

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	アポトーシス細胞による炎症応答に対する老化の影響
作成者(著者)	高橋, 澗
公開者	東邦大学
発行日	2012
掲載情報	東邦大学理学修士論文(生物分子科学専攻)平成23年度. 61. p.1 60.
資料種別	学位論文
内容記述	学位取得年月: 2012年3月 / 指導教員: 永田喜三郎
著者版フラグ	author
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD51738862

論文題目

アポトーシス細胞による炎症応答に対する老化の影響

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, KC 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。当研究室の以前の研究で、長寿という特徴をもつ STS/A マウス内のマクロファージは、非常に高い貪食能を持つことを発見した。さらに、他の多くの先行研究により、アポトーシス細胞が正常に貪食・除去されないと様々な疾病に陥ることが知られている。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応答やマクロファージの貪食能に着目し、アポトーシス細胞貪食除去における老化の影響を調べた。

本研究では、野生型マウスを若いマウスとして、老化促進モデルマウスとして知られる SMP30/GNL KO マウスを老化マウスとして用いた。SMP30 遺伝子は、ビタミン C 合成酵素群の一つである Gluconolactonase をコードしているため、この老化促進モデルマウスは、通常生体内で合成できるビタミン C を合成することができない。このマウスを必要量の 2.5% のビタミン C を与えて飼育すると、壊血病などを発症せず老化が促進される。これにより短期間で老化モデルマウスが得られる。

in vivo の結果から KO の方が WT と比較してアポトーシス細胞が長時間残存することが明らかとなった。さらに、アポトーシス細胞が速やかに除去されないことにより、MIP-2, KC が KO の方が早期、かつ、多量に産生されることにより好中球浸潤の有意な増加を引き起こし、炎症応答の増大を招くことが示された。*in vitro* ではマクロファージの貪食能が KO の方が低いことが示され、かつ、WT では検出されなかった MIP-2, KC が KO では高濃度で検出され、*in vivo* でのアポトーシス細胞の残存および炎症応答の増強を裏付ける結果となった。これらの結果から KO マウスでは腹腔常在性マクロファージの貪食能が低下し、アポトーシス細胞の速やかな除去が行われず、長時間アポトーシス細胞が残存し、強い炎症応答を引き起こすことが示された。

加えて、他の研究報告で、腹腔常在性マクロファージを後期アポトーシス細胞と共培養しても IFN- γ 存在下でなければ MIP-2 は産生されないことが示されている。*in vitro* での MIP-2 の結果では IFN- γ を加えずに共培養を行ったものであるため、WT の結果はその報告と一致する。しかし、KO では IFN- γ を加えていないにも関わらず、アポトーシス細胞の貪食に伴って MIP-2, KC が産生された。この結果は、先の報告と矛盾する。この矛盾の解釈として KO マウスの腹腔常在性マクロファージが、アポトーシス細胞投与以前に IFN- γ あるいは他の何らかの物質により刺激され前活性化状態にあるのではないかと示唆された。

IFN- γ 刺激を行っての共培養では、KO の方が IFN- γ 刺激により即座に MIP-2 が産生されたが、WT では時間を要した。さらに LPS との共培養では、興味深いことに IFN- γ 刺激を行わなかった KO と IFN- γ 刺激を行った WT の MIP-2 産生量がほぼ同程度であり、IFN- γ 刺激を受けた KO はさらに産生量が増大することが示された。このことから KO の腹腔常在性マクロファージが前活性化状態であることが示唆された。

このことが老化により多発する免疫系障害の原因メカニズムの一つであると考えられる。

平成 23 年度 修士論文

アポトーシス細胞による炎症応答に対する老化の影響

東邦大学大学院 理学研究科 生物分子科学専攻
分子医学部門 永田研究室
指導教員 永田喜三郎 准教授
6310019 高橋 滯

Contents

Introduction	1
Materials and Methods	3
Results	16
Discussion	21
Figures	23
References	53
Acknowledgements	57

Introduction

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, KC 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。

さらに、他の多くの先行研究により、アポトーシス細胞が正常に貪食・除去されないと様々な疾病に陥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。しかし、老化によるアポトーシス細胞の残存、あるいは免疫系障害の罹患に関する詳細なメカニズムは解明されていない。

当研究室では、以前の研究で長寿という特徴をもつ STS/A マウス内のマクロファージが、非常に高い貪食能を持つことを発見した。このことから、貪食能が高いことで効率よくアポトーシス細胞が除去され、様々な疾病に罹患するリスクが軽減されていることが示唆された。

そこで我々は、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、不都合な状況を招いているのではないかと仮定した。

このことを検証するため、若いマウスと老化したマウスを用いてアポトーシス細胞に対する応答を比較することにした。しかし、老化マウスは飼育に時間がかかり個体数にも限りがある。そのため、本研究では老化促進モデルマウス (KO) を用いて調べることにした。

今回実験に用いた KO マウス (SMP30/GNL^{-/-}) は、正常マウスでは合成できるビタミン C を合成することができない。この KO マウスは SMP30 遺伝子に欠損がある。SMP30 は Gluconolactonase という酵素をコードしている遺伝子であり、欠損によりこの酵素を合成することができない。グルコノラクトナーゼはビタ

ミンC合成経路の最後から 2 番目に位置する酵素であるため、SMP30/GNL^{-/-} マウスはビタミンCを合成することができない。そのため、このマウスをビタミン C を含まない飼料で飼育すると、体重の減少・臓器の委縮のような老化に似た症状を起こし短期間で死亡する。しかし、飼料中にビタミン C が全く含まれていないとビタミン C 欠乏症である壊血病を発症し死に至るため、老化モデルとしては適さない。だが、一日に必要なビタミン C 量の 2.5% を与えると、ビタミン C 欠乏症を発症せずに老化が促進されることがわかっている。また、必要量の 100% を与えた場合、老化は促進されず正常に生育する。これらのことから、SMP30/GNL^{-/-} マウスは老化促進モデルと言え、このマウスを用いることにより短期間で老化に関する実験を行うことができる^{1, 2)}。

以前の研究で二次的ネクローシス（後期アポトーシス）誘導したアポトーシス細胞をマウスの腹腔に投与すると、好中球の浸潤を伴う炎症応答が起きることが分かっている^{3, 4)}。

そのため本研究では、アポトーシス誘導した PMNs (polymorphonuclear leukocyte) をマウス腹腔に投与し、経時的に浸潤細胞をフローサイトメーターで観察し、腹腔浸出液中の MIP-2, KC, MCP-1 の各ケモカイン産生量を ELISA を用いて調べた。

さらに、in vitro において腹腔常在性マクロファージとアポトーシス細胞とを共培養し、貪食率および貪食能を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、算出した。

また、他の研究報告で LPS による全身性炎症モデルでは、老化によって IL-6, HMGB-1, TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が上昇することが報告されている⁵⁾。このため、腹腔常在性マクロファージと LPS の共培養により、老化による炎症性サイトカイン産生への影響も調べた。

Materials and Methods

【実験動物の飼育】

● マウス

- C57BL/6 ♂ 5 週齢 [三協ラボサービス株式会社]

実験まで Conventional 動物舎で飼育した。

- SMP30/GNL -/- ♂ 7 週齢 [東京都老人総合研究所 石神昭人主任研究員より提供] 飼料は CL-2 [三協ラボサービス] 用い、生後 4 週齢までアスコルビン酸添加水 (ビタミンC充足群用) で飼育、その後 7 週齢までアスコルビン酸添加水 (ビタミンC不足群用) で飼育し、実験に使用した。

● 試薬

- CL-2 [三協ラボサービス]

コバルト 60 (30 kGy) で照射滅菌したビタミンCを含まないマウス飼料。

- アスコルビン酸添加水 (ビタミンC充足群用)

L (+) - Ascorbic Acid [DSM ニュートリションジャパン株式会社] 1.5 g に 2N HCl 500 μ l, 0.1 M EDTA (pH 8.0) 100 μ l を加えた。超純水で 1 L にメスアップし転倒混和 (final : 1.5 g/L) 、給水ビンに分注。

•アスコルビン酸添加水 (ビタミンC不足群用)

L (+) - Ascorbic Acid 1.0 g を塩酸水 (2N HCl 20 μ l, 0.1 M EDTA 4 μ l, 超純水 39.976 ml) 40 ml に溶かしこれを原液とする。原液 1.5 ml を塩酸水 1 L に加え転倒混和し (final : 0.0375 g/L) 給水ビンに分注。

•2N HCl

35 % HCl [ナカライテスク株式会社] 17.7 ml に超純水で 100 ml にメスアップ。

•0.1 M EDTA

EDTA [ナカライテスク株式会社] 3.7 g を超純水 100 ml に溶解し、pH 8.0 に調整。

【アポトーシス細胞】

● 細胞

•後期アポトーシス PMNs

野生型の C57BL/6 マウスの腹腔に TG 培地を 2ml/mouse で投与した 6 h 後にマウス腹腔滲出細胞を PBS で回収した。PBS で 3 回洗浄 (800×g, 5 min, 4°C) し、7% FCS-RPMI で 2×10^6 cells/ml に調整し、アズノール滅菌シャーレ [アズワン株式会社] に播種。12 h, 37°C で incubate したものを後期アポトーシス PMNs とした。

● 培地

•RPMI 培地

RPMI 1640 [日水製薬株式会社] 10.3 g を超純水 1 L に溶解し、120°C, 20 min オートクレーブしたものに、あらかじめ濾過滅菌した L-グルタミン [ナカライテスク株式会社] 0.3 g とカナマイシン硫酸塩 [ナカライテスク株式会社] 60 mg、あらかじめオートクレーブしておいた 10% 炭酸水素ナトリウム [ナカライテスク株式会社] 水溶液を 10 ml 加えた。

•FCS (Fetal Bovine Serum) :ウシ胎児血清 [biowest]

56°C, 30 min 非働化したものを使用した。

● 試薬

•PBS (Phosphate Buffered Saline)

リン酸緩衝生理食塩水

0.5 M Na_2HPO_4 14 ml と 0.5 M KH_2PO_4 6 ml, NaCl [ナカライテスク株式会社] 4.25 g に超純水を加えて 500 ml として溶解させた後、120℃, 20min オートクレーブし、4℃ で保存した。

•Trypan blue

粉末の Trypan blue [和光純薬工業株式会社] を PBS で 0.5% に調整し濾過滅菌した。

【アポトーシス細胞の解析】

● 実験動物

- C57BL/6 (WT) ♂ 5-6 週齢

● 試薬

- PBS
- Trypan blue
- Binding Buffer
- Annexin V-FITC
- Propidium Iodide (PI)
Binding Buffer, Annexin V-FITC, PI は human Annexin V-FITC Kit [Bender MedSystems] を使用。
- シース液 (ISO FLOW) [BECKMAN COULTER]

◆ アポトーシス PMNs のフローサイトメーターによる解析

TG 培地を 2ml/mouse で投与した 6 h 後にマウス腹腔滲出細胞を PBS で回収した。PBS で 3 回洗浄 (800×g, 5 min, 4°C) 後、7% FCS-RPMI で 2×10^6 cells/ml に調整し、アズノール滅菌シャーレ [アズワン株式会社] に播種。37°C で incubate し、経時的に回収。以後の操作は氷上で行った。PBS 10 ml で 3 回洗浄 (800×g, 5 min, 4°C) 後、PBS 1 ml に懸濁。血球計算盤と Trypan blue を用いて cell count し、細胞数と生存率を算出した。 5×10^5 cells を 1.5 ml tube に分注し、3000 rpm, 5 min, 4°C で遠心、上清を捨てた。Annexin V-FITC 2.5 μ l, PI 5.0 μ l, Binding Buffer 92.5 μ l に懸濁し、遮光した状態で 10 min, r. t. 静置した。PBS 1 ml で洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を捨て、シース液 500 μ l に懸濁、FALCON tube [BECTON DICKINSON] 移してフローサイトメーターで解析した。

【アポトーシス細胞投与における腹腔浸出細胞の解析】

● 実験動物

- C57BL/6 (WT) ♂ 5-6 週齢
- SMP30/GNL ^{-/-} (KO) ♂ 7 週齢

● 試薬

- PBS
- Trypan blue
- 生理食塩液 [大塚製薬株式会社]
- PKH26 Red Fluorescent Cell Linker kit [SIGMA-ALDRICH]
- Diluent C [SIGMA-ALDRICH]
- 0.5% BSA-PBS
PBS に 1.0 g の BSA (Bovine serum albumin) [SIGMA-ALDRICH] を加えて 200 ml とし、溶解させた。
- シース液 (ISO FLOW) [BECKMAN COULTER]
- PI
- Streptavidin-APC [BD Biosciences]

● 抗体

- normal mouse IgG (clone MOPC-21)
- rat anti mouse CD16/32 (Fcγ receptor III/II) (clone 2.4G2)
- FITC-conjugated rat anti mouse Ly-6G Gr-1 antibody (clone RB6-8C5)
- Biotin-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1 • subunit) antibody (clone M1/70)

- isotype control : FITC-conjugated rat anti human HLA antibody (IgG_{2b})
(clone SFR8-6B)
- isotype control : Biotin-conjugated rat anti human HLA antibody
(IgG_{2b}) (clone SFR8-6B)
- FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody (clone HB198)

◆ アポトーシス PMNs 投与

アポトーシス誘導した PMNs を 50 ml チューブ に回収し、PBS 10 ml で洗淨 (800×g, 5 min, r. t.) 後、Diluent C 1 ml に懸濁。あらかじめ PKH 26 Red を 8 μl 添加した Diluent C 1 ml を加え、懸濁し、4 min, r. t. 静置。FCS 1 ml を加え 1 min 静置。PBS を 5 ml 加え、遠心 (800×g, 5 min, r. t.) し、上清除去。PBS 10 ml で洗淨 (800×g, 5 min, r. t.) 後、生理食塩液 10 ml で洗淨 (800×g, 5 min, r. t.) し、上清除去。生理食塩液 1 ml に懸濁後 cell count し、生存率が約 40% であることを確認。2.0×10⁷ cells/ml に調整し、2.5 ml シリンジに 1 ml 分注、マウス腹腔に投与した。

◆ フローサイトメーターによる腹腔浸出細胞の解析

腹腔から回収したサンプルを遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を回収 (ELISA による測定まで -80°C で保存)、0.5% BSA-PBS に懸濁した。Trypan blue を用いて cell count し、細胞数と生存率を算出した。5×10⁵ cells 相当量を 1.5 ml シリコン処理マイクロチューブに分取し、遠心 (3000 rpm, 5 min, 4°C) 後、上清除去した。normal mouse IgG, 0.25 mg/ml を 4 μl と、anti CD16/32 (FcγR III/II) antibody, 0.25 mg/ml を 4 μl 添加し、遮光して氷

上に 30 min 静置した。その後、Biotin-conjugated rat anti mouse CD11b (Mac-1 • subunit) antibody, 0.5 mg/ml を 1 μ l 添加、別のチューブのサンプルに Biotin-conjugated rat anti human HLA antibody, 1 μ g/ml を 10 μ l 添加した。30 min 静置後、0.5% BSA-PBS 1 ml 加え、遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を除く作業を 2 回行った。FITC-conjugated rat anti mouse Ly-6G Gr-1 antibody, 0.5 mg/ml と FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody, 0.5 mg/ml を anti CD11b antibody を添加したサンプル 2 つにそれぞれ 2 μ l 添加し、さらに Streptavidin-APC をそれぞれ 0.5 μ l ずつ添加した。Biotin 標識した anti HLA antibody を添加したサンプルには、FITC-conjugated rat anti human HLA antibody, 1 μ g/ml を 10 μ l 添加し、さらに Streptavidin-APC を 0.5 μ l 添加した。30 min 静置後、0.5% BSA-PBS 1 ml 加え、遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を除く作業を 2 回行った。すべてのサンプルに PI (5 μ g/ml) を 10 μ l 添加し、10 min 静置した。0.5 % BSA-PBS 1 ml 加え、遠心・洗浄 (3000 rpm, 5 min, 4°C) し、上清を除く作業を 2 回行った。シース液 500 μ l に懸濁し、フローサイトメーターで解析した。

【ELISA による測定】

● 抗体

- Murine MIP-2 ELISA Development Kit [PEPROTEC EC LTD]
- Murine KC ELISA Development Kit [PEPROTEC EC LTD]
- Murine MCP-1 ELISA Development Kit [PEPROTEC EC LTD]
- Murine TNF- α ELISA Development Kit [PEPROTEC EC LTD]

● 試薬

- Avidin Peroxidase [PEPROTECH EC LTD]
1/2000 倍に希釈して使用した。
- ABTS Liquid Substrate Solution [PEPROTECH EC LTD]
- Wash buffer : 0.05% Tween 20 in PBS
- Block buffer : 1% BSA in PBS
- Diluent : 0.1 % BSA, 0.05 % Tween 20 in PBS [PEPROTECH EC LTD]

◆ ELISA による検出法

前日に 96 well plate に Capture Ab を 50 μ l/well でまき、室温で一晩おいた。翌日、まずプレートの液を捨て、ペーパーにたたくようにして well の水気を取り、Wash buffer を各 well に 150 μ l 入れて洗い、プレートをペーパーにたたくようにして well の水気をとった。これを 4 回行った (以下、この一連の操作を Wash と記す)。次に、Block buffer を各 well に 150 μ l まき、室温で 2 h 放置。Wash 後、sample と standard を各 well に 50 μ l ずつまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Detection Ab を各 well に 50 μ l でまき、室温で 2 h おいた。Wash 後、Avidin Peroxidase (1/2000 倍希釈したもの) を各 well に 50 μ l まき、室温で 30 min 放置。Wash 後、ABTS Liquid Substrate Solution を各 well に 50 μ l まき、5-25 分後、405 nm (対照波長 650 nm) の吸光度を測定した。

【腹腔常在性マクロファージとアポトーシス細胞、LPS の共培養】

● 実験動物

- C57BL/6 (WT) ♂ 5-6 週齢
- SMP30/GNL ^{-/-} (KO) ♂ 7 週齢

● 試薬

- 7% FCS-RPMI
- PBS
- Trypan blue
- PKH26 Red Fluorescent Cell Linker kit [SIGMA-ALDRICH]
- Diluent C [SIGMA-ALDRICH]
- FCS [biowest]
- 0.2 M Tris HCl (pH 9.5)

Trizma base [SIGMA-ALDRICH] 2.42 g を超純水 100 ml に溶解し、HCl で pH 9.5 に調整した。

- 退色防止封入剤 (Mowiol)

Glycerol [ナカライテスク株式会社] 6 ml, 0.2 M Tris HCl (pH9.5) 12 ml に 2.4 g Mowiol[®] 4-88 Reagent [CALBIOCHEM] を加え、直ちに攪拌して Mowiol を分散させた後、50°C incubate。DABCO [Polysciences, Inc.] を 5% になるように加え、超純水を加えて 24 ml にした。これを 1000 rpm, 5 min, r. t. で遠心し、不可溶物を取り除いた後、分注して-30°Cで保存した。使用時は 4°Cで解凍し、使用した。

- Recombinant Murine IFN- γ [PEPROTECH EC LTD]
- Lipopolysaccharide from E.coli J5 (LPS) [ナカライテスク株式会社]

● 抗体

- FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody (clone HB198)

◆ 腹腔常在性マクロファージの調整

WT, KO マウスそれぞれの腹腔から PBS 5 ml を用いて腹腔常在性細胞を回収し、1000 rpm, 5 min, 4°C で遠心、上清を除去した。7% FCS-RPMI 3 ml に懸濁し cell count。 1×10^6 cells/ml に調整し、Tissue Culture Test Plates 96 F [TPP] あるいは、96 well Black with Clear Flat Bottom [costar] に 200 μ /well で播種。37°C, 1 h incubate 後、上清を捨て、PBS で wash を 2 回 行い、7% FCS-RPMI を 200 μ /well 添加した。

◆ 後期アポトーシス PMNs との共培養時の貪食の観察

96 well Black with Clear Flat Bottom [costar] に調整したマクロファージの上清を捨て、PBS で wash を 2 回行った。PKH26 Red で染色し、細胞数を調整した後期アポトーシス PMNs を 200 μ l/well で播種した。経時的に上清を回収し、ELISA で測定まで -80°C で保存した。FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody, 0.5 mg/ml を 7% FCS-RPMI で 10 μ l/ml に調整し、100 μ l/well 添加し、 37°C , 30 min incubate した。PBS で wash を 2 回行い、4% PFA (4% パラホルムアルデヒド) を 25 μ l/well 添加し、遮光し、 4°C , 20 min 固定した。PFA を除去し、退色

防止封入剤を 25 μ l 添加し、封入した。

共焦点レーザー顕微鏡 [FLUOVIEW FV1000-D OLYMPUS] を用いて観察し、取得した画像を Adobe Photoshop CS4, Image J を用いて解析し、貪食率・貪食能を算出した。

• 貪食率 (% of Phagocytosis)

: アポトーシス細胞を貪食しているマクロファージの割合

$\text{貪食マクロファージ数} / \text{全マクロファージ数} \times 100$ (一視野当たり)

• 貪食能 (Phagocytic Index)

: マクロファージのアポトーシス細胞貪食量の相対値

$\text{貪食されているアポトーシス細胞の総面積} / \text{貪食マクロファージ数}$

◆ IFN- γ 存在下での腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs の共培養

Tissue Culture Test Plates 96 F [TPP] に調整したマクロファージの上清を捨て、PBS で wash を 2 回行った。各 well に IFN- γ を添加した 7% FCS-RPMI を 100 μ l/well (IFN- γ は終濃度 100 ng/ml) 加え 37 $^{\circ}$ C で incubate した。incubate 後、細胞数を調整した後期アポトーシス PMNs を 100 μ l/well 加え、37 $^{\circ}$ C で incubate し、経時的に上清を回収。回収した上清は ELISA による測定まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

◆ 腹腔常在性マクロファージと LPS の共培養

Tissue Culture Test Plates 96 F [TPP] に調整したマクロファージの上清を捨て、PBS で wash を 2 回行った。各 well に IFN- γ 添加あるいは、無添加の 7% FCS-RPMI を 100 μ l/well (IFN- γ は終濃度 100 ng/ml) 加え、0.01, 0.1, 1, 10 μ g/ml の各濃度に調整した LPS を 100 μ l/well 加えて 37 $^{\circ}$ C で incubate した。経時的に上清を回収し、ELISA による測定まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。

Results

【TG 誘導 PMNs の経時的解析】

WT マウス腹腔に TG 培地を 2 ml 投与し、6 h 後に回収した PMNs を 37°C で incubate した。アポトーシスの進行を調べるため、経時的に回収した PMNs を FITC-Annexin V と PI で染色し、フローサイトメーターで解析した。Fig. 1A では解析画像を示している。培養時間の経過とともに、細胞のサイズダウン、密度の上昇が確認できた。さらに、Annexin V により染色される細胞の割合も増加していくことからアポトーシスを起こしていることが確認できた。Fig. 1B では染色される細胞の割合の変化を経時的に示している。培養 12 h 以降は細胞数が減少し、細胞が破壊されネクローシスのような状態であることが考えられたため、目的であるアポトーシス細胞を用いた実験には適さないと判断した。そのため、培養 12 h を後期アポトーシス PMNs として用いることとした。

【腹腔常在性マクロファージの解析】

この研究では腹腔常在性マクロファージの貪食能に焦点を当てているため、まず未処理の状態でのマクロファージの数や状態を調べた。

腹腔常在性細胞を Biotin-conjugated rat anti mouse CD11b antibody と FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色し、ともに High positive となる細胞をマクロファージとしフローサイトメーターで解析した。WT, KO ともに CD11b, F4/80 の細胞表面発現レベルに違いはなかった (Fig. 2A)。また、マクロファージの細胞数も WT, KO で差はなかった (Fig. 2B)。さらに、腹腔常在性細胞をサイトスピンし、ディフクイック染色を行い顕微鏡で観察したが、形態的にも違いはなかった (Fig. 2C)。

【後期アポトーシス PMNs 腹腔投与における炎症応答の解析】

TG 誘導 PMNs を 12 h 培養し、後期アポトーシスさせたアポトーシス PMNs を 2.0×10^7 cells 投与し、腹腔浸出細胞を経時的に回収し、フローサイトメーターで解析した。

まず、投与したアポトーシス細胞の残存量を測定した。投与したアポトーシス細胞は PKH26 RED で染色してあるため、FL-2 で positive となる細胞にゲートし、判別した。WT では速やかに減少し、30 min 後には投与した数のおよそ半数まで減少した。しかし KO では、1 h 経過しても投与した全量が残存しており、半数まで減少するのに 2 h を要した。このことから KO ではアポトーシス細胞の速やかな除去が行われず、長時間残存することが明らかとなった (Fig. 3)。

次に、浸潤細胞の経時変化を解析した。炎症応答が起こると、炎症局所へ多量の好中球浸潤が生じることが知られている。WT では 12 h で浸潤量が最大となっているのに対し、KO では 6 h で最大となった。また、最大浸潤量も KO の方が WT と比較し有意に増加した (Fig. 4A)。さらに、炎症応答時には単球の浸潤も誘導される。単球の浸潤量は WT, KO ともに 24 h で最大となったが、KO の方が浸潤量は有意に増加した (Fig. 4B)。単球には浸潤時にみられる Gr-1⁺ の細胞と、浸潤後に成熟化し Gr-1⁻ となる細胞の 2 つの集団が存在したが、どちらの細胞群も前述の傾向と同じとなった (Fig. 4C, D)。しかし、投与後 24 h の Gr-1⁻ となる単球は投与後 12 h の Gr-1⁺ の単球よりもはるかに数が多い。そのため、浸潤後に成熟化するという考えに矛盾が生じるように思えるが、24 h での総単球数の増加量に対して Gr-1⁺ の単球数の増加量が少なく、また、Gr-1⁻ となる単球が占める割合が多いことから、Gr-1⁺ 単球の浸潤ピークは 12 h と 24 h の間にあると考えられる。

マクロファージの浸潤量についても KO の方が WT よりも有意に増加した (Fig. 4E)。これは、浸潤した単球が分化し、マクロファージとなったため、単球の浸潤量が KO において有意に増加したためと考えられる。

細胞浸潤量の有意な増加が認められたことから、腹腔浸出液中の細胞浸潤に
関与するケモカイン濃度を ELISA を用いて測定した。

まず、好中球浸潤に関与する MIP-2, KC の濃度を測定した。WT の MIP-2 濃度
はアポトーシス細胞投与後 3 h で最大となったのに対し、KO では 2 h で最大と
なった。さらに、産生された MIP-2 量の最大値も KO の方が有意に増加した。同
様に KC でも投与後 2 h で KO の方が有意に高い濃度を示した (Fig. 5A, B)。

また、単球・マクロファージの浸潤に関与する MCP-1 では、MIP-2, KC での結果
と同様に WT は 3 h で、KO は 2 h で最大となったが産生量は WT の方が有
意に増加した。

【腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs の共培養】

in vivo での結果から、KO では腹腔常在性マクロファージによるアポトーシス細
胞除去に遅延が生じることが明らかとなった。このメカニズムを解明するために
in vitro で腹腔常在性マクロファージとアポトーシス細胞を共培養し貪食を観察し
た。Fig. 6 では共焦点レーザー顕微鏡で観察・撮影した代表的な画像を示してい
る。

Adobe Photoshop CS4 を用いて貪食率を算出したところ、WT と比較し KO
の方が有意に貪食率が低く、6 h 経過しても貪食率は WT ほど上がらなかった。
また、培養 3 h では WT はアポトーシス細胞量依存的に貪食率が上昇するのに対
し、KO では量依存的に低下しているが、理由については分かっていない (Fig. 7)。
さらに、Image J を用いて貪食能を算出すると培養 1 h では WT の方が有意に
高くなったが、6 h では KO の方が有意に高くなった。これは、WT では速やかに
アポトーシス細胞が貪食されるため、培養時間が長くなるほど貪食した細胞が消化
され値が下がるが、KO では貪食に時間がかかるため値が高くなったと考えられ
る (Fig. 8)。

次に、回収した上清中の MIP-2, KC の産生量を ELISA を用いて測定した。驚くべきことに、MIP-2 の産生が WT ではコントロールとほぼ同程度しか検出されず、産生されていないにもかかわらず、KO では培養 1 h という短時間の培養においても多量の MIP-2 の産生が確認された (Fig. 9)。KC についても KO で有意に産生量が増加した (Fig. 10)。

【IFN- γ 刺激による炎症性サイトカイン産生への影響】

他の研究報告で腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス細胞を共培養しても、IFN- γ 存在下でなければ MIP-2 は産生されないことが示されている¹⁰⁾。そこで、共培養時に IFN- γ による刺激を加えた場合どのような応答の違いがあるのかを調べた。

アポトーシス細胞と共培養する前に、腹腔常在性マクロファージを IFN- γ で 5 min, 10 min, 30 min 間刺激し、共培養を行った。共培養 1 h では WT はどの刺激時間でも MIP-2 は産生されなかった。しかし、KO ではどの刺激時間でも MIP-2 産生の有意な増加が認められた (Fig. 11A)。共培養 3 h では KO はどの刺激時間でもさらなる産生量の増加が認められた。WT は 5 min および 10 min の刺激では産生が確認されなかったが、30 min 刺激したものは産生が確認された (Fig. 11B)。共培養 6 h では、WT, KO とともにどの条件でも同程度産生され、有意な差は確認されなかった (Fig. 11C)。

一方 KC では、WT, KO 間で IFN- γ による刺激から産生されるまでの時間に違いは見られなかった。しかし、共培養 6 h 後の産生量は KO の方が有意に増加した (Fig. 12)。

さらに炎症性サイトカインである TNF- α の測定も行った。共培養 1 h, 3 h ではともに WT の方が KO よりも有意に増加し、また、どの刺激時間でも差はなかった。しかし、6 h では KO の方が有意に増加した。このことから、TNF- α の産生は WT の方が IFN- γ 刺激により即座に開始され、KO では産生開始が遅く、WT よりも長時間産生し続けることが明らかとなった (Fig. 13)。

【腹腔常在性マクロファージと LPS の共培養】

これまでに得られた結果がアポトーシス細胞特異的な応答なのかどうかを調べるため、LPS と腹腔常在性マクロファージとを共培養し炎症応答時のサイトカイン産生を比較した。

まず MIP-2 については、IFN- γ 非存在下であっても WT, KO ともに産生が確認されたが、KO は WT の倍以上の濃度が検出された。さらに IFN- γ 存在下でも KO の方が WT よりも有意に増加した。興味深いことに、IFN- γ 非存在下での KO の MIP-2 産生量と IFN- γ 存在下での WT の産生量がほぼ同じ値を示した (Fig. 14)。また、KC についても MIP-2 と同様の結果が得られた (Fig. 15)。

TNF- α では、IFN- γ 非存在下においては WT, KO 間で産生量に有意な差が見られず、IFN- γ 存在下でも WT はあまり産生量が増加しなかった。しかし、KO では、IFN- γ 存在下において有意な増加が認められた (Fig. 16)。

Discussion

in vivo の結果から KO の方が WT と比較してアポトーシス細胞が長時間残存することが明らかとなった。さらに、アポトーシス細胞が速やかに除去されないことにより、好中球のケモカインである MIP-2, KC が KO の方が早期、かつ、多量に産生されることにより好中球浸潤の有意な増加を引き起こし、炎症応答の増大を招くことが示された。*in vitro* ではマクロファージの貪食能が KO の方が低いことが示され、かつ、WT では検出されなかった MIP-2, KC が KO では高濃度で検出され、*in vivo* でのアポトーシス細胞の残存および炎症応答の増強を裏付ける結果となった。これらの結果から KO マウスでは腹腔常在性マクロファージの貪食能が低下し、アポトーシス細胞の速やかな除去が行われず、長時間アポトーシス細胞が残存し、強い炎症応答を引き起こすことが示された。

加えて、他の研究報告で、腹腔常在性マクロファージを後期アポトーシス細胞と共培養しても IFN- γ 存在下でなければ MIP-2 は産生されないことが示されている¹⁰⁾。Fig. 9 で示した *in vitro* での MIP-2 の結果では IFN- γ を加えずに共培養を行ったものであるため、WT の結果はその報告と一致する。しかし、KO では IFN- γ を加えていないにも関わらず、アポトーシス細胞の貪食に伴って MIP-2, KC が産生された。この結果は、先の報告と矛盾する。この矛盾の解釈として KO マウスの腹腔常在性マクロファージが、アポトーシス細胞投与以前に IFN- γ あるいは他の何らかの物質により刺激され前活性化状態にあるのではないかと示唆された。

そこで次に行った IFN- γ 刺激を行っての共培養では、Fig. 11 で示しているように、KO の方が IFN- γ 刺激により即座に MIP-2 が産生されたが、WT では 30 min 刺激し、3 h 培養しなければ MIP-2 は産生されなかった。

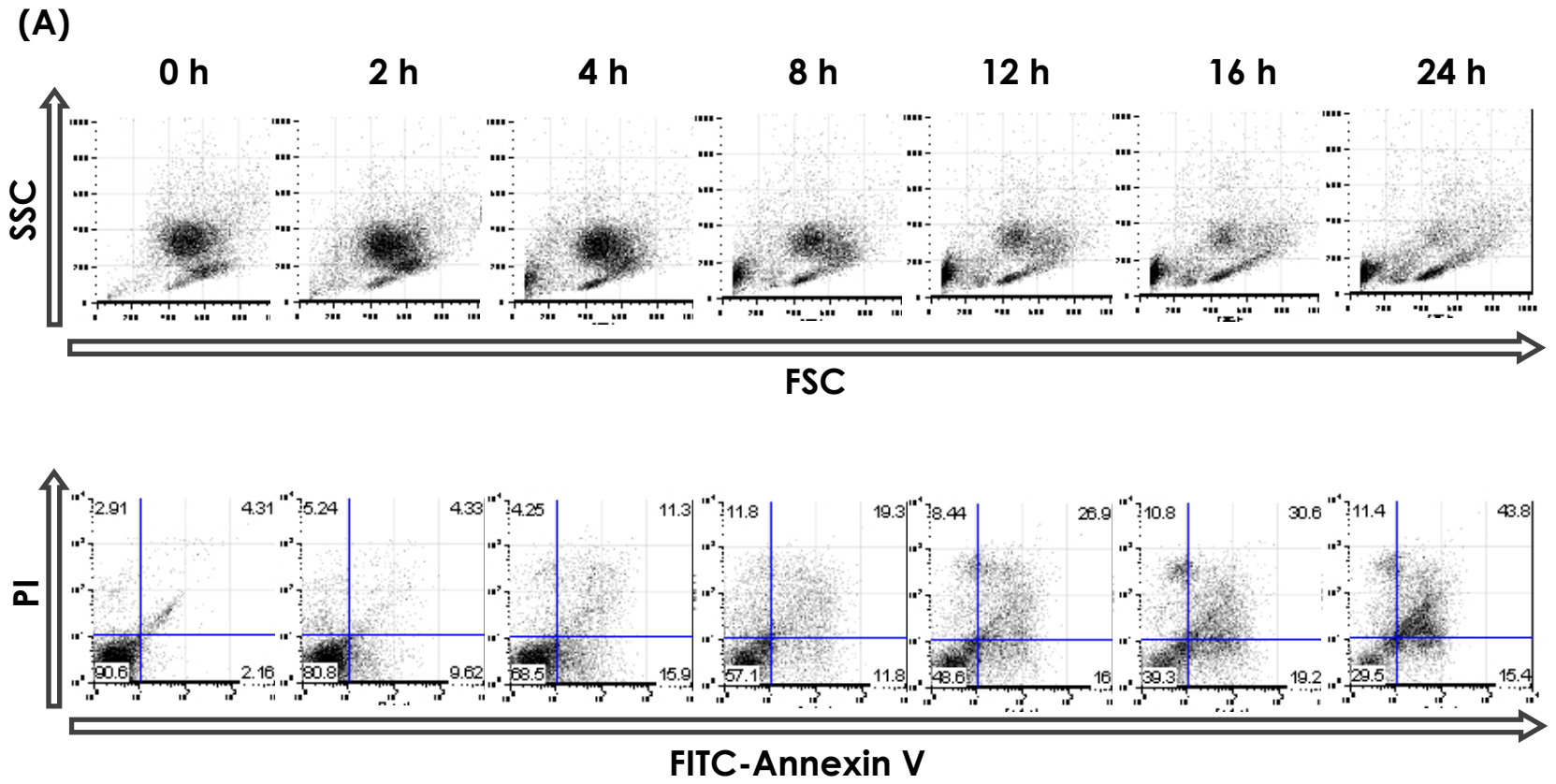
さらに LPS との共培養では、興味深いことに IFN- γ 刺激を行わなかった KO と IFN- γ 刺激を行った WT の MIP-2 産生量がほぼ同程度であり、IFN- γ 刺激を受けた KO はさらに産生量が増大することが示された。このことから KO の腹腔常在性マクロファージが前活性化状態であることが示唆された。

加えて、ヒトリウマチ患者に関する研究報告の中で、リウマチ患者の単球が IFN 暴露を受けて前活性化状態にあり、さらなる IFN 暴露により炎症応答が増大されていることが示された。この報告の中で筆者らは、調査したリウマチ患者が全員年配の方で、対照として調べた健常者が全員若い方だったことから、この IFN 暴露による炎症応答の増大は老化によって引き起こされている可能性もある、と述べている¹¹⁾。つまり我々の研究で得られた結果は、この仮説を支持するものであり、老化により多発する免疫系障害の原因メカニズムの一つであると考えられる。

今後は、IFN 誘導性遺伝子の発現解析やアポトーシス細胞の取り込みに関連するシグナル経路の解析などが課題となる。

一方、アポトーシス細胞の貪食能低下については、また別の研究報告で PKC が活性化し、局在が変化することが貪食に必要であることが示されている¹⁶⁾。今後、KO の腹腔常在性マクロファージの PKC 活性に着目し貪食能低下のメカニズムの解明を目指す。

Figure



(B)

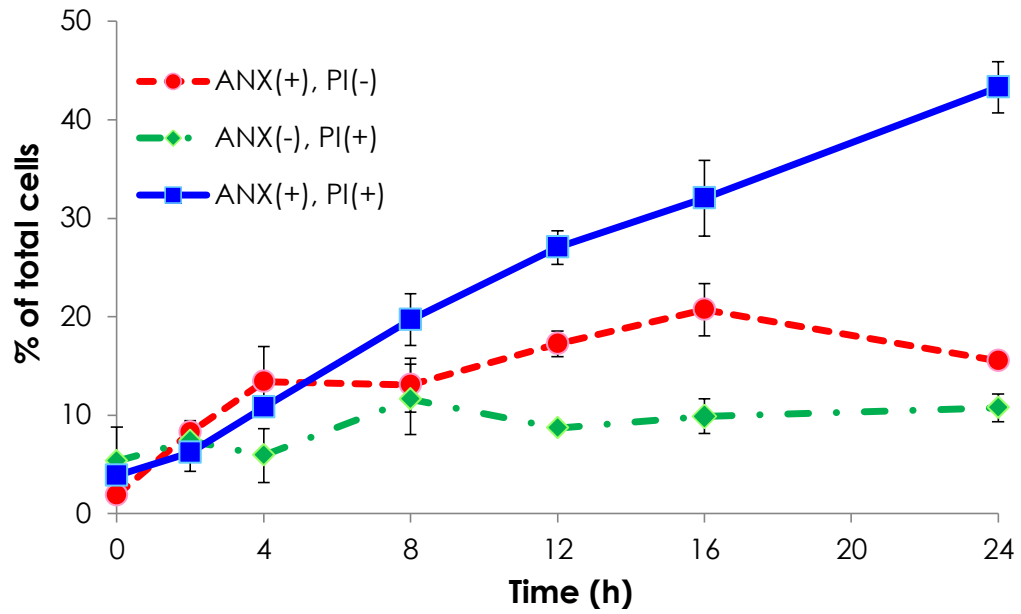


Fig. 1 TG 誘導腹腔浸出好中球培養時の経時変化

WT マウス腹腔へ TG 2 ml を投与し、6 h 後に回収した腹腔浸出好中球を 37℃ で培養した。経時的に回収し、FITC-Annexin V, PI で染色後、フローサイトメーターで解析した。

(A) 各時間における代表的なフローサイトメーターでの解析画像

(B) FITC-Annexin V と PI で染色される細胞の割合の経時変化

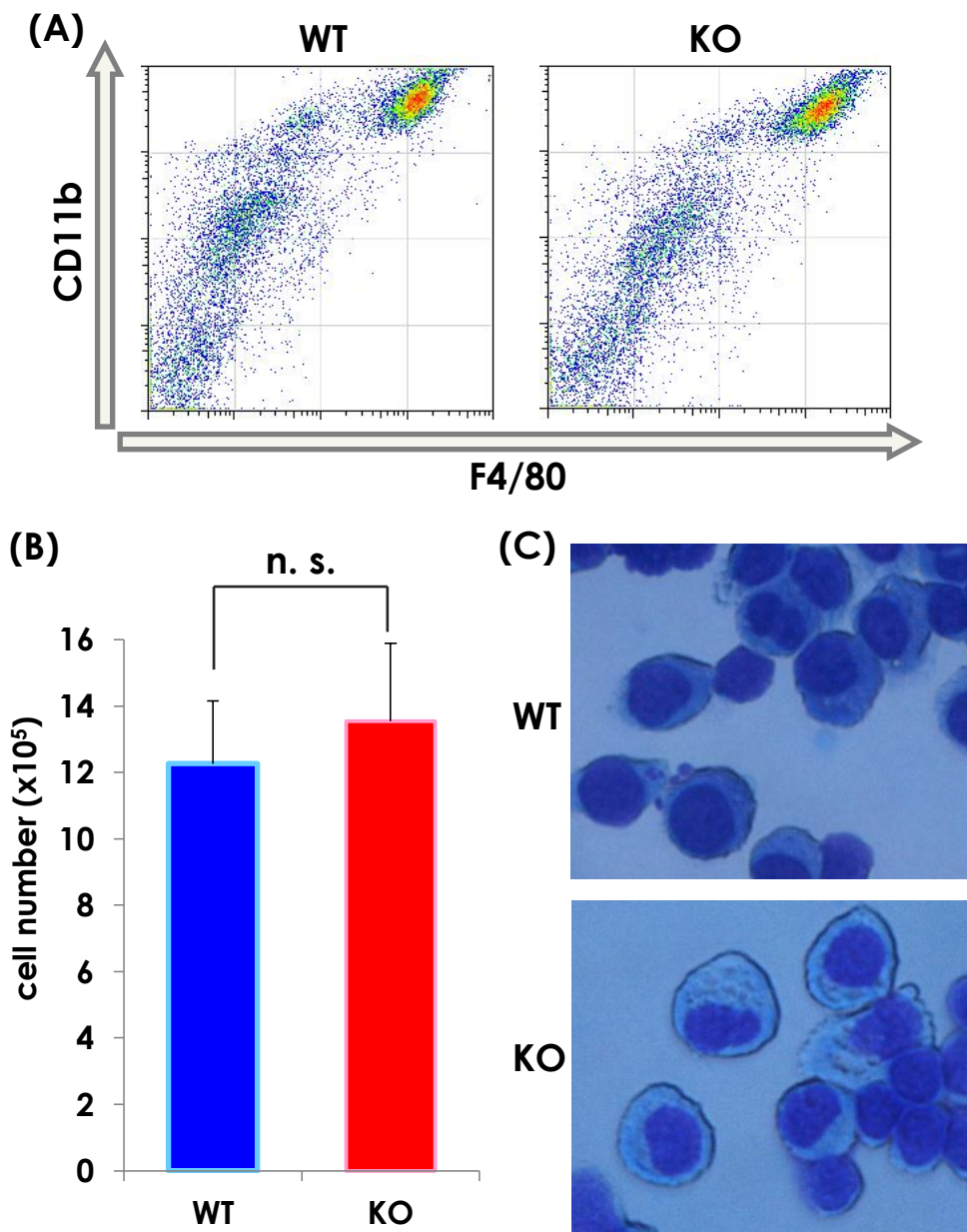


Fig. 2 WT, KO マウス腹腔常在性マクロファージ

WT, KO マウスそれぞれから PECs を回収し、解析行った。

(A) PECs をフローサイトメーターでの解析画像。F4/80^{high}CD11b^{high} がマクロファージを示す。

(B) マウス 1 匹当たりの腹腔常在性マクロファージ数。

(C) 腹腔常在性マクロファージをサイトスピンし、ディフクイック染色を行い顕微鏡で観察した画像。

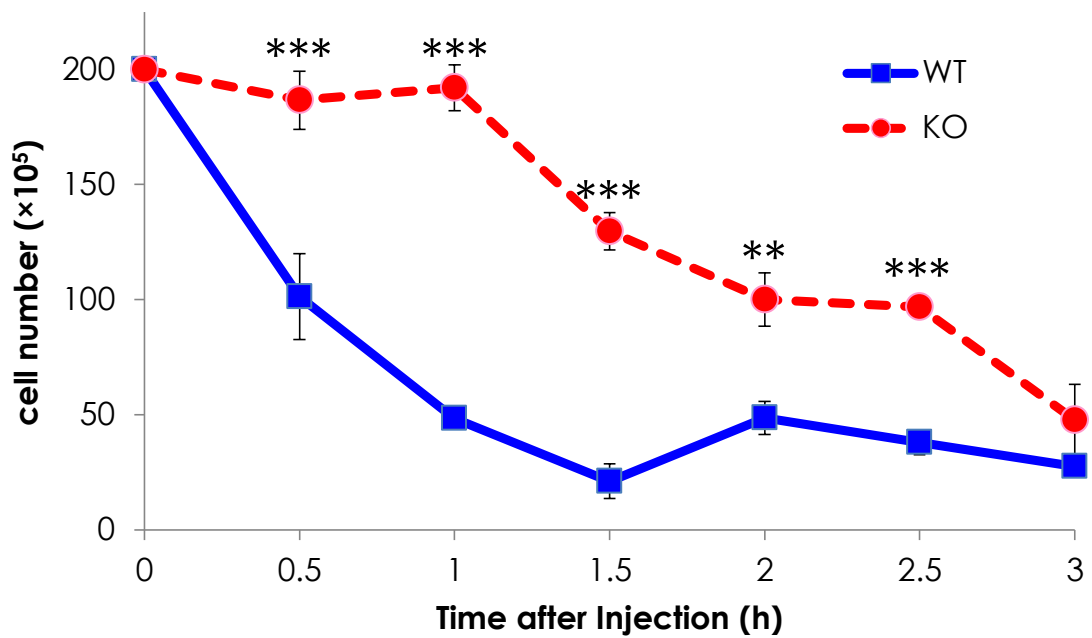
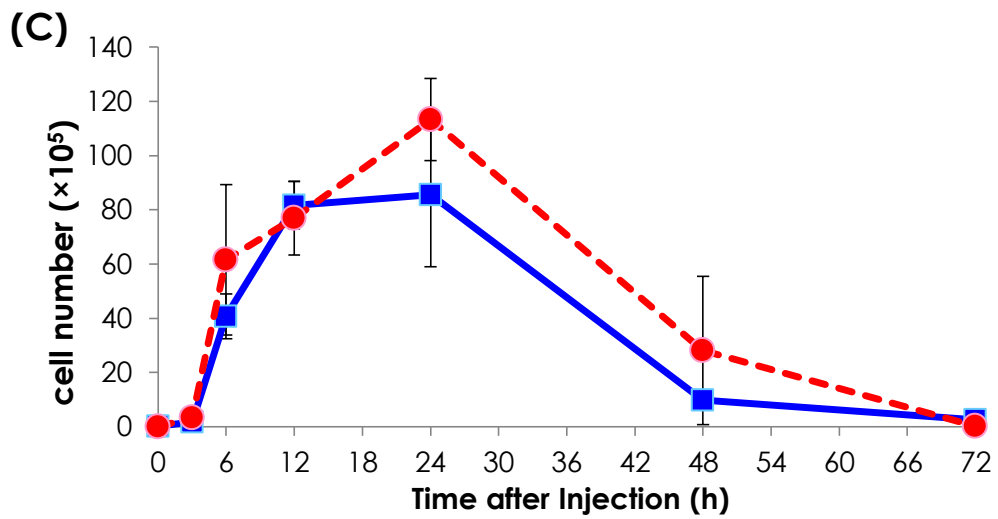
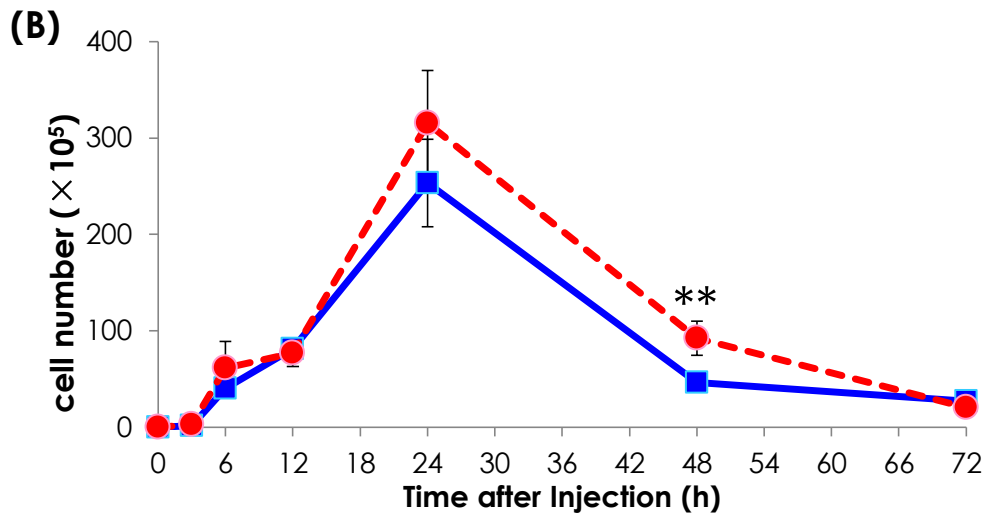
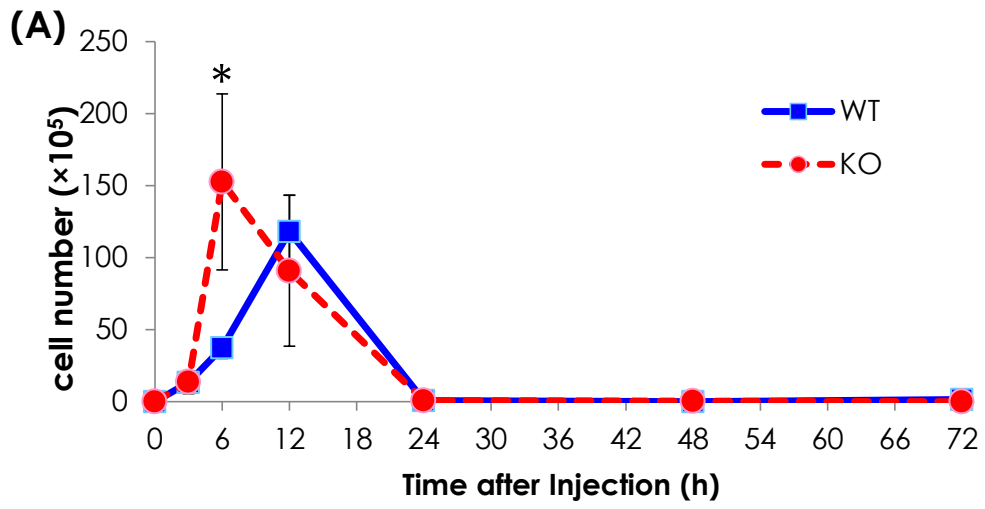


Fig. 3 残存アポトーシス細胞の経時的変化

PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を 2.0×10^7 cells 投与し、経時的に回収した PECs 中のアポトーシス細胞残存量をフローサイトメーターで経時的に測定した。

means \pm standard errors, n=3-4

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001 versus WT



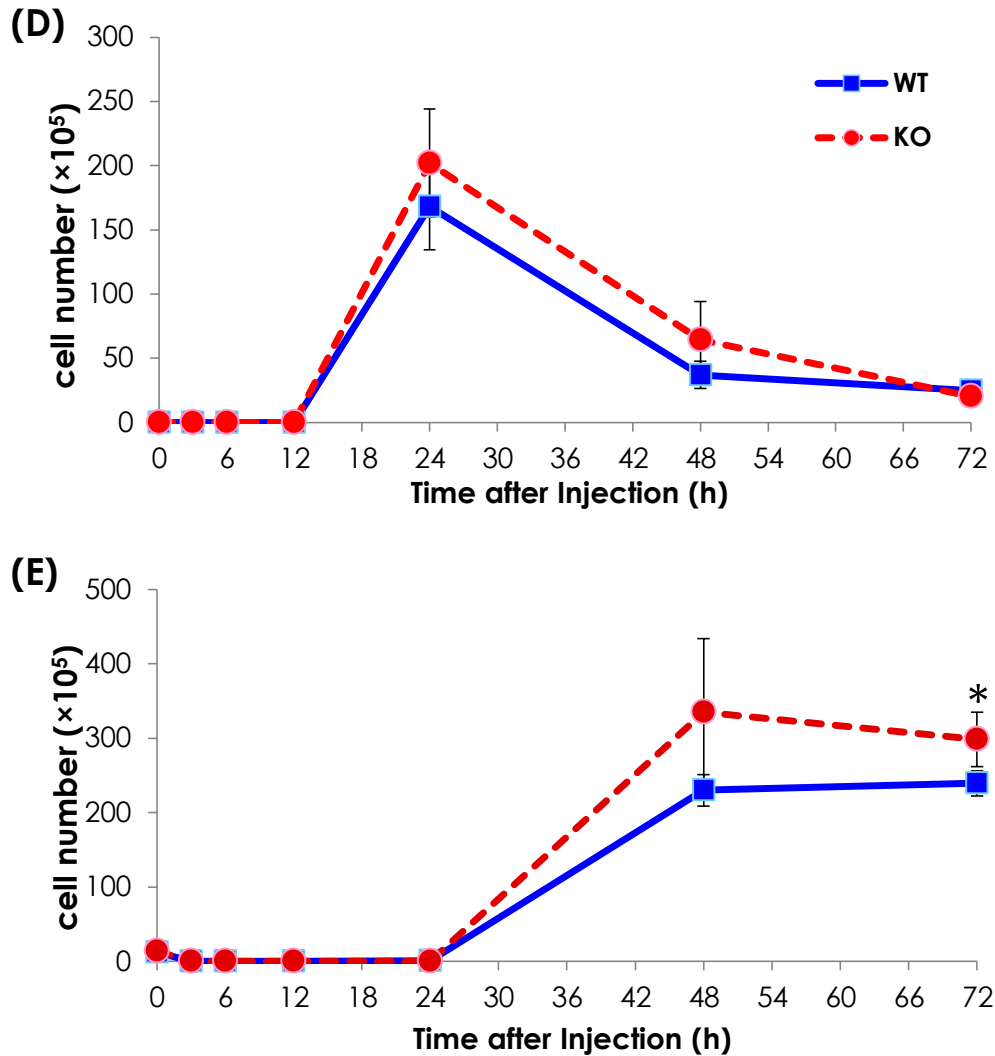


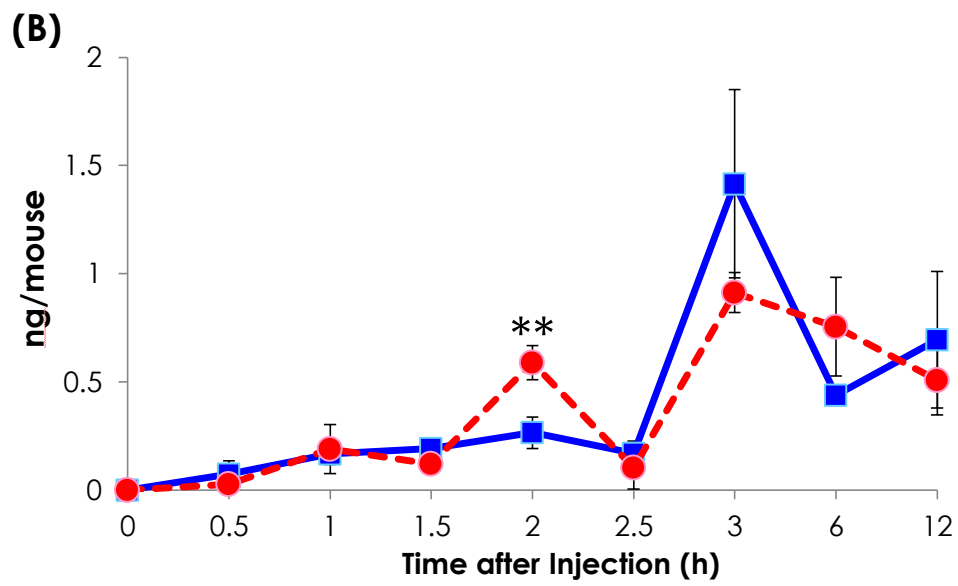
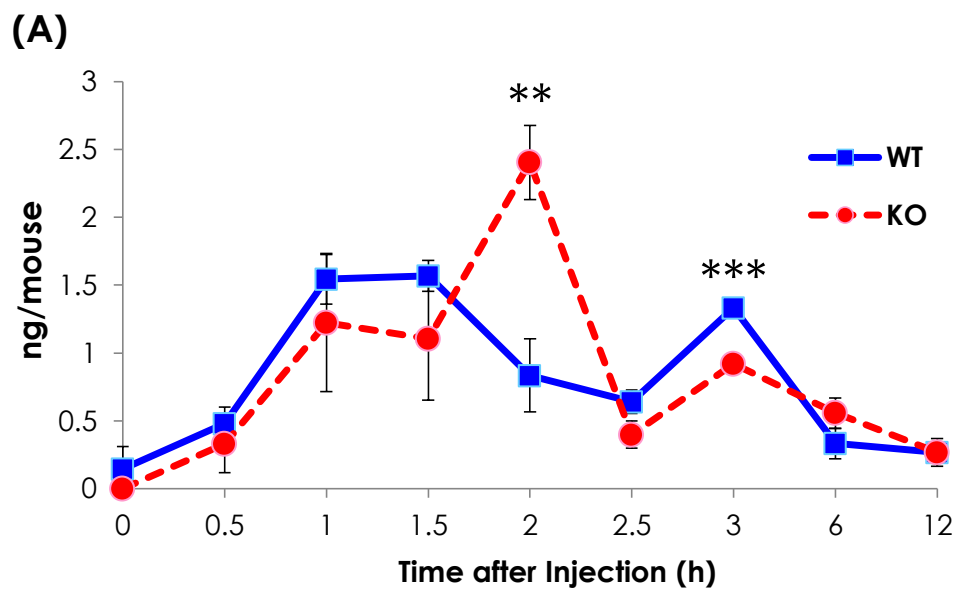
Fig. 4 後期アポトーシス PMNs 投与による腹腔浸出細胞の経時的変化

PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を 2.0×10^7 cells 投与し、経時的に回収した PECs をフローサイトメーターで解析した。

(A) は好中球 ($Gr-1^{high} CD11b^{int}$), (B) は単球 ($Gr-1^{int}$ or $- CD11b^{int}$), (C) は単球の中で $Gr-1^{int}$ となる細胞、(D) は単球の中で $Gr-1^{-}$ となる細胞、(E) はマクロファージ ($F4/80^{high} CD11b^{high}$) を示す。

means \pm standard errors, $n=3-4$

*, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ versus WT



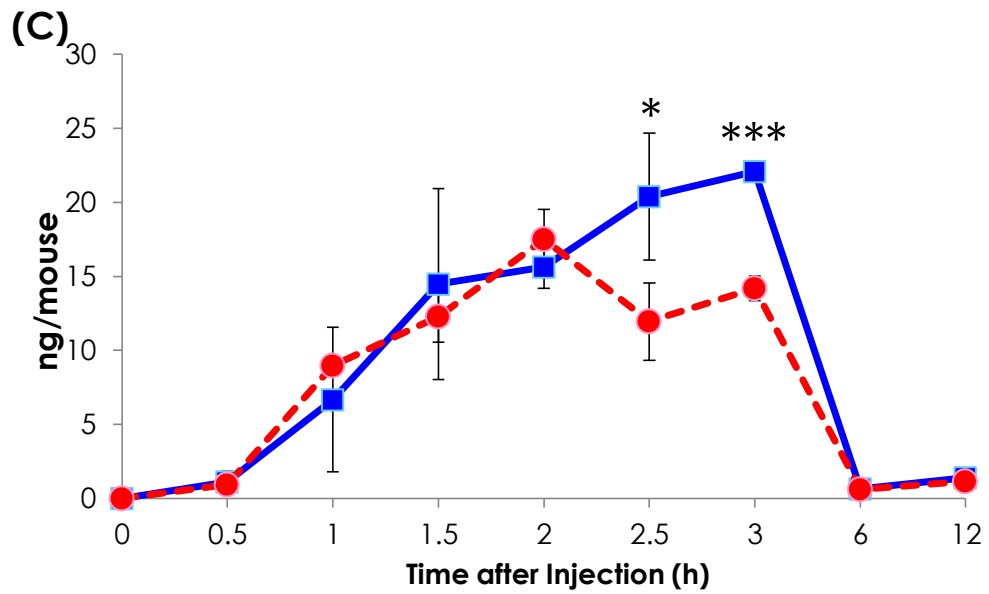


Fig. 5 後期アポトーシス PMNs 投与による腹腔浸出液中のケモカイン濃度の経時的変化

PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を 2.0×10^7 cells 投与し、経時的に回収した腹腔浸出液中のケモカイン濃度を ELISA で測定した。

(A) は MIP-2, (B) は KC, (C) は MCP-1 を示す。

means \pm standard errors, n=3-4

*, $p < 0.05$ **, $p < 0.01$ ***, $p < 0.001$ versus WT

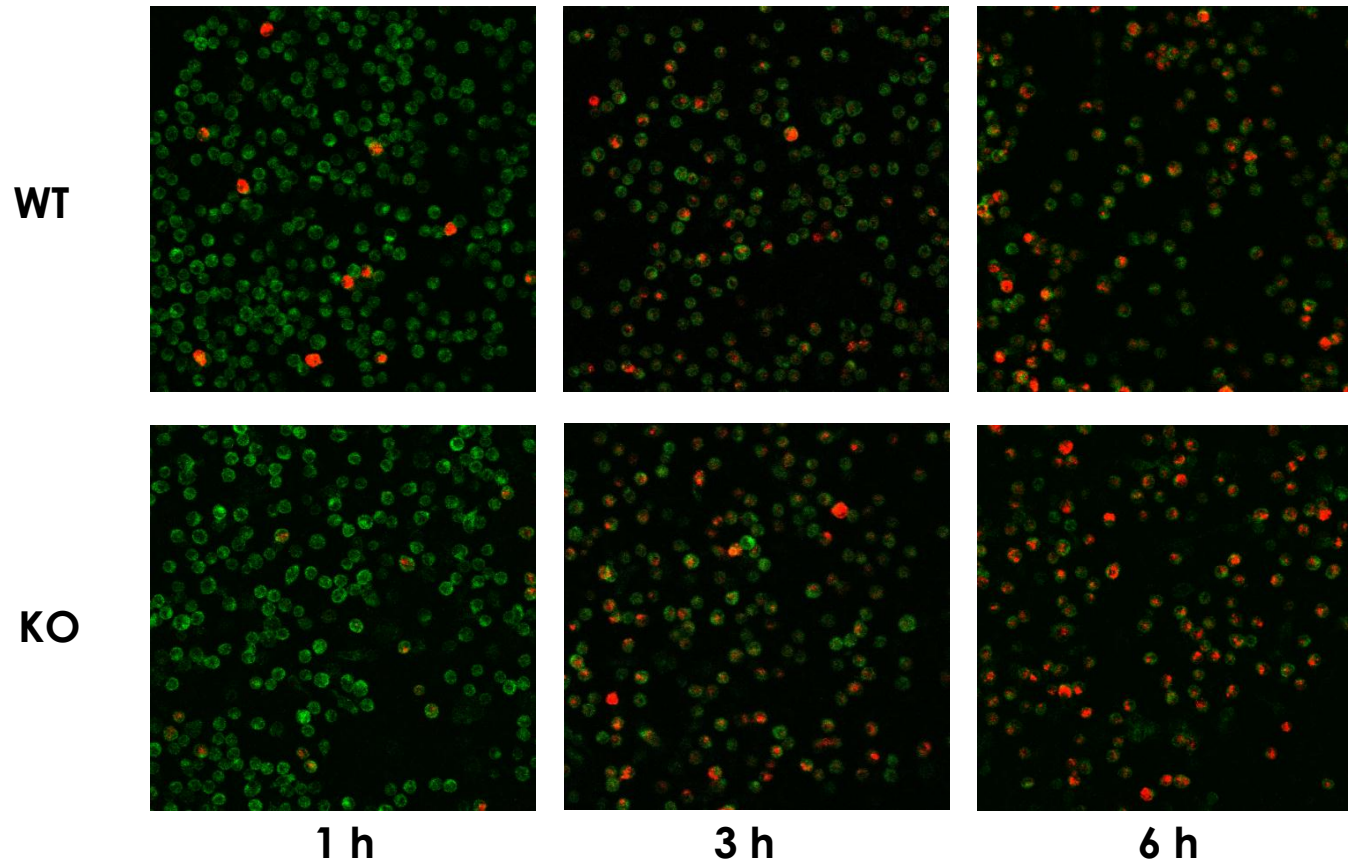
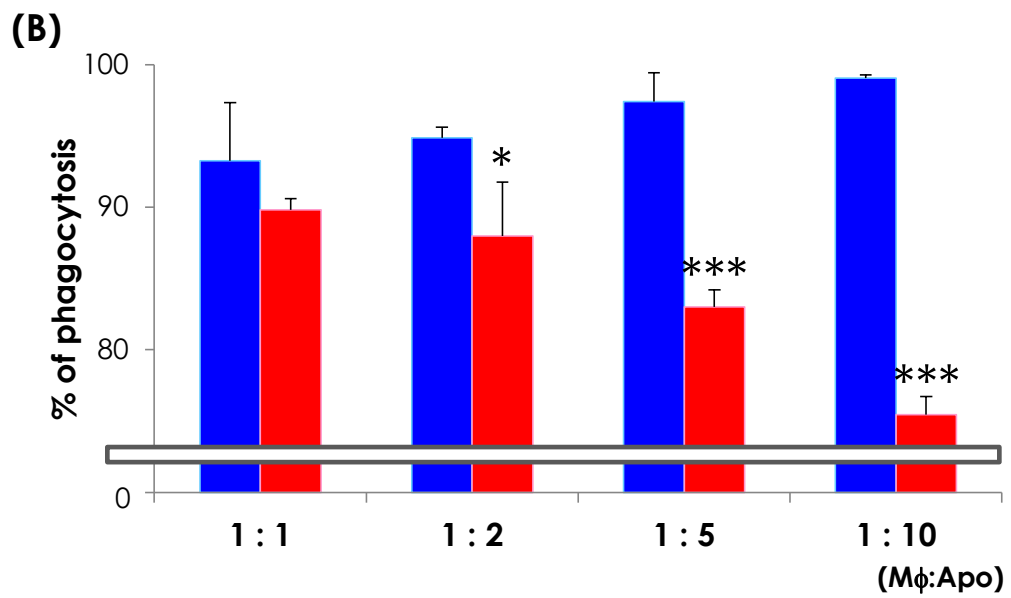
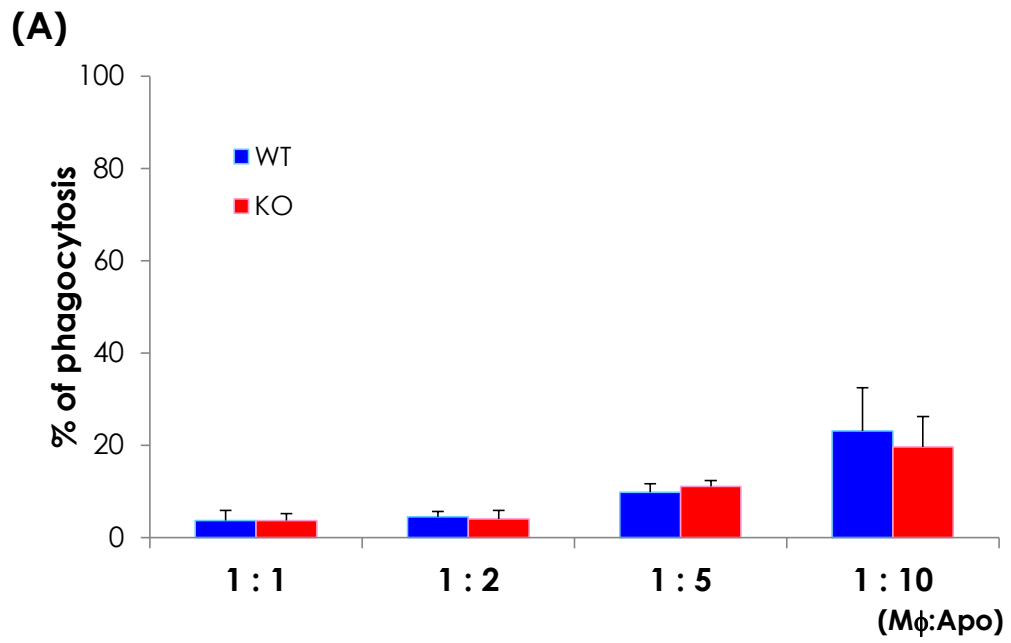


Fig. 6 腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時

FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色した腹腔常在性マクロファージと PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を共培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。Mφs : Apoptosis cells を 1 : 2 で共培養した時の代表的な画像を示した。



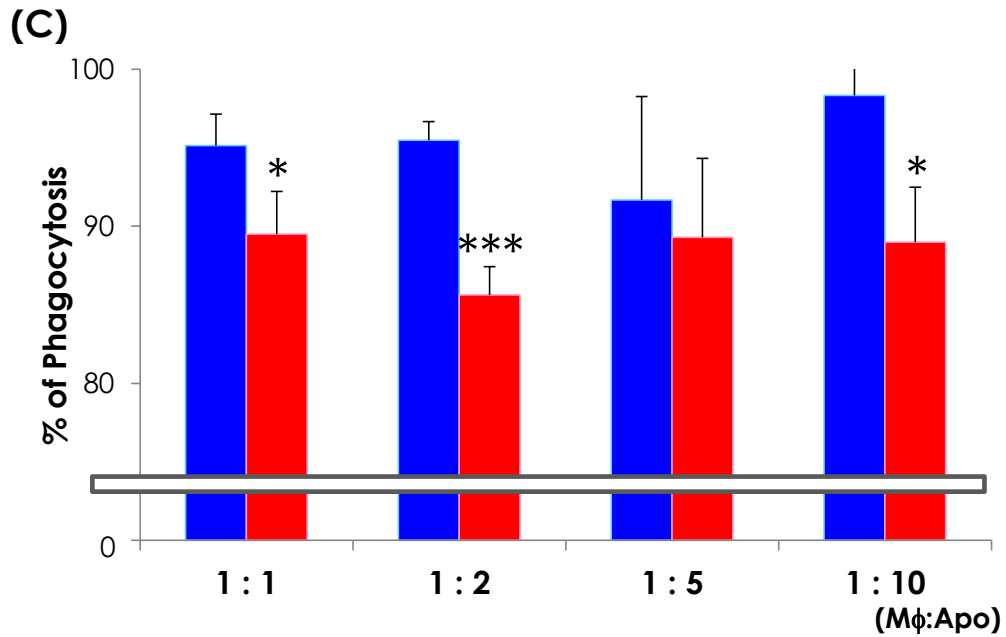


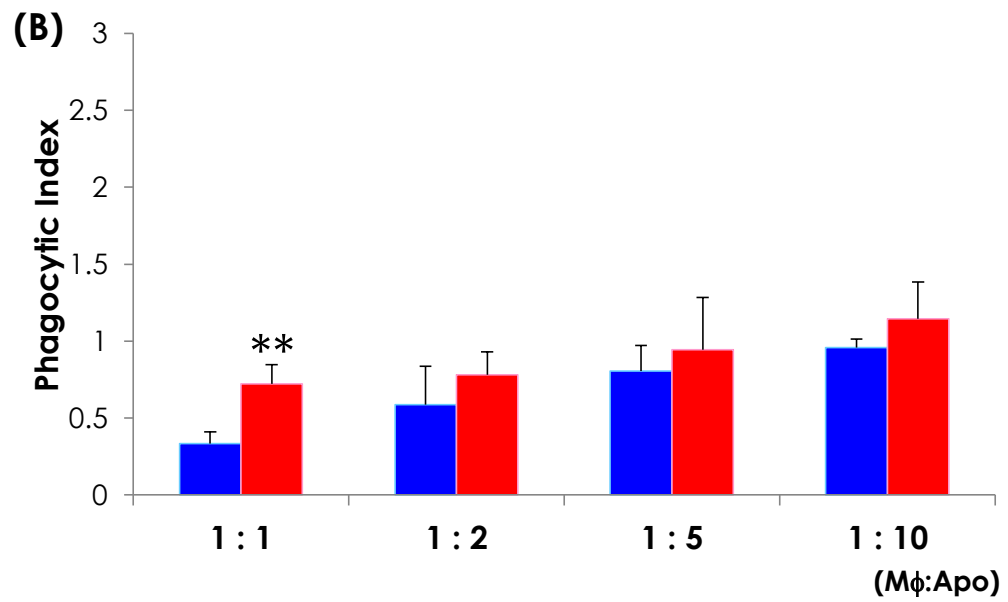
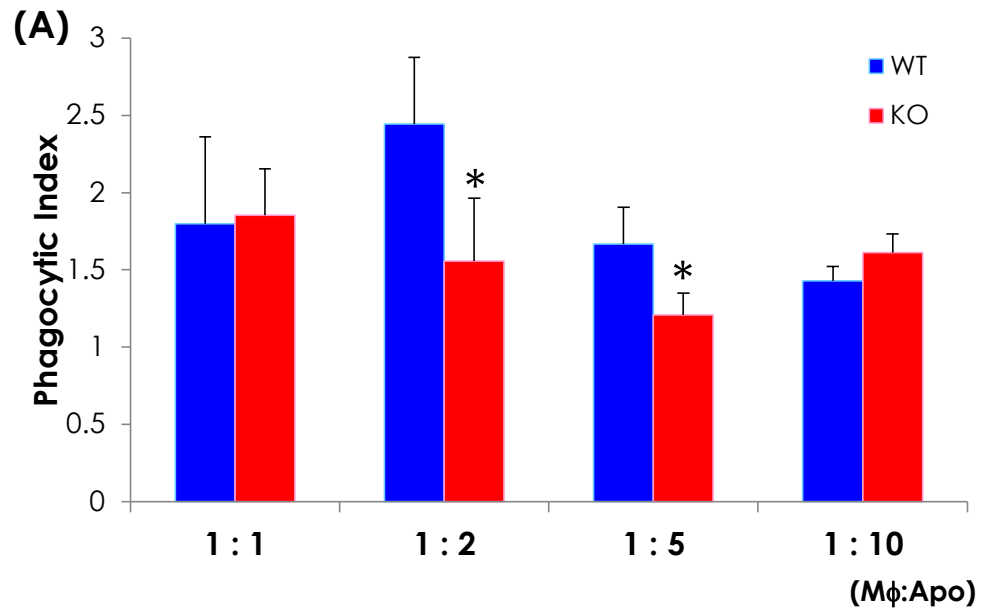
Fig. 7 腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の貪食率

FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色した腹腔常在性マクロファージと PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を共培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。取得した画像を Adobe Photoshop CS4 を用いて解析した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間における貪食率を示す。Fig. 中の横軸は Mφs : Apoptosis cells の比率を示す。

means ± standard errors, n=3

*, p<0.05 ** , p<0.01 *** , p<0.001 versus WT



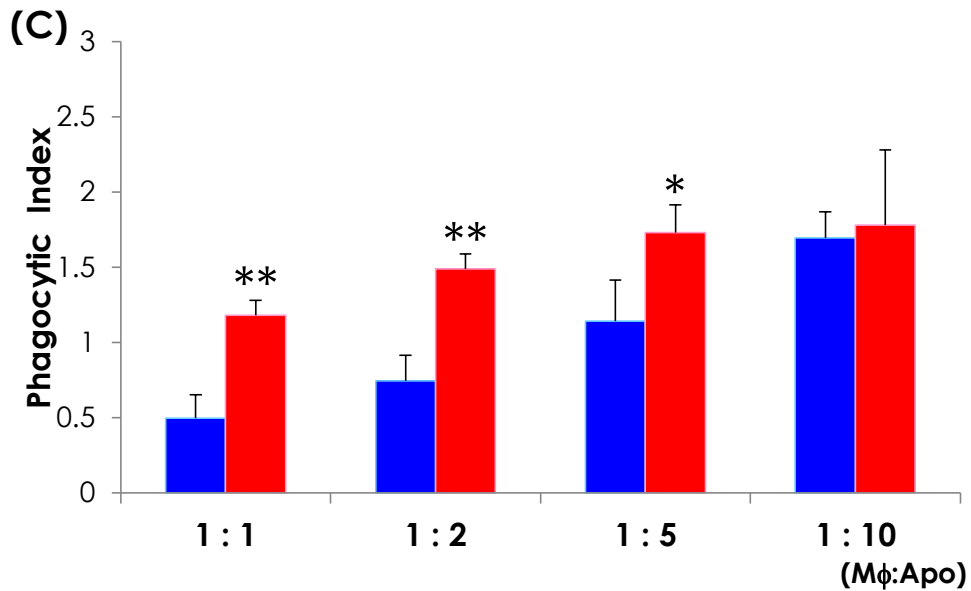


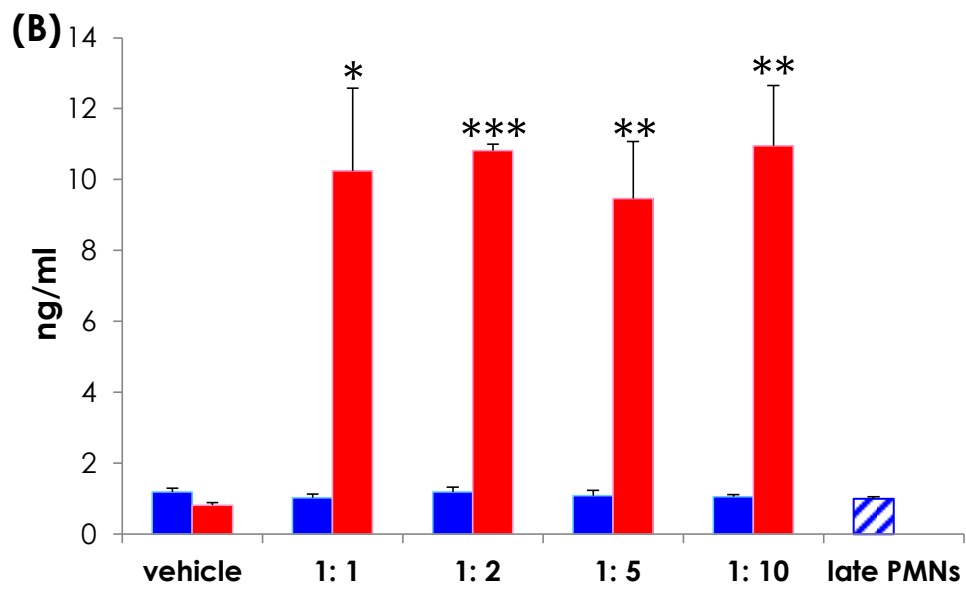
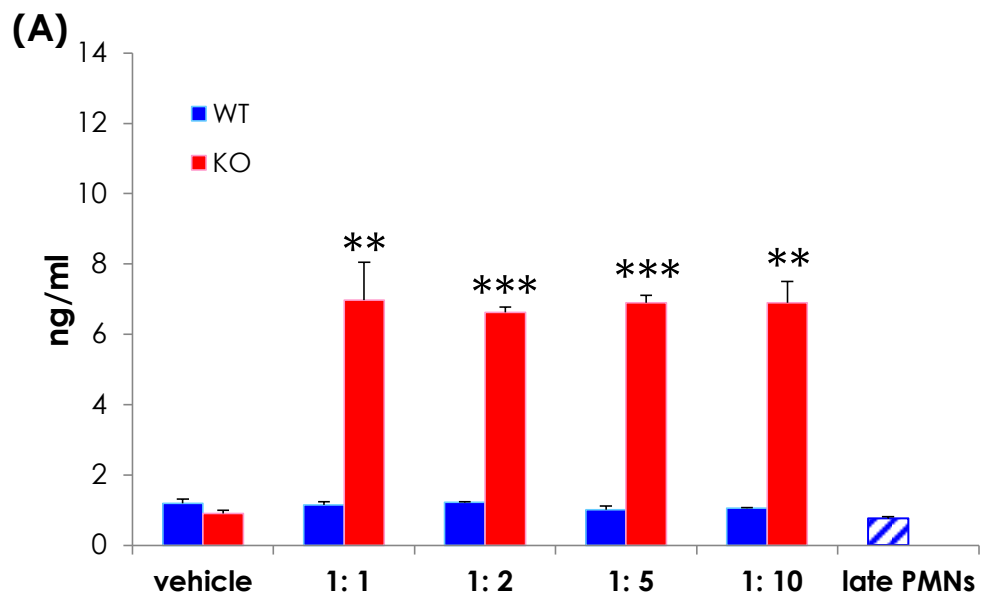
Fig. 8 腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の貪食能

FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色した腹腔常在性マクロファージと PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を共培養し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。取得した画像を Adobe Photoshop CS4, Image J を用いて解析した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間における貪食能を示す。Fig. 中の横軸は Mφs : Apoptosis cells の比率を示す。

means ± standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001 versus WT



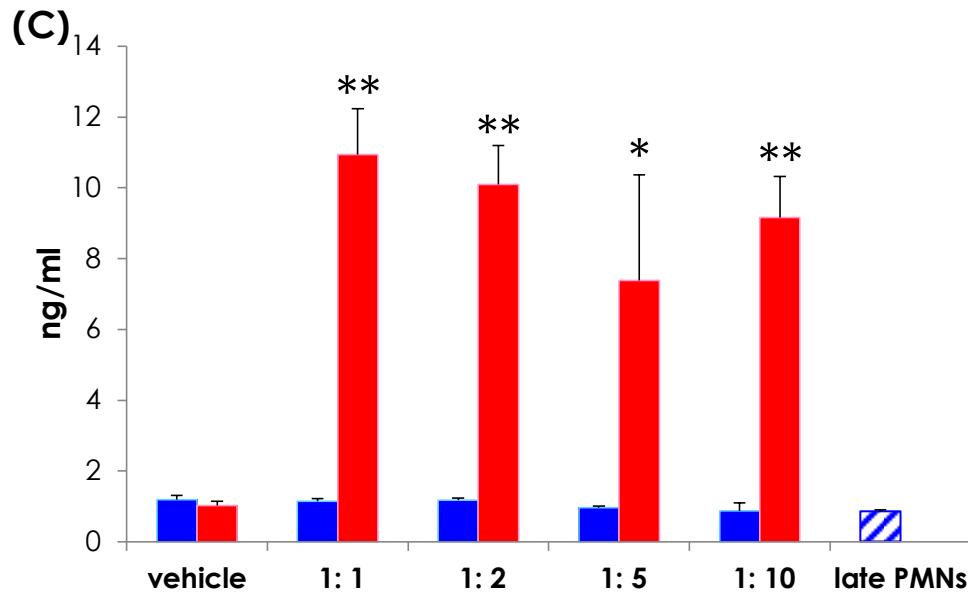
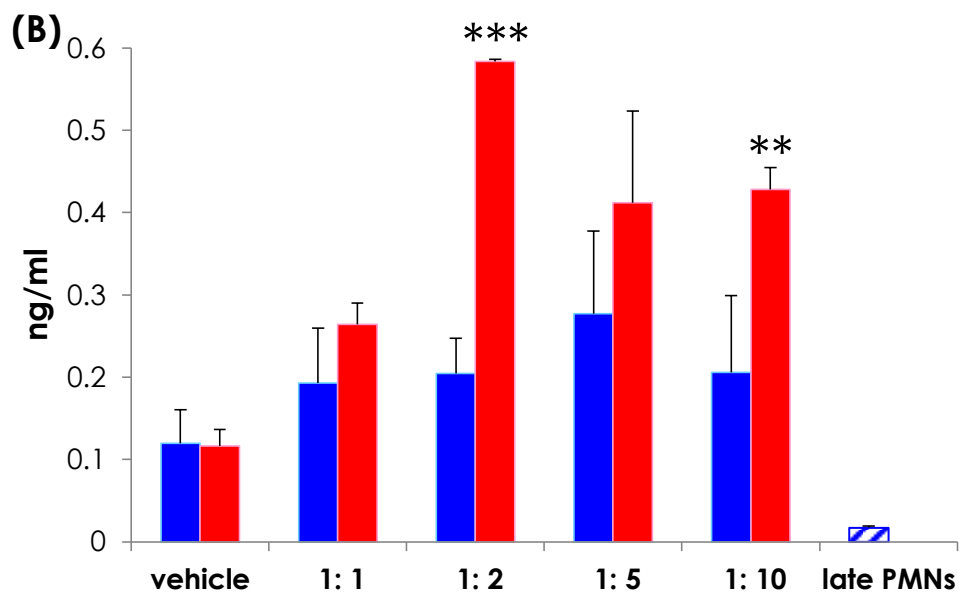
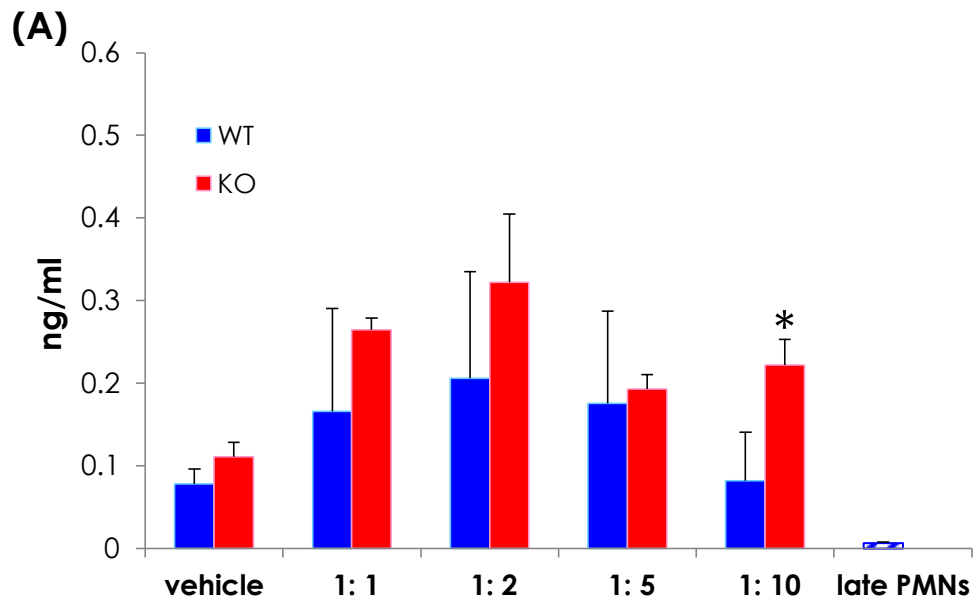


Fig. 9 腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の MIP-2 産生量

FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色した腹腔常在性マクロファージと PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を共培養し、経時的に回収した上清中の MIP-2 量を ELISA で測定した。(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001 versus WT



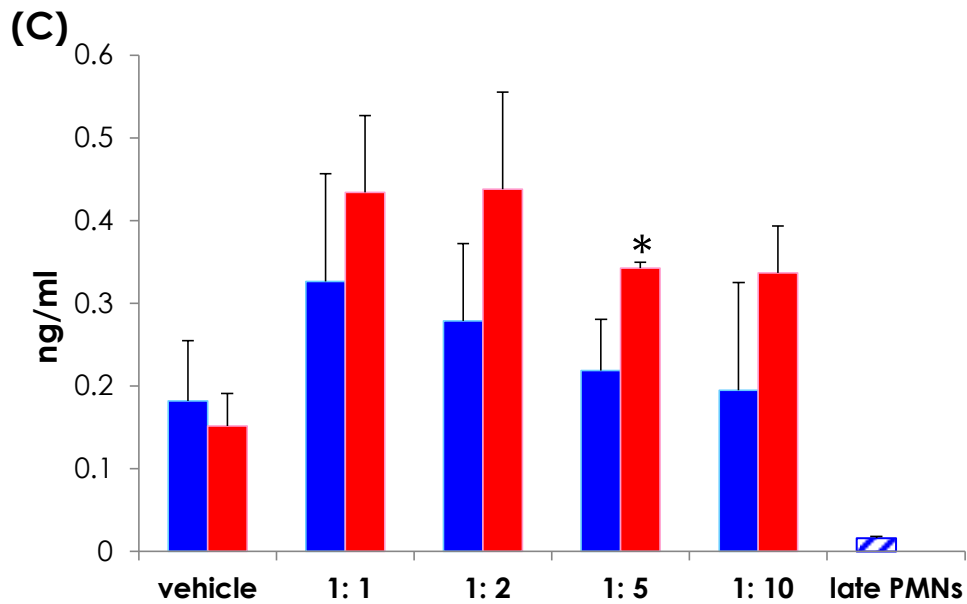
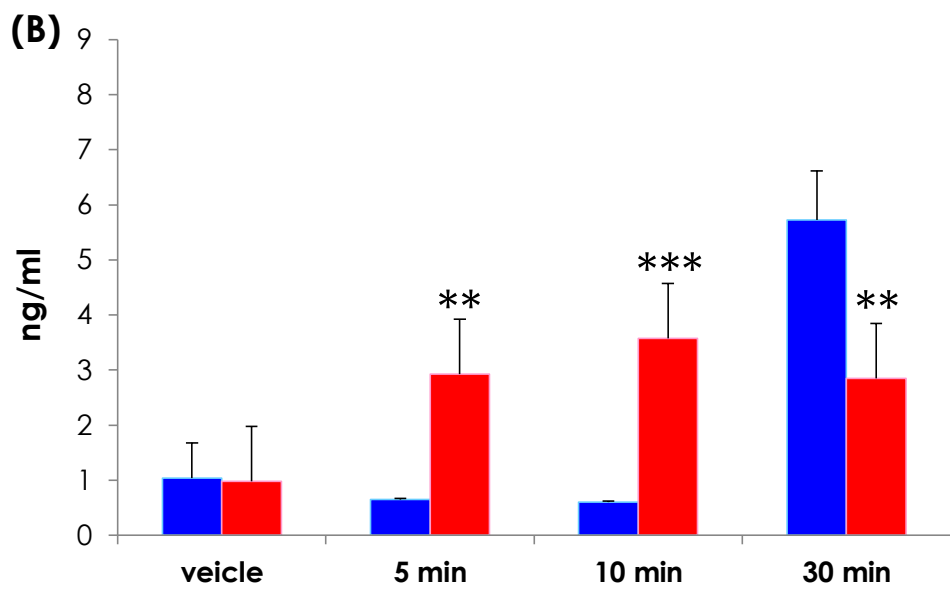
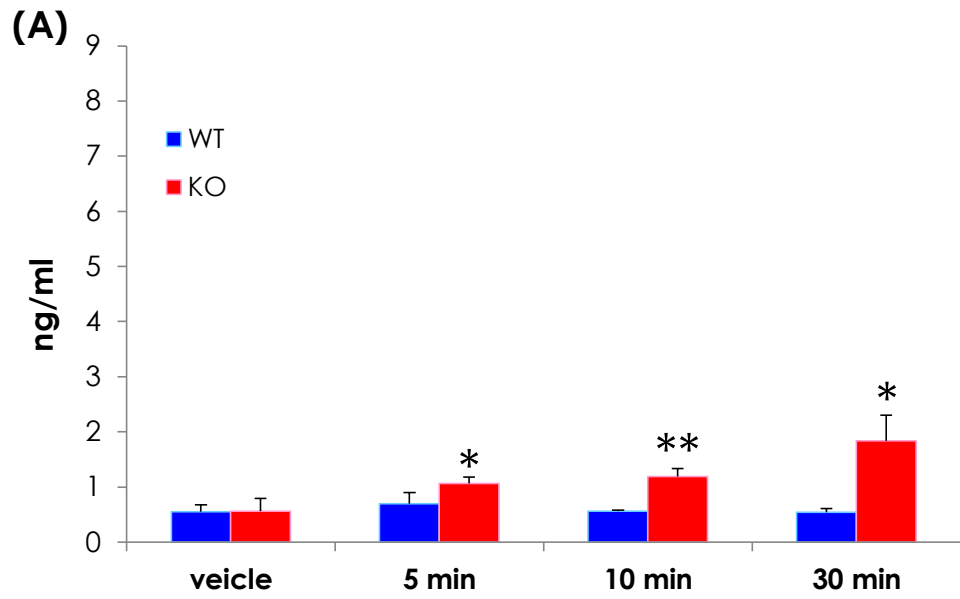


Fig. 10 腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の KC 産生量

FITC-conjugated rat anti mouse F4/80 antibody で染色した腹腔常在性マクロファージと PKH26 RED で染色した後期アポトーシス PMNs を共培養し、経時的に回収した上清中の KC 量を ELISA で測定した。(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001 versus WT



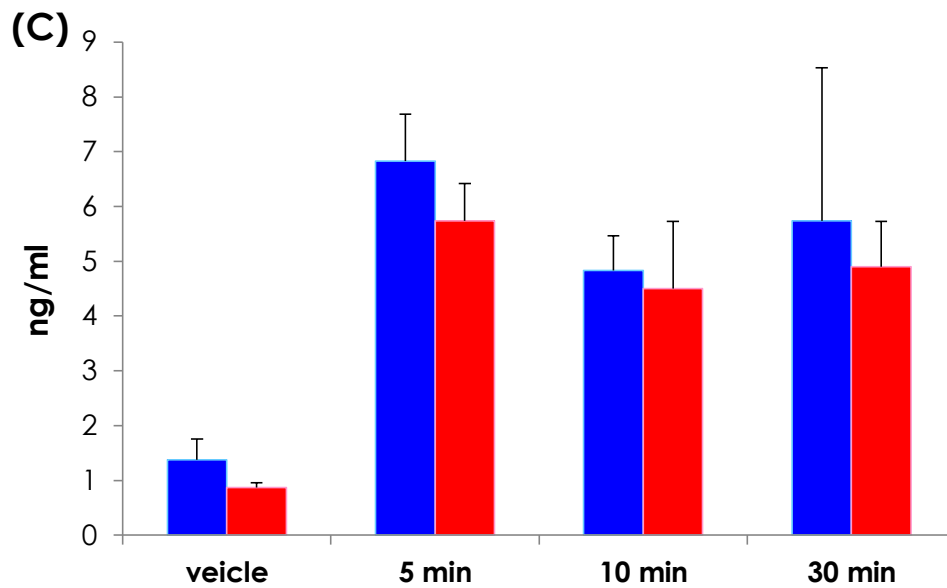


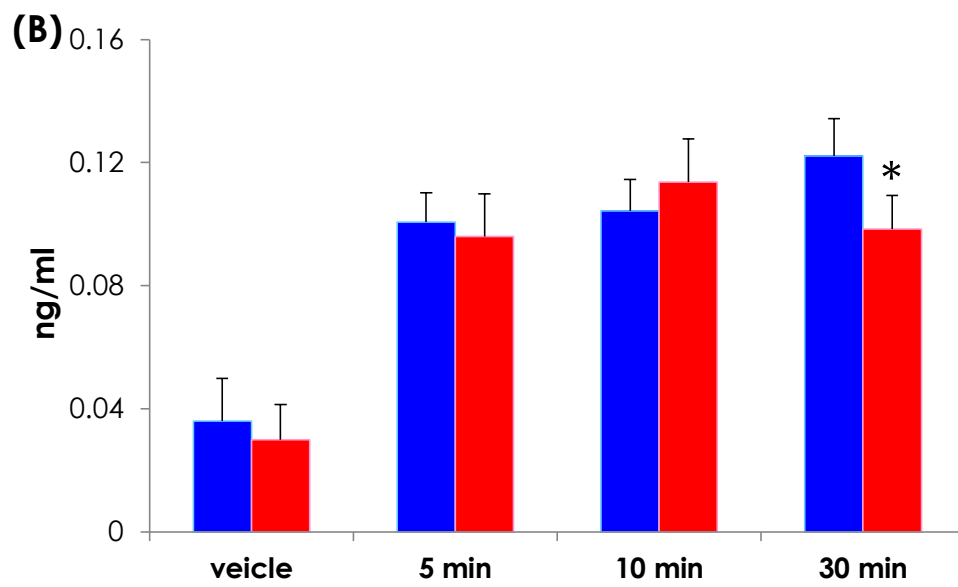
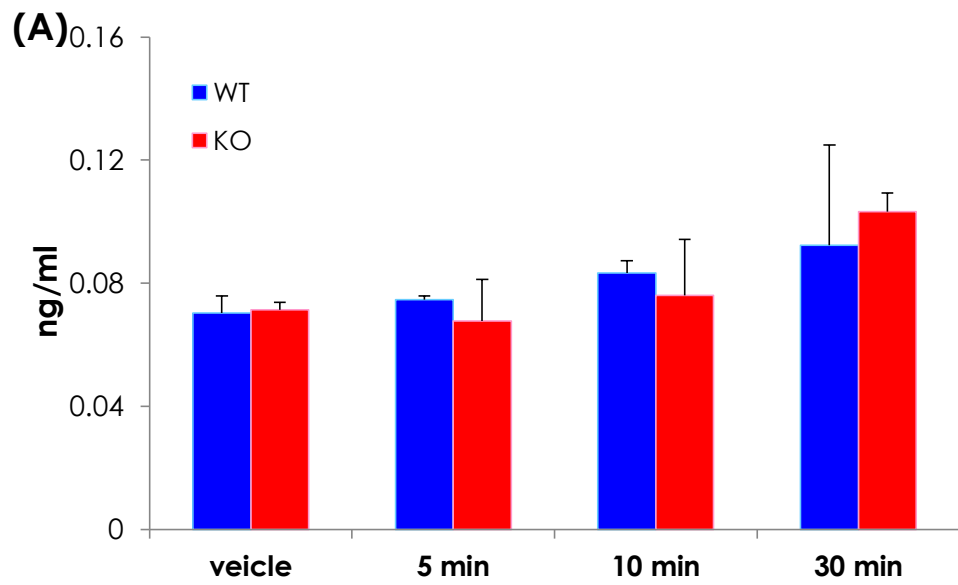
Fig. 11 IFN- γ 処理による腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の MIP-2 産生量の変化

IFN- γ による処理を、5 min, 10 min, 30 min 行った腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs を M ϕ s : Apoptosis cells を 1 : 2 の比率で共培養し、経時的に回収した上清中の MIP-2 量を ELISA で測定した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 ***, p<0.001 versus WT



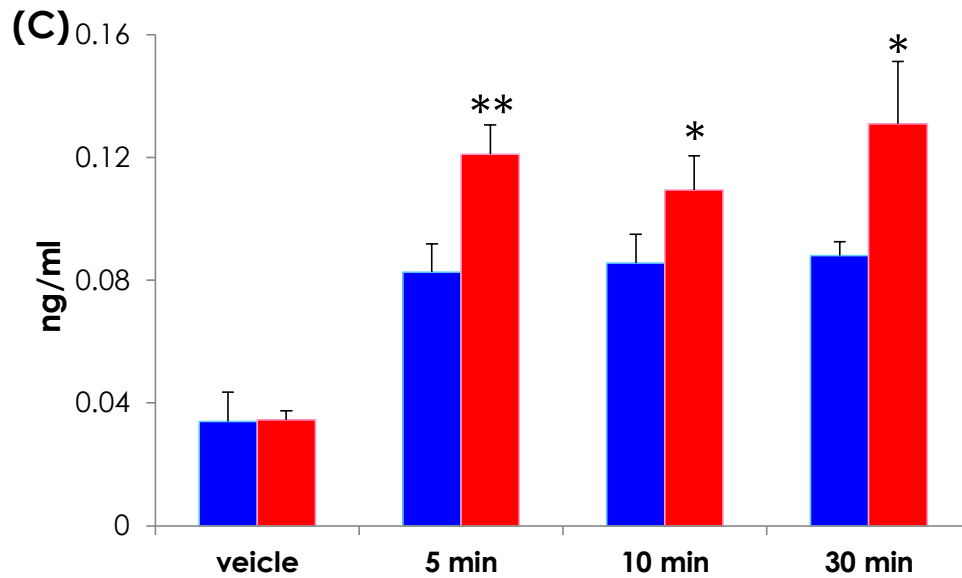


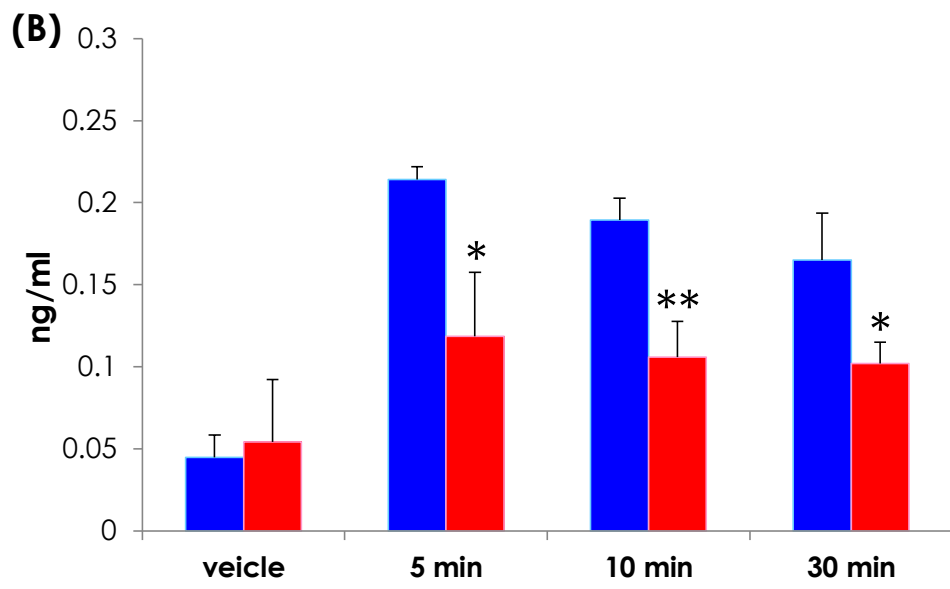
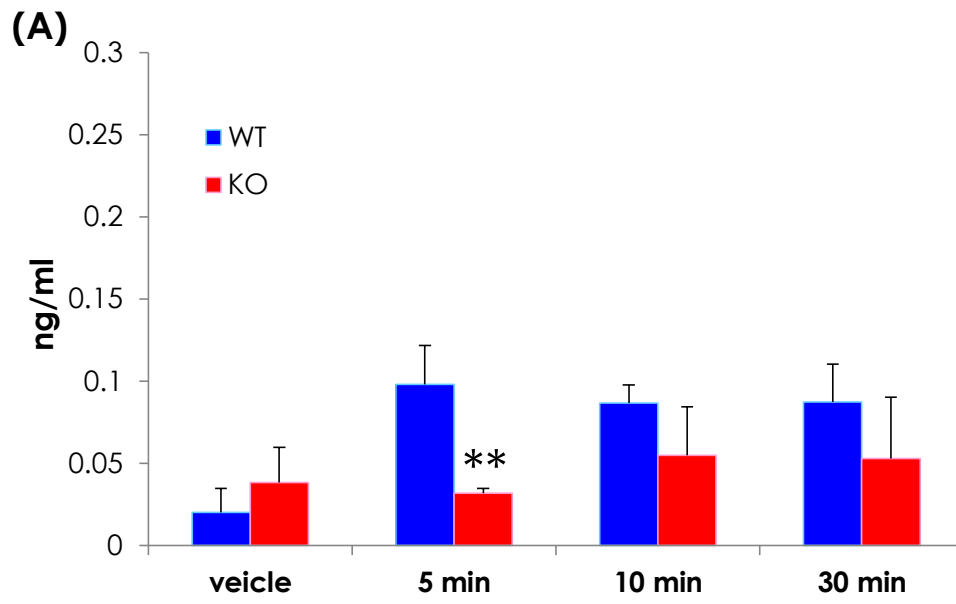
Fig. 12 IFN- γ 処理による腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の KC 産生量の変化

IFN- γ による処理を、5 min, 10 min, 30 min 行った腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs を M ϕ s : Apoptosis cells を 1 : 2 の比率で共培養し、経時的に回収した上清中の KC 量を ELISA で測定した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001 versus WT



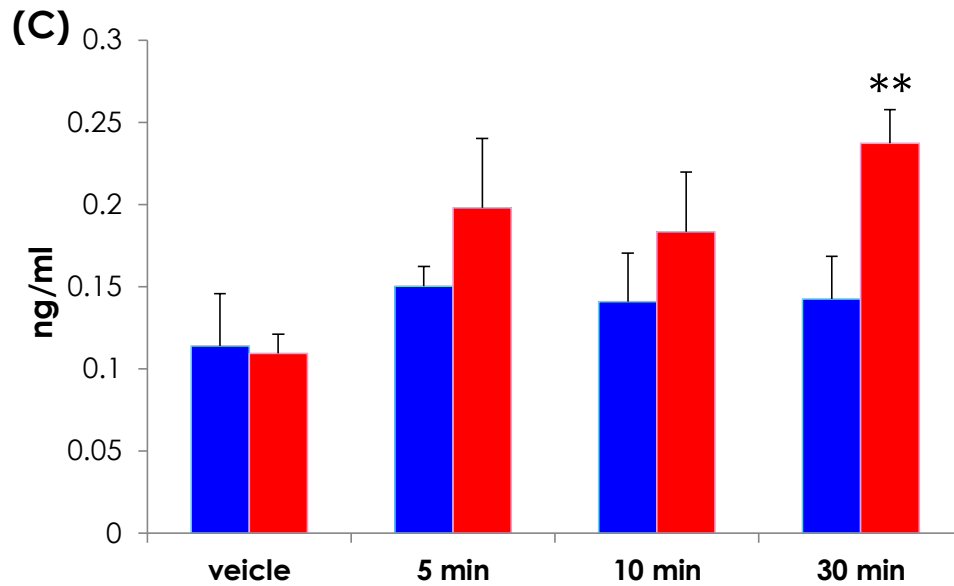


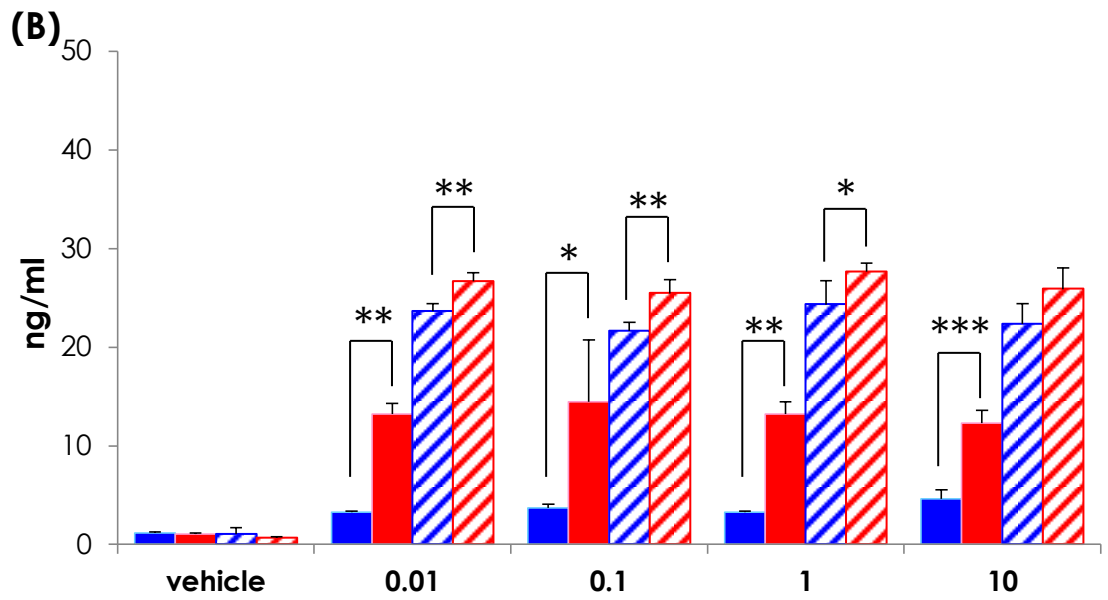
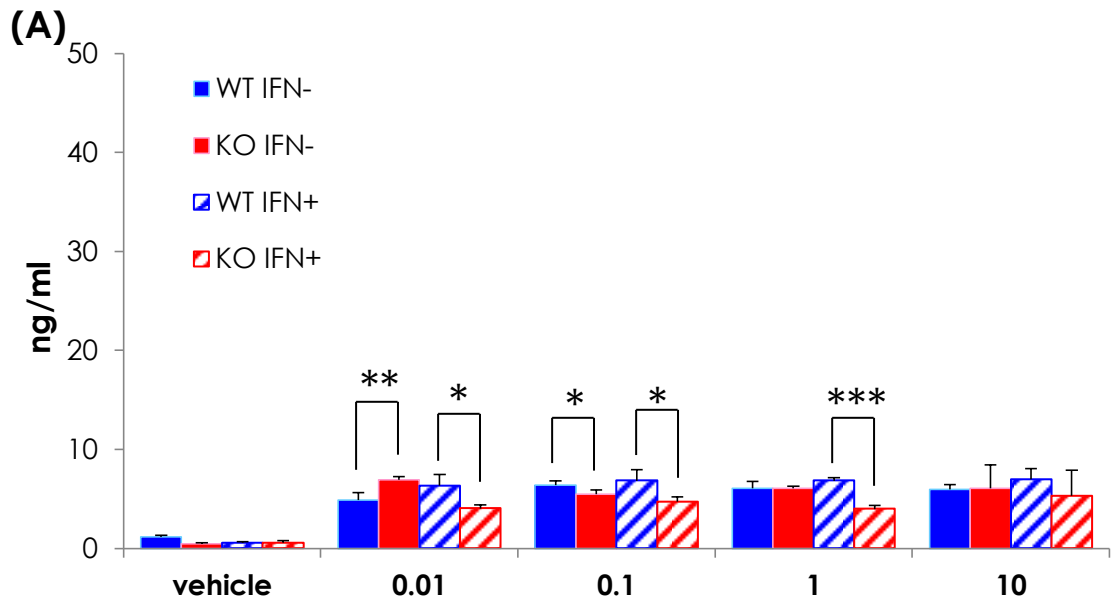
Fig. 13 IFN- γ 処理による腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs 共培養時の TNF- α 産生量の変化

IFN- γ による処理を、5 min, 10 min, 30 min 行った腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス PMNs を M ϕ s : Apoptosis cells を 1 : 2 の比率で共培養し、経時的に回収した上清中の TNF- α 量を ELISA で測定した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001 versus WT



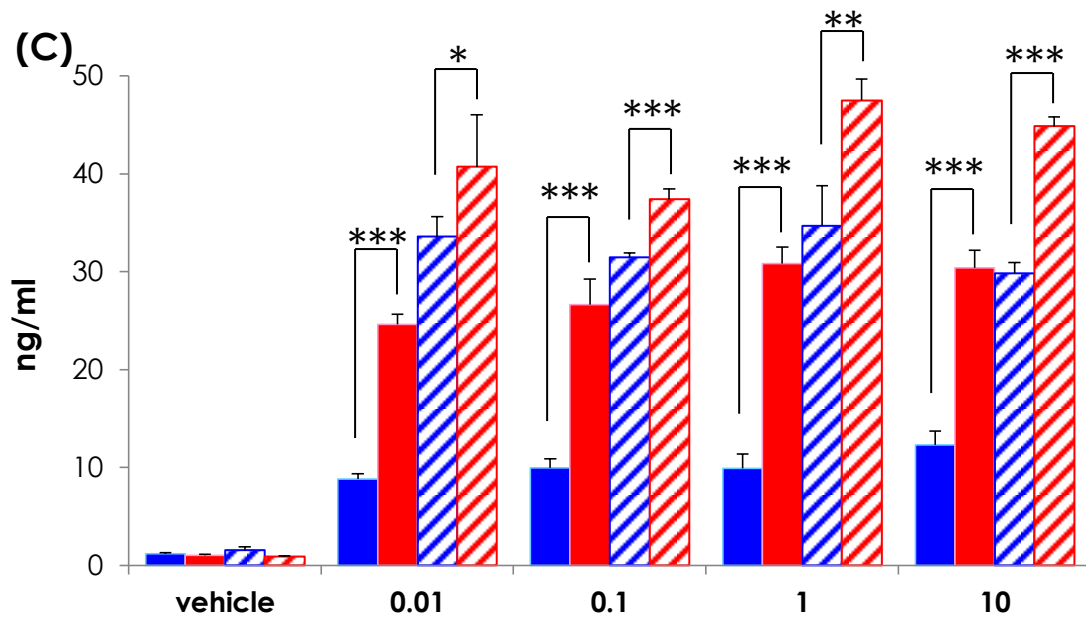


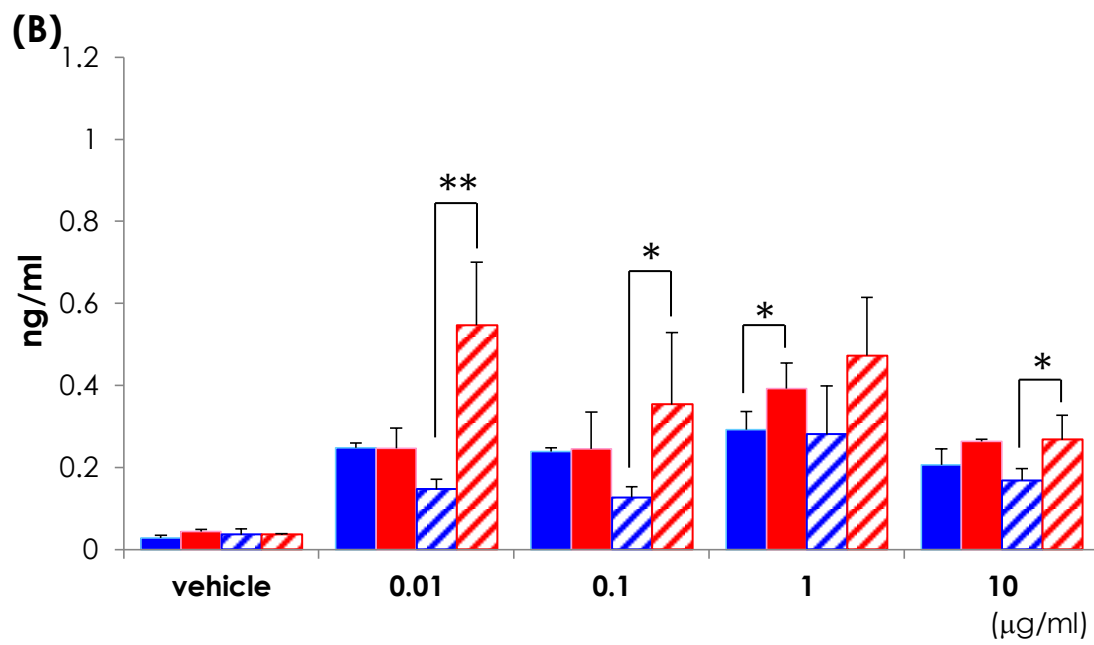
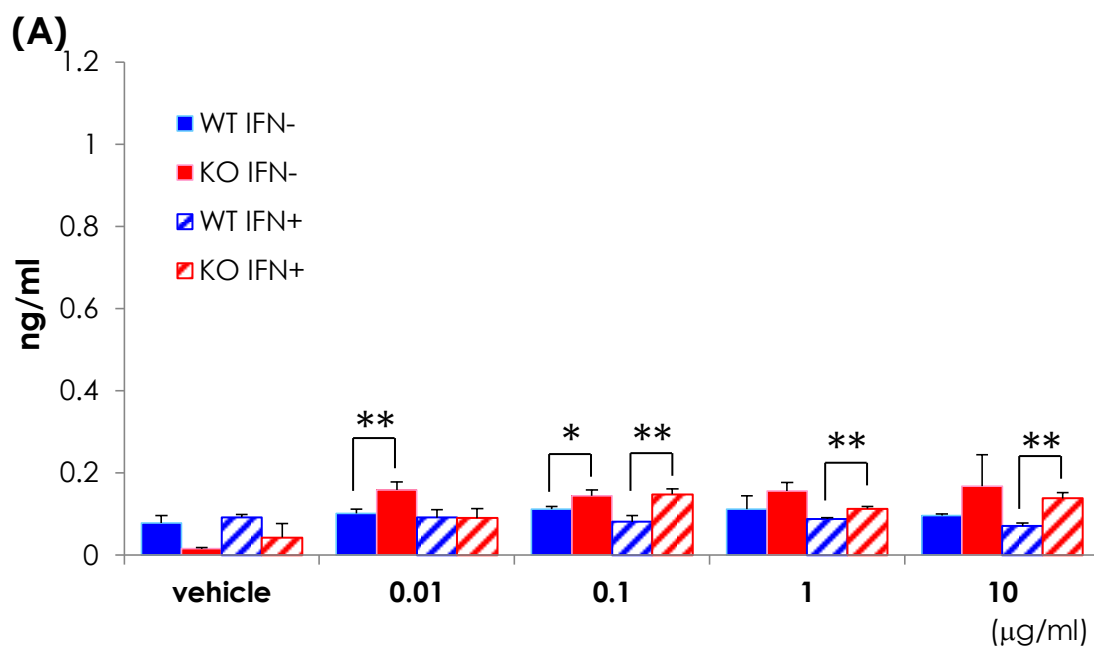
Fig. 14 腹腔常在性マクロファージと LPS 共培養時の MIP-2 産生量の変化

IFN- γ 腹腔常在性マクロファージと LPS を IFN- γ を含む、あるいは含まない 7% FCS-RPMI で共培養し、経時的に回収した上清中の MIP-2 量を ELISA で測定した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 ** , p<0.01 *** , p<0.001



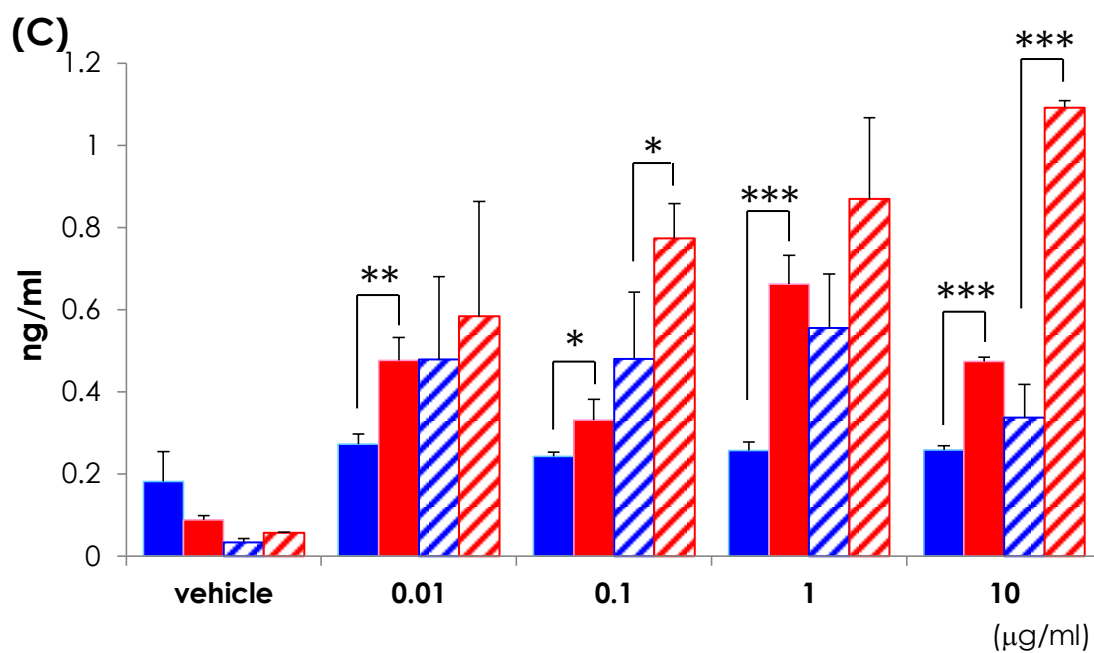
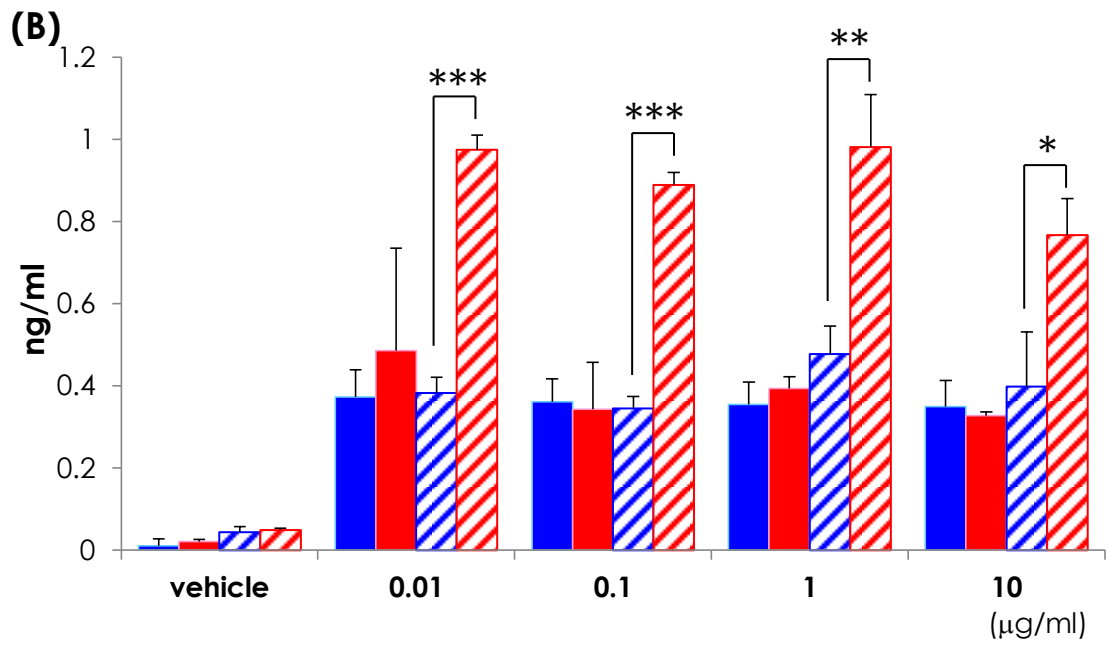
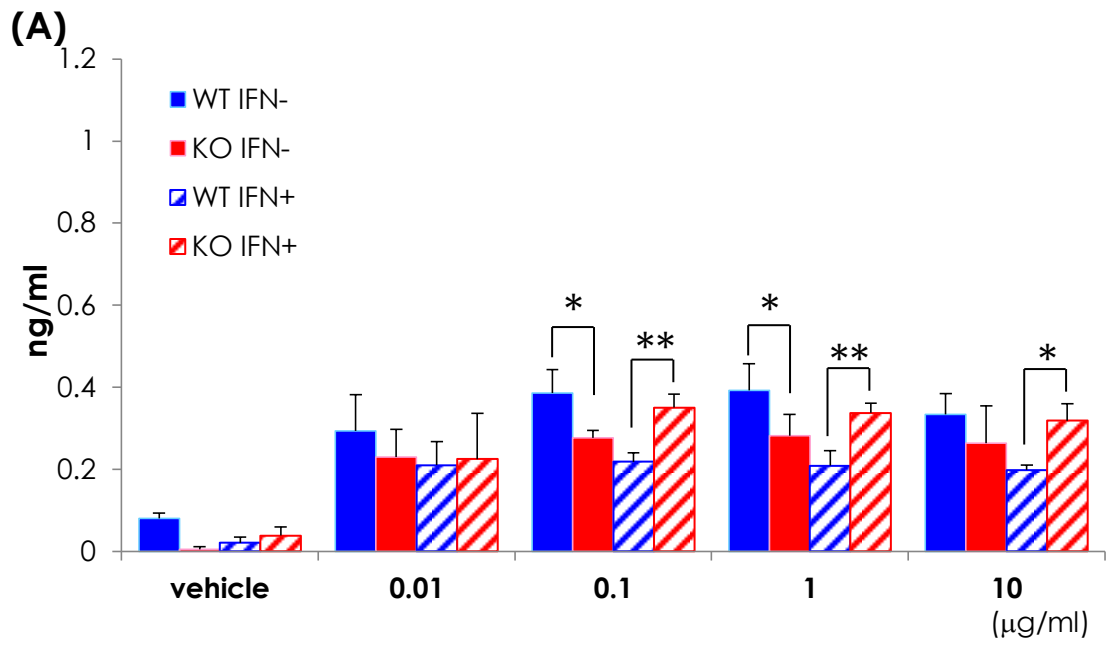


Fig. 15 腹腔常在性マクロファージと LPS 共培養時の KC 産生量の変化
 IFN- γ 腹腔常在性マクロファージと LPS を IFN- γ を含む、あるいは含まない 7% FCS-RPMI で共培養し、経時的に回収した上清中の KC 量を ELISA で測定した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001



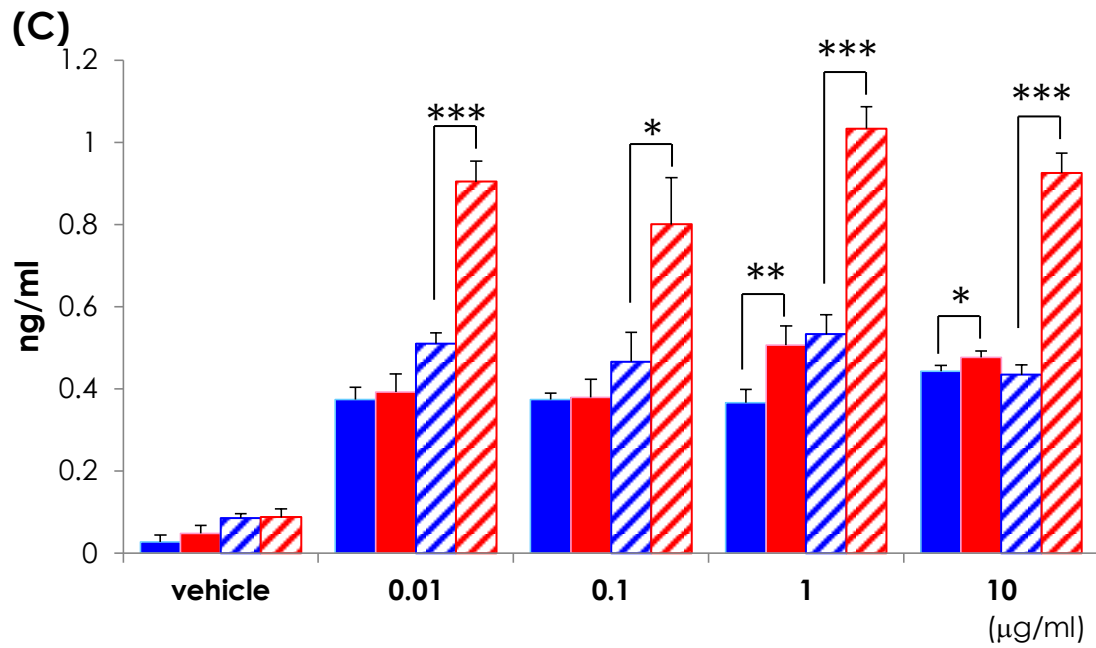


Fig. 16 腹腔常在性マクロファージと LPS 共培養時の TNF- α 産生量の変化

IFN- γ 腹腔常在性マクロファージと LPS を IFN- γ を含む、あるいは含まない 7% FCS-RPMI で共培養し、経時的に回収した上清中の TNF- α 量を ELISA で測定した。

(A) は 1 h, (B) は 3 h, (C) は 6 h の各培養時間を示す。

means \pm standard errors, n=3

*, p<0.05 **, p<0.01 ***, p<0.001

References

1. Y. Kondo, T. Sasaki, Y. Sato, A. Amano, S. Aizawa, M. Iwama, S. Handa, N. Shimada, M. Fukuda, M. Akita, Lee J, Jeong KS, N. Maruyama, A. Ishigami
Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 377 (2008) 291-296.
2. Ishigami
Vitamin C, aging regulation, and disease research. *Vitamins (Japan)*, 83 (3), (2009)125-130
3. T. Iyoda and Kobayashi
Involvement of MIP-2 and CXCR2 in neutrophil infiltration following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 9 (2004) 485-493.
4. R. Misawa, C Kawagishi, N. Watanabe, Y. Kobayashi
Infiltration of neutrophils following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 6 (2001) 411-417.
5. MIAN ZHOU, RONGOIAN WU, WEIFENG DONG, JENNIFER LEONG and PINGWANG
Accelerated apoptosis contributes to aging-related hyperinflammation in endotoxemia
INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 25 (2010) 929-935

6. Y. Shiratsuchi, T. Iyoda, N. Tanimoto, D. Kegai, K. Nagata, Y. Kobayashi
Infiltrating neutrophils induce allospecific CTL in response to immunization with apoptotic cells via MCP-1 production. *Journal of Leukocyte Biology* 81 (2007)
7. Nahoko Tanimoto, Masao Terasawa, Miho Nakamura, Daisuke Kegai, Naho Aoshima, Yoshiro Kobayashi, Kisaburo Nagata
Involvement of KC, MIP-2, and MCP-1 in leukocyte infiltration following injection of necrotic cells into the peritoneal cavity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 361 (2007) 533-536
8. T. Iyoda, K. Nagata, M. Akashi, Y. Kobayashi
Neutrophils Accelerate Macrophage-Mediated Digestion of Apoptotic Cells In Vivo as Well as In Vitro. *The Journal of Immunology* (2005)
9. Margret C. M. Vissers and Rachel P. Wilkie
Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of hypoxia-inducible factor 1 •. *Journal of Leukocyte Biology* 81 (2007)
10. Takehiko Shibata, Kisaburo Nagata, Yoshiro Kobayashi
Apoptotic neutrophils and nitric regulate cytokine production by IFN- γ -stimulated macrophages
Cytokine (2010), doi:10.1016/j.cyto.2010.10.003

11. Thomas Karonitsch, MD; Karolina Dalwigk; Carl W. Steiner; Stephan Bluml, MD; Gunter Steiner, PhD; Hans P. Kiener, MD; Josef S. Smolen, MD; and Martin Ariger, MD;
Interferon (IFN) Signals and Monocytic Sensitization of the IFN γ Signaling Pathway in Peripheral Blood of Rheumatoid Arthritis Patients
Arthritis & Rheumatism (2011) DOI 10.1002/art.33347

12. Yuanming Luo, Yaojun Li, Chentao Lin, Hong Ma, Jindan Zhang, Shuzhen Wu, Xiaorong Wang, Youhe Gao, Yanxin Liu, Dexian Zheng
Comparative Proteome Analysis of Splenic Lymphocytes in Senescence-Accelerated Mice
Gerontology (2009) 55:559-569

13. Keisuke Maeshima, Koji Ishii, Mikako Iwakura, Misuzu Akamine, Hajime Hamasaki, Itomi Abe, Miwa Haranaka, Hiroshi Tatsukawa, Hironobu Yoshimatsu
Adult-onset Still's disease with macrophage activation syndrome successfully treated with a combination of methotrexate and etanercept
Mod Rheumatol (2011) DOI 10.1007/s10165-011-0477-9

14. Christian R. Gomez, John Karavitis, Jessica L. Palmer, Douglas E. Faunce, Luis Ramirez, Vanessa Nomellini and Elizabeth J. Kovacs
Interleukin-6 Contributes to Age-Related Alteration of Cytokine Production by Macrophages
Mediators of Inflammation (2010) Article ID 475139, 7 pages

15. Masao Terasawa, Kisaburo Nagata, Yoshiro Kobayashi
Neutrophils and monocytes transport tumor cell antigens from the peritoneal cavity to secondary lymphoid tissues
Biochemical and Biophysical Research Communications 377 (2008) 589-594

16. Alexander Zheleznyak and Eric J. Brown
Immunoglobulin-mediated Phagocytosis by Human Monocytes Requires Protein Kinase C Activation
EVIDENCE FOR PROTEIN KINASE C TRANSLOCATION TO PHAGOSOMES
THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (1992) 12042-12048

Acknowledgement

本研究を行うにあたり、丁寧にご指導、ご鞭撻を賜りました小林芳郎教授、ならびに永田喜三郎准教授に深く感謝いたします。この 3 年間貴重な経験を積ませていただき本当にありがとうございました。

また、実験動物を提供していただいた東京都老人総合研究所の石神昭人主任研究員に心より感謝いたします。