

課題番号 25

ポリアミン類による加齢関連マクロファージの 細胞死誘導効果

[1] 組織

代表者：本田健

(山口大学大学院医学系研究科)

対応者：小笠原康悦

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

朝霧成挙 (山口大学大学院医学系研究科)

大塚まりな (山口大学大学院医学系研究科)

瀬戸哲也 (山口大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 13万円

[2] 研究経過

心筋梗塞や脳梗塞などの脳心血管疾患による死亡は、依然日本人の死因の上位を占める。加齢はそれらの病態発症に深く関わる動脈硬化の危険因子となるため、超高齢社会を迎える我が国では、その病態生理の分子基盤に基づいた治療法の開発が急務となっている。高齢者では血中の炎症性サイトカインレベルが高まる傾向が知られている。この全身性の慢性炎症状態は、マクロファージの持続的活性化を誘発することが指摘されている。このことは炎症性サイトカインのさらなる過剰放出を誘発し、ひいては炎症性細胞応答を遷延化させ、動脈硬化性疾患の発症・進展を引き起こす。この加齢に関連した炎症性マクロファージによる一連の炎症増悪プロセスにおいて、TNF の役割についてはよくわかっていない点が多く残されている。TNF はマクロファージが放出する主要な炎症性サイトカインだが、マクロファージ自身が受ける TNF 刺激が、サイトカイン過剰放出の惹起に関わっており、その抑制には TNF シグナル阻害が有効であることが自己炎症性疾患や異物食食性炎症等で報告されている。TNF 機能を適切に制御できれば、炎症性サイトカインによる悪循環を絶ち、動脈硬化を改善に導くことが期待できる。TNF は TNF 受容体を介してアポトーシスを誘導することが知られているが、通常は NF- κ B や MAPK シグナルを活性化して下流の炎症性遺伝子の発現を誘導し、炎症応答を惹起する。近年、この「細胞死 or 炎症惹起」を決定するチェックポイント機構が明らかにな

り、炎症性疾患における新たな創薬標的として注目されている。具体的には、チェックポイント制御因子を調節して、TNF シグナルを細胞死へと偏向させる戦略となる。我々は、生体内には過剰な TNF 活性化応答を抑制する防御因子として、チェックポイントを適切に調節する内因性分子があるのではないかと考え、TNF 刺激下にて細胞死を誘導させるような代謝産物を探索してきた。さらに、その防御機構の加齢による衰退を想定して、加齢に反応して存在量が減り、結果的に TNF シグナルの制御に支障をきたすような加齢応答性の代謝産物に着目した。マクロファージを対象にスクリーニングを行った結果、候補分子としてポリアミンを見出した。

ポリアミンは細胞内で合成され、多様な細胞プロセスを調節する因子である。また、ヒトの組織ポリアミン濃度は加齢とともに低下することや、外因性の投与によってモデル動物の寿命が延伸すること、さらに神経変性疾患、脳卒中、腎不全、心不全などいくつかの疾患においては、病態とポリアミン濃度との関連が指摘されている興味深い分子である。しかしながら、TNF 誘導細胞死に対するポリアミンの効果については報告がない。そこで本研究では、マクロファージにおいてポリアミンが TNF シグナルをいかに細胞死経路へと偏向させるのかを解析し、新たな TNF 制御機構を明らかにする。ポリアミンはアルギニンから生合成される一連の代謝産物、プロレツシン、スペルミジン、スペルミンの総称である。本研究では特にスペルミジンについて、マクロファージにおける TNF シグナルへの干渉作用を解析した結果を報告する。また、本研究の実施にあたり、加齢学研究所共同研究者としてご対応頂いた加齢医学研究所・小笠原康悦教授には、本研究の遂行に関するご助言や議論を賜った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では、マウスの大腿骨から骨髓細胞を単離し、マクロファージの生存と増殖を促す M-CSF を添加した培地で2日間培養してマクロファージを調製した。それに各種サイトカインを添加して培養し、1日

あるいは2日後に MTT アッセイを行い、検量線から細胞数を算出した。スペルミジンは様々な細胞系列において、増殖活性を亢進させることが知られており、サイトカイン無し (図1 ; Control) の条件ではスペルミジン刺激によって細胞数の増加が認められた。一方、スペルミジン共存下において TNF (50 ng/mL) を含む培地で培養すると、1 日後には有意な細胞数の減少が認められ、2 日後には5 割程度まで減少した (図1)。また、TNF と同じ superfamily に属する TNFSF11 (RANKL) を 20ng/mL にて TNF の代替とした条件では、スペルミジンによる細胞数減少効果は認められず、Control と同様に細胞数が増加した (図1)。このことから、TNF シグナルはスペルミジンの増殖活性を抑え、むしろ細胞数を減少させること、さらにその効果は TNF シグナルに特異的な機序に依存する可能性が示唆された。

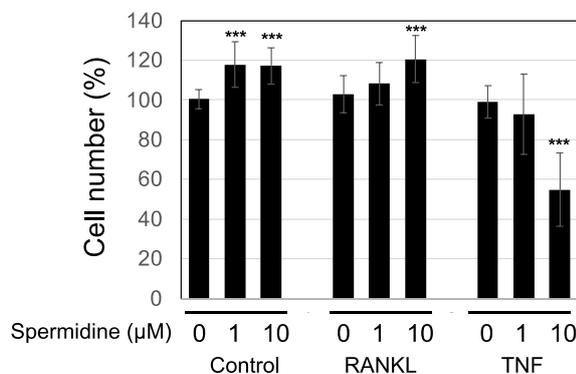


図1. サイトカイン存在下におけるスペルミジンの細胞数への影響

次に、スペルミジンによって減少した細胞数減少の機序を調べた。予備的検討から、TNF およびスペルミジン共存下における細胞数減少は、細胞接着能の減少ではなく、細胞死によるものであったため、アポトーシスの可能性を検討した。各種サイトカインおよびスペルミジン (10 μM) の共存下で 36 時間培養したマクロファージを、FITC 標識 Annexin V にて染色し、アポトーシス細胞を検出した (図2)。また定量化した結果、TNF を含む培地にスペルミジンを添加した細胞では、スペルミジン無添加の細胞に比べて有意にアポトーシス陽性細胞が増加していた。サイトカイン無添加およびRANKL 含有培地におけるスペルミジン添加では、そのようなアポトーシス陽性細胞の増加は認められず、先の細胞数測定と同様の結果を呈した。その他のマーカーにおいても、TNF とスペルミジンの共存下で特異的な細胞死の誘導が認められた (data not shown)。そこで我々は、TNF 刺激によって誘導される「炎症シグナル経路」および「細胞死経路」に着目し、TNF 刺激が入力された際、スペルミジンによって後者の経路が働くの

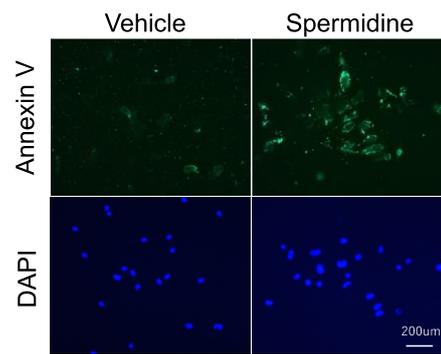


図2. スペルミジンおよびTNF 共存下におけるアポトーシスの誘導

ではないかと仮説を立てた。その経路のスイッチングには、ネクロプトーシス制御因子のユビキチン化が深く関わっている。現在、そのユビキチン化を調節する因子の mRNA およびタンパク質発現レベルに着目し、それらに対するスペルミジンの効果を解析している。今後、スペルミジンの作用機序とともに、TNF 存在下における細胞死誘導効果の生理的意義を解明していく。

(3-2) 波及効果と発展性など

各国の長寿者研究から、老化と炎症傾向 (血中炎症性サイトカイン濃度の上昇) との関連が示されている。また最近、骨髄などの局所においても、加齢によって造血幹細胞の分化が (単球・マクロファージの元となる) 前骨髄細胞系譜へ偏向すると共に、その骨髄微小環境における TNF 産生レベルの増大も報告されている。このように加齢 TNF 制御に異常を起しやすくするようだが、加齢による組織ポリアミン濃度の低下との因果関係については、現在のところ不明である。本研究成果によって、ポリアミンによる TNF シグナルの細胞死経路への偏向作用が明らかになれば、過剰な炎症に対抗する防御因子としてのポリアミンの働きについて新たな知見が得られる。また、加齢によるポリアミン減少が TNF 制御システム破綻の一因を担うといった因果関係が見出されれば、老化と炎症の関係性について理解が深まり、例えば加齢に関連した慢性炎症を基盤とする様々な病態に対して、新たな治療方策の開発につながるかもしれない。

[4] 成果資料

なし

(論文投稿準備中「Spermidine induces cell death in macrophages in a TNF-dependent manner」)