

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007 年度～2008 年度
 課題番号：19590310
 研究課題名 (和文) ヌクリングの関与する癌及び神経変性疾患発症機構の解明
 研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism of Nucling, a novel NF- κ B-regulatory factor, for the development of inflammatory diseases
 研究代表者
 坂井 隆志 (SAKAI TAKASHI)
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授
 研究者番号：80284321

研究成果の概要：

ヌクリングノックアウトマウスでは肝炎・肝ガンの自然発症率が生後一年を経過した集団で著増することが観察されている。これまで得られている我々も含めた研究の知見から、我々は独自にヌクリングノックアウトマウスにおける肝ガン発症機構モデルを構築してこのモデルの検証を行い、クッパー細胞死を伴った新規の肝炎・肝癌発症機序を明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌、シグナル伝達、発現制御、脳神経疾患、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

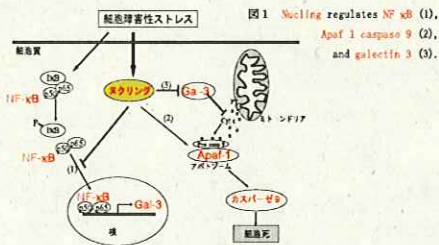
マウスヌクリング遺伝子は全長 1411 アミノ酸をコードし、またその配列中にはアンキリンリピート、ロイシンジッパーモチーフ及び二つの t-SNARE コイルドコイルドメインといったタンパク質間相互作用に重要と思われる複数のモチーフが同時に存在する構造を有する (Sakai et al. J. Biochem. 2003, (=JB 論文賞受賞))。

それまでの研究成果より、我々は本遺伝子のコードする蛋白分子が細胞障害性ストレス時に誘導される複数の細胞死 (アポトーシ

ス) 誘導情報伝達経路を制御していることを示す知見を得ていた。

ヌクリングは種々の細胞外ストレスにより細胞内に発現が誘導され、アポトーシス誘導分子 Apaf-1 と分子間相互作用して、そのアポトーシス誘導時の核移行及び細胞内発現を制御することにより、Apaf-1/カスパーゼ 9 経路 (アポトゾーム経路) の活性化に関与する (図 1 (2)) (Sakai et al. J. Biol. Chem. 2004)。さらに、Nuclear factor- κ B (NF- κ B) とも相互作用し、その核移行を制御することにより、NF- κ B の標的である種々の

アポトーシス関連遺伝子（ガレクチン3等）の転写活性を制御している（図1（3））（研究開始当時投稿中、のち FEBS J. に掲載（Liu, Sakai et al. 2009））。また、抗アポトーシス分子ガレクチン3との相互作用により、アポトーシス抑制経路の制御にも関与が強く示唆されていた（図1（1））（Liu, Sakai et al. Biochem. J. 2004）。



細胞障害性ストレスによるアポトーシス細胞死が主たる病態として考えられている一例として、パーキンソン病が挙げられる。パーキンソン病は脳黒質ドーパミン産生細胞の脱落を中心とした神経変性疾患であり、その機序の全容は未だ解明されていない。パーキンソン病モデル動物として1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP) 投与動物がしばしば用いられる。MPTPの生体内代謝産物1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)は黒質神経細胞に選択的に作用し、パーキンソン病の病態と同様のミトコンドリア電子伝達系の破綻を引き起こす事により、細胞を死に至らしめる。このMPTPによる黒質神経特異的細胞死にApaf-1/カスパーゼ9経路が関与していることを示唆する結果はこれまで幾つか報告されていた。我々はヌクリングノックアウトマウスにMPTPを投与することにより、実際にこのパーキンソン病モデルマウスではApaf-1/カスパーゼ9経路が発症に重要であり、その神経細胞死にヌクリングが重要な役割を担っていることを明らかとてきた（Teng, Sakai et al. J. Neurochem. 2006）。

ヌクリングの関与が示唆されるNF-κB経路は、近年発ガン機構への関与が注目されてきている。特に肝炎に伴う肝ガンの発症機構においては、肝実質細胞及びクッパー細胞におけるNF-κBの活性化及びそれに伴うアポトーシス抑制が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。ヌクリングノックアウトマウスでは初代培養胚細胞においてNF-κBの持続的活性化が観察されていたが（Liu, Sakai et al. Biochem. J. 2004）、生体肝組織においても多くのヌクリングノックアウ

トマウス個体においてNF-κBの持続的活性化を確認している。また、同ノックアウトマウスでは肝炎・肝ガンの自然発症率が生後一年を経過した集団で著増することが観察されている。また、同ノックアウトマウスでは肝クッパー細胞数が激減していることが確認された。このクッパー細胞の減少はアポトーシスによることを複数のアポトーシスマーカーで確認している。肝ガン発症症例におけるクッパー細胞の減少は今のところ報告が確認されておらず、肝ガン発症におけるクッパー細胞の新たな関与機構の発見へ繋がることが期待される。我々はこのクッパー細胞死の制御機構の解明を目指して研究を進めている段階である。

2. 研究の目的

我々が単離同定した新規細胞死（アポトーシス）制御分子「ヌクリング（Nucling）」の、ヒト生体内における生理機能と病態における意義の解明を最終目標としている。本研究では、ノックアウトマウスを主たる研究材料に用い、「炎症性及び腫瘍性疾患に関連した、病態の発症機構への関与の解明」を中心テーマに据えた研究を推進する。

(1) 高齢ヌクリングノックアウトマウスにおける肝炎・肝ガンの自然発症機構の解明

を目指す。前述したとおり、この肝炎・肝ガン自然発症にはクッパー細胞死が重要な鍵を握っていると考えており、我々は他の知見と併せて具体的なガン発症機構のモデルを構築している（「研究計画・方法」参照）。まずこのモデルの検証を行いつつ、これまで得られたヌクリングによる細胞死制御機構に関する知見を踏まえて、肝ガン発症機構を明らかにしていく。

(2) パーキンソン病発症機構の解明

：ヌクリングノックアウトマウスを用いたMPTP投与による中枢神経変性機構の解明を目指す。ヌクリングノックアウトマウスで獲得されたMPTP誘導神経細胞死に対する耐性は、どの細胞死経路の破綻によるものかを明らかにすることにより、その発症機構解明に迫る。

3. 研究の方法

老齢ヌクリングノックアウトマウスにおける肝ガン自然発症機構の解明

ヌクリングノックアウトマウスでは肝炎・肝ガンの自然発症率が生後一年を経過した集団で著増することが観察されている。これまで得られている我々も含めた研究の知見から、我々は独自に以下に示すヌクリングノックアウトマウスにおける肝ガン発症機構モデルを構築して、このモデルの検証をステップバイステップで行う計画を立てた。

ヌクリングノックアウトマウスにおける肝ガン発症機序 (仮説)

第一段階: ヌクリング失活により、NF- κ B活性化

第二段階: クッパー細胞のアポトーシス誘導

第三段階: クッパー細胞アポトーシスに伴う炎症性サイトカイン放出

結果として、炎症に伴う肝ガン発症率が増加する

(分子生物学的解析担当: 坂井、

病理像及び病態解析担当: 福井)

第一段階: 主にヌクリングノックアウトマウス由来の胚性線維芽細胞(MEF)を用いてヌクリングの遺伝子欠失異常がNF- κ B活性化に異常をもたらすかどうかを分子生物学的手法を用いて検証した。

第二段階: 「NF- κ BによってFas/FasLの転写活性化が誘導されることによりクッパー細胞のアポトーシス死が誘導される」との報告あり(文献1)。また、NK、NKT細胞はFasLを発現し、Fasを介したアポトーシスを誘導することが知られている。このことから、第一段階から第二段階へ至る経路として、「ヌクリングノックアウトマウス肝において、NF- κ Bの活性化がクッパー細胞におけるFasの発現を促進し、NK、NKTによるアポトーシスを誘導している」という仮説を立てた。クッパー細胞を含めた肝非実質細胞におけるFas/FasLの発現が上昇しているかどうかを調べた(フローサイトメトリー、抗体免疫染色法)。

4. 研究成果

上記仮説の検証

第一段階に関しては、ヌクリングのNF- κ B (p50)との分子間相互作用が重要であり、核移行を制御していることを確認した(Liu, Sakai et al. FEBS J. 2009)。また、実際に肝組織において多くの正常ノックアウト個体でNF- κ Bの活性化が確認された。(Sakai et al. 投稿中)

第二段階: クッパー細胞を含めた肝非実質細胞におけるFas/FasLの発現が上昇しているかどうかを調べた(フローサイトメトリー、抗体免疫染色法)。その結果、予想に反し、ヌクリングノックアウトマウス肝においてFas発現クッパー細胞数の全クッパー細胞数に対する比率は約50%と、野生型の94%に比べて著しく減少していた。また、上記仮説が正しければNK、NKT細胞の除去によりクッパー細胞数は回復することが期待されたので、この検証実験を行った。NK1.1陽性細胞(=NK/NKT細胞)の除去抗体PK136をヌクリングノックアウトマウスに腹腔投与し、クッパー細胞数を調べた。その結果、予想に反してクッパー細胞の脱落が観察された。このことからFas/FasL系を介したクッパー細胞のアポトーシス誘導仮説は否定的となった。次にTNF α の発現がクッパー細胞のアポトーシスを誘導するという報告に注目した(Takei, 1995 #128)。TNF α はNF- κ Bの標的遺伝子でもあり、実際NF- κ B活性が上昇しているヌクリングノックアウトマウスの肝においてTNF α が上昇していることが認められた。また、PK136投与により非常に強いTNF α 発現誘導が認められることを確認し、それに伴うクッパー細胞除去効果も観察された。以上よりヌクリングノックアウトマウスの肝臓におけ

るクッパー細胞数減少はNF- κ B活性化に伴うTNF α 発現上昇による可能性が最も考えられた。(実験担当:坂井)

第三段階:リアルタイムPCRにより、ヌクリングノックアウトマウス肝においてTNF α , IL-6が上昇していることを確認した。

(分子生物学的解析担当:坂井、

病理像及び病態解析担当:福井)

以上の研究成果の一部はFEBS Journalに掲載された。(Liu, Sakai et al. 2009)
また、他の成果は現在投稿中である。

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 3 件)

1. Liu L, Sakai T, Tran HN, Mukai-Sakai R, Kaji R, Fukui K: Nucling interacts with nuclear factor- κ B, regulating its cellular distribution. *FEBS J.* 276, 1459-1470 (2009) 査読有
2. Kawazoe T, Park HK, Iwana S, Tsuge H, Fukui K: Human D-amino acid oxidase: an update and review. *The Chemical Record* 7, 305-315 (2007) 査読有
3. Kawazoe T, Tsuge H, Imagawa T, Aki K, Kuramitsu S, Fukui K: Structural basis of D-DOPA oxidation by D-amino acid oxidase: alternative pathway for dopamine biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355, 385-391 (2007) 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Sakai T, Liu L, Teng X, Ishimaru N, Sakai R, Tran HN, Sano N, Hayashi Y, Kaji R, Fukui K: Inflammatory disease and cancer with a decrease in Kupffer cell numbers in Nucling-knockout mouse
20th FAOBMB Taipei Conference, 2008年10月24日, 国立陽明大学(台湾)

2. Tran HN, 坂井隆志, El-Sayed SM, 劉 莉, 坂井利佳, 石丸直澄, 林 良夫, 梶 龍兒, 福井 清: 第49回日本生化学会中国四国支部例会, 2008年5月17日, 高松市
3. 坂井隆志, Tran HN, 劉 莉, 藤 錫川, 石丸直澄, 坂井利佳, 佐野暢哉, 梶 龍兒, 林 良夫, 福井 清: ヌクリング欠損は肝クッパー細胞枯渇をもたらし, その結果として肝炎・肝癌発症率を上昇させる
第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会, 平成19年12月13日, 横浜市
4. 坂井隆志, 劉 莉, 藤 錫川, 石丸直澄, 坂井利佳, 佐野暢哉, 梶 龍兒, Tran HN, 福井 清: 新規アポトーシス制御分子ヌクリングの肝癌発症機構における役割の解明
第48回日本生化学会中国四国支部例会, 平成19年5月19日, 高知市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 隆志 (SAKAI TAKASHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号: 80284321

(2) 研究分担者

福井 清 (FUKUI KIYOSHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号: 00175564

(3) 連携研究者