

「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

H23 年度 実績報告
----------------

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. 研究実施体制

(1) 「長田」グループ

① 研究代表者: 長田 重一 (京都大学大学院医学研究科・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

## § 2. 研究実施内容

### (1) アポトーシス細胞の食食におけるフォスファチジルセリン

細胞膜のリン脂質は非対称的に分布されている。すなわち、フォスファチジルセリン (PS) やフォスファチジルエタノールアミン (PE) は内側に、フォスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリンは細胞の外側に位置している。この非対称性は細胞がアポトーシスに陥った場合、血小板が活性化された場合などに崩れ、細胞外に暴露された PS は貪食細胞への eat me シグナル、血液凝固因子への補酵素として作用する。昨年の本研究で私達は血小板の活性化においてリン脂質をスクランブルさせる膜蛋白質 TMEM16F を単離した。その過程で TMEM16F の構成的活性 (constitutive-active) 変異体を見いだした。この変異体を発現する細胞はアポトーシスの刺激無しに PS をその表面に暴露する。そこで、今回この細胞がマクロファージによって貪食されるかどうか検討した (3-1 文献1)。その結果、この細胞は低温では PS-受容体依存的にマクロファージに結合するが 25°C ではその結合能は失われ (図1)、in vitro, in vivo でマクロファージに貪食されることはなかった。以上の結果から、PS の暴露はアポトーシス細胞の貪食に必要なではあるが、十分ではないと結論した。

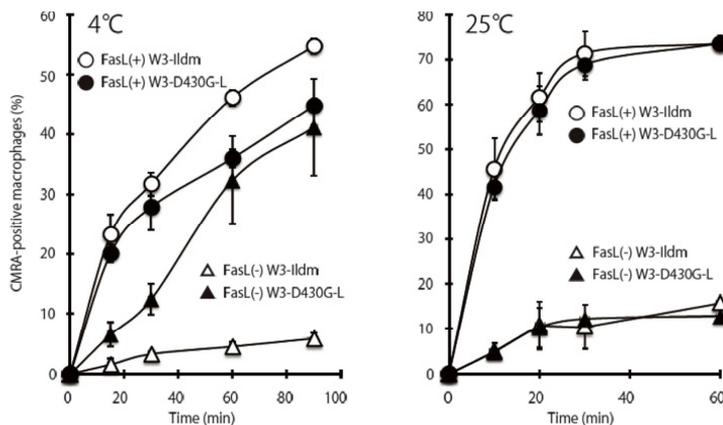


図1 PS 発現細胞のマクロファージへの結合。マウス細胞株(W3-Ildm) に TMEM16F の変異体(D430G-L) を発現させ、PS を暴露する細胞を樹立した。親株および W3-D430G-L 細胞を Cell-tracker で標識後、Fas リガンドで処理、あるいは処理せずにマウス腹腔マクロファージと 4°C あるいは 25°C で培養し、マクロファージへの結合を FACS で解析した。

### (2) Bリンパ球株を用いたアポトーシス細胞貪食の再構成。

私達はこれまでにアポトーシス細胞の貪食を促進する因子として MFG-E8、Tim-4 を単離した。これら因子はそれぞれ単独で NIH3T3 細胞で死細胞の貪食を促進することから、独立に作用すると考えられた。一方、脾臓 tingible-body macrophage などは MFG-E8、Tim-4 をともに発現することから、これらが協調的に作用するマクロファージの存在も示唆された。そこで、MFG-E8、Tim-4 の貪食における作用を検討するため、Ba/F3 マウス proB cell line での貪食系の再構築を試みた (3-1-文献2)。この細胞はアポトーシス細胞の貪食能はない。Tim-4 を発現すると PS 依存的にアポトーシス細胞は Ba/F3 に結合したが貪食は起こらなかった。さらに、integrin- $\alpha_v$ 、 $\beta_5$  を発現させると MFG-E8 依存してアポトーシス細胞の貪食が促進された (図2)。そして、この貪食過程は細胞内に Rac1 を発現させることにより増強した。以上より、マクロファージによる死細胞

の貪食は2段階で進行すること、まず Tim-4 による死細胞への結合、次いで MFG-E8/integrin による死細胞の貪食が起こることが示唆された。

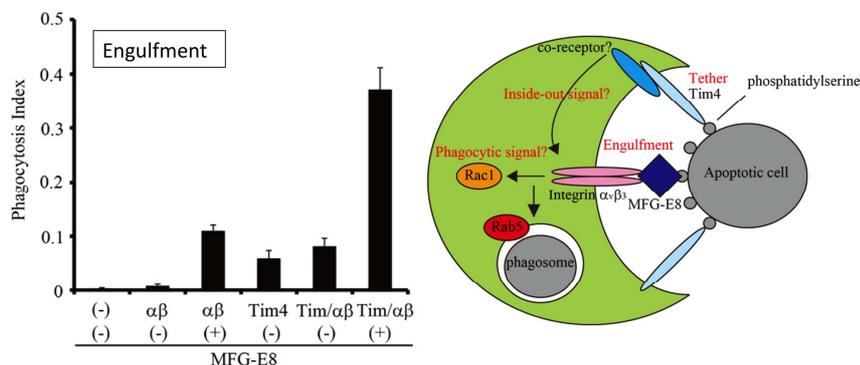


図2 2段階でのアポトーシス細胞の貪食。Ba/F3 細胞、integrin  $\alpha_v\beta_3$ 、Tim-4、integrin  $\alpha_v\beta_3$ /Tim-4 発現細胞をアポトーシス細胞と培養し、貪食を phagocytosis index (Ba/F3 一個あたりの貪食細胞の数)で表現した。右図は貪食過程の模式図。

### (3) Tim-4、MFG-E8 の欠損による SLE-type 自己免疫疾患

それでは、Tim-4、MFG-E8 などの貪食に関与する分子が欠損するとマウスではどのようなことが起こるであろうか、以前私達は MFG-E8 ノックアウトマウスは 129/B6 mixed background で SLE-type の自己免疫疾患を発症することを報告した。しかし、今回、B6 background ではその発症は認められなかった。一方、Tim-4、MFG-E8 両遺伝子を欠損するメスマウスは B6-background でも歳をとるに従い血清中の自己抗体価が増加し、その増加は抗 TNF $\alpha$ 抗体の投与、あるいは IFN $\alpha$ を誘導する薬剤プリステンの投与により顕著に促進された (3-1、文献5) (図3)。以上の結果は、アポトーシス細胞の貪食異常が自己免疫疾患へと導く可能性、ヒトの SLE-type 自己免疫疾患がそうであるようにその発症が TNF $\alpha$ によって抑制され、IFN $\alpha$ によって促進されることを示している。

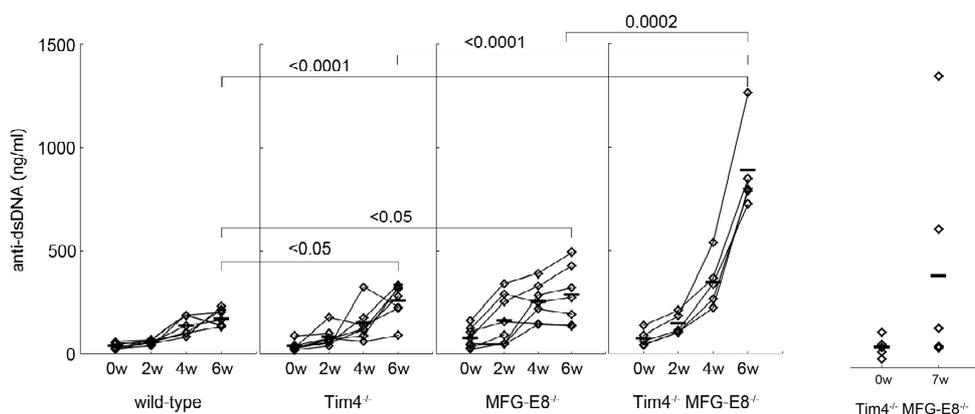


図3 MFG-E8/Tim-4 ノックアウトマウスにおける自己抗体産生。野生型、Tim-4、MFG-E8、Tim-4/MFG-E8 ノックアウトマウスに TNF $\alpha$ 抗体を投与し、血清中の DNA 抗体価を測定した。右図では Tim-4/MFG-E8 ノックアウトマウスに Pristine を投与7週間後に抗 DNA 抗体価を測定した。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Segawa, K., Suzuki, J., and Nagata, S. (2011) Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 19246-19251 (doi:10.1073/pnas.1114799108)
2. Toda, S., Hanayama, R., and Nagata, S. (2012) Two-step engulfment of apoptotic cells, *Mol. Cell. Biol.* **32**, 118-125 (doi:10.1128/MCB.05993-11)
3. Sano, T., and Nagata, S. (2011) Characterization of the threonine-phosphatase of mouse eyes absent 3, *FEBS Lett* **585**, 2714-2719 (doi:10.1016/j.febslet.2011.07.029)
4. Alonzo, M. T., Lacuesta, T. L., Dimaano, E. M., Kurosu, T., Suarez, L. A., Mapua, C. A., Akeda, Y., Matias, R. R., Kuter, D. J., Nagata, S., Natividad, F. F., and Oishi, K. (2012) Platelet Apoptosis and Apoptotic Platelet Clearance by Macrophages in Secondary Dengue Virus Infections, *J Infect Dis* **205**, 1321-1329 (doi:10.1093/infdis/jis180)
5. Miyanishi, M., Segawa, K., and Nagata, S. (2012) Synergistic effect of Tim4 and MFG-E8 null mutations on the development of autoimmunity, *Int. Immunol.*, in press