というマクロファージのサブセットが関与すると考えられてきた⁴⁾。M1 マクロファージは、リポ多糖 (LPS; lipopolysaccharide) などの菌体成分やインターフェロン γ (IFN- γ ; interferon-gamma) によって誘導され、炎症性サイトカインを産生し、細菌などの病原体を殺傷する役割を果たしている。一方、M2 マクロファージはインターロイキン (IL; interleukin) -4 あるいは IL-13 によって誘導され、抗炎症作用や組織修復作用を有する。マクロファージは、これら 2 つの状態を行き来することにより生体の免疫応答をコントロールしていると考えられている。そこでまず、M1

あるいは M2 マクロファージにおける AQP の発現特性を調べた。

マウスマクロファージ様 RAW264.7 細胞に LPS (10 ng/mL) を添加すると、tumor necrosis factor- α (TNF- α) および monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) の mRNA 発現量がコントロールと比べて有意に増加し、M1 マクロファージへの極性化が確認できた。このときの AQP の mRNA 発現量を網羅的に解析したところ、AQP9 のみがコントロールと比べてその発現量が約 10 倍に増加していた。一方、RAW264.7 細胞に IL-4 (10 ng/mL) を添加した場合には、M2 マクロファージのマーカーである CD206 の mRNA 発現量が増加していたものの、いずれの AQP においても有意な変化は認められなかった。

次に、RAW264.7 細胞で認められた現象が、生体細胞においても起こり得るかを調べた。具体的には、マウスの骨髄から単球様前駆細胞を単離し、bone marrow-derived macrophage (BMDM) の primary culture を作製して LPS あるいは IL-4 による免疫応答と AQP の発現量を解析した。BMDM に LPS を添加すると、TNF- α および MCP-1 の発現量はコントロールと比べて有意に増加した。このときの AQP ファミリーのうち AQP9 のみコントロールの約 200 倍有意に増加した。一方、BMDM に IL-4 を添加した場合には、M2 マクロファージのマーカーである arginase-1 の発現レベルが亢進し、この際、AQP3 が約 30 倍、AQP9 が約 10 倍増加した (右図)。

以上の結果から、マクロファージが M1 へと誘導された場合には、AQP9 のみが特異的かつ著明に増加することが明らかとなった。また、マクロファージが抗炎症性の M2 状態へと誘導された場合には、使用する細胞によって AQP の発現パターンが異なることが示唆された。

2. M1 マクロファージにおける AQP9 の発現パターンの解析

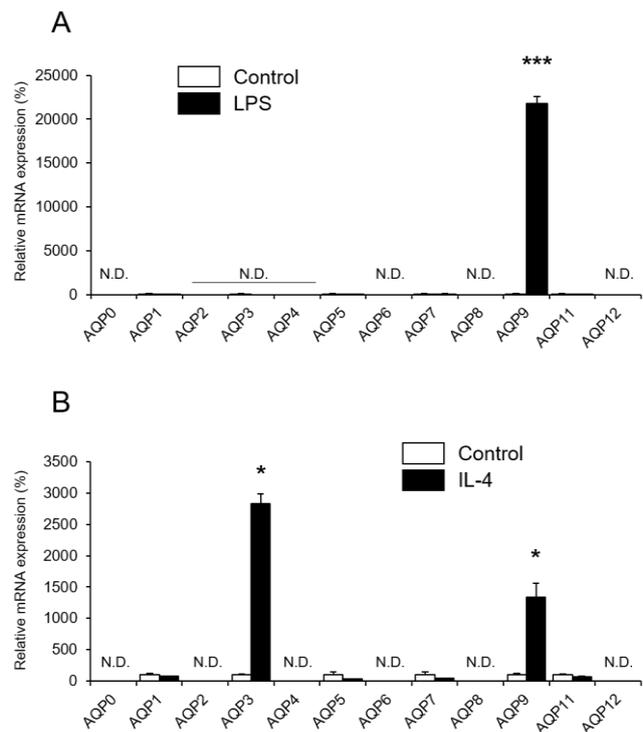
上述の通り、マクロファージが炎症性の M1 状態へと誘導された場合には、AQP9 のみが特異的に増加することが明らかとなった。また、背景でも述べた通り、抗がん剤を投与し大腸炎が発症した際には、AQP9 のみが著明に増加していた (p1. 図)。加えて、これまでに未治療の潰瘍性大腸炎患者の大腸において AQP9 が増加していることも報告されている⁹⁾。これらのことから、大腸炎の発症や増悪には M1 マクロファージが関与していること、AQP9 の発現増加が大腸炎の病態形成に何らかの役割を担っていると考えられたが、マクロファージによる炎症性の免疫応答と AQP9 との関係については未だ不明な点が多く残っていた。そこで次に、マクロファージによる炎症性の免疫応答と AQP9 との関係を調べた。

RAW264.7 細胞に LPS を 0.1~100 ng/mL の濃度で添加したところ、12 時間後における TNF- α 、MCP-1 および AQP9 の mRNA 発現量が、いずれも LPS の濃度依存的に有意に増加した。また、RAW264.7 細胞に LPS (10 ng/mL) を添加し、24 時間後まで経時的に炎症の程度と AQP9 の発現量を調べた。その結果、LPS 添加 30 分後から TNF- α および MCP-1 の mRNA 発現量が有意に増加し始め、12 時間後にピークとなり、24 時間後にはその程度が減弱していた。一方、AQP9 の mRNA 発現量は、LPS 添加 3 時間後から増加し始め、炎症性サイトカインの発現ピークが過ぎた 24 時間後においても添加前の約 20 倍と高値であった。以上のことから、LPS による AQP9 の発現増加は、マクロファージの炎症性の免疫応答よりも遅れて生じることが明らかとなった。

次に、LPS による AQP9 の発現誘導が、マクロファージ特異的であるかを検討した。AQP9 は、生体内において肝臓の hepatocyte に多く発現していることが報告されている。そこで、マウス hepatocyte の primary culture を用いて同様に検討した。その結果、マウス hepatocyte に LPS を添加すると、TNF- α および MCP-1 の mRNA 発現量が LPS の濃度依存的に増加したものの、AQP9 の発現には変化が認められなかった。

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などの免疫細胞においてのみ認められる可能性が示唆された。

本研究の結果から、マクロファージが M1 へと誘導された場合には、AQP9 が特異的に増加することが明らかとなった。また、この変化はマクロファージにおける炎症性の免疫応答よりも遅れて生じることも明ら



図；BMDMをLPS (A) あるいはIL-4 (B) 刺激した際のAQPsの発現変化

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⁶⁾。一方、AQP9 ノックアウトマウスでは、chemokine C-C motif ligand (CCL) 3、CCL4、CCL5 の産生が低下する一方で、IL-10 の産生量が増加すること⁷⁾、AQP9 が炎症応答に重要な役割を担っている nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor family pyrin domain-containing (NLRP) 3 インフラマソームの活性化に関与していることも報告されている⁸⁾。本研究では、マクロファージにおける AQP9 の役割について、その全容を解明することができなかったが、今後、詳細に解析することにより、免疫細胞において AQP を標的とした炎症性疾患の予防法や治療法を提案できる可能性が考えられる。

【引用論文】

1. Satoh T, et. al., *Nature*, **495**, 524-528 (2013)
2. Satoh T, et. al., *Nature*, **541**, 96-101 (2017)
3. Kon R, et. al., *Int J Mol Sci*, **19**, (2018)
4. Shapouri-Moghaddam A, et. al., *J Cell Physiol*, **233**, 6425-6440 (2018)
5. Taman H, et. al., *J Crohns Colitis*, **12**, 327-336 (2018)
6. Mesko B, Poliska S, et al., *BMC Med Genomics*, **3**, 15 (2010)
7. De Santis S, et. al., *Front Immunol*, **9**, 2355 (2018)
8. Schorn C, et. al., *J Biol Chem*, **286**, 35-41 (2011)