

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

論文題目

老化によるマクロファージのアポトーシス細胞貪食能低下の機序の解明

論文要旨

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。

論文審査の要旨及び審査結果の要旨

年入学	研究分野 生物分子科学	氏名 高橋 滯
審査委員	(主査) 東邦大学・理学部・准教授 永田 喜三郎 (副査) 東邦大学・理学部・教授 小林 芳郎 (副査) 東邦大学・理学部・教授 杉本 雅純 (副査) 東京都健康長寿医療センター研究所 部長 石神 昭人	
(論文題目) 老化によるマクロファージのアポトーシス細胞貪食能低下の機序の解明		
(論文審査の要旨及び審査結果の要旨) 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く、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。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。このとき、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。これらの知見から、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 (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. <i>Geriatr. Gerontol.</i> in press.)。 <i>in vivo</i> 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。