

「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症機構と治療技術」
平成 20 年度採択研究代表者

長田 重一

京都大学大学院医学研究科・教授

アポトーシス細胞の貪食・分解とその異常

§ 1. 研究実施の概要

私達はアポトーシス細胞の貪食に関与している分子として MFG-E8、Tim-4、Tim-1 を同定した。そして、MFG-E8 遺伝子の欠損によるアポトーシス細胞の貪食異常は SLE 様の自己免疫疾患をもたらすこと、DNase II 遺伝子の欠損はマクロファージの活性化による IFN β や TNF α の産生を通して貧血や関節リウマチを発症させることを報告した。本年度は(1) ヒト SLE の患者における MFG-E8 遺伝子を解析し、2名の患者に特異的な点変異を見いだした。(2) DNase II 欠損マクロファージにおける IFN β 遺伝子の活性化には Eya (Eyes absent) とよばれる特異的なセリン/スレオニン phosphatase が関与していることを見いだした。

§ 2. 研究実施体制

(1) 「長田」グループ

- ① 研究分担グループ長: 長田 重一 (京都大学、教授)
- ② 研究項目: アポトーシス細胞の貪食・分解とその異常

§ 3. 研究実施内容

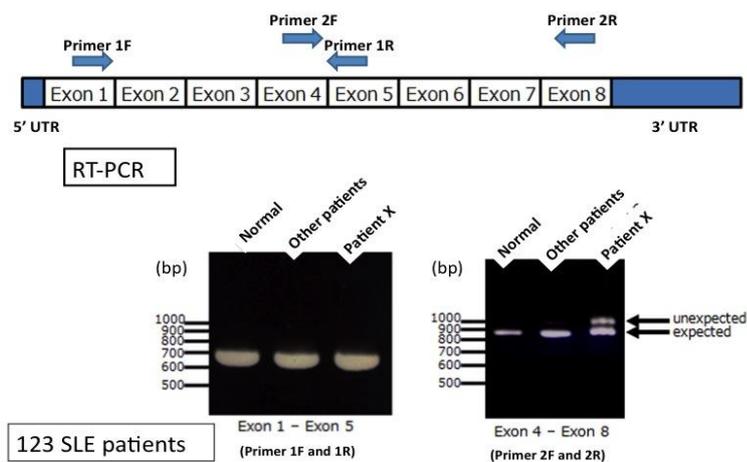
(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(1) アポトーシス細胞の貪食

私達はマウスでの MFG-E8 の欠損や過剰が ANA (antinuclear antibody) 抗 DNA 抗体、抗リン脂質抗体などの産生を促し、SLE 様の自己免疫疾患を発症させることを報告した。今回、ヒトの

約200名の SLE 患者の MFG-E8 mRNA, MFG-E8 染色体遺伝子を解析し、その2名において、MFG-E8 遺伝子のイントロン6に点変異を見いだした(図1)。この点変異により、MFG-E8 の異常なスプライシングがおこり、その C-末端領域が欠損した MFG-E8 が産生された。このタンパク質はアポトーシス細胞への結合能、死細胞の貪食能は野生型と同程度であったが、異常な糖鎖修飾がおこり、マウス体内での分解は野生型に比べ顕著に抑制されていた。そして、このタンパク質を投与したマウスは ANA の上昇が観察された。以上の結果から、ヒトに関しても MFG-E8 の異常が SLE を導く可能性がある結論した (Yamaguchi et al., in press)。

A



B

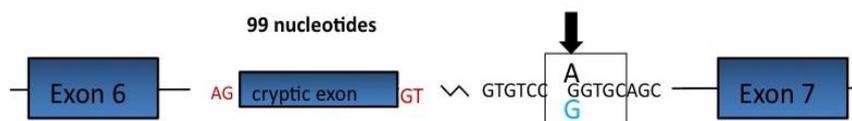


図1 ヒト SLE 患者における MFG-E8 遺伝子に見いだされた点変異

A. cryptic エクソンを含む MFG-E8 mRNA の検出。B. SLE 患者のイントロン 6 に見いだされた A から G への点変異。これによりイントロン内の 99 nucleotide が cryptic exon として組み込まれる。

(2) マクロファージによる死細胞 DNA の分解

アポトーシス細胞の DNA は死細胞内で CAD (caspase-activated DNase) によってヌクレオソーム単位へ分解される。ついで、死細胞はマクロファージによって貪食され、その DNA はリソソームにおいて DNase II によってヌクレオチドへと分解される。DNase II 遺伝子を欠損したマウスは種々の臓器に未分解の DNA を蓄積したマクロファージが認められ、発生の後期に極度の貧血により死滅する。このマウスでは IFN β が DNA を蓄積したマクロファージにより構成的に分泌され赤芽球などに作用、貧血を引き起こしていると考えられる。今回、リソソームに蓄積した未分解 DNA

による IFN β 遺伝子の活性化に関与している分子を同定するため発現クローニングを行った。すなわち、マウス繊維芽細胞より調製した cDNA をレトロウィルスベクターに挿入、cDNA ライブラリー(約 20000 クローン) を作成した。このライブラリーを400個のグループにわけ、DNase II 欠損マウスから調製した MEF (mouse embryonal fibroblasts)に導入した。ついで、その細胞をアポトーシスを起こした胸腺細胞と共培養し、死細胞を貪食させ、IFN β の産生を ELISA を用いて検討した。その結果、Eya (Eyes absent) と呼ばれる分子が DNA に応答した IFN β 遺伝子の活性化を促進することを見いだした。Eya は、本来転写因子として同定されたが、数年前、その C-末端領域に Tyrosine- phosphatase 活性が見出された。私達はこの因子を動物細胞で発現精製し、Eya には C-末端領域の Tyrosine-phosphatase ばかりでなく、その N-末端領域に Threonine-phosphatase 活性が存在すること、その Threonine-phosphatase が DNA による IFN β 遺伝子の活性化を促進することを見いだした(4-①-1)。さらに、この分子は NDV (Newcastle Disease Virus) による IFN β 遺伝子の活性化にも関与していること、NDV により、一過的にこの分子が IPS-1 と呼ばれる adaptor 分子に会合することも示された (Okabe et al., Nature 460, 520, 2009)。

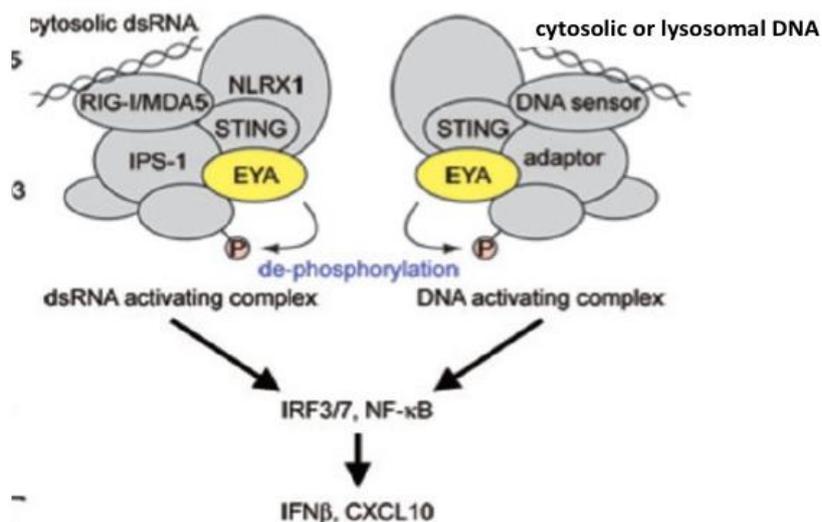


図2 ウィルス感染時、ウィルス RNA は RIG-I/MDA5 と呼ばれる分子に結合、ISP-1 などの adaptor 分子と会合し、IFN 遺伝子の発現へと導く。Eya はウィルス感染などの刺激に応答してこの複合体に結合し、そのコンポーネントの脱リン酸化によりその活性を制御すると考えられる。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

・論文詳細情報

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
(doi:10.1002/eji.200940096)

2. Nagasaka, A., Kawane, K., Yoshida, H. and Nagata, S.: Apaf-1-independent programmed cell death in mouse development. *Cell Death Differ.* in press
(doi:10.1038/cdd.2009.186)
3. Okabe, Y., Sano, T. and Nagata, S.: Regulation of the innate immune response by threonine phosphatase of Eyes absent. *Nature* 460: 520-524, 2009
(doi:10.1038/nature08138)
4. Dasgupta, S. K., Abdel-Monem, H., Niravath, P., Le, A., Bellera, R. V., Langlois, K., Nagata, S., Rumbaut, R. E., and Thiagarajan, P.: Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. *Blood* 113: 1332-1339, 2009
(doi:10.1182/blood-2008-07-167148)