

「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

アポトーシス細胞の貪食異常や死細胞 DNA の分解異常は SLE 様の自己免疫疾患や関節リウマチを発症させる。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、またアポトーシス細胞の DNA はマクロファージの DNase II によって分解されることを報告した。本年度は(1) 免疫染色、FACS、あるいは Western Blot が可能なマウス Tim-4 や Tim-1 に対するハムスターモノクローナル抗体を作成した。(2) DNase II 欠損マウスは IFN $\beta$  を構成的に産生し、発生過程の後期に貧血により死滅する。私達は以前、この過程は TLR システムに依存しないことを示したが、今回 IRF3、IRF7 遺伝子ノックアウトマウスと掛け合わせることで、このマウスでの IFN $\beta$  遺伝子の活性化には IRF3/IRF7 が関与していることを示した。

## 2. 研究実施内容

### (1) アポトーシス細胞の貪食

私達はこれまでにアポトーシス細胞の貪食に関与する分子として Tim-4 (T-cell immunoglobulin-mucin-domain) および Tim-1 を同定した。Tim-4 は胸腺や脾臓に存在する Mac1 陽性の細胞に発現されている。また、Tim-1 は活性化された T リンパ球が発現すると報告されているがその詳細は不明である。Tim-1、Tim-4 はその細胞外領域を介してフォスファチジルセリンを認識し、アポトーシス細胞の貪食を促進するがその本来の *in vivo* での役割は不明である。そこで、生体における Tim-1、Tim-4 の発現細胞を同定する目的でマウス Tim-1、Tim-4 に対するモノクローナル抗体の作成を試みた。

マウス Tim-1、Tim-4 の細胞外領域にヒト IgG Fc 領域を結合させたキメラタンパク質を構築し、293T 細胞で発現、細胞外に分泌されたタンパク質を Protein A-Sepharose カラムを用いて精製した。精製した Tim-1-Fc、Tim-4-Fc を用いて Armenia Hamster を免疫、そのリンパ球を Bcl-2 を導入した Myeloma 細胞株(NSO)と融合させ数千のハイブリドーマを作成した。Tim-1-Fc および Tim-4-Fc を用いた ELISA 法により Fc 部位と反応するクローンを除いた後、Western Blotting 法、immunohistochemistry、中和活性などを検討し、それらの反応に使用できるハイブリドーマを同定

した。現在、そのハイブリドーマから大量の抗体を調製し、免疫組織染色を行っている。

## (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た後、その死細胞がマクロファージによって貪食された後、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で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。このマウスの胎児肝臓での遺伝子発現の検討から DNase II 欠損マウスでは IFN $\beta$  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、貧血を引き起こしたと結論した。IFN $\beta$  はウイルスや細菌感染により活性化される遺伝子であり、この際、TLR 受容体およびその adaptor を介して IRF (interferon regulatory factor) 3 および 7 により転写が誘導される。私達は以前、DNase II ノックアウトマウスの致死性が TLR の欠損によっても回復しないことから、DNase II 欠損マクロファージでの IFN $\beta$  遺伝子発現には TLR 系は関与していないと結論した。そこで、IRF3、IRF7 の関与を検討した。まず、DNase II ノックアウトマウスと IRF3、あるいは IRF7 欠損マウスを掛け合わせると両者の遺伝子を欠損するマウスは非常に低率で誕生した。一方、IRF3 および IRF7 両者を欠損させた 3 重遺伝子ノックアウトマウスは効率よく誕生した。その際、胎児肝臓での IFN $\beta$  遺伝子の発現はほぼ完全に抑制された。DNase II ノックアウトマウスから調製した MEF にアポトーシス細胞を貪食させると DNA が蓄積し、IFN $\beta$  遺伝子が発現されるが IRF3、IRF7 を欠損させると IFN $\beta$  遺伝子の発現は完全に抑制された。ところで TLR の刺激はそのシグナル伝達の間段階で IFN 遺伝子の活性化へ導くものと TNF $\alpha$  など NF- $\kappa$ B 転写因子を活性化させる経路に分離する。DNase II、IRF3、IRF7 三重遺伝子欠損マウスにおいても TNF $\alpha$  遺伝子は発現していた。以前、私達は DNase II 遺伝子を生後欠損させると TNF $\alpha$  により、リュマチ性関節炎を発症することを見いだしたが、DNase II、IRF3、IRF7 欠損マウスも関節炎を発症した。以上、DNase II 遺伝子の欠損により、アポトーシス細胞の DNA が分解されないと、リソソームに蓄積した DNA により TLR-independent に自然免疫系が活性化されること、そのシグナルは IRF3、IRF7 を介して IFN 遺伝子の活性化、NF- $\kappa$ B を介した TNF $\alpha$  遺伝子の活性化へと導くことを示した。DNase II ノックアウト MEF にアポトーシス細胞を導入すると IFN $\beta$  や IP10 遺伝子が活性化されるが、現在この系を用いて、死細胞 DNA によって自然免疫活性化に関与する分子の同定を進めている。

## 3. 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

## 4. 研究成果の発表等

特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数: 0 件 (CREST 研究期間累積件数: 0 件)