



Title	自然免疫リガンドによる協奏的なサイトカイン分泌活性評価
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2023
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/90969">https://hdl.handle.net/11094/90969</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 令和4年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	くろかわ ともし 黒川 智暉	学部 学科	理学部化学科	学年	2 年
ふりがな 共 同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	かばやま かずや 樺山 一哉	所属	大阪大学理学研究科化学専攻 天然物有機化学研究室		
研究課題名	自然免疫リガンドによる協奏的なサイトカイン分泌活性評価				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

## 1. 研究目的

自然免疫は、侵入してきた病原体や異常になった自分の細胞を受容体で素早く感知し、これを体内から排除する仕組みである。アドバイザー教員が所属する研究室では、他大学との共同研究により、大腸菌膜構成分子のリポ多糖(LPS)と細胞膜構成分子のガングリオシド GM3 が相乗的にマクロファージの炎症性サイトカイン分泌を調節することを発見した。その作用機序には、上記分子の脂質構造などが大きく関与していることが分かったが、細胞には GM3 以外にも多くの脂質分子が含まれており、これらとの関連性はまだ検討されていない。また LPS 以外の病原体成分などを認識する受容体との関連も未検証である。そこで私は、炎症性サイトカインの分泌活性に関与する新たな細胞膜構成脂質分子を探索し、自然免疫シグナルの理解を深めることを目的として検討を実施する。この実験を行うことで、自然免疫ひいてはこれに続く獲得免疫に関わる分子を詳細な構造レベルで同定できれば、炎症制御や抗ウイルス・抗腫瘍活性を調節できる薬剤分子の創成へとつなげることができる。

## 2. 研究計画、研究方法

上記の研究目的を達成するために、以下の研究計画を実行した。

- 1) マウス骨髄由来のマクロファージの分化培養と活性評価
- 2) GM3 以外の細胞膜脂質によるサイトカイン分泌活性評価
- 3) フローサイトメトリーによるマウス骨髄由来マクロファージの活性状態評価

具体的な実験方法を以下に記す。

1) マウスの大腿骨から骨髄を抽出し、中に含まれる細胞を培養した。抽出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)および LPS を用いた。分化状態は顕微鏡による視認あるいはフローサイトメトリーによる分化マーカーの発現で確認した。(図3)(図4) マウスマクロファージ RAW264.7 細胞も併せて検討に用いた。この実験により、細胞培養技術ならびに細胞表面分子の発現解析技術を習得しつつ、最適なマクロファージ分化条件を確立した。

2) 上記の解析系を確立後、GM3 以外の細胞膜脂質であるスフィンゴエミリンと LPS を混在させた

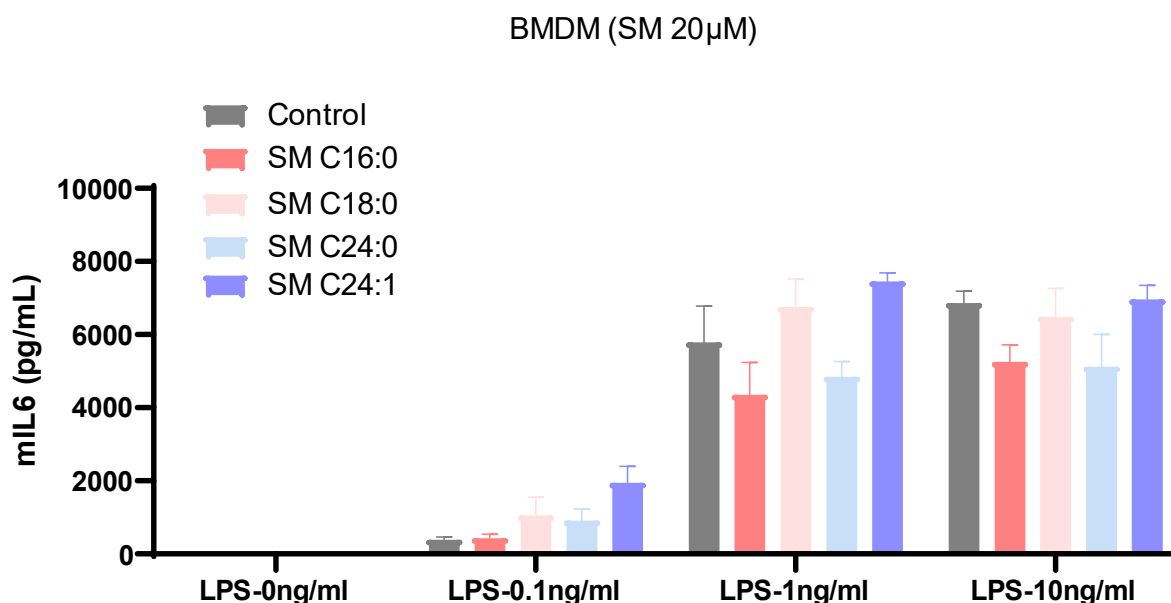
時 IL-6 の分泌活性評価を ELISA 法で行った。(Mouse IL-6 uncoated ELISA kit 88-7064-88)

以上の検討から、TLR に対して協奏的に作用するスフィンゴリエリン分子の構造およびその濃度条件を探索した。

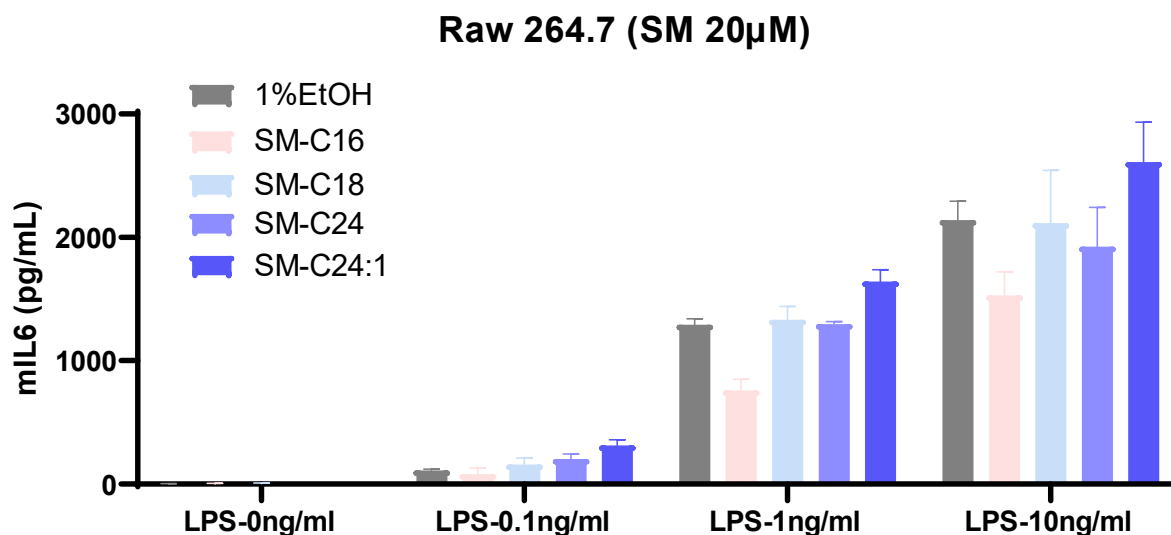
3) 2022 年 5 月 19 日に分化させたのち冷凍保存していたマウス骨髄由来マクロファージを解凍し、分化状態や活性状態の確認をおこなった。これにより冷凍、解凍を経た後のマウス骨髄由来マクロファージの変化について考察した。

### 3. 研究経過、研究結果

1) 2) 今回実施した実験を通して、TA が以前に実施していたマウスマクロファージ RAW264.7 細胞株と比べてマウス骨髄由来マクロファージのほうが明らかにサイトカイン放出量が多いという結果が出た。(図 1) (図 2) さらに GM3 以外の細胞膜脂質である、スフィンゴリエリンを用いたサイトカイン分泌活性評価の実験から、スフィンゴリエリンもサイトカイン分泌調節に関与していることを確認できた。また、スフィンゴリエリンも GM3 と同様に脂肪酸残基の構造の違いによるサイトカイン分泌量の変化が確認された。

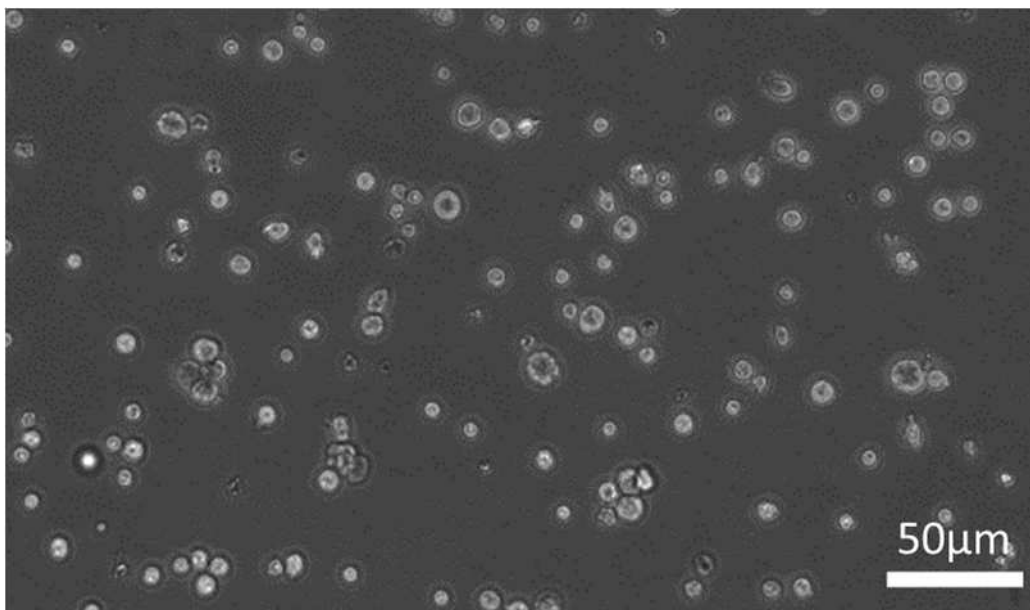


(図 1) マウス骨髄由来マクロファージとスフィンゴリエリン共存下での IL-6 放出量

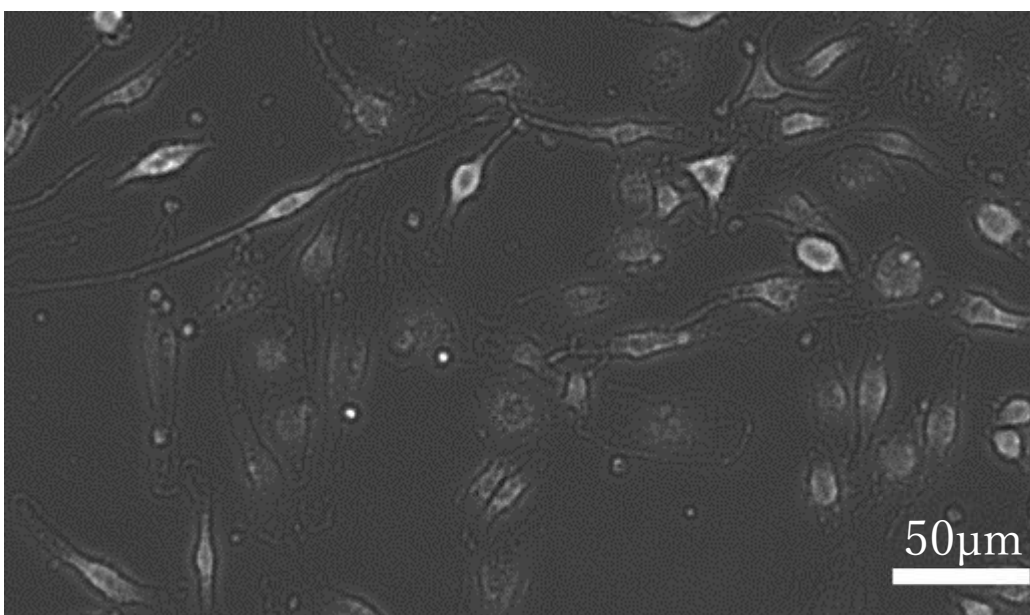


(図 2) マウスマクロファージ RAW264.7 細胞株とスフィンゴリエリン共存下での IL-6 放出量

しかし、有意差検定をすると有意差が出ないような結果がほとんどであった。今後はきちんとデータとして示すことができるようにさらに研究回数を増やし、検定をすることが必要である。



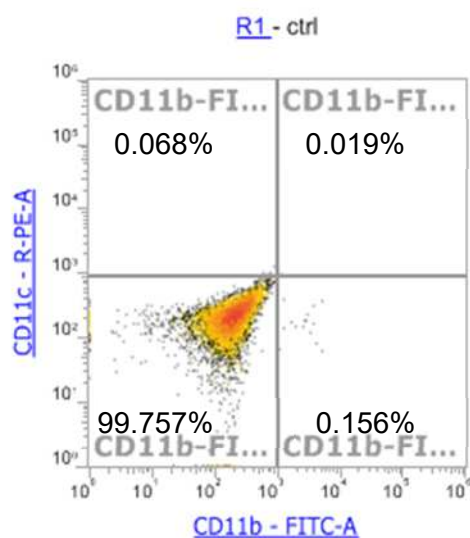
(図 3) マクロファージへの分化を誘導するサイトカイン M-CSF を添加後  
(Bone marrow cells\_M-CSF(40ng/ml)\_0h)



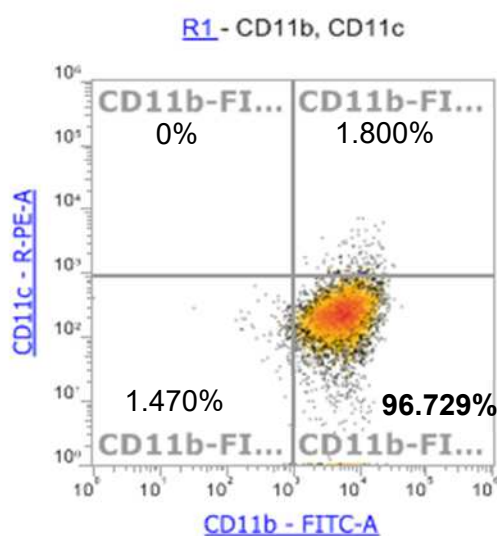
(図 4) マクロファージへの分化を誘導するサイトカイン M-CSF を添加後  
(Bone marrow cells\_M-CSF(40ng/ml)\_7days)

3) マウス骨髄由来マクロファージを分化させた直後の様子については TA がフローサイトメトリーを実施しており、今回は初めて冷凍保存したマウス骨髄由来マクロファージでも同様にマクロファージの抗原が発現されているのかを調べた。冷凍保存前のフローサイトメトリーでは、マクロファージマーカーの CD11b、樹状細胞マーカーの CD11c での染色をおこなった。(図 5) (図 6) この時、マクロファージ様細胞である RAW 細胞と分化させたマウス骨髄由来細胞の抗原発現量がほとんど同じ

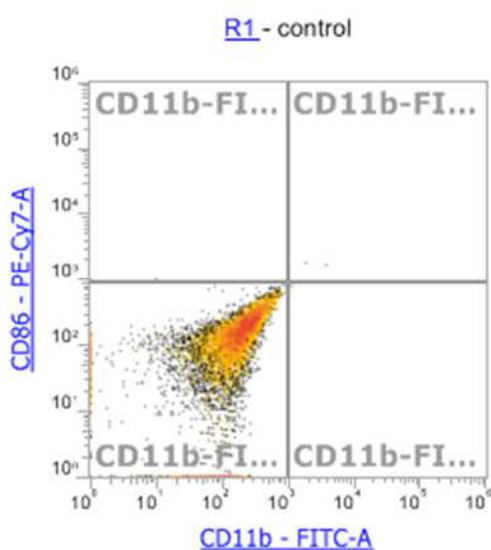
であったため、今回分化させた骨髄由来細胞はマクロファージに分化させられていたと改めていうことができる。(図5)(図6) また、2022年5月19日に冷凍したマウス骨髄由来マクロファージを2022年11月21日に解凍してフローサイトメトリーを実施した。マクロファージの抗原を認識する抗体(CD11b)、マクロファージが活性化しているときに発現する抗原を認識する抗体(CD86)を用いて実験を行った。実験から、マウス骨髄由来マクロファージを約六か月間冷凍保存し、解凍したのも分化させた直後と同様にマクロファージとしての性質を持っていることが分かった。さらに活性化させるサイトカインなどを添付していない状態ではマクロファージが勝手に活性化していないことも確認し、これらのことから、冷凍保存の内に不用意に活性化していないことも同時に分かった。(図7)(図8)(図9)(図10)(図11)



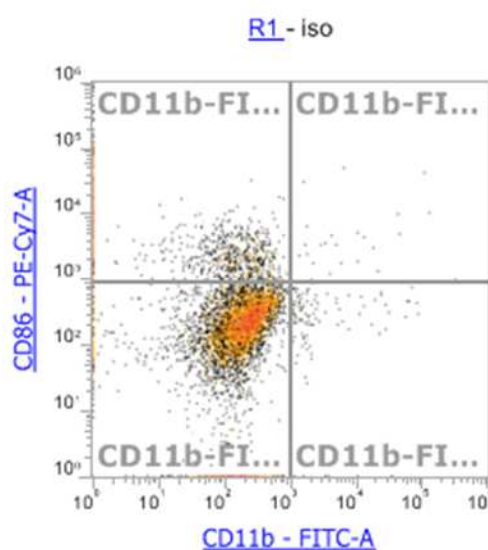
(図5) 2022/5/19 control



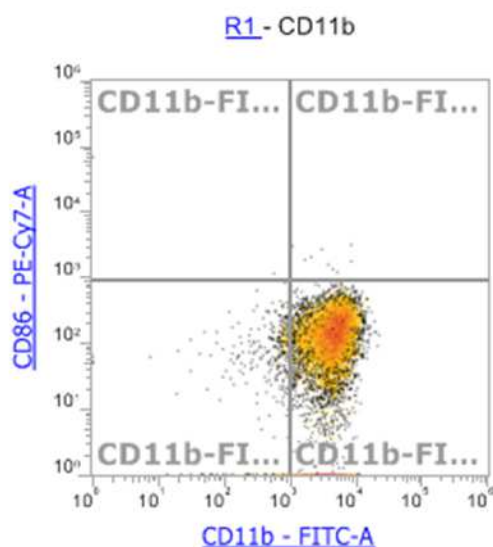
(図6) 2022/5/19 CD11b, CD11c



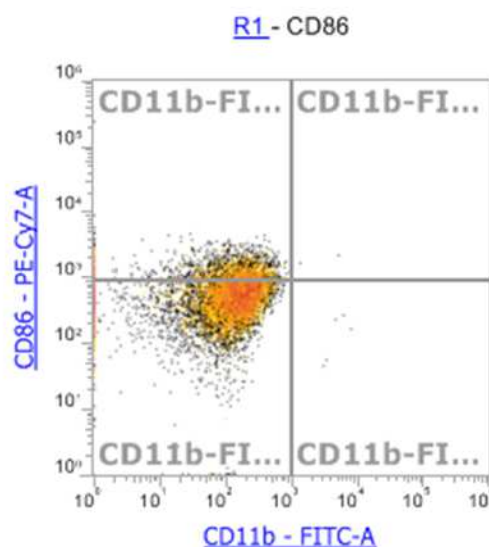
(図7) 2022/11/21 control



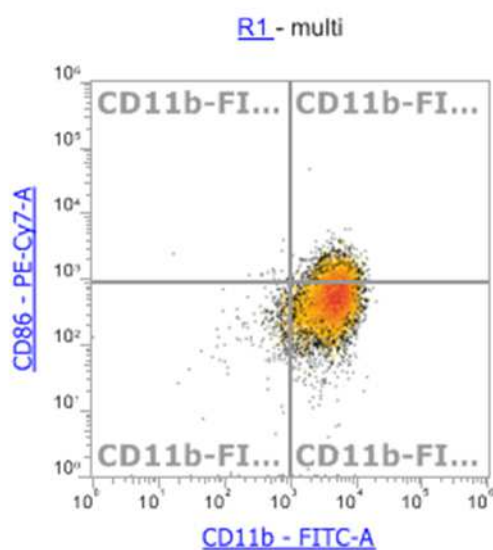
(図8) 2022/11/21 isotype control



(図 9) 2022/11/21 CD11b



(図 10) 2022/11/21 CD86



(図 11) 2022/11/21 CD11b, CD86

#### 4. 考察

以上の結果から、マウス骨髄細胞から単離したマクロファージのほうが、従来の細胞株に比べて反応性が高いことを踏まえて、今後はより反応性の低い免疫反応を確認できるようになる。さらに生きたマウスから細胞を単離しているので、より同じ哺乳類であるヒトに近い条件での実験が可能になる。スフィンゴミエリンを用いても GM3 と同じように炎症反応の抑制、活性が見られそうである。この結果が、スフィンゴミエリンが持っている炭素鎖の違いからくるものだと示すためには、今後は同様の実験を繰り返し、さらには有意差検定をおこない、条件を最適化する必要がある。マウス骨髄由来マクロファージの性質や活性をより理解するためには、フローサイトメトリーで他の抗原を用いて実験することが必要である。

## 5. 参考文献

1) 「ガングリオシドのアシル鎖構造による Toll-like receptor 4 活性化制御メカニズム」

[https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/seikagaku\\_seitaibogyo/jeiis/pdf/No22/No22-1.pdf](https://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab/seikagaku_seitaibogyo/jeiis/pdf/No22/No22-1.pdf)

2) 「内因性リガンドによる Toll 様受容体制御と慢性炎症疾患への関与の解明—ガングリオシドによる TLR4 シグナルの恒常性維持と破綻のメカニズム—」

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/142/3/142\\_21-00193/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/142/3/142_21-00193/pdf)