The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes
Author(s)	華山, 力成
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45239
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【37】

氏　　名	華山力成（はなやまりきなり）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８４６５　号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学　位　論　文　名	Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes **（アポトーシス細胞と食細胞を結びつける因子の同定）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　長田　重一 （副査） 教　授　宮坂　昌之　　教　授　平野　俊夫

論　文　内　容　の　要　旨

〔目　　的〕

生体内では、不要になった細胞や有害となる細胞は、アポトーシスにより死滅し、マクロファージなどの食細胞に速やかに貪食され除去される。この貪食により、アポトーシス細胞から二次的に炎症を引き起こす分子が放出されるのを防いでいるものと考えられる。しかしながら、この貪食過程の定量方法は確率されておらず、どのような分子を介してマクロファージがアポトーシス細胞を認識するかについては未だ不明な点が多い。よって、この過程に関与する分子の同定と作用機構及びその生理的意義の解明を目的とする。

〔方法ならびに成績〕

これまで、私達のグループでは、アポトーシス時に活性化される DNase である CAD（Caspase-activated DNase）を同定し、この酵素が死につつある細胞内で活性化され、染色体 DNA を分解していることを示してきた。続いて、アポトーシス時においても CAD の活性化が起こらないトランスジェニックマウスを作成した。このマウスから胸腺細胞を調製し、in vitro でアポトーシスを誘導したところ、染色体 DNA は全く分解されずに TUNEL 反応陰性のままであった。ところが、in vivo においては、これらのアポトーシスを起こした細胞は、周囲にいるマクロファージにより取り込まれ、マクロファージ内に存在する DNase によってその DNA が分解され、TUNEL 反応陽性になっていた。そこで私は、この現象を用いてマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を定量化する系を樹立した。すなわち、CAD の機能を欠損したマウスの胸腺細胞に in vitro でアポトーシスを誘導した後、この細胞をマウス腹腔内より調製したマクロファージと共培養して貪食させる。マクロファージはアポトーシス細胞を特異的に貪食し、細胞内のリソゾームに存在する DNase によりアポトーシス細胞の DNA を切断し TUNEL 反応陽性となる。これを FACS で定量することにより、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を定量化できる系を樹立した。ついで、マウスの腹腔内マクロファージを抗原としてハムスターを免疫し、マクロファージ表面蛋白質に対する約３千種類のモノクローナル抗体を作成した。これらの抗体をそれぞれ貪食の実験系に加えたところ、一つの抗体がマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に影響を与えることを見いだした。そこで、この抗体によって認識される蛋白質をマウスマクロファージ細胞株（P388D1）より精製し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、この蛋白質は MFG-E8

(Milk Fat Globule-EGF factor 8) と呼ばれる分子で、463 個のアミノ酸からなる蛋白質であった。MFG-E8 は、N-末端からシグナル配列、2 つの EGF ドメイン、プロリン・スレオニン(PT)に富むドメイン、血液凝固因子Ⅷ(Factor VIII) に相同性を持つ 2 つの領域 (C1, C2) からなっている。特に 2 番目の EGF ドメインにはインテグリンとの結合に必要な RGD (Arg-Gly-Asp) という配列が存在する。MFG-E8 は母乳中に多く含まれ、乳腺の上皮細胞から分泌される糖蛋白質として 1990 年に同定されたが、その生理作用はこれまで不明であった。

MFG-E8 のアポトーシス細胞貪食における作用を検討する為、その発現を検討したところ、この分子はチオグリコレートなどにより活性化されたマクロファージによって分泌される蛋白質であることが示された。そして、MFG-E8 の組み換え体を用いた解析から、この分子はアポトーシス細胞に特異的に結合し、生きた細胞には全く結合しないことが判明した。ところで、細胞膜を構成するリン脂質ホスファチジルセリンは増殖している細胞中では細胞の内側に存在するが、アポトーシスが起こると細胞の外側に提示される。MFG-E8 はこのホスファチジルセリンを特異的に認識してアポトーシス細胞に結合した。また、この結合は MFG-E8 の C 末端に存在する C1, C2 領域を介しておこることが認められた。

次に、MFG-E8 の N 末端に存在する EGF ドメインの生理作用を検討した。この領域の RGD モチーフは、インテグリンに結合することが知られていることから、マウスの繊維芽細胞 (NIH3T3) にインテグリンを強制発現させたところ、本来アポトーシス細胞を貪食しないマウスの繊維芽細胞が MFG-E8 の存在下でアポトーシス細胞を効率良く貪食した。これらの結果は MFG-E8 がアポトーシス細胞を特異的に認識し、アポトーシス細胞と食細胞をリンクする因子であることを示している。一方、RGD モチーフのアスパラギン酸残基をグルタミン酸残基に置換した MFG-E8 の D89E 変異体は、in vitro、in vivo でのマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を顕著に抑制した。

〔総　　括〕

私達はマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を特異的に定量できる系を樹立した。そしてこの系を用い、アポトーシス細胞で提示される "eat me" シグナルの一つはホスファチジルセリンであること、また活性化したマクロファージより分泌される MFG-E8 がアポトーシス細胞を特異的に認識し、その貪食処理過程に関与していることを示した。

論文審査の結果の要旨

本研究は、アポトーシスの最終過程である、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食反応を分子レベルで解析したものである。すなわち、マクロファージがアポトーシス細胞を貪食した後、その DNA を分解することを用いて貪食過程を定量化する実験系を樹立した。

次に、マウス腹腔マクロファージに対するモノクローナル抗体を作製し、この貪食過程に影響を与える抗体を検索し、2422 と名付けた抗体がマクロファージの貪食能を上げる活性をもつことを見出した。続いて、この抗体が認識する分子の同定を行い、その分子が、MFG-E8 であることを明らかにした。MFG-E8 は母乳中に多く含まれ、乳腺の上皮細胞から分泌される糖蛋白質として同定されていたが、その生理作用はこれまで不明であった。本研究では、MFG-E8 は、活性型マクロファージにより分泌され、アポトーシス細胞表面に露出されるリン脂質ホスファチジルセリンと特異的に結合する分子である事を示した。更に、MFG-E8 は、その EGF ドメインに含まれる RGD 配列を介して、マクロファージ細胞表面上にあるインテグリンと結合し、アポトーシス細胞との橋渡し役となっていることを明らかにした。

以上の知見は今後、マクロファージによるアポトーシス細胞除去の生理的意義の解明に重要な情報をもたらす研究であると期待され、学位の授与に値すると考えられる。