

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790210

研究課題名（和文）食細胞によるアポトーシス細胞貪食除去の動作原理の解明

研究課題名（英文）The Dynamic mechanism of phagocytosis of apoptotic cells

研究代表者

華山 力成 (HANAYAMA RIKINARI)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号：40403191

研究成果の概要（和文）：アポトーシス細胞は、ホスファチジルセリン(PS)を細胞膜の外側に提示し、これをマクロファージなどの食細胞が認識して貪食する。私たちは、マクロファージ上の蛋白質TIM4がこのPSと結合することによりアポトーシス細胞をマクロファージに繋ぎ止める一方、マクロファージから分泌されるMFG-E8がPSと結合し、マクロファージ上のインテグリンと橋渡しをすることにより、アポトーシス細胞を取り込むことを見出した。

研究成果の概要（英文）：Apoptotic cells are engulfed by macrophages by recognizing phosphatidylserine (PS). We found that Tim4 receptor on macrophages tethers apoptotic cells to macrophages by binding PS, and MFG-E8 secreted from macrophages binds to PS and stimulates the engulfment by binding to integrin on macrophages.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

キーワード：アポトーシス、マクロファージ、貪食

1. 研究開始当初の背景

私達はこれまでに、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を促進する分子MFG-E8を同定した。マクロファージから分泌されたMFG-E8は、C末端側のC1C2領域を介してアポトーシス細胞の表面に露出されるリン脂質 phosphatidylserine (PS) と特異的に結合する。一方で、MFG-E8はN

末端側のEGF領域に存在するRGD配列を介してマクロファージ上の integrin と結合し、アポトーシス細胞とマクロファージを結び付け貪食を促進する。MFG-E8遺伝子を欠損したマウスでは、脾臓やリンパ節の胚中心でアポトーシスにより死滅したB細胞を貪食する核片貪食マクロファージに

よる死細胞の貪食がうまくいかず、死細胞が胚中心に蓄積する。その結果、死細胞の膜は破裂し、その内容物（核、DNA、ミトコンドリアなど）が周囲に流失し抗原として作用することによって、抗核抗体と抗DNA抗体が産生され、自己免疫疾患を発症する。

MFG-E8 はマクロファージの integrin と結合すると、CrkII、Dock180/Elmo 複合体、Rac1 を順次活性化することによって、マクロファージ内の actin の再構成を誘導し、アポトーシス細胞の貪食を促進する。私達の研究グループでは最近、京都大学医学部の松田道行研究室との共同研究により、アポトーシス細胞の貪食時における食細胞内での Rac1 の活性化を Rac1 の 1 分子 FRET プローブを用いて可視化することに成功した。すなわち、活性型 Rac1 に特異的に結合する分子 PAK の CRIB 領域に YFP を結合させたものと、Rac1 に CFP を結合させたものとを繋いだプローブ (Raichu-Rac1) を食細胞に導入し、アポトーシス細胞を貪食させた。Raichu-Rac1 プローブは、Rac1 が非活性型 (GDP 結合時) の時には CFP による発色のみであるが、Rac1 が活性型 (GTP 結合時) になると、PAK の CRIB 領域が活性型 Rac1 と結合することによって、CFP と YFP が接近し蛍光エネルギー移動により、違う波長の色を発色する。このプローブを NIH3T3 細胞に発現させ、MFG-E8 と integrin の存在下で NIH3T3 細胞にアポトーシス細胞を貪食させたところ、今まで不明であった貪食過程の詳細が目に見える形で明らかとなった。すなわち、

- A) 活性型 Rac1 は、貪食時にアポトーシス細胞を取り囲むように局在し、phagocytic cup 構造を形成する。この構造は、integrin や actin の凝集としても可視化する事ができる。
- B) 貪食の完了とともに、活性型 Rac1 は速やかに不活性型に戻り、死細胞を取り囲んでいた integrin や actin の凝

集が解除され、phagocytic cup 構造も消滅する。

- C) Rac1 の常活性型変異体を発現させると、アポトーシス細胞を取り込もうとしても、効率良く貪食することができず、死細胞が食細胞膜上で入ったり出たりを繰り返す。この時、phagocytic cup 構造はいつまでも消滅せず残る。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究から、アポトーシス細胞が正しく貪食される為には、Rac1 の活性化と再不活性化が協調的に行われなければならないことが示された。よって本研究では、アポトーシス細胞貪食時において、Rac1 の活性化と不活性化がどのようにして協調的に制御されるのかを、Rac1 の GEF と GAP による作用を可視化することによって解明することを目標とする。

(2) 私たちは以前、マクロファージから分泌される MFG-E8 や、マクロファージ上の蛋白質 TIM4 が、ホスファチジルセリンと結合することにより、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を促進することを見出した。ところが、これらの分子がどのように協調的に働き、Rac1 の活性化と再不活性化を制御し、貪食を促進しているのかは未だに分かっていない。よって本研究では、これらの分子が、どのような動作原理を介してアポトーシス細胞の貪食を促進するかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) アポトーシス細胞の貪食時に、食細胞内で Rac1 がどのようにして活性化・不活性化するかを、Rac1 の GEF と GAP による作用を分子イメージングで調べることにより検討する。死細胞の貪食時には、Dock180 が Rac1 の GEF として働くことが知られている為、Dock180 の制御が、どのように Rac1 の活性化に影響を与えるかを検討する。一方、死細胞貪食時に Rac1 の GAP として働く分子は未だ

報告されておらず、本研究を通してその同定を試みる。

(2) マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を、本来貪食能のない細胞を用いて再構築できるかを試みる。これらの細胞に貪食に関連する分子の遺伝子を導入して貪食能を獲得させることにより、各分子がどのような貪食過程に関与するかを検討し、その動作原理を明らかにする。

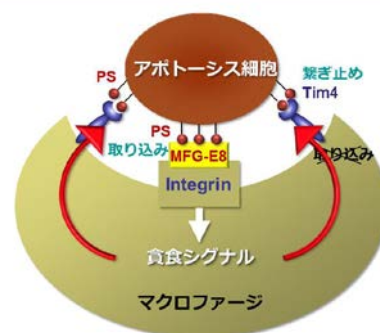
4. 研究成果

(1) マクロファージなどの食細胞によるアポトーシス細胞の貪食に関与する分子 Dock180 の動作原理に関する研究を行った。Dock180 を NIH3T3 細胞に過剰発現させ、アポトーシス細胞と共培養したところ、コントロールに比べアポトーシス細胞の取り込みが 1.5 倍に促進されることを確認した。一方、Dock180 は Rac1 の GEF であるが、その GEF 活性を失活させた点変異体を導入したところ、貪食促進能は認められなかった。Dock180 を過剰発現させた細胞は、野生型の細胞に比べ、培養ディッシュに強固に張り付いていることから、この細胞のアクチン骨格を蛍光色素で染め観察したところ、Dock180 を発現している細胞では、葉状仮足が定常状態においても多く形成されていることが示された。更に、ライブイメージングを用いてアポトーシス細胞の取り込みを観察したところ、食細胞はこの葉状仮足が形成されている場所で、ほとんどのアポトーシス細胞を取り込んでいることが示された。次に、Dock180 に RFP を結合させたプローブを用いアポトーシス細胞の取り込みを観察したところ、貪食時に Dock180 がアポトーシス細胞の周囲に強く集積し phagocytic cup 構造を形成することを示した。一方で、一旦取り込みが始まると、アポトーシス細胞を完全に飲み込んでしまうまでにかかる時間は、Dock180 を過剰発現させても変化がないことが示された。以上の結果から、Dock180 は、アポトーシス細胞を取り込む場所である葉状仮足を形成させる

ことによりアポトーシス細胞の貪食を促進するが、一旦取り込みが開始するとその後の貪食過程には Dock180 の寄与は少ないことが示された。

(2) マクロファージによる貪食を、本来貪食能のない細胞を用いて再構築できるかを試みた。未分化 B 細胞株である Baf3 細胞は、TIM4 を過剰発現させると、アポトーシス細胞と非常に効率よく結合するが、アポトーシス細胞を取り込むことができないことが示された。次にこの細胞に MFG-E8 とその受容体であるインテグリンを発現させると、アポトーシス細胞の取り込みが効率よく促進されることを見出した。この取り込みは、インテグリンの下流シグナルである Dock180 や Rac1 を発現させることにより、さらに促進することが明らかになった。以上の結果から私たちは、本来アポトーシス細胞を貪食できない Baf3 細胞にこれらの分子を発現させることによって、マクロファージによる貪食を完全に再構築することに成功した。また、Tim4 はアポトーシス細胞を繋ぎ止めるが取り込むことができず、Tim4 により繋ぎとめられたアポトーシス細胞が取り込まれる為には、MFG-E8 とインテグリンが必要であることを見出し、アポトーシス貪食の動作原理は「繋ぎとめ」と「取り込み」の 2 段階であることを見出した。

Tim4とMFG-E8による二段階貪食モデル



一方、Tim4 を過剰発現させた NIH3T3 細胞は、MFG-E8 が存在しなくてもアポトーシス細胞を効率よく貪食することができる。そこで、

NIH3T3 細胞には Tim4 と細胞外または細胞膜内で結合する共受容体が存在すると考え、その同定を試みた。すなわち、Tim4 を過剰発現させた NIH3T3 細胞を大量に培養し、Tim4 に対するモノクローナル抗体を用いて精製を行い共沈してくる蛋白質を検出したところ、160kD と 130kD のバンドが検出された。そこで、質量分析によりこれらの分子の同定を行い、二本のバンドから共に myoferlin という分子を同定した。今後は myoferlin による食食制御の分子機構を解明することを目標にする。

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 3 件)

① Greer PL*, Hanayama R (*同等貢献) (15 名中 2 番), Greenberg ME. The Angelman Syndrome protein Ube3A regulates synapse development by ubiquitinating Arc. Cell. 140, 704-716 (2010 年) 査読有

② Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. Cell. 140, 619-630 (2010 年) 査読有

③ Toda S, Hanayama R, Nagata S. Two-step engulfment of apoptotic cells. Molecular and Cellular Biology, 32(1): 118-125 (2012 年) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 華山力成、死細胞の除去とその疾患。阿波シンポジウム、2010 年 8 月 11 日 徳島大学

② 華山力成、Engulfment of apoptotic cells and its defects. シンフォニーシンポジウム、2011 年 9 月 11 日、ホテルメトロポリタンエドモント (東京)

③ 華山力成、Identification of a novel regulator for lysosomal fusion in macrophages. 第 2 回御茶ノ水動脈硬化フォーラム、2013 年 2 月 23 日、庭のホテル (東京)

[その他]

ホームページ等

<http://immnet.ifrec.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

華山 力成 (HANAYAMA RIKINARI)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授

研究者番号 : 40403191

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :