

平成 21 年 3 月 19 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590083

研究課題名 (和文) 好中球による自然免疫応答活性化の仕組みの解明とその応用

研究課題名 (英文) Analysis and Application of activating mechanisms of innate immunity by neutrophils.

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：

マクロファージおよび未熟樹状細胞は、生体内で常に産み出されているアポトーシス細胞を迅速に貪食除去している。また、この貪食応答に対する静止好中球および活性化好中球の影響を検討した。その結果、マクロファージ貪食能に対する助長効果は、骨髄好中球よりも浸潤好中球のほうが顕著であり、またこの効果は、trans-well assay により好中球とマクロファージの相互作用を阻害すると、著しく低下することから、好中球とマクロファージとの相互作用が重要であることが分かった。またこの現象は、同様にアポトーシス細胞を貪食する未熟樹状細胞における貪食応答においても観察され、好中球が貪食応答全般に対して積極的に助長する機構を有していることが強く示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：免疫化学

1. 研究開始当初の背景

生体内では様々な細胞が常に派生・分化もしくは細胞分裂し、次々と新たな細胞を産み出している。またその一方で、それぞれの役目を終えた細胞は、死細胞として生体内に蓄積されて来ることとなる。しかしながら、生体内ではマクロファージや樹状細胞などの貪食細胞が、このような老朽化してアポトーシスした死細胞を速やかに貪食

除去することによって生体内に蓄積しないようにしている。この貪食細胞によるアポトーシス細胞の迅速な除去機構に破綻が生じると、発生や免疫システムの異常、さらには生体の恒常性維持をも脅かす状況を引き起こすと考えられており、自然免疫におけるアポトーシス細胞の迅速な除去の重要性は近年注目されている。一方、一般に好

中球は、殺菌作用に関わることは広く知られているものの、アポトーシス細胞の貪食除去の制御に関わるという知見はほとんどない。

以前我々は、様々なマウス組織マクロファージがアポトーシス細胞を貪食する際、ヒト好中球走化性因子である IL-8 (interleukin-8) の機能性マウスホモログである炎症性サイトカイン：MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) を産生することを明らかにした。また腹腔内に投与したアポトーシス細胞を腹腔内マクロファージが貪食すると、顕著な MIP-2 の産生とともに著しい好中球の腹腔内浸潤が観察され、貪食応答と好中球の関わりが強く示唆された。そこでこの貪食巣に浸潤してくる好中球が、貪食応答に対し積極的な役割を行っている可能性をより生理的な条件下で検討するため、胸腺細胞の貪食除去に着目して調べた。通常胸腺では、ネガティブセレクションにより自己反応性を持つ Double Positive T 細胞 (CD4⁺CD8⁺ T-cell) がアポトーシスに陥り、胸腺マクロファージにより貪食除去されている。しかしながら、このような細胞群は、正常マウスでは極わずかしか存在せず、その貪食除去応答を観察するのは困難である。そこで我々は、Double Positive T 細胞が放射線に感受性が高いことに着目し、低線量 X 線 (Double Positive T 細胞以外の細胞には影響を及ぼさない線量) をマウスに照射し、人為的に胸腺内にアポトーシス細胞を増加させ、その後の貪食応答を調べた。この系を用いることによって我々は、「1」胸腺内においても胸腺マクロファージがアポトーシス細胞を貪食すると、顕著な MIP-2 産生と好中球の胸腺内浸潤がみられること、「2」好中球を枯渇処理したマウスでは、アポトーシス細胞の貪食除去が遅延すること、「3」好中球による貪食除去助長には、マクロファージとの直接的な相互作用ではなく、なんらかの液性因子が重要な役割を果たしていることを明らかにした (*J. Immunol.* 175:3475-3483, 2005)。これらの知見は、好中球がアポトーシス細胞の貪食除去助長という新たな機能に積極的に関与していることを強く示唆するものである。またヒト単球由来マクロファージがアポトーシス細胞を貪食したときも IL-8 が産生されることから、我々が得た知見は、動物種特有の現象ではなく、広くみられるものであると考えられる。

2. 研究の目的

マクロファージは、生体内で常に産み出されているアポトーシス細胞を迅速に貪食除去

している。最近の研究により我々は、貪食応答に伴って貪食巣に好中球が浸潤してくること、またこの好中球がマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食除去を助長していることを明らかとした。この知見は、好中球が自然免疫における新たな機能に関与しているということを強く示唆するものである (*J. Immunol.* 175:3475-3483, 2005)。本研究では、好中球がどのようにしてマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食除去に関わっているのかということに重点をおき、自然免疫応答における新たな好中球の重要性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

「好中球側からのアプローチ」

貪食巣への好中球の浸潤は、好中球走化性因子である MIP-2 によって担われているが、*in vitro* で MIP-2 処理した好中球は、マクロファージの機能亢進活性を有さないことが、申請者の予備実験により分かっている。そこで、貪食巣に浸潤してくる好中球はどのように活性化されて、マクロファージの機能を亢進させる能力を獲得するかを調べるため、以下の実験を計画している。

● trans-endothelial migration 法による好中球の活性化：好中球は、血管内から貪食巣 (血管外) に浸潤するとき、まず貪食巣近傍の血管内皮細胞と相互作用したのち、内皮細胞間隙から血管外に遊走される。そこで、好中球と血管内皮細胞との相互作用、あるいは血管内皮細胞間隙の遊走過程が、マクロファージの貪食能を助長する好中球の活性化に重要であると考え、血管内皮細胞上で培養した好中球、あるいは chemotactic chamber を用いて血管内皮細胞間隙を遊走してきた好中球の機能の変化について調べる。

● 好中球と血管内皮細胞との相互作用の解析：好中球の活性化に好中球と血管内皮細胞との相互作用が重要であることが分かった場合、どのような接着分子が好中球の活性化に重要な役割を果たしているか、接着分子に対する中和抗体などを用いて調べる。また、その接着分子を介してどのようなシグナルが好中球内に伝達されているのかを生化学的手法により解析する。

「浸潤好中球の重要性の裏付け」

貪食層への好中球の浸潤が、必然的な現象であることを証明するために以下のようなモデル動物を用いた解析を行う。

● マクロファージ機能亢進マウスの解析：申請者は、STS/A マウスという先天的にマクロファージの機能が亢進しているマウスを共同研究により解析している。これまで申請者が得た結果から推察すると、好中球が、マクロファージの機能亢進のためだけに働いているとしたら、STS/A マウスでは貪食巣への好中球の浸潤は観察されないことが予想される。そこで STS/A マウスに低線量 X 線照射したとき、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食と好中球の浸潤を調べ、マクロファージの機能亢進と好中球の浸潤との関わ

りを検討する。

4. 研究成果

マクロファージは、生体内で常に産み出されているアポトーシス細胞を迅速に貪食除去している。また、この貪食応答に伴って貪食巣に好中球が浸潤してくること、この好中球がマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食除去を助長していることが明らかとなっている。今年度は、どのような好中球(亜集団)がマクロファージおよび未熟樹状細胞に働きかけ、活性化を助長するのかを解明するための好中球側からのアプローチを中心に行なった。具合的には、貪食巣に浸潤してくる好中球を細胞表面抗原である Gr-1、CD11b、CD49d、および Ly49Q の発現パターンにより識別し、静止状態の好中球として用いた骨髄好中球と比較検討した。その結果、マクロファージ貪食能に対する助長効果は、骨髄好中球よりも浸潤好中球のほうが顕著であり、またこの効果は、trans-well assay により好中球とマクロファージの相互作用を阻害すると、著しく低下することから、好中球とマクロファージとの相互作用が重要であることが分かった。またこの現象は、同様にアポトーシス細胞を貪食する未熟樹状細胞における貪食応答においても観察され、好中球が貪食応答全般に対して積極的に助長する機構を有していることが強く示唆された。

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 9 件、すべて査読あり)

1. Terasawa, M., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Neutrophils and monocytes transport tumor cell antigens from the peritoneal cavity to secondary lymphoid tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377:589-594, 2008
2. Yamazaki, T., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Cytokine production by M-CSF- and GM-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Cellular Immunol.* 251: 124-130, 2008.
3. Hatano, M., Sasaki, S., Ohata, S., Shiratsuchi, Y., Yamazaki, Y., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Effects of Kupffer cell-depletion on Concanavalin A-induced hepatitis. *Cellular Immunol.* 251: 25-30, 2008.
4. Fujiwara, H., Yamazaki, T., Uzawa, A., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Transient infiltration of neutrophils into the thymus following whole-body X-ray irradiation in IL-10 knockout mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369:432-436, 2008
5. Shibata, T., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: *Cutting Edge*: A critical role of nitrogen oxide in preventing inflammation upon apoptotic cell clearance. *J. Immunol.* 179: 3402-3406, 2007
6. Tanimoto, N., Terasawa, M., Nakamura, M., Kegai, D., Aoshima, N., Kobayashi Y., and Nagata, K.: Involvement of KC, MIP-2, and MCP-1 in leukocyte infiltration following injection of necrotic cells into the peritoneal cavity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 361: 533-536, 2007.
7. Itoh, S., Susuki, C., Takeshita, C., Nagata, K., and Tsuji, T.: Redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) in chemokine-treated neutrophils: a role of lipid microdomains. *J. Leukoc. Biol.* 81: 1414-1421, 2007.
8. Saijo, S., Nagata, K., Masuda, J., Matsumoto, I., and Kobayashi, Y.:

Discrimination of early and late apoptotic cells by MDB-phosphatidylserine-labelling and time-lapse observation of phagocytosis of apoptotic cells by macrophages. *J. Biochem.* 141 : 301-307, 2007.

9. Shiratsuchi, Y., Iyoda, T., Tanimoto, N., Kegai D., Nagata, K., and Kobayashi, Y.: Infiltrating neutrophils induce allospecific CTL in response to immunization with apoptotic cells via MCP-1 production. *J. Leukoc. Biol.* 81 : 412-420, 2007.

[学会発表] (計 18 件)

1. 柴田岳彦、永田喜三郎、小林芳郎: 好中球のアポトーシスを伴う炎症の終息における一酸化窒素の役割 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008.12.1-3 京都
2. 佐々木宗一郎、永田喜三郎、小林芳郎: 好中球によるオピオイドペプチド産生を介した性周期の維持 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008.12.1-3 京都
3. 山崎貴裕、永田喜三郎、小林芳郎: 接触過敏症における浸潤好中球の役割 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008.12.1-3 京都
4. 坪井久美子、永田喜三郎、小林芳郎: マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食における消化の意義 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008.12.1-3 京都
5. 金野なつみ、永田喜三郎、小林芳郎: 未熟樹状細胞のアポトーシス細胞貪食時における好中球の役割 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008.12.1-3 京都
6. 中村美保、永田喜三郎、小林芳郎: ネクロシス細胞に対する生体の応答 第 38 回日本免疫学会学術集会 2008.12.1-3 京都
7. 永田喜三郎、中村美保、小林芳郎: 死細胞に対する生体の応答へアポトーシス

からネクロシスまでー 第 17 回日本アポトーシス研究会学術集会 2008.8.1-2 京都

8. 寺沢公男、永田喜三郎、小林芳郎: 腫瘍細胞特異的キラーT細胞誘導における 2 次リンパ組織への腫瘍抗原移動機構 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
9. 佐々木宗一郎、永田喜三郎、小林芳郎: 雌マウス生殖器官に一過的に浸潤する白血球の生理的意義 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
10. 柴田岳彦、永田喜三郎、小林芳郎: アポトーシス細胞の処理に伴う一酸化窒素の炎症応答抑制作用 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
11. 山崎貴裕、永田喜三郎、小林芳郎: 接触過敏症における浸潤好中球の役割 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
12. 高木秀幸、永田喜三郎、小林芳郎: 極初期アポトーシス細胞のマクロファージによる認識 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
13. 武富絢子、永田喜三郎、小林芳郎: アポトーシス細胞とネクロシス細胞の腹腔投与によって浸潤する好中球の特徴 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
14. 丹羽広之、松浦隆之、永田喜三郎、小林芳郎: 肺胞マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食応答と肺胞内環境によるその制御 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
15. 金野なつみ、永田喜三郎、小林芳郎: 貪食巣浸潤における好中球の活性化機構および活性化好中球の役割の解明 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
16. 中村美保、谷本奈緒子、寺沢公男、白土佳子、永田喜三郎、小林芳郎: ネクロシス細胞に対する生体の応答 第 37 回日本免疫学会学術集会 2007.11.20-22 東京
17. 高木秀幸、永田喜三郎、小林芳郎: Caspase活性を指標としたアポトーシス

進行段階の解析およびマクロファージ
による極初期アポトーシス細胞の認識
機構の解析 第16回日本アポトーシス
研究会学術集会 2007.8.3-4 千葉

18. 坪井久美子、永田喜三郎、小林芳郎：マ
クロファージのアポトーシス細胞食
応答における消化の意義 第16回日本
アポトーシス研究会学術集会
2007.8.3-4 千葉

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