食細胞による死細胞除去のシグナル伝達機構の解明

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター
免疫ネットワーク研究室
華山 力成

1. はじめに

緒言

本研究では、マクロファージによるアポトーシス細胞の食食受容体 Tim4のシグナル伝達機構を明らかにする為、Tim4に特異的に結合する膜蛋白質 Myoferlinの生理機能を解明する。

目的

生体内でアポトーシスを起こした細胞は、マクロファージなどの食細胞に食食され除去される。私達は、マクロファージの一部にTim4という分子が発現しており、アポトーシス細胞の食食を促進することを以前示した (Nature.450:435 (2007))。Tim4はI型膜蛋白質であり、アポトーシス細胞膜上のリン脂質ホスファチジルセリンと特異的に結合する受容体である。ところが、Tim4の細胞内領域は40個のアミノ酸と短く、特徴的なドメイン領域が存在しない為、Tim4がどのような分子機構を介して死細胞を取り込むのか不明である。そこで申請者らは、Tim4には共受容体が存在すると考え、その同定を試みた。すなわち、Tim4を過剰発現させたNIH3T3細胞を可溶化し、Tim4に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、共沈降した分子を質量分析により同定したところ、Myoferlinという分子が同定された。Myoferlinは2061個のアミノ酸からなるII型膜蛋白質で、その大部分が細胞内領域である。特に6つのC2ドメインを保有し、リン脂質や、Dynamin、Caveolin等のメンブレントラフィック分子と結合することが示されている。Myoferlinは線虫からヒトまで幅広く保存されており、筋芽細胞の膜融合、様々な小胞の融合と再利用、エンドサイトーシス、膜の再生や修復に深く関与する。ところが、データベースを用いてMyoferlinの発現組織・細胞を調べたところ、マクロファージに特異的に発現していることが明らかになった。よって、本研究では、Myoferlinがマクロファージによるアポトーシス細胞の食食を制御する細胞内シグナル分子であるかを検討し、Myoferlinによる食食制御の分子機構を解明することを目標にする。

背景

本研究はマクロファージによるアポトーシス細胞の食食に関わる受容体分子 Tim4 のシグナル伝達を担うと考えられる分子 Myoferlin の機能を、私達がこれまで確立してきた死細胞食食の実験系を利用して解析するものである。Tim4 がどのようなシグナル伝達機構を介して、死細胞の食食を行うのかは長らく不明であり、本研究を通してこの分子機構が解明されたならば、この研究分野において大きな意義をもつものと期待される。特に、これまでマクロファージ内で食食を促進する分子は、Rac1 や GEF など細胞骨格を制御するものしか報告されていなかった。今回同定した Myoferlin は、細胞骨格制御とは異なり、Dynamin や Caveolin 更には、本研究を通して同定が期待される分子を介して食食を促進する可能性があり、新たな食食メカニズムを提唱できると期待される。

2. 方法

今回私達は、マクロファージによる死細胞認識の受容体Tim4と結合する分子Myoferlinを同定した。MyoferlinはマクロファージやTim4過剰発現で高い食食能を獲得するNIH3T3細胞などに強く発現しており、Tim4に対する免疫沈降で共沈降してくるが、Tim4過剰発現だけでは食食能を獲得できないBaF3細胞には発現していない。よって、BaF3細胞にTim4とMyoferlinを共発現させる事により、両者が互いに結合するかを免疫沈降による実験で検討するとともに、BaF3細胞が食食能を獲得できるかを検証する。この細胞で、Myoferlin がTim4と結合することが確認できた場合、Myoferlinがどの領域を介してTim4と結合するかを各領域の欠損変異体を作成して検討する。一方、Myoferlinが既に発現しているマクロファージやNIH3T3細胞に対しては、short-hairpin RNA (shRNA) をレトロウイルスにて導入しMyoferlinをノックダウンした細胞を作成し、これらの細胞で死細胞食食能が低下するかを検討する。Myoferlinが死細胞の取り込みに関与

していることが示せた場合、Myoferlinノックアウトマウス (Doherty KR, et al. Development. 132, 5565 (2005))を導入し、マクロファージによる死細胞の貪食能を野生型と比較し評価する。ノックアウトマウスで死細胞の貪食能が低下していた場合、このマウスの体内で死細胞が蓄積しているかを検証し、その結果生じる疾患、特に自己免疫疾患が発症するかを調べる。

3. 結果 研究成果

まず私達は BaF3 細胞に Tim4 と Myoferlin をレトロウイルスで導入し、両者を強く発現する細胞株を樹立した。この細胞を用いて、Tim4 に対する免疫沈降を行い Myoferlin が結合するかを Western blot で検討したところ、両者は特異的に結合することが示された。しかしながら、BaF3 細胞に Tim4 とともに Myoferlin を過剰発現させても、やはりアポトーシス細胞の貪食能を獲得できないことが明らかとなった。また、shRNA を用いて Myoferlin をノックダウンした NIH3T3 細胞を樹立し、アポトーシス細胞の貪食能を評価したところ、コントロールに比べ、Tim4 によるアポトーシス細胞の貪食能が顕著に障害されることは認められなかった。よってこれらの実験から、Myoferlin は Tim4 によるアポトーシス細胞の貪食シグナルに関与しないことが示された。その後の実験により、Tim4 はアポトーシス細胞の貪食シグナルを伝える分子ではなく、マクロファージにアポトーシス細胞を繋ぎ止める分子であることが示された。Tim4 によってマクロファージに繋ぎ止められたアポトーシス細胞が取り込まれるためには、他のシグナル、すなわち MFG-E8 とインテグリンによる貪食シグナルが必要であることが明らかになった。よって私達は、マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食過程は、Tim4 による繋ぎ止め (Tether) と MFG-E8 とインテグリンによる取り込み (Uptake) の二段階であることを示した (Toda S, Hanayama R, Nagata S. Mol Cell Biol. 32(1):118-25 (2012))。

その後、私達は大阪大学免疫学フロンティア研究センターで新たな研究室を開設し、Myoferlin 本来の生理機能の解明に取り組んだ。私達は Myoferlin が NIH3T3 細胞のみならず、様々なマクロファージ、特にチオグリコレート培地で誘導した腹腔マクロファージや GM-CSF で誘導した骨髄由来樹状細胞などの炎症性細胞に強く発現していることが明らかになった。そこでこれらの細胞における Myoferlin の生理的機能を明らかにしようと考え、Myoferlin の細胞内局在を詳細に検討した。未刺激の NIH3T3 細胞で Myoferlin は細胞質全体に弱く発現しているが、細胞質内にカルシウムを流入させる monensin を作用させると Myoferlin は大型の小胞に局在していることが明らかとなった。この小胞はリソソームのマーカーである LAMP-1 に陽性であることから、カルシウム刺激によって融合したリソソームであることが判明した。私達はこの結果から Myoferlin はリソソームの融合を促進する分子ではないかと考え、shRNA を用いて Myoferlin をノックダウンした NIH3T3 細胞を樹立した。Monensin で細胞質内にカルシウムを流入させると、コントロール細胞では多くのリソソームが融合し肥大化するのに対し、Myoferlin ノックダウン細胞ではリソソームの融合が強く阻害されていることが明らかとなった。更に私達は、Myoferlin が最初の C2 ドメインを介して互いの膜リン脂質と結合することにより、リソソームの融合を促進することを見出した。

4. 考察 まとめ

今回の研究では残念ながら、MyoferlinがTim4によるアポトーシス細胞の貪食シグナルを伝える分子ではないことが明らかになったが、Myoferlinがマクロファージ内のリソソームの融合を制御する分子であることを明らかにすることができた。生理的にリソソームは、エンドソームやファゴソーム、更にはオートファゴソームと融合する。よって今後、Myoferlinがこれらのリソソーム融合過程を制御するかを明らかにしたいと考えている。更にMyoferlinは細胞膜にも発現している為、分泌型リソソームと細胞膜の融合を介してリソソームの開口放出を促進するかを検討する必要がある。実際、shRNAでMyoferlinをノックダウンした NIH3T3細胞を電子顕微鏡で観察したところ、リソソームの開口放出の障害により、多くの消化残渣が蓄積していることを確認している。最後に、リソソームの開口放出機構はリソソーム酵素の放出以外にも様々な免疫応答に関与していると考えられる。例えば、MHCによる抗原提示機構はファゴリソソームと細胞膜との融合により制御されており、今後、更なる研究により、その分子機構を明らかにしたいと考えている。更に、エクソソームと呼ばれる小型膜小胞は多胞性エンドソーム内で産生され、それが細胞膜と融合することによって細胞外へと放出される。私達はMyoferlinが多胞性エンドソームにも発現していることを確認しており、エクソソームの放出による免疫応答の活性化機構を明らかにしたいと考えている。リソソーム酵素の放出機構は、アポトーシス細胞の貪食除去やオートファジーに続く第三のリソソームによる生体恒常性維持機構である可能性があり、今後新しい研究分野を切り開くことができると期待している。

5. 発表論文、参考文献

Toda S, **Hanayama R**, Nagata S.
Two-step engulfment of apoptotic cells.
Mol Cell Biol. 32(1):118-25 (2012)