

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 $\beta$ や TNF $\alpha$ 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) IFN $\beta$ によるアポトーシス過程をヒト繊維芽細胞を用いて再現することに成功し、アポトーシス過程で特異的に発現誘導される遺伝子を見いだした。(2) DNase II 遺伝子欠損マウスにおける関節炎発症の機構を解析し、このマウスでは関節で種々の炎症性サイトカインが活性化されたサイトカインストームを形成していることを見いだした。(3) 血小板が活性化されるとその表面にフォスファチジルセリンが暴露し、血液凝固反応を惹起する。このリン脂質のスクランブルを媒介する分子を同定し、ヒト Scott Syndrome の患者ではその分子の遺伝子に変異が導入され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 (京都大学大学院医学研究科・教授) (研究代表者)
- 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

(1) Interferon による細胞死

マクロファージにおいて死細胞や赤芽球からの DNA を分解する酵素 DNase II をノックアウトするとそのマウスは発生の途上で死滅すること、この際未分解 DNA を蓄積したマクロファージが異常に活性化され、interferon (IFN) を産生、これが赤芽球や胸腺細胞に作用してアポトーシスを誘導することを報告した。今回、IFN によるアポトーシスの分子機構を解析するため、ヒト FL 細胞に IFN 受容体を過剰発現した細胞株を樹立した。親株である FL 細胞は高濃度の IFN によっても

死滅しないが、IFN 受容体を過剰発現した細胞株は IFN により、用量依存的に死滅した。この細胞死はカスパーゼ阻害分子により抑制されたことから、IFN はアポトーシスを誘導できると結論した。この細胞死は Fas リガンドによるアポトーシスとは異なり、蛋白合成の阻害分子で抑制できたことから、IFN は新しい遺伝子の発現を誘導し、これがアポトーシスをおこしていると結論した。そこで、Microarray 法を用いて遺伝子発現を検討したところ、親株である FL 細胞では見られず、IFN 受容体を過剰発現した細胞のみで IFN により誘導される遺伝子群が見つかった(表 1)。この中には、TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing factor) や、Bcl214 などアポトーシス関連遺伝子も認められた。今後、これらの分子が実際、IFN によるアポトーシスの実行因子であるかどうか検討する予定である (Kitahara et al. Eur. J. Immunol. 40, 2590, 2010)。

表1. IFN により死滅する IFN 受容体を過剰発現する細胞で顕著に発現誘導される遺伝子

Symbol (gene title)	FL			F19		
	0h	24h	24h/0h Fold	0h	24h	24h/0h Fold
<i>Cxcl10</i> (chemokine (C-X-C motif) ligand 10)	2.7	15.6	5.8	2.5	49834.2	19933.7
<i>Cxcl11</i> (chemokine (C-X-C motif) ligand 11)	6.7	53.0	7.9	3.0	40572.0	13524.0
<i>Gbp4</i> (guanylate binding protein 4)	2.5	5.8	2.3	2.3	3694.7	1606.4
<i>Indo</i> (indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase)	8.0	290.6	36.3	3.3	70983.1	21510.0
<i>C6orf32</i> (chr. 6 open reading frame 32)	2.6	4.2	1.6	2.4	1696.7	707.0
<i>Bcl2l14</i> (BCL2-like 14)	2.4	4.5	1.9	2.3	628.9	273.4
<i>Tgm2</i> (transglutaminase 2)	68.9	110.0	1.6	15.7	2435.9	155.2
<i>Trail</i> (TNF-related apoptosis-inducing ligand)	11.8	422.8	35.8	8.8	24699.3	2806.7
<i>Sept4</i> (septin 4)	11.0	4.2	0.4	6.8	173.2	25.5

## (2) DNase II 遺伝子欠損マウスにおけるサイトカインに依存した関節炎

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、マクロファージ・リソソームに存在する DNase II によってさらに分解される。DNase II 遺伝子を欠損したマウスは発生途上、死滅するが、この遺伝子を生後、欠損させると多発性の関節炎を発症する。この際、発症した関節では繊維芽細胞、滑膜細胞、マクロファージなどが異常増殖し、肉芽を形成、軟骨や骨を破壊する。また、この際、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 をはじめとする炎症性サイトカイン遺伝子、IFN、CSF、種々のケモカイン遺伝子の異常な発現誘導も認められる。この関節炎の原因を探るため、DNase II 欠損マウスを種々のサイトカイン遺伝子のノックアウトマウスと掛け合わせた。その結果、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、あるいは IL-6 遺伝子、どの遺

伝子が欠損しても関節炎はほぼ完全に抑制された。この際、関節では、ロックアウトされた遺伝子の mRNA ばかりでなく他のサイトカイン、ケモカイン遺伝子の mRNA も減少していた。一方、リンパ球の発生に必須の遺伝子 Rag1 遺伝子の欠損は関節炎の発症をより増悪させた。以上より、このマウスの関節では IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  がお互いの遺伝子を活性化し合い、いわゆるサイトカインストーム(図1)を形成、滑膜細胞などの増殖を促し、肉芽の形成を通して関節炎を発症させていると結論した。この際、CSF やケモカインの作用により、好中球やマクロファージ、リンパ球が関節にリクルートされ、リンパ球は抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生を通して、関節炎の発症を抑制すると思われる。これらの特徴はヒトの全身性発症性若年性関節炎(systemic onset juvenile idiopathic arthritis) に類似しており、そのマウスモデルとして役立つであろう (Kawane et al. PNAS 107, 19432, 2010)。

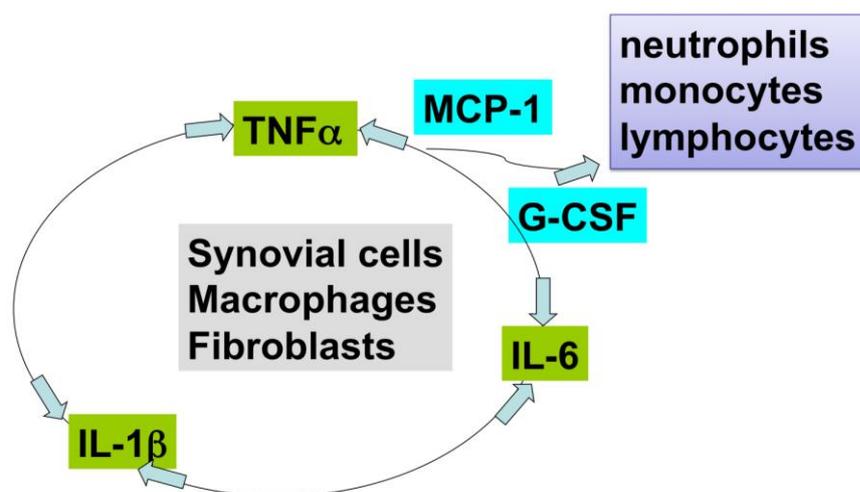


図 1. DNase II 遺伝子を欠損したマウスで関節炎を発症した関節でのサイトカインストーム  
関節で、TNF $\alpha$ , IL-6, あるいは IL-1 $\beta$  遺伝子が活性化されるとこれらサイトカインは自分自身、またお互いの遺伝子を活性化し合い、大量の炎症性サイトカインが関節腔に蓄積、これが滑膜細胞、繊維芽細胞、マクロファージ、破骨細胞の増殖を促し、滑膜や骨を破壊すると考えられる。

### (3) 活性化された血小板において作用するリン脂質スクランブラーゼの同定

二重膜を形成している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) はほぼそのすべてが内側に、一方、フォスファチジルコリン (PC) やスフィンゴミエリンは主に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崩れ、細胞外に暴露された PS はマクロファージに対して eat me シグナルとして作用する。一方、活性化された血小板で暴露された PS は血液凝固因子の足場として作用し、凝固因子を活性化、血液凝固を促進する。リン脂質の非対称性の破綻は Ca に依存したリン脂質スクランブラーゼによって担われていると考えられているがその実体はこれまで明らかになっていない。私達はマウス B 細胞株 Ba/F3 を Ca の非存在下で Ca-ionophore A24931 で処理すると、一過的、可逆的に PS が暴露されることを見いだした。そこで、この性質を

利用して FACS を用いた濃縮操作を19回繰り返すことにより、PS を強く暴露する細胞を樹立した。次いで、この細胞より発現クローニング法を用いてリン脂質のスクランブルを媒介する分子を同定した。この因子は TMEM16F と呼ばれる8回膜貫通領域を持つ膜蛋白質であった (図2)。血液凝固過程に欠陥を持つ Scott Syndrome と呼ばれるヒトの疾患が知られている。この患者から樹立された B リンパ球株では TMEM16F 染色体遺伝子のエクソン13をスプライスさせる配列に点変異が導入されており、正常な TMEM16F 分子を合成できなくなっていた。以上より、TMEM16F 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酵素と結論した。

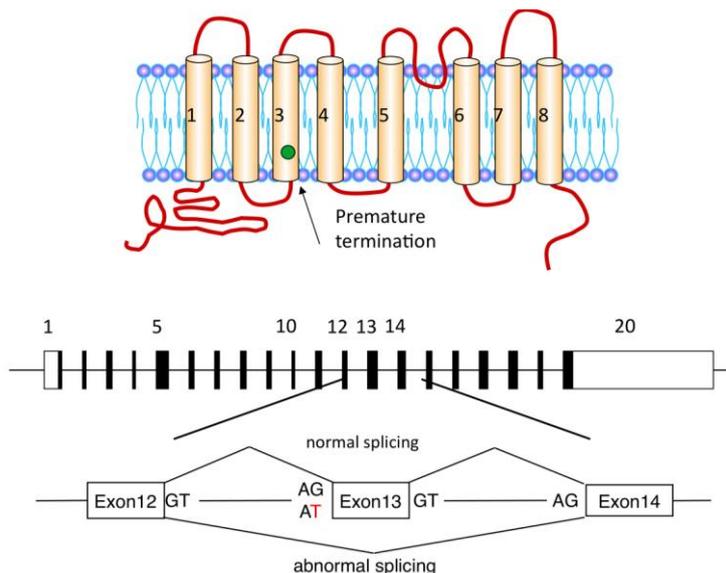


図 2 血小板で作用している phospholipid scramblase (TMEM16F) の構造とヒトの病気 Scott Syndrome の患者における変異

TMEM16F は8個の膜貫通領域を持つ。Scott Syndrome の患者ではイントロン12の GT-AG 配列が AG---AT に変異し、エクソン13が mRNA から排除される。このため、この分子は第3番目の膜貫通領域で終結する。

## §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 the milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) gene in human systemic lupus erythematosus. *Eur. J. Immunol.* 40: 1778-1785, 2010(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.* 17: 931-941, 2010 (doi:10.1038/cdd.2009.186)
3. Kitahara, Y., Kawane, K. and Nagata, S.: Interferon-induced TRAIL-independent cell death in *DNase II<sup>-/-</sup>* embryos. *Eur J Immunol.*, 40:2590-2598, 2010 (doi:10.1002/eji.201040604)

4. Fujii, T., Ueda, T., Nagata, S. and Fukunaga, R.: Essential role of p400/mDomino chromatin-remodeling ATPase in bone marrow hematopoiesis and cell-cycle progression. **J Biol Chem.**, 285: 30214-30223, 2010 (doi:10.1074/jbc.M110.104513)
5. Östberg, T., Kawane, K., Nagata, S., Yang, H., Chavan, S., Klevenvall, L., Bianchi, ME., Harris, HE., Andersson, U. and Palmblad, K.: Protective targeting of high mobility group box chromosomal protein 1 in a spontaneous arthritis model. **Arthritis Rheum.**, 62: 2963-2972, 2010 (doi:10.1002/art.27590)
6. 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 (doi:10.1073/pnas.1010603107)
7. Suzuki, J., Umeda, M., Sims JP. and Nagata, S.: Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. **Nature**, 468:834-838, 2010 (doi:10.1038/nature09583)