

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07183

研究課題名（和文）老化マクロファージの貪食能低下とそれに伴う死細胞による炎症応答悪化の仕組みの解明

研究課題名（英文）Analysis of phagocytic activity of aging macrophage and the accompanying inflammatory response induced by apoptotic cells

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、老化に伴うマクロファージの貪食能の低下の仕組みについて調べてところ、常在性マクロファージは老化に伴って前活性化状態となり、その貪食能が低下することが分かった。また、その活性化は、個体の老化環境に依存するものではなく、細胞老化が原因であることが示唆され、その一部にp53の不活性化が関わっていることも明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、老化に伴って罹患率が著しく高くなる自己免疫疾患や多臓器機能不全の原因として、残存する死細胞に着目して展開した研究であり、老化に伴って死細胞が残存すると、持続的な炎症応答が誘発され、様々な疾病を起こしやすくなることを示し、その原因がマクロファージの活性化によるものであることを明らかにした。本研究の成果は、老化に伴うマクロファージの活性化を制御し、加齢に伴う様々な疾病の発症を抑えることを目指す足がかりにあるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the mechanism of the decrease in phagocytic ability of macrophages accompanying aging. It was found that resident macrophages become pre-activated with aging, and their phagocytic ability decreases. In addition, it was suggested that the activation does not depend on the aging environment of the individual, but is caused by cell aging, and it was clarified that inactivation of p53 is involved in part of it.

研究分野：免疫

キーワード：老化 マクロファージ 炎症応答 アポトーシス

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癒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

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、また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が分かった。これらの知見は、老化が炎症応答の発症・重篤化と密接に関わっているということを示唆している。本研究では、老化に伴うマクロファージの貪食能の低下がアポトーシス細胞残存の直接的な原因であることに着目し、(1)老化に伴って貪食能が低下したマクロファージがどのように出現してくるのか、さらにこれまでの知見を受けて(2)老化に伴って M1 マクロファージが有意に出現するメカニズムの解明の2点について重点をおき、『老化に伴うマクロファージの貪食能低下が死細胞により誘発される炎症応答を悪化する仕組み』を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 個体老化または細胞老化によるマクロファージ機能低下からのアプローチ

常在性マクロファージの貪食能への個体老化の影響

生体内に生じたアポトーシス細胞は、常在性マクロファージによって速やかに貪食除去される。最近研究代表者は、常在性マクロファージの絶対数は、老化マウスと若年マウスとの間に有意な変化はなく、常在性マクロファージの貪食能の低下が老化マウスにおいてアポトーシス細胞が残存する原因であることを明らかにしている。一方、様々な生体内環境が常在性マクロファージの貪食能に影響を及ぼすことが知られており、個体老化が常在性マクロファージを恒常的に活性化し、その貪食能を低下させていると考えられる。そこで、個体老化の過程で常在性マクロファージ活性化状態がどのような影響を受けるか調べ、個体老化に伴う常在性マクロファージの貪食能低下の原因を明らかにする。

マクロファージの貪食能への細胞老化の影響

*in vitro*での長期間の細胞培養は、個体老化の影響を受けず純粋な細胞老化を観察する単純かつ有用な系であり、3T3 細胞のような繊維芽細胞を用いて細胞老化に関わる遺伝子解析した研究が盛んに行われている。しかしながら、常在性マクロファージの長期的な培養は困難であり、特に貪食能を維持したまま細胞老化を起こしたマクロファージを樹立したという報告はほとんどない。近年、骨髄細胞を高濃度 GM-CSF 存在下で培養すると、長期培養可能な未成熟なマクロファージを樹立できることが報告されている。またこの長期培養した未成熟マクロファージは、常在性マクロファージの性状および細胞老化の生化学的な特徴を保持していることが分かっている。そこで、この長期培養した未成熟マクロファージを老化マクロファージとして位置づけ、老化マクロファージの貪食能低下の仕組みを調べ、老化に伴う細胞老化による常在性マクロファージの貪食能への影響を明らかにする。

(2) 老化に伴う M1 マクロファージへの分極と貪食能低下の仕組みからのアプローチ

M1/M2 マクロファージ分極に対する p53 の役割

最近、M1/M2 マクロファージの分極には、ガン抑制遺伝子である p53 が関わっているこ

とが報告された(Cell Death Differ: 22, 1081–1093, 2015)。p53 は M2 マクロファージを誘導する c-myc 遺伝子を負に制御していることが分かっており、この p53 は Akt/MDM2 経路によりリン酸化されることによって不活性化されることが分かっている。つまり常在性マクロファージは、p53 が不活性化された状況では M2 マクロファージに分化し、活性化されると M1 マクロファージに分化する。一方、最近研究代表者は、若年マウスでは常在性マクロファージが M2 マクロファージに、老化マウスでは M1 マクロファージに分極していることを明らかにしている。そこで、まず若年および老化マウスの常在性マクロファージにおいて、若年マウスでは p53 が不活性化され、老化マウスでは活性化されているか調べる。次に p53 が M1/M2 マクロファージ分極に直接関わることを証明するために、若年マクロファージ (M2 マクロファージ) の p53 を Nutlin-3a により活性化したとき、M1 マクロファージへの分極が誘導されるか調べ、p53 の活性化と M1/M2 マクロファージ分極との相関関係を明らかにする。

老化による p53 の活性化とマクロファージ貪食能低下との関わり

p53 の活性化が M1 マクロファージへの分極とともに老化マクロファージの貪食能低下に関わっていると推察される。そこで *in vitro* で p53 を活性化させたとき、M1 マクロファージへの phenotype の変化だけでなく、マクロファージの貪食能にも影響が及ぼされるか調べる。また老化マクロファージ (M1 マクロファージ) の p53 を Pifithrin- α により不活性化したとき、M2 マクロファージへの phenotype の変化が観察されるか、またそれに伴って貪食能が賦活化されるか調べ、p53 の活性化とマクロファージの貪食能との相関関係を明らかにするとともに、老化に伴うこれらの変化のメカニズムを解明する。

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起因するのか、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、リポ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った。

若年マウスに老化マクロファージを移植してもその貪食能は賦活化することはなく、また老化マウスに若年マクロファージを移植してもその貪食能は変化しなかったことから、老化に伴うマクロファージの貪食能の低下には、マウス固体内の老化環境は影響することはなく、マクロファージ自体の細胞老化である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shibata T, Makino A, Ogata R, Nakamura S, Ito T, Nagata K, Terauchi Y, Oishi T, Fujieda M, Takahashi Y, Ato M.	4. 巻 6
2. 論文標題 Respiratory Syncytial Virus Infection Exacerbates Pneumococcal Pneumonia via Gas6/Axl-mediated Macrophage Polarization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Clin Invest .	6. 最初と最後の頁 3021-3037
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI125505	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takizawa, S., Funakoshi, T., Yatsu, T., Nagata, K., Aigaki, T., Machida, S., and Ishigami. A	4. 巻 9
2. 論文標題 Vitamin C deficiency causes muscle atrophy and a deterioration in physical performance.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 4702
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-41229-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kawashima, S., Funakoshi, T., Sato, Y., Saito, N., Ohsawa, H., Kurita K., Nagata, K., Yoshida, M., and Ishigami. A.	4. 巻 8
2. 論文標題 Protective effect of pre- and post-vitamin C treatments on UVB-irradiation-induced skin damage.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 16199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-34530-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Otaki, M., Hirano, T., Yamaguchi, Y., Kaida, K., Koshika, S., Nagata, K., Nishimura, M., Kakinuma, S., Shimada, Y., and Kobayashi, K.	4. 巻 65
2. 論文標題 Changes in the function and phenotype of resident peritoneal macrophages after housing in an enriched environment.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int. Immunopharmac.	6. 最初と最後の頁 44-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.intimp.2018.09.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Chen, Y., Takikawa, M., Tsutsumi, S., Yamaguchi, Y., Okabe, A., Shimada, M., Kawase, T., Sada, A., Ezawa, I., Takano, Y., Nagata, K. Suzuki, Y., Semba, K., Aburatani, H., and Ohki, R.	4. 巻 109
2. 論文標題 PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 3532-3542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13796.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Makino A, Nagata K, Ito T, Takahashi Y, Shibata T.
2. 発表標題 Increased matrix metalloproteinase-12 respiratory syncytial virus infection leads to the exacerbation of asthma
3. 学会等名 日本免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小鹿成二、皆田皓平、山口陽子、石神昭人、永田喜三郎
2. 発表標題 老化に伴うマクロファージ貪食能低下と細胞老化の関わり
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 富永航平、永田喜三郎、大木美恵子
2. 発表標題 下垂体神経内分泌腫瘍で同定されたがん抑制遺伝子PHLDA3変異の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山口陽子、皆田皓平、石神昭人、永田喜三郎
2. 発表標題 p53はマクロファージのサイレントクリアランス機能を抑制する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 船越智子、滝沢晶子、谷津智史、永田喜三郎、相垣敏郎、町田修一、石神昭人
2. 発表標題 アスコルビン酸欠乏がマウス骨格筋に及ぼす影響
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橘拓孝、臺野和広、森岡孝満、石川敦子、尚奕、金小海、小川真里、藤田美鈴、永田喜三郎、小林芳郎、野川宏幸、松浦彰、島田義也、柿沼志津子
2. 発表標題 放射線被ばくによるマウスB細胞リンパ腫の発症リスクおよび遺伝子変異
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武井 怜奈、臺野 和広、砂押 正章、甘崎 佳子、森岡 孝満、永田喜三郎、野川 宏幸、松浦 彰、島田 義也、柿沼 志津子
2. 発表標題 放射線誘発マウスTリンパ腫におけるIkarosのゲノム変異と関連するエピゲノム異常
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大谷真志、小林芳郎、笠原忠、築地信、永田喜三郎、渡邊直子	4. 発行年 2018年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 242
3. 書名 スタンダード免疫学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------