



研究課題名 マクロファージによる死細胞貪食・分解の分子機構

京都大学・大学院医学研究科・教授

ながた しげかず
長田 重一

研究分野：医歯薬学

キーワード：生体分子医学

【研究の背景・目的】

アポトーシスでは細胞や核が凝縮、断片化されるとともに染色体 DNA が切断される。そして、その最終段階ではマクロファージが死細胞を貪食・処理する。申請者らは Fas リガンドによるアポトーシスのシグナル伝達の解析から、この過程にはカスパーゼと呼ばれるプロテアーゼ、カスパーゼによって活性化される DNase (CAD) が関与していることを示した。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取り込まれた後、リソソームに存在する DNase II によってさらに分解されることを見出した。DNase II 欠損マウスでは未分解の DNA を蓄積したマクロファージが IFN や TNF を分泌し、マウスは重篤な貧血、関節炎を発症した。この未分解 DNA によるマクロファージの活性化は Toll-like receptor (TLR) に依存せず、Eya (Eyes absent) と呼ばれる因子が関与していた。Eya にはスレオニン・フォスファターゼ活性が存在した。

一方、アポトーシス細胞の貪食を *in vitro* で検定する方法を樹立、貪食を促進する分子 MFG-E8、Tim-4 を同定した。MFG-E8 はアポトーシス細胞の表面に暴露されるフォスファチジルセリン (PS) を認識、死細胞をマクロファージに橋渡しする。一方、Tim-4 は 1 個の膜貫通領域を持つ膜タンパク質であり、その細胞外領域が PS を認識し、死細胞を捕捉貪食する。本研究はこの様な背景をもとに (1) 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 (2) 死細胞分解の異常が自然免疫を活性化する分子機構を明らかにする。

【研究の方法】

①アポトーシスにおけるフォスファチジルセリンの細胞表面への暴露機構の解析

アポトーシス時には本来、細胞膜の内側に局在している PS が露出し、マクロファージに対して“eat me”シグナルとして作用する。PS の暴露はカスパーゼの下流で起こる反応と考えられるがその分子機構は不明である。私達は、低濃度の Ca 刺激では一過的に PS が細胞の表面に暴露されることを見いだした。そこで、まず、この Ca に依存して PS を暴露させる分子の同定を試みる。

②Tim-4 と会合する分子の同定

Tim-4 がアポトーシス細胞の貪食を促進する際、シグナルを伝達する何らかの分子と会合すると考えられる。そこで、この因子の同定を試みる。すなわち、Tim-4 を発現し、死細胞の貪食能がある NIH3T3 の細胞表面タンパク質をビオチン標識する。この細胞を可溶化後、抗 Tim-4 抗体で沈降させ、Tim-4 と共沈するタンパク質があるかどうか検討、特異的なタンパク質が確認できればそれを同定する。

③IFN 遺伝子の発現など自然免疫の活性化に關与している Eya の生化学的解析

Eya にはスレオニンフォスファターゼ活性が存在する。この活性領域は既知のフォスファターゼのアミノ酸配列とは相似せず、新しいフォスファターゼドメインと考えられる。そこで、種々の欠質変異、点変異を導入し、スレオニンフォスファターゼドメインの最小ドメイン、活性部位を同定する。また、京都大学理学部・藤好研究室と共同でこのフォスファターゼの三次構造解析を進める。

【期待される成果と意義】

本研究は動物の発生、恒常性の維持において重要な役割を果たす細胞死、その最終段階でおこる死細胞貪食・分解の分子機構を明らかにしようとするものである。細胞死は細胞生物学、免疫学の重要な課題であり、本研究の成果はこれら分野の基礎研究の発展に貢献するであろう。これまでの申請者らの結果は死細胞の貪食・分解の異常が全身性エリテマトーデス、関節性リウマチなどの自己免疫疾患をもたらすことを示している。抗体の産生を伴う獲得免疫、種々のサイトカインの産生を促す自然免疫はウイルスや細菌など外来からの病原体によって引き起こされる。申請者らの結果は死細胞の貪食・分解の異常によって生成された物質が外来からの病原体と同様な機構で獲得免疫、自然免疫を活性化している可能性を示唆している。

本研究でアポトーシス細胞の貪食の分子機構、DNA による免疫の活性化機構が明らかになれば、全身性エリテマトーデス、関節性リウマチなどヒトの自己免疫疾患の原因解明に大きく貢献すると考えられる。

【当該研究課題と関連の深い論文・著書】

1. Okabe, Y., Sano, T. and Nagata, S.: Regulation of the innate immune response by threonine phosphatase of Eyes absent. *Nature* **460**: 520-524, 2009
2. Nagata, S., Hanayama, R. and Kawane, K.: Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* **140**: 619-630, 2010

【研究期間と研究経費】

平成 22 年度 - 26 年度

318,700 千円

【ホームページ等】

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~nagata/snagata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp>