

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7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：21590078

研究課題名（和文） ネクロシス細胞が誘発する炎症応答の発症および終息における DAMPs の役割

研究課題名（英文） The role of DAMPs on induction and termination of inflammatory responses induced by necrotic cells.

研究代表者

永田 喜三郎 (NAGATA KISABURO)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：10291155

研究成果の概要（和文）：

本課題では、最初にネクロシス細胞により誘発された炎症下における S100A9 の機能を探る一環として、好中球、中皮細胞、単球の S100A9 産生能の検討を行った。中皮細胞は炎症下における浸潤細胞と相互作用することで炎症応答に関与しており、腹腔内投与されたネクロシス細胞とも直接接触するので、中皮細胞が S100A9 を産生するか検討するために、*in vitro* で中皮細胞と様々な細胞との共培養を行った。その結果、中皮細胞は直接的に S100A9 産生に関与しないということが分かった。次に、腹腔浸潤細胞中の好中球または単球が S100A9 を産生している可能性が考えられたので、これらの細胞の S100A9 産生能を調べた結果、単球ではなく、好中球が炎症後期における S100A9 産生に関与していることが明らかとなった。しかしながら、炎症初期に浸潤してくる好中球がどのように炎症後期に S100A9 を多量に分泌しているのかは不明のままである。浸潤してきた好中球は役目を終えるとアポトーシスに陥り、マクロファージに貪食除去される。このアポトーシスが S100A9 の分泌に関与している可能性があるが、今後検討していく必要がある。

研究成果の概要（英文）：

In order to examine the mechanism, we used an inflammation model induced by injection of several types of necrotic cells into the peritoneal cavity in this study. The injection of necrotic P388 cells (leukemia cells) and necrotic peritoneal neutrophils (necrotic activated neutrophils), which were obtained from the peritoneal cavity upon injection of thioglycollate broth, induced the infiltration of neutrophils and subsequently that of monocytes/macrophages, whereas the injection of necrotic thymocytes and necrotic bone marrow neutrophils (necrotic resting neutrophils) did not. These results suggested that the induction of inflammatory response induced by necrotic cells depend on the cell type undergoing necrosis. In agreement with induction of cell infiltration, the injection also induced the production of KC and MIP-2, and subsequently that of MCP-1 only when necrotic P388 cells or necrotic activated neutrophils were injected. Although the level of KC was higher than that of MIP-2, both anti-KC Ab and anti-MIP-2 Ab significantly inhibited the infiltration of neutrophils. These results indicate that KC and MIP-2 play important roles in the infiltration of neutrophils into the site of injection of necrotic cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011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

最近、細胞内に存在する **DAMPs** と呼ばれる分子群がネクローシスすることにより細胞外に放出されると、これらの分子が自然免疫応答に何らかの影響を及ぼすことが着目されてきている。本研究では、上記の知見を基に、ネクローシス細胞が誘発する炎症応答の元凶が、好中球の浸潤であること、そしてネクローシス細胞から放出される **DAMPs** が炎症応答の動態に密接に関わると考え、{1}ネクローシス細胞が生じた部位に好中球が浸潤してくる仕組み（炎症応答の発症）および {2} 浸潤してきた好中球が連鎖的に引き起こしてしまう炎症応答の仕組み（炎症応答の悪化（予後遅延））の解明に焦点を当て、ネクローシス細胞が誘発する炎症反応の発症機構を明らかにすることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、{1}ネクローシス細胞がどのようにして好中球の浸潤を促し、炎症応答を惹起するのか、{2}浸潤した好中球が、炎症応答の経過（増強もしくは終息）にどのように影響を及ぼすのかの2点について重点をおき、ネクローシス細胞が誘発する炎症応答の分子機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

『好中球浸潤の引き金となる **DAMPs** の解析』好中球の浸潤に対する **HMGB-1** の影響と好中球の浸潤を誘導する **DAMPs** の検索

『浸潤した好中球から放出される二次的 **DAMPs** の解析』ネクローシス好中球から放出される **DAMPs** の解析

『**DAMPs** により浸潤してくる好中球の解析』**DAMPs** により浸潤する好中球の亜集団の解析

『浸潤した好中球から放出される二次的 **DAMPs** の解析』ネクローシス好中球による細胞外 **DAMPs** の誘導と静止好中球と浸潤（活性化）好中球との **DAMPs** 発現の差異

『浸潤好中球による炎症応答発症・終息との関わり』マクロファージ機構亢進マウスの解析と TRECK 法による好中球の重要性の証明

4. 研究成果

中皮細胞が **S100A9** を産生するか検討するために、*in vitro* で中皮細胞と様々な細胞との共培養を行った。まず、ネクローシス好

中球との共培養を行ったが、中皮細胞からの **S100A9** 産生は認められなかった。また、腹腔常在性マクロファージとの三種共培養も行ったが、この場合も中皮細胞から **S100A9** は産生されなかった。次に、ネクローシス好中球により誘導される腹腔浸潤細胞と中皮細胞を共培養したが、この場合においても中皮細胞は **S100A9** を産生しなかった。これらの結果は、中皮細胞は **S100A9** 産生に関与しないということを示唆している。

一方、**anti MCP-1 Ab** を投与すると、単球浸潤が有意に阻害されたが、腹腔内滲出液中の **S100A9** 量に有意な変化はなかった。このことから、単球は **S100A9** 産生には関与していないと考えられる。また、**anti Gr-1 Ab** を投与すると、好中球の浸潤が著しく阻害され、そのときの腹腔内滲出液中の **S100A9** 量は細胞浸潤の抑制と相関するように、著しく抑制されていた。これらの結果は、単球ではなく、好中球が炎症後期における **S100A9** 産生に関与していることを示唆している。これらの結果から、ネクローシス細胞が誘発する炎症応答における炎症後期の **S100A9** 産生は好中球由来であることを示唆している。

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7件）

1. Iwasa, T., Takahashi, R., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Suppression of MIP-2 production by annexin A1 and A4 during coculturing of macrophages with late apoptotic human peripheral blood neutrophils. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1822: 204-211, 2012. 査読有
2. Yi, S., Kakinuma, S., Nishimura, M., Kobayashi, Y., Nagata, K., and Shimada, Y.: Interleukin-9 Receptor Gene is Transcriptionally Regulated by Nucleolin in T-Cell Lymphoma Cells. *Molecular Carcinogenesis*. doi: 10.1002/mc.20834, 2011. 査読有
3. Sasaki, S., Tamaki, Y., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Regulation of the estrous cycle by neutrophils via opioid peptides. *J. Immunol.* 187: 774-780 2011. 査読有
4. Nakayama, E., Shiratsuchi, Y.,

- Kobayashi, Y., and **Nagata, K.**: The importance of infiltrating neutrophils in SDF-1 production leading to regeneration of the thymus after whole-body X-irradiation. *Cellular Immunol.* 268: 24-28, 2011. 査読有
5. Shibata, T., **Nagata, K.**, and **Kobayashi, Y.**: Apoptotic neutrophils and nitric oxide regulate cytokine production by IFN-g-stimulated macrophages. *Cytokine* 53: 191-195 2011. 査読有
 6. Shibata, T., **Nagata, K.**, and **Kobayashi, Y.**: 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.* 1802: 1105-1111, 2010. 査読有
 7. Sasaki, S., **Nagata, K.**, and **Kobayashi, Y.**: Regulation of the estrous cycle by neutrophil infiltration into the vagina. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382: 35-40, 2009. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. 高橋滯、小林芳郎、**永田喜三郎**: Effect of aging on inflammatory responses to apoptotic cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29 千葉
2. 玉置豊、小林芳郎、**永田喜三郎**: Identification of S100A9 protein producing cell in inflammatory responses induced by necrotic neutrophils. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29 千葉
3. 山口正昭、小林芳郎、**永田喜三郎**: Effect of aging on inflammatory responses to necrotic cells. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29 千葉
4. 富沢由、**永田喜三郎**、小林芳郎: Regulation of phagocytic responses of macrophages by soluble and particulate β -glucan. 第 40 回日本免疫学会学術集会 2011.11.27-29 千葉
5. 高橋滯、石神昭人、小林芳郎、**永田喜三郎**: 老化促進モデルマウス (SMP30/GNL^{-/-}) におけるアポトーシス細胞の貪食除去応答 第 12 回 Pharmaco-Hematology Symposium 2011. 6.17-18 富山
6. **Nagata, K.**, Takahashi, R., Yamaguchi, M., Totsuka S., Ishigami, A., and **Kobayashi Y.**: Effect of aging on

inflammatory responses to dead cells. 14th International Congress of immunology. 2010. 8. 22-27, Kobe, Japan.

7. Iwasa, T., **Nagata, K.**, and **Kobayashi Y.**: The role of Annexins I and IV in macrophage response to apoptotic cells. 14th International Congress of immunology. 2010. 8. 22-27, Kobe, Japan.
8. 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 回日本免疫学会学術集会 2009.12.2-4 大阪
9. 山田真里亜、**永田喜三郎**、小林芳郎: 接触過敏症における好中球浸潤に対する IL-10 の役割 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009.12.2-4 大阪
10. 岩佐卓哉、**永田喜三郎**、小林芳郎: アポトーシス細胞の貪食における Annexin I, IV の役割 第 39 回日本免疫学会学術集会 2009.12.2-4 大阪
11. **Nagata, K.**, Miho, N., and **Kobayashi Y.**: Necrotic cell type-dependent induction of inflammatory response. The 6th Joint Seminar on Biomedical Sciences. 2009. 10. 12-14, Tokyo, Japan.
12. **Kobayashi Y.**, Shibata T., and **Nagata, K.**: A critical role of nitric oxide in the resolution of inflammation. Tri-Society Annual Conference 2009 of the Society for Leukocyte Biology, International Cytokine Society, & International Society for Interferon and Cytokine Research. 2009. 10.18-21, Lisbon, Portugal.
13. Sohichiro S., **Nagata, K.**, and **Kobayashi Y.**: Regulation of the estrous cycle by opioid peptides from neutrophils infiltrated into female genital organ. The 9th world congress on inflammation. 2009. 6. 6-10, Tokyo, Japan.

[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・准教授

研究者番号: 10291155

(2) 研究分担者

小林芳郎 (KOBAYASHU YOSHIRO)

東邦大学・理学部・教授

研究者番号：10134610

(3) 連携研究者

該当なし