

京都大学	博士（医学）	氏 名	宮西 正憲
論文題目	Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor (Tim4 をホスファチジルセリン受容体として同定)		
(論文内容の要旨)			
生体内では、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速やかに貪食され、死細胞から有害な物質が放出されるのを防いでいる。アポトーシス細胞の表面にはホスファチジルセリンが露出され、貪食に対する「eat me」シグナルとして作用する。ところで、生体内の各臓器には、臓器特異的なマクロファージが存在する。しかし、これら組織（在住）マクロファージが生理的条件下で、こういった分子を介して貪食しているかについては不明な点が多い。本研究では、これら組織マクロファージの一つである、腹腔在住マクロファージに焦点をあて、その貪食機構を明らかにすることを目的とする。 マウス腹腔マクロファージに対するハムスターモノクローナル抗体ライブラリーを作成し、この中からホスファチジルセリンに依存したアポトーシス細胞の貪食を強く阻害する抗体を見出した。次いで、発現クローニング法により、この抗体が認識する抗原が Tim4 (T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule 4) と呼ばれる I 型膜貫通タンパク質であることを同定した。マウス各組織より RNA を調製し、Tim4 の発現を検討したところ、胸腺、脾臓、リンパ節といったリンパ系組織での有意な発現を確認した。さらに胎仔肝臓、脾臓、リンパ節から調製した細胞を、Mac-1 陽性および陰性細胞に分画したところ、全てにおいて Mac-1 陽性細胞にのみ Tim4 遺伝子が発現していた。これらのことより、Tim4 はリンパ系組織において、マクロファージによるアポトーシス細胞のクリアランスに関与していると考えられる。ついで生体内での Tim4 の機能を明らかにするため、Tim4 に対する阻害抗体をマウスに投与し、貪食が抑制されているかを確認した。デキサメサゾン投与により胸腺内に一過性に大量のアポトーシスを誘導した所、阻害抗体投与群では、貪食されるアポトーシス細胞数が有意に減少することを確認した。さらに阻害抗体を投与した群ではコントロール群と比較し、血清中の ds-DNA、カルジオリピンに対する自己抗体が顕著に増加する結果が得られた。これらのことは、Tim4 を介した貪食機構が生体内に存在し、その破綻が自己免疫疾患等の発症に寄与しうることを示している。 ところで、腹腔在住マクロファージはアポトーシス細胞をホスファチジルセリン依存的に貪食する。そこで、今回同定した Tim4 がアポトーシス細胞表面上に露出したホスファチジルセリンを特異的に認識しうるかを検討した。その結果、解離定数 (Kd) 約 2nM の強い結合能をもって、ホスファチジルセリンに結合すること、他のリン脂質とはほとんど結合しないことが示された。またキメラ蛋白を用いた実験より、Tim4 の N 末端に存在する immunoglobulin 様ドメインにホスファチジルセリン結合サイトが存在することが明らかになった。 Tim ファミリーに属する他の分子の中では、NIH 3T3 を貪食細胞に用いた系では Tim1 が Tim4 同様にアポトーシス細胞の貪食を亢進し、Tim1 もホスファチジルセリンを特異的に認識することが明らかとなった。また Tim1 あるいは Tim4 を発現する Ba/F3 B 細胞には、ホスファチジルセリンを介してエキソソームが結合し、エキソソームは Tim1 と Tim4 の結合を促進した。これらの結果は、Tim4 と Tim1 がアポトーシス細胞を貪食するためのホスファチジルセリン受容体であり、また、エキソソームが関与する細胞間シグナル伝達にも関わっている可能性を示している。			

（論文審査の結果の要旨） アポトーシス細胞の貪食は、生体内での恒常性の維持に必須であるが、その詳細はまだ不明な点が多い。本研究では、マウス腹腔在住マクロファージによるアポトーシス細胞の貪食を抑制するモノクローナル抗体を樹立し、その抗体が認識する分子を発現クローニング法により同定した。同定した分子Tim4は、I型膜貫通タンパク質であり、マウス線維芽細胞に発現させると、その細胞はアポトーシス細胞を効率よく貪食した。またTim4は細胞外IgVドメインを介してホスファチジルセリンに特異的かつ強固（解離定数2nM）に結合することが示された。Tim4は、胸腺、脾臓、リンパ節といったリンパ系組織のMac-1陽性画分にのみ発現されていたことから、これらの組織におけるマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食に寄与しているものと考えられる。実際、中和抗体をマウスに投与すると、胸腺においてアポトーシス細胞の貪食抑制が観察され、また血清中のds-DNA、カルジオリピンに対する抗体が顕著に増加する結果が得られた。これらのことは、Tim4を介したアポトーシス細胞の貪食機構の破綻が自己免疫疾患の発症に寄与しうることを示している。以上の研究はアポトーシス細胞の貪食機構の解明に貢献し、アポトーシス細胞の貪食不全による自己免疫疾患の発症機序の解明に寄与するところが多いと考えうる。 したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 1 月 6 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			