【短 報】

Kupffer 細胞一酸化窒素産生におよぼす乳酸の影響

矢 野 博 己¹⁾ 松 崎 裕 美²⁾ 吉 良 尚 平³⁾

EFFECT OF LACTATE ON NITRIC OXIDE PRODUCTION OF
KUPFFER CELLS IN VITRO

HIROMI YANO, HIROMI MATSUZAKI and SYOHEI KIRA

key word : macrophage, lactate, NO, in vitro

I. 緒 言

近年、運動と免疫の関係が注目され、マクロファージについても様々な研究が報告されている¹⁾。しかし、肝在住マクロファージである Kupffer 細胞におよぼす運動の影響についてはほとんど報告を見ない。運動時の Kupffer 細胞をとりまく環境は、門脈を介した腸管由来のエンドトキシン (LPS; lipopolysaccharide) の影響²⁾ 以外にも、肝グリコーゲンの分解の結果生じる乳酸産生亢進³⁾、さらに骨格筋の解糖系亢進に由来する血中乳酸濃度の上昇⁴⁾ など高乳酸濃度の血液にさらされるものと考えられる。乳酸が Kupffer 細胞機能にどのような影響をおよぼすのかについては検討されていないが、近年、乳酸輸送担体の同定⁵⁾、そして骨格筋だけでなくマクロファージにも存在することが報告され⁶⁾、乳酸がマクロファージに対して何らかの影響をおよぼす可能性が示されるようになった。

一方で、Kupffer 細胞は一酸化窒素 (NO: nitric oxide) の産生を介して、肝癌細胞をアポトーシスへ誘導する作用が明らかにされた⁷⁾。また近年、運動には抗癌作用を有することも報告されるよう

になり⁸⁾、肝細胞癌に対する運動の効果についても報告が見られる^{9,10)}。そして運動トレーニングによる腹腔マクロファージ¹¹⁾、Kupffer 細胞¹²⁾ の NO 産生亢進が示されているが、運動によって変化するどのような因子がマクロファージの NO 産生を刺激しているのかについては未だ明らかにされていない。

そこで我々は Kupffer 細胞 NO 産生に対して、運動時上昇する血中乳酸が関係すると仮説し、Kupffer 細胞 NO 産生と乳酸との関係について in vitro で検討を行なった。

II. 方 法

実験には 8~9 週齢の Fischer 344 系雌性ラットから分離した初代培養 Kupffer 細胞を用いた。Kupffer 細胞の分離は Mochida ら¹³⁾ の方法にしたがった。すなわちペントバルビタール麻酔下で、無菌的に、pronase E と、collagenase を用いて門脈灌流を行った。灌流後、DNase を添加しさらにインキュベーションした。濾過後、400 rpm, 4℃で 6 分間の遠心分離、さらに 1,600 rpm, 4℃で 6 分間の遠心分離を行い、非実質細胞を採取した。18% メトリザマイドで 2,700 rpm, 25℃, 15 分間

¹⁾ 川崎医療福祉大学医療技術学部健康体育学科
〒701-0193 岡山県倉敷市松島288

²⁾ 和洋女子大学家政学部健康栄養学科
〒272-8533 千葉県市川市国府台2-3-1

³⁾ 岡山大学医学部公衆衛生学
〒700-8558 岡山県岡山市鹿田町2-5-1

Department of Health and Sports Sciences and Kawasaki University
of Medical Welfare, 288 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0193

Department of Health and Nutrition, Wayo Women's University,
2-3-1 Kounodai, Ichikawa, Chiba, 272-8533

Department of Public Health, Okayama University Medical School,
2-5-1 Shikata-cyo, Okayama, 700-8558 Japan

の遠心分離から Kupffer 細胞および類洞内皮細胞を分取した. yield と viability を測定し, 37°C, 5 % CO₂ インキュベーター内で 10%FCS (fetal calf serum) DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地を使用し 1 時間培養後, 接着細胞以外を取り除き, トリプシン処理後 96 穴プレートに, 2×10^4 個, または 24 穴プレートに 2×10^5 個まきなおした. 培養 24 時間後, 100 ng/ml の LPS 処理条件下で乳酸添加実験を行なった. LPS・乳酸添加後 24 時間培養し, 上清を用いてグリース法¹⁴⁾で NO 副産物である nitrite を測定した. 培地 pH は pH 試験紙で測定した.

また LPS・乳酸添加後 6 時間培養 Kupffer 細胞を用いて, Isogen 処理によって RNA を抽出後, RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法によって iNOS (inducible NO synthase) mRNA 発現を比較した. 用いたプライマーは, iNOS: 5'-GATCAATAACCTGAAGCCCG-3', 5'-GCCCTTTTTTGCTCCATAGG-3'¹⁵⁾, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase): 5'-TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTTGG-3',

5'-ACGACATACTCAGCACCAGCATCAC-3'¹⁶⁾であった.

さらに MTT [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] アッセイ¹⁷⁾を用いて, LPS・乳酸添加による Kupffer 細胞ミトコンドリア機能についても評価した.

統計処理は, 2 群間の比較には Student T-テストを使用し, 乳酸添加濃度の違いに対する NO 産生量の有意性については, 1 元配置の分散分析を用いた後, post hoc test として Fisher's PLSD を用いた. 5 % 水準を持って有意とした.

Ⅲ. 結果と考察

Kupffer 細胞の非カルシウム依存性 iNOS 由来の NO 産生に対して, 乳酸の影響が観察されるのかについて検討を行なった結果, LPS と 10 mM 乳酸の同時添加によって, LPS 単独刺激による NO 産生よりも有意な産生増加が観察された ($p < 0.01$, Fig. 1A). さらに Kupffer 細胞の iNOS mRNA 発現増強も確認され (Fig. 1B), 乳酸による iNOS 遺伝子発現を介した NO 産生促進作用が明

Fig. 1. The effect of lactate on NO production in LPS-treated Kupffer cells in vitro. Nitrite production (A, $n=4$), iNOS mRNA expression (B) and MTT assay (C, $n=4$) of Kupffer cells in 10%FCS DMEM were shown. Values were shown the mean $\pm$ SE. ** $p < 0.01$. LPS, 100ng/ml lipopolysaccharide and vehicle; LPS+La, 100 ng/ml lipopolysaccharide and 10 mM lactate treatments.

らかとなった。高強度運動時に観察される 10 mM 程度の血中乳酸濃度の上昇は、Kupffer 細胞の NO 産生亢進に寄与するのかもしれない。

一方、10 mM 乳酸添加培養による MTT の低下、すなわち Kupffer 細胞ミトコンドリア機能低下が観察された ($p < 0.01$, Fig. 1C)。NO は産生細胞自身に対しても細胞毒性を発揮すること¹⁸⁾、さらに乳酸による NAD/NADH の低下も報告されており¹⁹⁾、ミトコンドリアエネルギー代謝機構に依存しない機序によって乳酸による NO 産生が亢進するものと考えられる。

iNOS の遺伝子発現は転写因子 NF- κ B (nuclear factor-kappa B) によって調節されており、NF- κ B は炎症性サイトカインである TNF- α (tumor necrosis factor alpha) の転写因子としても作用する。乳酸を添加した培養実験で、LPS 刺激によるマクロファージの TNF- α mRNA 発現が抑制されることが報告されており²⁰⁾、同じ転写因子が関与する NO と TNF- α では結果が異なることに

なる。しかし、この報告は pH が 5.4 での培養結果であり、本研究では培地の緩衝作用により 10 mM の乳酸添加時であっても、pH は 7.2 に維持されており (Fig. 2A)、条件が異なる。50 mM 乳酸添加実験では、pH は 5.0 に低下し、この条件下では、やはり NO 産生の有意な抑制が観察された (Fig. 2B)。実際に、生体内において高強度運動時であっても血液 pH が著しく低下することはなく、10 mM 程度の生理的条件下での本研究結果から NO 産生亢進には乳酸による水素イオン濃度変化は関与していないものと思われる。

近年、Hahn ら⁶⁾ はマクロファージの乳酸輸送担体である MCT 1 (monocarboxylate transporter type 1) の発現が LPS によって増強することを明らかにしている。マクロファージには積極的に乳酸を取り込む機構が存在していると考えられ、運動によって劇的に変化する血中乳酸がマクロファージ機能に関与している現象として、NO 産生の亢進が本研究から示唆されたものと考ええる。

Fig. 2. Changes of pH in 10%FCS DMEM (A) and nitrite production of 100 ng/ml LPS-treated Kupffer cells (B, $n=4$) in response to increasing doses of lactate in vitro. Plots of pH were shown typical values and values of nitrite production were shown the mean $\pm$ SE. $p < 0.01$, superscript letters indicate significance between pairs of values having the same letter.

Ⅳ. 結 論

本研究は, Kupffer 細胞 NO 産生に対して, 乳酸が関与し得るかどうかについて, *in vitro* で検討を行った. その結果, LPS 存在下での 10 mM 乳酸刺激は, Kupffer 細胞 NO 産生能を亢進させる可能性が示唆された.

謝 辞

本研究は, 平成13年度川崎医療福祉大学プロジェクト研究助成によって実施された.

(受理日 平成14年 6 月10日)

参 考 文 献

- 1) Woods, J. A., Davis, J. M., Smith, J. A., & Nieman, D. C., Exercise and cellular innate immune function. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (1999), **31**, 57-66.
- 2) 矢野博己, 運動と Kupffer 細胞機能, 体育の科学, (2001), **51**, 124-133.
- 3) Wasserman, D. H., Williams, P. E., Lacy, D. B., Goldstein, R. E., & Cherrington, A. D., Exercise-induced fall in insulin and hepatic carbohydrate metabolism during muscular work. *Am. J. Physiol.*, (1989), **256** (Endocrinol. Metab., 19), E500-E509.
- 4) Durkot, M. J., & de Garavilla, L., Exercise in the heat: effects of an adenosine antagonist. *Int. J. Sports Med.*, (2000), **21**, 270-274.
- 5) Price, N. T., Jackson, V. N., & Halestrap, A. P., Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem. J.*, (1998), **329**, 321-328.
- 6) Hahn, E. L., Halestrap, A. P., & Gamelli, R. L., Expression of the lactate transporter MCT1 in macrophages. *Shock*, (2001), **13**, 253-260.
- 7) Kurose, I., Saito, H., Miura, S., Ebinuma, H., Higuchi, H., Watanabe, N., Zeki, S., Nakamura, T., Takaishi, M., & Ishii, H., CD18/ICAM-1-dependent oxidative NF- κ B activation leading to nitric oxide production in rat Kupffer cells cocultured with syngeneic hepatoma cells. *J. Clin. Invest.*, (1997), **99**, 867-878.
- 8) Pedersen, B. K. (Ed.), *Exercise Immunology*, Springer, (1997).
- 9) Shewchuk, L. D., Baracos, V. E., & Field, C. J., Dietary L-glutamine supplementation reduces the growth of the Morris Hepatoma 7777 in exercise-trained and sedentary rats. *J. Nutr.*, (1997), **127**, 158-166.
- 10) Duncan, K., Harris, S., & Ardies, C. M., Running exercise may reduce risk for lung and liver cancer by inducing activity of antioxidant and phase II enzymes. *Cancer Lett.* (1997), **116**, 151-158.
- 11) Lu, Q., Ceddia, M. A., Price, E. A., Ye, S.-M., & Woods, J. A., Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytotoxicity in young and old mice. *Am. J. Physiol.*, (1999), **276**, (Regulatory Integrative Comp. Physiol., 45), R482-R489.
- 12) Yano, H., Matsuzaki, H., & Kira, S., Voluntary exercise induces an increase in Kupffer cell function in the rat. *Med. Sci. Sports Exerc.*, (2001), **33**, S371.
- 13) Mochida, S., Ogata, I., Ohta, Y., Yamada, S., & Fujiwara, K., In situ evaluation of the stimulatory state of hepatic macrophages based on their ability to produce superoxide anions in rats. *J. Pathol.*, (1989), **158**, 67-71.
- 14) Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R., Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, (1982), **126**, 131-138.
- 15) Devaux, Y., Grosjean, S., Seguin, C., David, C., Dousset, B., Zannad, F., Meistelman, C., De Talence, N., Mertes, P., & Ungureanu-Longrois, D., Retinoic acid and host-pathogen interactions: effects on inducible nitric oxide synthase *in vivo*. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, (2000), **279**, E1045-E1053.
- 16) Li, C., Ha, T., Liu, L., Browder, W., & Kao, R. L., Adenosine prevents activation of transcription factor NF- κ B and enhances activator protein-1 binding activity in ischemic rat heart. *Surgery*, (2000), **127**, 161-169.
- 17) Earnest, D. L., Abril, E. R., Jolley, C. S., & Martinez, F., Ethanol and diet-induced alterations in Kupffer cell function. *Alcohol Alcohol*, (1993), **28**, 73-83.
- 18) Messmer, U. K., & Brune, B., Modification of macrophage glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase in response to nitric oxide. *Eur. J. Pharmacol.*, (1996), **302**, 171-182.
- 19) Hoffmann, A., Gloe, A., & Pohl, U., Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism. *J. Cell. Physiol.*, (2001), **188**, 33-44.
- 20) Mahiout, A., Matata, B. M., & Brunkhorst, R., Effect of glucose and pyruvate in acidic and non-acidic peritoneal dialysis fluids on leukocytes cell functions. *Kidney Int.*, (1997), **51**, 860-867.