

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成22年度採択分

平成25年5月24日現在

研究課題名（和文） **マクロファージによる死細胞貪食・分解の分子機構**

研究課題名（英文） **Molecular mechanism of the engulfment and degradation of dead cells by macrophages**

研究代表者

長田 重一 (NAGATA SHIGEKAZU)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要：マクロファージによるアポトーシス細胞貪食の分子機構を明らかにすることを目的としている。具体的には、①フォスファチジルセリン (PS) の細胞表面への暴露機構の解析、②細胞膜の非対称性維持の分子機構、③死細胞の貪食に関与する分子の同定とシグナル伝達。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：アポトーシス、自然免疫、リン脂質、マクロファージ、貪食

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスでは細胞や核の形態変化とともに染色体DNAが切断される。ついで、マクロファージがこの死細胞を貪食、分解する。私達は死細胞のDNAがマクロファージによっても分解されることを利用して死細胞貪食の検定法を樹立した。そして、この系を用いて、貪食を促進するMFG-E8、Tim-4を同定した。MFG-E8は分泌蛋白質で、アポトーシス細胞の表面に暴露されるフォスファチジルセリン(PS)を認識し死細胞をマクロファージに橋渡しする。一方、Tim-4は膜タンパク質であり、その細胞外領域を用いてPSを認識、死細胞を捕捉する。

2. 研究の目的

本来、細胞膜に分散して存在するPSは、健康な細胞ではATP依存フリッパーゼによって内側に維持される。そして、アポトーシスが誘導されると、スクランブラーゼが活性化され、PSが細胞表面に露出される。そこで、このスクランブラーゼを同定し、PS暴露の分子機構を解明する。ところで、Tim-4を発現する繊維芽細胞は死細胞を効率よく貪食するが、Tim-4の活性はその細胞内領域を欠損させても減少しない。そこで、Tim-4と協調的に死細胞の貪食に関与する分子を同定し、死細胞貪食のシグナル伝達機構を解明する。

3. 研究の方法

① PSの細胞表面への暴露

アポトーシス時のPSの暴露はカスパーゼの下流で起こるが、その過程はある種の細胞で

はCa²⁺にも依存している。一方、リンパ球系細胞株Ba/F3を低濃度のCa²⁺ ionophoreで刺激すると、一過的にPSが暴露される。そこで、Ba/F3細胞をionophoreで処理、PSをよく暴露する約1%の細胞をFACSで分取、分取した細胞を増殖させる。この過程、ionophoreによる刺激、FACSによる分画を繰り返すことにより、強くPSを暴露する細胞株を得、その細胞における遺伝子、蛋白質の発現を親株と比較する。また、この細胞よりcDNA libraryを作製し、これをBa/F3細胞に導入し、PSのスクランブルを促進する分子を同定する。

②死細胞の貪食

死細胞の貪食能が全く存在しない浮遊細胞、Ba/F3に、integrin/MFG-E8、Tim-4、MERなど、死細胞の貪食に関与していると考えられる分子を導入し、死細胞や赤芽球からの核の貪食におけるこれら因子の相互作用、作用機構、シグナル伝達を解析する。

4. これまでの成果

① PSの細胞表面への暴露

Ca²⁺ ionophoreによる処理と、PS発現細胞のソーティングを19回繰り返し、親株の100倍近い効率でPSを暴露する細胞株を樹立した。この細胞より、cDNA libraryを調製、これをBa/F3に導入し、ionophoreによってPSを効率よく暴露する細胞集団を分画した。この操作を2回繰り返した段階でPSを構成的に暴露する細胞集団が存在することに気づき、この集団に導入されたcDNAを同定した。このcDNAは8個の膜貫通領域を持つTMEM16F

に点変異が導入された分子をコードしていた。活性化された血小板は PS を暴露、血液凝固をスタートさせる。血小板が PS を暴露できない Scott Syndrome と呼ばれる病気が知られている。この患者では TMEM16F 遺伝子に変異が導入されていた。一方、TMEM16F^{-/-}細胞株は ionophore による PS の暴露は喪失していたがアポトーシスによる PS の暴露は正常におこった。以上より、TMEM16F は血小板での PS の暴露に関与しているがアポトーシスの PS の暴露には関与しないと結論した。

TMEM16F は 10 個のメンバーからなる TMEM16 ファミリーの一員であり、そのファミリーの TMEM16A, 16B は Cl⁻ チャネル活性を持つ。そこで、TMEM16 ファミリーの 10 個の遺伝子を TMEM16F^{-/-}細胞株に導入し、スクランブラーゼ活性を検討した。また、これらを 293T 細胞で発現、Patch-Clamp 法を用いて、Cl⁻ チャネル活性を評価した。この結果、16A と 16B には Cl⁻ 活性が、TMEM16F, 16C, 16D, および 16J にスクランブラーゼ活性を認めた。しかし、その発現パターンなどから、これらはアポトーシス時に作用するスクランブラーゼではないと結論した。

② 死細胞の食食

pHrodo と呼ばれる酸性条件下でのみ蛍光を発する薬剤で標識された死細胞を用いることにより、簡便に食食を検定できる系を樹立した。ついで、リンパ球系浮遊細胞である Ba/F3 に Tim-4 および MFG-E8/integrin を導入するとアポトーシス細胞を食食すること、死細胞の食食は Tim-4 による死細胞の捕食(tethering)と MFG-E8/integrin による食食の 2 段階からなることを見いだした。

5. 今後の計画

① PS の細胞表面への暴露

TMEM16E や 16K の異常がそれぞれ筋ジストロフィー、骨の形成異常、脊髄小脳性運動失調を引き起こす。これらが TMEM16E, 16K のどのような活性に由来するか決定する為にこれら分子に対するモノクローナル抗体を作成し、発現細胞の同定、細胞での局在を明らかにする。また、TMEM16E や 16K 遺伝子のノックアウトマウスを樹立し、筋ジストロフィーや小脳失調症を示すかどうか検討する。一方、アポトーシス時の PS 暴露に関与する分子の単離が急務であり、改めて PS を強く発現する Ba/F3 細胞からの cDNA library のスクリーニングを行う。また、今回単離された TMEM16F が単独でスクランブラーゼ活性を持つか、他の分子と複合体を形成しているのか不明であり、合成リポソームへの TMEM16F 分子の挿入、細胞膜蛋白質の Proteomics 法などでの解析を進める。

② 死細胞の食食

今回樹立した浮遊細胞 Ba/F3 を用いた死細胞

食食の Assay 系を用いて、MER などアポトーシス細胞の食食に関与していると報告されている分子の食食への関与を解析する。MER の関与が確認できれば MER のキナーゼがアポトーシス細胞の食食時に活性化されるか検討し、必要があればその標的分子の同定を試みる。また、赤芽球からの脱核は骨髄や胎仔肝臓で形成される赤芽球島で進行するが、その中心部にはマクロファージが存在する。赤芽球はそのマクロファージ上で増殖分化し、その最終過程で細胞膜に囲まれた核 (prenocytes) が赤芽球から離れマクロファージにより食食される。この系を NIH3T3 や Ba/F3 細胞を用いて再構築し、prenocytes の食食がアポトーシス細胞の食食と同じような機構で進行するかどうか検討する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ① Nagata, S., Hanayama, R. and Kawane, K.: Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* 140: 619-630, 2010
- ② Suzuki, J., Umeda, M., Sims JP. and Nagata, S.: Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature* 468: 834-838, 2010
- ③ Kawane, K., Tanaka, H., Kitahara, Y., Shimaoka, S. and Nagata, S.: Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 19432-19437, 2010
- ④ Segawa, K., Suzuki, J. and Nagata, S.: Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 19246-19251, 2011
- ⑤ Toda, S., Hanayama, R. and Nagata, S.: Two-Step Engulfment of Apoptotic Cells. *Mol. Cell Biol.* 32: 118-125, 2012
- ⑥ Imao, T. and Nagata, S.: Apaf-1- and Caspase-8-independent apoptosis. *Cell Death Differ* 20: 343-352, 2013
- ⑦ Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S.: Calcium-dependent Phospholipid Scramblase Activity of TMEM16 Protein Family Members. *J Biol Chem.*, in press, 平成23年 日本学士院・会員
平成24年 名誉博士 (チューリッヒ大学)
平成24年 日本癌学会 吉田富三賞
平成24年 Debrecen Award (Hungary)

ホームページ

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