

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成17年度採択分

平成20年 3月31日現在

研究課題名（和文） 細胞死の分子機構とその生理作用
研究課題名（英文） Molecular mechanism of cell death
and its physiological roles

研究代表者

長田 重一 (NAGATA SHIGEKAZU)
京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要：アポトーシス細胞や赤芽球の核はマクロファージに貪食され、その DNA はマクロファージ・リソソームの DNase II によって分解される。DNase II^{-/-}マウスでは未分解 DNA を蓄積したマクロファージが IFN β を産生、マウスは発生途上で重度の貧血で死滅した。DNase II 遺伝子を生後、誘導的に欠如させると関節リウマチを発症した。これらの結果は、アポトーシスや造血における DNA の分解異常が貧血や関節炎の原因となることを示している。ところで、マクロファージは死細胞表面に暴露された phosphatidylserine (PS) を認識して死細胞を貪食するが、赤芽球から脱核した核も PS を暴露し、マクロファージはこれを認識して貪食した。マウス腹腔に本来存在するマクロファージから PS を認識する新たな受容体 Tim4 を同定した。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：アポトーシス・シグナル伝達・造血・マクロファージ・貪食

1. 研究開始当初の背景

生体の恒常性は細胞の増殖・分化ばかりでなく、アポトーシス、細胞死によっても制御されている。アポトーシスでは細胞や核が凝縮、断片化するとともに染色体 DNA が切断される。そして、死細胞はリン脂質 phosphatidylserine (PS) を暴露し、マクロファージによって速やかに貪食・処理される。私達はこれまでに、死細胞が貪食されないと SLE (systemic lupus erythematosus) に類似した自己免疫疾患を発症すること、また、貪食された死細胞の DNA がマクロファージ内で分解されない DNase II^{-/-} マウスは発生途上で死滅することを見出した。

2. 研究の目的

上記の背景のもと、(1) アポトーシスの分子機構と生理作用、特に DNA 分解異常が生体に及ぼす影響、その分子機構を明らかにする。(2) 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、生理作用を明らかにする。これらを目的とした。

3. 研究の方法

(1) DNase II^{-/-}胎児肝より RNA を調製し、この臓器で遺伝子発現を microarray 法を用いて検討する。

(2) DNase II^{-/-}マウスと TLR9, TLR3, MyD88 など TLR システムを欠如したマウスをかけあ

わせる。

(3) DNase II^{-/-}マウスは発生途中で死滅することから、DNase II 遺伝子を生後、ノックアウトすることを試みる。

(4) 赤血球の前駆細胞を調製し、in vitro での分化、脱核を試みる。脱核を再現できれば、マクロファージによる核の貪食を試みる。

(5) アポトーシス細胞の貪食に関与している MFG-E8 は、乳腺が退縮する際に大量に発現される。そこで、MFG-E8^{-/-}マウスで乳腺の退縮の異常を調べる。

(6) MFG-E8 はアポトーシス細胞の貪食に関与しているが、脾臓胚中心のマクロファージなどの細胞のみこの分子を発現している。そこで、MFG-E8 非発現細胞がどのように死細胞を貪食するか検討する。

4. これまでの成果

(1) DNase II^{-/-}マウスの胎児肝臓では一群の IFN 誘導遺伝子が強く発現していた。実際、未分解 DNA を蓄積したマクロファージが構成的に IFN β 遺伝子を発現していることを in situ hybridization により確認した。これに対応して、IFN type I 受容体遺伝子の欠損が DNase II^{-/-}マウスの致死性を回復することを見出した。

(2) DNase II^{-/-}, TLR9, TLR3, MyD88, TRIF など、TLR 関連遺伝子の欠損は DNase II^{-/-}マウスの致死性を回復することは無かった。この

ことから、哺乳動物 DNA による IFN β 遺伝子の活性化はバクテリアやウイルスの構成成分による IFN 遺伝子の活性化とは異なり、TLR は関与していないと結論した。

(3) DNase II 遺伝子を生後、誘導的に欠如させたマウス、DNase II^{-/-}IRF-IR^{-/-} マウスは年を取るに従い関節リウマチを発症した。この際、関節では IL-6, IL-1 β , TNF などの遺伝子が強く発現していた。また、骨髄に存在するマクロファージは TNF を発現しており、抗 TNF 抗体を投与するとリウマチの発症が阻害された。このことから、DNA を分解できないマクロファージから TNF が産生され、これが関節炎の発症に導いたと結論した。

(4) 赤芽球から脱核した核を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。この貪食はアポトーシス細胞の貪食と同じように PS に依存していた。赤芽球から脱核した核は速やかに ATP を失い、核を覆う細胞膜の非対称性が維持できなくなり、PS が暴露されたと考えられる。

(5) 乳腺の退縮時、乳脂肪球は乳腺上皮細胞に吸収される。その際、乳脂肪球の外膜に PS が暴露され、乳腺上皮細胞から分泌された MFG-E8 が結合、上皮細胞への再吸収を促進する。MFG-E8^{-/-}の乳腺では乳脂肪球の再吸収、退縮が抑制され、次世代の乳児のための乳腺の発達が遅れていた。

(6) マウスの腹腔に存在するマクロファージは MFG-E8 非依存的にアポトーシス細胞を貪食した。そこで、このマクロファージに対するモノクローナル抗体のライブラリーから死細胞の貪食を抑制する抗体 (Kat5) を同定した。ついで、Kat5 の抗原を発現クローニング法によって同定し、これが Tim4 と呼ばれる蛋白質であることを示した。Tim4 はタイプ I 膜蛋白質であり PS に対する受容体としてアポトーシス細胞を認識、それを貪食すると結論した。

5. 今後の計画

(1) DNase II^{-/-} マウスでの関節リウマチ発症の分子機構を解析するとともに、DNase II^{-/-} での IFN β や TNF α 遺伝子活性化の分子機構を解析する。

(2) Tim4 遺伝子ノックアウトマウスを樹立し、この因子の生理作用を解明する。具体的には Tim4 の欠損が自己免疫疾患などの病気を発症させるかどうか検討する。また、MFG-E8 や Tim4 によってマクロファージがアポトーシス細胞を貪食する際のマクロファージでのシグナル伝達を解析する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. 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.

2. 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.

3. 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.

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. Kawane, K., Ohtani, M., Miwa, K., Kizawa, T., Kanbara, Y., Yoshioka, Y., Yoshikawa, Y., and Nagata, S.: Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages. **Nature** **443**, 998-1002, 2006.

6. 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

7. Nagata, S.: DNA degradation in development and programmed cell death. **Annu. Rev. Immunol.** **23**, 853-875, 2005.

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. 川根公樹 平成20年4月15日
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」

ホームページ等:

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