

死にゆく細胞を認識除去する新たな分子機構に関する研究

Studies on a Novel Mechanism of Recognition and Clearance of Dying Cells by Macrophages

代表研究者 東京薬科大学 別府正敏 Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Masatoshi BEPPU

共同研究者 東京薬科大学 平野和也 Tokyo University of Pharmacy and Life Science

Kazuya HIRANO

Cells dying by apoptosis are swiftly ingested by macrophages before they rupture and release injurious and immunogenic contents into the surrounding tissue, and thus clearance of apoptotic cells by macrophages is important in maintaining tissue homeostasis and in tissue remodeling. In a series of studies, we have found a novel mechanism of phagocytic recognition of apoptotic cells that involves cell-surface carbohydrate chains of the apoptotic cells. The outlines of the phagocytic recognition of apoptotic cells including the carbohydrate-mediated novel mechanism are as follows.

1. At an early stage of apoptosis of lymphocytes, glycoprotein molecules (e.g., CD43) on apoptotic cell membrane localize to one pole of the cell and form a large cluster (cap) of the glycoprotein molecules. Macrophages recognize the apoptotic cells at this stage through the carbohydrate chains of the glycoprotein cluster.
2. The glycoprotein cluster gradually disappears from the cell surface in a few hours probably due to proteolytic degradation. Accordingly, the apoptotic cells become less susceptible to the macrophage recognition.
3. In contrast, phosphatidylserine (PS) exposure becomes observable around this time and increases thereafter. Susceptibility of the apoptotic cells to macrophage recognition increases again as PS exposure increases.

Furthermore, the macrophage receptor involved in the carbohydrate-mediated recognition of the early apoptotic cells was identified to be a 110 kDa protein that is known to be usually present in nuclei.

研究目的

生体内では、アポトーシスによる死細胞、損傷細胞、老化細胞などが常に発生しているが、これらの細胞は細胞が崩壊して周辺組織にダメージや悪影響を与える前に、マクロファージなどの貪食性細胞によって特異的に認識され、貪食によって安全に除去される。生体が持つこのような不要細胞や有害細胞に対する特異的除去機能は、生体恒常性の維持、組織の再構築、損傷組織の修復において極めて重要であると考えられている。

筆者らは、酸化ストレスにより損傷を受けた赤血球、好中球、リンパ球などがマクロファージにより特異的に認識除去されることを見出し、その認識にはこれらの酸化細胞表面の糖鎖、とりわけシアル酸を持つポリラクトサミン型糖鎖が関与していることを明らかにしてきた。また、細胞表面糖鎖が細胞の酸化に伴いマクロファージに認識されるようになる機構として、細胞酸化が細胞膜糖タンパク質（赤血球では Band 3、白血球では CD43 抗原）の凝集（クラスタリング）を引き起こし、その結果、細胞表面に形成される糖タンパク質糖鎖のクラスターがマクロファージ表面のレクチン様レセプ

ターにより認識されるのであろうと推定してきた。また、酸化とは無関係にアポトーシスを起こした細胞も全く同様の糖鎖認識によりアポトーシスの早期に認識され、貪食除去されることを見いだした。

一方、マクロファージ表面に存在すると予想されるこの糖鎖認識に関わるレクチン様レセプターの候補分子として分子量 50kDa のタンパク質 (p50) をマクロファージ細胞膜画分から糖鎖に対するアフィニティークロマトグラフィーにより単離した。

本研究では、これまでに得た以上の知見を踏まえて、アポトーシス初期細胞の糖鎖を介したマクロファージによる認識機構の基本骨格を分子レベルで解明するために、1) アポトーシスの初期に細胞表面糖タンパク質がクラスターリングし、その糖鎖クラスターを介してマクロファージにより認識されることを証明すること、2) このような糖鎖認識に関わるマクロファージ表面レセプター分子を上記の候補分子 p50 を手がかりとして解明すること、を目指した。

研究経過

1. アポトーシス初期細胞における細胞膜糖タンパク質クラスターリングとその糖鎖を介したマクロファージによる認識

筆者らのこれまでの研究で、ヒト T リンパ球系細胞株 Jurkat を用いてアポトーシスを誘導すると、核変化が起こる以前のアポトーシス初期ステージ (誘導後 2 時間目) においてマクロファージ (ヒト単球系細胞株 THP-1 をマクロファージに分化させた細胞を使用) により認識 (結合および貪食) されやすくなる状態が一過性に現れること、この認識はアポトーシス細胞表面のシアル酸を含むポリラクトサミン型糖鎖に依存すること、がわかっていた。今回の研究では、リンパ球表面の主要シアロ糖タンパク質でありポリラクトサミン型糖鎖をも有する CD43 抗原に対する抗体がアポトーシス Jurkat 細胞と THP-1 マクロファージの結合を阻害したことから、アポトーシス細胞表面でマクロファージに認識されるのは CD43 であることが判明した。アポトーシスを誘導した Jurkat 細胞の細胞表面 CD43 の分布変化を経時的に観察すると、細胞表面の一極に集合する cap 形成 (capping) を一過性に起こしていることが明らかとなった。この一過性の CD43 capping と Jurkat 細胞のマクロファージによる一過性認識のおこるステージが一致したことから、アポトーシス初期に一過性に capping を起こした CD43 の糖鎖がマクロファージによって認識されるリガンド ("eat m signal") であると考えられた。実際、アポトーシス初期 Jurkat 細胞とマクロファージの接着部位に CD43 が局在していることが観察された。

2. 糖鎖を介する認識と Phosphatidylserine (PS) を介する認識との関係

アポトーシス細胞のマクロファージによる認識機構として最もよく知られ、よく研究されているのはアポトーシスに伴って細胞表面に露出した PS を介する機構である。そこで、この認識機構と糖鎖を介する認識機構との関係を、Jurkat 細胞と THP-1 マクロファージの実験系にて経時的に検討した。その結果、1) CD43capping の終息は CD43 の発現量の減少 (分解) によること、2) CD43 の分解が進行し始める頃から PS 露出が始まること、3) PS 露出が十分に進行した頃 (アポトーシス後期) から再びマクロファージにより認識されやすくなること、4) このアポトーシス後期の認識は糖鎖を介さ

ず、PS を介すること、が明らかとなった。以上の結果から、リンパ球がアポトーシスを起こし始めると、その初期に糖鎖を介した認識機構、後期に PS を介した認識機構が働くことが明らかとなった。

3. マウスの脾臓リンパ球と腹腔マクロファージを用いた実験系における糖鎖依存性認識

上述の実験系は、リンパ球、マクロファージのいずれも培養細胞株を用いたものであった。そこで、正常の primary 細胞でも同様な認識機構が働くかどうか確かめるため、マウスの脾臓リンパ球、腹腔マクロファージを用いて、同様な検討を行った。その結果、アポトーシス初期（誘導後 1 時間目）に同様な一過性の糖鎖依存性認識が観察され、アポトーシス後期（誘導後 6 時間目）には多量の PS 露出が観察されるとともに、PS を介する認識が起こることが確認できた。

4. アポトーシス初期細胞の糖鎖依存性認識に関わるマクロファージ細胞膜レセプターの同定

マクロファージ表面には、アポトーシス細胞の糖鎖認識に関わるレクチン様レセプターが存在すると予想される。筆者らは、その候補分子として THP-1 マクロファージの細胞膜から分子量 50kDa のタンパク質 (p50) を単離した。今回、この p50 の N 末端アミノ酸部分配列を解析した結果、このタンパク質は核タンパク質として知られる分子量 110kDa のタンパク質 (p110) である可能性が考えられた。

そこで、まず、この核タンパク質がマクロファージ表面にも存在するかどうかを、p110 の部分アミノ酸配列に対する抗体 (抗 p110 抗体) をプローブとして、フローサイトメトリー、免疫蛍光染色、細胞表面タンパク質のビオチン標識による解析、等にて検討したところ、いずれの方法によっても単球およびマクロファージの細胞表面における p110 の発現が認められた。

また、アポトーシス初期細胞のマクロファージによる認識は抗 p110 抗体により完全に阻害され、p110 がマクロファージ表面でアポトーシス初期細胞の認識に関与していることが示唆された。

p110 のアポトーシス細胞認識機能を直接的に確かめるため、p110 の cDNA を発現ベクターに組み込んで HEK293 細胞に発現させたところ、細胞表面での発現が認められ、発現細胞はアポトーシス初期細胞を糖鎖依存的に認識するようになった。また、この認識は抗 p110 抗体で阻害された。

さらに、p110 の活性フラグメントと推定される truncated 体に相当する cDNA を作製し、発現ベクターに組み込んで大腸菌にて発現させ、可溶性の recombinant p110 フラグメント (rp110) を調製した。rp110 はアポトーシス初期細胞のマクロファージによる認識を阻害し、その阻害活性はポリラクトサミン糖鎖の共存によりキャンセルされた。また、この rp110 のアポトーシス細胞表面における結合分布は CD43 の分布と一致し、CD43 のポリラクトサミン糖鎖に結合して阻害活性を示すことが示唆された。

以上の様々な角度からの検討の結果、アポトーシス初期細胞をその糖鎖を介して認識するマクロファージ細胞表面のレセプターは p110 であるとの結論に至った。

考察

以上の結果より、アポトーシス初期細胞のマクロファージによる糖鎖を介した認識除去の分子機構について、1) アポトーシス細胞表面での糖鎖リガンド生成機構、2) マクロファージ表面レセプター分子の実体解明、の両面から概要を明らかにすることができた。

アポトーシス細胞のマクロファージによる認識機構のうち、これまでに実体がある程度明らかにされてきたのは PS を介した認識機構のみであり、糖鎖を介した認識機構についてはその存在が古くから示唆されていたにもかかわらず、リガンド、レセプター共に実体は不明のままであった。本研究は、アポトーシス細胞の糖鎖を介する認識機構の概要を分子レベルで明らかにした最初のケースといえる。

今回得られた知見で興味深いことは、従来、アポトーシスの比較的初期に起こるとされていた PS の露出とそれを介したマクロファージによる認識除去よりも、さらに早いステージで糖鎖を介した認識機構が働くという点である。このように、異なるステージで異なるメカニズムにより働く二段構えの認識機構によって、生体に発生するアポトーシス細胞は確実に除去されているのであろうと思われる。

本研究結果を受けて今後取り組むべき課題としては、1) アポトーシス初期細胞膜における CD43 抗原 capping のメカニズム解明、2) In vivo における本糖鎖認識機構の生理的意義の実証、3) マクロファージによるアポトーシス細胞除去における本糖鎖認識機構の寄与の度合いの評価、などがあり、今後、これらの検討を続けていく予定である。

研究発表

口頭発表

1. 伊藤隆司, 林 明子, 三木雄一, 別府正敏: 酸化ストレスによる細胞のアポトーシス誘導とマクロファージによる糖鎖依存性認識除去、第 9 回日本臓器保存生物医学会総会 (東京、2002 年 5 月)
2. 山中将敬, 中野恭明, 別府正敏: Fas 経路で誘導されたアポトーシス細胞のマクロファージによる糖鎖依存性認識、第 3 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム (東京、2002 年 6 月)
3. T. Itoh, A. Hayashi, S. Eda, Y. Miki, and M. Beppu: Involvement of apoptosis in carbohydrate-mediated recognition of oxidized T-cells by macrophages, XIth Biennial Meeting of the Society for Free Radical Research International (Paris, 2002.7)
4. 別府正敏: アポトーシス細胞のマクロファージによる糖鎖依存性認識機構、第 46 回日本薬学会関東支部大会 シンポジウム (東京、2002 年 10 月)
5. 三木雄一, 伊藤隆司, 林 明子, 別府正敏: 細胞の酸化的傷害とマクロファージによる認識除去の関係、第 75 回日本生化学会大会 (京都、2002 年 10 月)
6. 山中将敬, 中野恭明, 別府正敏: Fas 経路アポトーシス細胞のマクロファージによる糖鎖依存性認識、第 75 回日本生化学会大会 (京都、2002 年 10 月)
7. Kazuya Hirano, Yuichi Miki, Takashi Itoh, Akiko Hayashi, Rena Fukuyama, Yuriko Hirai, Masahiro Yamanaka, Shigetoshi Eda, and Masatoshi Beppu: A macrophage-surface lectin-like protein involved in the recognition of oxidized and apoptotic cells, XVII International Symposium on Glycoconjugates (Bangalore,

2003.1)

8. Masatoshi Beppu, Masahiro Yamanaka, and Yasuaki Nakano: Carbohydrate-mediated recognition of anti-Fas antibody-induced apoptotic cells by macrophages, XVII International Symposium on Glycoconjugates (Bangalore, 2003.1)
9. Masatoshi Beppu, Masahiro Yamanaka, Shigetoshi Eda, Kazuya Hirano, Yuichi Miki, and Takashi Itoh: Carbohydrate-mediated recognition of early apoptotic cells by macrophages: Role of glycoprotein clustering on apoptotic cells, Gordon Research Conference 2003: Clearance of Apoptotic Cells by Phagocytes (New London, 2003.8)
10. 中野 恭明, 山中 将敬, 別府 正敏: アポトーシス早期マウス脾臓リンパ球のマクロファージによる認識機構の解析、第 46 回日本薬学会関東支部大会 (東京、2003 年 10 月)
11. 佐藤 瑠美, 林 明子, 平野 和也, 別府 正敏: アポトーシス細胞認識に関わるマクロファージレクチン様候補分子の細胞表面における検出、第 46 回日本薬学会関東支部大会 (東京、2003 年 10 月)
12. 平井 由梨子, 三木 雄一, 平野 和也, 別府 正敏: アポトーシス細胞認識に関わるマクロファージレクチン様候補分子の細胞表面発現細胞を用いた機能解析、第 46 回日本薬学会関東支部大会 (東京、2003 年 10 月)
13. Masatoshi Beppu: Carbohydrate-mediated recognition of dying cells at an early stage of apoptosis by macrophages, 第 76 回日本生化学会大会 シンポジウム (横浜、2003 年 10 月)
14. Rumi Sato, Akiko Hayashi, Kazuya Hirano, and Masatoshi Beppu: A macrophage receptor for the carbohydrate-mediated recognition of apoptotic cells: presence of a candidate protein on the cell surface、第 76 回日本生化学会大会 (横浜、2003 年 10 月)
15. Yuriko Hirai, Yuichi Miki, Kazuya Hirano, and Masatoshi Beppu: A macrophage receptor for the carbohydrate-mediated recognition of apoptotic cells: recognition by the cells expressing candidate protein、第 76 回日本生化学会大会 (横浜、2003 年 10 月)
16. Yuichi Miki, Takashi Itoh, Kazuya Hirano, and Masatoshi Beppu: A macrophage receptor for the carbohydrate-mediated recognition of apoptotic cells: recognition by a soluble recombinant of a candidate protein、第 76 回日本生化学会大会 (横浜、2003 年 10 月)

誌上発表

1. Shigetoshi Eda, Masahiro Yamanaka, and Masatoshi Beppu: Carbohydrate-mediated phagocytic recognition of early apoptotic cells undergoing transient capping of CD43 glycoprotein, *J. Biol. Chem.*, 279, 5967-5974 (2004)