

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14519

研究課題名(和文) マウスの個体発生期における非アポトーシス型プログラム細胞死の網羅的遺伝学的解析

研究課題名(英文) Study of non-apoptotic programmed cell death during embryogenesis in mice

研究代表者

辻本 賀英 (TSUJIMOTO, YOSHIHIDE)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・研究所長

研究者番号：70132735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：プログラム細胞死は、形態形成や組織の恒常性維持などに関わっており、アポトーシスに加え、我々はネクローシス型機構も重要な役割を演じていることを報告している。我々は蛍光色素 propidium iodide を利用した独自のネクローシス型細胞死の *in vivo* イメージング法を用いこれまで網羅的・定量的解析が可能でなかったマウスの個体発生期のネクローシス型細胞死機構の役割について解析を行った。その結果、多くの時空間でネクローシス型のプログラム細胞死の存在を検出した。発生時の細胞死マップを作製しつつ、心臓の左心室における細胞死と骨形成領域で起きるプログラム細胞死の解析を続け、その重要性を検証した。

研究成果の概要(英文)：Programmed cell death has a crucial role in various biological events, including developmental morphogenesis. Recent evidence indicates that necrosis contributes to programmed cell death in addition to apoptosis. For imaging physiological necrosis *in vivo*, we developed the vital staining method using propidium iodide to identify cells with plasma membrane disruption (necrotic cells) in mouse embryos. We discover that non-apoptotic programmed death occur in various tissues and in various stages during embryogenesis. We focused on a form of necrosis at the bone surface and found the death does not occur in embryos with deficiency of the autophagy-related gene Atg9a, although it is unaffected by Atg5 knockout. We also find abnormalities of the bone surface in Atg9a knockout mice, suggesting an important role of Atg9a-dependent necrosis in bone surface formation. These findings suggest that necrosis has an active role in developmental morphogenesis.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：プログラム細胞死 ネクローシス アポトーシス オートファジー 生体イメージング 形態形成 個体発生

## 1. 研究開始当初の背景

細胞死研究はアポトーシス研究を中心に進展し、我々も多大な貢献してきたが、その大筋は解明され成熟期に至っている。しかし、以下に述べるように、哺乳動物の個体発生期の形態形成、成体組織での新旧細胞の交代や有害細胞の除去などに関わる生理的な細胞死(プログラム細胞死)におけるアポトーシスの重要性は過大評価されており、「プログラム細胞死の大半はアポトーシス機構に依る」という考え方がドグマ化していた。しかし、このドグマには強い具体的な証拠はなく、一方で、アポトーシス機構欠損マウスが正常発生する事実や *C. elegans* において生物学的意義を示すプログラム細胞死は非アポトーシス機構で担われていることなどを考えると、プログラム細胞死にアポトーシス以外の機構、つまり非アポトーシス型細胞死機構も重要な役割を演じていると考えられる。そこで我はそのような観点に立ち、解析を行った結果、実際にマウスの複数のプログラム細胞死系で(小腸絨毛上皮細胞のプログラム細胞死や脚芽の骨形成時のプログラム細胞死などに)、非アポトーシス型細胞死機構が主要な役割を演じていることを見出した。また細胞死分野で長年成功していなかった非アポトーシス型細胞死の *in vivo* イメージングに、我々は成功した。このような経緯から、哺乳動物におけるプログラム細胞死の真の理解のために、今まで特に網羅的・経時的解析が不可能であった非アポトーシス型細胞死に焦点を合わせ、特に個体発生期のプログラム細胞死の解析を行なうことを提案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では独自の非アポトーシス型細胞死の *in vivo* イメージング法と細胞死関連の幾つかのノックアウトマウスを用い、これまで網羅的・定量的解析が可能でなかった非アポトーシス型細胞死機構について解析を行い、特にマウスの個体発生中での非アポトーシス型細胞死の時空間的マップを作製し、また幾つかの細胞死については

その詳細及び役割についても解析を行い、プログラム細胞死の真の理解に貢献しようというものである。

## 3. 研究の方法

非アポトーシス型細胞死(ネクローシス)を起こした細胞(細胞膜破綻を起こしたものを) *in vivo* イメージングするために、核酸に結合する蛍光色素 propidium iodide (PI)(膜透過性を持たない)を、またアポトーシス細胞を標識するために、汎用されているアクリジンオレンジ(AO)を用いる。PIは、マウスの胎盤を通過できないので、色素はマウス胚の血管にマイクロインジェクション法により投与する。種々のステージにある妊娠マウスのマウス胚にその yolk sac 静脈よりPIとAOを投与する。一定時間(約30分)の後、マウス胚を摘出し凍結の後、クライオトームで切片を作製する。これら切片を蛍光顕微鏡下に観察し、PIとAOの蛍光シグナルを取得することにより、マウス胚における細胞死の時空間的マップを作製する。また、そこに関わる細胞死機構については、先ずは以下のKOマウスを利用して情報を得る。

- (1) Atg9a KO マウス (Atg9 は、オートファジーに関与する因子の一つである)
- (2) Atg5 KO マウス (Atg5 は、オートファジーに関与する因子の一つである)
- (3) Bax/Bak ダブル KO マウス
- (4) Caspase-9 KO マウス (Bax/Bak と caspase-9 はともに、アポトーシスに関与する重要な因子であり、これらを欠損するとアポトーシスは起きない)

## 4. 研究成果

PIとAOを用い、野生型マウスの個体発生期(E9.5~E16.5)のプログラム細胞死の時空間的観察を行った。その結果、公汎な時空間領域にAOおよびPIシグナルが観察されることが分かった。つまり広汎な時空間域でネクローシス型(非アポトーシス型)細胞死が起きていることを示している。PI陽性のネクローシス細胞の発生機序

を知るために、まずアポトーシス因子欠損マウス (Bax/Bak ダブル KO マウスおよび Caspase-9 KO マウス) で同様の観察を行った結果、アポトーシス因子欠損により消失する PI 陽性死細胞と消失しない PI 陽性死細胞が存在することが判明した。前者はアポトーシスによる2次的ネクローシスに相当するものと考えられるが、後者は、非アポトーシス型プログラム細胞死機構が intrinsic に関与する系と考えられた。特に2つの領域、心臓左心室と骨形成領域に観察された PI 陽性のプログラム細胞死の解析を継続した。骨形成領域の細胞死は、電子顕微鏡観察においても、ネクローシス型細胞死の形態(細胞膜の破綻)を示していることを確認した(PI 陽性細胞そのものの電子顕微鏡像を取得する技術を確立した)。骨形成領域のこの細胞死に関与する因子としてオートファジー関連因子 ATG9a 遺伝子を同定した。このことから、骨形成領域で起きるプログラム細胞死は、ATG9a に依存した新規の非アポトーシス型プログラム細胞死機構によると結論した。他のオートファジー関連因子である ATG5 欠損マウスでは、この細胞死は正常に起こっていたので、このプログラム細胞死はオートファジー依存的な細胞死でないと考えている。また、この細胞死が起こらない ATG9a 欠損マウス(新生児)の骨表面は骨形成不全を示していた。このことは、この骨形成に ATG9a 依存的非アポトーシス型プログラム細胞死が重要な役割を演じていることを示している。これらの成果を、Nature Communications(2016)に発表した。一方、心臓左心室で観察された非アポトーシス型プログラム細胞死に関しては、当初の予想(心筋細胞が細胞死を起こしているという予想)とは異なり、免疫組織化学的解析の結果は、左心室の血管内皮細胞が細胞死を起こしていることを示した。非常に興味深い知見である。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

1. Ito, K., Eguchi, Y., Imagawa, Y., Akai, S., Mochizuki, H. and Tsujimoto, Y. MPP+ induces necrostatin-1- and ferrostatin-1-sensitive necrotic death of neuronal SH-SY5Y cells. Cell Death Discov. 3: 17013, 2017 DOI:10.1038/cddiscovery.2017.13
2. Imagawa, Y., Saitoh, T. and Tsujimoto, Y. Vital staining for cell death identifies Atg9a-dependent necrosis in developmental bone formation in mouse. Nature Commun. 17: 13391, 2016 DOI: 10.1038/ncomms13391
3. Yamaguchi, H., Arakawa, S., Kanaseki, T., Miyatsuka, T., Fujitani, Y., Watada, H., Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. Golgi membrane-associated degradation pathway in Yeast and Mammals. EMBO J. 35(18): 1991-2007, 2016 DOI: 10.15252/embj.201593191
4. Beck, G., Shinzawa, K., Hayakawa, H., Baba, K., Sumi-Akamaru, H., Tsujimoto, Y. and Mochizuki, H. Progressive axonal degeneration of striatonigral dopaminergic neurons in calcium-independent phospholipase A2 knockout mice. PLOS One, Apr 14;11(4):e0153789 DOI: 10.1371/journal.pone.0153789
5. Sumi-Akamaru, H., Beck, G., Shinzawa, K., Kato, S., Riku, Y., Yoshida, M., Fujimura, H., Tsujimoto, Y., Sakoda, S. and Mochizuki, H. High expression of  $\alpha$ -synuclein in damaged mitochondria with PLA2G6 dysfunction. Acta Neuropathol. Comm. 4: 27, 2016 DOI: 10.1186/s40478-016-0298-3
6. Beck, G., Shinzawa, K., Hayakawa, H., Baba, K., Yasuda, T., Sumi-Akamaru, H., Tsujimoto, Y. and Mochizuki, H. Deficiency of calcium-independent phospholipase A2 beta induces brain iron accumulation through upregulation of divalent metal transporter 1 PLOS One 10: e0141629, 2015 DOI:10.1371/journal.pone.0141629

[学会発表](計1件)

1. 伊藤奎亮、恵口豊、今川祐介、赤井周司、

## 辻本賀英

MPP+に誘導される新規ネクローシス型神経細胞死の誘導機序について

日本分子生物学会年会 2016年11月30日

横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/saibou/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

辻本 賀英 (TSUJIMOTO Yoshihide)

大阪府立成人病センター研究所・所長

研究者番号：70132735

### (2) 研究協力者

今川 佑介 (IMAGAWA Yusuke)

大阪府立成人病センター研究所・研究員

研究者番号：20614770

### (3) 研究協力者

松岡 洋祐 (MATSUOKA Yosuke)

大阪府立成人病センター研究所・非常勤研究員

研究者番号：60263258