

胞 (FLC) の増加がみられるが (図2), 骨髄細胞からこの FLC への変換については解明すべき点が多い。問題は, 骨髄で初めに増える細胞は如何なる性質を有する細胞で, 滑膜にどのような形で移動し, 細胞の機能, マーカーをどのように変化, 獲得していくかということである。Li と Makarov は, FLS は間葉系細胞の幹細胞であり, NF- κ B がこの FLS を osteogenic cell や adipogenic cell への分化を調節しているという証明を GFP マウスの培養細胞を用いておこなっている³⁾。最近, MRI (magnetic resonance imaging) などで骨髄浮腫と診断される例があり⁴⁾, 抗 CCP 抗体の高値とともに, 予後に関係しそうだと報告されているが⁵⁾, これも浮腫だけでなく, ある種の細胞が増加していることも十分考えられる。

滑膜の初期病変は bare area から始まる?

ヒトでの滑膜での初期病変は滑膜と軟骨の移行部である bare area から始まるといわれてきた。しかし, ヒトで早期 RA の滑膜を入手することは倫理上からもますます難しくなっており, ま

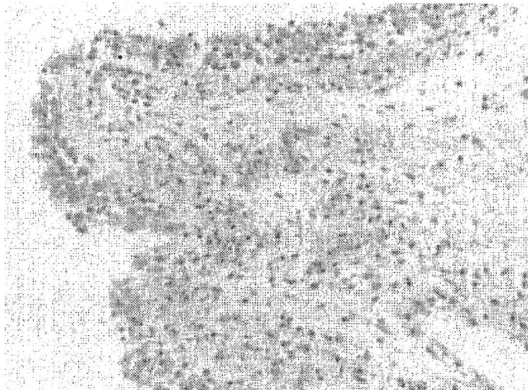


図3 RA 初期の組織像

滑膜の表層や深部には軽度の CD14, HLA/DR 陽性の細胞を認める。Bリンパ球の浸潤は時間的に遅くなる。

(文献6より引用改変)

して, bare area の組織所見をみることは, ほとんど不可能である。RA 発症1カ月例の滑膜組織では, 滑膜表層細胞の増加傾向がみられ (図3), その下の毛細血管の周囲には, HLA/DR 陽性の FLC が出現し, 次にTリンパ球の浸潤, 集簇がみられ, Bリンパ球はかなり時間を経てから出現して集簇するのが特徴であった。従って, FLS は初期の状態から RA の病変形成・進行の大きな鍵を握っている可能性があるといえる⁶⁾。しかし, 滑膜, 軟骨移行部の bare area がどのようになっているかをヒトで観察するのは不可能であり, 今後, まますます状況は厳しくなるものと思われる。そこで, このような解析には, 動物モデルが必要となってくる。

関節炎の初期病変を観察するために, 自己免疫現象を緩徐に自然発症する MRL/Mp-lpr/lpr (MRL/1) マウスを選択し, 免疫組織学的検討を行った。その結果, 生後4週の早期に bare area に近い軟骨下骨髄に炎症性細胞が集積し始め, 週

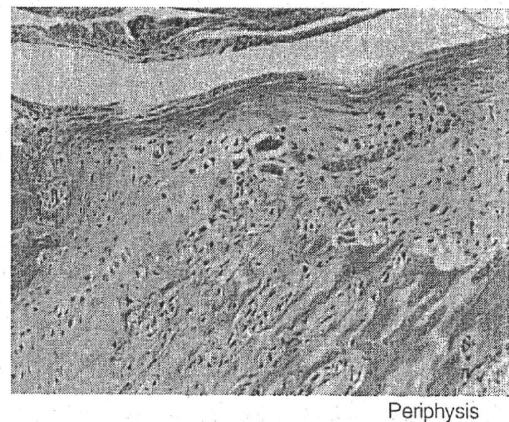


図4 MRL マウスの初期病変

マウスにおいては軟骨, 滑膜, 骨の移行部の periphysis には, IgG の沈着やマクロファージの浸潤を認める。ヒトの bare area に相当するものと思われる。

(文献7より引用改変)

MRI : magnetic resonance imaging

齢とともに、成長軟骨、骨髄に向かって次第に拡大する傾向が認められた⁷⁾ (図4)。さらに、この部位の血管の周囲のIgGや補体の沈着, Mac-1 陽性で未消化の食食物 (dense body) を有するマクロファージ, 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ

(TRAP) 陽性の多核大型細胞が認められ, これらの細胞も週齢とともに増加した。なお, コントロールに用いた DBA/1J マウスでは, 同部の炎症性変化は全く観察されなかった。この領域は, Oestreich らにより periphysis と名づけられて

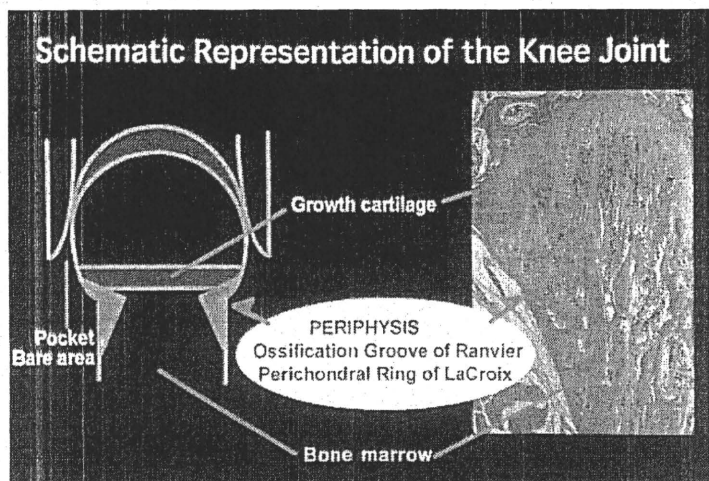


図5 Periphysis の部分のシェーマとマウスの病変

Periphysis の部分は移行部のため柔らかい結合組織と血管が認められる。

(文献7, 8より引用改変)

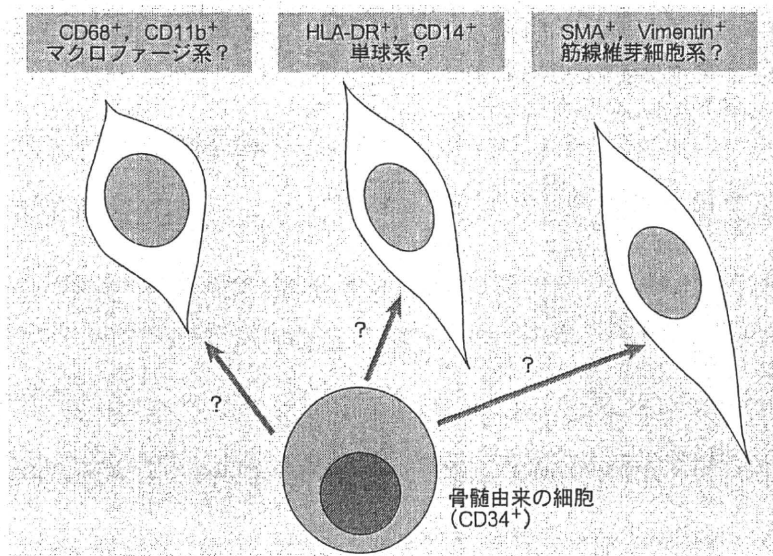


図6 線維芽細胞様細胞 (FLS) の性質

現在, FLS には ① 本来の線維芽細胞, ② 免疫担当細胞, ③ マクロファージ的細胞の3種類が考えられる。これらは主に形と免疫染色をもとに考えられているが, 同一の起源を有する細胞かどうかは不明である。

(文献1より引用改変)

TRAP : 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ

おり⁸⁾ (図5), 数種の未分化な細胞の存在する ossification groove of Ranvier と II 型コラーゲンがネットワークを形成する perichondral ring of Lacroix とから構成される。MRL/1 マウスの perichondral ring における変化は, II 型コラーゲンに対する免疫反応に引き続く軟骨破壊に関連したものと考えられるが, その根拠は, ① periphysis の細胞はマウス血清中の抗 II 型コラーゲン抗体と同時期に出現し, 炎症性変化は抗体価と相関して変動したこと⁷⁾, ② 発生の早期から無血管性組織として血液とは隔離されていた軟骨が, 組織移行部での血管が侵入する periphysis で新たに抗原として認識されることなどである。従って, モデル動物である MRL/1 マウスの periphysis の変化は, ヒト RA における初期病変と共通した所見を呈することが示唆される。

滑膜組織の細胞はどこから

旺盛な炎症を示す RA の滑膜組織をみるとリンパ球, 血管に混じって多くの FLS が認められ, この FLS は RA の滑膜炎を特徴づける重要な細胞であろうと思われるが, 今のところ, この FLS に

はいくつかの種類があると考えられる。一つは通常の線維芽細胞 (間葉系細胞としての役割) であり, 二つには情報伝達に関与する細胞であり (免疫系担当細胞), そして, 三つには骨破壊に関与する細胞 (マクロファージ系細胞) である (図6)。従来, RA は T リンパ球が主体の疾患で T Cell Disease ともいわれてきた。しかし, 最近では細胞動態や治療との関係から B Cell が RA の病態の形成に大きな比重を占めているのではないかとされている⁹⁾¹⁰⁾。以前, NK 細胞の研究が盛んだったころは, 滑膜組織に NK 細胞がほとんどいないにもかかわらず, RA は NK 細胞によって支配されているという説が流れたことがあった。形態学的に RA の組織像が時代とともに大きく変化することはないが, さまざまな因子の関与が証明されるにつれて考え方が左右されることは珍しくない。従って, 我々形態学に従事しているものの責任は, きちんと物をみて正確に記録しておくことであると思っている。

軟骨・骨破壊への過程とその因子

軟骨・骨の破壊は病理学的にみていくつかの原

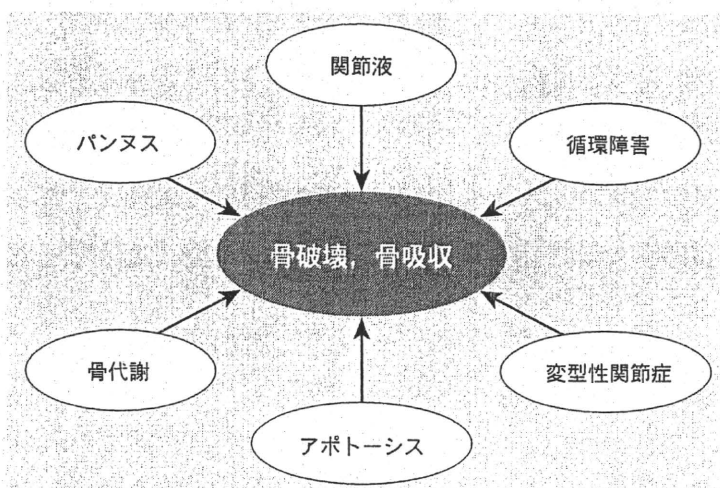


図7 軟骨・骨破壊に影響を与える因子

軟骨, 骨の吸収, 破壊にはいくつかの原因が考えられる。

(筆者ら作成)

因からなる。関節の破壊となる因子を図7にあげた。もちろん、このなかで破壊的な作用として持続的なもの、あるいは破壊に対して比重の大きなものなど因子によって異なるが、やはり、大きな影響を与えるのは炎症性肉芽組織(パンヌス)では

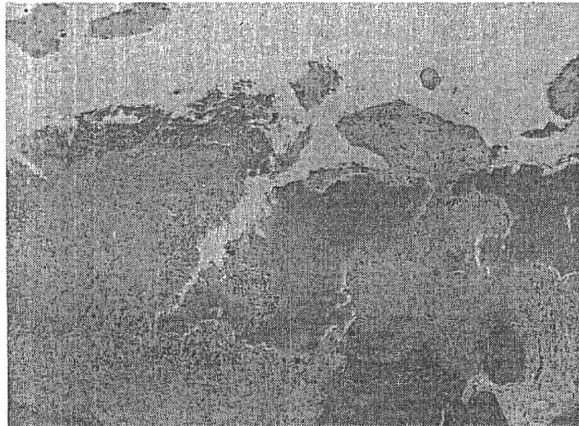


図8 RAのパンヌス

炎症性の肉芽組織であるパンヌスは腫瘍と同じように浸潤しながら軟骨、骨を破壊していく。

(文献1より引用)

ないかと思われる(図8)。このパンヌスには多くの炎症性細胞や毛細血管と、またそれぞれの細胞が産生、放出するサイトカインやタンパク分解酵素、増殖因子などが含まれている。そして、最近の生物学的製剤による治療との関係で示唆されるのはNF- α の影響が大きいという可能性であろう¹¹⁾。TNF- α を抑えることで炎症が抑制され、手術件数が減少しているという最近の傾向を考えると、この効果をだれしもが目で確認したくなるのではないかと思う。そして、最近抗CD20抗体¹²⁾、抗IL-6 receptor抗体¹³⁾などに関連した生物学的製剤なども効果が認められることから、我々はここでもう一度原点に戻って、これらのサイトカインによって支配されているRAの炎症というものを見直す必要があるのではないかと思われる。

最近の治療による組織像の変化

前述のごとく軟骨・骨の吸収、破壊の像が大き

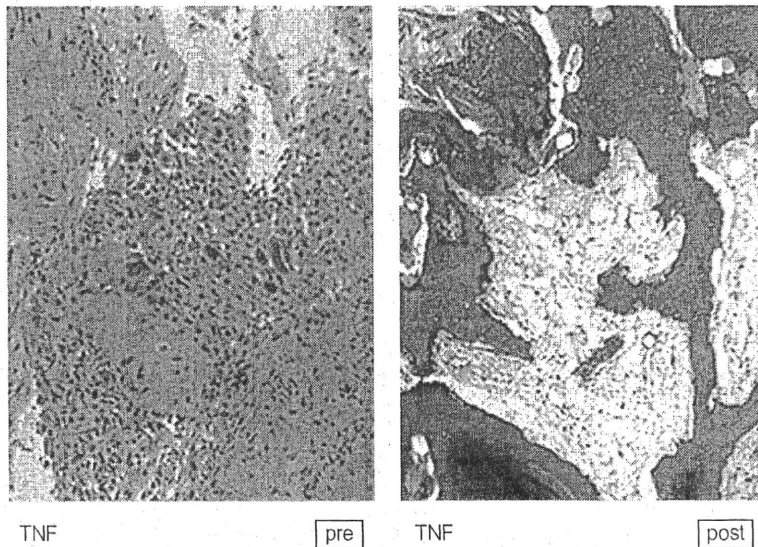


図9 SCIDマウスを利用した生物学的製剤, 抗TNF- α 抗体の治療効果の実験

ヒトの滑膜組織(左)をSCIDマウスに移植して抗TNF抗体を投与したところ、炎症性細胞浸潤が消失し(右)、治療効果が動物で実証された。

(筆者ら提供)

く変わったわけではない。ただ、最近生物学的製剤の投与とともにその炎症の特徴に違いが現れてきているような印象を受ける。図9はRA患者の滑膜組織を移植した SCID マウスに抗 TNF- α 抗体を投与した組織像である。写真左のように滑膜組織にみられた炎症性細胞は、写真右のように細胞の種類を問わずほとんど消失してしまってい

る。決して組織が壊死になっているわけではない¹⁴⁾。図10は最近、我々が経験した抗 TNF- α 抗体を投与した RA 患者の滑膜組織である。マクロファージなどの炎症性細胞はほとんど消失している。図11は炎症反応は治まったものの変形と痛みのために手術をおこなった症例であり、滑膜組織は絨毛性を保ったまま炎症性細胞が減少し、

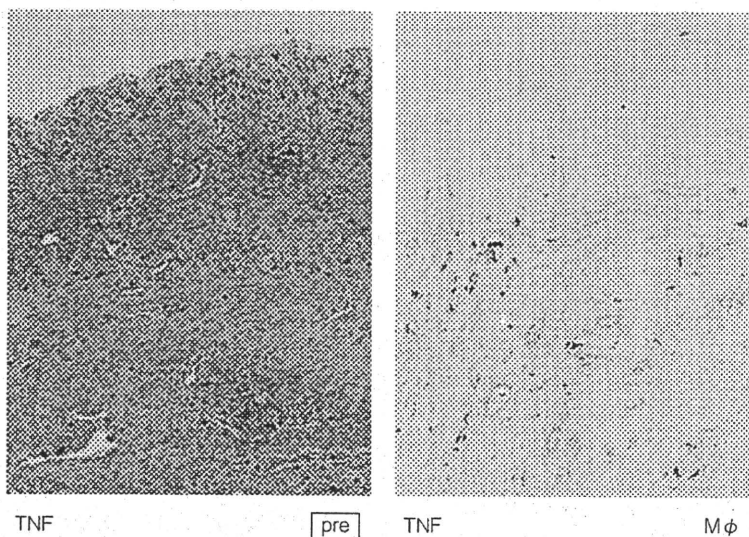


図10 RA患者に抗 TNF- α 抗体を投与したあとの滑膜組織

HE 染色では、細胞数の減弱が認められ (左)、抗 CD68 抗体で免疫染色をおこなってもマクロファージはほとんど認められない。

(文献 15 より引用)



図11 生物学的製剤(抗 TNF- α 抗体)を投与したヒトの滑膜組織

図10と同様、炎症性細胞はほとんどみられなくなる(左)、あるいは血管だけが残って、炎症性細胞がなくなる(右)。いずれにせよ炎症性細胞は減少している。

(筆者ら提供)

硝子化あるいは線維化し、毛細血管だけが目立っている。つまり、治療によって滑膜組織の炎症性細胞がなくなってしまうということである。滑膜組織に何が起こったのであろうか。単純に考えれば、炎症性細胞-血管内皮細胞との接着関係が薬剤によって阻害されたとみるべきかもしれない。その機序が接着因子の発現、Rolling、遊走の抑制などによるものかどうか、もっと他の影響があるか等などは今後の課題である。いずれにせよ、これまでみてきた炎症の慢性化による滑膜組織の萎縮とは異なり、絨毛状の形を保ったまま“化石”のように炎症性細胞が消滅してしまったと考えざるをえない。病理学的にみての問題は、滑膜の炎症と軟骨・骨破壊の進行について解離しているものがあるが、その原因については、今後、まだ解析の余地がある。

関節炎と動物モデル

ここで若干、関節炎の動物モデルについて触れる。従来、関節炎モデルは大きく、自然発症と誘発による関節炎に分類され、その後プリスタン、SKJ マウスなどの新しいモデル関節炎も追加され、病態の解明や治療の開発に利用されている。表1はこれまで利用されてきた関節炎モデルである。これまでは関節炎のモデルとしては、特にRAを対象にして誘発関節炎と自然発症のモデル動物が用いられてきた。前者は主に治療、後者は病態解明などで利用されることが多い。しかし、最近では遺伝子との関係が注目されるとノックアウト、トランスジェニックを用いた解析が利用されている。また、軟骨、骨破壊についても破壊される側である軟骨、骨などの基質の異常だけでなく、サイトカインやタンパク分解酵素の作用、これに影響を与える因子、さらにアポトーシスなど細胞内のシグナル伝達の面からも解析されている。

表1 関節炎モデル

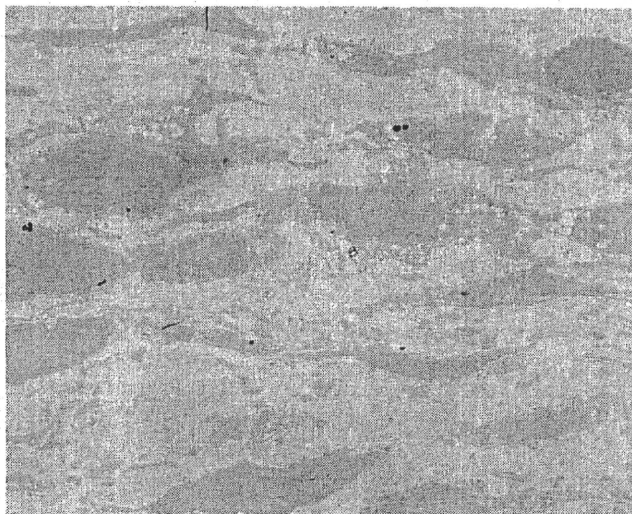
A. 自然発症関節炎モデル
1. MRL マウス関節炎
2. NZB/KN マウス関節炎
3. SKJ マウス関節炎
B. 誘発関節炎モデル
1. アジュバント関節炎
2. コラーゲン関節炎ラット
3. II型コラーゲン関節炎モデルマウス
4. 大腸菌関節炎ウサギ
5. プリスタン関節炎
6. レンサ球菌関節炎ラット
7. 塩化水銀関節炎ラット
8. 結晶誘発性関節炎
最近の関節炎モデル
1. SCID 細胞移入関節炎
2. SCID マウス組織移植関節炎
3. ノックアウトマウスを用いた関節炎モデルの解析
4. トランスジェニックマウス
5. カクテル関節炎

(筆者ら作成)

また、抗リウマチ薬が開発されると、その機序、効果については、開発されてきたモデル動物の利用がおこなわれている。動物モデルを用いての利点はその解析に時間の因子や薬剤の投与量、投与方法などを自由に組み込むことができることであり、ヒトでは解析の難しくなってきた初期病変からの組織変化の推移の観察にも有用である。その点では、動物モデルの利用はMRIなどの画像の利用と並んで、今後も関節炎解析の大きな方法である。

しかし、これらのモデル関節炎とヒトの関節炎を比較してみると組織像からみて全く同じように論じていいということではない。むしろ炎症という概括的な表現を除けば異なる面もいろいろみられる。例えば、アジュバント関節炎には顆粒系細胞はみられるもの、リンパ球がみられないし、MRL/l マウスでも滑膜に出ている多くは、リンパ球というよりはマクロファージ系の細胞である。従って、利用する場合はそれらを念頭において使っていく必要がある。ある薬剤をモデル動物に投与して関節炎を抑制したからヒトにも効果があると断定するのは早計であり、慎重な扱いが必要である。以下、我々が扱った関節炎モデルについて簡単に紹介したい。

MRL/l マウス滑膜のマクロファージ(免疫複合体を貪食した像)



1. MRL/l マウスの関節炎の解析¹⁶⁾(図 12)

MRL/l マウスの関節炎の組織像を検討した結果、滑膜組織にはマクロファージ様の細胞が多数出現し、免疫複合体を貪食していた。滑膜の炎症はみられるもののヒトのようなリンパ瀰胞の形成をみることはなく、滑膜細胞の多層化もヒトの多層化のような高度なものではなかった。

2. MRL/l マウスの骨髄の変化¹⁷⁾(図 13a, b)

MRL/l マウスの骨髄の時間による変化を MRL/n マウスとの比較で検討した。その結果、MRL/L マウスでは時間の変化とともに I-A^d、Thy1, 2 陽性細胞が増殖し、これが自己免疫の病態あるいは関節炎に大きく関与している可能性が示唆された。

3. SCID マウスによる抗 IL-6 抗体の影響¹⁸⁾(図 14)

抗 TNF- α 抗体投与と類似して、SCID マウスに移植した RA 患者の滑膜の炎症性細胞はほとんど消失する。

図 12 MRL/l マウスの滑膜組織

MRL/l マウスの滑膜組織には紡錘形の細胞が多数認められ、免疫複合体を貪食している像が認められる。ヒトの RA 滑膜のようなリンパ球の浸潤は目立たない。
(文献 16 より引用改変)

4. アジュバント関節炎¹⁹⁾ (図 15)

Freund Conjugate Adjuvant (FCA) の投与後、24 時間ぐらいで関節には炎症がおこり、初期は顆粒系、後期は単球系が出現してパンススを形成する。動物モデルとしてはもっとも激しい関節炎を呈するが、リンパ球よりは顆粒細胞が目立つ炎

症である。

5. プリスタン関節炎²⁰⁾ (図 16)

鉱物油の一成分であるプリスタンを腹腔内投与して関節炎を発症し、軟骨・骨破壊が起こり、炎症性細胞としてリンパ球、形質細胞、多核巨細胞、

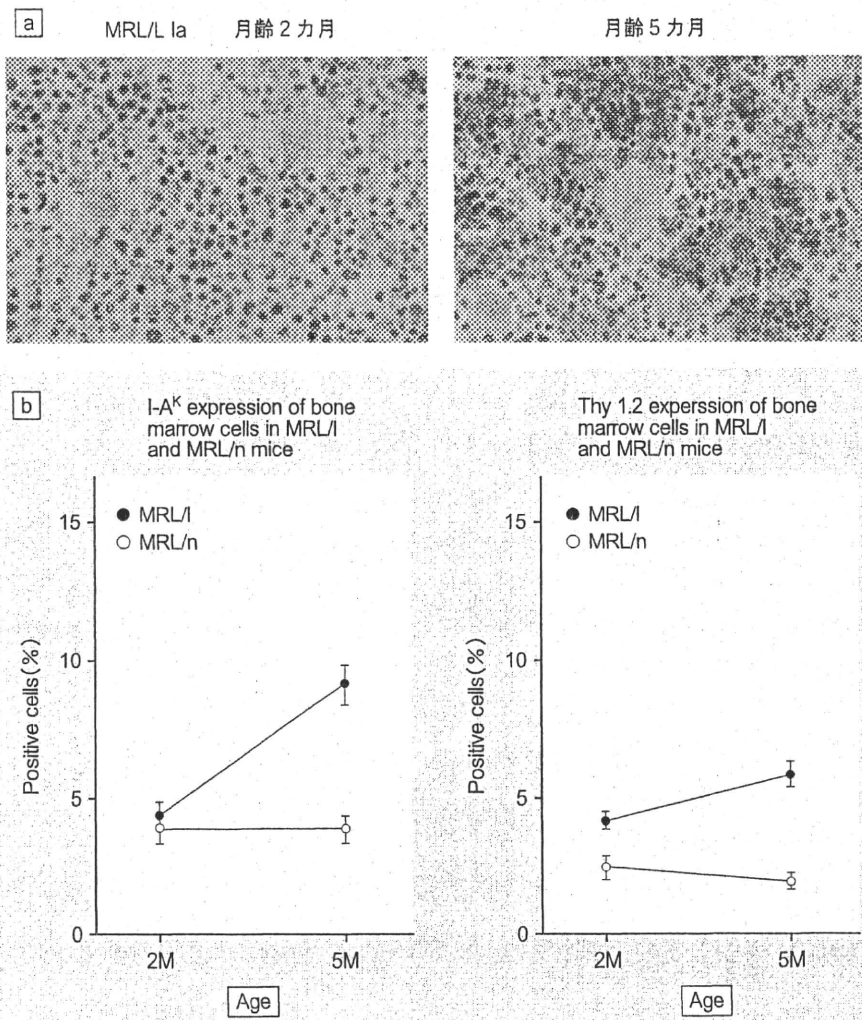


図 13a, b MRL/1 マウスの骨髄像の月齢2カ月と5カ月の変化(aは写真, bはグラフ)

I-A^kを免疫染色で検討した結果、5カ月例になるとI-A^k陽性の細胞が増加する。I-A^kはヒトのHLA/DRに相当する。同じ系統で免疫異常を発症しないMRL/nマウスにはこのようなI-A^k陽性細胞の増殖は全くみられない。Thy 1, 2についてもI-A^kほど顕著ではないが同じ傾向がみられる。(文献 17 より引用改変)

FCA : Freund Conjugate Adjuvant, GFP : Green fluorescent Protein



図 14 RA 患者の滑膜組織を SCID マウスに移植して抗 IL-6receptor 抗体を投与したあとの滑膜組織像

滑膜組織では、細胞数の減少が目立つ。

(文献 18 より引用改変)

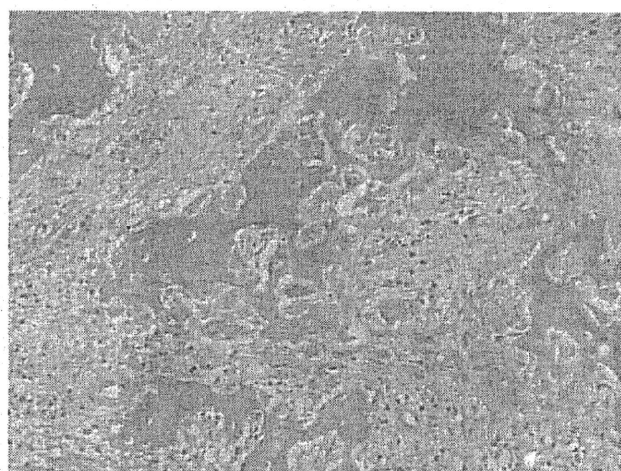


図 15 ウサギで発症させたアジュバント関節炎

顆粒球を主体とする激しい炎症性変化と破骨細胞の活性化により、高度の骨吸収が認められる。抗リウマチ薬の開発のために作成したアジュバント関節炎である。

(文献 19 より引用改変)

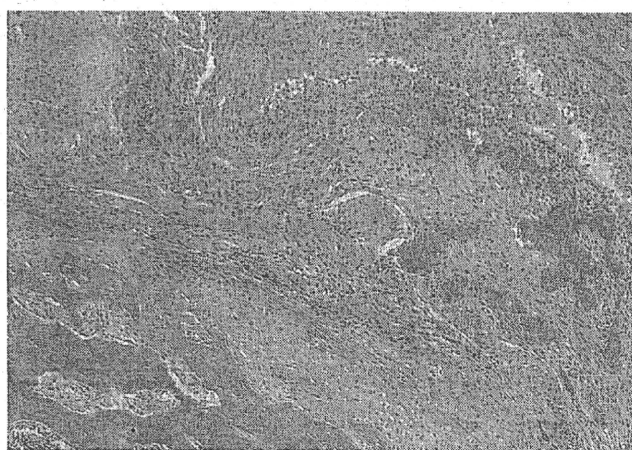


図 16 プリスタン関節炎

プリスタン投与によって誘発した関節炎を用いて、接着分子発現の実験を抑制することで抗リウマチ薬の開発中に利用した。プリスタン関節炎は、炎症がアジュバント関節炎に比較し穏やかで、発症までの時間がかかるために経過をみながらの薬剤の投与実験が可能となる。

(文献 20 より引用改変)

組織球の浸潤がみられる。自己抗体も出現し、SLE モデルの解析としても扱われている。

6. Green fluorescent Protein (GFP) による細胞の解析 (図 17)

関節炎における骨髄と滑膜に浸潤する細胞の関

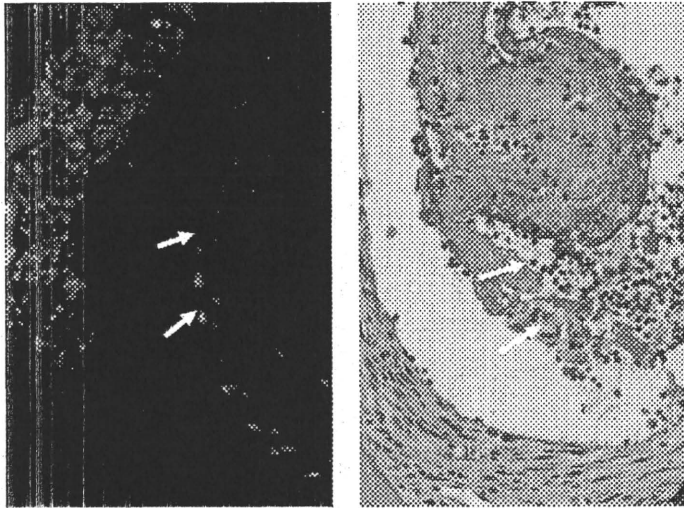


図 17 GFP マウス

放射線で骨髄を空にしたマウスに GFP の細胞を移入し、さらに関節炎の発症を試みた。その結果、骨髄で増殖した GFP 由来の骨髄細胞が関節炎の初期に滑膜に浸潤しているのが認められた。

(筆者ら提供)

連を検討するため GFP マウスを用いて細胞の性質について検討した。その結果、関節炎でみられる滑膜に浸潤する細胞は骨髄由来であることが証明され、現在、滑膜に現れる細胞のマーカー、機能を解析中である。

7. カクテル関節炎

最後に、最近しばしば利用されるカクテル関節炎を紹介したい。これは、コラーゲン関節炎の一種で関節炎の発症の経験のない方でも簡単に扱うことができるが、発症に用いる試薬の値段の少々高いのが難である。II 型コラーゲンに対する 4 種類の抗体からなるカクテルで、これを尾静脈あるいは腹腔に注射し、数日後に LPS を腹腔に打つだけで 2、3 日するとほとんど 100% のマウスに関節炎が発症する。関節では、図 18 のようにヒト RA のパンヌスに類似した像が認められる²¹⁾。

このように、モデル動物では、ヒトでは制約が多く、利用できない部分を扱うことも可能であり、利用のされ方も時代とともに変化してきている。

しかし、培養実験と同様に動物モデルはあくまでもモデルであり、ヒトとは異なることを念頭において用いるべきである。また、最近のように目

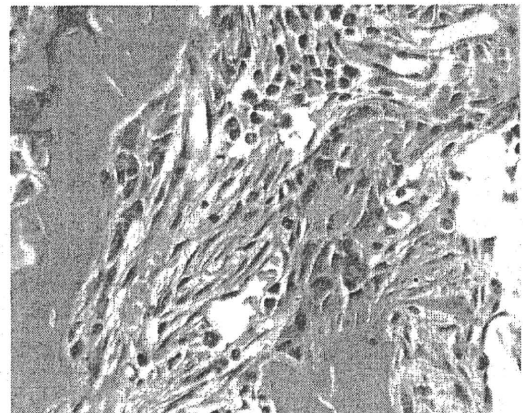


図 18 C57BL/6J マウスで発症したカクテル関節炎

2、3 日でヒトのパンヌスに類似した炎症性肉芽組織が形成される。

(筆者ら提供)

覚ましい治療の進歩によってヒトでの病態解析がかなり可能になってくると、動物モデルの利用方法も考えていく必要があるように思われる。

■ おわりに

最近、話題になっている治療の影響、RA の発現に関与する細胞、特に FLS を中心にとりあげてみた。治療については、これからも新しい薬剤が次々開発されるであろうし、初期病変の解析も動物モデルを用いながら着実に進められている。病

理組織学的解析というのは、一見ふるい前近代的な解析方法と思われるかもしれないが、実は裏を返せばもっとも確実な解析方法といえる。

この稿を終えるにあたり、共同研究者である田中真希、森 士郎、松野博明各先生方に深謝する。

なお、本研究の一部は厚生労働省「免疫アレルギー疾患等予防・治療研究事業」(越智班)の研究助成によるものである。

文 献

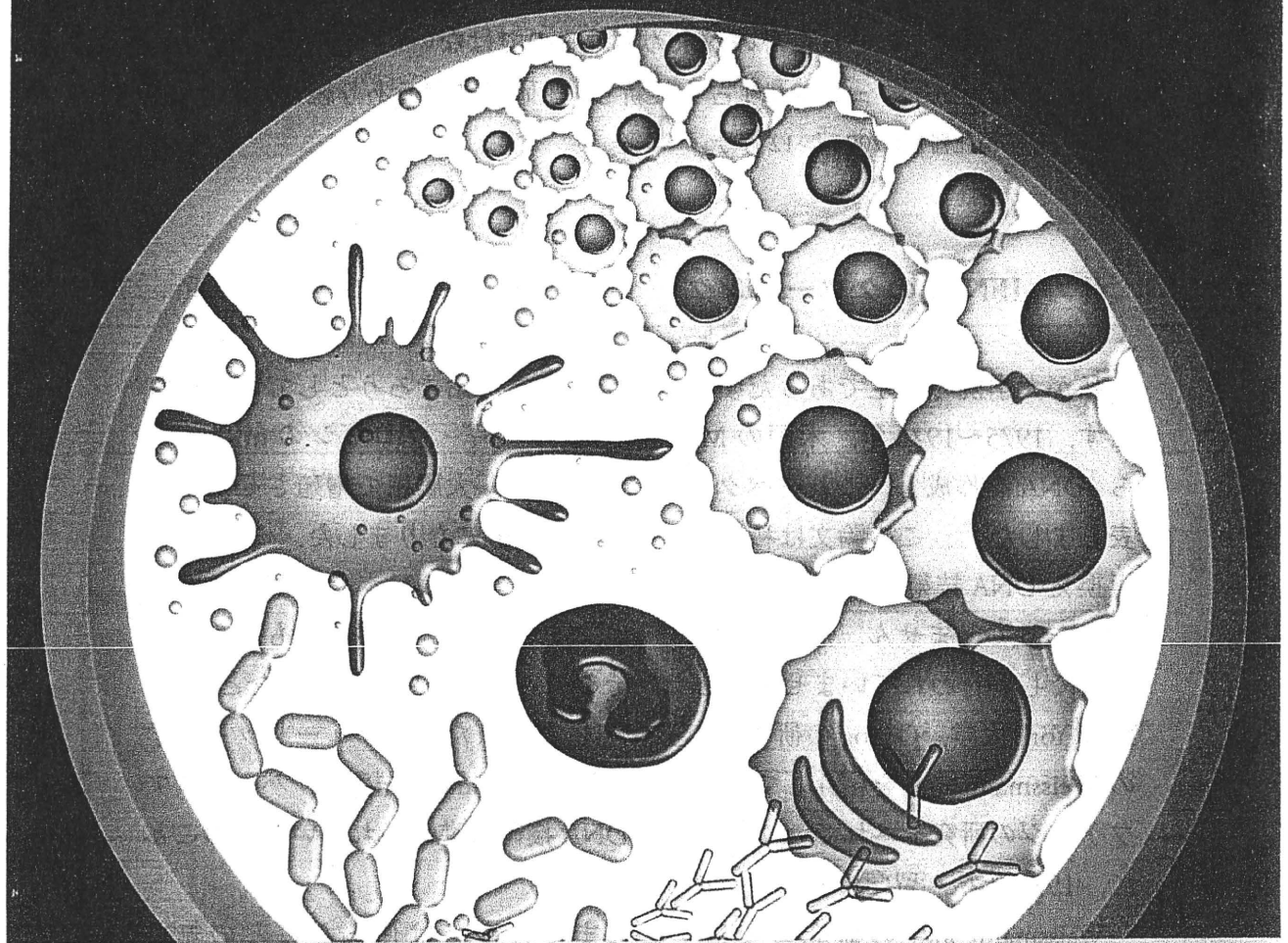
- 1) 澤井高志, 宇月美和ほか: 滑膜の炎症から骨破壊まで. 関節リウマチ最新医学別冊 (宮坂信之編), 最新医学社. 大阪, p26-41, 2008.
- 2) Tomita T, Kaneko M, Takano H, et al: Bone marrow plays an important role in joint destruction in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Calcium* **11**: 561-567, 2001.
- 3) Li X, Makarov SS: An essential role of NF- κ B in the "tumor-like" phenotype of arthritic synovial cells. *PNAS* **103**: 17432-17437, 2006.
- 4) Kawakami A, Tamai M, Eguchi K, et al: Classification of early arthritis patients and how to determine disease severity. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi* **30**: 37-40, 2007.
- 5) Mathsson L, Mullazehi M, Wick MC, et al: Antibodies against citrullinated vimentin in rheumatoid arthritis: higher sensitivity and extended prognostic value concerning future radiographic progression as compared with antibodies against cyclic citrullinated peptides. *Arthritis Rheum* **58**: 36-45, 2008.
- 6) 澤井高志, 大山 明ほか: 慢性関節リウマチ滑膜初期病変の免疫組織化学的検討—モノクロナル抗体を用いた炎症性細胞の定性ならびに定量的解析—. *リウマチ* **30**: 247-254, 1990.
- 7) Tanaka M, Fujii K, Tsuji M, et al: Autoimmune reaction to type II collagen and cartilage degeneration in MRL/Mp-lpr/lpr mouse. *Rheumatol Int* **24**: 84-92, 2004.
- 8) Ralphs JR, Benjamin M: The joint capsule structure, composition, again and disease. *J Anatomy* **184**: 503-550, 1994.
- 9) Magalhães R, Stiehl P, Morawietz L, et al: Morphological and molecular pathology of the B cell response in synovitis of rheumatoid arthritis. *Virchows Arch* **441**: 415-427, 2002.
- 10) Kondo S, Akashi T, Katsuta H, et al: B cell as key contributors in determining the level of immune responses B cell targeted therapy in patients with autoimmune diseases. *Fukuoka Igaku Zasshi* **96**: 86-92, 2005.
- 11) Chu CQ, Field M, Feldmann M, et al: Localization of tumor necrosis factor alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **34**: 1125-1132, 1991.
- 12) Genovese MC, Kaine JL: ACTION Study Group: Ocrelizumab, a humanized anti-CD20 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I/II randomized, blinded, placebo-controlled, dose-ranging study. *Arthritis Rheum* **58**: 2652-2661, 2008.
- 13) Nishimoto N, Yoshizaki K, Miyasaka N, et al: Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* **50**: 1761-1769, 2004.
- 14) Matsuno H, Yudoh K, Katayama R, et al: The role of TNF-alpha in the pathogenesis of inflammation and joint destruction in rheumatoid arthritis (RA): a study using a human RA/SCID mouse chimera. *Rheumatology (Oxford)* **41**: 329-337, 2002.
- 15) 澤井高志: 慢性関節リウマチの病態と発生機序現代病理学大系 補遺3 (飯島宗一編). 中山書店, 東京, p165-176, 1996.
- 16) 澤井高志, 京極方久: MRL/l マウス, 難治疾患のモデルと動物実験 —ヒト疾患との共通理解のために—. 京極方久監修. ソフトサイエンス社, 東京, p232-243, 1984.
- 17) 森 士郎, 能勢真人ほか: MRL/Mp-lpr/lpr マウスにおける関節炎の成因と骨髄細胞の関与. 臨床

- 免疫 23 : 1428-1435, 1991.
- 18) Matsuno H, Sawai T, Nezuka T, et al : Treatment of rheumatoid synovitis with anti-reshaping human interleukin-6 receptor monoclonal antibody. *Arthritis Rheum* 41 : 2014-2021, 1998.
- 19) 澤井高志, 宇月美和ほか : アジュバント関節炎の病理. *分子リウマチ* 1 : 255-260, 2004.
- 20) Satoh M, Reeves WH : Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristine. *J Exp Med* 180 : 2341-2346, 1994.
- 21) Terato K, Harper DS, Griffiths MM, et al : Collagen-induced arthritis in mice : synergistic effect of *E. coli* lipopolysaccharide bypasses epitope specificity in the induction of arthritis with monoclonal antibodies to type II collagen. *Autoimmunity* 22 : 137-147, 1995.

サイトカインハンティング

—先頭を駆け抜けた日本人研究者たち—

日本インターフェロン・サイトカイン学会 [編]



今だから語れる生命科学の歴史

サイトカインハンティングの歴史を辿ってみると、それはバイオ・免疫学の発展の歴史でもある。サイトカインハンティングを通じてバイオ技術が発展し、その先頭を駆け抜けた研究者たちは、また、免疫学の今の繁栄に貢献した研究者たちでもあった。

京都大学学術出版会

は後者のメカニズムを巧妙に利用する仕組みが判明しており、この細胞による適応免疫系の増強に深く関与している。

実際、過度の IFN 産生、シグナル伝達が免疫寛容の破綻につながる、という報告が最近とくに注目されている。しかしながら、IFN と自己免疫、となるとそのメカニズムは依然としてよく解明されてはいない。IFN を通じて免疫寛容の仕組みがどこまで明らかになるのか、興味深いところであるが、新しいコンセプトといったものが求められるのではないと思われる。このように、インターフェロンは「古くて新しい」研究課題であり続けている。

初出：『分子消化器病』2006年12月号

4▶▶▶IFN- α のクローニング

長田 重一

私が大学院の学生であった頃は、遺伝子工学が始まろうとしていた時期です。1975～1976年、米国の Maniatis らがウサギ・グロビンの mRNA から cDNA を作成し、これをベクターに組み込み、大腸菌で増殖させたと発表しました^{1,2)}。この論文は私にとって大きな転機になりました。この技術、組換え DNA 技術を習いたいと思いましたが、当時の日本ではどの研究室でもやっていません。危険な技術だと思われていて、世界的にも限られた場所で行われていませんでした。そこで、上代先生に相談したところ、New York 大学、Ochoa の研究室で上代先生と同僚だったチューリッヒ大学の Weissmann 先生を紹介して下さいました。Weissmann 先生は、バクテリアファージの研究をされていて、組換え DNA 技術も進められているとのことで、1977年秋、留学することになりました。

Weissmann 先生の研究室では、これまで日本では使ったことの無い disposable の製品 (Eppendorf tube, disposable pipette, tissue culture dish) がふんだんに用いられ、信じられないことばかりでした。まずは Q β ファージに人工的に変異を導入する実験から始めました。研究室では谷口維紹氏 (現東京大学医学部教授) がおられ、実験の手技など教えてもらいました。Weissmann 先生は 8 時過ぎに研究室に現れて毎日「What's new?」と聞いて回ります。何らかの新しいデータを用意しておかなければなりません。その圧力は強いも

のでしたが、彼との Discussion は楽しく、大変勉強になりました。

1978年からヒトのインターフェロン (IFN) の cDNA を単離する研究を始めました。最初は谷口維紹氏がこのプロジェクトを担当しましたが、彼が1978年年末帰国することになり、私が担当することになりました。(谷口維紹氏は日本の癌研究所で IFN cDNA のクローニングを続けられました。) センダイウイルスを感染させたヒト白血球から cDNA ライブラリを作成し、その2万個のクローンの中から IFN cDNA を探し出すことになります。25年も前、IFN のアミノ酸配列が決まっていない時期であり、発現クローニング法もありません。2万個のクローンを100個ずつ200個のプールにわけ、その plasmid DNA に IFN 産生細胞から調製した mRNA をハイブリダイズ、ハイブリダイズした mRNA をアフリカツメガエルの酵母細胞に注射、それを2日間培養した後、その培養液中に IFN があるかどうかバイオアッセイする。結果が出るまでに10日かかる気の遠くなるような作業です。IFN は非常に量が少なく、何万個のクローンの中に1つ位しかないと思われていました。しかしアッセイを繰り返していくうちに、100個に1個くらいのクローンが陽性になりました。Weissmann 先生は「一体これは何だ。Assay が全く動いていないではないか」と怒りましたが、こちらはそんなことは考えられない、と反論しました。すると、Weissmann 先生「君が陽性と思う大腸菌の溶解物に IFN 活性があるかどうかを調べてみる」と言い出しました。そこで大腸菌から抽出液を調製、調べてみたところ、なんと IFN の活性が見つかったのです。大腸菌がヒトの IFN を作っていたのです。1979年12月24日、研究室には一緒に仕事をしていた平秀晴氏(現岩手大学教授)、ボストンから Summer student ととして研究室に来ていた Michel Streuli の3人だけ、抱き合いました。Weissmann 先生はクリスマス休暇でスキーに行っていましたが、その日の正午に研究室に電話があり、「大腸菌が IFN をつくっている」という私の言葉を聞くと「Fantastic!」と一言。3時間後にはアルプスから研究室に戻ってきていました。それから、一週間、大腸菌で発現されているたんぱく質が実際に IFN であることを確認し、1980年の1月3日 Weissmann 先生はマイアミでの conference に向かわれました。そして、スイスへの帰国の途中、急遽、1月16日ボストンで IFN 遺伝子単離に関する講演、記者会見をされました。その内容は次の日の *New York Times* の1面に紹介されました。



図2 Charles Weissmann 博士

1月17日に Weissmann 先生が研究室に戻ってきた時には、すでに投稿すべき論文がほぼ書き上がっていました。タイプライター（当時、ワープロはない）を購入し、空港の待合室などで書かれたたさそうです。Weissmann 先生はこの論文をイギリス *Nature* の編集部に持参、数週間後レフリーから「この論文は *Nature* の front section に発表すべき論文である。」との、とてもうれしい、これまでの苦勞が一掃されるコメントをもらい、3月27日号の *Nature* に掲載されました³⁾。

IFN には抗癌作用が存在すると報告されていたことから、*Time* 誌などマスコミに大きく取り上げられました。何千もの患者さんから「分けてほしい」という手紙や電話でのリクエストが飛び込んできました。Weissmann 先生はこれらに対して、「今はそういう時期ではない。これが薬として使えるようになるまでに何年もかかる」ということを丁寧に説明して返信されました。バイオサイエンスはインパクトが非常に強くて大変面白い分野ですが、それと同時にその成果の発表にあたっては、注意をしないと世間の人達を騙す結果にもなるのだと、強く思いました。ワイスマン研究室ではその後2年間に、大腸菌を使って IFN の大量生産に成功、これを精製、サルを使った実験をし、最終的に臨床試験にまで発展していきました。臨床試験のため、IFN を研究室から搬送しようとした前の晩、Weissmann 先生は私に「明日の朝まで自分がここに倒れていたら、搬送を止めろ」と告げた後、IFN を自らに注射されました。彼の自信と責任感に圧倒されました。このような先生（図2）の研究室で4年間過ごせたということはすばらしい経験であり幸運だったと思います。

初出：『分子消化器病』2008年6月号

Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F

Jun Suzuki^{1,2}, Masato Umeda³, Peter J. Sims⁴ & Shigekazu Nagata^{1,2}

In all animal cells, phospholipids are asymmetrically distributed between the outer and inner leaflets of the plasma membrane¹. This asymmetrical phospholipid distribution is disrupted in various biological systems. For example, when blood platelets are activated, they expose phosphatidylserine (PtdSer) to trigger the clotting system^{2,3}. The PtdSer exposure is believed to be mediated by Ca²⁺-dependent phospholipid scramblases that transport phospholipids bidirectionally^{1,4}, but its molecular mechanism is still unknown. Here we show that TMEM16F (transmembrane protein 16F) is an essential component for the Ca²⁺-dependent exposure of PtdSer on the cell surface. When a mouse B-cell line, Ba/F3, was treated with a Ca²⁺ ionophore under low-Ca²⁺ conditions, it reversibly exposed PtdSer. Using this property, we established a Ba/F3 subline that strongly exposed PtdSer by repetitive fluorescence-activated cell sorting. A complementary DNA library was constructed from the subline, and a cDNA that caused Ba/F3 to expose PtdSer spontaneously was identified by expression cloning. The cDNA encoded a constitutively active mutant of TMEM16F, a protein with eight transmembrane segments⁵. Wild-type TMEM16F was localized on the plasma membrane and conferred Ca²⁺-dependent scrambling of phospholipids. A patient with Scott syndrome^{6,7}, which results from a defect in phospholipid scrambling activity^{8,9}, was found to carry a mutation at a splice-acceptor site of the gene encoding TMEM16F, causing the premature termination of the protein.

When mouse Ba/F3 cells were treated with 1.0 μ M A23187 for 15 min in the presence of 0.5 mM CaCl₂, the cells underwent necrosis or became propidium iodide (PI)-positive. However, when the same treatment was performed in Ca²⁺-free conditions, most of the cells exposed PtdSer and the PI-positive population was low (Fig. 1a). Chelating intracellular Ca²⁺ with bis-(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetra-acetic acid acetoxymethyl ester (BAPTA-AM) blocked the PtdSer exposure (Fig. 1b), indicating that the process required the mobilization of intracellular calcium. This PtdSer exposure was reversible: treatment of the PtdSer-exposing cells with BAPTA-AM at 37 °C for 5 min (Fig. 1c) or culturing them in Ca²⁺-free medium at 37 °C for 12 h (data not shown) eliminated the PtdSer from the cell surface. These results suggest that under low-Ca²⁺ conditions, A23187 mobilized the intracellular Ca²⁺, which activated a phospholipid scramblase to expose PtdSer. When the intracellular Ca²⁺ concentration was lowered, the phospholipid scramblase lost activity, and flippases returned the PtdSer to the inner leaflet.

To characterize the PtdSer-exposure process, we used its reversible nature under low-Ca²⁺ conditions to establish a cell line that overexposed PtdSer. Ba/F3 cells were treated with 1.0 μ M A23187 in the absence of calcium, and subjected to fluorescence-activated cell sorting (FACS) based on PtdSer exposure. A population (0.5–5%) that showed intense staining with Annexin V was collected, cultured for 15 h in Ca²⁺-free medium, returned to normal medium, and subjected to the next sorting. After this cycle of sorting and expansion had been repeated 12 times, the cells (Ba/F3-PS12) showed roughly 100-fold

higher staining with Annexin V than the original Ba/F3 cells (Ba/F3-PS0) on treatment with 125 nM A23187 (Fig. 1d). The sorting and expansion were repeated another seven times, and the resulting cell line (Ba/F3-PS19) was used for further studies.

There were two possible causes of the strong PtdSer exposure in Ba/F3-PS19 cells. One was the overexpression or overactivation of phospholipid scramblase, and the other was the inactivation of flippase¹⁰ that transports PtdSer from the outer to the inner leaflet of the plasma membrane. To examine which possibility was correct, DsRed-expressing Ba/F3-PS19 cells were fused with green fluorescent protein (GFP)-labelled parental Ba/F3 (Ba/F3-PS0) cells. The PtdSer-exposure response of the hybrid cells to 1.0 μ M A23187 was similar to, or slightly weaker than, that of Ba/F3-PS19 cells (Fig. 1e), suggesting that the phenotype of Ba/F3-PS19 cells was dominant to that of Ba/F3-PS0 cells, and that the phospholipid scramblase was overactivated in Ba/F3-PS19 cells. To identify the gene responsible for the enhanced phospholipid scramblase activity, a cDNA library (9.3 \times 10⁵ clones) was prepared from Ba/F3-PS19 cells, and introduced into the parental Ba/F3 cell line. The stably transformed cells were treated with 125 nM A23187, and a population that stained strongly with Annexin V was sorted (Fig. 1f). At the third cycle of sorting and expansion (Library-Derived (LD)-PS3), about 35% of the cells exposed PtdSer without A23187 treatment, and this cell population (LD-PS4) was characterized.

LD-PS4 cells carried two or three different cDNAs, but the *Tmem16f* cDNA (GenBank accession number NM_175344) was present in two independent experiments, suggesting that TMEM16F caused the PtdSer exposure. The two *Tmem16f* cDNAs identified in the different experiments contained an A-to-G mutation at nucleotide 1226, which caused an aspartic residue to be replaced by glycine at codon 409 (Fig. 2a). TMEM16A, another member of the TMEM16 family, was recently shown to be a Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel^{11–13}. However, the Cl⁻-channel activity of TMEM16F was lower than that of TMEM16A¹⁴. To examine the function of TMEM16F, the wild-type and mutant (D409G) forms of TMEM16F were tagged with Flag or monomeric red fluorescent protein (mRFP) at the carboxy terminus, and expressed in Ba/F3 or human 293T cells. Western blotting of the cell lysates with anti-Flag showed broad bands at 125 and 500 kDa on SDS-PAGE (Fig. 2b), suggesting that mouse TMEM16F (calculated molecular mass 106 kDa) is glycosylated and/or aggregated. Observation of the 293T cells expressing TMEM16F-mRFP indicated that TMEM16F is located at the plasma membrane (Fig. 2c).

Annexin V was able to bind to the Ba/F3 cells expressing the D409G mutant, but not the wild-type, TMEM16F (Fig. 2d), suggesting that the mutant TMEM16F-expressing cells constitutively expose PtdSer. This was confirmed by binding of MFG-E8, which specifically binds to PtdSer^{15,16} (Supplementary Fig. 1). Chelating the intracellular Ca²⁺ with BAPTA-AM decreased the exposed PtdSer level in the mutant TMEM16F-expressing cells (Fig. 2d). When cells expressing wild-type TMEM16F were treated with A23187, PtdSer was exposed without a lag time, reaching saturation more quickly than the vector-transformed

¹Department of Medical Chemistry, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan. ²Core Research for Evolutional Science and Technology, Japan Science and Technology Corporation, Kyoto 606-8501, Japan. ³Department of Synthetic Chemistry and Biological Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University, Katsura, Nishikyoku-ku, Kyoto 615-8510, Japan. ⁴Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester Medical Center, 601 Elmwood Avenue, Rochester, New York 14642, USA.

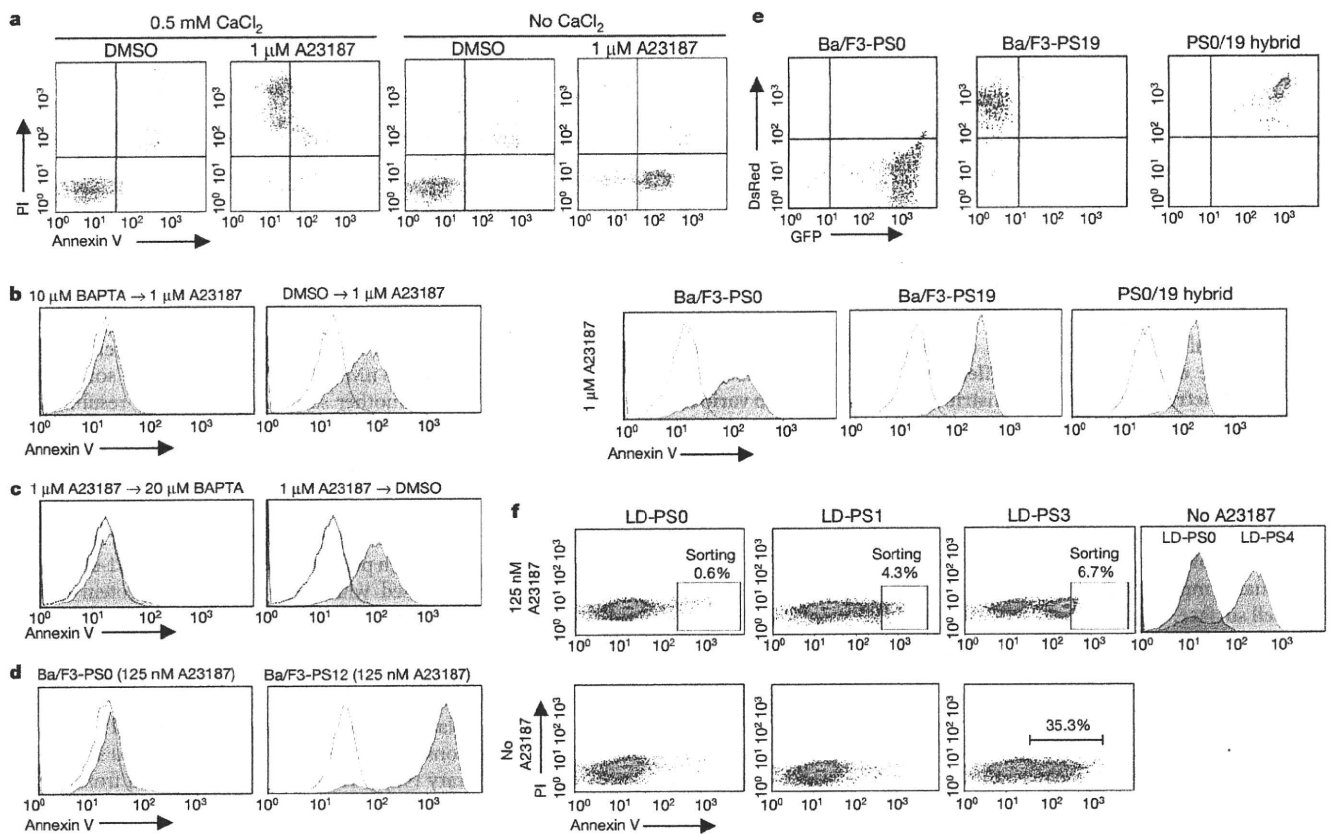


Figure 1 | Molecular cloning of TMEM16F. **a**, Ba/F3 cells were treated with A23187 with or without CaCl_2 , and stained with Annexin V and PI. DMSO, dimethylsulphoxide. **b**, Ba/F3 cells were incubated with BAPTA-AM and treated with A23187. An Annexin V profile in a PI-negative population is shown. Open curve, profile of resting cells. **c**, Ba/F3 cells were treated with A23187 and then with BAPTA-AM for 5 min, and stained with Annexin V. **d**, Ba/F3 cells and cells after sorting for 12 cycles (PS12) were treated with

A23187 and stained with Annexin V. **e**, GFP and DsRed profiles of PS0, PS19 and PS0/19 hybrid cells are shown. Bottom: the same cells were treated with A23187 and stained with Annexin V. **f**, Ba/F3 cells transformed with PS19 cDNA library were treated with A23187, stained with Annexin V and sorted (LD-PS0). Annexin V and PI profiles of cells after first (LD-PS1) and third (LD-PS3) sorting are shown. Right: Annexin V profile of original cells (LD-PS0) and after fourth sorting (LD-PS4) without A23187.

Ba/F3 cells (Fig. 2e). The intracellular Ca^{2+} concentration and the kinetics of the Ca^{2+} influx after treatment with A23187 was similar among the vector-transformed cells and those expressing wild-type and D409G mutant TMEM16F (Supplementary Fig. 2). These results indicated that TMEM16F mediates a Ca^{2+} -dependent scramblase activity for PtdSer, and that its D409G mutant is sensitized to respond to the normal intracellular concentration of Ca^{2+} to expose PtdSer.

Phospholipid scramblase mediates the bidirectional transfer between plasma membrane leaflets of all phospholipids. Cells expressing the D409G mutant TMEM16F were stained with Ro09-0198 (Supplementary Fig. 3a), a tetracyclic polypeptide that specifically binds phosphatidylethanolamine (PtdEtn)¹⁷, indicating that they constitutively exposed PtdEtn, a phospholipid that, like PtdSer, is normally sequestered to the inner leaflet. Treatment of Ba/F3 cells with A23187 caused exposure of PtdEtn. This process was accelerated by overexpressing wild-type TMEM16F (Supplementary Fig. 3b). When 1-oleoyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine (NBD-PtdCho) was added to the culture, it was quickly internalized by the D409G-mutant-expressing cells (Fig. 2f): of the cell-associated NBD-PtdCho, more than 40% became resistant to extraction with BSA within 6 min. When the cells expressing wild-type TMEM16F were treated with A23187, they incorporated NBD-PtdCho faster than the parental cells, and about 40% of the cell-associated NBD-PtdCho was inside the cells within 4 min (Fig. 2g). Similar results—that is, constitutive internalization by cells expressing the mutant TMEM16F, and enhanced A23187-induced incorporation by cells expressing wild-type

TMEM16F—were obtained with *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sphingosine-1-phosphocholine (NBD-SM) (Supplementary Fig. 4). The internalized NBD-PtdCho and NBD-SM were intact (Supplementary Fig. 5). Dynasore, which inhibits dynamin-mediated endocytosis¹⁸ inhibited the internalization of these phospholipids only slightly or not at all (Supplementary Fig. 6), suggesting that the contribution of endocytosis to TMEM16F-mediated phospholipid internalization may not be great.

Expression of endogenous TMEM16F in Ba/F3 cells was then knocked down by expressing *Tmem16f* short hairpin RNA (shRNA). As shown in Fig. 3a and Supplementary Fig. 7, the expression level of *Tmem16f* messenger RNA in five transformants was decreased to 20–35% of that in the cells expressing the control shRNA. The rate of A23187-induced exposure of PtdSer and PtdEtn was decreased in these transformants (Fig. 3b, c). Similarly, the uptake of NBD-PtdCho and NBD-SM was slower in *Tmem16f*shRNA-transformed cells (Fig. 3d, e).

Platelets and other blood cells from patients with Scott syndrome show a defect in their ability to expose PtdSer in response to a Ca^{2+} ionophore^{7,19}. B-cell lines have been established from a patient with Scott syndrome and from the patient's parents²⁰. In agreement with previous reports^{8,20}, the patient-derived cells did not expose PtdSer in response to a Ca^{2+} ionophore (Fig. 4a). In contrast, A23187 elicited PtdSer exposure in cell lines derived from the patient's parents at the same levels as in cell lines from healthy volunteers. An RT-PCR analysis of the *TMEM16F* mRNA (GenBank accession number NM_001025356) showed that the 5' part (1,320 base pairs (bp)), corresponding to exons

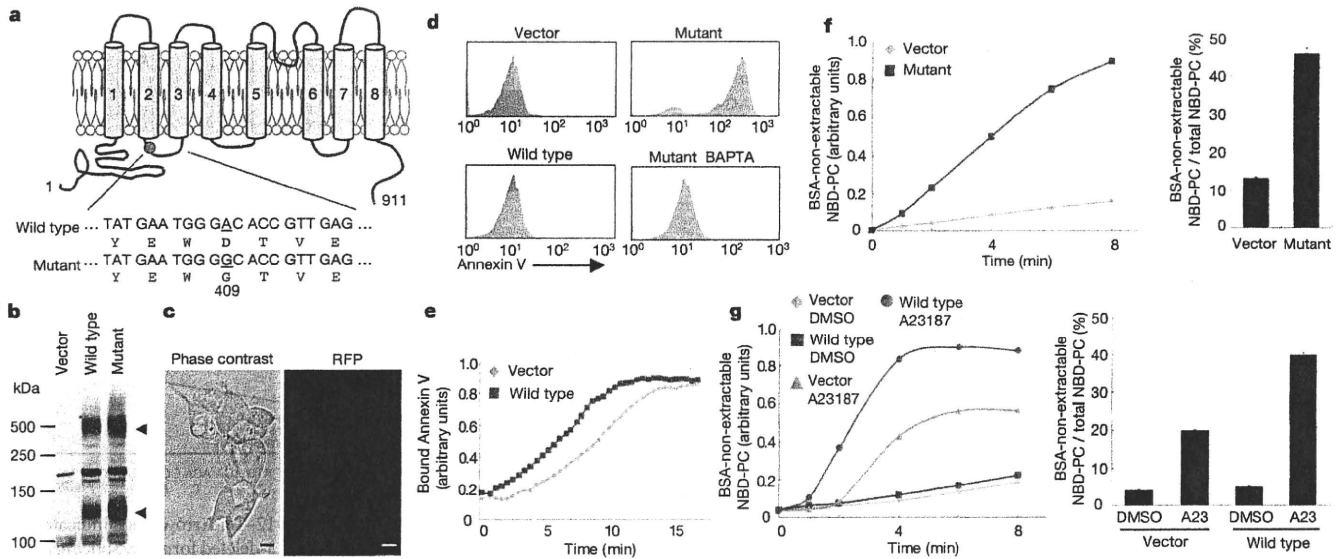


Figure 2 | Phospholipid scrambling in TMEM16F-expressing cells. a, Schematic representation of mouse TMEM16F and D409G mutant. b, Western blotting of Ba/F3 cells expressing Flag-tagged wild-type and mutant TMEM16F with anti-Flag. Arrowheads, monomer and multimer of TMEM16F. c, 293T cells expressing TMEM16F-mRFP were observed under a fluorescent microscope. Scale bars, 10 μ m. d, Vector-transformed Ba/F3 cells, or cells expressing wild-type or mutant TMEM16F, were stained with Annexin V with or without pretreatment with BAPTA-AM. e, Vector-transformed or wild-type TMEM16F-Ba/F3 cells were preincubated with Annexin V. After addition of A23187, the fluorescence was monitored. The y axis shows fluorescence intensity on FACS. f, Vector-transformed or mutant

TMEM16F-expressing Ba/F3 cells were incubated for 8 min at room temperature (26–27 °C) with 0.5 μ M NBD-PtdCho in Hanks balanced salt solution containing Ca^{2+} . After dilution with fatty-acid-free BSA buffer, the fluorescence intensity was determined by FACS. g, Vector-transformed or wild-type TMEM16F-expressing Ba/F3 cells were preincubated at 4 °C with 0.1 μ M NBD-PtdCho. A23187 (A23) was added and incubated for 8 min at room temperature, and internalized NBD-PtdCho was determined as above. In f and g the percentage of BSA-non-extractable NBD-PtdCho was determined in triplicate at 4 min (f) or 6 min (g) after the addition of NBD-PtdCho and is plotted as mean and s.d. All experiments were performed at least three times.

1–12, was identical in the patient and the parents, whereas its 3' half, corresponding to exons 11–20, was shorter in the patient than in the parents (Fig. 4b). A sequence analysis indicated that the cDNA of the patient lacked the 226-bp sequence corresponding to exon 13. Direct

sequencing of the chromosomal DNA indicated that the *TMEM16F* gene of the patient carried a G-to-T homozygous mutation at the splice-acceptor site in intron 12, whereas both parents were heterozygous for the mutation at this position (Fig. 4c). PCR analysis of the *TMEM16F* mRNA with primers at exons 12 and 16 showed a 608-bp band from the control and a 382-bp band from the cell line from the patient with Scott syndrome (Fig. 4d), indicating that a mutation in the splice acceptor site caused exon 13 to be skipped. This skipping caused a frame shift resulting in the premature termination of the protein in exon 14 (Fig. 4e) at the third transmembrane segment of human TMEM16F (Fig. 4f). The non-sense-mediated mRNA decay²¹ may explain the decreased concentration of the exon-13-deleted form of *TMEM16F* mRNA in the patient's parents (Fig. 4d).

Repeated FACS analysis has been used previously to establish cell lines that overexpress a particular cell-surface protein^{22,23}. Here, this method yielded TMEM16F carrying a point mutation that rendered the process extremely sensitive to Ca^{2+} , such that in the cells expressing the mutated TMEM16F the phospholipid scramblase functioned even in resting cells, in which the cytosolic Ca^{2+} concentration was below 100 nM (ref. 24). The TMEM16 family, to which TMEM16F belongs, consists of ten members in humans and mice⁵. The founding member of the family, human TMEM16A, is a Ca^{2+} -dependent Cl^- channel^{11–13}. Although the direct binding of Ca^{2+} to TMEM16 members has yet to be demonstrated, the amino-terminal region of TMEM16A seems to have a regulatory role²⁵. Similarly, the increased sensitivity of the D409G mutant to Ca^{2+} suggests that either Ca^{2+} or a Ca^{2+} -sensing molecule binds to this N-terminal region of TMEM16F. The overexpression of TMEM16A in Ba/F3 cells had no effect on the ionophore-induced exposure of PtdSer (data not shown), suggesting that different members of this family have distinct functions. The PtdSer exposure or scrambling of phospholipids occurs in other biological processes^{14,26–29}, such as apoptotic cell death, the fusion of muscle, bone or trophoblast cells, and the release of neurotransmitters and microvesicles. It will be

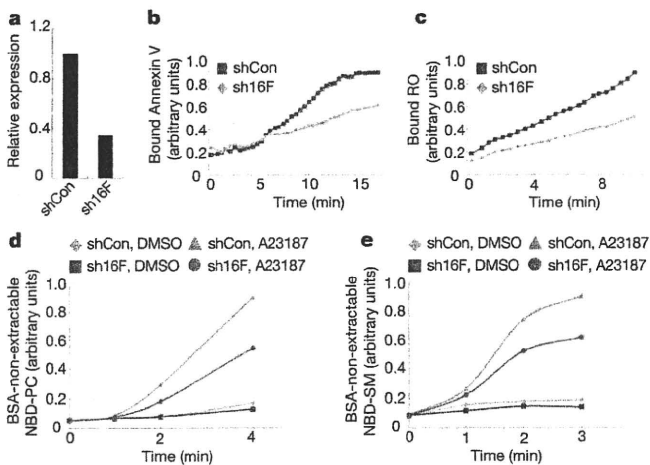


Figure 3 | Requirement of TMEM16F for phospholipid scrambling. a, Ba/F3 transformants expressing shRNA for *Tmem16f* (sh16F) or scrambled shRNA (shCon). *Tmem16f* mRNA level was normalized to β -actin mRNA and is shown as relative expression. b, c, Ba/F3 cells expressing sh16F or shCon were preincubated with Cy5-Annexin V (b) or biotin-Ro09-0198 (RO) and allophycocyanin (APC)-labelled streptavidin (c). A23187 was added and fluorescence was monitored. d, e, Ba/F3 cells expressing sh16F or shCon were preincubated with 0.5 μ M NBD-PtdCho (d) or NBD-SM (e) in Hanks balanced salt solution containing Ca^{2+} . A23187 was added, incubated and diluted with fatty-acid-free BSA buffer, and fluorescence was determined. Experiments in b–e were performed at least three times.

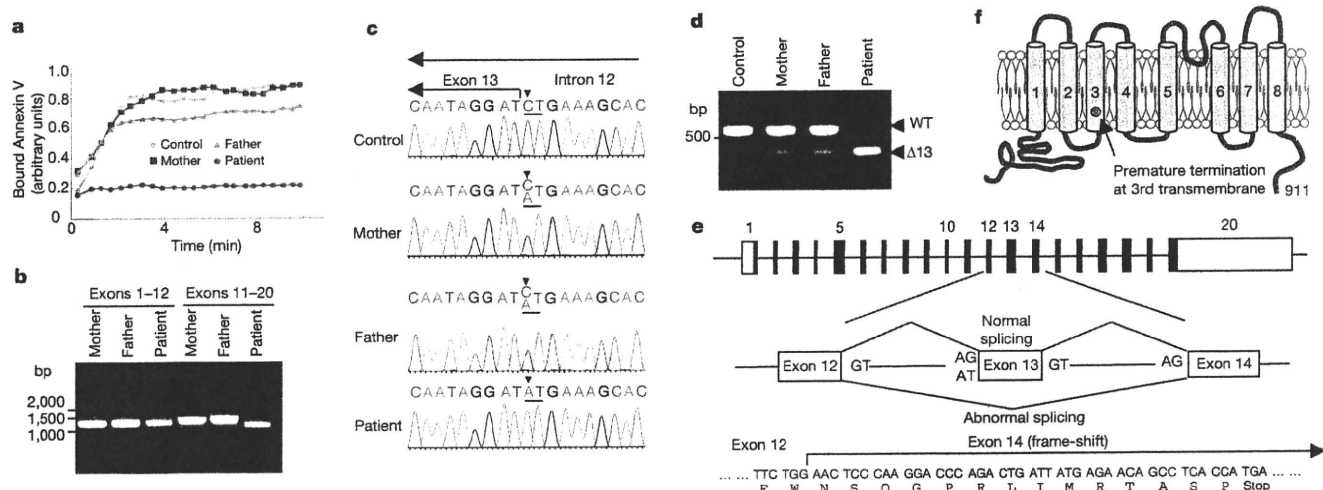


Figure 4 | A splice mutation of *TMEM16F* in a patient with Scott syndrome. **a**, Cells from control, from a patient with Scott syndrome and from the patient's parents, were preincubated with Annexin V. A23187 was added and fluorescence was monitored. **b**, RT-PCR for *TMEM16F* mRNA for exons 1–12 and 11–20 with RNA from the patient and parents. **c**, The junction between exon 13 and intron 12 of the *TMEM16F* gene sequenced from the 3' end. The CT complementary to the splice acceptor site AG is underlined. Arrowheads

indicate the mutation. **d**, RT-PCR for exons 12–16. Arrowheads indicate fragments for the wild-type (WT) and exon-13-deleted forms. **e**, Splicing in the patient's *TMEM16F* gene. The mutation causes the skipping of exon 13, resulting in a frame-shift mutation in exon 14. **f**, Schematic representation of the frame-shift mutation in the Scott patient that causes premature termination in the third transmembrane region of *TMEM16F*.

interesting to study whether *TMEM16F* and/or its related members in the *TMEM16* family are involved in these processes.

METHODS SUMMARY

To expose PtdSer reversibly on the cell surface, Ba/F3 cells were treated at 37 °C with A23187 under Ca²⁺-free conditions. The exposed PtdSer was detected by binding of Annexin V at 4 °C in Ca²⁺-containing Annexin V-binding buffer. A subline (Ba/F3-PS19) of Ba/F3 cells that was extremely sensitive to Ca²⁺-ionophore-elicited PtdSer exposure was selected by repeating the sorting 19 times with FACSAria (BD Bioscience). A cDNA library was established with mRNA from Ba/F3-PS19 cells in retrovirus vector, and the cDNA (*Tmem16f*) that caused Ba/F3 cells to expose PtdSer constitutively was identified by expression cloning. The Epstein–Barr virus (EBV)-transformed cell lines from a patient with Scott syndrome and from the patient's parents were described previously²⁰. The *TMEM16F* mRNA in these cell lines was analysed by RT-PCR. The *TMEM16F* chromosomal gene was amplified by PCR from the genomic DNA of the cell lines, and was directly sequenced by cycle sequencing with an ABI 3100 genetic analyser (Applied Biosystems). Exposure of PtdSer and PtdEtn on the cell surface was analysed by the binding of Cy5-labelled Annexin V and biotin-labelled Ro09-0198 (ref. 17), respectively. The internalization of NBD-PtdCho and NBD-SM was analysed by the BSA-extraction method essentially as described³⁰. For the knock-down experiment, shRNA-retrovirus vectors for *Tmem16f* and control scrambled sequence were obtained from OriGene, and the resultant retrovirus was used to infect Ba/F3 cells.

Full Methods and any associated references are available in the online version of the paper at www.nature.com/nature.

Received 19 April; accepted 13 October 2010.

Published online 24 November 2010.

- Leventis, P. A. & Grinstein, S. The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu. Rev. Biophys.* **39**, 407–427 (2010).
- Zwaal, R. F., Comfurius, P. & Bevers, E. M. Lipid–protein interactions in blood coagulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 433–453 (1998).
- Lentz, B. Exposure of platelet membrane phosphatidylserine regulates blood coagulation. *Prog. Lipid Res.* **42**, 423–438 (2003).
- Balasubramanian, K. & Schroit, A. Aminophospholipid asymmetry: a matter of life and death. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 701–734 (2003).
- Galletta, L. The *TMEM16* protein family: a new class of chloride channels? *Biophys. J.* **97**, 3047–3053 (2009).
- Weiss, H. & Lages, B. Family studies in Scott syndrome. *Blood* **90**, 475–476 (1997).
- Zwaal, R., Comfurius, P. & Bevers, E. Scott syndrome, a bleeding disorder caused by defective scrambling of membrane phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1636**, 119–128 (2004).
- Williamson, P. et al. Phospholipid scramblase activation pathways in lymphocytes. *Biochemistry* **40**, 8065–8072 (2001).

- Wielders, S. J. et al. Absence of platelet-dependent fibrin formation in a patient with Scott syndrome. *Thromb. Haemost.* **102**, 76–82 (2009).
- Daleke, D. Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**, 821–825 (2007).
- Caputo, A. et al. *TMEM16A*, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity. *Science* **322**, 590–594 (2008).
- Schroeder, B., Cheng, T., Jan, Y. & Jan, L. Expression cloning of *TMEM16A* as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell* **134**, 1019–1029 (2008).
- Yang, Y. et al. *TMEM16A* confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature* **455**, 1210–1215 (2008).
- Schreiber, R. et al. Expression and function of epithelial anoctamins. *J. Biol. Chem.* **285**, 7838–7845 (2010).
- Shi, J. & Gilbert, G. Lactadherin inhibits enzyme complexes of blood coagulation by competing for phospholipid-binding sites. *Blood* **101**, 2628–2636 (2003).
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miwa, K. & Nagata, S. Expression of developmental endothelial locus-1 in a subset of macrophages for engulfment of apoptotic cells. *J. Immunol.* **172**, 3876–3882 (2004).
- Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K. & Umeda, M. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* **232**, 430–434 (1997).
- Macia, E. et al. Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Dev. Cell* **10**, 839–850 (2006).
- Toti, F., Satta, N., Fressinaud, E., Meyer, D. & Freyssinet, J. Scott syndrome, characterized by impaired transmembrane migration of procoagulant phosphatidylserine and hemorrhagic complications, is an inherited disorder. *Blood* **87**, 1409–1415 (1996).
- Kojima, H. et al. Production and characterization of transformed B-lymphocytes expressing the membrane defect of Scott syndrome. *J. Clin. Invest.* **94**, 2237–2244 (1994).
- Shyu, A., Wilkinson, M. & van Hoof, A. Messenger RNA regulation: to translate or to degrade. *EMBO J.* **27**, 471–481 (2008).
- Kavathas, P. & Herzenberg, L. A. Amplification of a gene coding for human T-cell differentiation antigen. *Nature* **306**, 385–387 (1983).
- Suda, T., Takahashi, T., Golstein, P. & Nagata, S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand: a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* **75**, 1169–1178 (1993).
- Berridge, M., Bootman, M. & Roderick, H. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 517–529 (2003).
- Ferrera, L. et al. Regulation of *TMEM16A* chloride channel properties by alternative splicing. *J. Biol. Chem.* **284**, 33360–33368 (2009).
- Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* **140**, 619–630 (2010).
- Huppertz, B., Bartz, C. & Kokozidou, M. Trophoblast fusion: fusogenic proteins, syncytins and ADAMs, and other prerequisites for syncytial fusion. *Micron* **37**, 509–517 (2006).
- Helming, L. & Gordon, S. Molecular mediators of macrophage fusion. *Trends Cell Biol.* **19**, 514–522 (2009).
- van den Eijnde, S. et al. Transient expression of phosphatidylserine at cell–cell contact areas is required for myotube formation. *J. Cell Sci.* **114**, 3631–3642 (2001).
- Williamson, P. et al. Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells. *PLoS ONE* **2**, e729 (2007).

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