戦略的創造研究推進事業
発展研究（SORST）

研究終了報告書

研究課題
「アポトーシスと貪食の分子機構とその生理作用」

研究期間：平成１５年１２月１日～
平成２１年３月３１日

長田　重一
（京都大学大学院医学研究科・教授）

１．研究課題名

アポトーシスと貪食の分子機構とその生理作用

２．研究実施の概要

生体の発生過程では数多くの不要な細胞、害となる細胞が生成されるが、これらはアポトーシスと呼ばれる過程を経て速やかに除去される。また成体においてもその恒常性を維持するため老化した細胞は死滅し、新しい細胞と置き換わる。一方、ウイルスに感染した細胞、がん化した細胞はリンパ球などに攻撃され死滅する。アポトーシスでは、細胞、およびその核が凝縮、断片化しながら死滅し、マクロファージにより貪食される。この過程の分子機構は長い間不明であったが、私達は、1990 年代、ある種のサイトカイン、Fas リガンドが“death factor”としてアポトーシスを誘導することを見出した。そして、この系の異常が、細胞の異常増殖、がん、自己免疫疾患、組織の破壊などさまざまな疾患へと導くことを明らかにした。ついで、アポトーシスの際には、カスパーゼと呼ばれるたんぱく質分解酵素、その下流で作用する DNase, CAD (caspase-activated DNase)が活性化されることを示した。ついで、CAD 欠損マウスの解析から、死細胞の DNA は死細胞がマクロファージに貪食された後、そのリソソームで DNase II によっても分解されること、DNase II は赤芽球から脱落した核 DNA の分解にも関与していることを示した。DNase II 遺伝子の欠損マウスは胎仔の段階で死滅した。一方、DNase II に相同性のある DLAD (DNaseII-like acid DNase)は目に特異的に発現していること、DLAD の欠損マウスは目の水晶体に未分解の DNA が残存し、白内障を呈することも見出した。さらに、アポトーシス細胞の DNA が貪食された後マクロファージ内で分解されることを用いて死細胞貪食の Assay 系を樹立し、アポトーシス細胞とマクロファージを橋渡しする分子(MFG-E8)を単離した。本研究はこのような状況をふまえ、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、その生理作用、また死細胞や赤芽球 DNA 分解の分子機構・生理作用を明らかにすることを目的とした。

本研究の結果、(1) DNase II遺伝子欠損マウスの種々の組織には貪食した死細胞由来のDNAを蓄積したマクロファージが存在すること、このマクロファージから TLR (Toll-like receptor)-independentに産生されたIFN (interferon) βがマウス胎仔に対して致死的に作用することを示した。 (2) DNase II遺伝子を生後欠損させたマウスは歳を経るに従い、リュマチ性関節炎を発症した。抗TNF(tumor necrosis factor) α抗体はこの発症を抑制することからDNAを蓄積したマクロファージから産生されたTNFαが関節炎の発症に関与していると結論した。 (3) アポトーシス細

胞はその細胞表面にリン脂質フォスファチヂルセリンを暴露し、これがマクロファージに対して“eat me”シグナルとして作用するが、赤芽球から脱落した核もフォスファチヂルセリンを暴露し、この分子がマクロファージによって認識されることを示した。（4）アポトーシス細胞の貪食に関与するMFG-E8遺伝子の欠損マウスは抗核抗体、抗DNA抗体などを産生し、腎炎などのヒトSLEに類似した自己免疫疾患を発症した。また、アポトーシス細胞の貪食に関与する分子として新たにTim-4と呼ばれる膜蛋白質を同定した。

以上、アポトーシス細胞の貪食と分解に関して研究は順調に進展し、アポトーシス細胞が貪食されないとSLEタイプの自己免疫疾患を引き起こすこと、アポトーシス細胞のDNAが分解されないと強い炎症を引き起こし貧血や関節炎などを引き起こすことを見出した。今後はこれらの現象の詳細な分子機構を明らかにする必要があろう。特に死細胞のDNAがマクロファージのリソソームに蓄積することによりどのようにIFNβやTNFα遺伝子の活性化に導くのか大きな課題であろう。一方、フォスファチジルセリンの受容体と同定したTim-4がどのようなマクロファージによって発現されているか、どのように作用するかなども今後の大きな課題であろう。

本研究による主要な発表論文

1. Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M. Uchiyama, Y. and Nagata, S.: Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. **Science** 304: 1147-1150, 2004
2. Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., and Nagata, S.: Lethal anemia caused by interferon-β produced in mouse embryos carrying undigested DNA. **Nat. Immunol.** 6: 49-56, 2005
3. 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
4. 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
5. Nagata, S.: DNA degrdation in development and programmed cell death. **Annu. Rev. Immunol.** 23: 853-875, 2005
6. 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
7. Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S.: Identification of Tim-4 as a phosphatidylserine receptor. **Nature** 450: 435-439, 2007
8. Nagata, S.: Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. **Immunol. Rev.** 220: 237-250, 2007

9. 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

国際会議での主要な招待講演（Keynote Address, Plenary Lectures）

Feb. 2004	**Keynote Address**, Keystone Symposium on Apoptosis in Development, Keystone, Colorado, USA
Jan. 2005	**Keynote Address**, AACR Special Conference on Regulation of Cell Death in Oncogenesis, Wikoloa Village, Hawaii, USA
Jun. 2005	**Keynote Address**, Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance, New London, Connecticut, USA
Dec. 2005	**Plenary Lecture**, The International Symposium on "Molecular aspects of apoptosis and Cancer", Trivandrum, Kerala, India
Mar. 2006	**Keynote Address**, The 6th Hunter Cellular Biology Meeting, Hunter Valley NSW, Australia
May 2008	**The Marian Elliott Koshland Memorial Lecture**, Chicago University, Chicago, Chicago, USA
Oct. 2008	**Plenary Lecture**, The 9th International Congress on Cell Biology, Seoul, Korea

３．研究構想

生体の発生過程で数多くの不要な細胞、害となる細胞が生成される。これらの細胞は発生の過程で速やかに除去される。また成体においてもその恒常性を維持するため老化した細胞は速やかに除去され、新しい細胞と置き換わる。一方、ウイルスに感染した細胞、がん化した細胞はリンパ球などの白血球細胞に攻撃され体内から除かれる。このように生体内では毎日、数億の細胞が死滅する。

1970 年代、Wyllie らは肝臓で死につつある細胞の観察から、細胞は大きく２通りの過程を経て死滅することを認め、これをアポトーシス、ネクローシスと命名した[1]。アポトーシスでは、細胞、およびその核が凝縮、断片化しながら死滅し、速やかに周りの貪食細胞に貪食される。すなわち、この過程では死滅する細胞からその内容物が放出されることはなく、クリーンな細胞死と考えられる。一方、ネクローシスの過程では細胞は膨潤、破裂し、その内容物が放出され、炎症を引き起こすと考えられた。しかし、アポトーシスの分子機構、生理作用に関しては長い間不明であった。

私たちは、1990 年代初め、ある種のサイトカイン(Fas リガンド)が “death factor” としてその特異的受容体に結合しアポトーシスを誘導することを見出した[2, 3]。そして、この系の異常が、細胞の異常増殖、がん、自己免疫疾患、組織の破壊などさまざまな疾患へと導くことを明らかにした[4, 5]。ついで、Fas リガンドによるアポトーシスの反応系を用いて、アポトーシスの際には、カスパーゼと呼ばれる一群のたんぱく質分解酵素[6, 7]、ならびにその下流で作用する CAD (caspase-activated DNase) と呼ばれる DNase が活性化されることを示した[8]。そして、CAD 欠損マウスの解析から、死細胞の DNA は死細胞ばかりでなく、死細胞がマクロファージなどの貪食細胞に貪食された後、そのリソソームで DNase II と呼ばれる酵素によって切断されること、この DNase II は赤芽球から脱落した核 DNA の分解にも関与していることを示した[9]。そして、DNase II 遺伝子の欠損マウスは胎仔の段階で死滅することから、DNA の分解がマウスの発生にとって必須の過程であることを示した。一方、DNase II に相同性のある DLAD(DNaseII-like acid DNase)と呼ばれる DNase が存在するが、この酵素は目に特異的に発現していること、DLAD の欠損マウスは目の水晶体に未分解の DNA が残存し、白内障を呈することも見出した[10]。一方、アポトーシス細胞の DNA が貪食された後マクロファージ内で分解されることを用いてマクロファージによるアポトーシス細胞貪食の Assay 系を樹立し、アポトーシス細胞とマクロファージを橋渡しする分子(MFG-E8)

を単離した[11]。

本研究はこのような状況をふまえ、これまでに、ほとんど解明されていないアポトーシス細胞の貪食の分子機構、その生理作用、また、アポトーシス細胞や赤芽球から脱離した核 DNA 分解の分子機構・生理作用を明らかにすることを目的とした。

参考論文

1. Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer** 26: 239-257, 1972

2. Itoh, N., Yonehara, S., Ishii, A., Yonehara, M., Mizushima, S., Sameshima, M., Hase, A., Seto, Y. & Nagata, S. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. **Cell** 66: 233-243, 1991

3. Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. **Cell** 75: 1169-1178, 1993

4. Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. & Nagata, S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. **Nature** 356: 314-317, 1992

5. Ogasawara, J., Watanabe-Fukunaga, R., Adachi, M., Matsuzawa, A., Kasugai, T., Kitamura, Y., Itoh, N., Suda, T. & Nagata, S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. **Nature** 364: 806-809, 1993

6. Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. **Nature** 375: 78-81, 1995

7. Enari, M., Talanian, R. V., Wong, W. W. & Nagata, S. Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. **Nature** 380: 723-726, 1996

8. Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, H., Iwamatsu, A. & Nagata, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature** 391: 43-50, 1998

9. Kawane, K., Fukuyama, H., Kondoh, G., Takeda, J., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y. & Nagata, S. Requirement of DNase II for definitive erythropoiesis in the mouse fetal liver. **Science** 292: 1546-1549, 2001

10. Nishimoto, S., Kawane, K., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Ohsawa, Y., Uchiyama, Y., Hashida, N., Ohguro, N., Tano, Y., Morimoto, T., Fukuda, Y. & Nagata, S. Nuclear cataract caused by a lack of DNA degradation in the mouse eye lens. **Nature** 424: 1071-1074, 2003

11. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., Shinohara, A., Iwamatsu, A. & Nagata, S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. **Nature** 417: 182-187, 2002

４．研究実施内容

４．１ 死細胞 DNA 分解の異常による病理作用

（１）実施の内容

DNase II 遺伝子欠損マウスでの IFNβ の産生とその致死作用

DNase II 遺伝子欠損マウスはその発生の最終段階で重度の貧血により死滅する。その原因を探るため、DNase II 遺伝子欠損マウス、野生型マウスの胎仔肝や胸腺より RNA を調製し、20000 個のマウス遺伝子に対する Microchip 解析を行った。その結果,インターフェロン(IFN) によって誘導される一群の遺伝子(IFN 誘導遺伝子)の発現が DNase II 欠損マウスにおいて野生型に比べ 50-100 倍上昇していた（表１)。IFNα、IFNβ、IFNγ ３種の IFN が知られているが、DNase II 遺伝子欠損マウスの胎仔肝臓には IFNβ、IFNγ mRNA の発現が認められた。そして、*in situ* hybridization により、胎仔肝臓などに存在する未分解の DNA を蓄積したマクロファージが IFNβを構成的に発現していることを見いだした。

	Induction (fold)
T-cell specific GTPase (TGTP)	131.5
IFN-induced protein with tetratricopep rep (IRG2)	123.5
2'-5'oligoadenylate synthetase	97.6
IFN-inducible GTPase	60.1
Chemokine CCL5	52.7
Chemokine CXCL1	52.6
IFN-regulatory factor 7	51.4
Myxovirus-resistant (Mx-1)	48.9
28k IFNα-responsive protein	43.1

表１ DNase II 遺伝子欠損マウス胎仔肝における IFN 誘導遺伝子の構成的発現

野生型、DNase II 欠損マウス胎児肝臓より RNA を調製し、20000 個のマウス遺伝子に対する microarray 解析を行った。DNase II 欠損マウスでの発現を野生型マウスでの発現と比較し、その発現倍率(Induction fold)の高い遺伝子から列記した。

IFNαや IFNβなどのタイプ I-IFN は抗ウイルス作用を持つサイトカインとして同定された因子であり C-型肝炎患者への投与など広く臨床応用されている。一方、タイプ I-IFN には細胞傷害作用も知られており、ある種の白血病細胞に対して抗がん剤としても用いられている。DNase II 遺伝子欠損マウスでは赤芽球が減少し貧血を呈することから、未分解 DNA を蓄積したマクロファージから放出された IFNβが赤芽球に作用、その細胞傷害作用により赤芽球を死滅させた可能性を考えた。IFNαと IFNβはタイプ I-IFN 受容体に結合することによりその抗ウイルス作用や抗腫瘍作用を発揮する。一方、IFNγはタイプ II-IFN 受容体に結合しその作用を発揮する。そこで、DNase II 遺伝子欠損マウスとタイプ I-、あるいはタイプ II-IFN 受容体欠損マウスを掛け合わせ両遺伝子を欠

損するマウスの樹立を試みた。すなわち、IFN 受容体遺伝子をホモに欠損するマウスに DNase II 遺伝子のヘテロ変異を導入し、その雌雄を交配させた。その結果、図１に示したように DNase II 遺伝子単独欠損マウスや DNase II 遺伝子とタイプ II-IFN 受容体遺伝子を欠損するマウスは胎生致死であるのに対し、DNase II 遺伝子とタイプ I-IFN 受容体両者を欠損するマウスはほぼメンデルの法則にしたがって誕生した。以上の結果は DNase II 欠損マウスでは、DNA 分解の異常によりマクロファージが活性化、IFNβが分泌され、これが周囲の細胞、特に赤芽球のアポトーシスを誘導、マウスに貧血をもたらし死滅させたと結論した。

	DNase II		(No. of mice born)
IFN receptor	+/+	+/-	-/-
+/+	21	35	0
IFN-IR-/- (IFNα orβ)	19	36	23
IFN-IIR-/- (IFNγ)	12	25	0

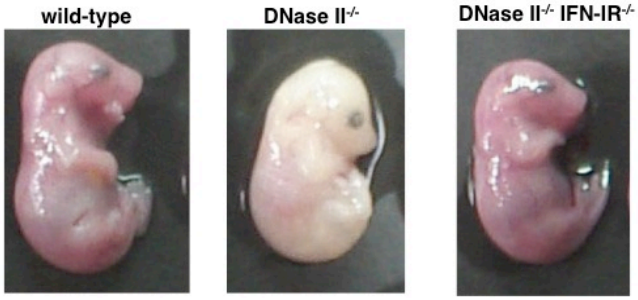

図１　IFN 受容体の欠損による DNase II 遺伝子欠損マウス致死性の回復

ホモにタイプ I-IFN 受容体(IFN-IR)あるいはタイプ II-IFN 受容体(IFN-IIR)遺伝子の欠質を持つ雌雄の *DNase II*$^{+/-}$マウスを交配させ、誕生したマウスの DNase II 遺伝子に関する遺伝子型を決定した。下段は E14.5 での野生型、*DNase II*$^{-/-}$, *DNase II*$^{-/-}$*IFN-RI*$^{-/-}$マウスの外見。

IFNα や IFNβ はウイルスやバクテリアに感染した細胞が産生するサイトカインであり、自然免疫の担い手と考えられている。ウイルスや細菌による IFNβ 遺伝子の活性化に関しては国内外のグループにより盛んに研究されており、TLR (Toll-like receptor) と呼ばれる一群の受容体、その受容体に対する adaptor 分子の関与が知られている。特に、細菌の DNA は TLR9 に結合し、MyD88 あるいは TRIF と呼ばれる adaptor を介してシグナルを伝達する。一方、動物の DNA は TLR9 には結合せず、自然免疫を活性化させないと報告されていた。しかし、DNase II 遺伝子ノックアウトマウスの結果はマクロファージに蓄積したマウス DNA が IFNβ 遺伝子を活性化することを示している。DNase II 遺伝子欠損マウスでの IFNβ 遺伝子活性化に TLR システムが関与している可能性を調べるため、*DNase II*$^{-/-}$マウスと *TLR9*$^{-/-}$などの TLR 遺伝子欠損マウス、*MyD88*$^{-/-}$, *TRIF*$^{-/-}$ adaptor 欠損マウスを交配させた。その結果、どの組み合わせでも *DNase II*$^{-/-}$マウスの致死性は回復されることはなかった(表２)。また、TLR 受容体のシグナル伝達全般に関与している Myd88, TRIF 両遺伝子を欠損させても *DNase II*$^{-/-}$マウスの致死性は回復され

ないことから、*DNase II*$^{-/-}$マウスでの IFNβ 遺伝子発現には TLR システムは関与していないと結論した。ところで IFNβ 遺伝子プロモーター上には IRE(IFN-regulatory element)と呼ばれる cis-element が存在し、この部位には transcription factor IRF3, IRF7 が結合する。実際、DNase II、IRF3, IRF7 三者の遺伝子を欠損させたマウスはほぼ正常に生まれ、哺乳動物 DNA による IFNβ遺伝子の活性化においても IRF の活性化が必要と結論した。

	DNaseII$^{+/+}$	*DNaseII*$^{+/-}$	*DNaseII*$^{-/-}$
+/+	29	50	0
TLR9$^{-/-}$	42	65	0
TLR3$^{-/-}$	14	29	0
MyD88$^{-/-}$	14	37	0
TRIF$^{-/-}$	35	73	0
MyD88$^{-/-}$,TRIF$^{-/-}$	6	12	0
IFN-IR$^{-/-}$	19	36	23

表２　*DNase II*$^{-/-}$での TLR システムを関与しない IFNβ 遺伝子の活性化

TLR9, TLR3, MyD88, TRIF, あるいは MyD88 と TRIF 両者の遺伝子欠質をホモに持つマウスに DNase II 遺伝子のヘテロ欠質変異を導入し、その雌雄のマウスを交配させた。表では 誕生したマウスの *DNase II*$^{+/+}$, *DNase II*$^{+/-}$, *DNase II*$^{-/-}$ 遺伝子型を持つマウスの匹数を示した。

発表論文

1. Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H. & Nagata, S. Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA. *Nat. Immunol.* **6**, 49-56 (2005).
2. Okabe, Y., Kawane, K., Akira, S., Taniguchi, T. & 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).
3. Okabe, Y., Kawane, K., & 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).

DNase II 遺伝子欠損マウスでの慢性関節炎の発症

DNase II 遺伝子、タイプ I-IFN 受容体遺伝子、両者を欠損するマウスはほぼメンデルの法則にしたがって誕生する。しかし、このマウスは歳を経るにしたがって、手足の関節が膨潤しはじめた。8 ヶ月になるとすべての関節が膨潤しており、レントゲン、MRI 解析により激しい炎症反応が起こっていることが確認された（図２）。膨潤した関節を組織化学的に解析すると滑膜細胞が激しく増殖し、パンヌス(肉芽)を形成、骨髄へ侵入している箇所も見出された。パンヌスの先端には破骨細胞が存在していることから、この細胞が骨を破壊したと考えられる。この組織像はヒトの関節リュマチで見られる組織像と酷似していた。また、このマウスでは腸、皮膚など他の組織では炎症は観察されず、

関節炎を特異的に惹起したと結論した。

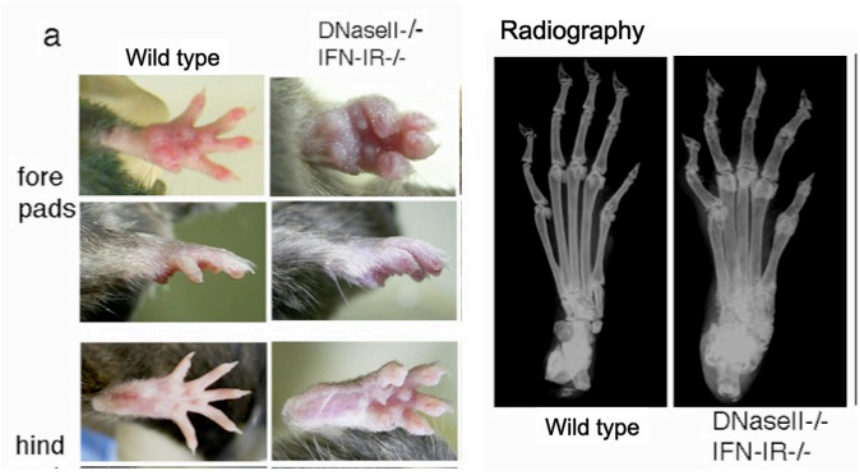

図２　DNase II 欠損マウスでの関節リュウマチ

八ヶ月齢の *DNase II*$^{-/-}$*IFN-RI*$^{-/-}$マウスの手足の外観、レントゲン写真

DNase II$^{-/-}$*IFN-RI*$^{-/-}$マウスで観察された関節炎が DNase II 遺伝子単独の欠損でも起こるかどうか確認するために、DNase II 遺伝子をマウスの生後誘導的に欠損させた。すなわち、DNase II 遺伝子内に 2 個の lox 配列を導入し、CRE recombinase が poly(IC)の投与によって作用するトランスジェニックマウス(Mx-CRE マウス)と掛け合わせた。このマウスの生後 4 週目に poly(IC)を投与したところ数週間後には脾臓や、骨髄から DNase II mRNA が消失した。そして、この *DNase II*$^{\Delta/-}$マウスは数ヵ月後、関節リュウマチを発症した。以上の結果から、DNase II 遺伝子単独の欠損が関節炎をもたらしうると結論した。

リュウマチを発症したヒトの関節では IL-1β, TNFα, IL-6 などの炎症性サイトカイン遺伝子が強く発現している。*DNase II*$^{-/-}$*IFN-RI*$^{-/-}$マウスや DNase II 遺伝子を生後欠損させた *DNase II*$^{\Delta/-}$マウスの関節でもこれらサイトカイン遺伝子が野生型マウスの関節に比べ 10-50 倍発現していた(図３)。また、血清中にはヒトのリュマチ患者のように MMP(matrix metalloprotease)-9 やリュウマチ因子などが認められた。以上の結果は DNase II 遺伝子欠損による関節リュマチがヒトの関節リュウマチのよいモデルになることを示している。

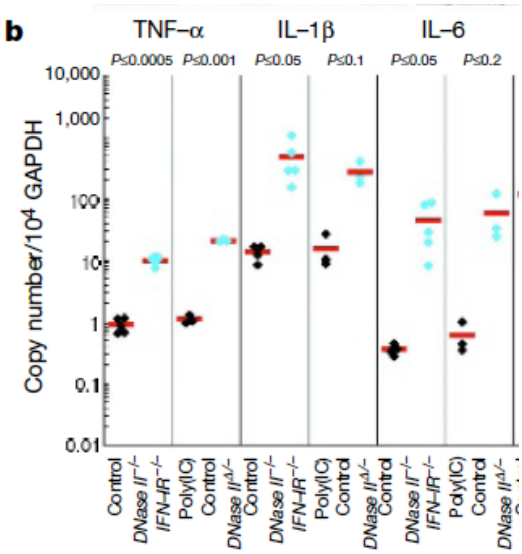

図３関節炎を発症した関節での炎症性サイトカイン遺伝子の発現

7.5−13 ヶ月齢の *DNase II*$^{-/-}$*IFN-RI*$^{-/-}$、および *DNase II*$^{-/-}$マウスの関節より RNA を調製し Real-Time PCR 法によりそれぞれの mRNA 量を定量した。

それでは、DNase II 遺伝子の欠損がどのような機構で関節炎をひきおこすのであろうか。このマウスの組織を組織化学的に解析すると、骨髄や脾臓には未分解の DNA を蓄積した大量のマクロファージが存在した。また、脾臓では赤脾髄が肥大化し髄外造血を起こしていた。種々のサイトカイン遺伝子に対する *in situ* hybridization により、骨髄や脾臓に存在する DNA を蓄積したマクロファージが TNFα を構成的に発現していることを見出した。以前、ドイツ、Keffer らは TNFα のトランスジェニックマウスが関節炎を発症することを報告している（EMBOJ. 10, 4025, 1991）。そこで、DNase II 遺伝子欠損マウスで発症する関節炎はマクロファージから分泌された TNFαによる可能性を考え、*DNase II*$^{-/-}$マウスに抗 TNFα 抗体を投与したところ、関節炎の発症は顕著に抑制された。以上の結果から、DNase II 遺伝子欠損マウスでは未分解の DNA により活性化されたマクロファージから IFNβばかりでなく TNFαも分泌されること、分泌された TNFα が滑膜細胞に作用し、種々の炎症性サイトカイン遺伝子を活性化、これが滑膜細胞やマクロファージの増殖を促進し、骨の破壊へ導いたと結論した。

発表論文

1. Kawane, K. et al. Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. *Nature* **443**, 998-1002 (2006).
2. Kawane, K. & Nagata, S. Nucleases in programmed cell death. *Methods Enzymol* **442**, 271-287 (2008).
3. Nagata, S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu Rev Immunol* **23**, 853-875 (2005).
4. Nagata, S. Rheumatoid polyarthritis caused by a defect in DNA degradation. *Cytokine Growth Factor Rev* **19**, 295-302 (2008).

（２）得られた研究成果の状況および今後期待される効果

私達の身体の中では毎日、数億の細胞がアポトーシスにより死滅しその DNA がマクロファージで分解される。また赤血球の分化過程で核が除去され分解されるがその数は毎日数１０億に達する。マクロファージのリソソームに存在する DNase II はこれら大量の DNA 分解を担っている。すなわち毎日、数 g の DNA を一個の酵素 DNase II が分解している。今回、私達の研究結果はこの DNA 分解の異常が貧血やリュマチ性関節炎などの病気の原因となりうることを示している。リュマチ性関節炎は人口の１−２％が発症する病気であるがその原因は未だに不明である。今回の結果はアポトーシスや造血という我々の体内で通常おこっている過程の異常がリュマチ性関節炎をもたらすことを示唆している。今後、ヒトのリュマチ患者において DNase II 遺伝子の異常、あるいはマクロファージの異常な活性化が原因となっていないか検討する必要があろう。アポトーシスを起こす細胞は細菌やウイルスの感染により増大する。我々が樹立したマウスでの関節炎がウイルス感染などにより増悪されるかどうか興味深い。ところで、ヒトのリュウマチの治療薬として TNFαや IL-6 受容体に対する抗体が広く使われている。抗 TNFα抗体は本研究で樹立した DNase II 遺伝子欠損マウスの関節炎の発症を抑制するばかりでなく、治療効果も認められた。今後は IL-6 受容体に対する抗体に治療効果があるかどうか検討する必要が有ろう。また、今回樹立した DNase II 遺伝子欠損マウスはリュマチ性関節炎のよりよい薬剤のスクリーニングなどにも使われると考えられる。

ところで、細菌やウイルスの DNA は自然免疫を活性化し、IFN や TNF などのサイトカインを介して炎症を引き起こすとされてきた。今回の私達の結果は動物細胞の DNA も速やかに分解されなければ IFNβや TNFα遺伝子を活性化し、一種の炎症状態を引き起こしうることを示している。最近、PAMP (pathogen-associated molecular pattern) に対抗して、DAMP (danger-associated molecular pattern) の言葉が欧米のグループを中心に使われているがアポトーシスなどで本来分解されるべき DNA が分解されないと、その DNA が DAMP の一種として作用することを示唆している。動物の DNA は細菌やウイルスの DNA とは異なり IFNβや TNFα遺伝子の活性化に TLR システムを用いていない。私達は DNase II 遺伝子欠損マウスから調製したマクロファージにアポトーシス細胞を貪食させると DNA が蓄積し、IFNβ 遺伝子が活性化されることを認めている。この *in vitro* での Assay 系を用いることにより動物細胞 DNA に応答して IFNβや TNFα遺伝子を活性化する因子の探索が可能であろう。

４．２ 死細胞貪食の分子機構とその異状による自己免疫疾患

MFG-E8 遺伝子の欠損マウスにおける SLE 様自己免疫疾患

2002 年、私達は、アポトーシス細胞の貪食を促進する分子として MFG-E8 を同定した(Nature 417, 182, 2002)。この因子に対するモノクローナル抗体を作成し、種々のマウス組織を染色したところ、この分子はチオグリコレートによって惹起されたマウス腹腔マクロファージ、皮膚に存在するランゲルハンス細胞、脾臓やリンパ節の胚中心（germinal center）に存在する核片貪食マクロファージ(TBM, tingible-body macrophage)に発現されていた（図４）。脾臓の胚中心では数多くの B-リンパ球が抗原により活性化され増殖分化するが、抗原に対して低親和性の抗体を産生する B-リンパ球はアポトーシスに陥り、核片貪食マクロファージによって貪食される。

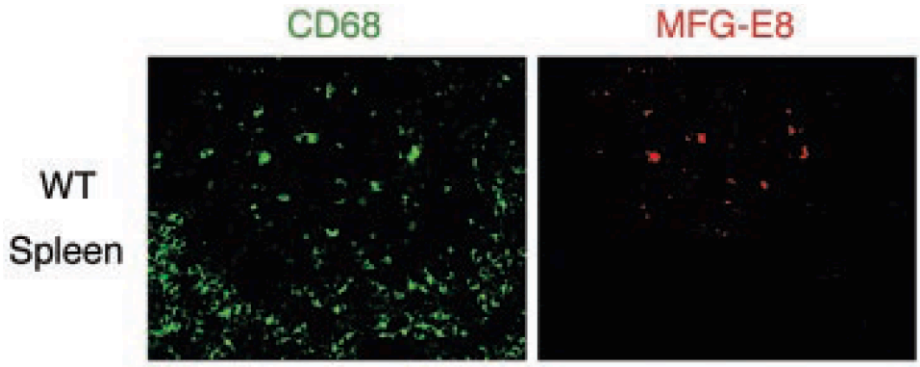

図４　核片貪食マクロファージ(tingible-body macrophage)での MFG-E8 の発現
マウス脾臓の胚中心から調製した切片をマクロファージの抗原である CD68 に対する抗体と、抗 MFG-E8 抗体で染色した。

腹腔マクロファージや胚中心の核片貪食マクロファージにおける MFG-E8 の生理作用を解析する目的で、MFG-E8 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。このマウスから調製したチオグリコレートで誘導した腹腔マクロファージのアポトーシス細胞・貪食能は顕著に減少していた。一方、このマウスの脾臓・胚中心には核片貪食マクロファージの表面に結合したアポトーシス細胞が大量に存在した。また、MFG-E8 遺伝子欠損マウス、特にメスマウスの血清中には歳をとるに従い高濃度の抗核抗体、抗 DNA 抗体が認められた（図５）。そして、その腎臓糸球体には抗体が沈着し、糸球体腎炎を発症していた。以上の結果は MFG-E8 遺伝子の欠損によりアポトーシス細胞が速やかに貪食されないと死細胞は 2 次的なネクローシスに陥り、細胞膜は破裂、その内容物が放出され、核やミトコンドリア、DNA が免疫系を活性化、自己抗体の産生へと導くことを示唆している（図６）。

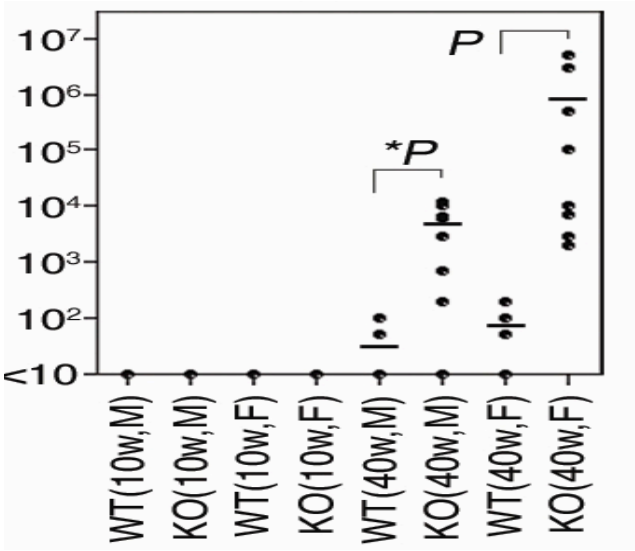

図５　MFG-E8 ノックアウトマウスにおける抗核抗体

10 週令、40 週令の野生型(WT)、および MFG-E8 遺伝子欠損(KO)マウスの血清中の抗核抗体価を測定した。M,雄；F, 雌：

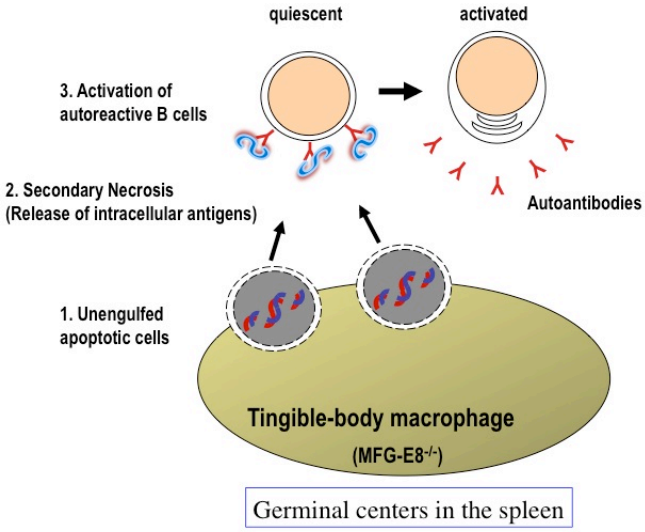

図６　MFG-E8 ノックアウトマウスでの自己免疫疾患発症の分子機構

脾臓の胚中心(germinal center)では数多くの B-リンパ球がアポトーシスにより死滅する。この細胞を貪食する細胞が胚中心に存在する Tingible-body macrophage と考えられる。このマクロファージは MFG-E8 を発現し、この分子を用いてアポトーシス細胞を貪食すると考えられる。MFG-E8 が欠損するとアポトーシス細胞は secondary necrosis に陥り、細胞膜が破裂、細胞内容物が飛散し、免疫系を活性化すると考えられる。

発表論文

1. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K. & Nagata, S. Expression of Developmental Endothelial Locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. *J. Immunol.* **172**, 3876-3882 (2004).
2. Hanayama, R. et al. Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in

MFG-E8-deficient mice. *Science* **304**, 1147-1150 (2004).
3. Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M. & Nagata, S. Expression of MFG-E8 in bone marrow-derived immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1414-1422 (2004).
4. Hanayama, R., Miyasaka, K., Nakaya, M. & Nagata, S. MFG-E8-dependent clearance of apoptotic cells, and autoimmunity caused by its failure. *Curr Dir Autoimmun* **9**, 162-172 (2006). **(Cover)**

ヒトの SLE 患者における MFG-E8

MFG-E8 はアポトーシス細胞のフォスファチヂルセリン，マクロファージ側のインテグリンに結合する分子である。MFG-E8 によるアポトーシス細胞貪食には至適濃度が存在する。すなわち、*MFG-E8*$^{-/-}$マウスから調製した腹腔マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食は MFG-E8 が 0.8 μg/ml で至適であり、これ以上では貪食が抑制された。一方、野生型マウスから調製したマクロファージに対しては低濃度の MFG-E8 によって死細胞の貪食が阻害された。この結果は野生型のマクロファージには既に MFG-E8 が結合しており、過剰の MFG-E8 によってアポトーシス細胞の貪食が抑制されたと考えられる（図 7)。実際、MFG-E8 の組み替え体をマウスに投与したところ低濃度の MFG-E8 の投与により数週間の間に抗 DNA 抗体、抗核抗体などが出現し、糸球体への抗体の沈着、糸球体腎炎の発症が認められた。

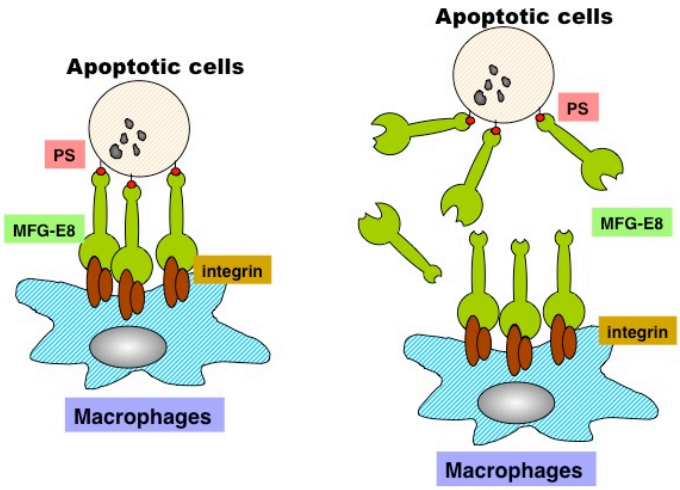

図 7　過剰の MFG-E8 によるアポトーシス細胞貪食の抑制

MFG-E8 はアポトーシス細胞の表面に暴露されたフォスファチジルセリン(PS)、マクロファージ表面の integrin$\alpha_v\beta_3$に結合し、アポトーシス細胞とマクロファージ間を橋渡しする（左）。MFG-E8 が過剰になるとこの分子はアポトーシス細胞、マクロファージ、それぞれに結合し両者を連結させることはできなくなると考えられる（右）。

MFG-E8 のノックアウトマウスや MFG-E8 の投与によっておこる抗核抗体の上昇、糸球体腎炎の発症はヒト SLE(systemic lupus erythematosus)の症状と相似している。ヒ

トSLEもMFG-E8の発現異常によっておこる可能性を検討するため、ヒトMFG-E8に対するモノクローナル抗体を作成しヒトMFG-E8に対するELISAを確立、SLE患者の血清中でのMFG-E8レベルを測定した。その結果、健常人の血清中にはMFG-E8はほとんど検知できないのに対し、SLEの患者では約1割の患者において、高濃度のMFG-E8が認められた（図8)。

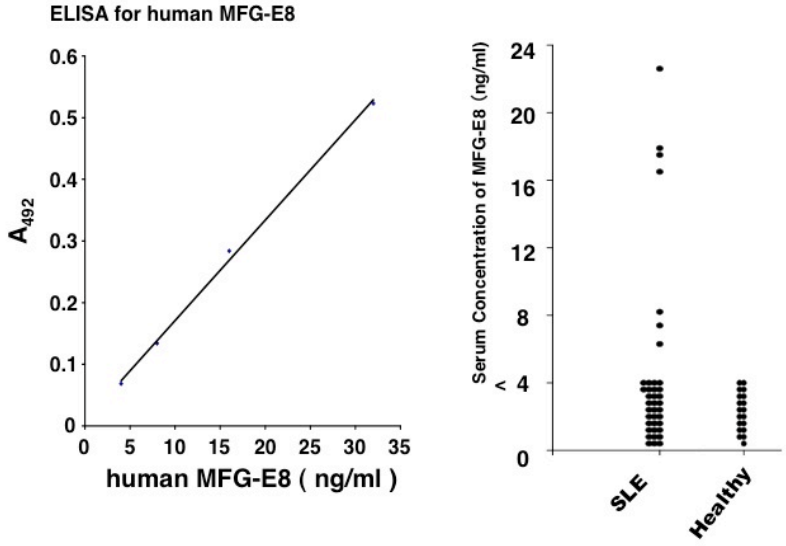

図8　ヒトSLE患者におけるMFG-E8の血中濃度

MFG-E8に対する高感度のELISAシステムを樹立した(左)。約100名のヒトSLE患者の血清中におけるMFG-E8レベルを左記ELISAシステムを用いて定量した。

発表論文

1. Asano, K. et al. Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces auto-antibody production in mice. *J. Exp. Med.* **200**, 459-467 (2004).
2. Yamaguchi, H. *et al.*, Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J. Leukoc. Biol.* **83**, 1300-1307 (2008). **(Cover)**

赤芽球での脱核、乳腺の退縮におけるフォスファチジルセリンの関与

赤血球は骨髄や胎児肝に存在する erythroblastic island と呼ばれるユニット上で増殖・分化し、その最終分化段階で核は赤芽球から脱落する。Erythroblastic island の中心には一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芽球が取り囲んでいる。赤芽球から離れた核は速やかにマクロファージによって貪食され、一方、核を失った網状赤血球はErythroblastic islandを離れ抹消へと送られる。私達はマクロファージが赤芽球から離れた核を貪食する分子機構を解析するため、脾臓から調製した赤芽球を用いて、*in vitro*での脱核過程を再現し（図9)、FACSAriaを用いて、核を分画、調製した。

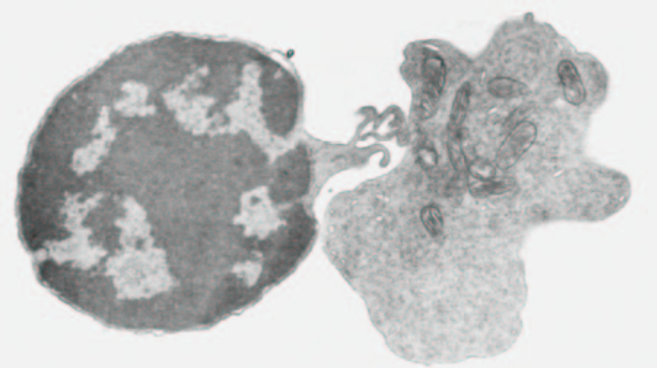

図 9　赤芽球からの核の脱核

貧血にしたマウス脾臓から調製した赤芽球を in vitro で培養することにより脱核させ、電子顕微鏡で観察した。網状赤血球から分離した核は細胞膜で囲まれておりこの過程が細胞の非対称分裂であることを示している。 また、脱核直後は核と網状赤血球は細い膜状の管によって連結されている。

赤芽球を脱核させることにより調製した核を胎児肝から調製したマクロファージに加えたところマクロファージは効率よく核を貪食した。この際、フォスファチジルセリンには結合するがインテグリンには結合しない MFG-E8 の変異体を加えるとマクロファージによる核の貪食はほぼ完全に抑制された。このことはマクロファージが赤芽球からの核を貪食する際にもフォスファチジルセリンを“Eat me”シグナルとして用いていることを示している。実際、赤芽球から調製された核は細胞膜によって囲まれていること、核が網状赤血球から脱離するや否やその表面にフォスファチジルセリンが暴露されることを見いだした（図 9 and 10）。

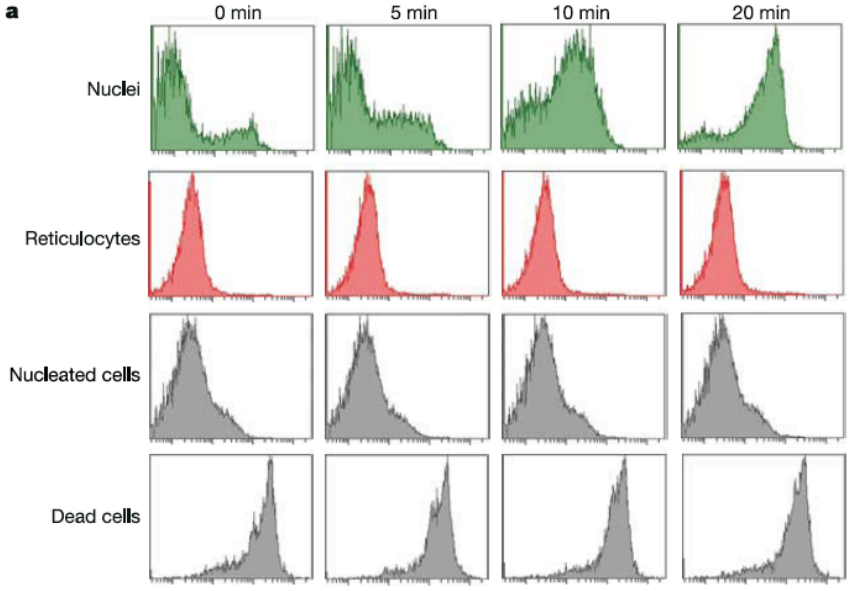

図 10　赤芽球から脱核した核におけるフォスファチジルセリンの暴露

赤芽球を脱核させた直後、軽く物理的刺激を加え、核と網状赤血球を分離。その後３７℃で図の上部に示した時間 incubation した後、Annexin V で染色し、FACSAria を用いて解析した。図では Annexin V の染色パターンを核、網状赤血球、赤芽球に対して示した。

細胞膜の非対称性は２個の putative 酵素、“ATP-dependent translocase”，“Ca-dependent scramblase”によって担われている。そこで、赤芽球、網状赤血球、核分画を調製し、それぞれに含まれる ATP を定量したところ、網状赤血球では赤芽球の約３分の１の ATP が存在するのに対し、核にはほとんど検知できなかった。赤芽球ではミトコンドリア、解糖系により ATP が合成されるのに対し、網状赤血球では解糖系だけ、核には一切 ATP 合成系が存在しないことと対応している。赤芽球から脱離した核は速やかに ATP を喪失、ATP-dependent translocase の不活化、Ca の流入による scamblase の活性化などを通して細胞膜の非対称性を維持することができなくなりフォスファチジルセリンが暴露されたと考えられる。

ところで、乳腺の退縮過程で MFG-E8 遺伝子の発現が強く誘導される。乳腺の退縮過程では上皮細胞がアポトーシスによって死滅するが、同時に乳腺に蓄積されていた乳脂肪球が上皮細胞によって再吸収される。乳腺切片を組織免疫化学的に解析し、MFG-E8 は乳腺上皮細胞、乳腺に浸潤したマクロファージが発現していることを確認した。MFG-E8 遺伝子のノックアウトマウスでは最初の妊娠での乳腺の発達は正常であったが、２度目、３度目の妊娠においては乳腺の発達が遅れ、哺乳能力は最初の妊娠時に比べ顕著に低下した。そのため、その仔の発育は顕著に遅れ、2－3割の仔マウスは餓死した。乳腺は妊娠、哺乳を終えた後、退縮する。*MFG-E8*$^{-/-}$マウスでは乳脂肪球が長時間にわたり乳腺内に残り、次の妊娠時の乳腺の発達を阻害した。また、乳腺炎の発症も観察された。

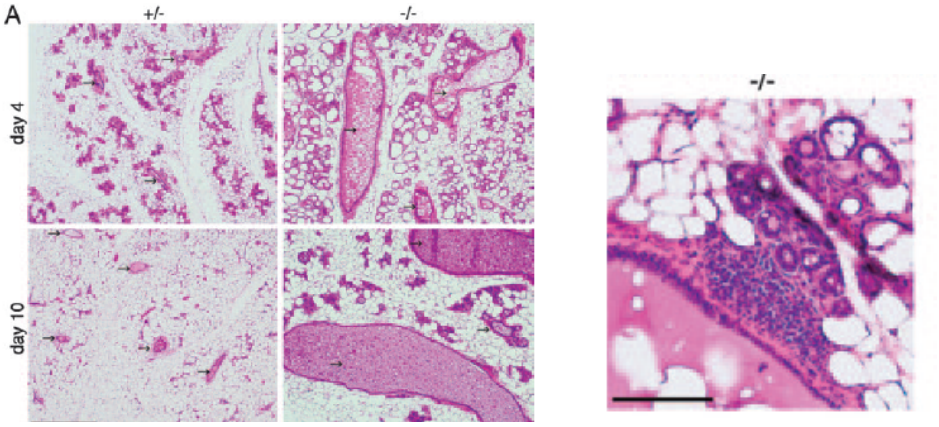

図 11　MFG-E8 欠損マウスにおける乳脂肪球の蓄積と乳腺炎

MFG-E8$^{+/-}$および MFG-E8$^{-/-}$哺乳中の母親のマウスから強制的に仔マウスを離し、乳腺の退縮を促した。その後４日、10 日目の乳腺をヘマトキシリン-エオジンで染色した(左)。MFG-E8$^{-/-}$の母親マウスはその後２度目の妊娠、出産をおえ、仔マウスに哺乳させた。その６日後の乳腺を染色した(右)。

乳脂肪球は乳腺上皮細胞から放出される脂肪を内蔵する小胞であり、plasma membrane によって取り囲まれている。この細胞膜表面にもフォスファチジルセリンが暴露されていた。乳脂肪球内にはミトコンドリアや細胞質の解糖系は存在せず、ATP の

枯渇により細胞膜の非対称性を維持できず、フォスファチジルセリンを暴露したと考えられる。乳脂肪球は乳腺上皮細胞から分泌されると速やかにフォスファチジルセリンを暴露、上皮細胞から分泌された MFG-E8 がフォスファチジルセリンを介して乳脂肪球に結合すると考えられる。仔マウスによって飲みきれない乳脂肪球、あるいは哺乳後、乳腺退縮時には MFG-E8 の結合した乳脂肪球がインテグリンを発現する乳腺上皮細胞に再吸収されるのであろう。

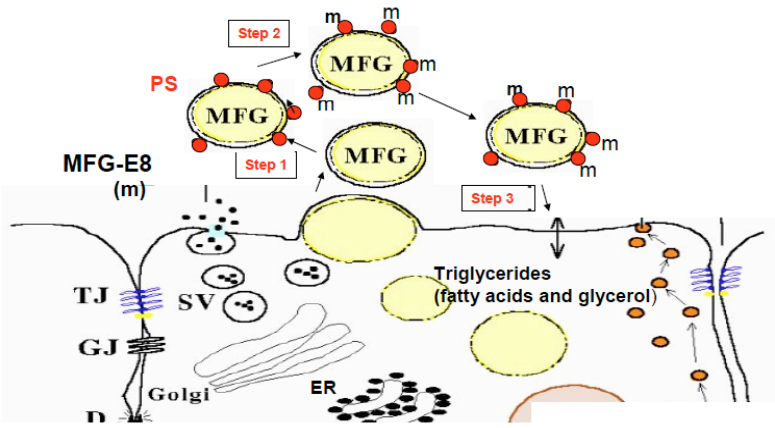

図 12　乳腺上皮細胞による乳脂肪球の貪食再吸収

母乳の主成分は乳腺上皮細胞から分泌される triglyceride や脂肪、グリセロールを含む細胞膜に囲まれた乳脂肪球と呼ばれる一種のエクソソーム（Step1）。この小胞の表面にはフォスファチジルセリンが暴露されており乳腺上皮細胞によって合成される MFG-E8 が結合する（Step2）。乳腺の退縮時、余剰の乳脂肪球は MFG-E8 を介して乳腺上皮細胞によって吸収される（Step 3）。

以上、マクロファージによるアポトーシス細胞や赤芽球から脱離した核の貪食、乳腺退縮時におこる乳腺上皮細胞による余剰乳脂肪球の再吸収などの過程において、フォスファチジルセリンが“eat me”シグナルとして作用していると考えられる。

発表論文

1. Hanayama, R. & 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).
2. Yoshida, H. *et al.*, Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437, 754-758 (2005).
3. Nagata, S., Apoptosis and autoimmune diseases. *IUBMB Life* 58 (5-6), 358-362 (2006).
4. Nagata, S., Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol Rev* 220, 237-250 (2007).

アポトーシス細胞の貪食に関与する新規受容体の同定

ところで、フォスファチジルセリンに結合する分子として MFG-E8 が同定されているが、この分子はチオグリコレートで誘導した腹腔マクロファージ、ランゲルハンス細胞、乳腺上皮細胞によって発現されているのみであり、アポトーシスや造血の盛んな骨髄や胸

腺のマクロファージ、腹腔に本来存在するマクロファージには発現されていない。これら MFG-E8 非発現細胞でのアポトーシス細胞貪食の分子機構を調べるため、マウス腹腔マクロファージを抗原としてハムスターを免疫し数千個のモノクローナル抗体を作成した。その抗体より、腹腔マクロファージによるアポトーシス細胞貪食を阻害する抗体（Kat-1）を選択した。一方、腹腔マクロファージより調製した cDNA をマウスレテロウイルスベクターに挿入、これを用いてマウス Ba/F3 細胞を形質転換した。この細胞集団より Kat-1 抗原を発現する細胞を FACSAria を用いて選別した。選別された細胞より導入されている cDNA を回収し，Kat-1 抗原は Tim-4 と呼ばれるタイプ I 膜タンパク質であることを見いだした。そこで、本来アポトーシス細胞に対する貪食能のないマウス NIH3T3 細胞に Tim-4 cDNA を導入したところこの細胞は効率よくアポトーシス細胞を貪食した(図 13)。ついで、Tim-4 の細胞外領域に IgG Fc 領域を結合したキメラタンパク質を作成し、この分子はフォスファチジルセリンに特異的に結合することを見いだした(図 14)。このことは Tim-4 がフォスファチジルセリン受容体としてアポトーシス細胞の貪食を担っていることを示している。

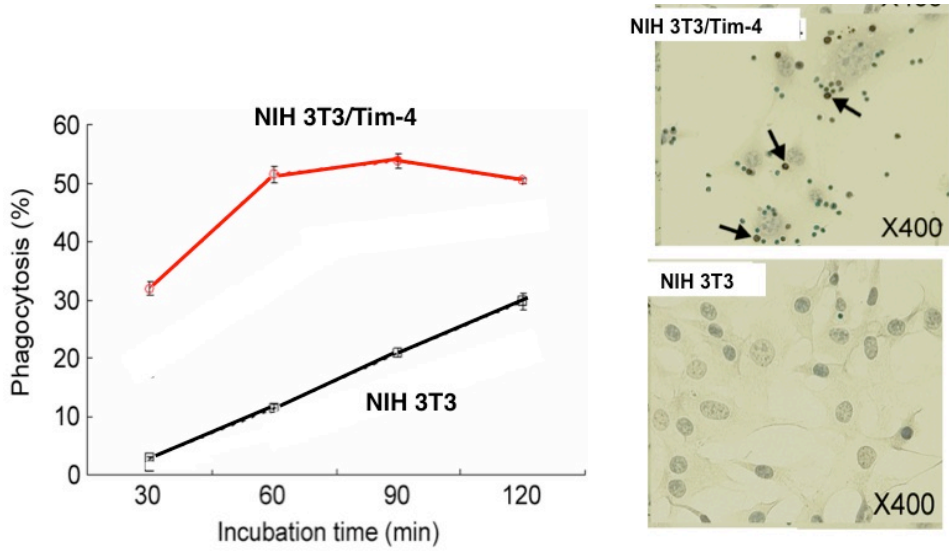

図１３　Tim-4 発現細胞によるアポトーシス細胞の貪食

NIH3T3 に TIM-4 を構成的に発現させた(NIH3T3/Tim-4)。その細胞にアポトーシスを起こしたマウス胸腺細胞を加え示した時間培養した。その後、アポトーシス細胞を貪食した細胞を FACS で同定した。右図では培養 30 分後の細胞を顕微鏡で観察した。

Tim-4 は 4 種知られている Tim family の一員であるが、Tim-1 が Tim-4 と同じようにフォスファチジルセリンに結合した。Tim family は N-末端からシグナル配列、IgG に相同性のある IgV 領域、糖鎖が多く結合しているムチン領域から成り立っている。Tim-4 の種々の欠質変異体の解析から IgV 領域がフォスファチジルセリン結合部位であることを示した。また、real-Time PCR 法によりこの分子は脾臓、胸腺などの Mac-1 陽性細胞に発現していることも確認した。

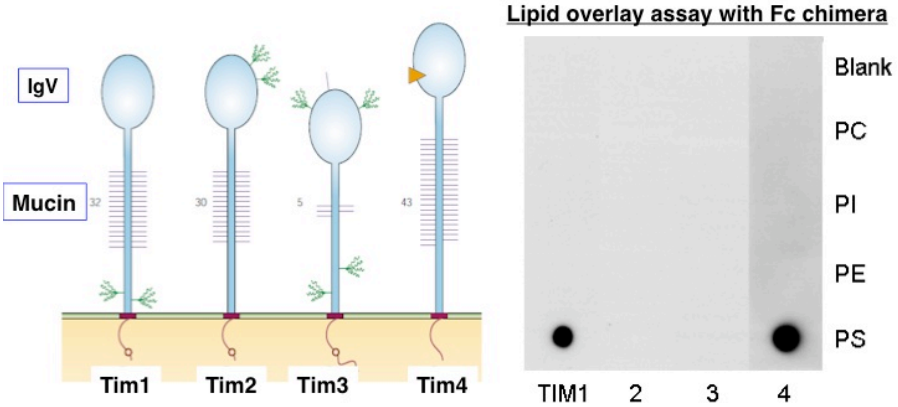

図１４．Tim family メンバー、および Tim member のリン脂質への結合

左図では Tim family member を模式化して示した。右図ではそれぞれの member の細胞外領域を Fc と結合させたキメラタンパク質を作成、おのおののタンパク質のリン脂質(PC, phosphatidylcholine; PI, phosphatidylinositol; PE, phosphatidylethanolamine; PS, phosphatidylserine)への結合を lipid overlay assay により解析した。

発表論文

1. Miyanishi, M. *et al.*, Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature* 450, 435-439 (2007).

（２）得られた研究成果の状況および今後期待される効果

アポトーシス細胞の貪食過程に関与する分子として ICAM3, LDL, ABC1 transporter など数多くのリガンド、受容体が提案された。その中でも Fadok ら (J. Immunol. 148, 2207, 1992) によって提案されたリン脂質フォスファチジルセリンはアポトーシス時に特異的にその表面に暴露されること、フォスファチジルセリンを赤血球上にロードするとマクロファージによって貪食されることなどから“eat me”シグナルの強い候補と考えられた。そして、Fadok らは 2000 年フォスファチジルセリンに対する受容体 (PSR) を同定したとして発表したが（Nature 405, 85 2000）、この論文が分野に大きな混乱をもたらした。すなわち、PSR のノックアウトマウスが発生段階で死滅することからこれがアポトーシス細胞貪食の欠陥による (Science 302, 1560, 2003) と考えられたが、実際は PSR 欠損マクロファージのアポトーシス細胞貪食能は野生型とかわらないこと、PSR は核のタンパク質であること、などが報告された (J. Biol. 3, 15, 2004)。本研究によってマクロファージから分泌される MFG-E8 がフォスファチジルセリンとインテグリンに結合することによってアポトーシス細胞とマクロファージを橋渡しする分子であることを確立するとともに、Tim-4 をフォスファチジルセリン受容体として同定した。MFG-E8 をマウスに投与すると全身でのアポトーシス細胞の貪食が抑制される結果もフォスファチジルセリンが “eat me”シグナルとして作用していることを強くサポートしている。今後は MFG-E8 や Tim-4 が細胞にどのようなシグナルを伝達することにより貪食反応が惹起されるか、MFG-E8 と Tim-4 はどのように使い分けられているかなど検討する必要があろう。

ところで、アポトーシス細胞は速やかにマクロファージによって貪食される。その目的はアポトーシス細胞が貪食されないと生体にとって様々な悪影響を及ぼすからと考えられた。今回、MFG-E8 ノックアウトマウスが抗核抗体、抗 DNA 抗体などを産生し、糸球体腎炎を発症したことはこの仮説を証明することとなった。今後はヒトの SLE 患者においてアポトーシス細胞や赤芽球核の貪食異常が存在するかどうか検討する必要があろう。一方、死細胞から遊離した核や DNA などの細胞内コンポーネントがどのようにして免疫反応を活性化するかも大きな課題であろう。

５．類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

アポトーシス細胞の貪食、赤芽球から脱離した核の分解に関する研究は我々の独創的な研究である。DNase II 遺伝子ノックアウトマウスに関してはアメリカのグループが我々より１年遅れて樹立しているが（CDD 9, 956, 2002）、関節炎の発症などは解析されていない。しかし、我々の論文発表以来、国内外のグループから DNase II ノックアウトマウスの分与依頼が届き、配布した。一方、動物細胞 DNA による TLR-independent IFNβ遺伝子の活性化は分野に大きな impact を与えている。数多くのグループが動物細胞 DNA に対するセンサーを探索し、その候補分子が発表されている。しかし、未だにリソソームでの DNA センサーは報告されていない。

我々はアポトーシス細胞をマクロファージに橋渡しする分子として MFG-E8 を同定したがこの分子は種々のグループの注目を受けている。すなわち、この分子はマクロファージなどから分泌されるエクソソームや精子の表面に存在することからエクソソームによる細胞間での抗原提示作用 (Nat. Med. 11, 499, 2005)、精子と卵の結合 (Cell 114, 405, 2003)への関与などの観点から調べられ、ノックアウトマウスも我々以外に３グループが作製している。特に、MFG-E8 遺伝子のノックアウトマウスが SLE を発症するとの我々の報告以来、このマウスを用いた研究が多くなっており、数多くのグループにノックアウトマウスを分与した。一方、Tim-4 がフォスファチジルセリン受容体であるとの我々の報告はこれまでこの分子を研究していたグループにより即追試され、確認された (Immunity 27, 927, 2007)。フォスファチジルセリン受容体としては Tim-4 以外に BAI と命名された分子が我々の論文と同時期に発表された (Nature 450, 430, 2007) がアポトーシス細胞に対する貪食能は Tim-4 が数段勝っており (Curr. Biol. 19, 346, 2009)、Tim-4 の研究者が急速に増加している。

６．研究実施体制

(1)体制

研究代表者
長田　重一
総括

長田グループ
京都大学大学院医学研究科

赤血球や目レンズ細胞における脱核の分子機構解析を担当

(2)メンバー表

①長田グループ

氏　名	所　属	役　職	研究項目	参加時期
長田　重一	京大・医	教授	研究総括	H15.12.1.～H21.3.31
福永理己郎	京大・医	准教授	アポトーシス細胞における phosphatidylserine の転移機構の解明	H15.12.1.～H21.3.31
内山　安男	阪大・医	教授	アポトーシス、貪食における細胞の形態変化	H15.12.1.～H21.3.31
佐子山豈彦	阪大・医	助手	ショウジョハエを用いたアポトーシスと自然免疫	H15.12.1.～H17.3.31
川根　公樹	京大・医	助教	アポトーシスにおける DNA 分解の生理作用（自然免疫との関連）	H15.12.1.～H21.3.31
華山　力成	阪大・医	大学院生 JST 博士研究員 助手	アポトーシス貪食細胞の生理作用の解析	H15.12.1.～H16.3.31 H16.4.1.～H16.9.30 H16.10.1.～H17.9.15
三輪　桂子	阪大・医	JST 技術員	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	H15.12.1.～H17.4.30
福永　理恵	阪大・生命	JST 技術員	アポトーシス細胞における phosphatidylserine の転移機構の解明	H15.12.1.～H19.5.31
原山　雅子	阪大・生命	JST 研究補助員	研究データの収集解析	H15.12.1.～H19.3.31
藤井麻紀子	京大・医	JST 研究補助員	研究データの収集解析	H15.12.1.～H21.3.31
小川　裕規	阪大・生命	JST 博士研究員	″Eat me″シグナルの提示機構の解析	H16.4.1.～H17.3.31
上田　健	阪大・生命	JST 博士研究員	アポトーシスに関与している遺伝子のノックアウトマウスの樹立とその解析	H17.4.1.～H18.4.30
吉田　英行	阪大・生命	JST 博士研究員	アポトーシスや赤血球脱核における DNA 分解の生理作用	H17.4.1.～H19.5.31
大谷　真弓	阪大・生命	JST 技術員	細胞の培養、組換えタンパク質の産成と精製、遺伝子の単離と解析	H17.4.1.～H19.5.31
岡部　泰賢	京大・医	JST 博士研究員	哺乳動物 DNA によるインターフェロン遺伝子の活性化、自然免疫の活性化の分子機構	H18.4.1.～H21.3.31
仲矢　道雄	京大・医	JST 博士研究員	アポトーシス細胞貪食におけるマクロファージ内でのシグナル伝達	H18.4.1.～H19.6.30
飯田　智	京大・医	JST 博士研究員	好中球やマクロファージの分化の分子機構	H19.4.1.～H20.3.31
田中　博美	京大・医	JST 研究補助員	細胞の培養、組換えタンパク質の産成と精製、遺伝子の単離と解析	H19.6.1.～H21.3.31

７．研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
なし				

(2)招聘した研究者等

氏　名（所属、役職）	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Hermann Steller (ロックフェラー大学・教授)	第20回国際生化学・分子生物学会での講演	京都国際会議場	H18.6.17 ～ H18.6.23
Craig Thompson (ペンシルベニア大学・教授)	第20回国際生化学・分子生物学会での講演	京都国際会議場	H18.6.17 ～ H18.6.22

８．発展研究による主な研究成果

(1)論文発表（英文論文　３８件　　邦文論文　９件）

原著論文

1. Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K., and Nagata, S.: Expression of developmental endothelial locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. **J. Immunol.** 172: 3876-3882, 2004
2. Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M., and Nagata, S.: Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. **Eur. J. Immunol.** 34: 1414-1422, 2004
3. Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M. Uchiyama, Y. and Nagata, S.: Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. **Science** 304: 1147-1150, 2004
4. Miyazaki, S., Ishikawa, F., Fujikawa, T., Nagata, S. and Yamaguchi, K.: Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide induces dynamic migration of Gr-1high polymorphonuclear neutrophils in the murine abdominal cavity. **Clin Diagn Lab Immunol** 11: 452-457, 2004
5. Kimura, A., Naka, T., Nagata, S., Kawase, I. and Kishimoto, T.: SOCS-1 suppresses TNF-alpha-induced apoptosis through the regulation of Jak activation. **Int. Immunol.** 16: 991-999, 2004
6. Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukuyama, H., Nagata, S. and Fukunaga, R.: Mnk2 and Mnk1 Are Essential for Constitutive and Inducible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4E but Not for Cell Growth or Development. **Mol. Cell Biol.** 24: 6539-6549, 2004
7. Shiraishi, T., Suzuyama, K., Okamoto, H., Mineta, T., Tabuchi, K., Nakayama, K., Shimizu, Y., Tohma, J., Ogihara, T., Naba, H., Mochizuki, H. and Nagata, S.: Increased cytotoxicity of soluble Fas ligand by fusing isoleucine zipper motif.. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 322: 197-202, 2004
8. Asano, K., Miwa, M., Miwa, K., Hanayama, R., Nagase, H., Nagata, S. and Tanaka, M.: Masking of phosphatidylserine inhibits apoptotic cell engulfment and induces autoantibody

production in mice. **J. Exp. Med.** 200: 459-467, 2004

9. Yoshida, H., Okabe, Y., Kawane, K., Fukuyama, H., and Nagata, S.: Lethal anemia caused by interferon-β produced in mouse embryos carrying undigested DNA. **Nat. Immunol.** 6: 49-56, 2005

10. Ohnishi H., Kaneko Y., Okazawa H., Miyashita M., Sato R., Hayashi A., Tada K., Nagata S., Takahashi M., and Matozaki T.: Differential localization of Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase substrate-1 and CD47 and its molecular mechanisms in cultured hippocampal neurons. **J. Neurosci.** 25: 2702-2711, 2005

11. Iida, S., Kohro, T., Kodama, T., Nagata, S., and Fukunaga, R.: Identification of CCR2, flotillin, and gp49B genes as new G-CSF targets during neutrophilic differentiation. **J. Leuk. Biol.** 78: 481-490, 2005

12. Watanabe-Fukunaga, R., Iida, S., Shimizu, Y., Nagata, S., and Fukunaga, R. : SEI family of nuclear factors regulates p53-dependent transcriptional activation. **Genes Cells.** 10: 851-860, 2005

13. 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

14. 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

15. Hanayama, R., and Nagata, S.: Impaired involution of mammary glands in the absence of Milk Fat Globule EGF Factor 8. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 102: 16886-16891, 2005

16. Bergsmedh, A., Ehnfors, J., Kawane, K., Motoyama, N., Nagata, S., and Holmgren, L.: DNase II and the Chk2 DNA Damage Pathway Form a Genetic Barrier Blocking Replication of Horizontally Transferred DNA. **Mol. Cancer Res.** 4: 187-195, 2006

17. 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

18. Bergsmedh, A., Ehnfors, J., Kawane, K., Motoyama, N., Nagata, S., and Holmgren, L.: DNase II and the Chk2 DNA Damage Pathway Form a Genetic Barrier Blocking Replication of Horizontally Transferred DNA. **Mol. Cancer Res.** 4: 187-195, 2006

19. 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

20. Burgess, B., Abrams, T., Nagata, S., and Hall, M.: MFG-E8 in the retina and retinal pigment epithelium of rat and mouse. **Mol. Vis.** 12: 1437-1447, 2006

21. Witasp, E., Uthaisang, W., Elenstrom-Magnusson, C., Hanayama, R., Tanaka, M., Nagata, S., Orrenius, S. and Fadeel, B.: Bridge over troubled water: milk fat globule epidermal growth factor 8 promotes human monocyte-derived macrophage clearance of non-blebbing phosphatidylserine-positive target cells. **Cell Death Differ** 14: 1063-1065, 2007

22. Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Ogawa, H., Fukuyama, H., Higashi, Y., Nagata, S. and Fukunaga, R.: Critical role of the p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in embryonic hematopoiesis. **Genes Cells** 12: 581-592, 2007

23. Nakahara, M., Nasgasaka, 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

24. Miyanishi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., and Nagata, S.: Identification of Tim-4 as a phosphatidylserine receptor. **Nature** 450: 435-439, 2007

25. Yamaguchi, H., Takagi, J., Miyamae, T., Yokota, S., Fujimoto, T., Nakamura, S., Ohshima, S., Naka, T. and Nagata, S.: Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. **J Leukoc Biol**. 83: 1300-1307, 2008
26. Iida, S., Watanabe-Fukunaga, R., Nagata, S. and Fukunaga, R.: Essential role of C/EBPalpha in G-CSF-induced transcriptional activation and chromatin modification of myeloid-specific genes. **Genes Cells** 13: 313-327, 2008
27. 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
28. Nakaya, M., Kitano, M., Matsuda, M. and Nagata, S.: Spatiotemporal activation of Rac1 for engulfment of apoptotic cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 105: 9198-9203, 2008
29. Dasgupta, S.K., Abdel-Monem, H., Guchhait, P., Nagata, S., and Thiagarajan, P.: Role of lactadherin in the clearance of phosphatidylserine-expressing red blood cells. **Transfusion** 48: 2370-2376, 2008
30. 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

総説（英文）

1. Nagata, S.: Early work on the function of CD95, an interview with Shige Nagata. **Cell Death Differ.** 11: S23-S27, 2004
2. Nagata, S.: DNA degrdation in development and programmed cell death. **Annu. Rev. Immunol.** 23: 853-875, 2005
3. 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: 162-172, 2006
4. Nagata, S.: Apoptosis and Autoimmune Diseases. **IUBMB Life**. 58: 358-362, 2006
5. Nagata, S.: Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. **Immunol. Rev.** 220: 237-250, 2007
6. Kawane, K. and Nagata, S.: Nucleases in Programmed Cell Death. **Methods Enzymol** 442: 271-287, 2008
7. Nagata, S.: Rheumatoid polyarthritis caused by a defect in DNA degradation. **Cytokine and Growth Factor Rev.** 19: 295-302, 2008
8. Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S.: The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. **Immunity** 30: 180-192, 2009

総説（和文）

1. 華山　力成、田中　正人、長田　重一
   「アポトーシス細胞の貪食障害と自己免疫疾患」「実験医学」羊土社
   Vol.22 No.13, 1843-1845 頁, 2004 年 9 月
2. 長田　重一
   「細胞死の分子機構と生理作用」
   「がん研究のいま」第２巻　第４章「がん細胞の生物学」
   編集代表: 鶴尾 隆 谷口 維継, 47-63 頁, 東大出版, 2006 年 2 月
3. 長田　重一
   インタビュー記事「科学する心を語る：WHY? - すべては単純な疑問から- 」
   「実験医学」Vol.34, No.4, 518-523 頁, 羊土社, 2006 年 3 月

4.　吉田　英行、長田　重一
「赤芽球の脱核：ホスファチジルセリンに依存して起こる貪食機構」
「細胞工学」Vol.25, No.2, 170-171 頁, 秀潤社, 2006 年 2 月
5.　宮坂　恵、長田　重一
「MFG-E8 とその免疫応答における役割」
「臨床免疫」Vol.45, No.3, 印刷中, 科学評論社, 2006 年 3 月
6.　岡部　泰賢、長田　重一
「自己の DNA による自然免疫の活性化」「実験医学(増刊号免疫研究最前線 2007)」
Vol.24, No.20, 91-97 頁, 羊土社, 2006 年 12 月
7.　川根　公樹、長田　重一
「ＤＮＡの分解異常による関節炎」
「実験医学」Vol.25, No.4, 507-510頁, 羊土社, 2007年3月

図書(和文)

1. 長田　重一「細胞死」「細胞生物学(永田和宏 中野和彦 米田悦啓 編集)」第 13 章, 154-158 頁, 東京化学同人, 2006 年 12 月
2. 長田　重一「バイオサイエンスの魅力にとりつかれて」私の研究履歴書 連載第 18 回「分子消化器病」Vol.5, No.2, 90-98 頁, 先端医学社, 2008 年 6 月

(2)口頭発表
①学会等
国内７４件,　　海外５８件
②その他
国内　　件,　　海外　　件

(3)特許出願（SORST 研究の成果に関わる特許（出願人が JST 以外のものを含む））

1.　出願番号：特願2006-106351　出願日：2006年4月7日　発明者：長田　重一、川根　公樹
発明の名称：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

	件数
国内出願	1
海外出願	0
計	1

(4)その他特記事項
受賞等
1.　長田　重一（平成 16 年 6 月）
The first International Cell Death Society Prize　(Maynooth, Univ. Ireland)
2.　華山　力成（平成 18 年 2 月）
The Grand Prize of AAA/Science's Young Investigator Award of year 2005
3.　川根　公樹（平成 20 年 4 月）
平成 20 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞
「分解を免れた DNA による自己免疫疾患の研究」
4.　長田　重一（平成 20 年 5 月）
2008 Marian Elliott Koshland Memorial Lecture
「Apoptosis and Engulfment of Dead Cells」
5.　川根　公樹（平成 20 年 10 月）
平成 20 年度 日本生化学会奨励賞

「DNA 分解酵素の生理作用の解析」

新聞報道

1. 平成 16 年 5 月 21 日
   毎日新聞・朝日新聞 NHK 他
   「死んだ細胞、未処理で自己免疫病に」
2. 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」
3. 平成 18 年 6 月 15 日
   サイエンスチャンネル（ｽｶｲﾊﾟｰﾌｪｸﾄ TV 他）
   第 19 話「生命に秘められたアポトーシスの謎」
4. 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」
5. 平成 19 年 3 月
   「Nature Digest 日本語編集版」Vol.4, No.3, 24-25 頁, NPG ﾈｲﾁｬｰｱｼﾞｱﾊﾟｼﾌｨｯｸ
   「アポトーシスを鍵に、関節リウマチの発症メカニズムを探る」
6. 平成 19 年 6 月 21 日
   京都新聞
   「生命科学は今「細胞の自殺」」
7. 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-」
8. 平成 19 年 11 月 30 日
   朝日新聞
   「大食細胞のセンサー解明」

Seminar style presentations

1. Shigekazu Nagata「Degradation of Apoptotic Cells」
   A Henry Stewart Talks Series in Biomedical and Life Sciences “Apoptosis” 2006

９．結び