

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590100

研究課題名(和文)死細胞により誘導される炎症応答に対して老化が及ぼす影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)The effect of aging on dead cells induced inflammatory responses and analysis of its mechanisms

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アポトーシス細胞に対するマクロファージの貪食能と炎症応答における老化の影響を解明するため、若年および老化マウスを用いて常在性マクロファージの後期アポトーシス細胞貪食能と炎症応答の解析を行った。後期アポトーシス細胞をマクロファージに貪食させたところ、若年マウスと比較し老化マウスで有意に低下することが観察された。また、後期アポトーシス細胞を腹腔内に投与したところ、若年マウスと比較し老化マウスの方がアポトーシス細胞の速やかな除去が行われず長時間残存し、MIP-2が早期かつ多量に産生されることが確認され、それにつづく好中球浸潤も早期かつ多量に浸潤することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated phagocytosis of late apoptotic cells by peritoneal resident macrophages and infiltration of neutrophil and production of MIP-2 when injected late apoptotic cells to peritoneal cavity. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages from aged mice was significantly lower than that by macrophages from young mice. Upon peritoneal injection of apoptotic cells, the peak time of neutrophil infiltration was earlier and the neutrophil number was greater in aged mice than in young mice. Macrophages from young mice produced MIP-2 in the presence but not the absence of IFN- upon phagocytosis of late apoptotic cells. These results suggested that peritoneal resident macrophages in WT aged and SMP30-/-mice might be pre-activated. The present data suggested that resident macrophages are pre-activated and phenotypically changed in WT aged and SMP30-/-mice, causing delayed clearance of apoptotic cells and subsequently rapid and strong inflammation.

研究分野：免疫

キーワード：老化 炎症 アポトーシス 貪食

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。

最近私たちは、若年マウスと老化マウスの腹腔内にアポトーシス細胞を投与したときの応答を調べた。その結果、「1」投与したアポトーシス細胞は、若年マウスでは、速やかに貪食除去されたのに対し、老化マウスでは、長時間残存していたこと、「2」腹腔内への MIP-2 および KC の産生および好中球の浸潤は、老化マウスで顕著に多かったこと、「3」若年マウスで誘発される炎症応答は、微弱かつ一時的であったのに対し、老化マウスで誘導される炎症応答は、強くかつ持続的であったことを明らかにした。この知見は、死細胞が誘発する炎症応答への影響を老化マウスで示した初めての報告であり、特に「3」の知見は、誘発された炎症応答の重篤化および慢性化に老化が深く関わっていることを示唆するものである。

2. 研究の目的

生体内で産み出されるアポトーシス細胞は、貪食細胞によって炎症応答を伴うことなく、速やかに除去される。ところが、老化マウス

にアポトーシス細胞を投与すると、アポトーシス細胞が著しく残存することが分かった。さらに生体内に残存したアポトーシス細胞は、ネクローシス細胞となり、好中球の浸潤を伴う炎症応答を惹起することも分かった。これら知見は、老化(加齢)が炎症応答の発症・重篤化と密接に関わっているという可能性を示唆している。本研究では、死細胞により誘発される炎症応答に着目し、老化(加齢)が{1}アポトーシス細胞の貪食除去にどのような影響を及ぼすのか、{2}ネクローシス細胞により誘発される炎症応答の経過(発症・重篤度および終息・持続化)にどのような影響を及ぼすのかの2点について重点をおき、『死細胞が誘発する炎症応答に対して老化が及ぼす影響のメカニズム』を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

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、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る。また『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る。

『常在性マクロファージの貪食応答に対する老化の影響』

『炎症応答の重篤化への老化の影響』

『炎症応答の慢性化への老化の影響』

『炎症応答の終息への老化の影響』

4. 研究成果

生体内では、日々多くの細胞がアポトーシスにより死滅している。しかし、生体組織中で検出されることは通常ほとんどない。なぜなら、初期アポトーシスの状態でマクロファージなどの貪食細胞によって速やかに除去されるからである。しかし、なんらかの原因により初期アポトーシス細胞が速やかに除去されず、残存すると、後期アポトーシス(二次的ネクローシス)へと移行し強い炎症応答を引き起こす。この時、炎症性サイトカインである MIP-2 が産生され、多量の好中球が浸潤することが知られている。一方、老化すると多臓器機能不全や自己免疫疾患などの免疫系障害に罹患することが多くなる。これらのことから、老化に伴ってマクロファージ

の貪食能が低下し、アポトーシス細胞が残存することで炎症応答が引き起こされ、様々な疾患の原因になるのではないかと仮定した。

そこで本研究では、アポトーシス細胞に対するマクロファージの貪食能と炎症応答における老化の影響を解明するため、野生型の若年および老化マウス (C57BL/6) と老化促進モデルマウス (SMP30^{-/-}) を用いて腹腔常在性マクロファージの後期アポトーシス細胞貪食能と後期アポトーシス細胞の腹腔投与による炎症応答の解析を行った。

後期アポトーシス細胞をマクロファージに貪食させたところ、野生型若年マウスと比較し野生型老化マウスおよび SMP30^{-/-}マウスで有意に低下することが観察された。また、後期アポトーシス細胞を腹腔内に投与したところ、野生型若年マウスと比較し野生型老化マウスおよび SMP30^{-/-}マウスの方がアポトーシス細胞の速やかな除去が行われず長時間残存し、MIP-2 が早期かつ多量に産生されることが確認され、それにつづく好中球浸潤も早期かつ多量に浸潤することが明らかとなった。*in vivo* での結果からマクロファージからの MIP-2 産生量を詳しく解析するため、後期アポトーシス細胞と共培養した際の MIP-2 産生量を測定した。野生型若年マウスでは MIP-2 は産生されなかったが、野生型老化マウスおよび SMP30^{-/-}マウスでは高濃度で検出された。他の研究報告でマクロファージから MIP-2 が産生されるにはマクロファージへの IFN- γ による刺激が必要であることが示されている。*in vivo* での結果から MIP-2 産生への IFN- γ の作用を調べるため、*in vitro* でマクロファージに IFN- γ 刺激を行い、後期アポトーシス細胞を貪食させたところ、野生型若年マウスでも MIP-2 産生を確認できたが、IFN- γ 刺激を行わなかった野生型老化マウスおよび SMP30^{-/-}マウスマクロファージの方が産生量が多いことが明らかとなった。この現象を解析するため、マクロファージの活性化に焦点を当て解析を行ったところ、活性化し分極したマクロファージの表現型の一つである classical activation (M1) のマーカーである CD40 の発現が SMP30^{-/-}マウスマクロファージにおいて増加し、M1 に分極していることが観察された。M1 マクロファージは炎症促進性で貪食能が低いといわれていることから、M1 マクロファージとアポトーシス細胞を共培養し応答を解析したところ、アポトーシス細胞の貪食が低下し、MIP-2 が多量に産生された。

これらの結果から、老化によって腹腔のマクロファージが活性化し表現型が M1 となることで、アポトーシス細胞の貪食能が低下、長時間残存し、多量の MIP-2 を産生することによって急速かつ強力な炎症応答を引き起こし、様々な疾患の原因となっていることが示唆された。

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2件、ともに査読あり)

1. 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. Internal.* 17 JAN 2015, DOI: 10.1111/ggi.12436.
2. Suzuki, J., Hamada, E., Shodai, T., Kamoshida, G., Kudo, S., Itoh, S., Koike, J., Nagata, K., Irimura, T., and Tsuji, T.: Cytokine Secretion from human monocytes potentiated by P-selectin-mediated cell adhesion. *International archives of Allergy and immunology.* 160: 152-160,2013.

[学会発表](計11件)

1. 高橋 濤、小林 芳郎、永田 喜三郎: The phagocytic capacity of macrophages in aged mice was reduced. 第43回日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12 国立京都国際会館(京都府京都市)
2. 関口 朱津乃、永田 喜三郎、小林 芳郎: The mechanism for β -glucan-mediated inhibition of phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. 第43回日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12 国立京都国際会館(京都府京都市)
3. 滝野 有花、永田 喜三郎、小林 芳郎: The relation between neutrophil infiltration and ischemia in stress-induced gastric injury in mice. 第43回日本免疫学会学術集会 2014.12.10-12 国立京都国際会館(京都府京都市)
4. 高橋 濤、小林 芳郎、永田 喜三郎: Effect of aging on inflammatory responses to apoptotic cells. 第42回日本免疫学会学術集会 2013.12.11-13 幕張メッセ(千葉県千葉市)
5. 高橋 濤、小林 芳郎、永田 喜三郎: Macrophage in aged mice are pre-activated. 第41回日本免疫学会学術集会 2012.12.5-7 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
6. 與座 法子、小林 芳郎、永田 喜三郎: The role of S100A9 protein in the late stage of inflammatory response induced necrotic cells. 第41回日本免疫学会学術集会 2012.12.5-7 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
7. 高橋 濤、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 幕張メッセ(千葉県千葉市)
8. 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 幕張メッセ(千葉県千葉市)
9. 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 幕張メッセ(千葉県千葉市)
10. 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 幕張メッセ(千葉県千葉市)
11. 高橋漣、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 富山国際会議場(富山県富山市)

〔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：
出願年月日：
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 准教授
研究者番号：10291155

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

なし()

研究者番号：