

戦略的創造研究推進事業 CREST

研究領域「アレルギー疾患・自己免疫疾患などの発症  
機構と治療技術」

研究課題「アポトーシス細胞の貪食・分解とその異常」

## 研究終了報告書

研究期間 平成20年10月～平成26年3月

研究代表者:長田重一  
(京都大学大学院医学研究科・教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

**背景:** ヒトの体内では毎日、100億を超える細胞がアポトーシスの過程を経て死滅する。死滅した細胞は速やかにマクロファージなどの貪食細胞によって貪食、分解される。この貪食過程が効率よく進行しなければ、死細胞はいわゆる“secondary necrosis”の状態に陥り、核やミトコンドリアなどの構成成分を遊離、これが免疫系を活性化して、全身性エリテマトーデス(SLE)などの自己免疫疾患を発症する。死細胞はその表面にフォスファチジルセリンを“eat me”シグナルとして提示、これをマクロファージが認識して貪食するが、フォスファチジルセリンの暴露の分子機構、フォスファチジルセリンの認識、貪食の分子機構など、ほとんど明らかになっていない。私達はマクロファージによるアポトーシス細胞・貪食のassay系を樹立し、この系を用いて、マクロファージから分泌される MFG-E8、および Tim-4 と呼ばれる膜蛋白質がアポトーシスの貪食に関与していることを報告した。また、私達はアポトーシスのシグナル伝達、特に死細胞の DNA 分解機構の解析から、アポトーシス細胞の DNA は死細胞内でヌクレオソームの単位に分解された後、マクロファージリソソームの酵素 (DNase II) によりさらに分解されることを示した。そして、胎生期に DNase II が作用しないとマウスは重篤な貧血を起こすこと、大人のマウスで DNase II が作用しないと、リウマチ性関節炎を発症することを見いだした。

**目的:** このような背景をもとに、本研究は、アポトーシスにおいてフォスファチジルセリンの暴露に関与している分子の同定、Tim-4、MFG-E8 による死細胞貪食の分子機構と生理作用の解析、未分解の DNA を蓄積したマクロファージでのサイトカイン産生の分子機構、DNase II 欠損マウスでの関節炎発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

**結果:** (1)アポトーシス細胞においてフォスファチジルセリンの暴露に関与している因子として6回膜貫通領域を持つ Xkr8 (XK-related 8) 遺伝子を同定した。ある種のヒト白血病細胞では Xkr8 遺伝子プロモーター領域が強くメチル化され、その発現が抑制されていた。(2)アポトーシス時のフォスファチジルセリン暴露に責任ある分子(Xkr8)を探索している過程で、Ca<sup>2+</sup> によって活性化され、フォスファチジルセリンを暴露する8回膜貫通領域を持つ分子 TMEM16F を単離した。この分子は Scott Syndrome とよばれる血友病の原因遺伝子であることを見いだした。(3)内在性の Ca<sup>2+</sup> に応答して活性を持つ TMEM16F 変異体を発現する細胞は構成的にフォスファチジルセリンを細胞表面に暴露したが、マクロファージはその細胞を貪食できなかった。このことは、フォスファチジルセリンはアポトーシス細胞の貪食に必要であるが十分ではないことを示している。(4)マクロファージに蓄積した DNA がインターフェロン遺伝子を活性化する際、EYA (Eyes Absent) と呼ばれるスレオニン・フォスファターゼが関与していることを見いだした。(5)DNase II 遺伝子欠損マウスでのリウマチ性関節炎はリンパ球に依存しないこと、関節では tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )、interleukin 6 (IL-6)、interleukin 1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) などのいわゆる炎症性サイトカインが大量に発現していること、そのどれを抑制しても関節炎が軽減することを見いだした。

**考察:** 1992年、Hensonらによってアポトーシス細胞の表面にフォスファチジルセリンが暴露され、これが死細胞の“eat me”シグナルとして作用している可能性が指摘されて以来、数多くのグループがフォスファチジルセリン暴露の分子機構の解析にとりかかった。しかし、その分子機構は永年、不明のままであり、実際、血小板とアポトーシス細胞でのフォスファチジルセリンの暴露が同一の分子によるかどうか不明であった。今回、アポトーシス時、活性化血小板でのフォスファチジルセリンの暴露に関与する分子が別個の分子として同定されたことはこの分野の大きなブレイクスルーである。一方、DNase II 遺伝子欠損マウスで見いだされたリウマチ性関節炎がヒトのリウマチ、特にヒト全身性若年性突発性関節炎に類似していることは、このマウスがヒトの関節炎の良いモデルとなることを示唆している。

## (2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

### 1. アポトーシス細胞においてフォスファチジルセリンの暴露に関与する分子の同定

**概要:** Xkr8 と呼ばれる6回膜貫通領域を持つ蛋白質をアポトーシス細胞でフォスファチジルセリンの暴露に関与する分子として同定した。この分子はアポトーシス時、カスパーゼ3によって切断・活性化される。線虫 CED-8 は哺乳動物の Xkr8 と相似した分子であり、CED-8 もフォスファチジルセリンの暴露に関与していることを見出した。2013年7月、*Science* に発表。

### 2. 活性化血小板でフォスファチジルセリンの暴露に関与している分子の同定

**概要:** 活性化された血小板はその表面にフォスファチジルセリンを暴露する。フォスファチジルセリンは血液凝固因子を活性化、トロンビンの産生を促し、血液凝固反応を引き起こす。TMEM16F と呼ばれる8回膜貫通領域を持つ蛋白質を、活性化された血小板でフォスファチジルセリンを膜表面に暴露させる分子として同定した。この分子の変異は Scott Syndrome と呼ばれる血友病を引き起こす。2010年11月、*Nature* に発表。

### 3. Eyes absent スレオニン-脱リン酸化酵素によるインターフェロン遺伝子の活性化

**概要:** DNase II 欠損細胞は死細胞を貪食するとインターフェロンを分泌する。この過程を増強する分子として Eyes absent(EYA)を同定した。EYA は転写因子として単離されたが、その後チロシン脱リン酸化酵素活性が報告されている。私達は EYA にはセリン/スレオニン-脱リン酸化酵素活性も存在すること、その活性がインターフェロン遺伝子の活性化に必要であることを示した。2009年7月、*Nature* に発表。

<科学技術イノベーション・臨床応用に大きく寄与する成果>

### 1. ヒト全身性エリテマトーデス (SLE) における MFG-E8 の関与

**概要:** アポトーシス細胞の貪食に関与する MFG-E8 を過剰に投与したマウスは SLE を発症する。今回、ヒトの SLE 患者に MFG-E8 の安定性を増加させる変異を見だし、この変異が SLE を増悪している可能性を指摘した。2010年、*Eur. J. Immunol.* に発表。

### 2. DNase II ノックアウトマウスにおける関節炎とヒト全身性若年性突発性関節炎

**概要:** DNase II ノックアウトマウスは関節炎を発症するが、発症した関節では IL-6、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  遺伝子の発現が 10-50 倍増加しており、血清中には高いレベルの IL-18 が存在した。さらに、この関節炎は抗 TNF $\alpha$  抗体、抗 IL-6 受容体抗体で抑制された。これらの特徴はヒト全身性若年性突発性関節炎に類似しており、その良いモデルになると考えられる。2010年、*Proc.Natl.Acad.Sci.* に発表。

### 3. “Eat me”シグナルとしてのフォスファチジルセリンの役割

**概要:** フォスファチジルセリンは死細胞の貪食に必要である。しかし、TMEM16F の構成的活性型変異によりフォスファチジルセリンを暴露する生細胞はマクロファージによって貪食されなかった。最近、“don't eat me”シグナルとして作用する CD47 を抑制する抗 CD47 抗体をがんの治療薬とすることがプロポーズされている。フォスファチジルセリンを発現する細胞は、CD47 の効果を明らかにする上で良い系であろう。2011年、*Proc.Natl.Acad.Sci.* に発表。

## § 2. 当初の研究構想

研究代表者らは 1988 年頃から、アポトーシスに関する研究を始め、その研究は、アポトーシスを誘導する Death Factor とその受容体、アポトーシスのシグナル伝達、アポトーシスの生理作用、死細胞の貪食の研究へと発展した。本 CREST 課題はその延長である。

これまで私達は、アポトーシスは Death Factor として作用するサイトカインによって誘導されること (Itoh et al. Cell 66, 233, 1991; Suda et al. Cell 75, 1169, 1993)、アポトーシスを起こした細胞はその細胞内で、蛋白質の分解酵素カスパーゼが活性化されること (Enari et al. Nature 375, 78, 1995; Enari et al. Nature 380, 723, 1996)、カスパーゼは数百に上る細胞内蛋白質を切断するとともに DNase を活性化し、死細胞の DNA が分解されること (Enari et al. Nature 391, 43, 1998) を明らかにした。一方、アポトーシス細胞はその表面に“eat me”シグナルとしてフォスファチジルセリンを暴露、マクロファージは、MFG-E8 や Tim-4 と呼ばれる分子を持ちいてフォスファチジルセリンを認識、死細胞を貪食する (Hanayama et al. Nature 417, 182, 2002; Miyanish et al. Nature 450, 435, 2007)。ついで、MFG-E8 ノックアウトマウスを作製したが、このマウスはある種のマウスバックグラウンドでは、抗核抗体、抗 DNA 抗体を産生し、全身性エリテマトーデス (SLE) タイプの自己免疫疾患を発症した (Hanayama et al. Science 304, 1147, 2004)。また、マクロファージが死細胞の DNA を分解できないと貧血や関節リウマチを発症することを見いだした (Kawane et al. Science 292, 1546, 2001; Kawane et al. Nature 443, 998, 2006)。これらの結果は、SLE や関節リウマチなど原因不明の病気がウイルスや細菌感染を介することなく、私達の体内で通常起きているアポトーシスの貪食・分解の異常が原因となっておこることを示している。そこで、本研究はアポトーシス細胞の貪食・分解異常による SLE や関節リウマチ発症の分子機構を明らかにすることを目的とした。

### A. アポトーシス細胞の貪食不良による自己免疫疾患

#### a. アポトーシス細胞の貪食における Tim-4 受容体の寄与

組織免疫染色や FACS、Western Blot が可能なマウス Tim-4 に対するモノクローナル抗体を作成し、マウス組織を染色、どのようなマクロファージや樹状細胞が Tim-4 を発現しているか検討する。また、Tim-4 遺伝子のノックアウトマウスを作成する。

#### b. MFG-E8、Tim-4 の発現とこれら分子の相互作用

炎症性の腹腔マクロファージや、脾臓・リンパ節の核片貪食マクロファージが MFG-E8 を発現するのに対し、Tim-4 は腹腔や種々のリンパ組織に常在するマクロファージによって発現される。そこでこれら発現細胞を可視化するとともに両者の関係を明らかにする。

#### c. ヒトの全身性エリテマトーデスの患者における MFG-E8、Tim-4 遺伝子

京都大学医学部、膠原病内科にはこれまでに約 3000 症例の SLE や関節リウマチ患者の血清、数百例の DNA が集められている。また、奈良県立医大総合内科教室では数百人の膠原病患者の末梢血から DNA、RNA が調製、保管されている。そこで、京都大学膠原病内科や奈良県立医大のグループと共同で SLE 患者の血清中に MFG-E8 が存在するかどうか、また、これら患者の MFG-E8 遺伝子、Tim-4 遺伝子の発現・変異を検討する(京都大学医学部・倫理委員会に申請、承認済み)。

### B. アポトーシス細胞の消化不良による関節炎

#### a. 未分解の DNA によるサイトカイン遺伝子発現の分子機構

DNase II<sup>-/-</sup>マウスから調製したマクロファージにアポトーシス細胞を貪食させると、IFN $\beta$  遺伝子が活性化される。そこで、この反応系を用いて、未分解の DNA による IFN $\beta$  や TNF $\alpha$  遺伝子発現のシグナル伝達系を明らかにする。IFN $\beta$  遺伝子の発現は転写因子 IRF3/7 によって、TNF $\alpha$  遺伝子は NF- $\kappa$ B によって活性化される。未分解の DNA によってどのように、これらの転写因子が活性化されるか解析する。

### **b. IFN $\beta$ の赤芽球に対する細胞傷害作用の解析**

タイプ I IFN には抗ウイルス作用ばかりでなく、細胞傷害活性が知られているがその分子機構は不明である。DNase II 遺伝子欠損マウスでは IFN  $\beta$ 、IFN  $\gamma$ 、及び IFN 誘導遺伝子が発現されている。そして、IFN  $\beta$  に対する受容体 (IFN-RI) の欠損は DNase II<sup>-/-</sup>マウスの致死性を回復させるが IFN  $\gamma$  の受容体 (IFN-RII) の欠損は致死性を回復させない。そこで、DNase II<sup>-/-</sup>IFN-RI<sup>-/-</sup>、DNase II<sup>-/-</sup>IFN-RII<sup>-/-</sup> マウスの胎仔肝での遺伝子発現を検討し、IFN  $\beta$  特異的に発現が誘導され、細胞傷害性をもたらすものを同定する。一方、私達は、タイプ I IFN の受容体をヒト FL 細胞で過剰発現すると、その細胞は IFN  $\alpha$  によって死滅することを見出した。そこで、この系を用いて IFN  $\alpha$  により細胞傷害を媒介する因子を同定する。

### **c. DNase II 欠損マウスでの関節炎発症の分子機構**

DNase II 遺伝子欠損マウス (DNase II<sup>-/-</sup>IFN-RI<sup>-/-</sup>) は歳を経るとともに関節炎を発症する。ヒトの関節炎では種々の抗体が炎症を惹起しているという報告、T-リンパ球が炎症に必須であるとの報告、サイトカインが関与しているとの報告が存在する。そこで、DNase II<sup>-/-</sup>IFN-RI<sup>-/-</sup> と種々のノックアウトマウスを掛け合わせ、DNase II<sup>-/-</sup>マウスでの関節炎発症におけるリンパ球、サイトカインの関与を明らかにする。また、このモデルでの関節炎の発症、維持におけるマクロファージの役割を明らかにする。ところで、最近、SLE の発症にタイプ II IFN の関与が報告されている。そこで、TNF  $\alpha$  ばかりでなく IFN  $\beta$  も産生する DNase II 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスが関節炎以外に SLE を発症するかどうか検討する。

### **d. ヒト関節リウマチ、キャスルマン症候群における DNase II 機能不全の可能性**

DNase II 遺伝子の欠損マウスはまず、リンパ節が腫大し、その後、関節炎を発症する。この際、TNF  $\alpha$  や IL-6 などのサイトカイン遺伝子の活性化が認められる。人の関節リウマチやキャスルマン病でも IL-6 や TNF  $\alpha$  遺伝子の活性化が起こっている。そこで、ヒトの関節炎やキャスルマン患者における DNase II 遺伝子の発現、異常を検討する。(京都大学臨床研究・倫理委員会に申請、承認済み)

### §3 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

「長田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
長田 重一	京都大学医学研究科	教授	H20.10-
福永理己郎	京都大学医学研究科	准教授	H20.10-22.10
川根 公樹	京都大学医学研究科	助教 特定助教	H20.10-22.2 H25.4-
華山 力成	京都大学医学研究科	助教	H20.10-23.10
鈴木 淳	京都大学医学研究科	助教	H23.4-
宮西 正憲	京都大学医学研究科	D4 特定研究員 助教	H20.10-21.3 H21.4-23.2 H23.3-23.5
田中 博美	京都大学医学研究科	技術補助員	H20.10-22.3
井上千代美	京都大学医学研究科	技術補助員	H20.10-21.4
木村 春奈	京都大学医学研究科	技術補助員	H22.4-22.6
中原 匡咲	京都大学医学研究科	特定研究員	H20.10-22.1
山口 裕嗣	京都大学医学研究科	特定研究員 助教	H20.10-23.10 H23.11-
藤本 隆	京都大学医学研究科	客員研究員	H20.10-
瀬川 勝盛	京都大学医学研究科	特定研究員 学振・博士研究員 助教	H21.4-23.3 H23.4-23.10 H23.11-
藤井 俊裕	京都大学医学研究科	特定研究員 特定研究員(学術奨励) 特定助教(学術奨励)	H22.4-23.10 H23.11-24.3 H24.4-
佐々木暁倫	京都大学医学研究科	D3-4	H20.10-22.6
北原 雄輔	京都大学医学研究科	D4 特定研究員	H22.4-23.3 H23.4- H25.7
長坂 明臣	京都大学医学研究科	D3	H20.10-21.3
佐野 晃之	京都大学医学研究科	D2-4 (学振・DC2)	H21.4-24.3
神田 浩聡	京都大学医学研究科	D1-2 (学振・DC1)	H23.4-25.3
戸田 聡	京都大学医学研究科	D1 D2- (学振・DC2)	H23.4-24.3 H24.4-
鈴木 孝征	京都大学医学研究科	D2-	H23.4-
石原 健司	京都大学医学研究科	D2-	H24.4-
柳橋 祐一	京都大学医学研究科	特定研究員	H24.4-
今西 英一	京都大学医学研究科	技術補佐員	H24.4-
倉田 祥子	京都大学医学研究科	技術補佐員	H25.4-
形部 小百合	京都大学医学研究科	D1-	H24.4-
西 ちひろ	京都大学医学研究科	D1-	H25.4-
小杉 竜生	京都大学医学研究科	労務補佐員	H25.7-
原山 雅子	京都大学医学研究科	研究補助員	H20.10-24.3
藤井麻紀子	京都大学医学研究科	研究補助員	H20.10-

(2) 研究項目

- アポトーシス細胞の貪食不良による自己免疫疾患
- マクロファージによる死細胞 DNA の分解とその異常による自己炎症

## § 4 研究実施内容及び成果

### 4.1 アポトーシス細胞の食食不良による自己免疫疾患

#### 4.1.1 アポトーシス細胞の食食における MFG-E8、Tim-4 の関与

私達はこれまでにアポトーシス細胞の食食に関与する分子として MFG-E8、Tim-4 および Tim-1 を同定した。これら分子の生理作用を明らかにする目的で発現細胞の同定、ノックアウトマウスの構築、ヒト SLE 患者でのこれら遺伝子の異常を解析した。

##### 4.1.1.1 MFG-E8、Tim-4 の発現細胞

MFG-E8に関しては以前、この分子を特異的に認識するモノクローナル抗体を作製し、脾臓、胚中心に存在する核片食食マクロファージ(tingible-body macrophage) がこの分子を発現していることを報告した(Hanayama, R. et al. *Science* 304, 1147-1150, 2004)。一方、Tim-4は胸腺や脾臓に存在する Mac1 陽性細胞、Tim-1は活性化されたTリンパ球が発現すると報告されている(Meyers, J.H. et al. *Nat. Immunol.* 6, 455-464, 2005)がその詳細は不明である。そこで、マウスTim-1、Tim-4の細胞外領域にヒトIgG Fc領域を結合させたキメラタンパク質を構築し、293T細胞で発現、細胞外に分泌されたタンパク質を調製した。精製したTim-1-Fc、Tim-4-Fcを用いてアルメニアハムスターを免疫、そのリンパ球をBcl-2を導入したMyeloma細胞株(NSO)と融合させ数千のハイブリドーマを作成した。Tim-1-FcおよびTim-4-Fcを用いたELISA法によりFc部位と反応するクローンを除いた後、Western Blotting、組織免疫染色、FACS、中和活性などで検討し、それらの反応に使用できるハイブリドーマを同定した。得られたモノクローナル抗体を用いて、種々の組織の細胞を免疫組織染色、FACSにより解析した。その結果、MFG-E8がチオグリコレートで誘導した炎症性腹腔マクロファージによって発現されているのに対し、Tim-4は腹腔常在マクロファージ、Tim-1は 形質細胞用樹状細胞(plasmacytoid dendritic cells) で発現されていた。一方、脾臓胚中心のマクロファージはMFG-E8、およびTim-4、両者を発現していた(図1)。

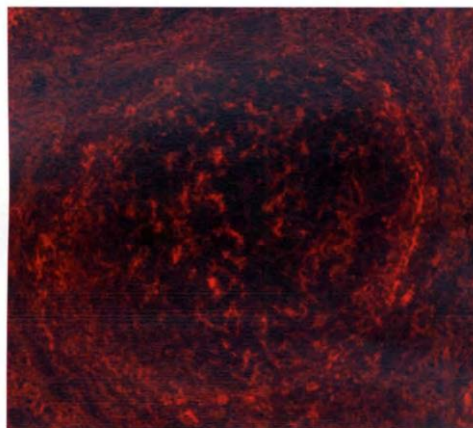


図1 脾臓胚中心での Tim-4 の発現

マウス脾臓切片をハムスター抗マウス Tim-4 で染色後、Cy3 標識ヤギ抗ハムスターIgG で発色し、蛍光顕微鏡で観察した。胚中心を示した。中央部に Tim-4 を発現する tingible-body macrophage が認められる。

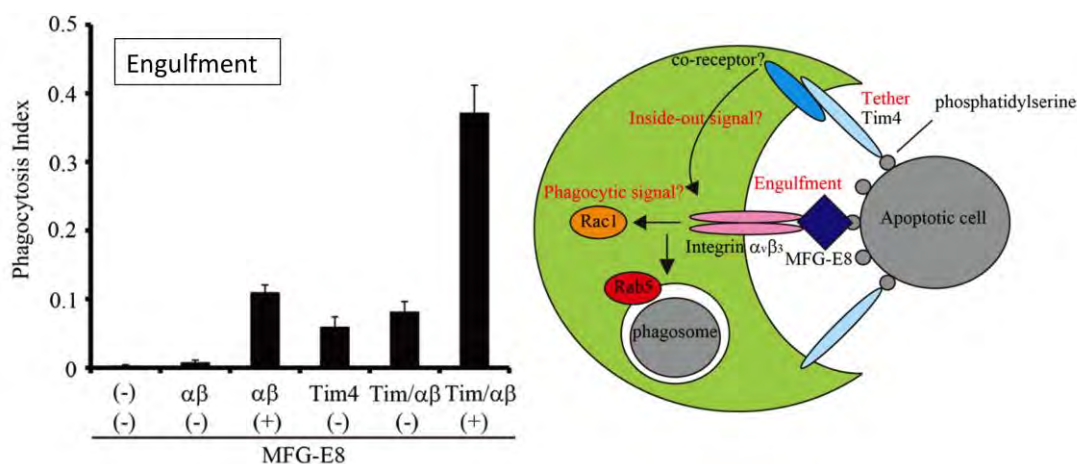
##### 4.1.1.2 アポトーシス細胞の食食における Tim-4 と MFG-E8 の協調作用

MFG-E8、Tim-4をNIH3T3細胞で発現させると、それぞれ死細胞の食食を促進することから、MFG-E8、Tim-4は独立に作用すると考えられた (Miyaniishi, M. et al. *Nature* 450, 435-439, 2007; Hanayama, R. et al. *Nature* 417, 182-187, 2002)。一方、脾臓 胚中心のtingible-body macrophage などはMFG-E8、Tim-4をともに発現することから、これら分子が協調的に作用するマクロファージの存在も示唆された。そこで、MFG-E8、Tim-4の作用を検討するため、浮遊細胞であるマウス



proB 細胞株 Ba/F3 を用いて、アポトーシス細胞の貪食を再現することを試みた。この細胞にはアポトーシス細胞を貪食する能力はないが、Tim-4を発現させるとフォスファチジルセリン依存的にアポトーシス細胞を結合した。しかし、この細胞は死細胞を貪食することはなかった。一方、MFG-E8と結合する integrin  $\alpha_v\beta_3$  をBa/F3に発現させ、MFG-E8を添加してもアポトーシス細胞を貪食することはなかった。ところが、integrin  $\alpha_v\beta_3$  に加えTim-4を発現させると、MFG-E8に依存してアポトーシス細胞の貪食が促進された(図2)。そして、この貪食過程は細胞内にRac1を発現させることにより増強した。以上より、マクロファージによる死細胞の貪食は2段階で進行すること、まずTim-4による死細胞への結合、次いでMFG-E8/integrinによる死細胞の貪食が起これると考えられた。

**Ref:** Toda, S., Hanayama, R., and Nagata, S. (2012). Two-step engulfment of apoptotic cells. *Mol Cell Biol* 32, 118-125.



**図2** アポトーシス細胞の貪食における integrin  $\alpha_v\beta_3$ /MFG-E8 と Tim-4 の協調作用

左図: Ba/F3 細胞に integrin  $\alpha_v\beta_3$  ( $\alpha\beta$ )、Tim-4 を単独、あるいはともに発現、MFG-E8 の存在(+)、非存在下(-)でアポトーシス細胞と培養、死細胞の Ba/F3 細胞への貪食(Phagocytosis index)を検定した。右図: tingible-body macrophage によるアポトーシス細胞貪食の模式図。Tim-4 はアポトーシス細胞に暴露されるフォスファチジルセリンに結合、死細胞をマクロファージに集める(tethering)。ついで、死細胞は integrin  $\alpha_v\beta_3$ /MFG-E8 システムを用いて貪食される。

#### 4.1.1.3 Tim-4、MFG-E8 の欠損による自己抗体の産生

それでは、Tim-4、MFG-E8 などの貪食に関与する分子が欠如するとマウスではどのようなことが起こるのであろうか。以前私達は MFG-E8 ノックアウトマウスは 129/B6 mixed background で SLE-type の自己免疫疾患を発症することを報告した (Hanayama et al. *Science* 304, 1147-1150, 2004)。SLE タイプの自己免疫疾患はマウス background に依存することが知られている。そこで、MFG-E8 ノックアウトマウスの B6 への戻し交配を 10 度繰り返した。一方、あらたに Tim-4 遺伝子のノックアウトマウスを B6 background で作製した。すると、MFG-E8、Tim-4 単独のノックアウトマウスでは自己抗体の産生はおこらなかったが、Tim-4、MFG-E8 両遺伝子を欠損するメスマウスでは歳をとるに従い血清中の自己抗体価が増加した(図3)。そして、その抗体価は抗 TNF $\alpha$  抗体の投与、あるいは IFN $\alpha$  を誘導する薬剤プリステンの投与により顕著に促進された。以上の結果は、アポトーシス細胞の貪食異常が自己免疫疾患へと導く可能性、ヒトの SLE-type の自己免疫疾患と同様にその発症が TNF $\alpha$  によって抑制され、IFN $\alpha$  によって促進されることを示唆している。

**Ref:** Miyanishi, M., Segawa, K., and Nagata, S. (2012). Synergistic effect of Tim4 and MFG-E8 null mutations on the development of autoimmunity. *Int Immunol* 24, 551-559.

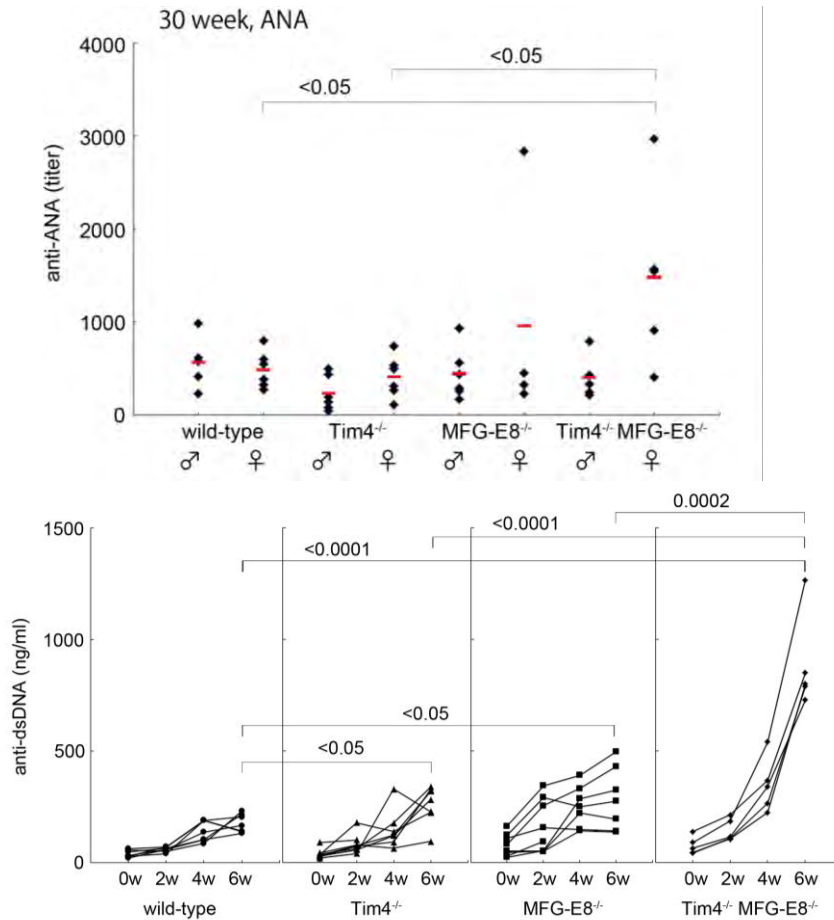


図3 B6 マウスにおける Tim-4、MFG-E8 ノックアウトの自己抗体産生

上段:30週令のマウスでの抗核抗体(ANA)。下段:7-11 週令のマウス腹腔に毎週 200  $\mu$ g の抗 TNF  $\alpha$  抗体を投与し、血清中の抗 DNA 抗体を測定した。

#### 4.1.1.4 ヒト SLE 患者での MFG-E8 遺伝子

MFG-E8/Tim-4 ノックアウトマウスはマウスで SLE 様自己免疫疾患を引き起こす。一方、私達は以前、高濃度の MFG-E8 をマウスに投与すると自己抗体の増加を引き起こすこと、血清 MFG-E8 レベルが高いヒトの SLE 患者が存在することを報告した(Asano et al. *J. Exp. Med.* 200, 459-467, 2004; Yamaguchi et al. *J. Leuk. Biol.* 83, 1300-1307, 2008)。今回、約 200 名の SLE 患者の MFG-E8 mRNA、MFG-E8 染色体遺伝子を解析し、その2名において、MFG-E8 遺伝子のイントロン6に点変異を見いだした(図4)。この点変異により、MFG-E8 の異常なスプライシングがおこり、C-末端領域が欠損した MFG-E8 が産生された。このタンパク質はアポトーシス細胞への結合能、死細胞の貪食能は野生型と同程度であったが、異常な糖鎖修飾がおこり、マウス体内での分解が野生型に比べ顕著に抑制されていた。そして、このタンパク質は野生型の MFG-E8 に比べ、低い用量でマウスに抗核抗体(ANA)の上昇を引き起こした。以上の結果から、ヒトに関しても MFG-E8 の異常が SLE を導く可能性がある結論した。

**Ref:** Yamaguchi, H., Takagi, J., Miyamae, T., Yokota, S., Fujimoto, T., Nakamura, S., Ohshima, S., Naka, T., and Nagata, S. (2008). Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *J. Leukoc. Biol.* 83, 1300-1307.

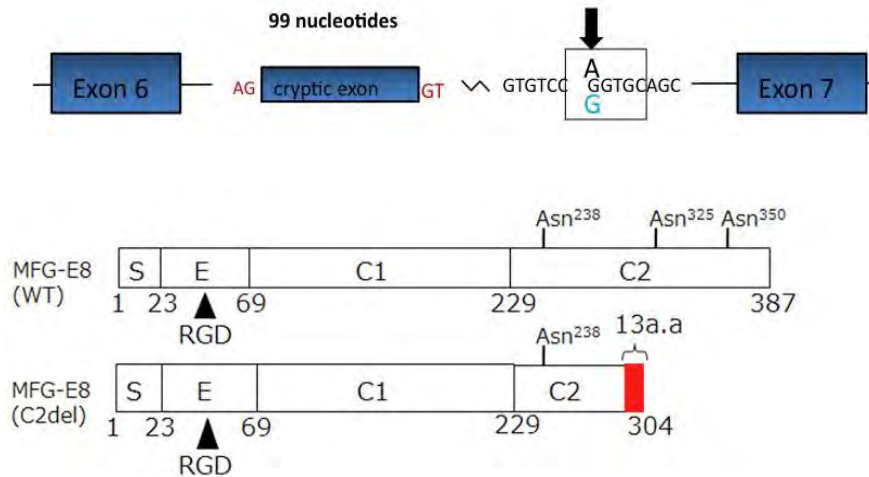


図4 ヒト SLE 患者における MFG-E8 遺伝子の点変異

上段: MFG-E8 遺伝子イントロン6に見いだされた A>G 変異。この変異により、その 5'側で新たなエクソンが導入される。下段: 導入された新たなエクソンには termination codon が存在し、MFG-E8 蛋白質はその C 末端が欠質する。この欠質により蛋白質の機能の低下は認められないが、Asn-238 の糖鎖修飾が増加し、蛋白質の安定性が増加した。

#### 4.1.2 フォスファチジルセリンの暴露に関する膜蛋白質

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が、様々な生物現象においてその非対称性は崩壊し、フォスファチジルセリンが細胞表面に暴露される。私達はフォスファチジルセリンの暴露に関与している2種の分子 (TMEM16F および Xkr8) を同定した。

##### 4.1.2.1 活性化された血小板において作用する TMEM16F と Scott Syndrome

アポトーシス細胞や活性化された血小板ではCa<sup>2+</sup>に依存したリン脂質スクランブラーゼによってリン脂質の非対称的分布が破綻、フォスファチジルセリンがその表面に暴露されると考えられている。しかし、スクランブラーゼの実体、スクランプリングの分子機構は全く明らかになっていない。私達はマウス細胞株 Ba/F3 をCa<sup>2+</sup>の非存在下で Ca-ionophore A24931 で処理すると、一過的、可逆的にフォスファチジルセリン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 を用いた細胞の分画、濃縮操作を19回繰り返すことにより、フォスファチジルセリンを強く暴露する細胞株を樹立した。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5)。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染色体遺伝子のイントロンスプライシング配列“GT-AG”に点変異が導入され、“GT-AT”となっていた。このため、エクソン13がスキップされ、TMEM16F蛋白質はエクソン14で終結した。本来の半分の大きさとなった変異蛋白質が機能するとは考えられず、Scott Syndrome の患者はTMEM16Fの変異により血友病を起こしていると結論した。その後、ヨーロッパのグループから、Scott Syndrome の異なる家系でもTMEM16F遺伝子に変異が存在することが報告されている(Castoldi, E. et al. Blood 117, 4399-4400, 2011)。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ために必須の酵素であり、この分子の作用によってフォスファチジルセリンが血小板の表面に暴露され血液凝固因子を活性化すると結論した。

Ref: Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P.J., and Nagata, S. (2010). Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. Nature 468, 834-838.

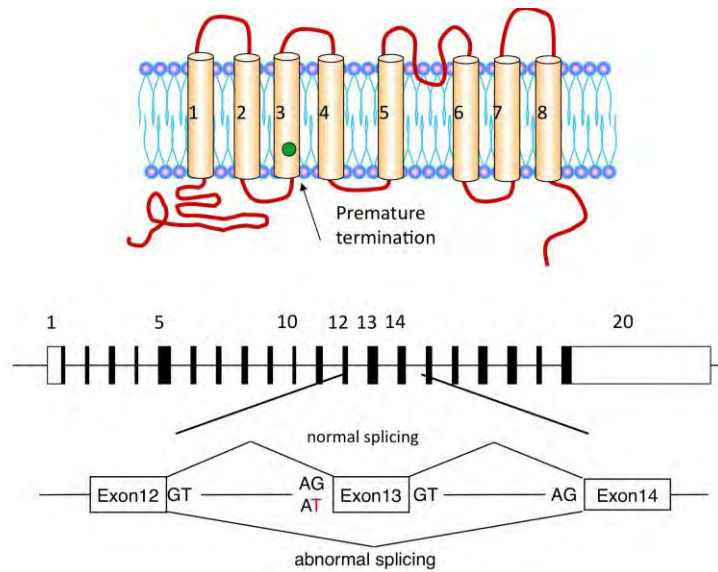


図5 血小板でフォスファチジルセリンの暴露に関与する TMEM16F と Scott Syndrome

TMEM16F は8個の膜貫通領域を持つ膜蛋白質。血友病の一種 Scott Syndrome の患者で TMEM16F 遺伝子に変異が見つかった。すなわち、TMEM16F 遺伝子イントロン12の GT-AG 配列が GT-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。

#### 4.1.2.2 TMEM16 ファミリーのリン脂質スクランブラーゼ活性

TMEM16Fは血小板ばかりでなく、様々な組織、細胞で発現されている。これら組織でのTMEM16Fの作用を解析するため、コンディショナルノックアウトマウスの樹立を目的として、TMEM16F遺伝子のエクソン2にlox配列を導入したマウスを樹立した。その胎仔胸腺細胞にretrovirusを用いてH-ras、c-myc遺伝子を導入、不死化した。ついで、adenovirusを用いてCre recombinaseを一過的に導入することにより、TMEM16F遺伝子をノックアウトした。野生型胎仔胸腺細胞はCa<sup>2+</sup> ionophore 刺激でフォスファチジルセリンを速やかに暴露したが、TMEM16Fを欠損させるとその活性は完全に失われた(図6A)。一方、Fasリガンドによってアポトーシスを誘導した際におこるフォスファチジルセリンの暴露はTMEM16Fノックアウト細胞でも正常におこった(図6B)。このことはアポトーシスと活性化血小板でのフォスファチジルセリンの暴露は異なる分子によって担われていることを示している。ところでTMEM16Fは10個のメンバーからなるTMEM16ファミリーに属している。これらメンバーを293T細胞に発現、Patch-Clamp 法でassayすることにより、他のグループからの報告 (Caputo et al. *Science* 322, 590, 2008; Schroede et al. *Cell* 134, 1019, 2008; Yang et al. *Nature* 455, 1210, 2008)のようにTMEM16AとTMEM16BはCl<sup>-</sup>チャンネルとして作用した。しかし、他のメンバーにはCl<sup>-</sup>チャンネル活性は認められなかった。そこで、これらメンバーにスクランブラーゼ活性が存在するかどうか調べるため、それぞれのメンバーをTMEM16F欠損細胞に導入し、スクランブラーゼ活性を検定した。その結果、TMEM16F以外に16C、16D、16G、16JにCa<sup>2+</sup>に依存したスクランブラーゼ活性が認められた(図6C)。これら分子はそれぞれ脳や皮膚、腸に特異的に発現しているが、胸腺や脾臓などのリンパ球系ではその発現は見られず、アポトーシス時のフォスファチジルセリンの暴露に関与しているとは考えられなかった。

**Ref:** Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S. (2013). Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J. Biol. Chem.* 288, 13305-13316.

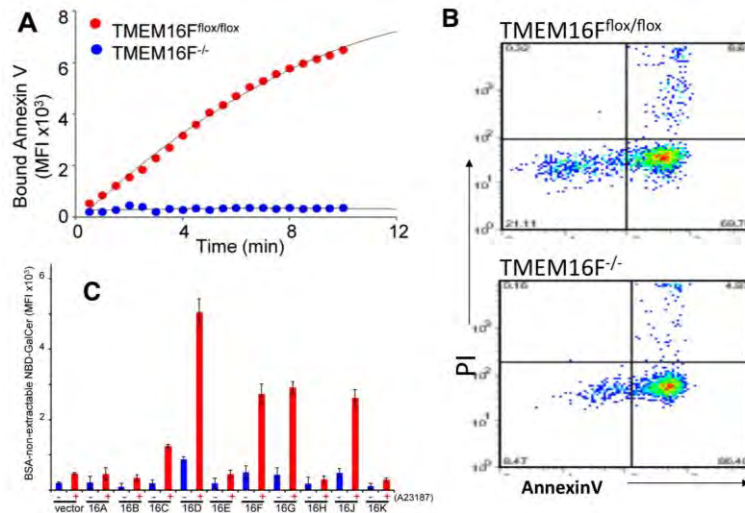


図6 TMEM16F および TMEM16 ファミリーのリン脂質スクランブラーゼ活性

マウス胎仔胸腺より樹立した野生型 (TMEM16F<sup>flox/flox</sup>)、ノックアウト細胞 (TMEM16F<sup>-/-</sup>) を Ca<sup>2+</sup>イオノフォア(A)あるいは Fas リガンド(B) で処理し、フォスファチジルセリンの暴露を FACS で解析した。また、TMEM16F<sup>-/-</sup>細胞に TMEM16 メンバーを導入し、リン脂質スクランブラーゼ活性を蛍光リン脂質の取り込み能を用いて検定した(C)。

#### 4.1.2.3 アポトーシス細胞においてフォスファチジルセリンの暴露を促進する Xkr8

TMEM16 ファミリーメンバーがアポトーシス時のフォスファチジルセリン暴露に関与していなかったことから、4.1.2.1 項で樹立したフォスファチジルセリンを強く暴露する Ba/F3 細胞株からの cDNA ライブラリーを改めて expression cloning 法で screening した。その結果、Ba/F3 細胞でフォスファチジルセリンを構成的に発現させる能力を持つ分子 Xkr8 を単離した(図7)。Xkr8 は6個の膜貫通領域を持つ膜蛋白質であり、その C-末端部がカスパーゼ3あるいは7で切断され、活性化される。この分子は様々な細胞で普遍的に発現されており、Xkr8 ノックアウトマウスの胚から調製した繊維芽細胞 (MEF) ではアポトーシス刺激に応じたフォスファチジルセリンの暴露がおこらなかった。PLB985 や Raji などのヒトの白血病細胞はアポトーシス時にフォスファチジルセリンを暴露しないことが知られている。これらの細胞では CpG 配列に富んだ Xkr8 遺伝子プロモーター領域が強くメチル化されており、これにより Xkr8 遺伝子の発現が抑制されていた(図8)。また、Xkr8 と相同性を持つ(約 20% の identity)線虫 CED-8 遺伝子もアポトーシス時のフォスファチジルセリンの暴露、死細胞の貪食に関与することが明らかとなった。

Ref: Suzuki, J., Denning, D.P., Imanishi, E., Horvitz, H.R., and Nagata, S. (2013).

Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*, 341, 403-406.

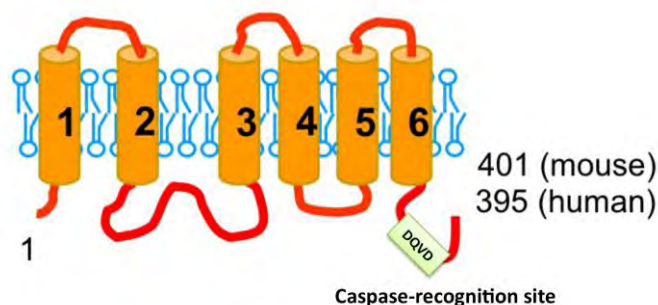


図7 Xkr8 の構造

Xkr8 の C-末端部にカスパーゼ3認識配列(DQVD)が存在し、この部位でカスパーゼによって切断されスクランブラーゼ活性を持つと考えられる。

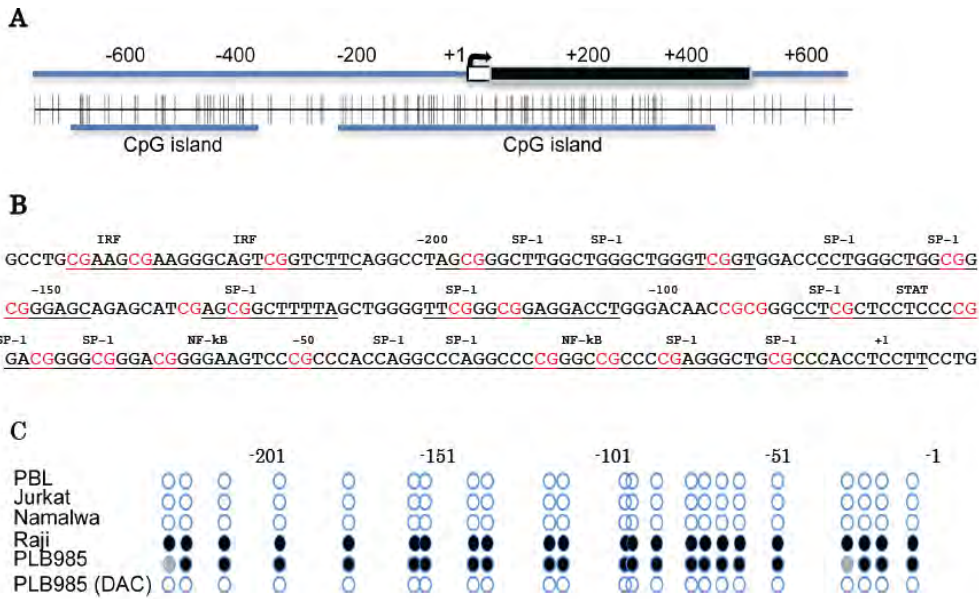


図8 ヒト *Xkr8* 遺伝子プロモーター領域の CpG islands と白血病細胞でのメチル化  
 A. ヒト *Xkr8* 遺伝子プロモーター領域の CpG 配列を縦線で示した。B. ヒト *Xkr8* 遺伝子プロモータの塩基配列と転写因子認識部位 (Sp1、STAT、NF-κ B などの認識配列が存在する)。C. ヒト *Xkr8* 遺伝子プロモーター領域(-230 から+1)における CpG 配列のメチル化状態を示した。○:メチル化無し、●: 90%以上の確率でメチル化。PBL、ヒト正常人の抹消血液細胞。

#### 4.1.2.4 アポトーシス細胞の貪食におけるフォスファチジルセリン

細胞外に暴露されたフォスファチジルセリンは貪食細胞への“eat me” シグナルとして作用すると提案されている(Fadok, V.A. et al. *Cell Death & Differ.* 5, 551-562, 1998)。私達はTMEM16Fの cloning 過程でTMEM16Fに点変異が導入され、内在性レベルのCa<sup>2+</sup>に応答して活性を示す TMEM16F変異体(Asp430Gly)を同定した(Suzuki, J. et al. *Nature* 468, 834-838, 2010)。この変異体を発現する細胞では細胞膜におけるリン脂質の非対称分布が失われ、アポトーシスの刺激無しにフォスファチジルセリンをその表面に暴露する。しかし、その細胞の増殖能や IL-3 や Fasリガンドに対する応答性は野生型と相違しなかった。さらにこの細胞は低温ではフォスファチジルセリン受容体依存的にマクロファージに結合するが、25° Cではその結合能は失われ、in vitro、in vivo でマクロファージに貪食されることはなかった(図9)。以上の結果から、TMEM16Fの活性化によるフォスファチジルセリンの暴露はアポトーシス細胞の貪食に必要なではあるが、十分ではないと結論した。

**Ref:** Segawa, K., Suzuki, J., and Nagata, S. (2011). Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 19246-19251.

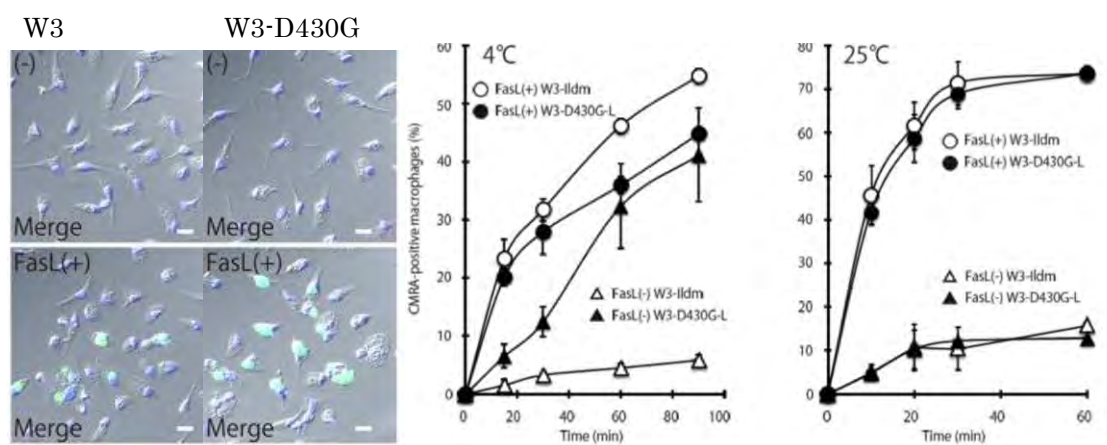


図9 フォスファチジルセリン発現細胞のマクロファージによる貪食

マウス細胞株(W3)にTMEM16Fの変異体(D430G; Asp430Gly)を発現させ、フォスファチジルセリンを暴露する細胞を樹立した。W3およびW3-D430GL細胞をFasリガンドで処理(下段)あるいは処理せず(上段)、マクロファージと培養し、貪食を検定した。緑の細胞が貪食された細胞(左図)。また、細胞をCell-trackerで標識後、Fasリガンドで処理、あるいは処理せずにマウス腹腔マクロファージと4°Cあるいは25°Cで培養し、マクロファージへの結合をFACSで解析した(右図)。

#### 4.2 マクロファージによる死細胞DNAの分解とその異常による自己炎症

死細胞のDNA分解を担うDNase II遺伝子を欠損したマウスでは、マクロファージからIFN $\beta$ やTNF $\alpha$ が分泌される。IFN $\beta$ は赤芽球にアポトーシスを誘導、胎仔は貧血を起し死滅する。一方、TNF $\alpha$ は関節滑膜細胞に作用し、関節炎を誘起する。そこで、その分子機構を解析した。

##### 4.2.1 未分解DNAによるIFN $\beta$ 遺伝子の活性化に関するEYAフォスファターゼ

リソソームに蓄積したDNAによるIFN $\beta$ 遺伝子の活性化の分子機構を明らかにするため発現クローニングを行った。マウス胚繊維芽細胞(MEF)より調製したcDNAライブラリー(約20,000個のクローン)を400個のグループにわけ、DNase II欠損マウスから調製したMEFに導入した。ついで、その細胞をアポトーシスを起こした胸腺細胞と培養、死細胞を貪食させ、IFN $\beta$ の産生をELISAを用いて検討した。その結果、Eya (Eyes absent) と呼ばれる分子が死細胞の貪食に応答してIFN $\beta$ 遺伝子の発現を促進した。Eyaはショウジョウハエで転写因子として同定されたが、2008年、C-末端領域にチロシンフォスファターゼ活性が見出された(Jemc, J., and Rebay, I. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 513-538, 2007)。私達はこの因子を動物細胞で発現、単一蛋白質として精製し、EYAにはチロシンフォスファターゼばかりでなく、N-末端部にスレオニンフォスファターゼ活性が存在すること、そのスレオニンフォスファターゼがDNAによるIFN $\beta$ 遺伝子の活性化に必要なことを見いだした。また、この分子はNDV (Newcastle Disease Virus) によるIFN $\beta$ 遺伝子の活性化にも関与し、NDVにより一過的にIPS-1と呼ばれるadaptor分子に会合した(図10)。ついで、ショウジョウハエの自然免疫、抗菌ペプチドの産生にEYAが関与しているかどうか検討した。まず、DNase II遺伝子を欠損したショウジョウハエは抗菌ペプチドを強く発現するが、この発現はEya遺伝子のハプロ不全変異、あるいはその発現のノックダウンにより減少した。一方、ショウジョウハエEYA蛋白質を293T細胞を用いて産生、精製し、この分子もスレオニンフォスファターゼ活性をN-末端部に持つこと、このスレオニンフォスファターゼ活性がDNAによる抗菌ペプチドの活性化に関与していることを見いだした(図11)。

Ref: Okabe, Y., Sano, T., and Nagata, S. (2009). Regulation of the innate immune response by threonine-phosphatase of Eyes absent. *Nature* 460, 520-524.

Ref: Liu, X., Sano, T., Guan, Y., Nagata, S., Hoffmann, J.A., and Fukuyama, H. (2012). *Drosophila* EYA Regulates the Immune Response against DNA through an Evolutionarily Conserved Threonine Phosphatase Motif. PLoS One 7, e42725.

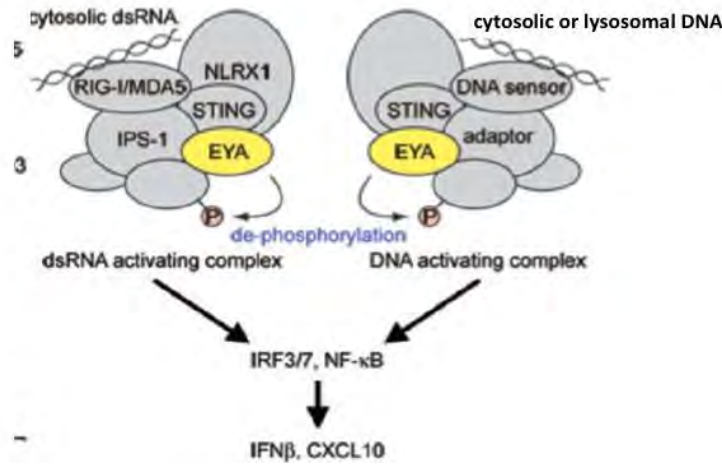


図 10 IFN 遺伝子の活性化における EYA の関与

ウイルス感染時、ウイルス RNA は RIG-I/MDA5 と呼ばれる分子に結合、その複合体は IPS-1 などの adaptor 分子と会合し、IRF3/7 を介して IFN 遺伝子の発現へと導く。Eya はウイルス感染などの刺激に応答してこの複合体に結合し、そのコンポーネントの脱リン酸化によりその活性を制御すると考えられる。

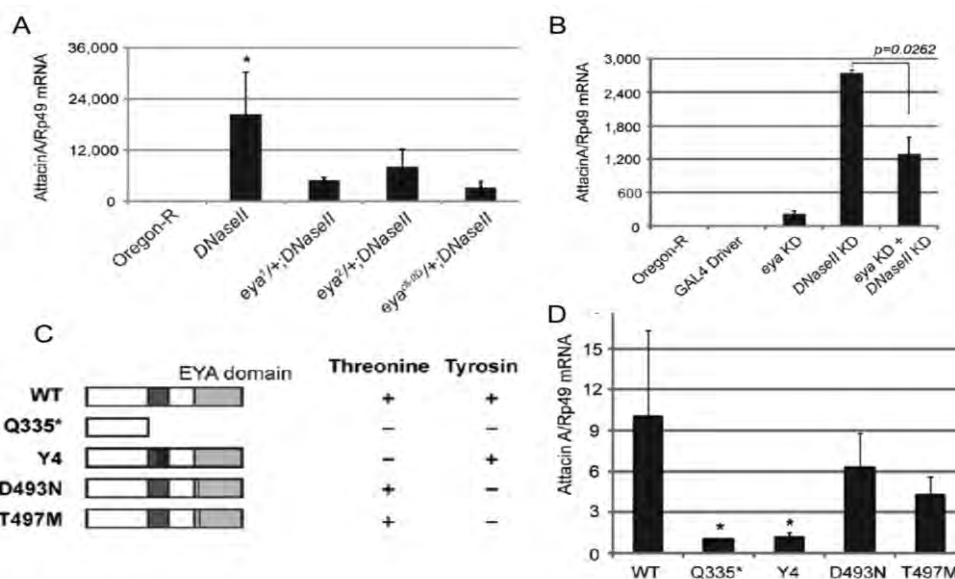


図 11 未分解 DNA による抗菌ペプチド Attacin 遺伝子の発現と EYA の効果

A. DNase II-null ショウジョハエにおける attacin 遺伝子の発現と、それに対するハプロ不全 EYA 遺伝子の効果。Attacin mRNA 量は Real-time PCR により検定した。B. DNaseII 遺伝子、EYA 遺伝子を dsRNA を用いてノックダウンし、attacin mRNA レベルを RT-PCR によって検定した。C. 野生型、Q335\*、Y4、D493N、T497M 変異ショウジョハエ EYA の組み替え体を作成、スレオニン、チロシンフォスファターゼ活性を検定した。D. DNase II-null、EYA ヘテロ不全ハエに野生型、Q335\*、Y4、D493N、T497M 変異 EYA を導入 attacin mRNA を検定した。



#### 4.2.2 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

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 (Kawane et al. *Nature* 443, 998-1002, 2006)。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、関節では 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、G-CSF、MCP-1 などのサイトカイン、ケモカイン遺伝子の異常な発現増加も認められる。また、血清中には高濃度の IL-18 も認められた。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 遺伝子が欠損すると関節炎はほぼ完全に抑制された。この際、関節では、ノ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。さらに、DNase II ノックアウトマウスで観察された関節炎は抗 IL-6 受容体抗体、抗 TNF $\alpha$  抗体、抗 IL-1 $\beta$  抗体、メキシレート投与によって顕著に抑制された。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、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、G-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る。リクルートされた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考えられる。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。

**Ref:** Kawane, K., Tanaka, H., Kitahara, Y., Shimaoka, S., and Nagata, S. (2010).

Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19432-19437.

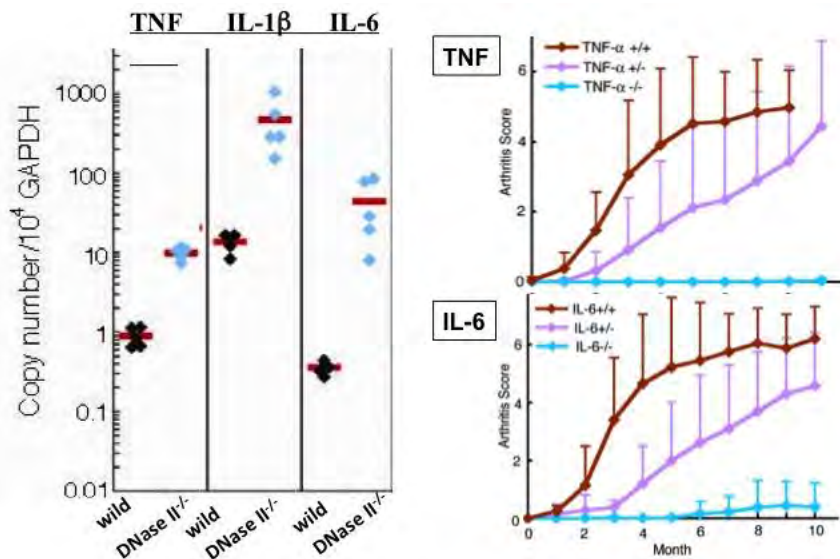


図 12 DNase II ノックアウトにおける TNF $\alpha$ 、IL-6 に依存した関節炎

左図: DNase II 遺伝子を生後ノックアウトし、30 週後の関節での TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 遺伝子の発現を RT-PCR で定量し、同週令の野生型マウスと比較した。右図: TNF $\alpha$  あるいは IL-6 遺伝子が野生型、ヘテロ、ホモに欠質したマウス background で DNase II 遺伝子を生後ノックアウトし、関節炎の発症を経時的に観察した。

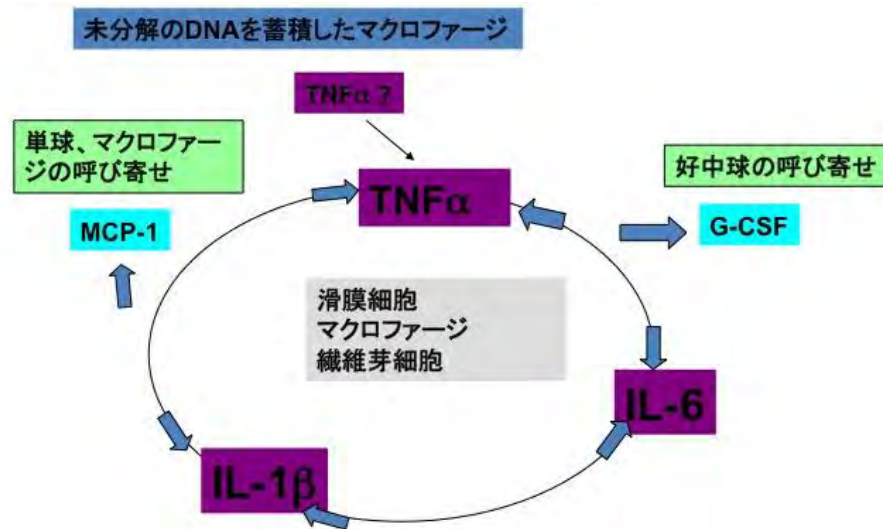


図 13 DNase II ノックアウトマウスにおける関節炎発症のモデル

アポトーシス細胞を貪食したマクロファージがその DNA を分解できないと、TNF $\alpha$ を分泌する。TNF $\alpha$ は関節滑膜細胞を刺激し、刺激された滑膜細胞では TNF $\alpha$ 、IL-6、あるいは IL-1 $\beta$  遺伝子が自分自身、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される。これらサイトカインが滑膜細胞、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。

#### 4.2.3 タイプ I インターフェロンによる細胞死

DNase II 遺伝子を欠損したマウスは胚発生の途上、死滅する。この原因は分解されない DNA により活性化されたマクロファージが IFN $\beta$  を産生、IFN $\beta$  が赤芽球にアポトーシスを誘導、マウスに貧血を誘導したためと考えられる。IFN $\beta$  や IFN $\alpha$  などのタイプ I インターフェロンによるアポトーシスには Fas リガンド、TNF $\alpha$ 、TRAIL などの関与も示唆されているが、混沌としている (Chawla-Sarkar, M. et al. *Apoptosis* 8, 237-249, 2003)。そこで、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。親株の FL 細胞は高濃度の IFN $\alpha$  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 $\alpha$  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、かつ蛋白合成の阻害分子で抑制された。以上より、IFN $\alpha$  は新しい遺伝子の発現を誘導し、誘導された遺伝子の産物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、Fas リガンドや TNF $\alpha$  の発現は IFN $\alpha$  で変動していなかったが、TRAIL 遺伝子の発現は、IFN 受容体を過剰発現した細胞のみで IFN $\alpha$  により誘導された (表 1)。実際、DNase II ノックアウトマウス胎児肝においても、TRAIL 遺伝子の発現がタイプ I IFN 受容体依存的に増加していることが認められた。そこで、TRAIL ノックアウト background で DNase II 遺伝子のノックアウトマウスの樹立を試みたが、TRAIL が存在しなくてもマウスは死滅した。以上の結果は、IFN $\beta$  によるアポトーシスは Fas リガンド、TNF $\alpha$ 、TRAIL などの Death Factor 経路を用いていないことを示唆している。

Ref: Kitahara, Y., Kawane, K., and Nagata, S. (2010). Interferon-induced TRAIL-independent cell death in DNase II<sup>-/-</sup> embryos. *Eur. J. Immunol.* 40, 2590-2598.

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		
	Signal			Signal		
	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

ヒト FL 細胞、タイプ I IFN 受容体を発現させた FL 細胞(F19)をヒト IFN  $\alpha$  で 24 時間処理した後、遺伝子発現を microarray 法で検定した。

## § 5 成果発表等

- (1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 28件)
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. Dasgupta, S. K., Abdel-Monem, H., Niravath, P., Le, A., Bellera, R. V., Langlois, K., Nagata, S., Rumbaut, R. E., and Thiagarajan, P.: Lactadherin and clearance of platelet-derived microvesicles. **Blood** 113: 1332-1339, 2009
  3. 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
  4. 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
  5. 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
  6. 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
  7. 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
  8. 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
  9. Suzuki, J., Umeda, M., Sims JP. And Nagata, S.: Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. **Nature** 468: 834-838, 2010
  10. Sano T. and Nagata S.: Characterization of the threonine-phosphatase of mouse eyes absent 3. **FEBS Lett.** 585: 2714-2719, 2011
  11. Segawa, K., Suzuki, J. and Nagata, S.: Constitutive exposure of phosphatidylserine on viable cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 108: 19246-19251, 2011
  12. Toda, S., Hanayama, R. and Nagata, S.: Two-Step Engulfment of Apoptotic Cells. **Mol. Cell Biol.** 32: 118-125, 2012
  13. Alonzo, M., Lacuesta, T., Dimaano, EM., Kurosu, T., Suarez, LC., Mapua, CA Akeda, Y., Matias, RR., Kuter, DJ., Nagata, S., Natividad, FF. and Oishi, K.: Platelet Apoptosis and Apoptotic Platelet Clearance by Macrophages in Secondary Dengue Virus Infections. **J. Infect. Dis.** 205: 1321-1329, 2012
  14. Nakahashi-Oda, C., Tahara-Hanaoka, S., Shoji, M., Okoshi, Y., Nakano-Yokomizo, T., Ohkohchi, N., Yasui, T., Kikutani, H., Honda, S., Shibuya, K., Nagata, S. and Shibuya, A.: Apoptotic cells suppress mast cell inflammatory responses via the CD300a immunoreceptor. **J. Exp. Med.** 209: 1493-1503, 2012
  15. Miyanishi, M. Segawa, K. and Nagata, S.: Synergistic effect of *Tim4* and *MFG-E8* null mutations on the development of autoimmunity. **Int. Immunol.** 24: 551-559, 2012
  16. Liu, X., Sano, T., Guan, Y., Nagata, S. Hoffmann, JA. and Fukuyama, H.: *Drosophila* EYA Regulates the Immune Response against DNA through an Evolutionarily Conserved Threonine Phosphatase Motif. **PLoS One** 7: e42725, 2012
  17. Imao, T. and Nagata, S.: Apaf-1- and Caspase-8-independent apoptosis. **Cell Death Differ.** 20: 343-352, 2013
  18. Ohkouchi, S., Shibata, M., Sasaki, M., Koike, M., Safig, P., Peters, C., Nagata, S., and Uchiyama, Y.: Biogenesis and Proteolytic Processing of Lysosomal DNase II. **PLoS One** 8: e59148, 2013
  19. Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H., and Nagata, S.: Calcium-dependent Phospholipid Scramblase Activity of TMEM16 Protein Family Members. **J. Biol. Chem.** 288: 13305-13316, 2013
  20. Wang, Q., Imamura, R., Motani, K., Kushiya, H., Nagata, S. and Suda, T.: Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. **Int. Immunol.** 25: 363-372, 2013
  21. Suzuki, J., Denning, DP., Imanishi, E., Horvitz, HR. and Nagata, S.: Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. **Science** 341: 403-406, 2013
  22. Lauber, K., Keppeler, H., Munoz, LE., Koppe, U., Schröder, K., Yamaguchi, H., Krönke, G., Uderhardt, S., Wesselborg, S., Belka, C., Nagata, S. and Herrmann, M.: Milk fat

- globule-EGF factor 8 mediates the enhancement of apoptotic cell. **Cell Death Differ.** 20: 1230-1240, 2013
23. Yamamoto, N., Yamaguchi, H., Ohmura, K., Yokoyama, T., Yoshifuji, H., Yukawa, N., Kawabata, D., Fujii, T., Morita, S., Nagata, S. and Mimori, T.: Serum milk fat globule epidermal growth factor 8 elevation may subdivide systemic lupus erythematosus into two pathophysiologically distinct subsets. **Lupus** , 23: 386-394, 2014
  24. Suzuki, T., Suzuki, J. and Nagata, S.: Functional Swapping between Transmembrane Proteins TMEM16A and TMEM16F. **J Biol Chem.**, 289: 7438-7447, 2014
  25. Nishi, C., Toda, S., Segawa, K. and Nagata, S.: Tim4<sup>-</sup> and MerTK<sup>-</sup> mediated engulfment of apoptotic cells by mouse resident peritoneal macrophages. **Mol Cell Biol.**, 34: 1512-1520, 2014
  26. Yamaguchi, H., Maruyama, T., Urade, Y. and Nagata, S.: Immunosuppression via adenosine receptor activation by adenosine monophosphate released from apoptotic cells. **eLife** 3: e02172, 2014
  27. Suzuki, J. and Nagata, S.: Phospholipid scrambling on the plasma membrane. **Methods Enzymol.** in press.
  28. Toda, S., Segawa, K. and Nagata, S.: MerTK-mediated engulfment of pyrenocytes by central macrophages in erythroblastic islands. **Blood** in press.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

#### 総説(欧文)

1. Strasser, A., Jost, P.J., and Nagata, S.: The Many Roles of FAS Receptor Signaling in the Immune System. **Immunity** 30: 180-192, 2009
2. Nagata, S., Hanayama, R. and Kawane, K.: Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. **Cell** 140: 619-630, 2010
3. Galluzzi, L., Nagata, S., and Kroemer, G. et al.: Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. **Cell Death Differ.** 16: 1093-1107, 2009
4. Nagata, S.: Apoptosis and Autoimmune Diseases. **Ann. NY Acad. Sci.** 1209: 10-16, 2010
5. Nagata, S. and Kawane, K.: Autoinflammation by endogenous DNA. **Adv. Immunol.** 110: 139-161, 2011
6. Kawane, K. and Nagata, S.: DNA Degradation and Its Defects. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** in press.

#### 総説(和文)

1. 川根公樹、長田重一「DNAの分解異常による関節炎」**「Inflammation and Regeneration」** Vol.29, No.3, 204-208頁, 日本炎症・再生医学会, 2009年5月
2. 川根公樹「DNA分解の分子機構及び生理作用」**「生化学」**Vol.81, No.9, 765-779頁, 日本生化学会, 2009年9月25日
3. 山口裕嗣、長田重一「MFG-E8およびTim4を介したアポトーシス細胞の認識・食食機構とその破綻」**「実験医学」**Vol.28, No.7(増刊), 72-78頁, 羊土社, 2010年5月1日
4. 長田重一「アポトーシスと死細胞の食食」第20回研究会記録:**The Meeting of Liver and Immunology「Minophagen Medical Review」**Vol.55, No.2, 112-114頁, ミノファーゲン製薬, 2010年6月20日
5. 岡部泰賢、長田重一「スレオニン脱リン酸化酵素Eyaによる自然免疫の制御」**「実験医学」**Vol.28, No.12(増刊), 48-54頁, 羊土社, 2010年8月1日
6. 鈴木淳、長田重一「TMEM16Fによる細胞膜におけるリン脂質のスクランブル」**「ライフサイエンス新着論文レビュー」**Web Journal, 2011年1月7日 <http://first.lifesciencedb.jp/archives/1809>
7. 川根公樹、長田重一「DNAの分解異常による関節炎」**「炎症と免疫」**Vol.19, No.2, 24-29頁, 先端医学社, 2011年2月20日
8. 鈴木淳、長田重一「TMEM16Fによる細胞膜リン脂質のスクランブル」**「生化学」**Vol.83, No.11, 1050-1054頁, 社団法人日本生化学会, 2011年11月25日
9. 長田重一「アポトーシスの興奮からその先のフロンティアへ」**「実験医学:500号記念特集 世界を動かした生命医学のマイルストーン」**Vol.30, No.12, 1858-1863頁, 羊土社, 2012年7月
10. 鈴木淳、長田重一「アポトーシスを起こした細胞におけるXkr8によるホスファチジルセリンの露出」

「ライフサイエンス 新着論文レビュー」Web Journal, 2013年7月24日

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/7464>

11. 鈴木淳、長田重一「アポトーシス細胞のホスファチジルセリンの露出に関する Xkr8 の同定」『実験医学』Vol.32, No.1, 74-77頁, 羊土社, 2014年1月

#### 書籍(欧文)

1. Hanayama, R., Miyanishi, M., Yamaguchi, H., Suzuki, J. and Nagata, S.: Engulfment of apoptotic cells and its physiological roles. In: **Cell Death**, Gerry Melino, and D. Vaux, eds. (John Wiley & Sons) pp.165-175, 2010

#### 書籍(和文)

1. 長田重一「IFN- $\alpha$ のクローニング」『サイトカインハンティング(日本インターフェロン・サイトカイン学会 編)』第2章, 32-34頁, 京都大学学術出版会, 2010年6月
2. 長田重一「G-CSF, Fas」『サイトカインハンティング(日本インターフェロン・サイトカイン学会 編)』第8章, 254-259頁, 京都大学学術出版会, 2010年6月
3. 長田重一「終末への道筋 -アポトーシスとさまざまな細胞死-」監訳 メディカル・サイエンス・インターナショナル, 2012年6月

#### その他

1. 長田重一「死の側から生を見る分野を確立」JT 生命誌研究館 Scientist Library: 特別編 -日本の生命研究を築いた科学者-, 2010年9月24日  
[www.brh.co.jp/s\\_library/j\\_site/scientistweb/no66/index.html](http://www.brh.co.jp/s_library/j_site/scientistweb/no66/index.html)
2. 長田重一「分子生物学に魅せられた人々」(日本分子生物学会編) 第14章, 209-222頁, 東京化学同人, 2011年6月
3. 長田重一「Eyes:細胞に備えられた死のシステム、アポトーシスの分子機構の解明に貢献」LF 対談「アポトーシスはまだまだわかっていないことが多い。できるところから攻めるしかない」千里ライフサイエンス振興財団ニュース No.63, 1-6頁, 2011年6月
4. 長田重一「アポトーシス研究で生命のしくみを解明」『AERA ムック本:京都大学 by AERA』34-35頁, 朝日新聞出版, 2012年10月

#### (3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 60件、国際会議 57件)

##### 国内

1. 川根公樹、長田重一(平成20年10月17日)分解を免れたDNAによる関節炎 第36回日本臨床免疫学会総会 シンポジウム 京王プラザホテル 東京
2. 長田重一(平成20年10月31日)アポトーシスと死細胞の貪食 第27回信州免疫アレルギー懇話会 特別講演 信州大学 長野
3. 長田重一(平成20年11月14日)アポトーシスと死細胞の貪食 第15回分子皮膚科学フォーラム 特別講演 ホテルフジタ京都 京都
4. 長田重一(平成20年11月26日)細胞の死 特許庁先端技術研修会 特別講演 経済産業省別館 東京
5. 長田重一(平成20年12月2日)Engulfment of dead cells 第15回武田科学振興財団生命科学シンポジウム 招待講演 シェラトン都ホテル 東京
6. 長田重一(平成20年12月9日)Engulfment of apoptotic cells BMB2008(第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム・オーガナイザー 神戸ポートアイランド 神戸
7. 長田重一(平成21年1月23日)アポトーシスと死細胞の貪食 兵庫医科大学 第4回 知の創造レクチャー 特別講演 兵庫医科大学 兵庫
8. 長田重一(平成21年2月11日)細胞の死 芝蘭会神戸支部講演会 兵庫県医師会館 神戸
9. 長田重一(平成21年3月14日)アポトーシスと死細胞の貪食 HBS 特別講演会 徳島大学 徳島

10. Miyanishi, M., Tada, K. and Nagata, S. (平成20年12月1日) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor シンポジウム 第38回日本免疫学会総会・学術集会 京都国際会館 京都
11. 長田重一, 多田和年, 宮西正憲 (平成20年12月10日) Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor シンポジウム BMB2008 神戸ポートアイランド 神戸
12. 川根公樹 (平成20年12月11日) DNA 分解酵素の生理作用の解析 平成 20 年度日本生化学会 奨励賞受賞講演 BMB2008 神戸ポートアイランド 神戸
13. 長田重一 (平成21年4月16日) アポトーシスと死細胞の食食 第 113 回日本眼科学会総会 招聘講演 東京国際フォーラム 東京
14. 長田重一 (平成21年5月23日) アポトーシスと死細胞の食食 第 7 回北東北血液研究会 特別講演 秋田温泉さとみコンベンションホール 秋田
15. 長田重一 (平成21年9月5日) アポトーシスと死細胞の食食 The 20<sup>th</sup> Meeting of Liver and Immunology 特別講演 京都国際ホテル 京都
16. 佐野晃之, 岡部泰賢, 長田重一 (平成21年10月21日) Eyes absent のスレオニン脱リン酸化酵素活性による自然免疫活性化の調節機構 第 82 回日本生化学会大会 オーガナイザー シンポジウム 神戸国際会議場 神戸
17. 長田重一 (平成21年10月31日) アポトーシスと死細胞の食食 第9回臨床免疫セミナー in Kyoto 特別講演 ウェスティン都ホテル 京都
18. 長田重一 (平成21年12月14日) 死細胞の食食と分解 再生医科学研究所 学術講演会 芝蘭会館 京都
19. 長田重一 (平成22年1月13日) 死細胞の食食・分解異常による炎症 特別講演 新学術領域「自然炎症」第1回公開シンポジウム 東京大学医科学研究所 東京
20. 長田重一 (平成22年3月4日) 死細胞の食食と分解 アレルギークロストーク研究会 特別講演 メルバルク京都 京都
21. 長田重一 (平成22年4月23日) 死細胞の分解異常による炎症 第 54 回日本リウマチ学会総会・学術集会 招聘講演 神戸ポートピアホテル 神戸
22. 長田重一 (平成22年5月17日) 細胞の死と死細胞の食食 金沢大学がん研究所竣工記念講演会 招聘講演 金沢大学 金沢
23. 長田重一 (平成22年5月19日) アポトーシスと死細胞の食食 第 80 回実験結核研究会 特別講演 京都テルサ 京都
24. 鈴木淳, 長田重一 (平成22年12月8日) Exposure of Phosphatidylserine BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会大会合同大会) シンポジウム 神戸ポートアイランド 神戸
25. 長田重一 (平成23年1月29日) アポトーシスと慢性炎症 第 10 回リウマチ性疾患研究会 特別講演 経団連会館 東京
26. 長田重一 (平成23年2月6日) 細胞死、食食そして新しい発展をめざして 愛媛大学プロテオ医学研究センター学術シンポジウム 講演 道後温泉大和屋本店 愛媛
27. 長田重一 (平成23年5月9日) 細胞死、死細胞の食食、そしてこれから 大阪バイオサイエンス研究所 Monthly Lecture 招聘講演 大阪バイオサイエンス研究所 大阪
28. 長田重一 (平成23年5月21日) アポトーシスと自然免疫 第 44 回日本発生生物学会年会 シンポジウム 沖縄コンベンションセンター 沖縄
29. 長田重一 (平成23年5月23日) 細胞死、食食そして新しい発展をめざして 第 1 回 先端医療センター Monthly Lecture 招聘講演 先端医療センター 神戸
30. 長田重一 (平成23年5月25日) Apoptosis, engulfment and then? 日本分子生物学会 第 11 回春季シンポジウム 金沢国際がん生物学シンポジウム 合同大会 特別講演 石川県立音楽堂交流ホール 金沢
31. 長田重一 (平成23年5月27日) Exposure of phosphatidylserine 第 76 回日本インターフェロン・サイトカイン学会 第 19 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 2011 合同国際学術集会 Luncheon Seminar 全日空ゲートタワーホテル大阪 大阪
32. 長田重一 (平成23年5月28日) 細胞膜の非対称性の崩壊 第 3 回シグナルネットワーク研究会 シンポジウム 東京大学医科学研究所 東京
33. 長田重一 (平成23年7月28日) アポトーシスと自己免疫疾患 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 特別講演 大阪国際会議場 大阪
34. 長田重一 (平成23年8月3日) 細胞死と自己免疫疾患 第 13 回 免疫サマースクール 2011 シンポ

ジウム ラフォーレ蔵王リゾート&スパ 宮城

35. 長田 重一(平成23年8月26日)細胞死、食食そして新しい発展をめざして 大阪府立大学セミナー セミナー 大阪府立大学 大阪
36. 長田 重一(平成23年9月2日)細胞死、死細胞の食食、そしてこれから 日本学術会議 第5回形態科学シンポジウム「生命科学のパイオニアが語る生命の不思議」シンポジウム 大阪大学 大阪
37. 長田 重一(平成23年9月21日)アポトーシス細胞の食食 第84回日本生化学会大会 シンポジウム 京都国際会館 京都
38. 長田 重一(平成23年11月15日)アポトーシス細胞の食食 第2回 Infection and Immunity Research Symposium 招聘講演 ホテルオークラ福岡 福岡
39. 長田 重一(平成23年12月17日)細胞死、死細胞の食食、そしてこれから 第7回臨床分子医学研究会 特別講演 ホテルグランヴィア京都 京都
40. 長田 重一(平成24年4月7日)Apoptosis, Engulfment, and Next International Symposium on Cellular Signaling 招待講演 東京大学医科学研究所 東京
41. 長田 重一(平成24年5月26日)細胞膜表面へのフォスファチジルセリンの暴露 日本生化学会東北支部 第78回例会・シンポジウム シンポジウム 山形大学医学部 山形
42. 長田 重一(平成24年5月29日)Exposure of phosphatidylserine to the cell surface 第45回日本発生物学会 第64回日本細胞生物学会 合同年大会 Joint Keynote Symposium 神戸国際会議場 神戸
43. 長田 重一(平成24年7月24日)細胞膜におけるリン脂質の非対称性分布とその崩壊 第14回免疫サマースクール シンポジウム ラフォーレ那須 栃木
44. 長田 重一(平成24年8月6日)アポトーシスとフォスファチジルセリンの暴露 さきがけ「炎症の慢性化機構の解明と制御」研究領域 第3回領域会議 特別講演 KKR ホテル金沢 石川
45. 長田 重一(平成24年9月1日)アポトーシスとフォスファチジルセリンの暴露 第5回 Symposium on the pathophysiology of cancer, cardiovascular ageing and metabolic syndrome 特別講演 ホテル メトロポリタンエドモント飯田橋 東京
46. 長田 重一(平成24年10月19日)アポトーシスとフォスファチジルセリンの暴露 筑波大学・東京理科大学生命科学研究合同シンポジウム 招待講演 学士会館 東京
47. 長田 重一(平成24年11月9日)細胞の死 第28回西宮市ライフサイエンスセミナー 招待講演 西宮市大学交流センター 兵庫
48. 長田 重一(平成24年12月15日)フォスファチジルセリンの暴露とアポトーシス細胞の食食 第85回日本生化学会大会 シンポジウム 福岡国際会議場 福岡
49. 長田 重一(平成24年12月18日)細胞の死と食食 大阪バイオサイエンス研究所 25周年記念シンポジウム 招待講演 大阪市中央公会堂 大阪
50. 長田 重一(平成25年5月18日)細胞の死と死細胞の食食 第60回日本生化学会近畿支部例会 特別講演 大阪大学 大阪
51. 長田 重一(平成25年7月3日)炎症とアポトーシス 第34回日本炎症・再生医学会 特別講演 京都国際会館 京都
52. 長田 重一(平成25年7月20日)アポトーシスと死細胞の食食 第88回北野病院学術講演会 特別講演 北野病院 大阪
53. 長田 重一(平成25年8月2日)細胞死と死細胞の食食 第15回免疫サマースクール Symposium ザ・ルイガンズ 福岡
54. 長田 重一(平成25年8月30日)アポトーシスと細胞膜非対称性の崩壊 生体機能と創薬シンポジウム2013 特別講演 九州大学 福岡
55. 長田 重一(平成25年9月7日)アポトーシス細胞でのフォスファチジルセリンの暴露と死細胞の食食 第1回ブリストル血液学アカデミー 特別講演 ヒルトン福岡シーホーク 福岡
56. 長田 重一(平成25年11月27日)細胞の死 第18回慶應医学賞受賞記念講演会 慶應義塾大学 東京
57. 長田 重一(平成25年12月5日)アポトーシス -- Death Factor の同定から20年 第36回日本分子生物学会大会 シンポジウム 神戸国際会議場 兵庫
58. 長田 重一(平成25年12月7日)細胞死と死細胞の食食 大阪府立大学理学部公開セミナー 大阪府立大学 大阪
59. 長田 重一(平成26年1月20日)フォスファチジルセリンの暴露と死細胞の食食 第4回酵素学講習会(酵素学ウィンタースクール) 特別講演 徳島大学 徳島



60. 長田 重一(平成26年1月31日)細胞死と死細胞の貪食 第 17 回神戸ラボ全体研究会議 講演  
神戸大学 神戸 BT センター 兵庫

国際

1. Nagata, S. (October 7, 2008) Apoptosis and engulfment of dead cells, **Plenary Lecture**, The 9th International Congress on Cell Biology, Seoul Convention and exhibition Center (COEX), Seoul, KOREA
2. Nagata, S. (October 15, 2008) Engulfment of apoptotic cells, **The 2008-2009 President's Research Seminar Series**, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA
3. Nagata, S. (October 19, 2008) Engulfment of apoptotic cells, and autoimmune diseases caused by its defect, **Symposium**, The 2nd International Symposium on Regulators of Adaptive Immunity, Erlangen University, Erlangen, GERMANY
4. Nagata, S. (November 14, 2008) Apoptosis, and engulfment of dead cells, **Symposium**, The NAIST Global COE International Symposium on Cell Signaling, Nara Institute of Science and Technology, Nara, JAPAN
5. Nagata, S. (April 28, 2009) Chronic polyarthritis by undigested DNA accumulated in macrophages, 12th International TNF Conference, **Symposium**, Euroforum Escorial, Madrid, SPAIN
6. Nagata, S. (June 17, 2009) Apoptosis and engulfment of dead cells, **Seminar** at The Institute for Molecular and Cell Biology, Strasbourg, FRANCE
7. Nagata, S. (June 19, 2009) Engulfment and degradation of apoptotic cells, The Occasion of Pierre Golstein's 40 years of research on Cytotoxicity and cell death, Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Marseille, FRANCE
8. Nagata, S. (June 29, 2009) Tim4 as a phosphatidylserine receptor, The Gordon Research Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance, Colby-Sawyer College, New Hampshire, USA
9. Nagata, S. (July 7, 2009) Activation of Innate Immune Reaction by Mammalian DNA that Escaped from Degradation, Leading to Anemia and Arthritis, The 9th World Congress on Inflammation, **Morning Symposium**, Keio Plaza Hotel, Tokyo, JAPAN
10. Nagata, S. (July 8, 2009) Programmed Cell Death and Autoimmune Diseases, The 9th World Congress on Inflammation, **Evening Seminar**, Keio Plaza Hotel, Tokyo, JAPAN
11. Nagata, S. (Aug 30, 2009) Programmed Cell Death and Autoimmune Diseases, The EMBO meeting, Amsterdam RAI, Amsterdam, NETHERLANDS
12. Nagata, S. (Oct 5, 2009) Engulfment of apoptotic cells, 5<sup>th</sup> Annual St. Jude Biomedical Research Symposium, on "Cell Death, Survival and Autophagy: Therapeutic targets and biological perspectives. The St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
13. Nagata, S. (Oct 7, 2009) Programmed cell death in mouse development, The 2009 Cold Spring Harbor meeting on "Cell Death", **Organizer**, The Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
14. Nagata, S. (Nov 10, 2009) Apoptosis and engulfment of dead cells, **Frontier Biology Seminar**, The Institute of Molecular Biology, Academia Sinica, Taipei, TAIWAN
15. Nagata, S. (Nov 20, 2009) Engulfment of apoptotic cells, The conference of "To kill or be killed: viral evasion strategies and interference with cell death machinery", Norra Latin Conference Center, Stockholm, SWEDEN
16. Okabe, Y., Sano, T., Kawane, K. and Nagata, S. (February 15, 2010) Activation of innate immune reaction by mammalian DNA that escaped from degradation, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Fairmont Banff Springs, Banff, CANADA
17. Nagata, S. (Mar 28, 2010) Engulfment and degradation of apoptotic cells, Japan Endocrinology Society **Meister Award-Awarding Seminar**. The 14<sup>th</sup> International Congress of Endocrinology, Kyoto International Conference Center, Kyoto, JAPAN
18. Nagata, S. (May 9, 2010) **Keynote Address**, Engulfment and degradation of dead cells, **Organizer**, The Conference of "Clearance of Dying cells in a Healthy and Diseased Immune System", The Konrad Adenauer Conference Center, Jerusalem, ISRAEL
19. Nagata, S. (May 24, 2010) Engulfment and degradation of apoptotic cells, **Symposium**, The Nobel Symposium 2010 on the Cell Cycle and Apoptosis in Disease, Karolinska Institute, Stockholm, SWEDEN
20. Nagata, S. (June 24, 2010) Activation of the innate immunity by mammalian DNA that escaped degradation, leading to arthritis, **Symposium**, The 3rd International Conference on Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems, Nomikos

Conference Center, Santorini, GREECE

21. Nagata, S. (July 13, 2010) Activation of innate immune reaction by mammalian DNA that escaped from degradation, leading to arthritis, **Symposium**, Osaka University G-COE Program International Symposium on Organelle Network: Microbiology, Immunology, and Cell Biology, Osaka International Convention Center, Osaka, JAPAN
22. Nagata, S. (August 24, 2010) Engulfment and degradation of dead cells, **Symposium**, The 14th International Congress of Immunology, Kobe Convention Center, Kobe, JAPAN
23. Nagata, S. (September 4, 2010) Clearance of Dead Cells, **Symposium**, The 18th Euroconference on Apoptosis, Ghent University, Ghent, BELGIUM
24. Nagata, S. (September 29, 2010) Engulfment and degradation of apoptotic cells, **Symposium**, The OzBio2010 Conference, Melbourne Convention Centre, Melbourne, AUSTRALIA
25. Nagata, S. (October 9, 2010) Polyarthritis due to autoinflammation caused by the defective DNA degradation, **Symposium**, The Cell's 2010 Exciting Biology Meeting: The Biology of Recognition, The Sentosa Resort & Spa, Sentosa Island, SINGAPORE
26. Nagata, S. (November 26, 2010) Apoptosis and Autoimmunity, **Symposium**, APRU Research Symposium on Molecular Biology & Research Symposium on Nano-biology, Kyoto University (iCeMS), Kyoto, JAPAN
27. Nagata, S. (December 27, 2010) Apoptosis, engulfment, and degradation of dead cells, 2010 **Charles Janeway Lecture** at the Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy, Moscow, RUSSIA
28. Nagata, S. (February 15, 2011) Apoptosis and Autoimmunity, **Symposium**, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Santa Fe Community Convention Center, New Mexico, USA
29. Nagata, S. (May 15-18, 2011) **Organizer**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
30. Nagata, S. (July 15, 2011) Exposure of phosphatidylserine to the cell surface, **Seminar** at The Scripps Research Institute, Florida, USA
31. Nagata, S. (July 20, 2011) Exposure of phosphatidylserine to the cell surface, **Symposium**, Gordon Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance, Bates College, Lewiston, USA
32. Nagata, S. (September 11, 2011) Exposure of phosphatidylserine, and engulfment of apoptotic cells, **Symposium**, The 2nd International Symposium on "Brain Myeloid Cells: New light on old friends", Insel Hotel Potsdam, Potsdam, GERMANY
33. Nagata, S. (September 13, 2011) Exposure of phosphatidylserine to the cell surface., **Keynote Seminar** at The Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille, FRANCE
34. Nagata, S. (October 31, 2011) Apoptosis, Engulfment and Next, **Symposium**, The Frontiers in Cancer Science 2011, National University of Singapore, SINGAPORE
35. Nagata, S. (November 15, 2011) Apoptosis, and Exposure of Phosphatidylserine, **Symposium**, The 10<sup>th</sup> International Symposium on "New Aspects of Phospholipid Biology and Medicine 2011", The Luigans Spa & Resort, Fukuoka, JAPAN
36. Nagata, S. (November 24, 2011) Exposure of Phosphatidylserine for Signaling, **Symposium**, The 5th Barossa Meeting on "Cell Signalling and Molecular Medicine", Novotel Resort, Barossa Valley, AUSTRALIA
37. Nagata, S. (December 7, 2011) Engulfment and degradation of dead cells, **Symposium**, The British Society for Immunology Congress 2011, Arena and Convention Centre, Liverpool, UK
38. Nagata, S. (January 16, 2012) Apoptosis, engulfment, and exposure of phosphatidylserine, **Symposium**, International symposium: Infection, immunity and cancer, Shiran-Kaikan of Kyoto University, Kyoto, JAPAN
39. Nagata, S. (January 19, 2012) Apoptosis, engulfment, and exposure of phosphatidylserine, **Symposium**, The 6th Annual Symposium on "Immunity & Inflammation", Salk Institute in La Jolla, California, USA
40. Nagata, S. (March 29, 2012) Apoptosis and its Failure, "**Karolinska Research Lectures**" at Nobel Forum, The Karolinska Institute, Stockholm, SWEDEN
41. Nagata, S. (April 27, 2012) Apoptosis and its Failure, **Award Lecture, Honorary Doctorate** from University of Zurich, Zurich, SWITZERLAND
42. Nagata, S. (April 30, 2012) Engulfment of apoptotic cells, and exposure of

- phosphatidylserine, Seminar at The University of Pennsylvania, Philadelphia, USA
43. Nagata, S. (May 1, 2012) Exposure of phosphatidylserine to the cell surface, Seminar at The New York University, New York, USA
  44. Nagata, S. (May 2, 2012) Apoptosis and exposure of phosphatidylserine, **Edwin J. Cohn Lecture** at The Harvard Medical School, Boston, USA
  45. Nagata, S. (May 22, 2012) Exposure of Phosphatidylserine to the Cell Surface, Symposium, The International Symposium "Dynamism of Immune Reactions & Regulation", Osaka International Convention Center, Osaka, JAPAN
  46. Nagata, S. (June 29, 2012) Exposure of Phosphatidylserine to the Cell Surface, Symposium, The International Cell Death Society, National University of Singapore, SINGAPORE
  47. Nagata, S. (November 22, 2012) Engulfment of apoptotic cells, **Plenary Lecture**, The special celebratory symposium of Walter And Eliza Hall Institute, WEHI, AUSTRALIA
  48. Nagata, S. (December 7, 2012) Apoptosis and its defect, **Award Lecture, Debrecen Award for Moleculare Medicine**, University of Debrecen, Debrecen, HUNGARY
  49. Nagata, S. (April 15-19, 2013) Apoptosis, exposure of phosphatidylserine, and engulfment of apoptotic cells, **Keynote Lecture**, Cold Spring Harbor Asia Conferences on Mechanisms and Functions of Non-apoptotic Cell Death, Suzhou Dushu Lake Conference Center, Jiangsu, CHINA
  50. Nagata, S. (June 24, 2013) Exposure of phosphatidylserine to cell surface, **Symposium**, Gordon Conference on Apoptotic Cell Recognition & Clearance, University of New England, Maine, USA
  51. Nagata, S. (September 17, 2013) Apoptosis and Engulfment of Dead Cells by Macrophages, **Keynote Speech**, Koc University – Kyoto University International Symposium on “New Frontiers in Health Sciences & Technologies”, Kyoto University, Kyoto, JAPAN
  52. Nagata, S. (October 8-12, 2013) Exposure of phosphatidylserine, and engulfment of apoptotic cells, **Symposium**, The 2013 CSHL Meeting on Cell Death, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
  53. Nagata, S. (November 21, 2013) Cell Death and Clearance of Dead Cells, **Keynote Lecture**, Swiss-Kyoto Symposium 2013, ETH(Swiss Federal Institute of Technology), Zurich, SWITZERLAND
  54. Nagata, S. (February 11, 2014) Exposure of phosphatidylserine in apoptotic cells, **Symposium**, The 2014 Keystone Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages in Human Diseases, Hilton Santa Fe Historic Plaza Hotel, Santa Fe, USA
  55. Nagata, S. (March 21, 2014) Exposure of phosphatidylserine and engulfment of apoptotic cells, Distinguished Lecture Series at The Wistar Institute, Philadelphia, USA
  56. Nagata, S. (March 24, 2014) Exposure of phosphatidylserine and engulfment of apoptotic cells, **Seminar** at The Campbell Family Institute for Breast Cancer Research, Toronto, CANADA
  57. Nagata, S. (March 26, 2014) Exposure of Phosphatidylserine and Phosphatidylserine-Dependent Engulfment of Apoptotic Cells, **Symposium**, The 2014 Keystone Symposium on Innate Immunity, Metabolism and Vascular Injury, The Whistler Conference Centre, Whistler, CANADA

② 口頭発表 (国内会議 11件、国際会議 3件)

国内

1. 長坂明臣, 川根公樹, 長田重一(平成20年12月10日)DNaseII 欠損マウスを用いたマウスの発生段階におけるアポトーシス細胞の検出 **口頭発表** BMB2008 神戸ポートアイランド 神戸
2. 藤井俊裕, 上田健, 長田重一, 福永理己郎(平成20年12月11日)p400/mDomino クロマチンリモデリング因子は成体造血に必須である **口頭発表** BMB2008 神戸ポートアイランド 神戸
3. 藤井俊裕, 長田重一, 福永理己郎(平成21年12月11日)p400/mDomino クロマチンリモデリング因子は細胞周期進行に必須である 第32回日本分子生物学会年会 **ワークショップ** パシフィコ横浜 横浜
4. 北原雄輔, 長田重一(平成22年12月10日)Interferon-induced TRAIL- independent cell death in DNase II<sup>-/-</sup> embryos BMB2010(第33回日本分子生物学会年第83回日本生化学会大会合同大会) **口頭発表** 神戸ポートアイランド 神戸
5. 佐野晃之, 長田重一(平成23年9月23日)Characterization of the threonine- phosphatase of

- mouse eyes absent 3 第 84 回日本生化学会大会 **口頭発表** 京都国際会館 京都
6. 鈴木淳、長田重一(平成23年9月24日)細胞膜リン脂質のスクランブル 第 84 回日本生化学会大会 **シンポジウム** 京都国際会館 京都
  7. 鈴木孝征、鈴木淳、長田重一(平成25年9月12日) Functional Swapping between Transmembrane Protein TMEM16A and TMEM16F 第 86 回日本生化学会大会 **口頭発表** パシフィコ横浜 神奈川
  8. 鈴木淳、長田重一(平成25年9月13日) Phospholipid scrambling on plasma membrane 第 86 回日本生化学会大会 **シンポジウム** パシフィコ横浜 神奈川
  9. 戸田聡、瀬川勝盛、長田重一(平成25年9月13日) The molecular mechanism of the engulfment of nuclei extruded from erythroblasts in the erythroblastic islands 第 86 回日本生化学会大会 **口頭発表** パシフィコ横浜 神奈川
  10. 西ちひろ、瀬川勝盛、長田重一(平成25年9月13日) Requirement of Tim4 and Mer on the engulfment of apoptotic cells by peritoneal macrophage 第 86 回日本生化学会大会 **口頭発表** パシフィコ横浜 神奈川
  11. 鈴木淳、長田重一(平成25年12月4日) アポトーシス細胞におけるホスファチジルセリン露出機構 第 36 回日本分子生物学会大会 **ワークショップ** 神戸国際会議場 兵庫

#### 国際

1. Suzuki, J and Nagata, S. (May 17, 2011) Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F, **Symposium**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
2. Suzuki, J. (October 5, 2012) Phospholipid scrambling on plasma membrane, **Plenary Session**, Kyoto Univ. Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2012, Awaji Yumebutai Int. Conf. Cent, Hyogo, JAPAN
3. Toda, S. (October 5, 2012) Reconstitution of the engulfment of apoptotic cells with a B cell line, **Area Meeting**, Kyoto Univ. Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2012, Awaji Yumebutai Int. Conf. Cent, Hyogo, JAPAN

③ ポスター発表 (国内会議 1件、国際会議 12件)

#### 国内

1. 仲矢道雄, 北野正寛, 松田道行, 長田重一(平成20年12月9日) アポトーシス細胞の貪食における Rac1 の空間的・時間的活性化 **ポスター発表** BMB2008 神戸ポートアイランド 神戸

#### 国際

1. Kitahara, Y. and Nagata, S. (May 16, 2011) Two-steps cell death by type I interferon, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
2. Imao, T. and Nagata, S. (May 16, 2011) Apaf-1-independent intrinsic apoptotic pathway, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
3. Koda, H., Miyanishi, M. and Nagata, S. (May 16, 2011) Specific expression of Tim1, a phosphatidylserine receptor, on mouse plasmacytoid dendritic cells, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
4. Sano, T. and Nagata, S. (May 16, 2011) Different function between EYA family members in innate immune signalling, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
5. Yamaguchi, H. and Nagata, S. (May 17, 2011) Release by apoptotic cells of a factor(s) that regulates the gene expression in macrophages, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
6. Toda, S., Hanayama, R. and Nagata, S. (May 17, 2011) Reconstitution of the engulfment of apoptotic cells with a B cell line, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN

7. Fujimoto, T. Kawane, K. and Nagata, S. (May 17, 2011) Therapeutic effect of recombinant DNase II on the arthritis caused by DNA escaped from degradation, **Poster**, 13th International TNF Conference, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, JAPAN
8. Suzuki, T. (October 5, 2012) Structure-function analysis of TMEM16A and TMEM16F, **Poster**, Kyoto Univ. Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2012, Awaji Yumebutai Int. Conf. Cent, Hyogo, JAPAN
9. Motani, K. (October 5, 2012) Searching for intracellular DNA sensor, **Poster**, Kyoto Univ. Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2012, Awaji Yumebutai Int. Conf. Cent, Hyogo, JAPAN
10. Gyobu, S. (October 5, 2012) Analysis of the physiological function of TMEM16E, **Poster**, Kyoto Univ. Global COE “Center for Frontier Medicine” International Symposium / Retreat 2012, Awaji Yumebutai Int. Conf. Cent, Hyogo, JAPAN
11. Suzuki, J. (October 8-12, 2013) Exposure of phosphatidylserine by Xkr8, **Poster**, The 2013 CSHL Meeting on Cell Death, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA
12. Toda, S. (October 8-12, 2013) MerTK-dependent engulfment of pyrenocytes by macrophages, **Poster**, The 2013 CSHL Meeting on Cell Death, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA

#### (4)知財出願

- ①国内出願 (0件)
- ②海外出願 (6件)
- ③その他の知的財産権  
該当なし

#### (5)受賞・報道等

- ①受賞
  1. 川根公樹 平成 20 年 10 月 27 日  
平成 20 年度日本生化学会奨励賞  
「DNA 分解酵素の生理作用の解析」
  2. 華山力成 平成 21 年 4 月 14 日  
平成 21 年度 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞  
「アポトーシス細胞の貪食機構の研究」
  3. 佐野晃之 平成 21 年 8 月 30 日  
第2回 Merck Award for Young Biochemistry Researcher
  4. 長田重一 平成 22 年 3 月 28 日  
2010 年度 日本内分泌学会 マイスター賞
  5. 長田重一 平成 22 年 12 月 13 日  
日本学士院 新会員に選出
  6. 鈴木 淳 平成 23 年 5 月 3 日  
平成 22 年京都大学医学部若手研究者優秀論文賞(KMYIA) 基礎研究部門  
「Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F」
  7. 戸田 聡 平成 23 年 9 月 9 日

- 京都大学 G-COE プログラム(2011 年全体リポート)ベストプレゼンテーション賞  
「Reconstitution of the engulfment of apoptotic cells with a B cell line」
8. 佐野晃之 平成 23 年 9 月 23 日  
第 84 回日本生化学会大会 鈴木絃一メモリアル賞  
「Characterization of the threonine-phosphatase of mouse eyes absent 3」
  9. 長田重一 平成 24 年 4 月 28 日  
Zurich 大学名誉博士号
  10. 長田重一 平成 24 年 9 月 19 日  
第 21 回 日本癌学会 吉田富三賞  
「細胞死と貪食の分子機構とその生理作用の解明」
  11. 戸田 聡 平成 24 年 9 月 29 日  
平成 23 年京都大学医学部若手研究者優秀論文賞(KMYIA) 基礎研究部門  
「Two-step engulfment of apoptotic cells」
  12. 鈴木孝征 平成 24 年 10 月 5 日  
京都大学 G-COE プログラム(2012 年全体リポート)ベストプレゼンテーション賞  
「Structure-function analysis of TMEM16A and TMEM16F」
  13. 長田重一 平成 24 年 12 月 7 日  
Debrecen Award for Molecular Medicine, Debrecen University (Hungary)
  14. 長田重一 平成 25 年 6 月 27 日  
京都大学教員表彰「孜孜賞」
  15. 西ちひろ 平成 25 年 7 月 20 日  
第 22 回 Cell Death 学会学術集会優秀演題賞  
「腹腔常在マクロファージにおける Tim4 と Mer 依存的な死細胞の貪食」
  16. 戸田 聡 平成 25 年 9 月 13 日  
The molecular mechanism of the engulfment of nuclei extruded from erythroblasts in the erythroblastic islands  
第 86 回日本生化学会大会 鈴木絃一メモリアル賞
  17. 長田重一 平成 25 年 11 月 27 日  
第 18 回慶應医学賞  
「細胞死の分子機構・生理作用の研究」

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 平成 21 年 6 月 29 日  
日本経済新聞、朝日新聞、京都新聞 他  
「ウイルスから細胞守る物質 増やす酵素を発見」
2. 平成 22 年 10 月 26 日  
日本経済新聞、読売新聞、京都新聞 他  
「関節リウマチ 子供発症 仕組み解明」
3. 平成 22 年 11 月 25 日  
毎日新聞、読売新聞、京都新聞 他  
「止血の「引き金」たんぱく質特定」
4. 平成 25 年 7 月 12 日  
京都新聞、中日新聞、日刊工業新聞  
「死んだ細胞に目印つけるタンパク質発見」

③その他

なし

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

②社会還元的な展開活動

該当なし

## § 6 研究期間中の活動

主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2011.5.15-18	13th International TNF Conference	淡路夢舞台 国際会議場	208 人	学会長
2012.3.1	第 14 回早石修 レクチャー	京都大学 芝蘭会館	180 人	主催者



## §7 最後に



平成 24 年 3 月 2 日 アメリカ マサチューセッツ工科大学 Dr. H. Robert Horvitz 教授を研究室に迎えて、Discussion



平成 24 年 11 月 28 日 カナダ トロント大学 Dr. Tak Mak 教授を研究室に迎えて、Discussion