

平成22年 5 月 25 日現在

研究種目：特別推進研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17002017

研究課題名（和文） 細胞死の分子機構とその生理作用

研究課題名（英文） Molecular Mechanism of Cell Death And Its Physiological Role

研究代表者

長田 重一 (NAGATA SHIGEKAZU)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：70114428

研究成果の概要（和文）：アポトーシス細胞表面に暴露されるフォスファチジルセリンを認識するマクロファージ膜タンパク質を同定するとともに、マクロファージには死細胞に特異的なゲートが存在すること、そこではアクチンの重合、脱重合がおこることを見いだした。また、死細胞や赤芽球からの核 DNA を分解する酵素が作用しないと、マクロファージから未分解 DNA に応答して種々のサイトカインが産生され、これが貧血やリウマチ性関節炎を発症することを突き止めた。

研究成果の概要（英文）：We identified a type I-membrane protein that recognizes phosphatidylserine exposed on the cell surface of apoptotic cells, and found that there are specific gates in the phagocytes for the entry of apoptotic cells. In these gates, actin polymerized when the dead cells enter and it de polymerized as soon as they are inside of the phagocytes. We also found that if the DNA of apoptotic cells is not degraded in the phagocytes, the macrophages produce various cytokines that causes anemia and arthritis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	69,400,000	20,820,000	90,220,000
2006年度	63,000,000	18,900,000	81,900,000
2007年度	69,400,000	20,820,000	90,220,000
2008年度	69,400,000	20,820,000	90,220,000
2009年度	69,400,000	20,820,000	90,220,000
総計	340,600,000	102,180,000	442,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：アポトーシス・シグナル伝達・造血・マクロファージ・飽食

1. 研究開始当初の背景

動物の発生過程で無用あるいは害となる細胞が数多く形成されるが、これらは速やかにアポトーシスを起こして死滅する。また、成人においても、老化した細胞、がん化した細胞、ウイルスや細菌に感染した細胞は細胞障

害性 Tリンパ球 (CTL) などに攻撃されアポトーシスにより死滅する。一方、抗がん剤などの薬剤、放射線照射、増殖因子の枯渇などによっても細胞はアポトーシスに陥る。アポトーシスでは細胞や核が凝縮、断片化されるとともに染色体 DNA が切断される。

そして、その最終段階ではマクロファージなどの貪食細胞が死細胞を認識し、速やかに貪食・処理する。私達はアポトーシスを誘導するサイトカイン Fas リガンドを同定し、アポトーシスのシグナル伝達にはカスパーゼと呼ばれるプロテアーゼ、カスパーゼによって活性化される DNase (CAD、caspase-activated DNase) が関与していることを示した。ところで、アポトーシス細胞の DNA は死細胞がマクロファージによって貪食された後、リソソームに存在する DNase II によってさらに分解される。哺乳動物の赤血球には核はない。核は赤血球分化の最終過程で脱落する。赤芽球から脱落した核もマクロファージの DNase II によって分解される。そして、DNase II の欠損により、アポトーシスや造血過程で DNA が分解されないと、インターフェロン (IFN) β 遺伝子の発現など、自然免疫系が活性化される。さらに、私達はマクロファージが分泌し、アポトーシス細胞をマクロファージに橋渡しする Milk Fat Globule EGF Factor 8 (MFG-E8) と呼ばれる分子を同定した。この分子は、死細胞の表面に暴露されるリン脂質 phosphatidylserine (PS) を “Eat Me” シグナルとして認識し、マクロファージによる貪食を促進する。脾臓の胚中心に存在する核片貪食マクロファージ (tingible-body macrophage) が MFG-E8 を特異的に発現し、この分子が欠損すると、SLE (systemic lupus erythematosus) 様の自己免疫疾患を発症する。

2. 研究の目的

本研究は上記の様な背景をもとに (1) アポトーシスの分子機構と生理作用、特にアポトーシス細胞の DNA 分解の意義、DNA 分解異常が自然免疫を活性化する分子機構を明らかにする。(2) マクロファージによるアポトーシス細胞や赤血球から脱核した核の貪食の分子機構、生理作用を明らかにする。これらを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の2つの課題 (1) アポトーシス時の DNA 分解の異常が自然免疫を活性化する機構、(2) マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の機構のうち、研究分担者川根は1-2名の博士研究員、3-4名の大学院生とともに第1の課題、長田・華山もほぼ同人数の博士研究員、大学院生とともに第2の課題を担当した。しかし、その担当ははっきり分かれているものではなく、生化学を専門とする長田は第一の課題においても、自然免疫を活性化する因子の同定、生化学的解析などでは、川根や大学院生と討論を重ね研究を進めた。

一方、川根はノックアウトマウスの作成、マウスの組織化学的解析の知識が豊富なことから、アポトーシス細胞の貪食に関与する新しい分子が同定されれば、ノックアウトマウスの作成、マウスの解析などで大学院生を指導した。

4. 研究成果

(1) DNA 分解の異常と自然免疫の活性化
DNase II 遺伝子欠損マウス胚の胸腺や肝臓には未分解の DNA を蓄積したマクロファージが見出され、かつ、これらの組織で IFN β 遺伝子の顕著な発現が認められる。そこで、DNase II 遺伝子欠損マウスの胸腺や肝臓の細胞を分画した後、Real-Time PCR 法で IFN β mRNA を定量し、マクロファージが IFN β を産生することを示した。また、IFN β mRNA に対する anti-sense プローブを用いた in situ hybridization 法により、未分解の DNA を持つマクロファージが IFN β 産生細胞であることを証明した。IFN β は抗ウイルス作用をもつサイトカインであるが、抗細胞増殖作用や細胞障害作用を持つことも知られている。実際、赤芽球に IFN β を作用させると用量依存的に赤芽球の増殖を阻害した。そこで、IFN β のシグナルを伝達する IFN type I 受容体を欠損したマウスと DNase II 遺伝子欠損マウスを交配させたところ、両遺伝子を欠損するマウスはメンデルの法則にしたがって誕生した。以上の結果からアポトーシス細胞や赤血球からの核を貪食したマクロファージがその DNA を分解できないと IFN β 遺伝子が活性化され、この因子によりマウスは発症途上で死滅したと結論した。IFN は C-型肝炎、白血病などの治療に用いられているが、今回の結果は IFN β は胎児を死滅させる能力を持つ危険な因子であることを示している。IFN β のどのような作用によって赤芽球の増殖抑制が起こったか、この因子にはアポトーシスを誘導する活性はあるかなど明らかにする必要がある。

DNase II^{-/-}・IFN-RI^{-/-}マウスはメンデルの法則にしたがって生まれたが、このマウスの骨髄、脾臓などには未分解の DNA を大量に蓄積したマクロファージが存在する。このマクロファージからは IFN β ばかりでなく、TNF や IFN γ などのサイトカインが分泌されている。このマウスは関節リウマチを発症した。このリウマチの発症が DNase II 遺伝子の欠損によることを確認するため、DNase II 遺伝子を生後、poly (I) (C) の投与によって欠損できるマウスを樹立したところ、このマウスもリウマチを発症した。すなわち、DNase II 遺伝子を欠損させたマウスは歳をとるにしたがって、指先、手・足首、ひじ・ひざの順に、関節炎の症状を示し、8ヶ月目には、すべてのマウスでほとんどの関節が発症した。

発症した関節では、骨を覆う滑膜細胞が著しく増殖し、軟骨や骨を破壊していた。また、関節組織ではTNF、IL-6やIL-1 β 遺伝子の発現が10~50倍に増加しており、血清中にはヒトのリウマチ患者で認められるリウマチ因子、マトリックスメタロプロテアーゼなどが高濃度に認められた。関節炎を発症していない時期に抗TNF抗体を投与したところ、関節炎の発症が抑制され、さらに、関節炎を発症したマウスに抗TNF抗体を投与すると関節炎の症状は顕著に減少した。以上の結果は、アポトーシス細胞や赤血球前駆細胞から由来するDNAが効率よく分解されずマクロファージに残存すると、マクロファージが活性化され、その細胞から産生されたTNFによって滑膜細胞の増殖が誘導され関節炎が発症したことを示唆している。今後はこのマウスでのリウマチの発症にどのような分子が関与しているか、人のリウマチの患者で実際にDNase IIの異常によって起こる例があるかなど検討する必要がある。

IFN β はウイルスや細菌感染時に産生される。この際、Toll-Like Receptor (TLR)と呼ばれる一群の分子がウイルスや細菌のコンポーネントを特異的に認識する。そして、その受容体からのシグナルはMyD88やTRIFと呼ばれるアダプター分子を介して伝達される。そこで、DNase II $^{-/-}$ マウスとTLR3、TLR9、Myd88、TRIFなどの欠損マウスを交配させたところ、これら遺伝子とDNase II遺伝子を共に欠損するマウスはIFN β 遺伝子を発現し、胚発生の段階で死滅した。これらの結果から未分解の哺乳動物DNAによるIFN β 遺伝子の活性化にはTLR系は関与していないと結論した。そこで、この分子機構を明らかにするため、DNase II欠損細胞を用いてin vitroでのアポトーシス細胞食、IFN β 遺伝子活性化系を再現し、この反応を促進する分子をexpression cloning法により同定した。この分子はEya (Eyes absence)と呼ばれる分子で、生化学的解析から、N-末端にスレオニン、C-末端にチロシン脱リン酸化活性を持つことを見いだした。そして、この分子はリソソームに蓄積したDNAばかりでなく、NDVなどのウイルス感染に応答した自然免疫を活性化することも突き止めた。

(2) マクロファージによるアポトーシス細胞、赤芽球核、乳腺脂肪球の食食
アポトーシス細胞の食食に関与するマクロファージの分子を発現クローニングでスクリーニングすることにより、2種のRhoファミリーに属する低分子量G-蛋白質を同定した(RhoGとRab5)。RhoファミリーのG-蛋白質は数多くの分子から成り立っており、いくつかのサブファミリーに分けられている。そこで、それぞれのサブファミリーを代表する

5種の低分子量G-蛋白質(Rac1, Cdc42, RhoA, RhoG, Rab5)の野生型およびdominant-negative体を作成しマクロファージで発現させた。その結果、Rac1はアポトーシス細胞の食食を促進し、RhoAは食食を抑制した。Rac1やRhoAはアクチンの重合、脱重合を支配することにより細胞の極性を制御することが知られている。今回の結果はこれら分子がアポトーシス細胞の食食時に活性化あるいは不活化されることを示唆している。今後はFRET解析などにより、食食におけるRac1やRhoAの活性化を時間的、空間的に解析する必要がある。

骨髄、胎児肝には血液島とよばれる解剖学的単位が存在する。血液島ではその中心に、1個のマクロファージが存在し、その周りを種々の分化段階の赤血球が取り囲んでいる。DNase II $^{-/-}$ マウスの胎児肝に存在する血液島のマクロファージは大量の未分解DNAを持つことから、赤血球から脱核した核はマクロファージにより食食されると考えられる。この食食の機構を解析するため、貧血にしたマウス脾臓から赤芽球を調製し培養したところ、細胞膜に囲まれた核が突出した。この核をFACSを用いて分取し、胎児肝より調製したマクロファージと培養すると、マクロファージは核の膜表面に露出したリン脂質PSを認識してこれを食食した。PSは増殖している細胞では細胞の内膜に局在している。しかし、アポトーシスが誘導されるとPSは細胞の外膜に提示され、マクロファージはこの分子を認識して、死細胞を食食する。今回の結果は赤芽球から放出された核もアポトーシス細胞と同一の分子をマクロファージに提示することを示している。PSの露出は核が網状赤血球から分断された後速やかに観察された。健康な細胞内でのPSの細胞膜内側への局在はATPに依存した酵素phosphatidylserine translocaseによって担われていると考えられている。網状赤血球から分断された核には細胞質、ミトコンドリアが存在せず、ATPが急速に枯渇し、この酵素が失活したと考えられる。今後phosphatidylserine translocaseの同定、アポトーシス時のPS暴露の分子機構の解明をすすめる必要がある。新生児が離乳すると母親の乳腺は急激に退縮する。この退縮は、乳腺のダクトなどに蓄積していた乳脂肪球が乳腺表皮細胞に再吸収されること、および、乳腺表皮細胞のアポトーシスによる。脾臓のマクロファージが発現し、アポトーシス細胞の食食を促進する因子MFG-E8は乳腺、特に、退縮する乳腺に顕著に発現されている。MFG-E8欠損マウスの乳腺を観察したところ、このマウスでは離乳後の乳腺萎縮が遅れ、長期にわたり乳腺ダクトに乳脂肪球が蓄積した。また、アポトーシスを起こした乳腺表皮細胞の食食も遅れていた。

これらの結果は MFG-E8 はアポトーシス細胞の貪食ばかりでなく、乳脂肪球の再吸収にも重要な役割を担っていることを示している。乳脂肪球は脂肪を細胞膜が取り囲んでいる。この場合も PS を細胞内膜に維持する translocase が ATP の欠如により作用せず、PS が外膜に露出、これを MFG-E8 が認識し、上皮細胞へ橋渡しすると考えられる。また、MFG-E8 マウスの乳腺の退縮の遅れは、乳腺の発達の遅れを引き起こし、次世代の乳児のために分泌される母乳の量が顕著に減少し、新生児のマウスが飢餓状態に陥った。この結果は乳腺の退縮が次の世代の乳児のための乳腺の発達・成熟に必須のプロセスであることを示している。

MFG-E8 はアポトーシス細胞に暴露される PS とマクロファージ上のインテグリンを認識し、アポトーシス細胞をマクロファージに橋渡しする。アポトーシスは、生体内のさまざまな組織でおこり、近くに存在するマクロファージが死細胞を貪食する。脾臓胚中心に存在する核片貪食マクロファージや腹腔の炎症性マクロファージは MFG-E8 を発現しているが、腹腔に本来存在するマクロファージ、胸腺や骨髄のマクロファージはこの因子を発現していない。これらのマクロファージがどのようにアポトーシス細胞を認識・貪食するか調べるため、腹腔のマクロファージを用いてハムスターを免疫し、モノクローナル抗体のライブラリーを作製した。ついで、そのライブラリーからアポトーシス細胞の貪食を抑制する抗体を同定した。この抗体が認識するマクロファージの抗原を発現クローニング法で同定、これが Tim-4 と呼ばれる機能の知られていない受容体様の膜蛋白質であることをつきとめた。Tim-4 の細胞外領域は PS に強い親和性を持って結合した。また、本来貪食能のないマウス NIH3T3 細胞に Tim-4 を発現させたところ、その細胞は食欲にアポトーシス細胞を貪食した。このことから、Tim-4 はアポトーシス細胞の表面に暴露される phosphatidylserine を認識、死細胞の貪食を促進する phosphatidylserine receptor (PSR) と結論した。

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 35 件)

1. Yamaguchi H., Fujimoto T., Nakamura S., Ohmura K., Mimori T., Matsuda F. and Nagata S. Aberrant splicing of milk fat globule EGF factor 8 gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* in press (2010) 査読有

2. Nagasaka A., Kawane K., Yoshida H. and Nagata S. Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell Death Differ.* 17, 931-941 (2010) 査読有

3. Nagata S., Hanayama R. and Kawane K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140, 619-630 (2010) 査読有

4. Okabe Y., Sano T. and Nagata S. Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent. *Nature* 460, 520-524 (2009) 査読有

5. Strasser A., Jost P. J. and Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192 (2009) 査読有

6. Kitano M., Nakaya M., Nakamura T., Nagata S. and Matsuda M. Imaging of Rab5 activity identifies essential regulators for phagosome maturation. *Nature* 453, 241-245 (2008) 査読有

7. Nakaya M., Kitano M., Matsuda M. and Nagata S. Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 9198-9203 (2008) 査読有

8. Yamaguchi H., Takagi J., Miyamae T., Yokota S., Fujimoto T., Nakamura S., Oshima S., Naka T., and Nagata S. Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J. Leuk. Biol.* 83, 1300-1307 (2008) 査読有

9. Kawane K. and Nagata S. Nucleases in programmed cell death. *Methods Enzymol.* 442, 271-287 (2008) 査読有

10. Okabe Y., Kawane K. and Nagata S. IFN regulatory factor (IRF) 3/7-dependent and -independent gene induction by mammalian DNA that escapes degradation. *Eur. J. Immunol.* 38, 3150-3158 (2008) 査読有

11. Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T. and Nagata S. Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435-439 (2007) 査読有

12. Nagata S. Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol. Rev.* 220, 237-250 (2007) 査読有

13. Nakahara M., Nagasaka A., Koike M., Uchida K., Kawane K., Uchiyama Y. and Nagata S. Degradation of nuclear DNA by DNase II-like acid DNase in cortical fiber cells of mouse eye lens. *FEBS J.* 274, 3055-3064 (2007) 査読有

14. Kawane K., Ohtani M., Miwa K., Kizawa T., Kanbara Y., Yoshioka Y., Yoshikawa H. and Nagata S. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* 443, 998-1002 (2006) 査読有

15. Nakaya M., Tanaka M., Okabe Y., Hanayama R. and Nagata S. Opposite effects of Rho family GTPases on engulfment of apoptotic cells by macrophages. *J. Biol. Chem.* 281, 8836-8842 (2006) 査読有

16. Hanayama R., Miyasaka K., Nakaya M. and Nagata S. MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure. *Curr Dir Autoimmun* 9, 162-72 (2006) 査読有

17. Yoshida H., Kawane K., Koike M., Mori Y., Uchiyama Y. and Nagata S. Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437, 754-758 (2005) 査読有

18. Yoshida H., Okabe Y., Kawane K., Fukuyama H. and Nagata S. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* 6, 49-56 (2005) 査読有

19. Okabe Y., Kawane K., Akira S., Taniguchi T. and Nagata S. Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation. *J. Exp. Med.* 202, 1333-1339 (2005) 査読有

20. Hanayama R. and Nagata S. Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16886-16891 (2005) 査読有

21. Nagata S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 853-875 (2005) 査読有

[学会発表] (計 165 件)

1. Nagata S. (Oct 7, 2009) Programmed cell death in mouse development, The 2009 Cold Spring Harbor meeting on "Cell Death", Organizer, NY, USA.

2. Nagata S. (June 29, 2009) Tim4 as a phosphatidylserine receptor, The Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance, NH, USA

3. Nagata S. (October 7, 2008) Apoptosis and engulfment of dead cells, Plenary Lecture, The 9th International Congress on Cell Biology, Seoul, KOREA

4. Nagata S. (May 5, 2008) Apoptosis and engulfment of dead cells, The Marian Elliott Koshland Lecture, Chicago University, IL USA.

5. Nagata S. (April 29, 2008) Engulfment of apoptotic cells and its defect, Conference Metchnikoff's Legacy 2008, Institute Pasteur, Paris, FRANCE

6. Nagata S. (October 22, 2007) Engulfment of apoptotic cells, The Merck and Nature Colloquia in Biomedicine, Rome, ITALY

7. Nagata S. (September 26-30, 2007) Autoimmune diseases caused by defects in apoptotic cell death and clearing dead cells, The 2007 Cold Spring Harbor meeting on "Cell Death", NY, USA

8. Nagata S. (June 19, 2007) Polyarthritie caused by the failure in digesting DNA of corpses, The Gordon Conference on "Apoptotic Cell Recognition & Clearance", Bates college, MA, USA.

9. Nagata S. (March 23, 2006) DNA degradation in mammalian development, The 6th Hunter Cellular Biology Meeting, Keynote Address, The Sebel-Kirkton Park Hunter Valley Hotel, NSW, Australia

10. Nagata S. (December 20, 2005) Clearance of apoptotic cells and its failure, The International Symposium on "Molecular aspects of apoptosis and Cancer", Plenary Lecture, Trivandrum, Kerala, India

11. Nagata S. (June 20, 2005) Bridging molecules, apoptotic cell recognition and autoimmunity, The Gordon Conference on "Apoptotic Cell Recognition & Clearance", Keynote Address, Connecticut College, CO, U. S. A.

12. Nagata S. (January 26, 2005) Clearance of apoptotic cells and its failure, The AACR special conference "Regulation of Cell Death in Oncogenesis", Keynote Address, HI, USA

[図書] (計 3 件)

1. Hanayama R., Miyanishi M., Yamaguchi H., Suzuki J. and Nagata S. Engulfment of apoptotic cells and its physiological roles. Cell Death, G. Melino and D. Vaux, eds. (John Wiley & Sons) 165-175 (2009)

2. 長田重一 「細胞生物学」東京化学同人 第 13 章、154-158 (2006)

3. 岡部泰賢、長田重一 「実験医学 (増刊号: 免疫研究最前線 2007)」羊土社 26, 91-97 (2006)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: リウマチ性関節炎モデル非ヒト動物およびその作製方法

発明者: 長田重一 川根公樹

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2006-106351

出願年月日: 2006 年 4 月 7 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称: DNase II 遺伝子機能欠損貧血症モデル非ヒト動物

発明者: 長田重一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4409785 号

取得年月日: 2009 年 11 月 20 日

名称: 生体内のアポトーシス細胞の除去促進剤および除去阻害剤

発明者: 長田重一

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 4160292 号

取得年月日: 2008 年 7 月 25 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~nagata/>

○新聞、テレビ等での放送・紹介

平成 21 年 6 月 29 日 日本経済新聞、朝日新聞、京都新聞他: 「ウイルスから細胞守る物質増やす酵素を発見」

平成 19 年 11 月 30 日 朝日新聞: 「大食細胞のセンサー解明」

平成 19 年 11 月 15 日 読売新聞他: 「体内の廃棄物処理 -スイッチ役たんぱく質解明-

平成 19 年 6 月 21 日 京都新聞: 「生命科学は今「細胞の自殺」

平成 18 年 6 月 15 日 サイエンスチャンネル (スカイパーフェクト TV, 110 度 CS 放送他): 第 19 話 「生命に秘められたアポトーシスの謎」

平成 18 年 10 月 26 日 NHK, 日経新聞, 朝日新聞, 読売新聞共同通信 他: 「関節リウマチ DNA の分解異常が一因」

平成 17 年 10 月 19 日 読売新聞 「赤血球破棄の「核」処理の仕組み解明」

Sfi

A4 4G4 F; < 8>4MH

*#SS' '%~

fi&fi

>4J4A8~>B< ~~~

) #&)%(+, ~

fi 4A4LA@4 E<><A4E< ~~~

' # #&S, S~