

であることが示された。ヒトにおいて血中PAI-1濃度と脂肪分布の関連を調べたところ、血中PAI-1値は内臓脂肪面積と正相関を示すが、皮下脂肪面積とは相関しないことが明らかになった⁴⁾。以上の知見から、内臓脂肪から直接分泌されるPAI-1が血中レベルに影響を与え、血栓性疾患の発症に関与するという、内臓脂肪蓄積と血管病変をつなぐ新たな道(adipo-vascular axis)の存在が明らかになった。また、最近、高脂肪食負荷による肥満・インスリン抵抗性の出現に対してPAI-1欠損マウスが抵抗性であること⁵⁾、PAI-1がインスリンシグナルを抑制することが報告され⁶⁾、肥満時の血中PAI-1レベルの上昇は肥満・インスリン抵抗性の病態発症そのものにかかわっている可能性もあり、興味深い。

2) Tumor necrosis factor (TNF)- α

Spiegelmanら⁷⁾は遺伝性肥満動物の脂肪組織におけるサイトカイン遺伝子発現において、腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor : TNF)- α が著明に増加していることを見出した。これら動物にTNF- α の中和抗体を投与したところ、インスリン抵抗性・糖尿病の改善がみられた。脂肪細胞や肝細胞においてTNF- α は、スフィンゴミエリナーゼの活性化を介して、インスリン受容体の基質であるインスリン受容体基質(insulin receptor substrate : IRS)-1のセリン残基をリン酸化し、チロシン残基のリン酸化を抑制することで、インスリン作用を減弱させる⁸⁾。蓄積した脂肪組織より分泌されたTNF- α が筋肉、脂肪組織、肝臓での糖利用亢進を抑制し、インスリン抵抗性を介して、糖・脂質代謝異常をもたらすと考えられている。また、TNF- α は後述するアディポネクチンの遺伝子転写を抑制することによりアディポネクチンの産生・分泌を減少させる作用を有する(アディポネクチンの項参照)⁹⁾¹⁰⁾。さらに、TNF- α 、インターロイキン(IL)-1を介して核内で増えたNF- κ Bが、直接 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ に作用し、その転写活性を不活性化することが⁸⁾、脂肪細胞分化抑制につながる事が明らかとなった¹¹⁾。TNF- α 、IL-1のような肥大脂肪細胞から産生・分泌される因子が、未分化細胞の脂肪細胞への分化を抑制するという点は、アディポサイトカインが脂肪組織そのものに作用して代謝の恒常性・病態にかかわるこ

とを示唆しており、興味深い。

3) レプチン

Friedmanら¹²⁾は肥満の遺伝的基盤を明らかにするため、ポジショナル・クローニングを用いて遺伝性肥満マウスの原因遺伝子の単離を試み、脂肪組織特異的な分泌蛋白質で、脂肪蓄積とともに脂肪細胞より分泌されるレプチンを同定した。その作用はおもに視床下部食欲中枢に作用し、食欲の抑制作用、エネルギー消費増強作用を介して、体重を減少させる。全身性脂肪萎縮症モデルマウスやレプチン欠損マウス(ob/ob)において認められるレプチンの欠乏は、糖・脂質代謝異常を招き、重篤なインスリン抵抗性、糖尿病、脂肪肝、高脂血症を発症するが、レプチン補充にて、改善もしくは正常化する¹³⁾。レプチンの全身性脂肪萎縮症への有効性はすでにヒトにおいても証明され、糖尿病、高脂血症、脂肪肝の劇的な改善に至っている¹⁴⁾。その作用機序として、レプチン欠乏が引き起こす慢性的な高インスリン血症が、肝臓の脂肪酸・中性脂肪合成を上昇させる転写因子SREBP-1cを上昇させ、脂肪肝、高脂血症を引き起こすこと、高インスリン血症が肝臓の糖代謝に重要なアダプター蛋白IRS-2の絶対量を減少させることでインスリン抵抗性を引き起こし、定常的に糖の産生・放出が上昇し高血糖へとつながることが考えられている¹⁵⁾。また、レプチンには交感神経系を介した昇圧作用があり、肥満時には脂肪組織からのレプチン産生が上昇することから、肥満者の高血圧には高レプチン血症の関与が考えられる。さらに、レプチンは視床下部—交感神経系を介して、かつ骨格筋に直接作用して、骨格筋での脂肪酸酸化を亢進させることが報告され¹⁶⁾、この作用がAMP-activated protein kinase (AMPK)を介して惹起されることを見出し、Leptin-AMPK axisが骨格筋におけるエネルギー消費の重要な制御機構であることを示した。レプチンは、骨代謝に及ぼす作用も報告されている。中枢性に骨形成を抑制すること¹⁷⁾、逆に、骨芽細胞に直接作用して、石灰化や増殖分化を促進すること¹⁸⁾¹⁹⁾や破骨細胞前駆細胞に作用してその分化を抑制することなどが報告されている²⁰⁾。

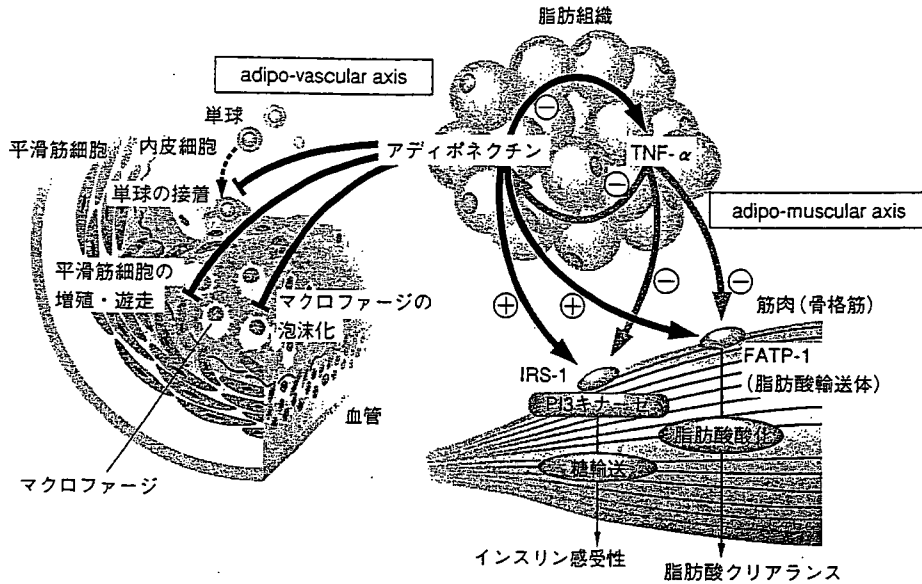


図3 アディポネクチンの作用(adipo-vascular, adipo-muscular axis)

4) アディポネクチン

a. アディポネクチンの発見と血中濃度変化

アディポネクチンは、Body map project²¹⁾におけるヒト脂肪組織遺伝子ライブラリーに最も頻回に出現し、脂肪組織特異的に発現した遺伝子adipose most abundant gene transcript 1(apM1)の産物である²²⁾。血中アディポネクチン濃度は5~30 μg/mlと高濃度に存在し、肥満者や男性において低下し、減量によって増加する²³⁾²⁴⁾。さらに、心筋梗塞や狭心症といった動脈硬化性疾患、糖尿病で低下する²⁵⁾²⁶⁾ (図3)。

b. アディポネクチンの抗動脈硬化作用 (adipo-vascular axis)

アディポネクチンは、血管内皮細胞においてTNF-α依存性に上昇する接着分子VCAM-1, ICAM-1, E-セレクチンの発現を抑制し、血管内皮細胞と単球との接着を阻害する²⁵⁾。また、マクロファージの泡沫化や血管平滑筋細胞の増殖を抑制する²⁷⁾²⁸⁾。これらはアディポネクチンが抗動脈硬化ホルモンであることを示す。

最近報告されたcase-control studyでは、入院時急性心筋梗塞や急性冠症候群と診断された症例は、安定型狭心症と診断された症例にくらべ、血中アディポネクチン濃度が有意に低値であり²⁹⁾、マクロファージにアディポネ

クチンを添加したところ、プラーク攻撃因子であるmatrix metalloproteinase-9(MMP-9)の発現は変化しないが、これに拮抗する防御因子であるtissue inhibitor of metalloproteinase-1(TIMP-1)の著明な増加がみられた。これは、アディポネクチンが動脈硬化の発症進展を抑制するだけでなく、プラーク破綻に対しても抑制的に作用していることを示唆する³⁰⁾。

c. アディポネクチンの抗糖尿病作用(インスリン感受性増強作用)

血中アディポネクチン濃度は全身のインスリン感受性と強く相関する³¹⁾。アディポネクチンは、筋肉細胞にはたらいて、IRS-1シグナリングを介したPI3-kinaseの活性および糖輸送を上昇させ、インスリン感受性を増強させる。さらに、アディポネクチンは脂肪酸輸送蛋白1型(fatty acid transport protein 1:FATP-1)の遺伝子発現増強を介して脂肪酸の酸化およびクリアランスを高め、インスリン感受性を上昇させる³²⁾。そして、脂肪蓄積で脂肪組織より過分泌されるTNF-αは同経路に作用してアディポネクチンと逆の作用を示す。一方、アディポネクチンとTNF-αは、互いの作用を抑制しあうだけでなく、その産生場所である脂肪組織において転写レベルでの調節によりお互いの産生を抑制しあうことがわかった。つまり、

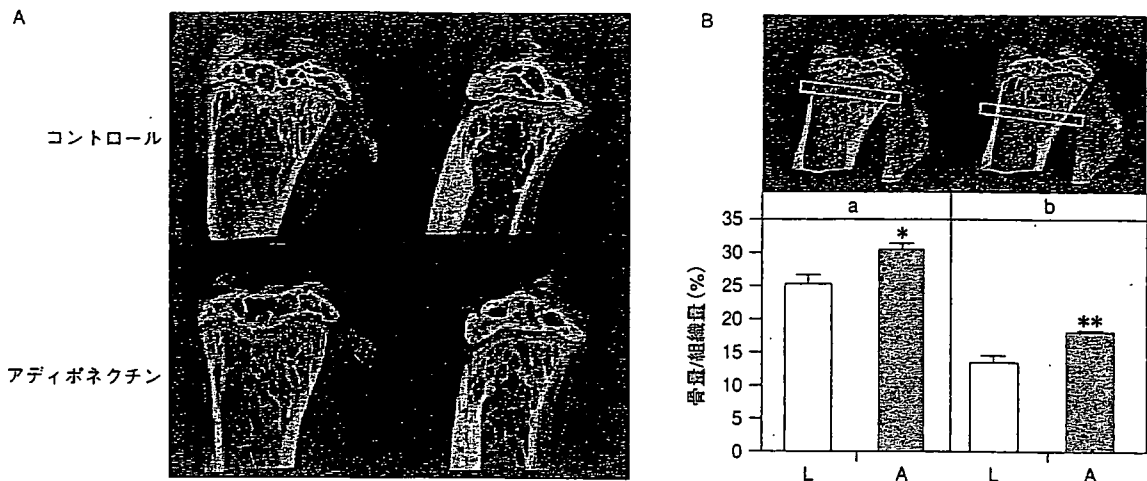


図4 アデノウイルスを用いたアディポネクチン強発現マウスの3D- μ CT解析
 A: 3D- μ CT画像. B: 海綿骨量(脛骨), 成長板より50~250 μ m(a), 500~700 μ m(b)の領域. L:コントロール, A: アディポネクチン.

アディポネクチンは、インスリン抵抗性惹起因子であるTNF- α の産生と機能を抑制する。実際、糖尿病モデルマウスにアディポネクチンを補充すると血糖値が下がることが報告され³³⁾³⁴⁾、アディポネクチンのインスリン抵抗性改善作用は、骨格筋、肝臓で脂肪酸酸化に重要なはたらきをしているAMP kinaseを介したものであることが明らかにされた³⁵⁾。

d. 遺伝的低アディポネクチン血症からの知見

アディポネクチン欠損マウスは、高脂肪・高シヨ糖食2週間負荷にて、強いインスリン抵抗性・糖尿病を呈し、アデノウイルスによる血中アディポネクチン補充により野生型レベルまで改善した³²⁾。血管病変については³⁶⁾、大腿動脈擦過後の血管内膜平滑筋の増殖すなわち内膜肥厚の進行を認めるも、補充にて野生型レベルまで改善した。アディポネクチン欠損マウスは、外観上正常と変わらないが、環境負荷や傷害に対して強く反応が起こるといふ、生体侵襲に対する防御因子としての本分子の一面がうかがえる。

現在までヒトにおいて本分子を完全に欠損する遺伝子異常は報告されていないが、興味深いのは、血中アディポネクチン濃度の低下を伴うI164T変異で、耐糖能異常、高脂血症、高血圧や動脈硬化疾患を高率に合併し、まさにメタボリックシンドロームの表現型を示す³⁷⁾ことである。

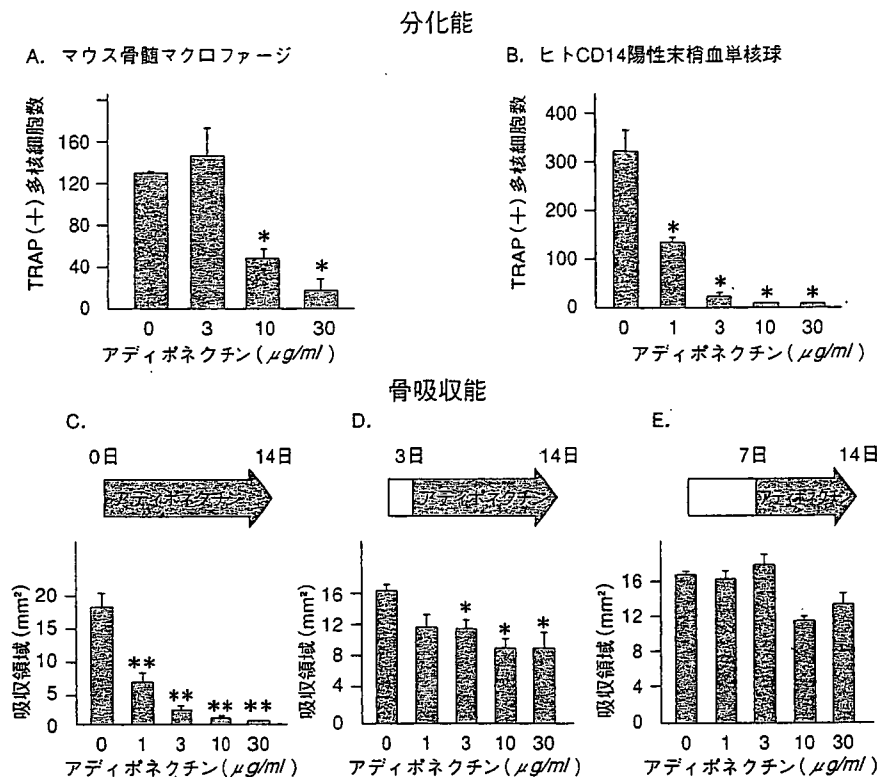
e. 炎症、高血圧、肝線維症-生活習慣による多彩な病態への関与

近年、動脈硬化疾患や2型糖尿病発症の基盤として、炎症が注目されている。アディポネクチンはTNF- α 分泌を介して炎症と関連するが、血中high sensitive CRP (hsCRP)濃度はアディポネクチン濃度と弱い逆相関関係にある。アディポネクチン欠損マウスでは脂肪組織CRP発現量が増加しており³⁸⁾、この組織が多くの補体分子を発現していることから、過栄養に対するバッファー機能のみでなく、炎症に対する防御機能を有していると考えられる。

高血圧はメタボリックシンドロームの重要な病態である。一般集団で血中アディポネクチンとの相関関係をみると、HDLコレステロール、トリグリセリド濃度やインスリン抵抗性指標にくらべ、血圧との関連は低い。しかし、本態性高血圧群をみると血中アディポネクチン濃度は血圧と逆相関する。アディポネクチン欠損マウスに高脂肪高食塩負荷をおこなうと、血管内皮機能が障害され血圧は上昇する³⁹⁾。アディポネクチンは、血管内皮機能を介し高血圧へも関与していると考えられる。

動脈硬化は一種の過剰な創傷治療反応である。アディポネクチン欠損マウスに四塩化炭素を投与した肝臓障害実験では⁴⁰⁾、野生型にくらべて著明な肝線維化が起こり、線維合成にあずかる肝星細胞(α -smooth muscle actin陽

破骨細胞に対する作用



骨芽細胞に対する作用

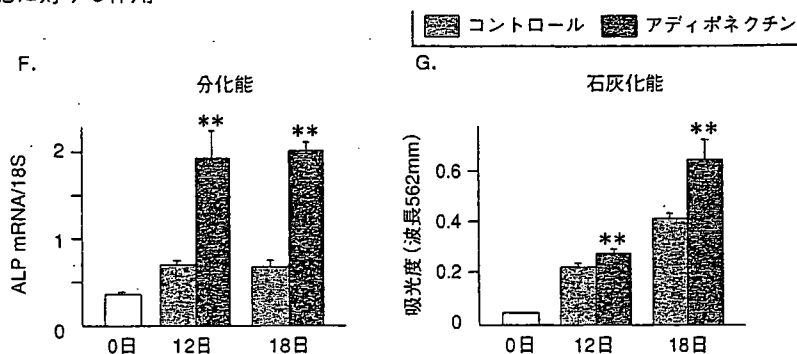


図5 培養細胞に対するアディポネクチンの作用
 アディポネクチンによる破骨細胞の分化(A, B)・活性化(C, D, E)抑制作用および骨芽細胞の分化(F)・活性化(G)促進作用を示す。
 A-E: 誘導破骨細胞初代培養(マウスおよびヒト細胞), F-G: 誘導骨芽細胞培養(MC3T3-E1細胞), TRAP: 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ, ALP: アルカリホスファターゼ。
 Studentのt検定によるP値: *p<0.05, **p<0.01。

性細胞)が活性化され, TGF-β1, connective tissue growth factorなどの線維化関連遺伝子の発現が上昇していた。

f. アディポネクチンの骨代謝に及ぼす影響

アディポネクチンレセプターが同定され, その発現がユビキタスであったことから, レプチンのみならずアディ

ポネクチンも骨代謝に何らかの影響を及ぼすことが容易に想像された。最近, *in vivo*の検討にて, アデノウイルスを用いたアディポネクチン強発現マウスの海綿骨量が著明に増加し, 破骨細胞数の減少とNTxの減少を伴うことが明らかとなり⁴¹⁾, *in vitro*では, アディポネクチンが

破骨細胞の分化, 吸収活性を抑制すること, 骨芽細胞の分化, 石灰化を促進することが明らかにされた⁴¹⁾ (図④, ⑤). また, 骨芽細胞の増殖・分化促進作用は, MAPK シグナルを介したものであることがわかった⁴²⁾.



おわりに

近年における臨床的, 基礎的両側面からの研究アプローチにより, メタボリックシンドロームの発症基盤として, 脂肪組織, とくに内臓脂肪蓄積の意義は確立した. 今後, 内臓脂肪蓄積とそれに引き続くアディポサイトカイン産生・分泌異常を病態マーカーとして早期にとらえ, 治療標的として臨床応用することが, 個々のリスクファクターに対する治療を超えたメタボリックシンドロームの包括的な予防および治療につながると考えられる.



文 献

- 1) Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M *et al* : Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat : possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* 2 : 800-803, 1996
- 2) Sawdey MS, Loskutoff DJ : Regulation of murine type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression *in vivo*. Tissue specificity and induction by lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and transforming growth factor-beta. *J Clin Invest* 88 : 1346-1353, 1991
- 3) Lundgren CH, Brown SL, Nordt TK *et al* : Elaboration of type-1 plasminogen activator inhibitor from adipocytes. A potential pathogenetic link between obesity and cardiovascular disease. *Circulation* 93 : 106-110, 1996
- 4) Landin K, Stigendal L, Eriksson E *et al* : Abdominal obesity is associated with an impaired fibrinolytic activity and elevated plasminogen activator inhibitor-1. *Metabolism* 39 : 1044-1048, 1990
- 5) Ma LJ, Mao SL, Taylor KL *et al* : Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 53 : 336-346, 2004
- 6) Lopez-Alemayn R, Redondo JM, Nagamine Y *et al* : Plasminogen activator inhibitor type-1 inhibits insulin signaling by competing with alphavbeta3 integrin for vitronectin binding. *Eur J Biochem* 270 : 814-821, 2003
- 7) Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM *et al* : Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259 : 87-91, 1993
- 8) Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A *et al* : IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 271 : 665-668, 1996
- 9) Maeda N, Takahashi M, Funahashi T *et al* : PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes* 50 : 2094-2099, 2001
- 10) Ruan H, Hacoen N, Golub TR *et al* : Tumor necrosis factor-alpha suppresses adipocyte-specific genes and activates expression of preadipocyte genes in 3T3-L1 adipocytes : nuclear factor-kappaB activation by TNF-alpha is obligatory. *Diabetes* 51 : 1319-1336, 2002
- 11) Suzuwa M, Takada I, Yanagisawa J *et al* : Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nat Cell Biol* 5 : 224-230, 2003
- 12) Zhang Y, Proenca R, Maffei M *et al* : Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372 : 425-432, 1994
- 13) Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S *et al* : Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401 : 73-76, 1999
- 14) Oral EA, Simha V, Ruiz E *et al* : Leptin-replacement therapy for lipodystrophy. *N Engl J Med* 346 : 570-578, 2002
- 15) Shimomura I, Matsuda M, Hammer RE *et al* : Decreased IRS-2 and increased SREBP-1c lead to mixed insulin resistance and sensitivity in livers of lipodystrophic and ob/ob mice. *Mol Cell* 6 : 77-86, 2000
- 16) Minokoshi Y, Kim YB, Peroni OD *et al* : Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nature* 415 : 339-343, 2002
- 17) Ducy P, Amling M, Takeda S *et al* : Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay : a central control of bone mass. *Cell* 100 : 197-207, 2000
- 18) Thomas T, Gori F, Khosla S *et al* : Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology* 140 : 1630-1638, 1999
- 19) Reseland JE, Syversen U, Bakke I *et al* : Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization. *J Bone Miner Res* 16 : 1426-1433, 2001
- 20) Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ *et al* : Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 17 : 200-209, 2002
- 21) Maeda K, Okubo K, Shimomura I *et al* : Analysis of an expression profile of genes in the human adipose tissue. *Gene*

- 190 : 227-235, 1997
- 22) Maeda K, Okubo K, Shimomura I *et al* : cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun* 221 : 286-289, 1996
 - 23) Arita Y, Kihara S, Ouchi N *et al* : Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun* 257 : 79-83, 1999
 - 24) Nishizawa H, Shimomura I, Kishida K *et al* : Androgens decrease plasma adiponectin, an insulin-sensitizing adipocyte-derived protein. *Diabetes* 51 : 2734-2741, 2002
 - 25) Ouchi N, Kihara S, Akita Y *et al* : Novel modulator for endothelial adhesion molecules : adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation* 100 : 2473-2476, 1999
 - 26) Hotta K, Funahashi T, Arita Y *et al* : Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20 : 1595-1599, 2000
 - 27) Ouchi N, Kihara S, Akita Y *et al* : Adipocyte-derived plasma protein, adiponectin, suppresses lipid accumulation and class A scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages. *Circulation* 103 : 1057-1063, 2001
 - 28) Arita Y, Kihara S, Ouchi N *et al* : Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. *Circulation* 105 : 2893-2898, 2002
 - 29) Nakamura Y, Shimada K, Fukuda D *et al* : Implications of plasma concentrations of adiponectin in patients with coronary artery disease. *Heart* 90 : 528-533, 2004
 - 30) Kumada M, Kihara S, Ouchi N *et al* : Adiponectin specifically increased tissue inhibitor of metalloproteinase-1 through interleukin-10 expression in human macrophages. *Circulation* 109 : 2046-2049, 2004
 - 31) Weyer C, Funahashi T, Tanaka S *et al* : Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes : close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. *J Clin Endocrinol Metab* 86 : 1930-1935, 2001
 - 32) Maeda N, Shimomura I, Kishida K *et al* : Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8 : 731-737, 2002
 - 33) Yamauchi T, Kamon J, Waki H *et al* : The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med* 7 : 941-946, 2001
 - 34) Berg AH, Combs TP, Du X *et al* : The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med* 7 : 947-953, 2001
 - 35) Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y *et al* : Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8 : 1288-1295, 2002
 - 36) Matsuda M, Shimomura I, Sata M *et al* : Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipovascular axis. *J Biol Chem* 277 : 37487-37491, 2002
 - 37) Kondo H, Shimomura I, Matsukawa Y *et al* : Association of adiponectin mutation with type 2 diabetes : a candidate gene for the insulin resistance syndrome. *Diabetes* 51 : 2325-2328, 2002
 - 38) Ouchi N, Kihara S, Funahashi T *et al* : Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue. *Circulation* 107 : 671-674, 2003
 - 39) Ouchi N, Ohishi M, Kihara S *et al* : Association of hypoadiponectinemia with impaired vasoreactivity. *Hypertension* 42 : 231-234, 2003
 - 40) Kamada Y, Tamura S, Kiso S *et al* : Enhanced carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice lacking adiponectin. *Gastroenterology* 125 : 1796-1807, 2003
 - 41) Oshima K, Nampei A, Matsuda M *et al* : Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 331 : 520-526, 2005
 - 42) Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ *et al* : Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 309 : 99-109, 2005

第2章 骨代謝の基礎

肥満とカルシウム骨代謝*

大島和也**
下村伊一郎**、***
船橋 徹***

Key Words : obesity, bone metabolism, adipocytokine, mechanical stress, fracture

はじめに

臨床的に、肥満すなわち体重による力学的負荷が骨量と相関があることは広く知られているが¹⁾、肥満による脂肪組織増大やエネルギー代謝変化による生理活性物質の分泌変化が骨代謝にどのような影響を及ぼしているかはいまだ一定の見解を得ていない。しかし、脂肪組織が内分泌臓器であるという概念が提唱されて以降、脂肪組織、肥満と骨代謝に関する研究が急速に進められている。

肥満と骨代謝の関与

肥満と骨代謝に関与すると考えられる因子は物理学的因子と液性因子の2つに分けられる。物理学的因子とは体重など骨への機械的刺激による力学的負荷であり、液性因子とは脂肪組織由来生理活性物質(アディポサイトカイン)、脂肪組織で代謝されるエストロゲン、膵β細胞由来生理活性物質であるインスリンなどである。そして、体重や筋肉量の増加による骨への機械的刺激により皮質骨の肥厚や骨サイズの増大が生じ、ホルモンやサイトカインなどの液性因子に

より海綿骨量の増加が生じると考えられている。

肥満は加齢に伴う骨喪失率が低く、体重増加に伴い骨量が多くなることが一般的に知られている。また、成長期や思春期の肥満は骨密度の上昇、骨サイズの増大をひき起こすことが報告され、逆に、骨粗鬆症のスクリーニングで、やせは重要な危険因子になることが報告されている。

最近の臨床研究では、肥満による骨量増大には性差があり、男性ではlean body massの増加が、女性ではfat massおよびlean body massの増加が重要であると報告されている。また、最近の基礎研究では、脂肪組織から分泌されるレプチンやアディポネクチンなどのアディポサイトカインが骨に対して直接作用を有することが明らかとなった。

1. 力学的負荷

骨は主にコラーゲンからなる有機基質とリン酸カルシウムを主体とする無機質からなる生体の支持組織であり、重力に抗した姿勢の保持や運動機能の維持の役割を果たしている。このため、骨はその各部位に負荷される外力に応じて外形および内部構造の形態を変化させている。同時に、骨は生体のカルシウムの99%以上を含有する巨大なカルシウム貯蔵庫として、体液中のカルシウム濃度の保持に関与している。すなわち、血中カルシウム濃度の低下に伴い副甲状腺

* Obesity and bone metabolism.

** Kazuya OSHIMA, M.D. & Ichiro SHIMOMURA, M.D., Ph.D.: 大阪大学大学院医学系研究科病態制御医学病理学(修士)病理病態学[〒565-0871 吹田市山田丘2-2]; Department of Medicine and Pathophysiology, Graduate School of Medicine, Osaka University, Suita 565-0871, JAPAN

*** Tooru FUNAHASHI, M.D., Ph.D.: 大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学内科学内分泌代謝内科学

ホルモン(PTH)の分泌が増加し、骨に蓄積されたカルシウムが血中に溶出され、骨吸収が起こる。さらに、PTHにより産生される $1,25-(OH)_2D_3$ の働きでカルシウム結合蛋白質の合成が増加し、腸管からのカルシウム吸収が促進され、再び骨にカルシウムが補充され、骨形成が起こる。つまり、骨は外力に応じて形態を変化させ強度を維持しながら、血中カルシウム濃度を保持するための貯蔵庫として働き、必要に応じてカルシウムを体液中に供給するという機能をもつ。このため、骨は単なる剛体ではなく、力学的負荷の少ない部位では骨吸収が優位となり、強度を保つ必要のある部位では骨形成が優位となるように、常にリモデリングを繰り返している。

これまでに、体重と骨量の間には正の相関関係があることが知られ、肥満により体重が力学的負荷となることで骨量は増加し、逆に、長期臥床や宇宙船内での微小重力環境により骨量は減少する(不動性骨粗鬆症)とされている。また、閉経後女性において、肥満は骨量低下を予防する効果があり²⁾、脂肪組織量は骨密度に正の相関関係を認めている³⁾。

力学的負荷がどのように骨量増加をひき起こすかは不明な点が多く、骨芽細胞、破骨細胞または骨細胞の力学的負荷の感知方法やシグナル伝達は解明されていない。骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞による感知方法として、骨微小管内液流変化によるfluid shear stressや細胞の伸展刺激、静水圧などがあげられ、力学的負荷による細胞内シグナル伝達として、細胞膜上のストレス感受性陽イオンチャンネルを介したチロシンキナーゼ活性化やインテグリンの関与の報告がある。

2. サイトカイン

加齢に伴い骨粗鬆症が進行し骨量が減少する一方で、骨髄脂肪細胞は逆に増加する⁴⁾。骨芽細胞と脂肪細胞はともに骨髄に存在する共通の未分化間葉系幹細胞から分化することが知られ⁵⁾、この2つの細胞への分化のスイッチングにはかなりの可塑性が存在するとされるが、分子メカニズムに関してはよくわかっていない。

脂肪細胞分化に必須の転写因子としてPPAR γ が知られ、PPAR γ 欠損ES細胞は脂肪細胞へは分化しないが、骨芽細胞へは自発的に分化すること

が報告されており、PPAR γ ノックアウトマウスでは、ホモは胎生致死であるがヘテロは正常に成長し⁶⁾、野生型に比し骨量増加を認め、加齢に伴いその効果がより強くなると報告されている⁷⁾(図1)。

骨代謝および脂肪代謝を制御するホルモンはPPAR γ シグナルと関連しており、PPAR γ 減少により骨髄の幹細胞から骨芽細胞への分化が促進され骨量増加をきたすことから、脂肪組織、脂肪細胞の変化がサイトカインなどを介して骨代謝に影響を及ぼすことは想像に難くない。脂肪細胞は多くのアディポサイトカインを分泌し、それらは肥満すなわち脂肪組織、脂肪細胞の肥大に伴い分泌量に変化することで骨代謝に影響を及ぼすことが容易に類推される。

(1) エストロゲン

エストロゲンは女性ホルモンとして知られ、閉経前は主に卵巣で産生され、閉経後は脂肪組織をはじめとする末梢組織で副腎由来アンドロゲンから変換される。また、エストロゲンは骨髄細胞に直接作用して破骨細胞への分化を抑制し、骨芽細胞の増殖、骨基質蛋白の産生を促進する。それゆえ、閉経後に卵巣機能が低下し、エストロゲンが欠乏すると、骨代謝回転が亢進し、骨吸収促進による骨量減少が生じるが(閉経後骨粗鬆症)、脂肪組織が多ければ多いほど、副腎由来アンドロゲンから変換されるエストロゲンが増えるので骨量維持には有利と考えられている。

実際、Tremollieresらは、閉経後早期の腰椎の骨量減少率は、過体重群(BMI>25)では正常体重群(BMI<25)より少なく、骨量減少率とBMIに有意な相関があったと報告している⁸⁾。

(2) インスリン(図2)

肥満はインスリン抵抗性を惹起する最大の因子である。インスリン抵抗性が生じると、インスリンによる肝臓の糖放出抑制作用、末梢組織(骨格筋、脂肪組織)への糖取り込み作用が障害され、インスリンの血糖降下作用が発揮されないため、インスリン分泌予備能が保たれていれば、代償性にインスリン分泌が亢進して高インスリン血症となる。このインスリンおよびインスリン様成長因子-I(insulin-like growth factor-I ;

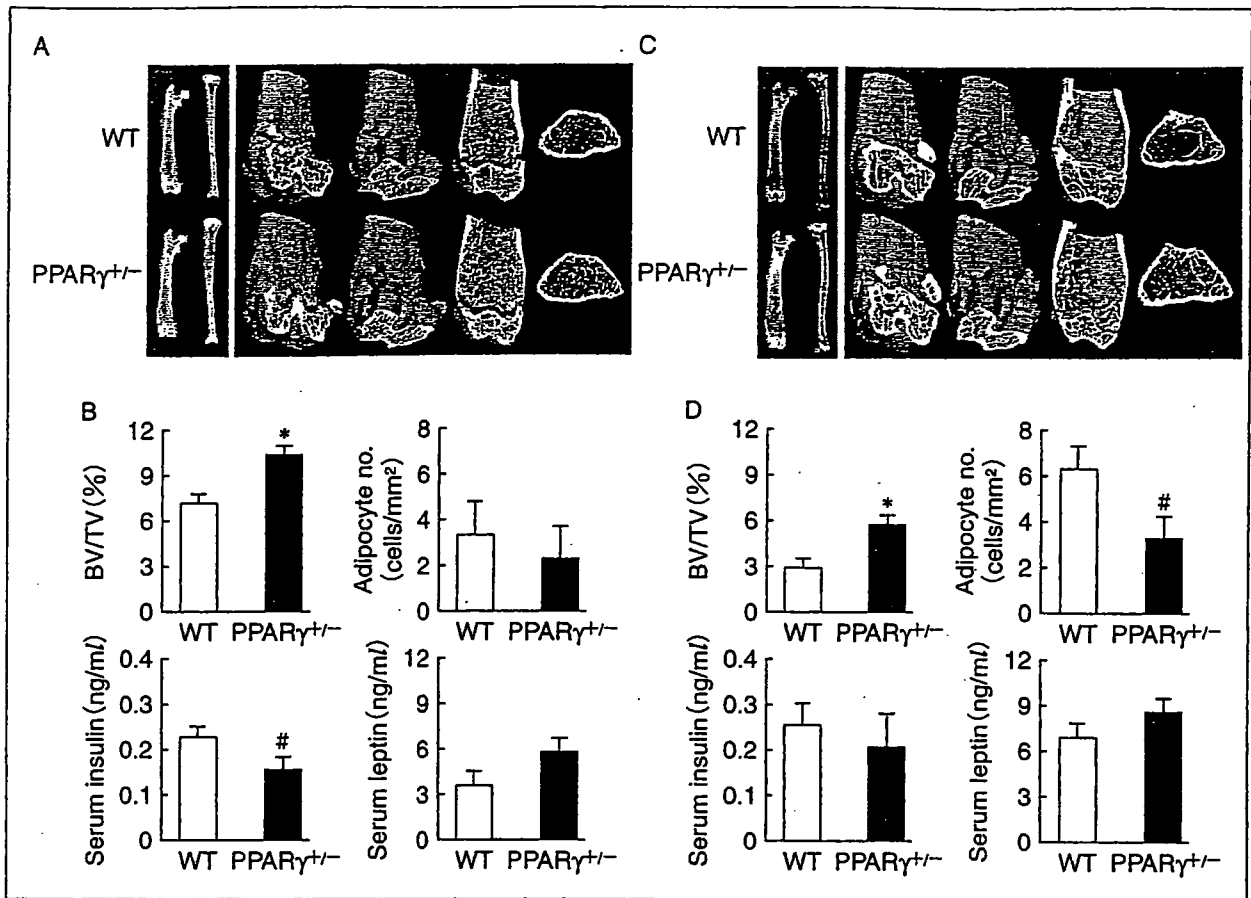


図1 8週齢(A, B)および52週齢(C, D)における野生型(WT)とPPAR γ ヘテロノックアウトマウスの骨組織評価
A, C: 下肢骨の単純レントゲン像および3次元 μ CT画像. B, D: 骨量, 骨髄脂肪細胞数, 血清インスリン値, 血清レプチン値. WTに対し* $p < 0.01$, # $p < 0.05$ (文献⁷⁾より引用改変)

IGF-I)は、ともに重要な骨代謝調節因子として知られる。まず、インスリンは、*in vitro*の検討で、骨芽細胞の増殖、分化やコラーゲン合成促進作用が報告され⁹⁾、*in vivo*の検討では、ストレプトゾトシンによるインスリン分泌不全ラットで急速な骨量減少がみられると報告されている¹⁰⁾。臨床的にも、I型糖尿病(IDDM)は骨粗鬆症を合併する場合が多いとされている¹¹⁾。II型糖尿病(NIDDM)でも、以前には骨量減少が指摘されていたが、近年では、体重増加に伴った骨量増加や病期あるいはインスリン反応性による骨量変化の違いが指摘されている。とくに、インスリン分泌が亢進している初～中期では骨量増加が、インスリン分泌が低下してくる末期では骨量減少が報告されている¹¹⁾。次に、IGF-Iは骨形成促進能をもつ成長因子の一つとしてよく知られるが、*in vitro*の検討で、成長ホルモンが肝臓に作用して分泌される全身性のもの以外に、局所で

主に骨芽細胞から産生されるautocrine/paracrine factorとして重要であることが明らかになっている。*In vivo*の検討でも、マウスの交差実験で骨密度とIGF-I濃度が有意に相関していることが報告され¹²⁾、臨床的には、閉経後女性で骨密度と血中IGF-I濃度の有意な正相関が認められ¹³⁾、先天性のIGF-I欠乏疾患であるLaron症候群では著しい骨量減少が報告されている。このように、インスリンおよびIGF-Iを介するシグナルは、ヒトの骨代謝異常病態においても重要な役割を果たしている。しかし、これらの機能解析に有用であるインスリン受容体やIGF-I受容体などのノックアウトマウスは生後すぐに死亡してしまうため、骨代謝における作用を検討するのが難しかった。インスリンおよびIGF-Iは、それぞれ別のチロシンリン酸化型受容体に結合した後、共通の基質をリン酸化することによって、さらに下流のシグナルを活性化することが知られる。この

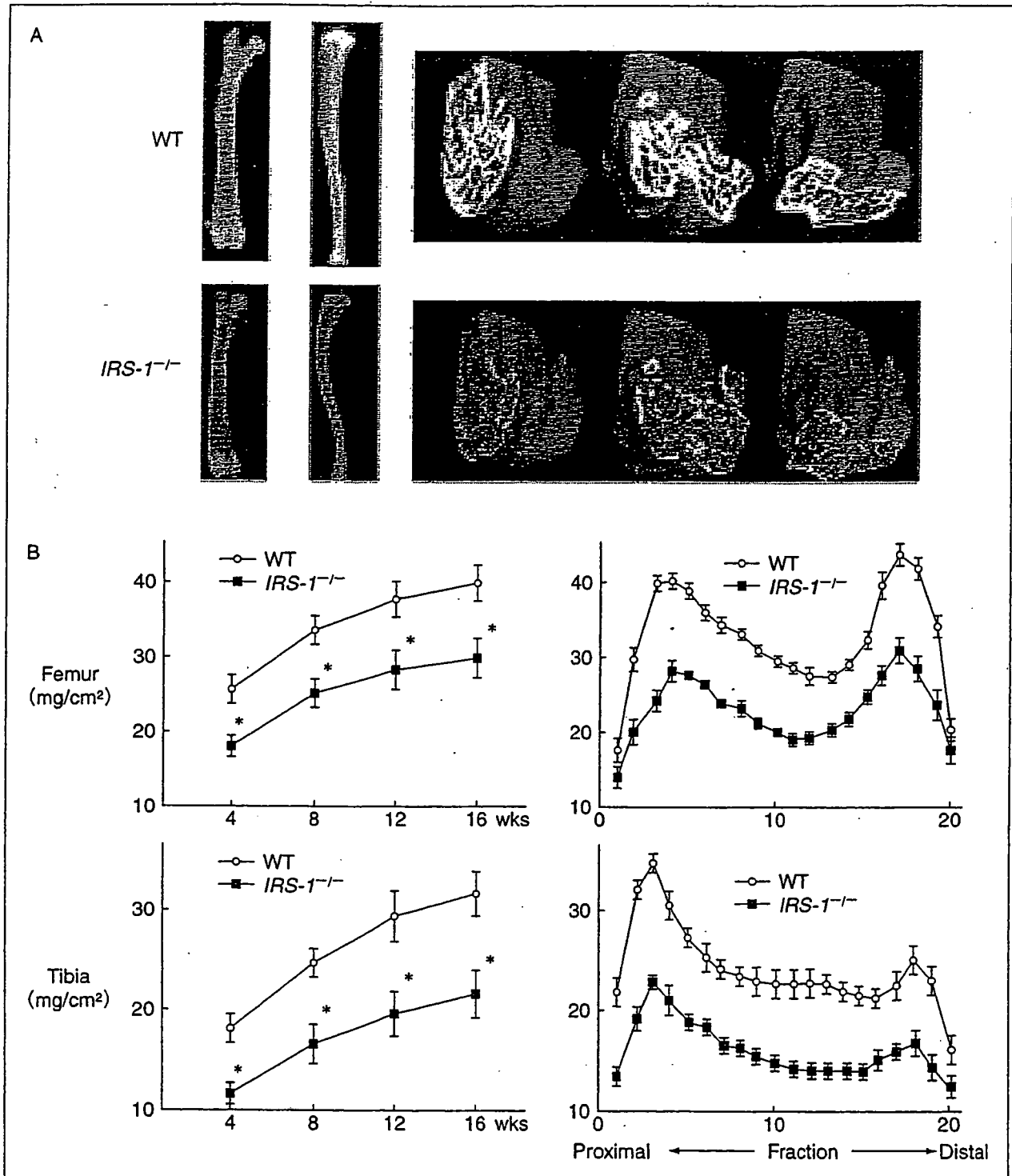


図2 8週齢における野生型(WT)とIRS-1ノックアウトマウスの骨組織評価

A: 下肢骨の単純レントゲン像および3次元μCT画像. B: 骨密度, WTに対し*p<0.01. (文献¹⁵)より引用改変)

基質がインスリン受容体基質(insulin receptor substrate ; IRS)であり, いくつかのサブタイプが特定され, その主たる機能はIRS-1(約180kD)およびIRS-2(約190kD)によってなされると考えられている. IRS-1,2は, 肝細胞, 筋肉細胞, 脂肪細胞など, インスリン標的細胞を含む広範な

組織に発現分布を示し, なかでもIRS-1は間葉系細胞で, IRS-2は血球系細胞で, 比較的優位な発現を認め, IRS-1ノックアウトマウスでは明らかな骨代謝回転の低下による骨量低下がみられ, 背景には骨芽細胞の増殖, 分化能の低下, インスリンやIGF-I刺激に対する反応性の低下, 骨芽

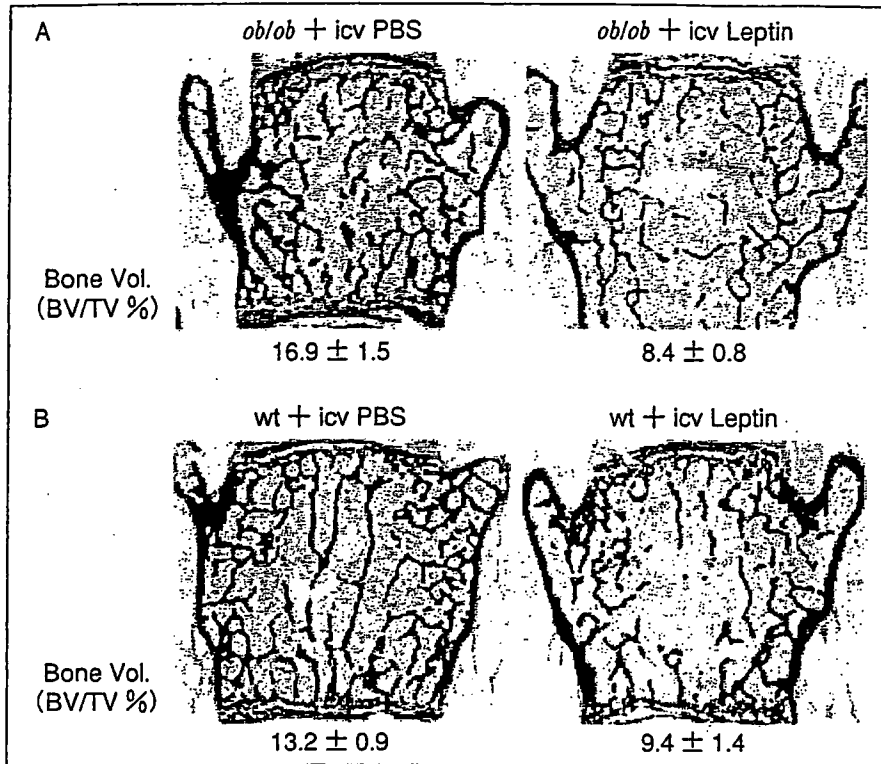


図3 16週齢における野生型(WT)と*ob/ob*マウスの骨組織評価(腰椎)
A, B: PBS(左)およびレプチン(右)の脳室内投与。WTに対し $p < 0.05$
(文献¹⁶⁾より引用改変)

細胞での破骨細胞形成支持能の低下が存在することが明らかにされた¹⁴⁾。一方、IRS-2ノックアウトマウスにおいても骨量低下は認められたが、その程度はIRS-1ノックアウトマウスほど著明ではなく、骨芽細胞機能の低下も少なかったが、破骨細胞機能の亢進を認めた¹⁵⁾。

(3) レプチン(図3)

レプチンは脂肪細胞から分泌される16kDのホルモンである。これまでに、視床下部弓状核にあるレプチン受容体を介し、摂食抑制ペプチド(α -MSH, CART)の発現亢進、摂食亢進ペプチド(NPY)の発現抑制により、摂食抑制作用とエネルギー消費亢進作用を有し、肥満や体重増加を抑制することが知られている。また、血圧調節、免疫能調節などにも関与するとされている。しかし、肥満では血中レプチン濃度が上昇しているにもかかわらず、過食行動や熱産低下は是正されないため、レプチン抵抗性の状態にあると考えられている。

これまでに、レプチン欠損マウス(*ob/ob*)およびレプチン受容体欠損マウス(*db/db*)では生後か

ら著しい肥満を呈し、性腺機能低下、高コルチゾール血症があるにもかかわらず、高い骨量を維持していることが報告され¹⁶⁾。臨床的にも、レプチン欠乏症lipodystrophy(脂肪異常栄養症)では骨量が高いことが知られているが、レプチンの骨代謝への作用には、以下に記すような骨形成促進と抑制、中枢性と局所性の報告があり、一定の見解が得られていない。

1) レプチンの間接作用(視床下部を介する)

Ducyらは、レプチンを第三脳室に投与すると、*ob/ob*、Wild Type(WT)のいずれにおいても骨量が減少することを報告した¹⁶⁾。すなわち、レプチンにはエネルギー代謝調節作用と同じく、視床下部を介した骨形成抑制作用があることを示唆した。さらに、Takedaらは、レプチンのエネルギー代謝調節作用に関する既知の視床下部の神経因子やニューロンは、レプチンの骨形成促進作用に関与しておらず、エネルギー代謝調節作用とは異なった経路を介した骨形成抑制作用を発現しているとした¹⁷⁾。

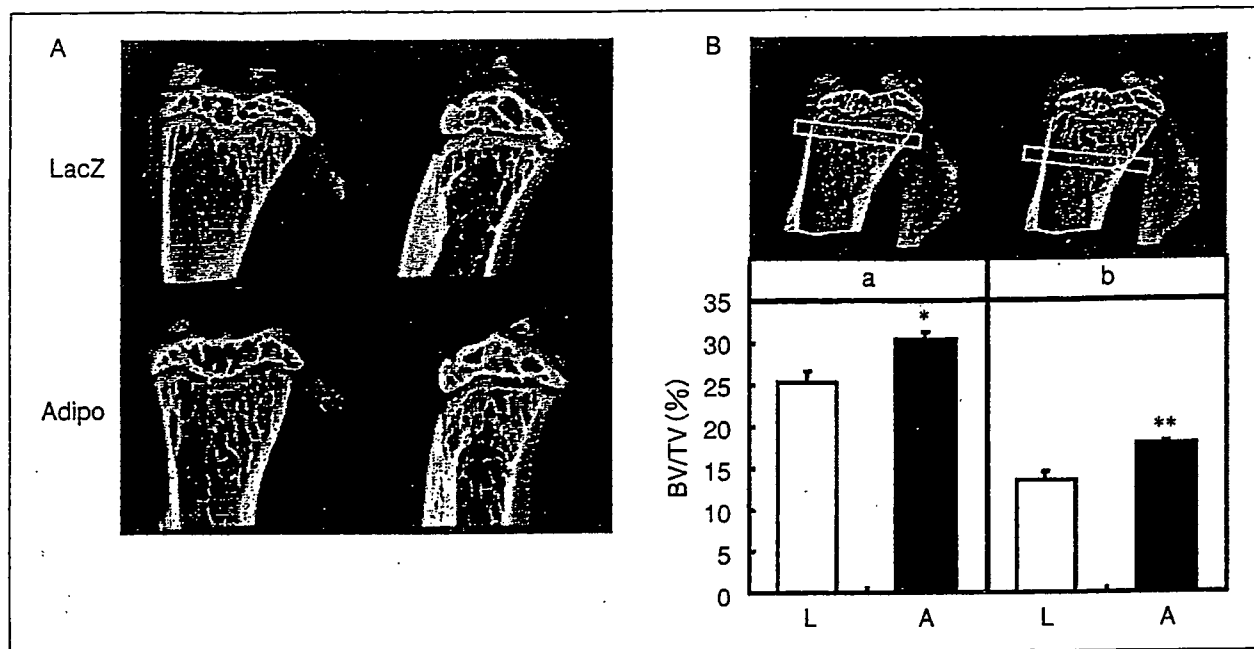


図4 8週齢の野生型(LacZ)とアディポネクチン強発現(Adipo)マウスの骨組織評価
 A: 脛骨近位部の3次元μCT画像, B: 脛骨近位成長帯から50~250μm(a), 500~700μm(b)遠位部における海綿骨量. LacZに対し*p<0.05, **p<0.01 (文献²²⁾より引用改変)

2) レプチンの直接作用

レプチンは骨髄の脂肪細胞でも産生され、その受容体は骨形成を担う骨芽細胞にも存在している。In vitroの検討では、骨芽細胞の増殖、分化を促進し¹⁸⁾、破骨細胞分化因子(RANKL)を介して破骨細胞への分化を抑制する¹⁹⁾。また、軟骨細胞の増殖を促進することも報告されている²⁰⁾。In vivoの検討では、レプチンを全身投与すると、ob/ob, WT, OVX, 先天性レプチン欠乏症で骨成長が進み、骨量が増加することが明らかにされており、成人女性の血中レプチン濃度と骨密度は正相関するとの報告もある²¹⁾。つまり、レプチンの骨組織に対する直接作用は、視床下部を介した中枢作用とは逆に、骨形成を促進して骨吸収を抑制することになる。

(4) アディポネクチン(図4)

アディポネクチンは、血中に5~30μg/mlと高濃度に存在し、脂肪細胞でのみ産生、分泌されるにもかかわらず、肥満者や男性において低下し、減量によって増加する特異なアディポサイトカインである。さらに、肥満度が同じでも、心筋梗塞や狭心症といった動脈硬化性疾患、および糖尿病で血中アディポネクチン濃度は低下する。これまでに、アディポネクチンはIRS-Iシ

グナルを介したPI3-kinaseの活性および糖輸送を上昇させ、インスリン感受性を増強させること、また、脂肪酸の酸化およびクリアランスに重要な脂肪酸輸送蛋白1型(fatty acid transport protein 1; FATP-1)の遺伝子発現を増強させることがわかっている。一方で、脂肪蓄積で脂肪組織より過分泌されるアディポサイトカインであるTNF-αは同じ経路に作用し、アディポネクチンと逆の作用を示すが、アディポネクチンとTNF-αは互いの作用を抑制し合うのみならず、その産生場所である脂肪組織において転写レベルでの調節により互いの産生を抑制し合う。つまり、アディポネクチンは、インスリン抵抗性惹起因子であるTNF-αの産生と機能を抑制することによってインスリン感受性を増強させる。また、アディポネクチンは血管壁に作用し、単球の接着、平滑筋細胞の増殖、遊走、マクロファージの泡沫化を抑制して抗動脈硬化作用を発揮し、TIMP-1産生上昇を介して急性冠症候群に対しても抑制作用を示す。

近年、アディポネクチンレセプターが同定され、その発現がユビキタスであったことから、レプチンのみならずアディポネクチンも骨代謝になんらかの影響を及ぼすことが容易に想像さ

れた。そして、最近、*In vivo*の検討で、アデノウイルスを用いたアディポネクチン強発現マウスの海綿骨量が著明に増加し、破骨細胞数の減少とNTxの減少を伴うことが明らかとなり²²⁾、*In vitro*の検討では、アディポネクチンが破骨細胞の分化、吸収活性を抑制すること、骨芽細胞の分化、石灰化を促進することが明らかにされた²²⁾。さらに、骨芽細胞の増殖、分化促進作用は、MAPKシグナルを介したものであることもわかった²³⁾。また、アディポネクチンのパラログであるCartducinが軟骨細胞の増殖、分化を促進することも報告されている²⁴⁾。

肥満と骨折率

肥満は骨量の増加因子であるのみならず、骨折率の増加とも関連していることが多数報告されている。これは、肥満だとバランス制御が悪く、転倒率が上昇することが考えられる。さらに、骨量の増加は骨への加重が増加していることを意味することから、荷重の増加が骨折に寄与することも想定される。そのため、肥満では骨量増加がみられるものの、骨折率の低下には結びつかない。

肥満での骨折の危険性を論じるには、糖尿病と非糖尿病を分けて考える必要がある。1948年にAlbrightらが糖尿病の長期罹患患者に易骨折性が生じると報告して以来、糖尿病と骨代謝異常との関連性が検討されてきた。インスリン欠乏が特徴的であるI型糖尿病では骨量減少が生じ、その結果、骨折頻度が増加するという一定した見解が得られている²⁵⁾。また、II型糖尿病においても皮質骨での有意な骨密度の減少を認め、II型糖尿病における骨折の危険性が閉経後女性においてとくに増加すること²⁶⁾、そして、いったん骨折を発症した際には骨折治癒過程が遅延することが報告された²⁷⁾。糖尿病では、高血糖の持続やインスリンおよびIGF-Iの欠乏による骨芽細胞機能の低下が特徴であり²⁸⁾、細胞内ソルビトールの蓄積が骨芽細胞機能の傷害に関与していることが報告されている²⁹⁾。それゆえ、糖尿病においては持続的高血糖が骨基質蛋白の糖化(グリケーション)を促し、たとえ骨の量的変化を認めなくても質的变化が起こり、その結果として骨脆弱性が

もたらされる可能性がある。糖尿病では骨密度に依存せずに骨折率が増加する報告もあることから³⁰⁾、糖尿病では骨密度の低下はなくとも骨質の劣化により骨折率が上昇するものと考えられる。

また、過去の報告から、5%以上の減量で骨量減少が生じ、体重減少に伴い骨折率は上昇するとされる。摂取カロリーが減少すると、PTHが上昇し、エストロゲンの低下とそれに伴う骨吸収が亢進する。逆に、カルシウム摂取量が増加すると、減量に伴う骨吸収の亢進が抑制される。このことから、減量により腸管でのカルシウム吸収量が低下し、二次性副甲状腺機能亢進症が起これると考えられる。さらに、女性では減量の速度と血清エストロゲン濃度の低下に相関がみられ、とくに、閉経後は脂肪組織局所で生合成されるため、脂肪量の減少により血清エストロゲン濃度が低下し、腸管でのカルシウム吸収がさらに低下すると考えられる。ほかに、食事制限によりIGF-Iが低下し、コルチゾールが増加することで骨形成が低下することも報告されている。しかし、いまだ確固たる機序の解明はなされていない。

おわりに

肥満と骨量および骨質の関係を説明する明確な機構はいまだ存在しなかった。力学的負荷が骨代謝に影響を与えていることは臨床研究から疑いようのない事実であり、生理活性物質が骨代謝に少なからず影響を与えていることはこれまでの知見から明らかである。しかし、明確な説明ができうるまでの解明には至っていない。生活習慣病、メタボリックシンドロームが脚光を浴びている現代において、肥満、骨粗鬆症の有効な予防対策や治療法の確立が早急に必要とされている。それを反映するように、肥満と骨代謝に関する論文報告数が急増していることから、これからの医学研究におけるホットトピックスになることは間違いないと思われる。新たな展開に期待したい。

文 献

- 1) Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, et al. Effects of weight and body mass index on bone mineral den-

- sity in men and women : the Framingham study. *J Bone Miner Res* 1993 ; 8 : 567.
- 2) Ribot C, Tremollieres F, Pouilles JM, et al. Obesity and postmenopausal bone loss : the influence of obesity on vertebral density and bone turnover in postmenopausal women. *Bone* 1987 ; 8 : 327.
 - 3) Reid IR, Ames RW, Evans MC, et al. Determinants of the rate of bone loss in normal postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1994 ; 79 : 950.
 - 4) Rozman C, Feliu E, Berga L, et al. Age-related variations of fat tissue fraction in normal human bone marrow depend both on size and number of adipocytes : a stereological study. *Exp Hematol* 1989 ; 17 : 34.
 - 5) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multi-lineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999 ; 284 : 143.
 - 6) Kubota N, Terauchi Y, Miki H, et al. PPAR γ mediates high-fat diet-induced adipocyte hypertrophy and insulin resistance. *Mol Cell* 1999 ; 4 : 597.
 - 7) Akune T, Ohba S, Kamekura S, et al. PPAR γ insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast formation from bone marrow progenitors. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 846.
 - 8) Tremollieres FA, Pouilles JM, Ribot C. Vertebral postmenopausal bone loss is reduced in overweight women : a longitudinal study in 155 early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 1993 ; 77 : 683.
 - 9) Thomas DM, Hards DK, Rogers SD, et al. Insulin receptor expression in bone. *J Bone Miner Res* 1996 ; 11 : 1312.
 - 10) Hough S, Avioli LV, Bergfeld MA, et al. Correction of abnormal bone and mineral metabolism in chronic streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat by insulin therapy. *Endocrinology* 1981 ; 108 : 2228.
 - 11) Piepkorn B, Kann P, Forst T, et al. Bone mineral density and bone metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res* 1997 ; 29 : 584.
 - 12) Rosen CJ, Dimai HP, Vereault D, et al. Circulating and skeletal insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in two inbred strains of mice with different bone mineral densities. *Bone* 1997 ; 21 : 217.
 - 13) Canalis E. Insulin-like growth factors and osteoporosis. *Bone* 1997 ; 21 : 215.
 - 14) Akune T, Ogata N, Hoshi K, et al. Insulin receptor substrate-2 maintains predominance of anabolic function over catabolic function of osteoblasts. *J Cell Biol* 2002 ; 159 : 147.
 - 15) Ogata N, Chikazu D, Kubota N, et al. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J Clin Invest* 2000 ; 105 : 935.
 - 16) Ducy P, Amling M, Takeda S, et al. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay : a central control of bone mass. *Cell* 2000 ; 100 : 197.
 - 17) Takeda S, Elefteriou F, Levasseur R, et al. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell* 2002 ; 111 : 305.
 - 18) Steppan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, et al. Leptin is a potent stimulator of bone growth in *ob/ob* mice. *Regul Pept* 2000 ; 92 : 73.
 - 19) Holloway WR, Collier FM, Aitken CJ, et al. Leptin inhibits osteoclast generation. *J Bone Miner Res* 2002 ; 17 : 200.
 - 20) Kume K, Satomura K, Nishisho S, et al. Potential role of leptin in endochondral ossification. *J Histochem Cytochem* 2002 ; 50 : 159.
 - 21) Yamauchi M, Sugimoto T, Yamaguchi T, et al. Plasma leptin concentrations are associated with bone mineral density and the presence of vertebral fractures in postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2001 ; 55 : 341.
 - 22) Oshima K, Nampei A, Matsuda M, et al. Adiponectin increases bone mass by suppressing osteoclast and activating osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 331 : 520.
 - 23) Luo XH, Guo LJ, Yuan LQ, et al. Adiponectin stimulates human osteoblasts proliferation and differentiation via the MAPK signaling pathway. *Exp Cell Res* 2005 ; 309 : 99.
 - 24) Maeda T, Jikko A, Abe M, et al. Cartducin, a paralog of Acrp30/adiponectin, is induced during chondrogenic differentiation and promotes proliferation of

- chondrogenic precursors and chondrocytes. *J Cell Physiol* 2006 ; 206 : 537.
- 25) Hui SL, Epstein S, Johnston CC Jr. A prospective study of bone mass in patients with type I diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 1985 ; 60 : 74.
- 26) Schwartz AV, Sellmeyer DE, Ensrud KE, et al. Older women with diabetes have an increased risk of fracture : a prospective study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001 ; 86 : 32.
- 27) Loder RT. The influence of diabetes mellitus on the healing of closed fractures. *Clin Orthop Relat Res* 1988 ; 232 : 210.
- 28) Inaba M, Terada M, Koyama H, et al. Influence of high glucose on 1,25-dihydroxyvitamin D₃-induced effect on human osteoblast-like MG-63 cells. *J Bone Miner Res* 1995 ; 10 : 1050.
- 29) Katayama Y, Akatsu T, Yamamoto M, et al. Role of nonenzymatic glycosylation of type I collagen in diabetic osteopenia. *J Bone Miner Res* 1996 ; 11 : 931.
- 30) Inaba M, Okuno S, Kumeda Y, et al. Increased incidence of vertebral fracture in older female hemodialyzed patients with type 2 diabetes mellitus. *Calcif Tissue Int* 2005 ; 76 : 256.

* * *

Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor

Masanori Miyanishi^{1,2}, Kazutoshi Tada^{2†}, Masato Koike³, Yasuo Uchiyama³, Toshio Kitamura⁴ & Shigekazu Nagata^{1,2,5}

In programmed cell death, a large number of cells undergo apoptosis, and are engulfed by macrophages to avoid the release of noxious materials from the dying cells^{1,2}. In definitive erythropoiesis, nuclei are expelled from erythroid precursor cells and are engulfed by macrophages. Phosphatidylserine is exposed on the surface of apoptotic cells³ and on the nuclei expelled from erythroid precursor cells⁴; it works as an 'eat me' signal for phagocytes^{5,6}. Phosphatidylserine is also expressed on the surface of exosomes involved in intercellular signalling⁷. Here we established a library of hamster monoclonal antibodies against mouse peritoneal macrophages, and found an antibody that strongly inhibited the phosphatidylserine-dependent engulfment of apoptotic cells. The antigen recognized by the antibody was identified by expression cloning as a type I transmembrane protein called Tim4 (T-cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecule; also known as Timd4)⁸. Tim4 was expressed in Mac1⁺ cells in various mouse tissues, including spleen, lymph nodes and fetal

liver. Tim4 bound apoptotic cells by recognizing phosphatidylserine via its immunoglobulin domain. The expression of Tim4 in fibroblasts enhanced their ability to engulf apoptotic cells. When the anti-Tim4 monoclonal antibody was administered into mice, the engulfment of apoptotic cells by thymic macrophages was significantly blocked, and the mice developed autoantibodies. Among the other Tim family members, Tim1, but neither Tim2 nor Tim3, specifically bound phosphatidylserine. Tim1- or Tim4-expressing Ba/F3 B cells were bound by exosomes via phosphatidylserine, and exosomes stimulated the interaction between Tim1 and Tim4. These results indicate that Tim4 and Tim1 are phosphatidylserine receptors for the engulfment of apoptotic cells, and may also be involved in intercellular signalling in which exosomes are involved.

Caspase-activated DNase (CAD)-deficient cells do not undergo apoptotic DNA fragmentation, but their DNA is degraded in phagocytes after they are engulfed⁹. We used this knowledge to assay the

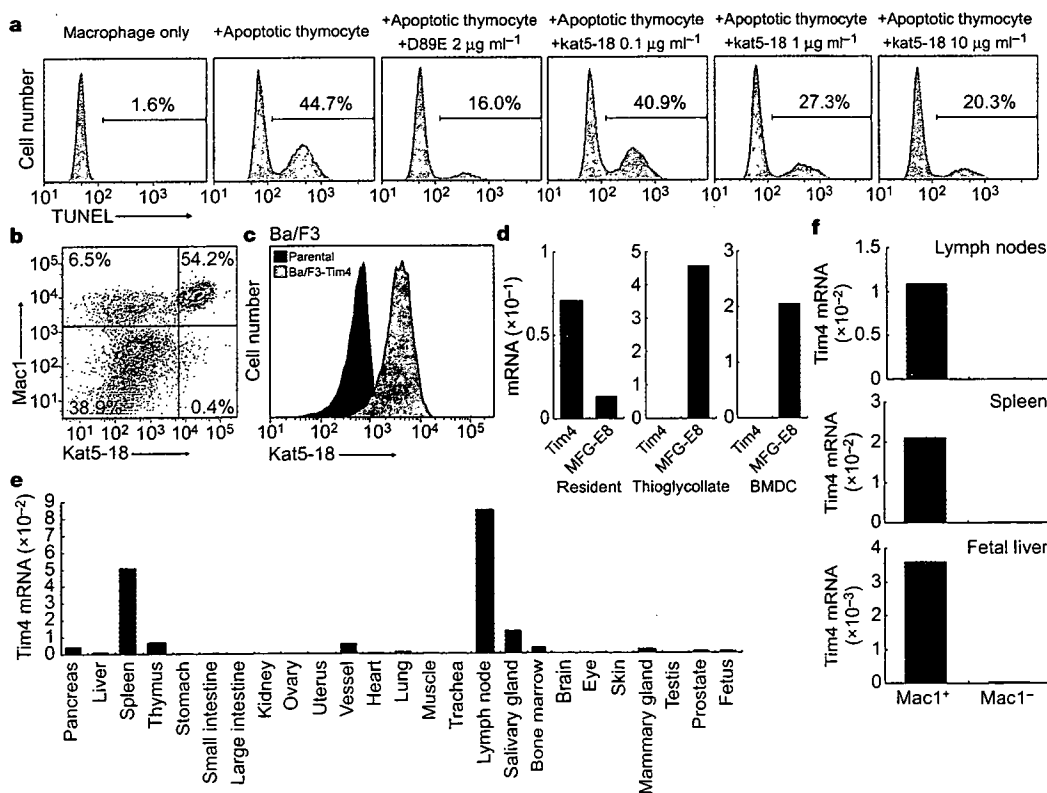


Figure 1 | Tim4 in peritoneal macrophages. **a**, Mouse peritoneal cells were used for phagocytosis with D89E¹⁰ or Kat5-18, stained for TUNEL, analysed by flow cytometry, and the percentage of TUNEL⁺ macrophages determined. Average values of two experiments are shown. **b**, Peritoneal macrophages incubated with biotin-Kat5-18, followed with FITC-streptavidin and APC-anti-Mac1. **c**, Parental and Tim4-expressing Ba/F3 analysed by flow cytometry with Kat5-18. **d**, mRNA levels of Tim4 and MFG-E8 in resident or thioglycollate-elicited peritoneal macrophages, and bone marrow-derived immature dendritic cells, determined by real-time PCR. **e**, Tim4 mRNA levels in mouse tissues, determined by real-time PCR. **f**, Real-time PCR for Tim4 mRNA in Mac1⁺ and Mac1⁻ cells from lymph nodes, spleen and fetal liver.

¹Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. ²Department of Genetics, ³Department of Cell Biology and Neuroscience, Osaka University Medical School, Osaka 565-0871, Japan. ⁴Division of Cellular Therapy, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. ⁵Solution Oriented Research for Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kyoto 606-8501, Japan. [†]Present address: Mitsubishi UFI Research and Consulting, Corporate Strategy Consulting Department I, 2-5-8 Emabashi, Chou-ku, Osaka 541-8512, Japan

engulfment of apoptotic cells, and identified MFG-E8 (milk fat globule EGF factor 8) that stimulates their engulfment¹⁰. MFG-E8 is expressed in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages, tingible-body macrophages of lymph nodes and spleen, Langerhans cells and mammary epithelial cells^{10–13}. Hu *et al.*¹⁴ reported that naïve peritoneal macrophages engulf apoptotic cells in a phosphatidylserine (PS)-dependent manner. We confirmed this with our assay system, which uses *CAD*^{-/-} thymocytes as prey (Fig. 1a). Peritoneal macrophages efficiently engulfed apoptotic cells, and this was inhibited by the D89E mutant of MFG-E8 that masks PS¹⁰. However, peritoneal macrophages expressed little MFG-E8 (see below), and this MFG-E8 deficiency did not affect the ability of these macrophages to engulf apoptotic cells (data not shown). To identify the molecules involved in this engulfment, Armenian hamsters were immunized with mouse peritoneal cells, and hybridomas were prepared. Among 1,200 hybridomas, one monoclonal antibody (Kat5-18) dose-dependently inhibited the phagocytosis of apoptotic cells by peritoneal macrophages (Fig. 1a). Most *Mac1*⁺ peritoneal cells were stained by Kat5-18 (Fig. 1b), indicating that peritoneal macrophages expressed its antigen.

To identify the antigen for Kat5-18, we used retrovirus-mediated expression cloning¹⁵. A complementary DNA library was constructed with messenger RNA from mouse peritoneal cells, converted to retroviruses, and used to infect mouse Ba/F3 cells. After 2 days in culture, transformants labelled by Kat5-18 (less than 0.1%) were sorted using a cell sorter, expanded in culture, and sorted again. This cycle of sorting and expansion was repeated three times until most cells

stained with Kat5-18. The sorted Kat5-18⁺ cells carried 2–3 different integrated cDNAs, and *Tim4* cDNA was found in two independent experiments. When *Tim4* cDNA was introduced into Ba/F3, the transformants stained strongly with Kat5-18 (Fig. 1c), confirming that *Tim4* was the antigen recognized by Kat5-18. Real-time PCR indicated that *Tim4* mRNA was expressed in resident, but not thioglycollate-elicited, peritoneal cells (Fig. 1d), in sharp contrast with MFG-E8, which was expressed in thioglycollate-elicited but weakly in resident peritoneal cells. A similar situation was observed with bone marrow-derived immature dendritic cells, which expressed a high level of MFG-E8, but not *Tim4*. Other major tissues that expressed *Tim4* included the spleen, thymus, lymph nodes and salivary glands (Fig. 1e). When cells from the spleen, lymph nodes and fetal liver were sorted into *Mac1*⁺ and *Mac1*⁻ cells using MACS (magnetic cell sorting), *Tim4* mRNA was found only in *Mac1*⁺ cells (Fig. 1f). Flow cytometry indicated that about 20% of *Mac1*⁺ cells in the lymph nodes expressed *Tim4* (Supplementary Fig. 1).

DNase II degrades DNA of apoptotic cells in lysosomes after phagocytes engulf them¹⁶. To examine the role of *Tim4* in the engulfment of apoptotic cells, a fibroblast cell line expressing *Tim4* was established with NIH3T3 expressing DNase II¹⁰ (NIH3T3/DNase II/*Tim4*) (Supplementary Fig. 2). The ability of the parental NIH3T3/DNase II to engulf apoptotic cells was weak: when incubated with apoptotic *CAD*^{-/-} thymocytes for 120 min, only 20% of the cells engulfed them (Fig. 2a). On the other hand, more than 50% of NIH3T3/DNase II/*Tim4* engulfed apoptotic cells within 60 min. This effect of *Tim4* was confirmed by microscopic observation. That is, when apoptotic

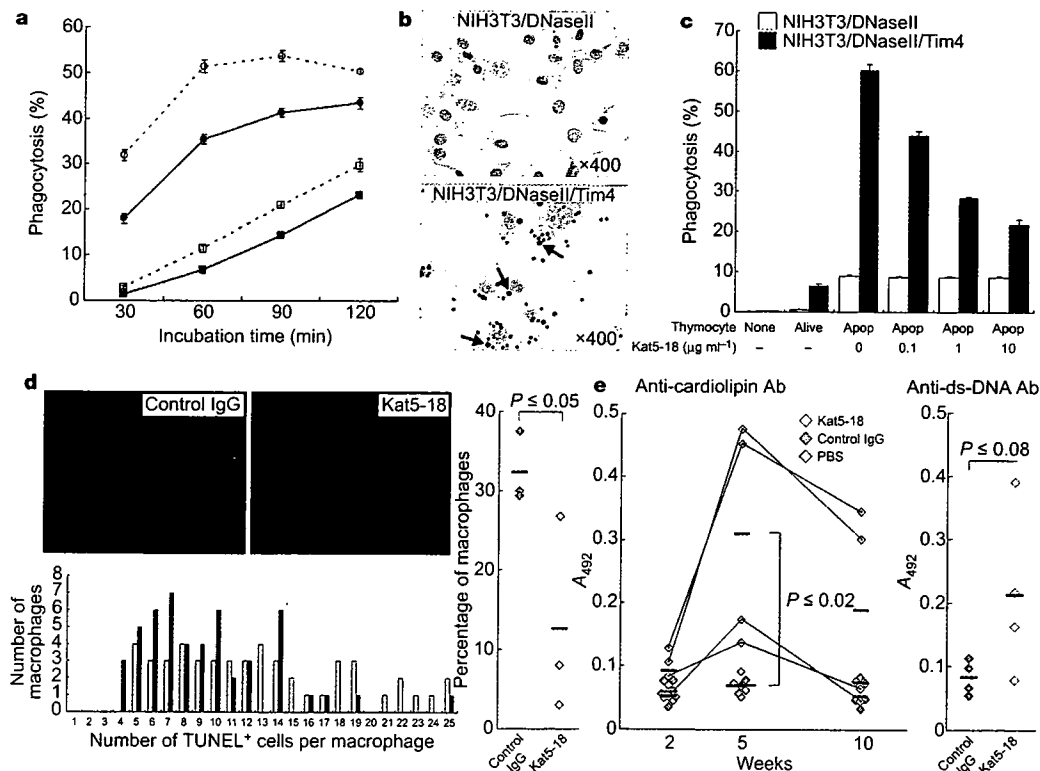


Figure 2 | Tim4-mediated engulfment of apoptotic cells. **a**, NIH3T3/DNase II (filled squares, open squares) and NIH3T3/DNase II/*Tim4* (filled circles, open circles) incubated with 3.0×10^5 (filled squares, filled circles) or 6.0×10^5 (open squares, open circles) apoptotic *CAD*^{-/-} thymocytes for the indicated periods. The percentage of TUNEL⁺ macrophages was determined by flow cytometry. Average values from three experiments are shown; error bars, ± 1 s.e. **b**, NIH3T3/DNase II and NIH3T3/DNase II/*Tim4* used for 60-min phagocytosis, stained for TUNEL, and observed by microscopy. Arrows indicate TUNEL⁺ cells. **c**, NIH3T3/DNase II or NIH3T3/DNase II/*Tim4* incubated with healthy or apoptotic thymocytes in the presence of Kat5-18, stained for TUNEL. The percentage of TUNEL⁺ macrophages was determined

by flow cytometry. Average values from three experiments are shown; error bars, ± 1 s.e. **d**, *CAD*^{-/-} mice that had received normal hamster Ab or Kat5-18 were treated with dexamethasone. Top, the thymus stained for TUNEL (green) and F4/80 (red). The number of TUNEL⁺ cells determined for 50 randomly selected macrophages (bottom). Experiments were carried out three times, and the percentage of the macrophages carrying more than 15 apoptotic cells plotted (right). Mann–Whitney’s U-test was used to analyse the difference, and *P* values are shown. **e**, Normal hamster IgG, Kat5-18 or PBS was injected into mice twice a week for 5 weeks. The serum concentration of anti-cardiolipin and anti-dsDNA was determined at 2, 5 and 10 weeks. *P* values determined as above are shown. *A*₄₉₂, absorbance at 492 nm.

cells were cultured with NIH3T3/DNase II, few apoptotic cells were seen attached to NIH3T3/DNase II (Fig. 2b). In contrast, many apoptotic cells associated with NIH3T3/DNase II/Tim4, and many were TUNEL-positive, indicating that these cells had been engulfed. NIH3T3/DNase II/Tim4 engulfed apoptotic cells but not healthy ones, and this engulfment was dose-dependently inhibited by Kat5-18 (Fig. 2c), confirming that Tim4 conferred the ability to engulf apoptotic cells on NIH3T3/DNase II. To confirm the function of Tim4 *in vivo*, *CAD*^{-/-} mice were given Kat5-18, and treated with dexamethasone to induce apoptosis in the thymus. As shown in Fig. 2d, in the thymus of mice that received the control IgG, 32.3% of F4/80⁺ macrophages carried more than 15 TUNEL⁺ apoptotic cells. This percentage of the macrophages carrying more than 15

apoptotic cells was reduced to about 12.6% in the thymus of the mice that received Kat5-18. Inefficient engulfment of apoptotic cells often leads to autoimmune diseases¹⁷. In fact, the mice that received Kat5-18 developed autoantibodies (anti-cardiolipin and anti-double-stranded-DNA antibodies) within 5 weeks in their serum (Fig. 2e). Two mice strongly responded to Kat5-18 and two weakly, but the injection of normal IgG or PBS never caused the development of autoantibodies. The serum anti-cardiolipin antibody level was reduced when the injection of Kat5-18 was interrupted, confirming that this increase was due to Kat5-18.

Mouse Tim4 is a type I membrane protein, consisting of a signal sequence and extracellular, transmembrane and cytosolic regions (Fig. 3a). To examine how Tim4 enhances the engulfment of

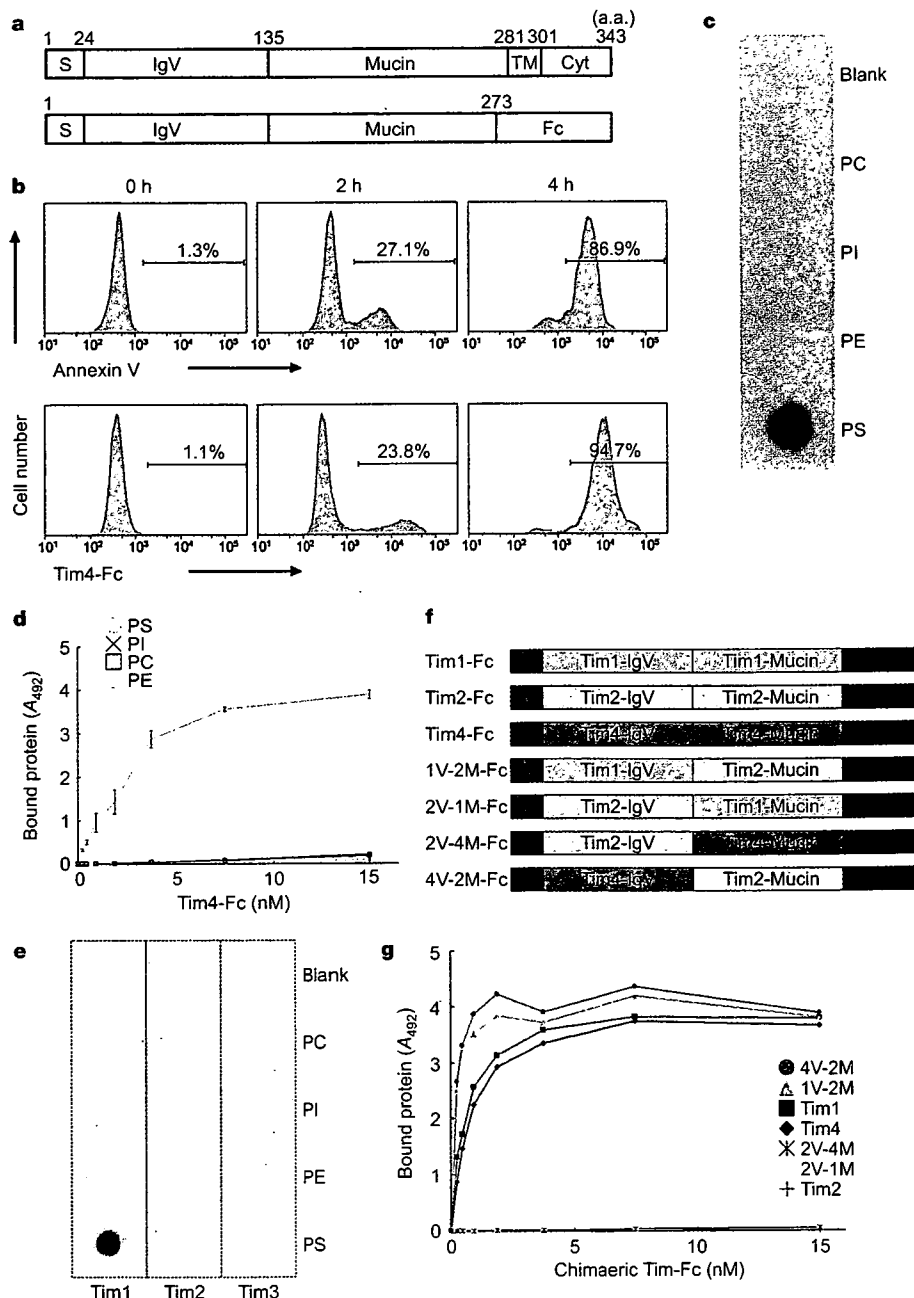


Figure 3 | Binding to phosphatidylserine. **a**, Structure of Tim4, showing signal sequence (S), IgV-like (IgV), mucin-like (Mucin), transmembrane (TM) and cytoplasmic regions (Cyt). a.a., amino acid. Tim4-Fc carries the Tim4 extracellular region and the Fc region of human IgG. **b**, Ba/F3-Fas treated with Fas ligand for the indicated periods, stained with annexin V or Tim4-Fc. **c**, A filter spotted with phosphatidylcholine (PC), phosphatidylinositol (PI), phosphatidylethanolamine (PE) or phosphatidylserine (PS), incubated with

Tim4-Fc followed by anti-IgG. **d**, Microtitre plates coated with indicated phospholipids incubated with Tim4-Fc, followed by anti-IgG. The assay was performed in triplicate. **e**, Lipid overlay assay performed as **c** with Tim1-Fc, Tim2-Fc and Tim3-Fc. **f**, Structures of the extracellular region of Tim1, Tim2 and Tim4, and their hybrids, fused to human IgG. **g**, Microtitre plates coated with PS incubated with increasing concentrations of Tim1-Fc, Tim2-Fc, Tim4-Fc, or their hybrids.

apoptotic cells, the Tim4 extracellular region was fused to the Fc region of human IgG (Tim4-Fc). The purified Tim4-Fc showed a band at 82 kDa in SDS-PAGE under reducing conditions, and a 170 kDa band under non-reducing conditions (Supplementary Fig. 3), indicating that Tim4-Fc existed as a dimer. When Ba/F3 expressing Fas was treated with Fas ligand, they underwent apoptosis and bound annexin V (Fig. 3b), which binds to PS exposed on the surface of apoptotic cells¹⁸. These cells also bound Tim4-Fc, with a time course similar to their binding of annexin V. When a nitrocellulose filter spotted with various phospholipids was incubated with Tim4-Fc, Tim4-Fc bound PS, but not phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, or phosphatidylethanolamine (Fig. 3c). The affinity of Tim4-Fc for PS, determined with microtitre plates coated with phospholipids, was comparable to that of MFG-E8 ($K_d \approx 2$ nM) (Fig. 3d). These results suggested that Tim4 recognizes PS exposed on apoptotic cells as an engulfment signal. In support of this idea, the MFG-E8 mutant D89E dose-dependently inhibited the engulfment of apoptotic cells by NIH3T3/DNase II/Tim4 (Supplementary Fig. 4).

The Tim family has three members in human (TIM1, 3 and 4), and eight in mouse (Tim1–8). To examine whether other Tim family members can recognize PS, the Fc fusion proteins were prepared with mouse Tim1, Tim2 and Tim3 (Supplementary Fig. 5). Tim1-Fc, Tim2-Fc and Tim3-Fc each behaved as a dimer (Supplementary Fig. 6). The lipid overlay assay indicated that Tim1-Fc, but neither Tim2-Fc nor Tim3-Fc, specifically bound PS (Fig. 3e). Accordingly, full-length Tim1, but neither Tim2 nor Tim3, enhanced the engulfment of apoptotic cells when it was expressed in NIH3T3/DNase II cells (Supplementary Fig. 7). The extracellular region of Tim family members consists of two domains (IgG V-chain like (IgV) and mucin domains)⁸. To examine which domain of Tim1 and Tim4 is responsible for binding PS, IgV and mucin domains were swapped between

Tim1 and Tim2, and between Tim4 and Tim2, and fused to the Fc region (Fig. 3f). As shown in Fig. 3g, the chimaeric molecules carrying IgV domain from Tim1 or Tim4 tightly bound PS, while no binding was observed with the chimaeric molecules carrying mucin domain from Tim1 or Tim4.

Various mammalian cells produce exosomes that expose PS on their surface⁷. The ability of Tim1 and Tim4 to bind PS suggested that exosomes bind to cells expressing Tim1 or Tim4. To examine this possibility, Ba/F3 cell lines expressing Tim1 or Tim4 (Ba/F3-Tim1 or Ba/F3-Tim4) were established. The growing Ba/F3-Tim1 or Ba/F3-Tim4 but not the parental Ba/F3 bound annexin V (Fig. 4a, and data not shown). Ba/F3-Tim1 and Ba/F3-Tim4 were then treated with biotin-labelled annexin V, followed by staining with gold-conjugated streptavidin. Observation by electron microscopy indicated that Ba/F3-Tim1 or Ba/F3-Tim4 was associated with exosome-like vesicles, and several gold particles were found on the outer leaflet of the exosomes (Fig. 4b). Such vesicles were not observed with the Ba/F3 parental cells. Meyers *et al.*¹⁹ reported that Tim4 acts as a ligand for Tim1 expressed in Th2 cells. Accordingly, Tim1-Fc strongly bound Ba/F3-Tim4 (Fig. 4c). In addition, Tim1-Fc bound Ba/F3-Tim1, and Tim4-Fc bound Ba/F3-Tim4. The ability of Tim4 and Tim1 to bind PS suggested that these homophilic and heterophilic interactions between Tim1 and Tim4 can be stimulated by exosomes. In support of this idea, the binding of Tim4-Fc to Ba/F3-Tim4 was inhibited by annexin V (Fig. 4d). To directly confirm the effect of exosomes on association between Tim1 and Tim4, microspheres were coated with Tim4-Fc, and subjected to binding assay with Tim1-Fc. As shown in Fig. 4e, little Tim1-Fc bound to Tim4-Fc-coated beads, and exosomes from Ba/F3 dose-dependently stimulated the binding of Tim1-Fc to the beads.

Phosphatidylserine exposed on the outer leaflet of the plasma membrane is often used as a recognition signal for phagocytes to

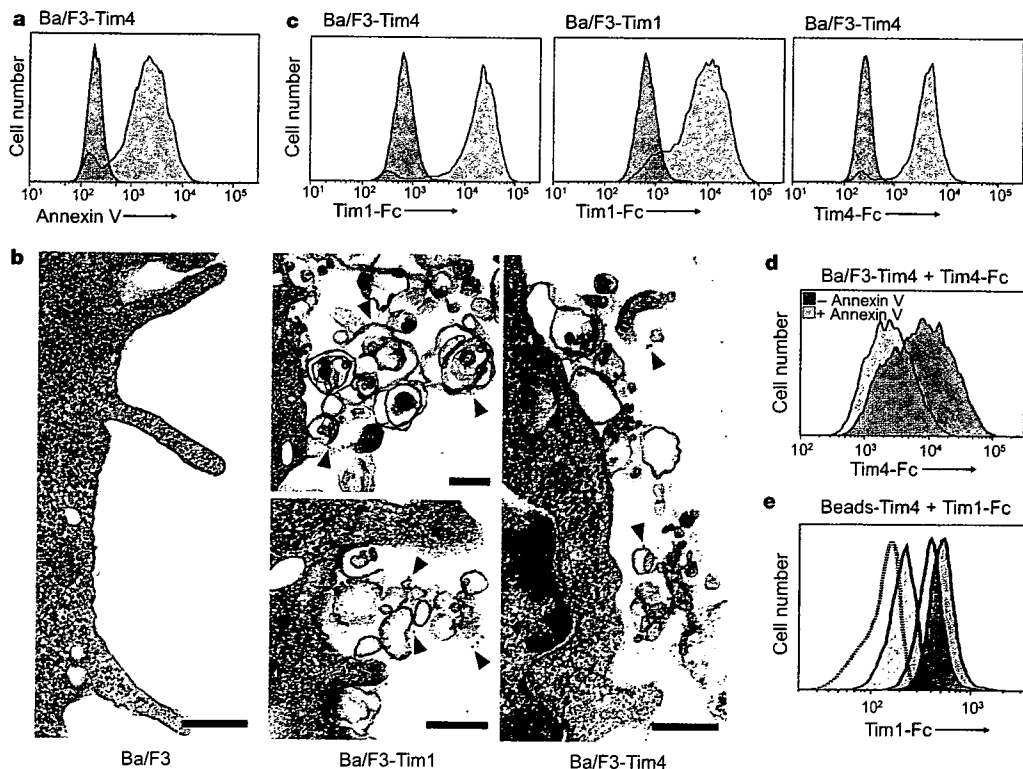


Figure 4 | Association of Tim1 and Tim4 via exosomes. **a**, Ba/F3-Tim4 incubated with PE-annexin V, and analysed by flow cytometry. Staining profile of Ba/F3 in red. **b**, Electron micrographs of Ba/F3, Ba/F3-Tim1 or Ba/F3-Tim4, incubated with biotin-annexin V and stained with streptavidin-colloidal gold. Gold particles on exosome-like vesicles indicated by arrowheads. Scale bar, 0.3 μ m. **c**, Ba/F3-Tim4 or Ba/F3-Tim1 incubated with Tim1-Fc or Tim4-Fc, stained with FITC-anti-IgG, and analysed by flow

cytometry. Staining profiles of Ba/F3 in red. **d**, Ba/F3-Tim4 incubated with Tim4-Fc in the absence or presence of annexin V, stained with FITC-anti-IgG. **e**, Tim4-Fc-coated latex beads incubated with Tim1-Fc in the absence (green) or presence of 10-fold (blue) or 50-fold (brown) concentrated exosomes, stained with PE-anti-Tim1, and analysed by flow cytometry. Profile without Tim1-Fc in red dotted line.

engulf apoptotic cells. Fadok *et al.* reported that phosphatidylserine receptor (PSR), a ubiquitously expressed type II-membrane protein, binds to PS on apoptotic cells and mediates their engulfment²⁰, and initial experiments with PSR^{-/-} mice supported this notion^{21,22}. However, a careful analysis of PSR^{-/-} mice by Bose *et al.*²³ indicated that PSR is not involved in the engulfment of apoptotic cells, and it is unlikely to work as a receptor for PS. Here, we showed that Tim4 expressed in macrophages in various tissues mediates the engulfment of apoptotic cells by recognizing PS, indicating that Tim4 is the phosphatidylserine receptor for engulfment of apoptotic cells. Tim1 also enhanced the PS-dependent engulfment of apoptotic cells. Tim1 is expressed in kidney tubule cells post-ischaemia²⁴, suggesting that it may have a role in removing injured and dead cells, to help restore the morphological integrity of the kidney. It will be interesting to examine whether any other molecules work as phosphatidylserine receptors.

Some non-apoptotic T or B cells^{25,26} as well as macrophages²⁷ have been reported to bind annexin V. Here, we showed that the cells expressing Tim1 or Tim4 associated with exosomes that carried exposed PS. Activated Th2 cells and B cells express Tim1^{28,29}, while the resident macrophages express Tim4, suggesting that the non-apoptotic annexin V-binding cells are those that express Tim1 or Tim4. Exosomes are secreted from various cells and act as an intercellular signalling device⁷. Tim1 and Tim4 may mediate this signalling by enhancing the uptake of exosomes. Cells expressing Tim1 or Tim4 tended to aggregate (M.M. and S.N., unpublished results). PS on activated T cells is suggested to function in cell-to-cell contact at the immunological synapse²⁵. Thus, Tim1 and Tim4 may also be involved in cell-to-cell interactions via PS on exosomes. Finally, Tim family genes of human and mouse are located on a genetic interval that has linkage to a number of autoimmune diseases, such as asthma, allergy and atopy³⁰. The establishment of Tim1 and Tim4 as PS receptors may contribute to the understanding of these autoimmune diseases.

METHODS SUMMARY

Production of monoclonal antibodies. Armenian hamsters (Oriental Yeast) were immunized with mouse peritoneal cells, and about 1,200 hybridomas were established by fusing cells from the popliteal and inguinal lymph nodes with NSO^{bcl-2} mouse myeloma. The hybridoma supernatants were tested by a phagocytosis assay, and one hybridoma (Kat5-18) that inhibited the engulfment of apoptotic cells was identified.

Construction of cDNA library, and expression cloning. The double-stranded cDNA longer than 1.0 kb was ligated into a BstXI-digested pMXs vector¹⁵. *Escherichia coli* DH10B was transformed by electroporation, and about 1.0×10^6 clones were produced. Plasmid DNA from the cDNA library was introduced into PLAT-E packaging cells, and the culture supernatant was used to infect Ba/F3. A subpopulation of Ba/F3 that stained intensely with Kat5-18 was selected by repeated FACS. The integrated cDNA was recovered by PCR with the vector primers from the genomic DNA of Ba/F3 transformants.

Phagocytosis assay. To assay the engulfment of apoptotic cells, CAD^{-/-} thymocytes were induced to undergo apoptosis with leucine-zipper tagged Fas ligand, and co-cultured with peritoneal macrophages or NIH3T3/DNase II cells. The cells were fixed with paraformaldehyde, subjected to TUNEL staining, and analysed by flow cytometry using a FACSAria (BD Biosciences).

Received 10 September; accepted 26 September 2007.

Published online 24 October 2007.

- Danial, N. N. & Korsmeyer, S. J. Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219 (2004).
- Savill, J., Dransfield, I., Gregory, C. & Haslett, C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature Rev. Immunol.* 2, 965–975 (2002).
- Fadok, V. A. *et al.* Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207–2216 (1992).

- Yoshida, H. *et al.* Phosphatidylserine-dependent engulfment by macrophages of nuclei from erythroid precursor cells. *Nature* 437, 754–758 (2005).
- Tanaka, Y. & Schroit, A. J. Insertion of fluorescent phosphatidylserine into the plasma membrane of red blood cells. Recognition by autologous macrophages. *J. Biol. Chem.* 258, 11335–11343 (1983).
- Schlegel, R. A. & Williamson, P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death Differ.* 8, 551–563 (2001).
- Thery, C., Zitvogel, L. & Amigorena, S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nature Rev. Immunol.* 2, 569–579 (2002).
- Kuchroo, V. K., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. & Freeman, G. J. The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nature Rev. Immunol.* 3, 454–462 (2003).
- Nagata, S. DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 853–875 (2005).
- Hanayama, R. *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 417, 182–187 (2002).
- Hanayama, R. & Nagata, S. Impaired involution of mammary glands in the absence of milk fat globule EGF factor 8. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 16886–16891 (2005).
- Hanayama, R. *et al.* Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science* 304, 1147–1150 (2004).
- Miyasaka, K., Hanayama, R., Tanaka, M. & Nagata, S. Expression of milk fat globule epidermal growth factor 8 in immature dendritic cells for engulfment of apoptotic cells. *Eur. J. Immunol.* 34, 1414–1422 (2004).
- Hu, B., Sonstein, J., Christensen, P. J., Punturieri, A. & Curtis, J. L. Deficient *in vitro* and *in vivo* phagocytosis of apoptotic T cells by resident murine alveolar macrophages. *J. Immunol.* 165, 2124–2133 (2000).
- Kitamura, T. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol.* 31, 1007–1014 (2003).
- Kawane, K. *et al.* Impaired thymic development in mouse embryos deficient in apoptotic DNA degradation. *Nature Immunol.* 4, 138–144 (2003).
- Gaipl, U. S. *et al.* Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* 4, 189–194 (2005).
- Koopman, G. *et al.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415–1420 (1994).
- Meyers, J. H. *et al.* TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nature Immunol.* 6, 455–464 (2005).
- Fadok, V. A. *et al.* A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* 405, 85–90 (2000).
- Li, M. O., Sarkisian, M. R., Mehal, W. Z., Rakic, P. & Flavell, R. A. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 302, 1560–1563 (2003).
- Kunisaki, Y. *et al.* Defective fetal liver erythropoiesis and T lymphopoiesis in mice lacking the phosphatidylserine receptor. *Blood* 103, 3362–3364 (2004).
- Bose, J. *et al.* The phosphatidylserine receptor has essential functions during embryogenesis but not in apoptotic cell removal. *J. Biol.* 3, 15 (2004).
- Ichimura, T. *et al.* Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J. Biol. Chem.* 273, 4135–4142 (1998).
- Fischer, K. *et al.* Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood* 108, 4094–4101 (2006).
- Dillon, S. R., Mancini, M., Rosen, A. & Schlissel, M. S. Annexin V binds to viable B cells and colocalizes with a marker of lipid rafts upon B cell receptor activation. *J. Immunol.* 164, 1322–1332 (2000).
- Callahan, M. K., Williamson, P. & Schlegel, R. A. Surface expression of phosphatidylserine on macrophages is required for phagocytosis of apoptotic thymocytes. *Cell Death Differ.* 7, 645–653 (2000).
- Umetsu, S. E. *et al.* TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nature Immunol.* 6, 447–454 (2005).
- Gielen, A. W. *et al.* Expression of T cell immunoglobulin- and mucin-domain-containing molecules-1 and -3 (TIM-1 and -3) in the rat nervous and immune systems. *J. Neuroimmunol.* 164, 93–104 (2005).
- McIntire, J. J. *et al.* Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nature Immunol.* 2, 1109–1116 (2001).

Supplementary Information is linked to the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Acknowledgements We thank R. Hanayama for advice in the initial stage of this project, and M. Fujii and M. Harayama for secretarial assistance. This work was supported in part by Grants-in-Aid from the Ministry of Education, Science, Sports, and Culture in Japan.

Author Information Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to S.N. (snagata@mfour.med.kyoto-u.ac.jp).