

# 東邦大学学術リポジトリ



## OPAC

東邦大学メディアセンター

タイトル	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
作成者（著者）	高橋, 澗
公開者	東邦大学
発行日	2015.03
掲載情報	東邦大学大学院理学研究科 博士論文. 63.
資料種別	学位論文
内容記述	主査: 永田 喜三郎 /
著者版フラグ	ETD
報告番号	32661甲第768号
学位授与年月日	2015.03.19
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD57484762">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD57484762</a>

# 東邦大学学位審査論文(博士)

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

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

高橋 滯

# Contents

Introduction	1
Materials and Methods	3
Results	8
Discussion	14
References	20
Figures	25
Figure Legends	31
Acknowledgements	38

## Introduction

アポトーシス細胞は初期のステージでマクロファージによって速やかに除去され、好中球の浸潤を伴うような炎症応答を起こさない (1)。一方、アポトーシス細胞は完全に除去されずに残存すると、後期アポトーシス (二次的ネクローシス) に陥る。生体内で後期アポトーシス細胞が生じると、急性肺障害のような様々な急性炎症性疾患の原因となる (2)。これまでの研究で、X 線全身照射によって胸腺に急速に後期アポトーシス細胞が生じ、多量の好中球が胸腺に浸潤することが示されている (3-4)。そのうえ、以前の報告でマクロファージと後期アポトーシス細胞を *in vitro* で共培養した際、好中球特異的ケモカインである IL-8 あるいは MIP-2 産生が増加し (5-8)、マウス腹腔内に後期アポトーシス細胞を投与すると MIP-2 が産生され好中球が浸潤し、抗 MIP-2 抗体である抗 CXCR2 抗体によって好中球浸潤が有意に抑制したことから (9-11)、後期アポトーシス細胞が MIP-2 を介した好中球浸潤を誘導することを示した。また、他の報告から、後期アポトーシス細胞を繰り返し投与することで全身性エリテマトーデスのような自己免疫疾患の原因となることが示され、後期アポトーシス細胞が全身性炎症性疾患の原因となるもわかっている (12)。

一方、老化によって免疫系の機能が低下し、ウイルスや細菌による高齢者の感染率を増加させる (13, 14)。これまでの研究で、ウイルス特異的 T 細胞応答が老化した動物で低下し、TNF- $\alpha$  や NO のような炎症性メディエーターの産生、後期アポトーシス細胞からの high mobility group box-1 (HMGB-1) のような danger-associated molecular patterns (DAMPs) の放出 LPS を投与した老齢マウスで増加することが明らかとなっている (15-17)。しかし、後期アポトーシス細胞による炎症応答に老化がどのような影響を与えるのかを解析した研究はない。また、マクロファージは自然免疫系の主要構成要素で、病原体の侵入に対する最も初期の防衛ラインの 1 つとして機能し、組織恒常性の維持に重要である。マクロファージは、受ける刺激によって異なる二つの亜集団に分極することが知られている。一つは、IFN- $\gamma$  と LPS の暴露によって誘導される炎症促進性の M1 マクロファージ (classically activated)、もう一つが IL-4 や IL-13 の暴露によって誘導される抗炎症性の M2 マクロファージ (alternatively activated) である。M1 マクロファージは、CD40 を高発現していて、TNF- $\alpha$  や IL-12 のような炎症性サイトカインを分泌し、抗腫瘍性の活性を示す。M2 マクロファージは、マンノース・レセプター

(MRC1/CD206) を高発現している、IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  のような抗炎症性サイトカインを分泌し、血管新生、線維症、腫瘍増殖を促進する (18,19)。最近の研究で、この分極したマクロファージの亜集団のバランスが老化によって変化することが報告されている。そこで、本研究では、腹腔常在性マクロファージの機能に焦点を当て、後期アポトーシス細胞による炎症応答に老化がどのような影響を与えるのかを解明するために、若齢マウス (C57BL/6, 1.5 ヶ月齢) と老齢マウス (C57BL/6, 18-24 ヶ月齢) さらに、老化促進モデルマウスである SMP30/GNL-knockout マウス (SMP30<sup>-/-</sup>) を用いて研究を行った。

## Materials and methods

### Mice

若齢マウス (C57BL/6 1.5 months old)(三共ラボサービス)、老齢マウス (C57BL/6 18-24 months old)(東京都健康長寿医療センター)、SMP30/GNL-knockout (SMP30<sup>-/-</sup>) mice (20) は東京都健康長寿医療センターの石神昭人研究部長より提供していただいたものをそれぞれ実験に用いた。SMP30<sup>-/-</sup> マウスは、ビタミンCを1.5 g/L 含んだ水で生後4週齢まで飼育し、その後0.0375 g/L に変えて7週齢まで飼育したものを実験に使用した。

### Antibodies

Fc block (anti-FcγRIII/II mAb), normal mouse IgG, anti-Gr-1 mAb, anti-CD11b mAb, anti-F4/80 mAb, and anti-human HLA mAb はそれぞれ、ハイブリドーマ2.4G2, MOPC-1, RB6-8C5, M1/70, HB-198, SFR8-6B の培養上清から作成した。

### 後期アポトーシス細胞

チオグリコレート培地 2 ml を若齢マウスの腹腔に投与し、6 h 後に腹腔浸出細胞 (PECs) を回収した。この PECs 中には 90.0% 以上の Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> で同定される好中球が含まれている。PECs を phosphate-buffered saline (PBS; saline containing 14 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) で2回洗浄し、7%

FCS を含む RPMI 1640 medium に懸濁し、細胞数を  $2 \times 10^6$  cells/ml に調整した。37°C で培養したものを Annexin V と propidium iodide (PI) で染色し、フローサイトメーターで解析して double positive となる細胞を後期アポトーシス細胞とした。12 h 37°C で培養した時、後期アポトーシス細胞がピークとなるため、これを実験に用いた。

### フローサイトメーターによる PECs 中のマクロファージの解析と腹腔常在性マクロファージの準備

PECs 中のマクロファージを解析するため、若齢マウス、老齢マウス、SMP30<sup>-/-</sup> マウスそれぞれの腹腔液を PBS で回収し、Fc block と mouse IgG で 30 min, on ice で処理した後、FITC-conjugated anti-F4/80 mAb あるいはコントロールの FITC-conjugated anti-HLA mAb で処理、その後それぞれを biotin-conjugated anti-CD11b mAb あるいはコントロールの biotin-conjugated anti-HLA mAb で処理した。APC-conjugated streptavidin で 30 min 処理し、FACSCalibur (BD Biosciences)を用いて解析した。

腹腔常在性マクロファージを準備するために、それぞれのマウスの PECs を PBS で回収し、7% FCS を含む RPMI 1640 medium で細胞数を  $1 \times 10^7$  cells/dish に調整し、温度感受性培養皿 RepCell (Cell Seed, Tokyo)に播種し、37°C で培養した。PBS で wash して非接着性の細胞を除去した後、on ice で 20 min 処理し、接着していた細胞を剥離し回収した。回収した細胞の 98% マクロファージであることを FITC-conjugated anti-F4/80 mAb 染色により確認した。

## 腹腔常在性マクロファージによる後期アポトーシス細胞の貪食

前述した方法で用意した後期アポトーシス細胞を PKH26-Red 蛍光色素 (Sigma-Aldrich) で染色し、96 well plate に接着させた腹腔常在性マクロファージ ( $1 \times 10^5$  cells/well) に後期アポトーシス細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/well) を共培養した。トラップされていないアポトーシス細胞を wash により除去し、マクロファージを FITC-conjugated F4/80 mAb により染色し、蛍光顕微鏡で観察した。貪食率はランダムに選んだ 3 か所の画像から算出した。

## 腹腔での残存アポトーシス細胞の同定

PKH26-Red 蛍光色素で染色した後期アポトーシス細胞  $2 \times 10^7$  cells をマウス腹腔に投与し、経時的に PBS で PECs を回収した。投与したアポトーシス細胞の PKH26-Red の蛍光強度と同じ強度を示す PKH26-Red High positive 細胞を腹腔で貪食されず残存したアポトーシス細胞として同定した。

## 浸潤好中球のフローサイトメーター解析

PKH26-Red 蛍光色素で染色した後期アポトーシス細胞  $2 \times 10^7$  cells をマウス腹腔に投与し、経時的に PBS で PECs を回収した。PBS で 2 回 wash した後、1% BSA を含む PBS で  $5 \times 10^5$  cells/tube で分注した。細胞を Fc block と mouse IgG で 30 min, on ice で処理した後 FITC-conjugated anti-Gr-1 mAb あるいはコントロールである FITC-conjugated anti-HLA mAb で染色した。その後それぞれを biotin-conjugated anti-CD11b mAb あるいはコントロールの biotin-conjugated



anti-HLA mAb で処理した。APC-conjugated streptavidin で 30 min 処理し、FACSCalibur (BD Biosciences)を用いて解析した。

### **MIP-2 の測定**

後期アポトーシス細胞を腹腔に投与し経時的に回収した腹腔洗浄液の上清中および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後、経時的に回収した上清中の MIP-2 レベルを測定した。MIP-2 は ELISA development kit (Peptotec, London, UK) を用いて測定した。

### **IFN- $\gamma$ 処理腹腔常在性マクロファージと後期アポトーシス細胞の共培養**

96 well plate に接着させた腹腔常在性マクロファージ ( $1 \times 10^5$  cells/well) に IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) (Peptotec, London, UK) を含む 7% FCS-RPMI 1640 medium を添加し、5 min, 37°Cで刺激した後、後期アポトーシス細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/well) を播種し、経時的に上清を回収し、上清中の MIP-2 レベルを測定した。

### **M1 マクロファージの誘導**

96 well plate に接着させた腹腔常在性マクロファージ ( $1 \times 10^5$  cells/well) に IFN- $\gamma$  (20 ng/ml) (Peptotec, London, UK) と LPS (1  $\mu$ g/ml) (nacalai tesque, Kyoto, Japan) を含む 7% FCS-RPMI 1640 medium を添加し、15 min, 37°Cで刺激した後、washして 7% FCS-RPMI 1640 medium を再度添加し、一晚 37°C で培養した。PBSで wash 後、0.1% BSA を含む PBS を添加し、20 min on ice 処理した。

セルスクレーパーで細胞を剥離後、 $5 \times 10^5$  cells/tube で分注した。細胞を Fc block と mouse IgG で 30 min, on ice で処理した後、FITC-conjugated anti-F4/80 mAb あるいはコントロールの FITC-conjugated anti-HLA mAb で処理した。その後それぞれを PE-conjugated anti-CD40 mAb (BD Pharmingen™, CA, USA) あるいはコントロールの biotin-conjugated anti-HLA mAb で処理した。biotin-conjugated anti-HLA mAb で処理したサンプルは PE-conjugated streptavidin で 30 min 処理し、FACSCalibur (BD Biosciences)を用いて解析し、CD40 が High positive になる細胞を M1 マクロファージとした。

#### **M1 マクロファージと後期アポトーシス細胞の共培養**

上記のように M1 マクロファージ ( $1 \times 10^5$  cells/well) を用意してから、PKH26-Red 蛍光色素で染色した後期アポトーシス細胞 ( $2 \times 10^5$  cells/well) を添加して 37°C で共培養した。経時的に上清を回収して、上清中の MIP-2 レベルを測定、マクロファージを FITC-conjugated F4/80 mAb により染色し、蛍光顕微鏡で観察した。貪食率はランダムに選んだ 3 か所の画像から算出した。

#### **Statistics**

すべてのデータは平均値を Student' s *t* test で *P* 値を算出し、*P* 値 < 0.05 となるものを有意な差があるとした。

## Results

### 腹腔常在性マクロファージの総数と貪食能の老化による影響

まず初めに、老化によって腹腔常在性マクロファージの数に影響があるのかを調べるために、若齢マウスと老齢マウスにおける腹腔常在性細胞 (PECs) をフローサイトメーターを用いて解析を行った。マクロファージの解析条件は  $CD11b^{high}$ ,  $F4/80^{high}$  (R1 in Fig. 1C) とした。若齢マウスと老齢マウスで腹腔常在性マクロファージの数に有意な差はなかったが、割合は若齢マウスに比べ老齢マウスの方が有意に低下した。若齢マウスの腹腔常在性マクロファージの割合が約 50% であったのに対し、老齢マウスでの割合は 5-20% と個体間で大きな差が見られた (Fig. 1A, B)。老齢マウスにおいて腹腔常在性マクロファージの割合が低下した理由として、マクロファージ以外の細胞集団が若齢マウスに比べ多く検出されたことが挙げられる (R2 and R3 in Fig. 1C)。これにより、*in vivo* で後期アポトーシス細胞に対する炎症応答を解析する際、様々な影響を及ぼす可能性が考えられた。

次に、アポトーシス細胞に対する腹腔常在性マクロファージの貪食能を調べた。Fig. 2A は、6 時間共培養を行った時の顕微鏡画像で、矢印はアポトーシス細胞を貪食していないマクロファージで若齢マウスよりも老齢マウスの方が多く検出された。Fig. 2B は経時的に貪食率を測定した結果を示していて、培養 1 h で老齢マウスの方が有意に低下し、その後培養時間を延ばしても有意に低いままであった。

## 老化促進モデルマウス (SMP30<sup>-/-</sup>) マクロファージの貪食能は低下する

これまでの他の報告で、老化促進モデルマウスとして知られる SMP30<sup>-/-</sup> マウスは、生体内でビタミンCを合成できず、与えるビタミンCを制限することで老化が促進することが分かっている。そこで、老齢マウスでの結果を受けて、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでも同様の結果となるのかを調べることにした。なお、SMP30<sup>-/-</sup> マウスの作成は **Materials and Methods** に記載した方法で行った。

まず、腹腔常在性細胞についてフローサイトメーターで解析を行った。SMP30<sup>-/-</sup> マウスのプロファイルは若齢マウスと似通ったものとなった (Fig. 3)。また、腹腔常在性マクロファージの総数と割合は若齢マウスと有意な差はなかった (data not shown)。そのため、*in vivo* での若齢マウスとの応答比較が可能であると判断した。

次に、前述した実験と同様に SMP30<sup>-/-</sup> マウス腹腔常在性マクロファージの後期アポトーシス細胞に対する貪食能を解析した。Fig. 3B で示すように、共培養 1 h では貪食率に差が見られなかったが、3 h および 6 h 共培養において SMP30<sup>-/-</sup> マウスの方が若齢マウスよりも有意に低下することが観察された。これらの結果から、老齢マウスと同様に SMP30<sup>-/-</sup> マウスでも腹腔常在性マクロファージの貪食能が低下することが示唆された。

## SMP30<sup>-/-</sup> マウスおよび老齢マウスは若齢マウスよりも強力な炎症応答を引き起こす

次に、*in vivo* で後期アポトーシス細胞による炎症応答を比較するため、若

齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスにおいて解析を行った。

PKH-26 Red でラベルした後期アポトーシス細胞を若齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔に投与し経時的に PECs を回収してフローサイトメーターで解析を行った。まず、投与した後期アポトーシス細胞の残存量を調べるため、回収した PECs 中の PKH-26 Red ラベルされた細胞数を測定した。若齢マウスでは投与後すぐに減少していき、速やかに除去されているのが確認できたが、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは投与後 1 h が経過しても減少しておらず、速やかな除去が行われず長時間投与した後期アポトーシス細胞が残存しているのが観察された (Fig. 4)。さらに、炎症応答時に腹腔内に浸潤してくる好中球数を測定した。若齢マウスでは、好中球の浸潤は 12 h でピークとなったのに対し、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは 6 h でピークに達した。さらに、ピーク時の浸潤数は SMP30<sup>-/-</sup> マウスの方が若齢マウスよりも有意に増加した (Fig. 5A)。これらの結果から、好中球のケモカインである MIP-2 の産生量に違いがあるのかを測定した。若齢マウスに比べ、SMP30<sup>-/-</sup> マウスの方が MIP-2 が早期に産生されピークに達し、また、ピーク時の MIP-2 レベルも SMP30<sup>-/-</sup> マウスの方が有意に高いことが確認された (Fig. 5B)。そのうえ、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでの好中球浸潤のピークだった 6 h の時点で老齢マウスでも同様に好中球浸潤量が若齢マウスよりも有意に増加し、また、MIP-2 産生量も SMP30<sup>-/-</sup> マウスでのピーク点である 2 h の時点で若齢マウスよりも有意に増加した (Table)。これらの結果から、後期アポトーシス細胞を投与した SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは、アポトーシス細胞の除去が遅延することにより、強力な炎症応答が引き起こされることが示唆された (21)。

## 老齡マウスと $SMP30^{-/-}$ マウスの腹腔常在性マクロファージは活性化されている

これまでの研究で、腹腔常在性マクロファージは  $IFN-\gamma$  の刺激がなければ  $TNF-\alpha$  が産生されないということがわかっている (22)。そこで、 $IFN-\gamma$  の刺激の有無で  $MIP-2$  産生がどのようになるのかを調べることにした。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た際、若齡マウスは  $IFN-\gamma$  の刺激に依存していて、刺激なしでは  $MIP-2$  は産生されなかった。しかし、老齡マウスと  $SMP30^{-/-}$  マウスの腹腔常在性マクロファージは  $IFN-\gamma$  の刺激なしで  $MIP-2$  が産生された (未発表データ①)。これらの結果から、老齡マウスと  $SMP30^{-/-}$  マウスの腹腔常在性マクロファージは活性化した状態であることが示唆された。

## **SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージは M1 表現型に分極している**

マクロファージの活性化について解析を行うために、活性化し分極したマクロファージの二つの亜集団である M1 マクロファージと M2 マクロファージに着目した。M1 マクロファージは炎症促進性、M2 マクロファージは抗炎症性の特徴を持つ。一般的に、常在性のマクロファージは活性化しておらず、M0 マクロファージと呼ばれる。そのため、老化によって腹腔常在性マクロファージが M1 表現型に分極しているのではないかと考え、M1 のマーカーである CD40 と M2 のマーカーである CD206 の発現レベルを解析することとした。若齢マウスの腹腔常在性マクロファージを IFN- $\gamma$  と LPS で刺激し、M1 表現型に誘導したマクロファージは、未刺激の M0 マクロファージと比較し、CD40 の発現が増加した。一方、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは、ビタミンCを制限せず老化促進をさせなかったマウスでは、若齢マウスの M0 マクロファージの CD40 発現レベルと変わらなかったが、ビタミンCを制限し老化促進させたマウスでは、CD40 の発現レベルは M1 マクロファージと同程度まで増加していた (未発表データ②A)。また、CD206 の発現レベルは、若齢マウスの M0 マクロファージと SMP30<sup>-/-</sup> マウスマクロファージで差はなく、ほぼ発現していないことが観察された (未発表データ②B)。これらの結果から、SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージは M1 表現型に分極していることが示唆された。

## M1 マクロファージは後期アポトーシス細胞の貪食が低下する

M1 マクロファージの後期アポトーシス細胞に対する応答が老齢マウスおよび SMP30<sup>-/-</sup> マウスと同様のものとなるのかを確認するため、*in vitro* で検証を行った。若齢マウスの M0 マクロファージと M1 マクロファージをそれぞれ後期アポトーシス細胞と共培養し、貪食率を算出したところ、M0 マクロファージでは培養 0.5 h の短時間の培養でも 95% を超える高い貪食率を示していたが、M1 マクロファージでは培養 3 h まで有意に低下していた (未発表データ③)。さらに、この時の MIP-2 産生量の測定も行った。M0 マクロファージでは MIP-2 の産生はどの培養時間でも確認されなかったが、M1 マクロファージでは培養 1 h 以降有意に高い濃度で検出された (未発表データ④)。これらの結果から、老化によって腹腔常在性マクロファージの表現型が M0 から炎症促進性の M1 に分極することで、後期アポトーシス細胞の貪食能が低下し、強力な炎症応答を誘導することが示唆された。



## Discussion

アポトーシス細胞はマクロファージによって速やかに除去され、好中球浸潤を伴う炎症応答を起こさない。一方、アポトーシス細胞が除去されずに残存するとネクローシス細胞となる。これまでと他の研究で、後期アポトーシス細胞が強い炎症応答を引き起こし、SLE のような自己免疫疾患といった多くの疾患の原因となることを示した (9,12,20,22)。それゆえ、老齢マウスマクロファージの貪食能が低下することによってアポトーシス細胞が残存し、後期アポトーシス細胞（二次的ネクローシス細胞）によって強い炎症応答が誘導されるのではないかと仮定した。最初に、Fig. 2 で示すように、老齢マウスの腹腔常在性マクロファージの後期アポトーシス細胞に対する貪食能が若齢マウスと比較して低下した。この発見から、老齢マウスでアポトーシス細胞の除去が低下し、多量の後期アポトーシス細胞が発生することが予想される。

そこで、アポトーシス細胞を老齢マウスに投与した時に誘導される炎症応答への影響の解析を行うことにした。しかし、老齢マウスの PECs 中にはマクロファージ以外の細胞が多量に検出された (R2 and R3 in Fig. 1C)。FSC/SSC の解析

では、R2 と R3 のゲートの細胞はリンパ球であると示唆されたが、はっきりと同一定はしていない。これが、老齢マウスでの後期アポトーシス細胞による炎症応答解析に様々な影響を与える可能性が考えられた。これらの結果から、SMP30<sup>-/-</sup> マウスを実験に用いることにした。Fig. 3 で示すように、SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージの貪食能は老齢マウスと同様に低下した。さらに、アポトーシス細胞と共培養した際、ビタミン C を添加しても SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージの貪食能は回復しないことも発見した。また、SMP30<sup>-/-</sup> マウスをビタミン C を制限せずに飼育し、老化促進させなかった場合、腹腔常在性マクロファージの貪食能は若齢マウスと変わらなかった (data not shown)。そのうえ、これまでの報告で、単球を含む末梢血細胞中には SMP30 はわずかしか発現していなかった (20)。これらの知見から、SMP30<sup>-/-</sup> マウスにおける老化促進によって貪食能が低下するが、ビタミン C が原因ではないということが示唆された。

次に、SMP30<sup>-/-</sup> マウスにおいて後期アポトーシス細胞の腹腔投与によって、アポトーシス細胞が残存するかどうかを解析した。その結果、若齢マウスでは速やかに除去されるのに対し、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは長時間残存することが明らかとなった。若齢マウスの腹腔常在性マクロファージを *in vitro* で共培養した時、1 h

では貪食率は 20% 程度だったにも関わらず、*in vivo* では投与 1 h 後で 80% ほど除去されていた。この *in vitro* と *in vivo* の結果の矛盾は、おそらく *in vivo* よりも *in vitro* の方が貪食能が低いということが考えられる。これらを考え合わせると、SMP30<sup>-/-</sup> 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た結果、多くのアポトーシス細胞が残存するということが証明された。以前の研究で、好中球を *in vitro* で培養した時、培養 1 h でネクローシス細胞が現れたことから (9)、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでのアポトーシス好中球投与 1 h 後ではネクローシスの段階にあると考えられる。

残存したアポトーシス細胞はネクローシスを誘導し、HMGB-1 や S100 A8/A9 のような DAMPs を放出して、それによって様々な炎症応答を引き起こす。実際、SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは若齢マウスと比べて、好中球浸潤のピーク時間が早く、また、MIP-2 産生量も多かった。これらの結果から、SMP30<sup>-/-</sup> マウスに後期アポトーシス細胞を投与した時、アポトーシス細胞の除去の遅延により、強い炎症応答が誘導されることが示唆された (21)。

これまでの結果から、老齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは、なぜ貪食能が低下するのかということが疑問になる。以前の報告で、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た際、マクロファージからの TNF- $\alpha$  の産生には IFN- $\gamma$  の刺激が必要であることを発見した (22)。さらに MIP-2 産生も IFN- $\gamma$  の刺激が必要であることを発見した。しかし、老齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスでは IFN- $\gamma$  非存在下で MIP-2 が産生された。そのうえ、老齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの MIP-2 産生量は IFN- $\gamma$  による刺激をした若齢マウスの腹腔常在性マクロファージよりも多かった。それゆえ、老齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージは前活性化状態にあるのではないかと考えた。このことは、老齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスのアポトーシス細胞に対する貪食能が低下したことからも言える。なぜなら、マクロファージは活性化すると貪食能が低下することが知られているからである。また、リウマチ関節炎 (RA) に関する報告で、リウマチ患者の末梢血中の単球の IFN- $\gamma$  シグナル経路が感作された状態であることが示された (23)。他の研究で、健康な人に比べてリウマチ患者の単球が IFN- $\gamma$  の刺激に敏感であるということが明らかとなっている (24)。リウマチ関節炎は老化関連疾患であるため、これらの研究では老化によって単球が IFN- $\gamma$  により敏感になった可能性があるが、筆者らはそのことについては述べていない。

その他の可能性として、老齢マウスでは腹腔常在性マクロファージの表現

型が変化し、それが原因で貪食能が低下したことが考えられる。マクロファージは、M1 (classically activate) マクロファージあるいは M2 (alternatively activate) マクロファージに分極することが知られている。以前の研究で、M1-like マクロファージである肺胞マクロファージのアポトーシス細胞に対する貪食能が腹腔常在性マクロファージよりも低いことを証明した (25)。そのうえ、老齢マウスの腹腔で M1 マクロファージが有意に増加することが報告されている (18)。実際、M1 のマーカーである CD40 と M2 のマーカーである CD206 を用いて、SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージのそれぞれの発現レベルを解析した結果、CD40 の発現レベルが増加していて、その発現レベルは M1 マクロファージと同程度だった。さらに、M1 表現型に誘導した若齢マウスの腹腔常在性マクロファージの後期アポトーシス細胞に対する貪食能は老齢マウスと同様に低下し、さらに、MIP-2 も多量に産生されることが確認された。これらの結果から、老化によって腹腔常在性マクロファージが M1 表現型に変化することでアポトーシス細胞の貪食低下と炎症応答の増悪を引き起こすことが示唆された。

まとめると、この研究で、老齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージによる後期アポトーシス細胞に対する貪食能が若齢マウスと比較して

有意に低下することと、後期アポトーシス細胞の腹腔投与において貪食能低下によるアポトーシス細胞の除去遅延によって強力な炎症応答が誘導されることを証明した。また、これらの現象の原因が老化により腹腔常在性マクロファージが M1 表現型に変化することで引き起こされることが示唆された。このことから、老化によるマクロファージの表現型の変化をコントロールすることができれば SLE や RA などの老化関連疾患の治療に寄与できると考えられる。

## References

1. Shibata T, Nagata K, Kobayashi Y. 2007. *Cutting Edge*; A critical role of nitrogen oxide in preventing inflammation upon apoptotic cell clearance. *J. Immunol* 2007; 179: 3402-3406.
2. Manuel T, do Vale A, dos Santos NM. Secondary necrosis in multicellular animal: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis* 2008; 13: 463-842.
3. Iyoda T, Kobayashi Y. Involvement of MIP-2 and CXCR2 in neutrophil infiltration following injection of late apoptotic cells into peritoneal cavity. *Apoptosis* 2004; 9: 485-493.
4. Uchimura E, Kodaira T, Kurosaka K, Yang D, Watanabe N, Kobayashi Y. Interaction of phagocytes with apoptotic cells leads to production of pro-inflammatory cytokines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 239: 799-803.
5. Kawagishi C, Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y. Cytokines production of macrophages in association with phagocytosis of etoposide-treated P388 cells *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Acta.* 2001; 1541: 221-230
6. Kurosaka K, Watanabe N, Kobayashi Y. Production of proinflammatory cytokines by phorbol myristate acetate-treated THP-1 cells and

monocyte-derived macrophages after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells.

*J. Immunol.* 1998; 161: 6249-6254.

7. Kurosaka, K., N. Watanabe, Y. Kobayashi. Production of proinflammatory cytokines by resident tissue macrophages after phagocytosis of apoptotic CTLL-2 cells. *Cell. Immunol.* 2001; 211: 1-7.

8. Misawa R, Kawagishi C, Watanabe N, Kobayashi Y. Infiltration of neutrophils following injection of apoptotic cells into the peritoneal cavity. *Apoptosis* 2001; 6: 411-417.

9. Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM. Differential effects of apoptotic versus lysed cell on macrophage production of cytokines: role of protease. *J. Immunol.* 2001; 166: 6847-6854.

10. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996; 273: 70-74.

11. Tanimoto N, Terasawa M, Nakamura M, Kegai D, Aoshima N, Kobayashi Y, 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.* 2007; 361: 533-536.

12. Su YJ, Cheng TT, Chen CJ, Chiu WC, Hsu CY, Chang WN, Tsai NW, Kung



CT, Wang HC, Lin WC, Huang CC, Chang YT, Su CM, Chiang YF, Cheng BC, Lin YJ, Lu CH. The association among leukocyte apoptosis, autoantibodies and disease severity in systemic lupus erythematosus. *J. Transl. Med.* 2013; 11:261.

13. Chorinchath BB, Kong L, Mao L, McCallum R E. Age-Associated Differences in TNF- $\alpha$  and Nitric Oxide Production in Endotoxic Mice. *J. Immunol.* 1996; 156: 1525-1530

14. Effros RB, Walford RL. The effect of age on the antigen-presenting mechanism in limiting dilution precursor cell frequency analysis. *Cell. Immunol.* 1984; 88: 531-539

15. Ito Y, Betsuyaku T, Nasuhara Y, Nishimura M. Lipopolysaccharide-Induced Neutrophilic Inflammation in the Lungs Differs with age. *Exp. lung res.* 2007; 33: 375-384

16. Maruyama N, Ishigami A, Kuramoto M, Handa S, Kubo A, Imasawa T, Seyama K, Shimosawa T, Kasahara Y. Senescence Marker Protein-30 Knockout Mouse as an Aging Model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1019: 383-387.

17. Smallwood HS, López-Ferrer D, Squier TC. Aging Enhances the Production

of Reactive Oxygen Species by Upregulating Classical Activation Pathways.

*Biochemistry* 2011; 50: 9911-9922.

18. Jackaman C, Radley-Crabb H G, Soffe Z, Shavlakadze T, Grounds M D, Nelson D J. Targeting macrophages rescues age-related immune deficiencies in C57BL/6J geriatric mice. *Aging Cell* 2013; 12: 345-357

19. Maria R. F., Joes L. R., Jordan L., Gabriella L., Derek M. M., The Pro-Inflammatory Cytokine, Interleukin-6, Enhances the Polarization of Alternatively Activated Macrophages. *PLOS ONE* 2014; 9(4):e94188

20. Feng D, Kondo Y, Ishigami A, Kuramoto M, Machida T, Maruyama N. Senescence marker protein-30 as a novel antiaging molecule. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1019: 360-364.

21. Takahashi, R., Ishigami, A., Kobayashi, Y, Nagata, K. : Attenuated phagocytosis of secondary necrotic neutrophils by macrophages in aged and SMP30 knockout mice. *Geriatr. Gerontol. Int.* (2014) (in press)

22. Shibata, T., K. Nagata, Y. Kobayashi. 2010. The mechanism underlying the appearance of late apoptotic neutrophils and subsequent TNF- $\alpha$  production at a late stage during *Staphylococcus aureus* bioparticle-induced peritoneal inflammation in inducible NO synthase-deficient mice. *Biochem. Biophys. Acta* 1802:1105-1111

23. Kato, C., M. Mikami. Effect of aging on BCG immunostimulation of *Porphyromonas gingivalis* infection in mice. *Biomed. Res.* 2010;32: 45-54
24. Karonitsch, T., K. V. Dalwigk, C.W. Steiner, S. Blüml, G. Steiner, H. P. Kiener, J. S. Smolen, and M. Aringer. Interferon Signals and Monocytic Sensitization of the Interferon- $\gamma$  Signaling Pathway in the Peripheral Blood of Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum* 2012;64: 400-408
25. Yamazaki T, Nagata K, Kobayashi Y. Cytokine production by M-CSF- and GM-CSF-induced mouse bone marrow-derived macrophages upon coculturing with late apoptotic cells. *Cell Immunol* 2008; 251: 124-130.

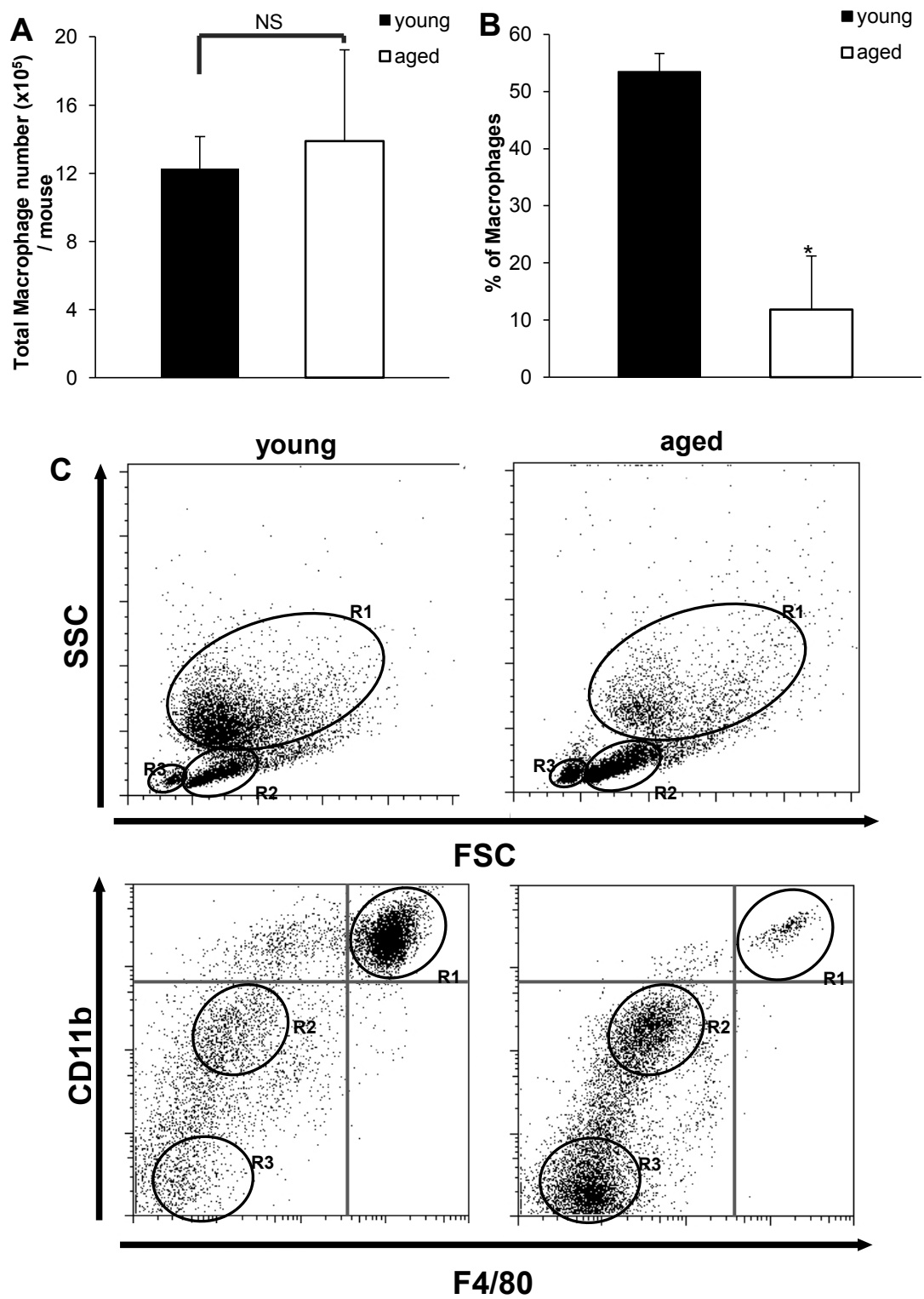


Figure 1

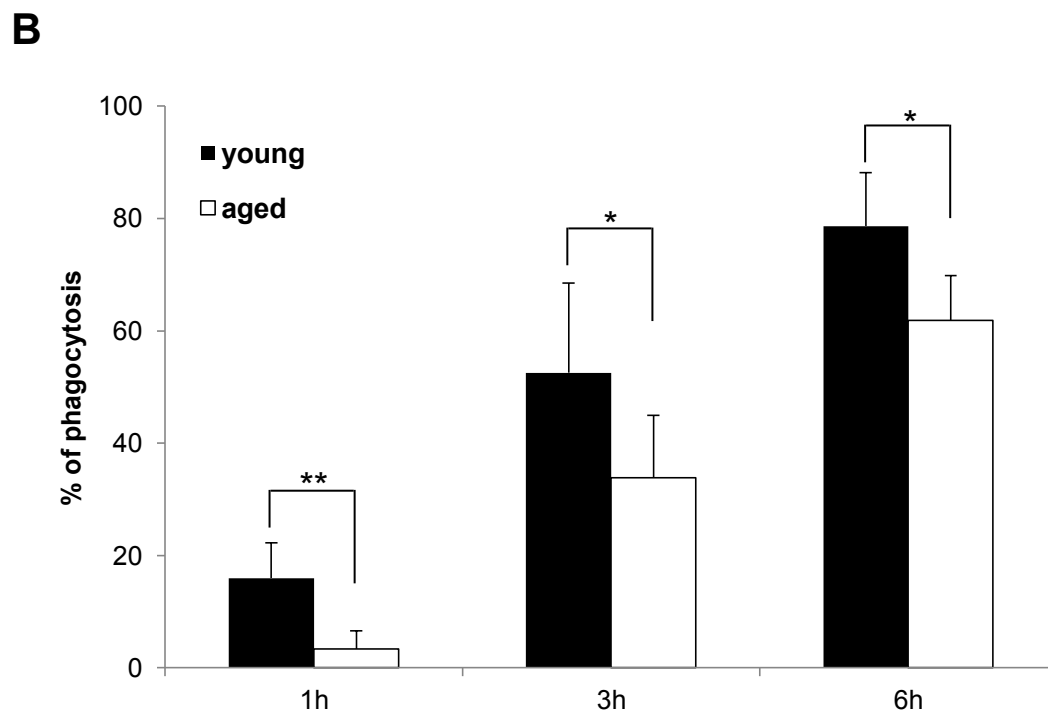
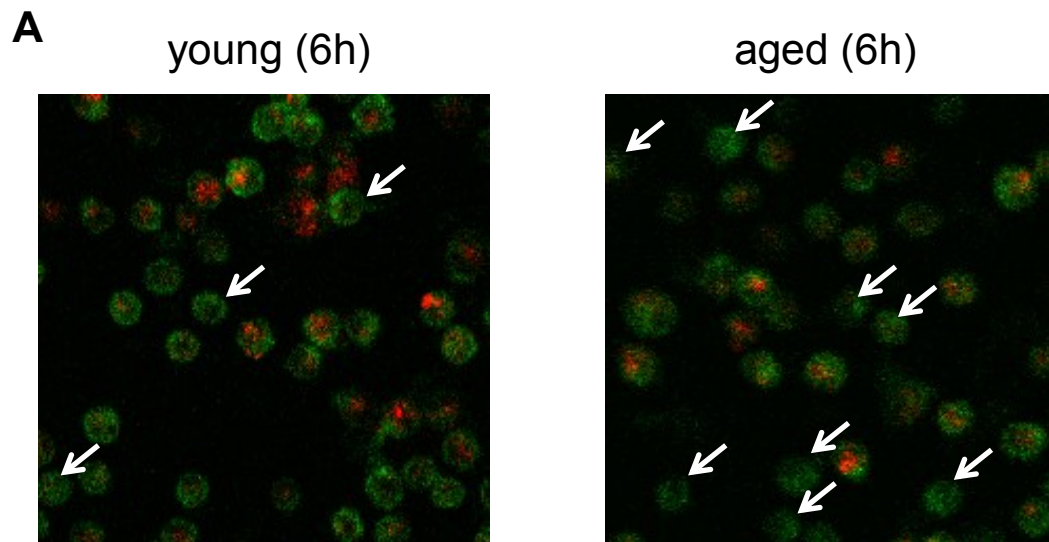


Figure 2

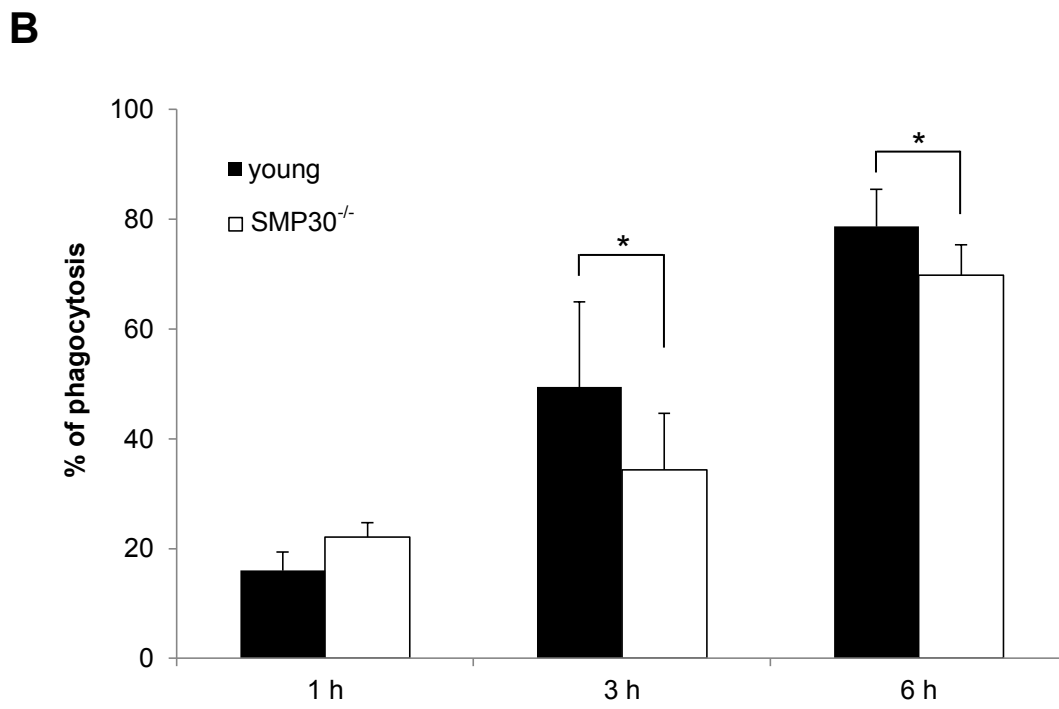
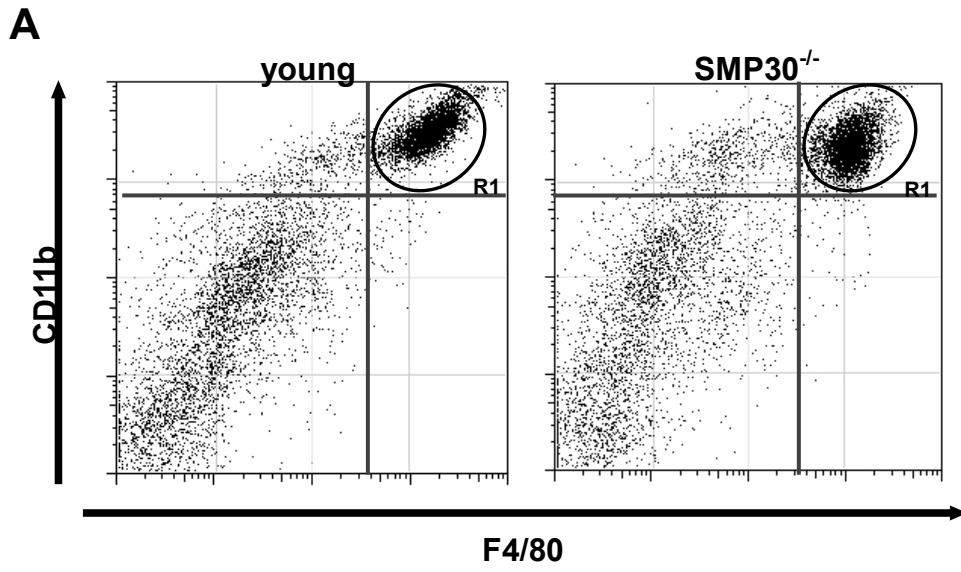


Figure 3

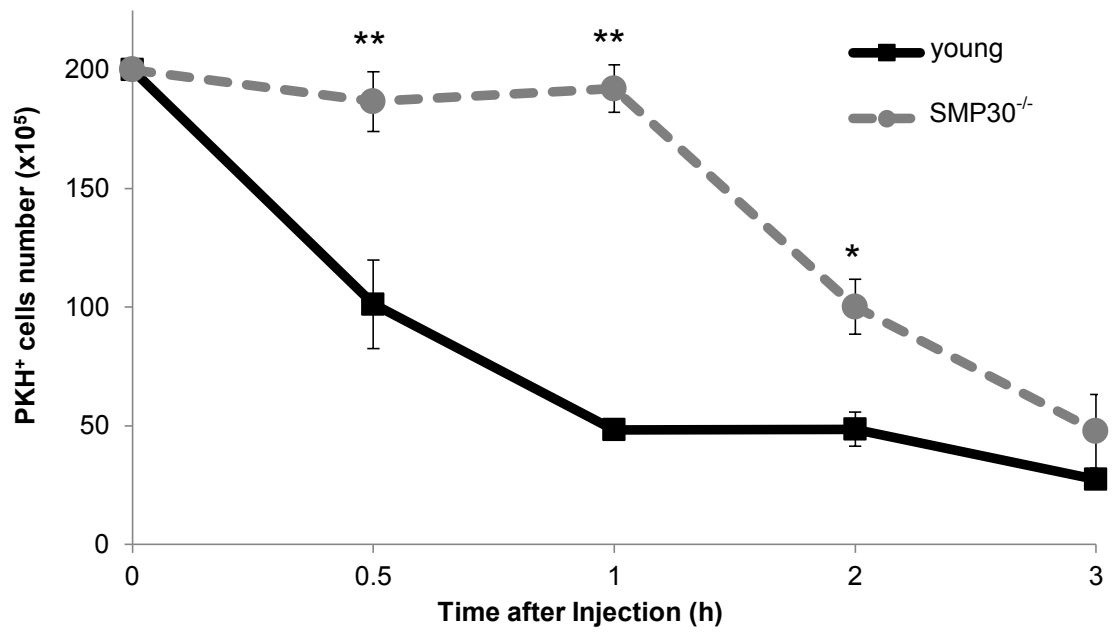


Figure 4

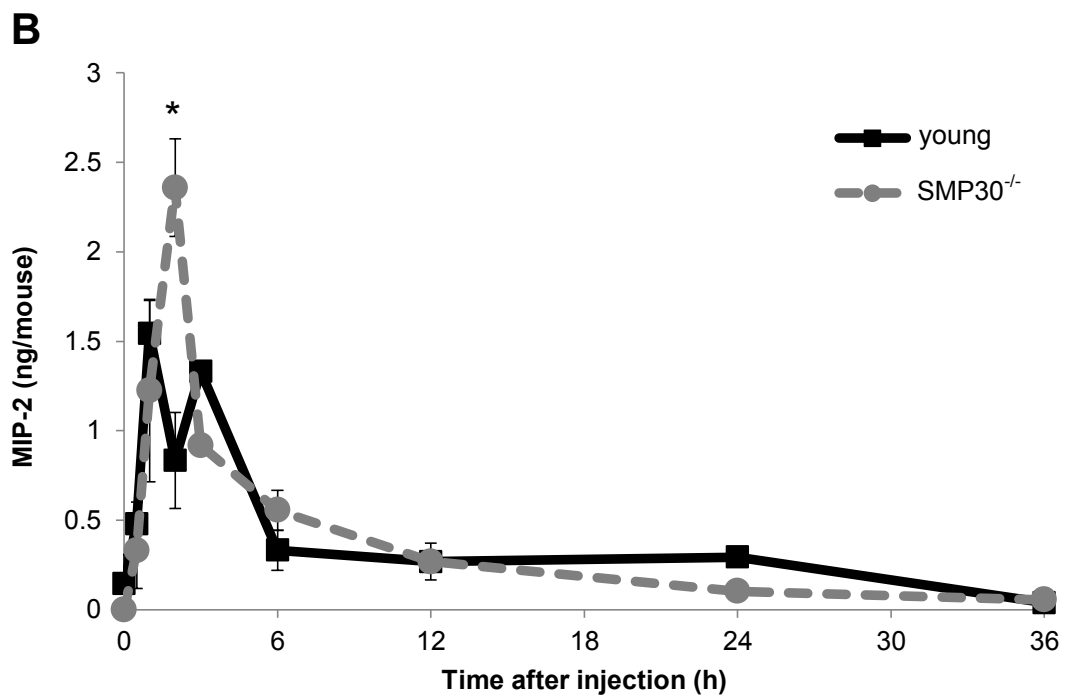
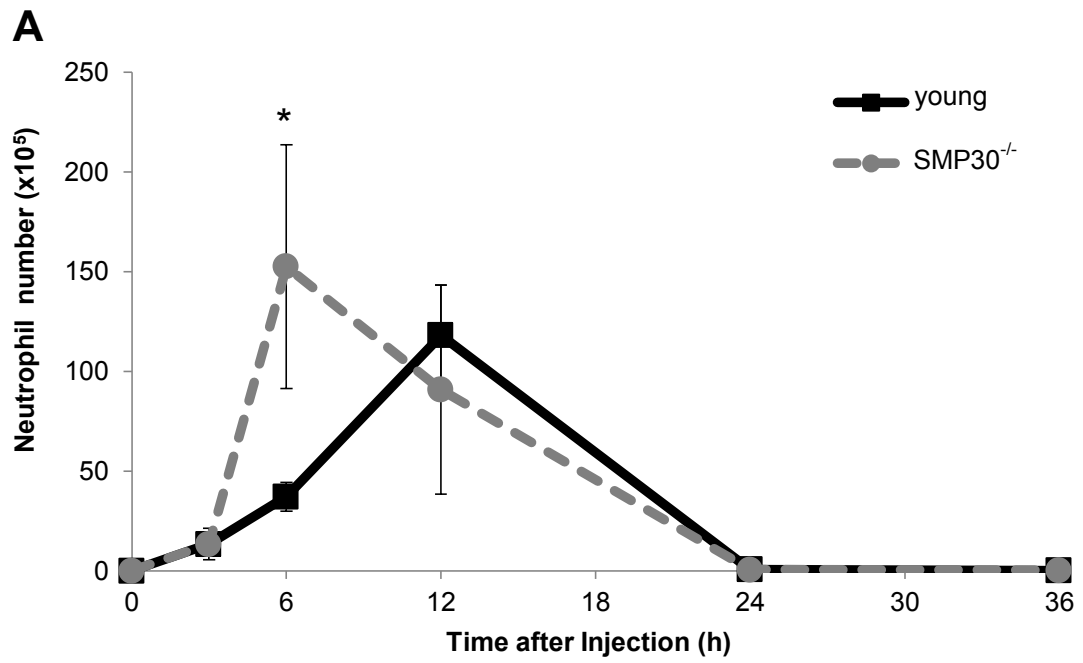


Figure 5



Table 後期アポトーシス細胞投与による炎症応答の誘導

	WT young	WT aged	SMP30 <sup>-/-</sup>
neutrophils (x10 <sup>5</sup> )	37.09±7.12	100.20±13.57*	152.47±61.89**
MIP-2 (ng/mouse)	0.83±0.27	3.60±0.62*	2.36±0.27*

後期アポトーシス細胞を若齢マウス、老齢マウス、SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔に投与し、6 h と 2 h の PECs と腹腔浸出液を回収して、Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> となる好中球をフローサイトメーターで解析、MIP-2 レベルを ELISA で測定した。

means ± standard errors (n=3). \*, p<0.001 \*\*, p<0.05 versus WT young mice.

## Figure Legends

**Figure 1.** 若齢マウスと老齢マウスの腹腔浸出細胞 (PECs) のフローサイトメーターによる解析

(A) 若齢マウス (1.5 months old) と老齢マウス (18-24 months old) の腹腔常在性マクロファージの総数 (B) PECs 中のマクロファージの割合 (C) フローサイトメーター解析でのプロファイルをそれぞれ示している

means  $\pm$  standard error (n=3-4). \*, p<0.001 versus WT young mice.

**Figure 2.** 若齢マウスと老齢マウスの腹腔常在性マクロファージによる後期アポトーシス細胞の貪食

若齢マウス (1.5 months old) と老齢マウス (18-24 months old) の腹腔常在性マクロファージと PKH26-Red でラベルした後期アポトーシス細胞を共培養し、FITC ラベルした抗 F4/80 抗体でマクロファージを染色後、蛍光顕微鏡で観察した。(A) 6 h 共培養後の顕微鏡画像で赤がアポトーシス細胞、緑がマクロファージ、矢印がアポトーシス細胞を貪食していないマクロファージを示している。(B) 貪食率を示して

いる。算出方法は Materials and methods に記載。

means  $\pm$  standard error (n=3-4). \*, p<0.001 versus WT young mice.

**Figure 3. 若齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マクロファージによる後期アポトーシス細胞の貪食**

(A) 若齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの PECs のフローサイトメーター解

析によるプロフィールを示す。(B) 若齢マウスと SMP30<sup>-/-</sup> マウスの腹腔常在性マ

クロファージと PKH26-Red でラベルした後期アポトーシス細胞を共培養し、FITC

ラベルした抗 F4/80 抗体でマクロファージを染色後、蛍光顕微鏡で観察して貪食

率を算出した。算出方法は Materials and methods に記載。

means  $\pm$  standard error (n=3). \*, p<0.05 \*\* , p<0.001 versus WT young

mice.

**Figure. 4.** 若齡マウスと比較し **SMP30<sup>-/-</sup>** マウスの方が後期アポトーシス細胞が

長時間残存する

若齡マウスと **SMP30<sup>-/-</sup>** マウスの腹腔に後期アポトーシス細胞を投与後、経時的に回収した PECs 中の残存アポトーシス細胞数を測定した。残存アポトーシス細胞はフローサイトメーターによる解析で PKH26-Red が High positive である細胞を同定した。

means ± standard error (n=3). \*, p<0.01 \*\*, p<0.001 versus WT young mice.

**Figure 5.** 後期アポトーシス細胞の若齡マウスと **SMP30<sup>-/-</sup>** マウスの腹腔内投与に

よる炎症応答

(A) 若齡マウスと **SMP30<sup>-/-</sup>** マウスの腹腔に後期アポトーシス細胞を投与後、経時的に回収した PECs 中の浸潤好中球数をフローサイトメーターで解析した。浸潤好中球の解析条件は、Gr-1<sup>high</sup>CD11b<sup>high</sup> とした。(B) 後期アポトーシス細胞を投与後の腹腔浸出液中に含まれる MIP-2 産生量を経時的に ELISA にて測定した結果を示す。

means ± standard errors (n=3). \*, p<0.01 versus WT young mice

## Acknowledgements

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永田喜三郎准教授ならびに小林芳郎教授に深く感謝いたします。この 6 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、本研究で用いた老齢マウス及び SMP30<sup>-/-</sup> マウスをご供与してくださいました、東京都健康長寿医療センター研究所の石神昭人研究部長に感謝致します。