

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 9日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590077

研究課題名（和文）好中球のアポトーシスとマクロファージによる貪食応答を介した炎症の終息機構

研究課題名（英文）Resolution of inflammation through macrophage response to apoptotic neutrophils

研究代表者

小林 芳郎 (KOBAYASHI YOSHIRO)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10134610

研究成果の概要（和文）：野生型マウスに固定黄色ブドウ状球菌を投与すると NO レベルが 24 時間でピークとなり、iNOS KO マウス（KO マウス）ではほとんど検出されなかった。24 時間後の好中球数と後期アポトーシス好中球は野生型に比べ KO マウスで増大し、TNF- α が KO マウスで 36 時間後に検出された。NO ドナーを投与した KO マウスでは 24 時間後の好中球数も後期アポトーシス好中球も 36 時間後の TNF- α 産生も抑制された。後期アポトーシス好中球とマクロファージを共培養すると TNF- α が産生され、NO ドナーによって好中球の培養内皮細胞通過が抑制された。以上より NO が炎症後期の好中球浸潤を抑制することで炎症の終息をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：During inflammation, neutrophils infiltrate into the involved site and undergo apoptosis. Early apoptotic neutrophils are then cleared by phagocytes, leading to resolution of the inflammation, whereas if late apoptotic neutrophils are accumulated for some reason, they provoke pro-inflammatory responses such as TNF- α production. In order to determine how endogenously produced nitric oxide (NO) regulates neutrophil apoptosis and the resolution of inflammation, we compared peritoneal inflammation induced by *Staphylococcus aureus* bioparticles in wild type mice with that in inducible NO synthase (iNOS)-deficient ones. In this model, NO production was largely dependent on iNOS, the NO level peaking at 24 h. There were increases in the numbers of neutrophils and late apoptotic ones at 24 h in iNOS-deficient mice as compared with in wild type ones, and consequently TNF- α production at 36 h in iNOS-deficient mice. On the other hand, the administration of a NO donor to iNOS-deficient mice at 12 h decreased the numbers of neutrophils and late apoptotic ones at 24 h, and thereafter TNF- α production at 36 h. In addition, coculturing of macrophages with late apoptotic neutrophils caused TNF- α production and a NO donor inhibited the transmigration of neutrophils in a dose-dependent manner. Collectively, these results suggest a novel mechanism that endogenously produced NO suppresses neutrophil accumulation at a late stage of inflammation, thereby preventing the appearance of late apoptotic neutrophils and subsequent pro-inflammatory responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成22年度	1,000,000	300,000	1,300,000
平成23年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学
キーワード：免疫学

1. 研究開始当初の背景

炎症は好中球の浸潤を特徴とする。浸潤した好中球はアポトーシスを起こし、マクロファージによって速やかに貪食除去され、やがて組織は修復に向かう。もし浸潤好中球がアポトーシスに至らず生存し続けると、好中球が産生する活性酸素などによって組織傷害がもたらされる。逆に、炎症に伴って浸潤した好中球にアポトーシスを誘導すると、炎症の終息が促進される (Sawatzky et al. *Am J Pathol* 168, 33, 2006)。また、何らかの理由でアポトーシス好中球が2次的ネクロシスに陥ると、マクロファージの炎症性応答が惹起される (Fadok et al. *J Immunol* 166, 6847, 2001)。従って、炎症が終息するためには、好中球がアポトーシスを起こすだけでなく、アポトーシス好中球を貪食したマクロファージが炎症性応答を起こさないことも必要である。

さて、アポトーシス好中球とマクロファージを共培養すると抑制性サイトカインのひとつ TGF- β が産生される (Fadok et al. *J Clin Invest* 101, 890, 1998)。さらに、胸腔に LPS を投与して炎症を惹起する際にアポトーシス細胞を共存させると、TGF- β を介して炎症が抑制される (Huynh et al. *J Clin Invest* 109, 41, 2002)。ただし抗 TGF- β 抗体はアポトーシス細胞の効果分しか抑制できない。また脇腹の皮膚に放射線を局所照射した後の好中球浸潤は、TGF- β シグナル伝達において重要な Smad3 が欠損すると亢進する (Flanders et al. *Am J Pathol* 173, 68, 2008)。ただしこのとき MIP-2 や KC のレベルは変わらない。以上より、炎症の終息過程において TGF- β が重要な役割を演じている可能性が高いと考えられる。

一方、我々は、マクロファージと初期アポトーシス細胞を共培養すると iNOS を介して NO が産生され、それによって好中球に対するおもなケモカインのひとつ、MIP-2、の産生が抑制されることを見出した (柴田ら *J Leukoc Biol* 80, 744, 2006; 業績 9)。さらに、放射線全身照射モデルと iNOS 遺伝子欠損マウスを用いて、生体内でも NO が炎症を抑制していることを示した (柴田ら *J Immunol* 179, 3407, 2007; 業績 8)。このモデルでは、放射線全身照射によって胸腺細胞のアポトーシスが起ると、それに伴って好中球浸潤が見られる (内村ら *J Leukoc Biol* 67, 780, 2000; 伊豫田ら *J Immunol* 175, 3475, 2005; 業績 15; 藤原ら *BBRC* 369, 432, 2008 ;

業績 2)。以上のことから、iNOS 由来の NO も、炎症の終息過程において働いている可能性が高いと考えられる。

ところで iNOS 由来の NO は、従来、炎症時の組織傷害などに関わっていると考えられてきた。実際、iNOS 遺伝子欠損マウスでは炎症時の組織傷害が低下する。さらに、このマウスでは炎症惹起後、ピークになる時点での好中球浸潤が低下する (Ajuebor et al. *Immunology* 95, 625, 1998; Cuzzocrea et al. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1859, 2000)。しかしこれらの研究では炎症の終息過程は調べられていない。

一方、iNOS 由来の NO は eNOS や nNOS 由来の NO に比べ一般に高濃度なので好中球のアポトーシスを誘導するのに対し、eNOS や nNOS 由来の NO は低濃度なのでアポトーシスを抑制するといわれている (Taylor et al. *Cell Death Differ* 10, 418, 2003)。ただし多少の異論はある。

2. 研究の目的

本研究では、炎症の終息過程における NO の役割を *in vitro* と *in vivo* で検討する。すなわち、アポトーシス好中球とマクロファージを共培養したときのケモカイン産生が NO によって抑制されるかを NOS 阻害剤や iNOS 遺伝子欠損マウスを用いて明らかにする。一方、野生型マウス、iNOS 遺伝子欠損マウス、適切な時期に NO ドナーを投与した iNOS 遺伝子欠損マウス、適切な時期に NOS 阻害剤 (L-NAME) を投与した野生型マウスでの炎症の終息過程を、好中球のアポトーシス、マクロファージの貪食とその後の応答、に焦点をあてて比較検討する。

3. 研究の方法

本研究では、炎症の終息過程における NO の役割を *in vitro* と *in vivo* の両方から解析する。

我々はこれまでアポトーシス CTLL-2 細胞 (IL-2 依存性マウス T 細胞株) やアポトーシス胸腺細胞を用いて NO による MIP-2 産生の抑制現象を明らかにしてきた (柴田ら *J Leukoc Biol* 80, 744, 2006; 柴田ら *J Immunol* 179, 3407, 2007)。またアポトーシス好中球の取込みに伴って IL-8 が産生されることも報告した (黒坂ら *J Leukoc Biol* 71, 950, 2002)。そこでここではアポトーシスマウス好中球の取込みに伴うマクロファージの応答の特徴を明らかにするため、腹腔常在

性マクロファージとアポトーシス好中球との共培養時に MIP-2 が産生されるか、それは NO によって抑制されるかを、IFN- γ または IFN- γ と LPS を共存させて調べる。IFN- γ または IFN- γ と LPS はマウスマクロファージにおいて iNOS を強く誘導することが知られているし、予備的検討により、これらを共存させない条件下では NO も MIP-2 も産生されないことがわかっているからである。

別の予備的検討の結果、ホルマリン固定黄色ブドウ球菌を野生型マウス腹腔に投与すると、好中球の浸潤と好中球のアポトーシスを伴う応答が観察できることが明らかにされている。そこで野生型マウスと iNOS 遺伝子欠損マウスの腹腔にホルマリン固定黄色ブドウ球菌を投与して、好中球、単球の浸潤、各種サイトカインのレベル、好中球のアポトーシス、食食腹腔浸出細胞中の iNOS mRNA を経時的に調べ、マクロファージがアポトーシス好中球を食食している時期を推定する。推定された適切な時期にマクロファージを採取して、培養し、MIP-2、KC、NO レベルを測定する。これにより、この炎症モデルにおいてマクロファージがアポトーシス好中球を食食したあと MIP-2 や KC を産生するか、またそれが NO によって抑制されているかを調べる。比較として野生型マウス由来の腹腔浸出マクロファージを培養する際、NOS 阻害剤 (L-NAME) を添加し、MIP-2 や KC 産生に対する効果を調べる。

あらかじめ蛍光色素で標識したホルマリン固定黄色ブドウ球菌を同様に腹腔に投与して、経時的に腹腔浸出細胞を回収し、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターで調べることにより、ホルマリン固定黄色ブドウ球菌を取り込んだ細胞を同定する。また取り込んだ細胞と取り込んでいない細胞とでアポトーシスにどのような相違があるか検討する。

以上の結果をふまえて、ホルマリン固定黄色ブドウ球菌を投与後適切な時期に NO ドナーを投与した iNOS 遺伝子欠損マウス、適切な時期に NOS 阻害剤 (L-NAME) を投与した野生型マウスで、炎症に伴う細胞浸潤、特に好中球数と好中球のアポトーシスについて、フローサイトメーターによって解析する。また比較のため、in vitro で NO ドナーを加えたあと好中球のアポトーシスがどのように変化するか経時的に調べる。これにより、NO ドナーが in vivo でも in vitro でも好中球のアポトーシスを促進して炎症の終息を促進するか明らかにする。

以上の結果、野生型と iNOS 遺伝子欠損マウスとで浸潤好中球数に違いが見られたら、それがアポトーシス好中球を取り込んだマクロファージによる MIP-2 や KC 産生によるかどうか検討するため、適切な時期に抗

MIP-2 抗体や抗 KC 抗体を投与する。比較のためホルマリン固定黄色ブドウ球菌を投与時にこれらの抗体を投与し、ピーク時の好中球浸潤に対する効果を調べる。

4. 研究成果

(1) アポトーシス好中球とマクロファージの共培養に伴う MIP-2 産生と NO 産生、それら相互の関係：チオグリコレート培地を腹腔に投与して4日後に回収した炎症性マクロファージとチオグリコレート培地を腹腔に投与して6時間後に浸潤した好中球を血清含有培地でアポトーシスを誘導した好中球との共培養を行った。IFN- γ を共存させた時に NO と MIP-2 が産生され、NOS 阻害剤 (L-NAME) で MIP-2 産生が促進された。これと一致して iNOS 遺伝子欠損マウス (以下 KO マウス) 由来マクロファージでも MIP-2 産生が促進された。

(2) ホルマリン固定黄色ブドウ球菌腹腔投与に伴う炎症反応の解析：野生型マウス、必要に応じて KO マウスの、腹腔にホルマリン固定黄色ブドウ球菌を投与して、好中球、単球/マクロファージの浸潤、各種サイトカインのレベル、好中球のアポトーシス、アポトーシス好中球のマクロファージによる食食を経時的に調べた。MIP-2、KC はおもにごく初期に産生され、IFN- γ はそれよりもやや遅れて産生された。TNF- α もごく初期に産生されたが、KO マウスでは後期 (36 時間目) にも産生された。一方、好中球は 9 時間目をピークとして浸潤したのに対し、単球/マクロファージは 12 時間目から浸潤した。KO マウスでは好中球が 12 時間から 36 時間目にかけて野生型よりも多く検出された。好中球のアポトーシスは野生型ではごくわずかし検出されなかったが KO マウスでは 9 時間目と 18、24 時間目に後期アポトーシス好中球が検出された。24 時間目に回収した腹腔浸出細胞を抗ミエロペルオキシダーゼ抗体で染色したところ、単球/マクロファージによるアポトーシス好中球の食食が観察された。腹腔浸出単球/マクロファージ中の iNOS mRNA は 12 時間から 24 時間にかけて増大した。

(3) ホルマリン固定黄色ブドウ球菌を取り込んだ細胞の同定：あらかじめ蛍光色素で標識したホルマリン固定黄色ブドウ球菌を腹腔に投与して、経時的に腹腔浸出液を回収し、蛍光顕微鏡とフローサイトメーターで調べたところ取り込んだ細胞はおもに好中球だった。

(4) ホルマリン固定黄色ブドウ球菌腹腔投与に伴う炎症反応でのマクロファージの応答 (ex vivo)：このモデルで実際にマクロファージが MIP-2 や KC を産生しているか、またそれは NO によって制御されているかを調べるため、野生型と iNOS 遺伝子欠損マウス

スにホルマリン固定黄色ブドウ状球菌を投与し、経時的に腹腔浸出細胞あるいはマクロファージを採取し、培養して、MIP-2、KC、NO レベルを測定した。結果、マクロファージはNOを産生していたが、それはMIP-2やKC産生を抑制していなかった。

(5) アポトーシス好中球を取り込んだマクロファージによるMIP-2やKC産生の生体での意義：野生型とiNOS遺伝子欠損マウスとで浸潤好中球数に違いが見られたので、それがアポトーシス好中球を取り込んだマクロファージによるMIP-2やKC産生によるのか検討するため、適切な時期に抗MIP-2抗体や抗KC抗体を投与した。比較のためホルマリン固定黄色ブドウ状球菌を投与時にこれらの抗体を投与し、ピーク時の好中球浸潤に対する効果を調べた。菌の投与時に抗体を投与すると好中球浸潤は阻害されたが、違いが見られた時間の少し前だと無効だった。つまり、浸潤好中球数の違いはその時期に産生されるケモカインに起因するのではないと考えられた。

(6) NOドナーによる好中球アポトーシスの誘導 (in vitro と in vivo) :ホルマリン固定黄色ブドウ状球菌を投与後12時間後にNOドナーを投与したiNOS遺伝子欠損マウスで、炎症に伴う細胞浸潤、特に好中球数と好中球のアポトーシスについて、フローサイトメーターによって解析した。結果、24時間後の好中球数も後期アポトーシス好中球も著しく抑制されて野生型マウスと同じレベルとなった。また比較のため、in vitro でNOドナーを加えたあと好中球のアポトーシスがどのように変化するか経時的に調べた。結果、好中球にホルマリン固定黄色ブドウ状球菌を加えるとすみやかに後期アポトーシスが誘導され、このときNOドナーを加えるとこの誘導が著しく抑制された。このことは一方菌を加えないでただ培養したときには、NOドナーは好中球のアポトーシスに大きな影響を与えなかった。

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5件)

- ①柴田岳彦、永田喜三郎、小林芳郎: Apoptotic neutrophils and nitric oxide regulate cytokine production by IFN- γ -stimulated macrophages. Cytokine 査読あり 53, 191-195, 2011
- ②中山恵美、白土佳子、小林芳郎、永田喜三郎: The importance of infiltrating neutrophils in SDF-1 production leading to regeneration of the thymus after

whole-body X-irradiation. Cellular Immunology 査読あり 268, 24-28, 2011

③柴田岳彦、永田喜三郎、小林芳郎: The mechanism underlying the appearance of late apoptotic neutrophils and subsequent TNF- α production at a late stage during Staphylococcus aureus bioparticle-induced peritoneal inflammation in inducible NO synthase-deficient mice. Biochimica et Biophysica Acta 査読あり 1802, 1105-1111, 2010

④佐々木宗一郎、永田喜三郎、小林芳郎: Regulation of the estrous cycle by neutrophil infiltration into the vagina. Biochem Biophys Res Commun 査読あり 382, 35-40, 2009

⑤中田・津久井久美子、小林芳郎、渡辺直子: Characterization of a cDNA encoding guinea pig I3 associated with the delayed-type hypersensitivity reaction. Zoolog Sci 査読あり 26, 617-622, 2009

[学会発表] (計2件)

①岩佐卓哉、永田喜三郎、小林芳郎: The role of annexins I and IV in macrophage response to apoptotic cells. 第14回国際免疫学会 2010.8.25 神戸

②柴田岳彦、永田喜三郎、小林芳郎: 炎症の終息における一酸化窒素の役割 第39回日本免疫学会 2009.12.4 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 芳郎 (KOBAYASHI YOSHIRO)
東邦大学・理学部・教授
研究者番号: 10134610

(2) 研究分担者

永田 喜三郎 (NAGATA KISABURO)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号: 10291155

(3) 連携研究者

該当なし