

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成28年 4月25日現在

機関番号：14401

研究種目：特別推進研究

研究期間：2010～2015

課題番号：22000013

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)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門教授

研究者番号：70114428

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：318,700,000円

研究成果の概要：リン脂質はフリッパーゼの作用により細胞膜の外膜と内膜の間で非対称的に分布している。この非対称的な分布は細胞がアポトーシスに陥った場合や活性化された場合、スクランブラーゼの作用により崩壊する。本研究では2個のP4-type ATPase (ATP11A, ATP11C)をフリッパーゼ、TMEM16 familyの5個のメンバー(16C, 16D, 16F, 16G および 16J)をCa²⁺によって活性化されるスクランブラーゼ、XKR familyの3個のメンバー(Xkr4, Xkr8 および Xkr9)をアポトーシス時にカスパーゼによって活性化されるスクランブラーゼとして同定した。また、アポトーシス細胞の貪食はフォスファチジルセリン受容体による捕食過程とインテグリンあるいはMerTKを介した取り込みの2段階からなることを見いだした。

Phospholipids at plasma membranes are asymmetrically distributed between inner and outer leaflets by the action of a flippase(s). This asymmetrical distribution is disrupted by the action of a scramblase(s) in various biological processes. In this project, we identified two P4-type ATPases (ATP11A and ATP11C) as flippases, five TMEM16 family members (16C, 16D, 16F, 16G and 16J) as Ca²⁺-dependent scramblase, and three XKR family members (XKR4, XKR8 and XKR9) as caspase-dependent scramblase. We also showed that the engulfment of apoptotic cells proceeds in two steps of tethering and internalization.

研究分野：医歯薬学

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、フォスファチジルセリン

1. 研究開始当初の背景

アポトーシスを起こした細胞はマクロファージによって速やかに貪食、分解される。私達は死細胞のDNAがマクロファージによって分解されることを利用して死細胞の貪食を定量的にAssayする方法を樹立した。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(PtdSer)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はタイプI膜タンパク質であり、その細胞外領域を用いてPtdSerを認識、死細胞を捕捉する。

2. 研究の目的

細胞膜を構成するPtdSer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、PtdSerが細胞表面に露出する。そこで、本研究ではこのフリッパーゼ、スクランブラーゼを同定し、PtdSerが非対称的に維持されている分子機構、PtdSerが暴露される分子機構を解明することを目的とする。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の貪食促進能力はその細胞内領域を欠損させても減少しない。このことはTim-4と協調的に作用する分子の存在を示唆している。そこで、その分子を同定し、死細胞貪食のシグナル伝達機構を解明することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) スクランプラーゼの同定

アポトーシス時の PtdSer 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 Ca^{2+} にも依存している。実際、リンパ球系細胞株 Ba/F3 を Ca^{2+} 非存在下、低濃度の Ca^{2+} -ionophore (A23187) で刺激すると、一過的に PtdSer が暴露された。そこで、A23187 で処理、PtdSer を暴露する細胞のうち、最もよく PtdSer を暴露する約 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、A23187 による刺激、FACS による分画を繰り返すことにより、強く PtdSer を暴露する細胞株を得る。ついで、この細胞より cDNA library を作製し、これを Ba/F3 細胞に導入し、細胞膜で PtdSer のスクランブルを促進する分子を同定する。

(2) フリッパーゼ同定

ヒト白血病細胞株 KBM7 は 8 番の染色体以外にはハプロイドとして存在する。この細胞にレトロウイルスで感染させることにより網羅的に変異を導入する。次いで蛍光で標識された PtdSer (NBD-PS) の細胞内への取り込みを指標に、フリッパーゼ活性を測定、その活性を失った細胞集団を FACS により分取する。次いでこの細胞集団から染色体 DNA を調製、レトロウイルスの挿入部位を次世代 DNA sequencer を用いて決定する。

(3) 死細胞の貪食

浮遊細胞である Ba/F3 細胞には死細胞の貪食能が全く存在しない。そこでこの細胞に integrin- $\alpha_4\beta_1$ 、Tim-4、MerTK 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作用機構、相互作用、シグナル伝達を解析する。

4. 研究成果

(1) PtdSer の細胞表面への暴露

① Ca^{2+} 依存リン脂質スクランブラーゼ

A23187 による処理と、PtdSer を強く発現する細胞のソーティングを 19 回繰り返し、低濃度の A23187 により強く PtdSer を暴露する細胞株を樹立した。この細胞より、レトロウイルスをベクターとした cDNA library を調製、これを Ba/F3 に導入し、A23187 によって PtdSer 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 PtdSer 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膜タンパク質 TMEM16F をコードしており、点変異が導入されたため構成的にスクランブラーゼ活性を示した。血小板が PtdSer を暴露できないために血友病の症状を示す Scott Syndrome と呼ばれる病気が知られている。この患者では TMEM16F 遺伝子の 12 番イントロンの Splice Acceptor 部位に

点変異が導入されていた。

ついで、血小板特異的に TMEM16F 遺伝子を欠損したマウスを樹立した。このマウス血小板をトロンビンで活性化しても PtdSer は暴露されず、血小板のトロンビン産性能も顕著に減少していた。また、血管障害で誘導される血小板の凝固過程、凝固した血小板上での PtdSer 暴露に異常が見られた。

TMEM16F は 10 個のメンバーからなるファミリーに属している。それぞれのメンバーを TMEM16F 欠損細胞に導入し、その細胞での A23187 による PtdSer の暴露を解析した。その結果、TMEM16F 以外に TMEM16C、16D、16G および 16J が細胞膜上でリン脂質スクランプリング活性を持つことを見いだした。これらのメンバーのうち 16F は様々な細胞で普遍的に発現しているのに対し、16C や 16D は脳、16G、16J は腸特異的に発現していた。

② カスパーゼに依存したリン脂質スクランブラーゼ

一方、上記 19 回ソートした細胞から作成した cDNA library を Ba/F3 細胞に導入し、構成的に PtdSer を暴露する細胞集団をえたが、その集団に XKR8 と呼ばれる膜タンパク質を発現する集団が存在した。この遺伝子を欠損した細胞を樹立したところ、その細胞は A23187 処理による PtdSer の暴露は正常に起こったが、Fas リガンドによるアポトーシス時の PtdSer 暴露は起こらなかった。Xkr8 の C-末端細胞内領域にはカスパーゼ 3/7 によって認識される配列が認められ、この配列に変異を導入するとアポトーシス時の PtdSer 暴露を促進しなかった。以上より XKR8 はアポトーシス時にカスパーゼによって切断されてリン脂質をスクランブルする分子と結論した。Xkr8 も 9 個のメンバーからなるファミリーに属し、様々な細胞で普遍的に発現する Xkr8 以外に、脳で特異的に発現する Xkr4、腸で発現する Xkr9 もカスパーゼによって活性化されるスクランブラーゼとして作用した。

③ フリッパーゼの同定

KBM7 細胞にレトロウイルスを用いて変異を導入した後、FACS によりソーティングを 2 度繰り返すことによりフリッパーゼ活性を失った細胞集団を濃縮した。ついでこの集団におけるレトロウイルス挿入部位を次世代 DNA sequencer を用いて決定した。その結果、P4-type ATPase である ATP11C と、そのシャペロンとして作用する CDC50A をフリッパーゼとして同定した。ATP11C の細胞内 ATPase ドメインにはカスパーゼ認識配列が 3 個存在し、アポトーシス時に切断、その ATPase は不活化された。そして ATP11C が切断、不活化されないと

アポトーシス時、PtdSer の暴露はおこらなかった。

P4-type ATPase は 14 個のメンバーから成り立っている。ATP11C 欠損細胞にこれらのメンバーを CDC50A と共に発現させた細胞を樹立、ATP11C 以外に、ATP11A, ATP8A2 が細胞膜において flippase 活性を持つことを見いだした。ATP11A, ATP11C は普遍的に様々な細胞で発現しているのに対し、ATP8A2 は脳特異的に発現していることから、ほとんどの細胞において ATP11A と ATP11C がフリッパーゼとしての活性を担っていると結論した。

(2) 死細胞の食食

酸性条件下でのみ蛍光を発する pHrodo で標識された死細胞を用ることにより、容易に死細胞の食食を検定できる系を樹立した。ついで、Ba/F3 に Tim-4 および integrin- $\alpha_v\beta_3$ を導入するとその細胞は MFG-E8 存在下で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 による死細胞の取り込みの 2 段階からなることを見いだした。

実際、マウス腹腔に常在しているマクロファージは Tim-4 と共に PtdSer を結合する Protein S に対するチロシンキナーゼ型の受容体、MerTK を発現していた。そして、死細胞の食食には Tim-4、MerTK 両者が必要であった。

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 42 件)

1. Nagata, S.: Killer enzymes tethered. **Nature**, in press, 2016 【査読無】 (doi:10.1038/nature18439)
2. Nagata, S., Suzuki, J., Segawa, K. and Fujii, T.: Exposure of Phosphatidylserine on the Cell Surface. **Cell Death Differ.**, in press, 2016【査読有】 (doi:10.1038/cdd.2016.7)
3. Segawa, K., Kurata, S. and Nagata, S.: Human type IV P-type ATPases that work as plasma membrane phospholipid flippases and their regulation by caspase and calcium. **J. Biol. Chem.**, 291: 762-772, 2016 【査読有】 (doi:10.1074/jbc.M115.690727)
4. Segawa, K. and Nagata, S.: An apoptotic "eat me" signal: phosphatidylserine exposure. **Trends Cell Biol.**, 25: 639-650, 2015 【査読有】 (doi:10.1016/j.tcb.2015.08.003)
5. Gyobu, S., Miyata, H., Ikawa, M., Yamazaki, D., Takekuma, H., Suzuki, J. and Nagata, S.: A role of TMEM16E carrying a scrambling domain in sperm motility. **Mol. Cell Biol.**, 36: 645-659, 2015 【査読有】 (doi:10.1128/MCB.00919-15.)
6. Fujii, T., Sakata, A., Nishimura, S., Eto, K. and Nagata, S.: TMEM16F is required for phosphatidylserine exposure and microparticle release in activated mouse platelets. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 112: 12800-12805, 2015 【査読有】 (doi:10.1073/pnas.1516594112)
7. Motani, K., Ito, S. and Nagata, S.: DNA-mediated cyclic GMP-AMP synthase-dependent and -independent regulation of innate immune responses. **J. Immunol.**, 194: 4914-4923, 2015 【査読有】 (doi:10.4049/jimmunol.1402705)
8. Segawa, K., Suzuki, J. and Nagata, S.: Flippases and scramblases in the plasma membrane. **Cell Cycle**, 13: 2990-2991, 2014 【査読有】 (doi:10.4161/15384101.2014.962865)
9. Suzuki, J., Imanishi, E. and Nagata, S.: Exposure of phosphatidylserine by Xk-related protein family members during apoptosis. **J. Biol. Chem.**, 289: 30257-30267, 2014 【査読有】 (doi:10.1074/jbc.M114.583419)
10. Suzuki, J. and Nagata, S.: Phospholipid scrambling on the plasma membrane. **Methods Enzymol.**, 544: 381-393, 2014 【査読有】 (doi:10.1016/B978-0-12-417158-9.00015-7)
11. Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, TR., Matsuda, F. and Nagata, S.: Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. **Science**, 344: 1164-1168, 2014【査読有】 (doi:10.1126/science.1252809)
12. Yamaguchi, H., Maruyama, T., Urade, Y. and Nagata, S.: Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. **eLife**, 3: e02172, 2014 【査読有】 (doi:10.7554/eLife.02172)
13. Toda, S., Segawa, K. and Nagata, S.: MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. **Blood**, 123: 3963-3971, 2014 【査読有】 (doi:10.1182/blood-2014-01-547976)
14. Nishi, C., Toda, S., Segawa, K. and Nagata, S.: Tim4- and MerTK-mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. **Mol. Cell Biol.**, 34: 1512-1520, 2014 【査読有】 (doi:10.1128/MCB.01394-13)
15. Suzuki, J., Denning, DP., Imanishi, E., Horvitz, HR. and Nagata, S.: Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. **Science**, 341: 403-406, 2013 【査読有】 (doi:10.1126/science.1236758)
16. 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.**, 288: 13305-13316, 2013 【査読有】
(doi:10.1074/jbc.M113.457937)
17. Imao, T. and Nagata, S.: Apaf-1- and Caspase-8-independent apoptosis. **Cell Death Differ.**, 20: 343-352, 2013 【査読有】
(doi:10.1038/cdd.2012.149)
 18. Toda, S., Hanayama, R. and Nagata, S.: Two-step engulfment of apoptotic cells. **Mol. Cell Biol.** 32: 118-125, 2012 【査読有】
(doi:10.1128/MCB.05993-11)
 19. Miyanishi, M. Segawa, K. and Nagata, S.: Synergistic effect of Tim4 and MFG-E8 null mutations on the development of autoimmunity. **Int. Immunol.**, 24: 551-559, 2012 【査読有】 (doi:10.1093/intimm/dxs064)
 20. Segawa, K., Suzuki, J. and Nagata, S.: Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108: 19246-19251, 2011 【査読有】
(doi:10.1073/pnas.1114799108)
 21. 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 【査読有】 (doi:10.1073/pnas.1010603107)
 22. Suzuki, J., Umeda, M., Sims JP. and Nagata, S.: Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. **Nature** 468: 834-838, 2010 【査読有】
(doi:10.1038/nature09583)
 23. Nagata, S., Hanayama, R. and Kawane, K.: Autoimmunity and the clearance of dead cells. **Cell** 140: 619-630, 2010 【査読有】
(doi:10.1016/j.cell.2010.02.014)
 24. 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.**, 40: 1778-1785, 2010 【査読有】
(doi:10.1002/eji.200940096)
 25. 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】
(doi:10.1038/cdd.2009.186)
 26. Kitahara, Y., Kawane, K. and Nagata, S.: Interferon-induced TRAIL-independent cell death in DNase II^{-/-} embryos. **Eur. J. Immunol.**, 40: 2590-2598, 2010 【査読有】
(doi:10.1002/eji.201040604)
- 〔学会発表〕 (計 138 件)
1. Nagata, S. (Dec 10, 2015) Apoptosis and exposure of phosphatidylserine, **The 29th annual Richard K. Gershon memorial lecture**, The Yale University School of Medicine, New Haven CT, USA
 2. Nagata, S. (Nov 8, 2015) Apoptosis and exposure of phosphatidylserine, **Keynote address**, Cell Symposia: Cell Death and Immunity, Berkeley, CA, USA
 3. Nagata, S. (Nov 6, 2015) Exposure of phosphatidylserine in apoptotic cells, **Regenerative Medicine Seminar Series 2015**, The Stanford University, Stanford, CA, USA
 4. Nagata, S. (Oct 21, 2015) Exposure of phosphatidylserine during apoptosis and engulfment of dead cells, **Plenary Lecture**, Japan-Australia meeting on Cell Death, WEHI, Melbourne, Australia
 5. Nagata, S. (Jul 11, 2015) Exposure of phosphatidylserine during apoptosis and engulfment of dead cells, **Keynote Lecture**, International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015, The University of Tokyo, Tokyo
 6. Nagata, S. (May 20, 2015) Exposure of phosphatidylserine during apoptosis and engulfment of dead cells, **Keynote Lecture**, The 15th International TNF Conference, Ghent, Belgium
 7. Nagata, S. (Mar 14, 2015) Apoptosis and exposure of phosphatidylserine, **Keynote Lecture**, Aichi Cancer Center 50th Anniversary International Symposium, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya
 8. Nagata, S. (Apr 3, 2014) Apoptosis and engulfment of dead cells, **The Henry Kunkel Lecture 2014**, The Rockefeller University, New York, NY, USA
 9. Nagata, S. (Nov 21, 2013) Cell death and clearance of dead cells, **Keynote Lecture**, Swiss-Kyoto Symposium 2013, ETH, Zurich, Switzerland
 10. Nagata, S. (Sep 17, 2013) Apoptosis and engulfment of dead cells by macrophages, **Keynote Speech**, Koc University-Kyoto University International Symposium on "New Frontiers in Health Sciences & Technologies", Kyoto University, Kyoto
 11. Nagata, S. (Apr 15-19, 2013) Apoptosis, exposure of phosphatidylserine, and engulfment of apoptotic cells, **Keynote Lecture**, Cold Spring Harbor Asia Conferences on Mechanisms and Functions of Non-apoptotic Cell Death, Jiangsu, China
 12. Nagata, S. (Dec 7, 2012) Apoptosis and its defect, **Award Lecture**, Debrecen Award for Moleculare Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary
 13. Nagata, S. (Nov 22, 2012) Engulfment of apoptotic cells, **Plenary Lecture**, The special celebratory symposium of Walter and Eliza Hall Institute, WEHI, Melbourne, Australia
 14. Nagata, S. (May 2, 2012) Apoptosis and exposure of phosphatidylserine, **Edwin J.**

- Cohn Lecture**, The Harvard Medical School, Boston, MA, USA
15. Nagata, S. (Apr 27, 2012) Apoptosis and its Failure, **Award Lecture**, Honorary Doctorate from University of Zurich, Zurich, Switzerland
 16. Nagata, S. (Mar 29, 2012) Apoptosis and its Failure, **“Karolinska Research Lectures”**, The Karolinska Institute, Stockholm, Sweden
 17. Nagata, S. (Sep 13, 2011) Exposure of phosphatidylserine to the cell surface, **Keynote Seminar**, The Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, France
 18. Nagata, S. (Dec 27, 2010) Apoptosis, engulfment, and degradation of dead cells, **2010 Charles Janeway Lecture**, the Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy, Moscow, Russia
 19. Nagata, S. (May 9, 2010) Engulfment and degradation of dead cells, **Organizer, Keynote Address**, The Conference of "Clearance of Dying cells in a Healthy and Diseased Immune System", Jerusalem, Israel

[図書] (計 12 件)

1. Toda, S., Nishi, C., Yanagihashi, Y., Segawa, K. and Nagata, S.: Clearance of apoptotic cells and pyrenocytes. In: **Curr. Top. Dev. Biol.**, Hermann Steller, eds. (Elsevier) 114: 267-295, 2015
2. Kawane, K. and Nagata, S.: DNA Degradation and its Defects. In: **Cold Spring Harb. Perspect Biol.**, Ruslan Medzhitov, eds. (Cold Spring Harbpr Laboratory Press, New York), Vol. Innate Immunity and Inflammation III: 141-154, 2014
3. Nagata, S. and Kawane, K.: Autoinflammation by endogenous DNA. In: **Adv. Immunol.** Frederick W. Alt, K. Frank Austen, Tasuku Honjo, Fritz Melchers, Jonathan W. Uhr and Emil R. Unanue, eds. (Elsevier) 110: 139-161, 2011
4. Hanayama, R., Miyanishi, M., Yamaguchi, H., Suzuki, J. and Nagata, S.: Engulfment of apoptotic cells and its physiological roles. In: **Cell Death**, Gerry Melino, and D. Vaux, eds. (John Wiley & Sons) pp.165-175, 2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称 : Method for screening for inhibitor of atp11c or cdc50a

発明者 : 長田重一、瀬川勝盛

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2015/060817

出願年月日 : 平成 27 年 4 月 7 日

国内外の別 : 国外

名称 : Method of screening modulator of xkr8

発明者 : 長田重一、鈴木 淳

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2013/080692

出願年月日 : 平成 25 年 11 月 13 日

国内外の別 : 国外

名称 : Method for screening a modulator of a TMEM16 family member

発明者 : 長田重一、鈴木 淳、藤井俊裕

種類 : 特許

番号 : PCT/JP2013/061699

出願年月日 : 平成 25 年 4 月 16 日

国内外の別 : 国外

名称 : Method of screening a blood coagulation modulator

発明者 : 長田重一、鈴木 淳

種類 : 特許

番号 : 特願 2012-531917 号

出願年月日 : 平成 23 年 8 月 31 日

国内外の別 : 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長田 重一 (NAGATA, Shigekazu)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門教授

研究者番号 : 7 0 1 1 4 4 2 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 淳 (SUZUKI Jun)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門准教授

研究者番号 : 3 0 5 1 1 8 9 4

瀬川 勝盛 (SEGAWA, Katsumori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号 : 2 0 5 4 2 9 7 1

藤井 俊裕 (FUJII, Toshihiro) H24.4-28.3

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・寄附研究部門助教

研究者番号 : 3 0 5 8 0 1 0 4

華山 力成 (HANAYAMA, Rikinari) H22.4-23.9

金沢大学・医学系・教授

研究者番号 : 4 0 4 0 3 1 9 1