

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2014

課題番号：26893120

研究課題名(和文)次世代シーケンスを用いた新規貪食シグナル因子の同定

研究課題名(英文)Functional screening for engulfment of apoptotic cells with next generation sequence

研究代表者

戸田 聡 (Toda, Satoshi)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20738835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは、死細胞や赤血球が排出した核の表面に露出されるホスファチジルセリンを認識し、それらを貪食する。本研究は、貪食を促進する因子を同定するため、次世代シーケンスを用いた貪食能の機能スクリーニング法を樹立することを目的とした。死細胞の貪食能のない浮遊系細胞株Ba/F3に、腹腔の常在マクロファージから調製したcDNAライブラリーを導入し、死細胞を貪食したBa/F3細胞をソーティングすることを繰り返した。その結果、貪食能を獲得したBa/F3細胞が濃縮され、次世代シーケンスを使ってその細胞集団に導入されたcDNAを網羅的に調べたところ、貪食に関与する因子が複数検出された。

研究成果の概要(英文)：Macrophages recognize phosphatidylserine exposed on apoptotic cells and nuclei expelled from erythroblasts to engulf them. To identify factors that promote the engulfment, I aim to establish a functional screening system for engulfment of apoptotic cells with next generation sequence. I introduced cDNA library of resident peritoneal macrophages into a suspension cell line, Ba/F3, which has no ability to engulf apoptotic cells. Then I sorted Ba/F3 cells which engulfed apoptotic cells. Ba/F3 cells which acquired engulfment ability were enriched and I read cDNA sequences integrated in the cells with next generation sequence. As a result, several genes which have an ability to promote engulfment of apoptotic cells were detected.

研究分野：分子生物学

キーワード：貪食 マクロファージ アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

私達の体内では、毎日、不要となった大量の細胞がアポトーシスにより死滅する。生じた死細胞は、マクロファージにより速やかに貪食・分解される。この過程が障害されると、死細胞から炎症を引き起こす因子が放出され、自己免疫疾患を発症する。マクロファージは、死細胞表面に露出されるホスファチジルセリンを "eat me" シグナルとして認識し、死細胞を特異的に貪食する。当研究室は、これまでに、常在性もしくは活性化型の腹腔マクロファージが持つホスファチジルセリンを認識する分子を同定した。しかし、マクロファージには、常在する組織や活性化状態などにより様々な種類が存在し、貪食機構が不明なマクロファージが存在する。

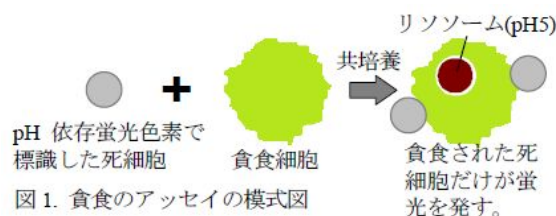
## 2. 研究の目的

本研究は、マクロファージがどのような分子機構で死細胞を貪食するのかを明らかにするため、死細胞の貪食能を指標にした機能スクリーニング法を樹立し、貪食を促進する因子を同定することを目的とする。この時、次世代シーケンスを用いることで、貪食を促進する因子を網羅的に検出することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 死細胞貪食の定量法

死細胞を貪食した細胞を検出するため、酸性条件でのみ蛍光を発する pH 依存蛍光色素で死細胞を標識した。貪食された死細胞は、酸性のリソソーム内に運ばれ蛍光陽性となり、死細胞を貪食した細胞を検出することができる(図1)。また、細胞を固定することなく死細胞の貪食を定量できることから、死細胞を貪食した細胞を再度、貪食アッセイに使用することが可能である。



### (2) 死細胞の貪食を指標にした機能スクリーニング

死細胞の貪食を指標にした機能スクリーニングを行うためには、本来は死細胞をまったく貪食しないが、死細胞を認識し貪食シグナルを活性化する因子を発現すると死細胞を貪食することができる細胞が必要である。浮遊系細胞株 Ba/F3 は、pro B 細胞であり、死細胞を貪食する能力を持たない。当研究室において、死細胞の表面に露出されるホスファチジルセリンを認識する因子として、膜タンパク質の Tim4 (T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 4) や分泌タンパク質の MFG-E8 (milk fat globule epidermal growth factor VIII) が同定された。Tim4 は死細胞を細胞表面に捕捉する役割、MFG-E8 は、その受容体である integrin を介して、貪食するために細胞骨格を駆動するシグナルを活性化する役割を持つ。これまでの研究により、Tim4 単独あるいは MFG-E8/integrin 系単独を Ba/F3 細胞に発現すると、Ba/F3 細胞は弱い貪食能を獲得すること、また、この両者を同時に発現すると、Ba/F3 細胞は効率良く死細胞を貪食することが見出された。よって、Ba/F3 細胞は、死細胞貪食のバックグラウンドが非常に低く、貪食を促進する因子を発現すると貪食能を獲得できることから、本研究のスクリーニングに使用した。

腹腔常在マクロファージより調整した cDNA ライブラリーを、レトロウイルス発現ベクターおよびウイルスパッケージング細胞を用いて、Ba/F3 細胞へ導入した。そして、死細胞を貪食した Ba/F3 細胞をセルソーターにより選別・分取(ソーティング)した。貪食能を獲得した Ba/F3 細胞の集団が得られるまで、貪食した Ba/F3 細胞のソーティングを繰り返した。

### (3) 貪食能を獲得した Ba/F3 細胞に導入された cDNA の検出

貪食能を獲得した Ba/F3 細胞の集団が得られた後、まず、細胞をクローン化し、それぞれのクローンの貪食能を調べ

た。そして貪食能を獲得したクローンのゲノムを精製し、そのクローンで発現している cDNA を PCR により増幅し、その配列を特定した。

(4) 次世代シーケンスを用いた cDNA の網羅的な検出および解析

(3)において、人力で調べることができるクローンの数は多くても 100 個程度であり、人力ではソーティングされた細胞集団のごく一部しか調べることができない。そこで、次世代シーケンスを用いることで、細胞に導入された cDNA を網羅的に検出することを行った。

まず、ソーティングにより得られた貪食能を獲得した Ba/F3 細胞の集団のゲノムを精製した。次に、そのゲノムに挿入されている cDNA の N 末端領域および C 末端領域を PCR により増幅した。PCR のプライマーにアダプター配列を付加することで、PCR 断片を直接次世代シーケンサーにより網羅的に解読した。本研究では、イルミナ社の Miseq を使い、cDNA の N 末端及び C 末端領域の 50 塩基配列を検出した。

まず、読まれた 50 塩基の配列（リード）の cDNA 上における位置および向きから、その cDNA が全長を発現しているかどうかを検討した。つまり、発現ベクターに逆向きに挿入された cDNA や、不完全な逆転写により開始コドンを含む N 末端領域を欠失した cDNA 等を除外した。次に、各遺伝子について、検出されたリードの種類およびリード数を算出した。ある遺伝子について、複数の種類のリードが検出された場合、その遺伝子がソーティングによって脱落せず、選択されている可能性がある。また、リード数が大きな値になる場合、ソーティングされた細胞の中で、その cDNA を持つ細胞集団の割合が大きい可能性がある。以上の解析により、貪食を促進する候補遺伝子を絞った。

上記の解析を実現するソフトウェアは、バイオインフォマティクスの分野で実績を上げているアメリカエフ株式会社と共同開発した。

#### 4. 研究成果

(1) 浮遊系細胞株 Ba/F3 を用いた貪食能の機能スクリーニング

腹腔の常在マクロファージより調製した cDNA ライブラリーを Ba/F3 細胞に導入し、死細胞を貪食した Ba/F3 細胞をソーティングすることを繰り返した。この操作を 3 回以上行くと、貪食能を獲得した Ba/F3 細胞が濃縮された（図 2）。この Ba/F3 細胞から、貪食能を獲得したクローンを単離し、それらのクローンに導入された cDNA を調べたところ、貪食シグナルを活性化する因子として知られている受容体チロシンキナーゼ Ax1 や死細胞の貪食への関与が報告されている膜タンパク質 Olr1 (Oxidized low-density lipoprotein receptor 1) が同定された。

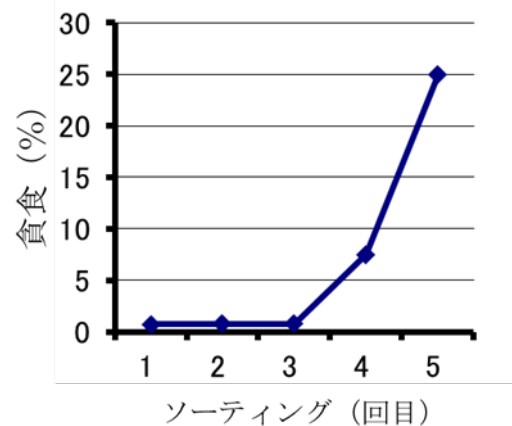


図 2. ソーティングによる貪食能を獲得した Ba/F3 細胞の濃縮

実際に Olr1 をクローニングし、Ba/F3 細胞に発現させると、Ba/F3 細胞は貪食能を獲得した（図 3）。

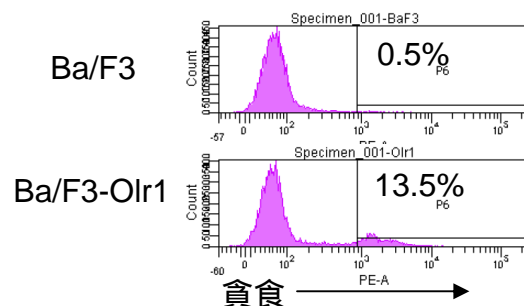


図 3. Olr1 を発現した Ba/F3 細胞による死細胞の貪食

以上の結果から、Ba/F3 細胞を用いることで、貪食を指標にした cDNA ライブラリーの機能スクリーニング系を樹立することができた。

## (2) 次世代シーケンスによる貪食を促進する cDNA の検出

3回ソーティングを行った Ba/F3 細胞のゲノムを回収し、次世代シーケンスにより、導入されている cDNA を網羅的に検出した。その中で、正しい向きで挿入され、全長を発現しうる cDNA の候補を絞った。その結果、上述した Axl、Olr1 に加え、ホスファチジルセリンを認識する受容体である Tim4 など、複数の貪食に関与する遺伝子が検出された。一方、貪食能を獲得した細胞に付随的に導入されてしまった貪食とは無関係な cDNA (passenger cDNA) もいくつか検出された。今後は、本研究で樹立した機能スクリーニング法を用いて、骨髄等の組織マクロファージの cDNA ライブラリーから死細胞の貪食を促進する因子を同定したいと考えている。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

戸田 聡 「次世代シーケンスを用いた新規貪食シグナル因子の同定」 定量生物学の会第七回年会、2015 年 1 月、九州大学 (福岡県福岡市)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

戸田 聡 (TODA, Satoshi)  
京都大学医学研究科特定研究員  
研究者番号 : 20738835