

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07949

研究課題名(和文) 死細胞により誘発される炎症応答が老化に伴って悪化する仕組みの解明

研究課題名(英文) The analysis of mechanism in the serious inflammatory responses induced by dead cells as aging.

研究代表者

永田 喜三郎 (NAGATA, Kisaburo)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10291155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、死細胞による炎症応答がなぜ老化に伴って増強するのか、また老化マクロファージの貪食能が低下するのはなぜか調べた。死細胞とマクロファージを共培養したとき、炎症の指標であるMIP-2の産生が見られた。これは、マクロファージがIFN- γ などにより活性化したときにみられる現象である。また老化マウスは、炎症性マクロファージの指標であるCD40を発現しており、炎症性マクロファージは貪食能が低いことも分かった。これらの結果から、老化に伴ってマクロファージの貪食能が低下する原因として、マクロファージが老化に伴って恒常的に炎症性マクロファージに分化し、貪食能が損なわれていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated why inflammatory responses was increased in aged mice upon injection of dead cells and why the phagocytic capacity of peritoneal resident macrophages from aged mice was reduced. When cocultured with dead cells, the peritoneal resident macrophages from aged mice significantly produced MIP-2, whereas MIP-2 production by macrophages from WT young mice required IFN- γ . The peritoneal resident macrophages from aged mice expressed CD40, a M1 macrophage marker, as in the case of M1 macrophages. Furthermore, M1 macrophages exhibited less phagocytic capacity as to dead cells than non-treated macrophages. These results suggest that the phenotype of peritoneal resident macrophages is skewed toward M1-like in aged mice and that such skewing toward M1-like is involved in enhancement of inflammatory responses induced by dead cells in aged mice.

研究分野：免疫

キーワード：老化 アポトーシス 炎症 マクロファージ 死細胞

1. 研究開始当初の背景

生体内で生じたアポトーシス細胞は、マクロファージや樹状細胞などの貪食細胞により貪食除去されることによって蓄積されないように制御されている。この貪食除去は、アポトーシス細胞が生体内に出現すると直ちに行われており、アポトーシス細胞はネクローシスに陥ることなく、速やかに除去されている。一見、何の変哲もないこの営みは、発生や免疫システムなど生体の恒常性の維持に欠かせない重要なチェックポイントの一つである。特に生体に悪影響を及ぼすことなく、アポトーシス細胞を何事もなく処理する「silent clearance」と呼ばれる機構は、盛んに研究されており、我々を含めて多くの報告がなされている。一方、この機構に破綻が生じる、または一過的に多量のアポトーシス細胞が生体内で生じると、アポトーシス細胞が残存し、二次的にネクローシスに陥る。生体内でネクローシス細胞が産み出されると、好中球走化性因子であるMIP-2およびKCの産生および好中球の浸潤を伴う炎症応答が惹起され、浸潤する好中球の量に依存してネクローシス細胞が元凶となる疾病の治療および予後を左右する。

一方、細菌感染やLPSなどのエンドトキシンの投与によって炎症応答を誘発したとき、TNF- α 、IFN- γ 、およびNOなどの炎症性液性因子が産生され、その産生量は、若年マウスよりも老化マウスのほうが多く、また逆に、VEGFなどの炎症の終息に関わる因子の産生量は、老化マウスのほうが少ないということも報告されている。これらの報告から、老化(加齢)が炎症応答の増強およびその終息過程に対して何らかの影響を与えているという可能性が考えられる。しかしながら、老化がどのようなメカニズムによって炎症応答に影響を及ぼしているのかという知見はほとんどない。

2. 研究の目的

高齢者になると、さまざまな要因によって惹起される炎症応答が、重篤になったり治癒しづらく慢性化したりすることは少なくない。最近、このような炎症応答への老化の影響が、加齢に伴って引き起こされる自己免疫疾患や多臓器機能不全の一つの原因であると考えられ、老化が及ぼす自然免疫応答への影響が着目されてきている。本研究では、背景で記した知見から老化マウスにおけるマクロファージの機能低下の原因について、老化に伴うマクロファージの機能低下によって残存したアポトーシス細胞が原因となり、二次的に生じた多量のネクローシス細胞が炎症応答の重篤化および慢性化に密接に関わると考え、個体老化と細胞老化から見たマクロファージの機能への影響およびアポトーシス細胞の認識機構から見たマクロファージ貪食能低下の仕組みの解明に焦点を当て、死細胞が誘発する炎症反応が老化に伴って悪化する仕組みを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

老化マウスにおけるマクロファージの貪食能の低下が、アポトーシス細胞の残存、引いてはネクローシス細胞による炎症の発症、さらに重篤化および慢性化にも関わることを示してきた。本研究では、この知見を二つのステージに分けて考えることによって、炎症応答の推移に対する老化の影響およびそのメカニズムの解明を目指し、実験を組み立てている。まず炎症応答の発症の原因となる『アポトーシス細胞が残存する仕組み』からのアプローチでは、常在性マクロファージの貪食能・貪食率およびMFG-E8などのアポトーシス細胞認識分子の解析について計画しており、老化における炎症の発症しやすさのメカニズムに迫った。もう一つの『ネクローシス細胞が引き起こす炎症応答の仕組み』からのアプローチでは、炎症応答の重篤化と慢性化の二つの観点から取り組み、前者についてはHMGB-1およびS100などのDAMPsおよびその受容体の解析について、後者については炎症応答の終息期における好酸球の役割について計画しており、老化において炎症応答が重篤化および慢性化してしまうメカニズムに迫った。

4. 研究成果

老化に伴うアポトーシス細胞に対するマクロファージ貪食能の低下がマクロファージ自体の細胞老化に忌諱するのが、または老化に伴う個体環境の変化(個体老化)に起因するのか調べるため、老化マクロファージの若年マウスへの移植実験を行った。本実験では、レシピエントとして腹腔マクロファージを枯渇処理した若年マウスを、ドナーとして骨髓細胞から誘導した長期培養マクロファージを用いた。マクロファージの枯渇は、リボソーム化したクロドロネート(細胞毒)を用い、これをマクロファージが選択的に取り込むことによってアポトーシスに陥らせることを行なった。まず用いた長期培養マクロファージが老化マクロファージとして用いて問題ないかを確認するため、老化マーカーであるbeta-SA-galactosidaseの発現とがん抑制遺伝子であるp53の活性化を検証した。その結果、培養三ヶ月で両マーカーとも検出され、三ヶ月培養マクロファージが老化マクロファージに匹敵することを確認できた。得られたマクロファージを後期アポトーシス細胞とともにレシピエントマウスに移植し、経時的に炎症応答を調べたところ、コントロールとして行った若年マクロファージを移植したときと比べて、有意に炎症応答の増強および炎症応答の終息遅延がみられた。これらの結果から、老化に伴うマクロファージの貪食能の低下は、マクロファージ自体が細胞老化することに原因があると推察された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件、ともに査読あり)

1. Takahashi, R., Ishigami, A., Kobayashi Y., and Nagata, K.: Skewing of peritoneal resident macrophages toward M1-like is involved in enhancement of inflammatory responses induced by secondary necrotic neutrophils in aged mice. *Cellular Immunol.* 304-305: 44-48, 2016.
2. Sekiguchi, S., Tomisawa, Y., Ohki, T., Tsuboi, K., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Suppression of macrophage-mediated phagocytosis of apoptotic cells by soluble β -glucan due to a failure of PKC- β II translocation. *Int. Immunopharm.* 31: 195-199, 2016.
3. Takahashi, R., Totsuka, S., Ishigami, A., Kobayashi Y., and Nagata, K.: Attenuated phagocytosis of secondary necrotic neutrophils by macrophages in aged and SMP30 knockout mice. *Geriatr. Gerontol. Int.* 16: 135-142, 2016.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 懸川奈央、佐藤麻実、石神昭人、小林芳郎、永田喜三郎: ネクロシス細胞により誘発される炎症応答の終息と好酸球の関わり 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会集会) 2017.12.6-9
2. 大滝桃子、小鹿成二、西村まゆみ、柿沼志津子、島田義也、小林芳郎、永田喜三郎: 腹腔常在性マクロファージの貪食応答に対する環境エンリッチメントの効果 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会集会) 2017.12.6-9
3. 富永航平、西川雷羅、山口陽子、永田喜三郎、大木理恵子: がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能喪失性変異と機能解析 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会集会) 2017.12.6-9
4. 河島早紀、滝野有花、近藤嘉高、永田喜三郎、斉藤紀克、大澤肇、栗田克己、佐藤安訓、吉田雅幸、石神昭人: ヒト培養表皮を用いたアスコルビン酸の紫外線による細胞傷害抑制効果および関連遺伝子発現への影響 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会集会) 2017.12.6-9
5. 宮崎優輝、藤田泰典、川上恭司郎、永田喜三郎、伊藤雅史: マクロファージ RAW264.7 細胞から放出されるエクソソームの定量プロテオーム解析 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会集会) 2017.12.6-9
6. 山口陽子、西川雷羅、陳ヨ、斉藤梢、広川貴次、八田知久、夏目徹、永田喜三郎、大木理恵子: Akt 抑制因子 PHLDA3 の新規結合分子 PH3IP は Akt 活性を制御する 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会集会) 2017.12.6-9
7. 富永航平、西川雷羅、山口陽子、永田

- 喜三郎、大木理恵子: Identification and functional analysis of loss-of-functional mutations of the tumor suppressor gene PHLDA3 in various cancer types. 第 39 回日本分子生物学会集会 2016.11.30-12.2
8. 河島早紀、永田喜三郎、佐藤安訓、吉田雅幸、石神昭人: ヒト培養表皮を用いた紫外線照射によるビタミン C の細胞傷害抑制効果 第 39 回日本分子生物学会集会 2016.11.30-12.2
9. 市原理恵、小林芳郎、永田喜三郎: The role of S100 A8 and A9 proteins in inflammatory responses induced by necrotic cells. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015.11.12-20 札幌
10. 平野哲也、永田喜三郎、小林芳郎: The mechanism for β -glucan-mediated inhibition of phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015.11.12-20 札幌
11. 近藤嘉高、永田喜三郎、小林芳郎: Neutrophil infiltration is essential for gastric mucosal injury in mice with water-immersion stress. 第 44 回日本免疫学会学術集会 2015.11.12-20 札幌

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
http://www.biomol.sci.toho-u.ac.jp/lab/nagata_lab/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 喜三郎 (NAGATA, Kisaburo)
東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10291155

(2)研究分担者

小林 芳郎 (KOBAYSHI, Yoshiro)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10134610

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし