

令和元年6月6日現在

機関番号：32661
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2016～2018
 課題番号：16K01378
 研究課題名(和文) 計画的ネクローシスのライブセルイメージング

研究課題名(英文) Live cell imaging of regulated necrosis

研究代表者

村井 晋 (MURAI, Shin)

東邦大学・医学部・助教

研究者番号：90287540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：計画的ネクローシスは細胞外刺激に応答してリン酸化酵素RIPK3が活性化されMLKLと相互作用し活性化することでおこる。我々は計画的ネクローシスの誘導を可視化するため、MLKLのRIPK3結合領域を持つFRETバイオセンサー、SMARTを開発した。SMART発現細胞に計画的ネクローシスを誘導すると膜傷害に先行してFRETが起こった。他のタイプの細胞死ではFRETは見られないことから、SMARTが計画的ネクローシスの特異的なセンサーであることが証明された。またSMARTはRIPK3活性化によりFRETをおこすため、SMARTによってRIPK3活性を可視化することに世界で初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疾患により損傷をうけた組織では、アポトーシスや計画的ネクローシスに加え、貪食されずに残った死細胞による二次的ネクローシス、ウイルス感染によるパイロトーシスや膜脂質の酸化によるフェロトーシスなど様々な細胞死が混在していることが予想される。病態の増悪を抑制するためには、それぞれの細胞死に特異的な阻害剤が有用である。本研究の成果により、計画的ネクローシスを他の細胞死と区別して検出することで、効果的な治療薬の選択が可能となる。さらに薬剤投与による計画的ネクローシスの抑制効果の解析が可能であるため、ドラッグ・スクリーニングによる新規治療薬の開発をはじめとする医療面への貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Regulated necrosis is a regulated form of necrosis that depends on RIPK3 and MLKL. To monitor the induction of regulated necrosis, we have designed FRET biosensor (KLN) which inserted the linker sequence derived from MLKL between CFP and YFP. Since KLN expression suppressed the cell proliferation, the KLN linker sequence was modified. As the result, FRET biosensor without cytotoxicity was developed and termed as SMART. SMART can monitor regulated necrosis, but not apoptosis or necrosis in vitro, indicating that SMART is a specific sensor to regulated necrosis. FRET was not observed by the knockdown of RIPK3 expression or the inhibition of RIPK3 activity, suggesting that SMART can monitor RIPK3 activity which is required the induction of regulated necrosis. Since the unphosphorylated SMART mutant can also monitor RIPK3 activation by its FRET, it was concluded that FRET of SMART is required for the interaction of RIPK3 but not phosphorylation by RIPK3.

研究分野：細胞死 細胞生物学 生化学

キーワード：MLKL RIPK3 Necroptosis FRET

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 計画的ネクローシスは炎症性サイトカインやウイルス感染など細胞外からの刺激に応答して起こるネクローシス様の細胞死である。計画的ネクローシスは虚血再還流障害や膵炎、ウイルス感染細胞の排除等に関与していることが示されている (Silke et al, *Nat Immunol*, 2015)。計画的ネクローシスはアポトーシスと異なり、Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) の放出により周囲の細胞に炎症の惹起やさらなる細胞死を誘導する。計画的ネクローシスの進行を継時的に解析することは炎症の増悪や組織の損傷に先立って細胞死の刺激がどのように伝播していくかを理解する上で非常に重要である。

計画的ネクローシスの検出方法はいずれもネクローシス様の細胞膜傷害を検出する方法であり、アポトーシス後期の細胞や単純なネクローシスと区別できない。計画的ネクローシスの検出方法として固定標本に対する免疫染色が用いられていたが、その後の DAMPs の放出との相関を証明することが不可能であった。したがって研究開始当初、計画的ネクローシスを特異的にかつ継時的にモニターする新たな実験系の開発が望まれていた。

(2) 生細胞内のタンパク質の構造あるいは状態変化を時空間的に解析する方法として 1 分子 FRET 法が知られている。1 分子 FRET 法は蛋白質の相互作用や翻訳後修飾、酵素活性の変化などの生理学的現象を FRET (蛍光共鳴エネルギー移動) として可視化できる手法である。我々は TNF および zVAD 刺激 (以下 TZ 刺激) 計画的ネクローシス誘導時に制御因子である RIPK3 が細胞死実行分子である MLKL と相互作用することで活性化することに注目し、FRET 用のプローブを作製した。このプローブをマウス線維肉腫由来 L929 細胞に導入して FRET 解析したところ、計画的ネクローシスに先行して YFP/CFP 値の上昇がおこることを確認した。すなわちこのプローブによって計画的ネクローシスを生細胞でモニターできることを見出した。

2. 研究の目的

(1) FRET 効率の変化の特異性を検討する。プローブ導入細胞にアポトーシスなどの別の種類の細胞死を誘導し、FRET 効率の上昇の計画的ネクローシスに対する特異性を検討する。またプローブをヒト由来の培養細胞に導入して FRET 解析を行い、作製したプローブの種特異性を検討する。

(2) プローブの挿入部分を改変して FRET 効率の上昇に必要な配列を特定する。特定した配列をすでに報告されている MLKL の機能部位と対応させることで FRET 効率の変化の分子機構を検討する。FRET プローブの挿入部分を改良することで細胞毒性を軽減させる。これをマウスに導入することで *in vivo* で計画的ネクローシスをモニターできるモデル動物を作製する。

3. 研究の方法

(1) YFP/CFP 値上昇の細胞死に対する特異性の検討：実験計画開始前にマウス MLKL の部分配列を挿入した FRET プローブを導入した L929 細胞では計画的ネクローシス刺激後に細胞死に先行して YFP/CFP 値が上昇することを見出していた。この YFP/CFP 値の上昇が計画的ネクローシスに特異的であることを証明するためにネクローシスおよびアポトーシスを誘導した場合にそれぞれ FRET 解析を行い、FRET が起こらないことを確認する。また計画的ネクローシス刺激にあわせて RIPK1 あるいは RIPK3 の阻害剤を添加後に FRET 解析を行い FRET が計画的ネクローシス誘導および RIPK3 活性に依存しているかを明らかにする。

(2) YFP/CFP 値上昇の動物種における特異性の検討：MLKL と RIPK3 の結合は種特異的であることが報告されている。したがってマウス MLKL 由来のプローブはヒトの RIPK3 と相互作用しないことが予想される。そこで FRET プローブをヒト培養細胞に導入する。これに計画的ネクローシスを誘導し、このときの YFP/CFP 値が変化しないことを確認する。ヒトの細胞で YFP/CFP 値の上昇がみられた時にはヒト MLKL を用いてヒト専用の FRET プローブを作製する。YFP/CFP 値の変化量についての解析結果をマウス MLKL 由来のプローブの結果と比較して、動物種による FRET 効率の違いについて検討する。

(3) FRET プローブの改良：作製したプローブは再現よく計画的ネクローシスを検出できるが、導入した培養細胞の増殖を抑制する効果があることが確認された。そこで、プローブを恒常的に発現する細胞株の樹立やトランスジェニックマウス作製のために挿入した MLKL の配列を YFP/CFP 値の上昇に必要な領域を中心にしたできるだけ短い配列に置き換えることで改良を加え、細胞増殖への影響をできるだけ軽減する。

(4) YFP/CFP 値上昇の分子機構の解明：これまでにマウス MLKL は RIPK3 によりセリン及びトレオニンがリン酸化されることが報告されている。そこでこれらのセリンをアラニンに置換した変異プローブを L929 細胞に導入して TZ 刺激後に FRET 解析を行う。解析結果からアミノ酸置換による YFP/CFP 値の上昇への影響を明らかにする。また FRET プローブと RIPK3 との会合の有無を検討するため、プローブと HA タグを付加したマウス RIPK3 (HA-RIPK3) を 293T 細胞内で共発現させる。免疫沈降による HA-RIPK3 とプローブの結合の検出からプローブの YFP/CFP 値の上

昇と RIPK3 との結合を対応づける。会合が認められた場合には、リンカー領域を短くしていき、YFP/CFP 値の解析と HA-RIPK3 との共沈降の結果から YFP/CFP 値の上昇と RIPK3 との結合の対応をさらに詳細に検討する。

4. 研究成果

(1) SMART の開発：FRET プロブのリンカー配列のうち RIPK3 との結合に必要とされている配列を残し、それ以外の配列を SAGG という 4 つのアミノ酸の繰り返し配列に置換した。これを培養細胞に導入して、計画的ネクローシスを誘導したところ FRET 効率が著しく低下した。このことから FRET には結合部位以外の配列も必要であることが明らかとなった。そこでリンカー配列のうち親水性アミノ酸からなる配列を SAGG 繰り返し配列に順次置換したものをデザインして、RIPK3 との結合および TZ 刺激により計画的ネクローシス誘導後に FRET 解析を行った。その結果リンカー配列のうち FRET に必須な最小領域を持ち、かつ細胞増殖に影響をあたえない FRET プロブの開発に成功し、これを SMART (Sensor for MLKL activation by RIPK3 based on FRET) と命名した。SMART は計画的ネクローシス誘導後に細胞膜傷害に先行して FRET が起こることによって、単一細胞レベルでイメージングできる FRET バイオセンサーとして世界に先駆けて報告することができた。

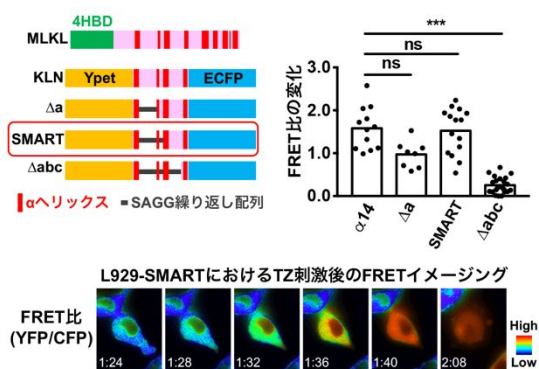


図1 SMARTのデザイン

(2) FRET のメカニズムの解明：L929 細胞における SMART の恒常的発現系を構築することができたので、これを用いて計画的ネクローシス以外の細胞死を誘導して FRET 解析を行った。TNF および RIPK3 阻害剤、GSK ' 872 によってアポトーシスを誘導して FRET 解析をおこなったが細胞死が誘導されても FRET はおこらなかった。また高濃度の H₂O₂ によってネクローシスをおこした場合においても FRET はおこらずむしろ FRET 比が低下した。これは H₂O₂ によって SMART が変性することも影響していると考えられる。これらの結果から SMART が計画的ネクローシスを特異的にモニターすることができることが明らかとなった。さらに SMART が計画的ネクローシス誘導経路の何を感じているかを詳細に研究するため、GSK ' 872 を添加して TZ 刺激した。この条件では計画的ネクローシスはおこらないが同時に FRET もおこらなかった。このことから SMART は計画的ネクローシスの RIPK3 の活性化以降の現象を感じていると予想された。しかし SMART のリンカー配列において RIPK3 のリン酸化部位であると予想されているセリン/スレオニンをアラニンに置換した非リン酸化 SMART においても RIPK3 との相互作用および計画的ネクローシス誘導後の FRET 効率にも影響がなかった。したがって FRET に必要な RIPK3 活性は SMART のリン酸化には不要であることが示唆された。そこで次に SMART が RIPK3 の自己リン酸化による MLKL との相互作用の変化をモニターする可能性について検討した。L929-SMART で siRNA によって RIPK3 をノックダウンすると TZ 刺激によっても FRET が起こらなかったことから FRET には RIPK3 が必須であることが確認できた。さらに MLKL の発現をノックダウンした場合でも RIPK3 は発現しているにも関わらず FRET はおこらなかった。そこで MLKL のノックアウトした MEF に SMART を導入して計画的ネクローシス刺激後に FRET 解析したところ、やはり FRET はおこらなかった。そこでこの細胞で RIPK3 の活性化状態を自己リン酸化レベルによって確認したところ、MLKL ノックアウトによって RIPK3 のリン酸化が強く抑制されていることが確認された。さらに MLKL ノックアウト細胞に強制的に MLKL を発現させたところ、計画的ネクローシス刺激によって RIPK3 の活性化がおこるようになり FRET も観察された。このことから MLKL は単なる RIPK3 の基質であるというだけでなく、RIPK3 と相互作用することでその活性化状態の維持に関与していることが示唆された。

(3) ヒトの計画的ネクローシスのモニター：SMART はマウスの培養細胞では、計画的ネクローシスを細胞膜の傷害に先行してモニターすることが明らかとなった。しかしヒトの培養細胞である HT29 では SMART によって計画的ネクローシスをモニターすることができなかった。これまでに RIPK3 と MLKL の相互作用には種特異性があることが報告されている。したがってマウスの MLKL 由来の配列を持つ SMART が HT29 の内在性のヒト RIPK3 と相互作用できないことが考えられる。そこで SMART のリンカー部分の配列をヒト MLKL 由来の配列に置換して新たな FRET バイオセンサー-hSMART を作製した。hSMART を HT29 に導入し、計画的ネクローシスを誘導したところ、細胞膜の傷害に先行して FRET が起こることが確認された。また HaCaT 細胞でも同様に計画的ネクローシス誘導を SMART によってモニターできたことから hSMART がヒトの細胞における計画的ネクローシスのバイオセンサーであることが確認できた。さらに FRET が GSK ' 872 の添加によって見られなくなったことから、SMART 同様、hSMART もヒトの細胞において計画的ネクローシス誘導後の RIPK3 の活性化をモニターすると考えられる。

(4)SMARTトランスジェニックマウスの作製: ROSA26 配列に SMART 遺伝子を挿入することで CAG プロモーターの下流で全身性に SMART を発現させるマウスを作製した。トランスジェニックマウスから調製した MEF、肝実質細胞、ケラチノサイト、および腹腔マクロファージにおいて SMART の発現を確認することができた。しかし発現量が FRET 解析には十分でなかったため、今後トランスジェニックマウスの作製方法などについてさらに検討をする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

村井晋、白崎義隆、中野裕康 クローズアップ実験法「FRET 解析と LCI-S によるネクロプトーシスのライブセルイメージング法」実験医学 37 巻、p1315-1321 (2019)、査読なし
Nakano H, Murai S et al. (6 人中 1 番目、2 番目) Development of novel methods that monitor necroptosis and the release of DAMPs at the single cell resolution. *Cell Stress*, Vol.3, 2019, pp.66-69, DOI: 10.15698/cst2019.02.177、査読あり
Murai S, Nakano H et al. (16 人中 1 番目、16 番目) A FRET biosensor for necroptosis uncovers two different modes of the release of DAMPs. *Nature Communications*, Vol.9, 2018, 4457, DOI: 10.1038/s41467-018-06985-6、査読あり
Sakata K, Nakano H, Murai S et al. (16 人中 3 番目、6 番目) Novel method to rescue a lethal phenotype through integration of target gene onto the X-chromosome. *Scientific Report*, Vol.6, 2016, 37200, DOI: 10.1038/srep37200、査読あり

〔学会発表〕(計 8 件)

村井 晋、ネクロプトーシスのタイムラプスイメージング、理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 XI」(招待講演)、2019.3.29
村井 晋、中野 裕康、ほか(11 人中 1 番目、11 番目) FRET バイオセンサーによるネクロプトーシス実行の 1 細胞イメージング、第 91 回日本生化学会大会、2018.9.25
Shin M, A Novel FRET Biosensor for Necroptosis Uncovers Two Different Modes of the Release of DAMPs, Gordon Research Conference (指定講演) 2018.8.8
中野 裕康、ネクロプトーシスによる生体応答制御、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(招待講演)、2017.12.8
村井 晋、中野 裕康、ほか(10 人中 1 番目、10 番目) ネクロプトーシスをモニターする FRET バイオセンサーによる DAMPs 放出メカニズムの解明、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017.12.8
村井 晋、中野 裕康、ほか(7 人中 1 番目、7 番目) SMART によるネクロプトーシス進行の継時的解析、第 26 回日本 Cell Death 学会学術集会、2017.7.24
村井 晋、1 分子 FRET によるネクロプトーシスのライブセルイメージング、第 4 回 Expert Seminar of Immunology (招待講演) 2017.5.22
村井 晋、中野 裕康、ほか(7 人中 1 番目、7 番目) ネクロプトーシスをモニターする FRET プローブの開発、第 25 回日本 Cell Death 学会学術集会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

報道関連情報

日本経済新聞「東邦大、制御された細胞死「ネクロプトーシス」の様子をイメージする技術を開発」

QLifePro 医療ニュース「制御された細胞死ネクロプトーシスの可視化に成功 - 東邦大」
Optronics online「東邦大、制御された細胞死のイメージングに成功」

ホームページ情報

https://www.toho-u.ac.jp/press/2018_index/20181029-929.html

東邦大学プレスリリース「東邦大学医学部研究グループが制御された細胞死「ネクロプトーシス」の可視化を世界で初めて実現～研究成果は英国 Nature Communications に掲載～」

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中野 裕康

ローマ字氏名：(NAKANO,Hiroyasu)

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 70276476

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山口 良文

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI,Yoshifumi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。