

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月15日現在

機関番号：14401

研究種目：学術創成研究

研究期間：2007～2012

課題番号：19GS0316

研究課題名（和文）

細胞死学の創成：非アポトーシス型細胞死を中心としたバイオロジー

研究課題名（英文）Integrated study of cell death: Biology focusing on multiple mechanisms of mammalian cell death

研究代表者

辻本 賀英 (TSUJIMOTO YOSHIHIDE)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：70132735

研究成果の概要（和文）：病的な細胞死に加え、生理的な役割を持つプログラム細胞死にも非アポトーシス型細胞死機構が大きく寄与するという洞察をもとに解析を行い、マウス小腸絨毛上皮細胞の新旧交代時、胎盤形成時あるいは骨形成時のプログラム細胞死と、神経軸索変性症の神経細胞死は非アポトーシス型機構で行われていることを見出し、アポトーシスを中心に据えてきた細胞死研究にパラダイムシフトの必要性を提示した。また、これらの系や培養細胞株系で、非アポトーシス型細胞死機構の解明のための糸口として関与遺伝子や阻害剤などを見出し、研究発展のための基盤を作った。

研究成果の概要（英文）：Based on our hypothesis that non-apoptotic cell death mechanisms play an important role in physiological programmed death in addition to pathological death, we have performed detailed studies and discovered that non-apoptotic death mechanisms play the major role in programmed death involved in turn over of mouse small intestinal epithelial cells, placenta formation, and bone formation as well as in pathological death of neurons in INAD model mouse with mutations in PLA2G6 gene. This implies that cell death research needs the paradigm shift. We have also found some chemical inhibitors or genes for the above-mentioned non-apoptotic programmed death and for non-apoptotic death, which we observed in cultured cells, providing the firm basis for the next generation of cell death research.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	85,000,000	25,500,000	110,500,000
2008年度	80,900,000	24,270,000	105,170,000
2009年度	84,600,000	25,380,000	109,980,000
2010年度	84,600,000	25,380,000	109,980,000
2011年度	84,600,000	25,380,000	109,980,000
総計	419,700,000	125,910,000	545,610,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞死、アポトーシス、ネクローシス、プログラム細胞死、オートファジー

1. 研究開始当初の背景

プログラム細胞死は、細胞自身に備わっている機構によって規定される自発的な細胞死であり、形態形成や組織の恒常性の維持など多岐の生

命現象に関わっている。一方、細胞死制御破綻は、梗塞や神経変性疾患などの種々の疾患発生の原因になることから、細胞死機構の総合的な理解は基礎研究に留まらず医学の分野にお

いても注目されてきた。この分野の分子生物学的解析はアポトーシス研究として始まり、本研究開始当時、すでに成熟期に向かいつつあった。その頃、我々を含む複数のグループは、細胞には複数の非アポトーシス型細胞死機構が存在すること、つまり、アポトーシスはプログラム細胞死機構の一つに過ぎないことを示し始めており、細胞死研究は新しい発展を遂げようとしていた。また、細胞死制御破綻に起因する疾患を考えても、そこに関与している細胞死機構については実は情報が極めて乏しい状況にあった。それ故、我々は生理的なプログラム細胞死と疾患に関与する細胞死を理解するには、アポトーシスの研究に加え、特に非アポトーシス型細胞死機構の理解が急務であると認識していた。

2. 研究の目的

上記の研究開始当初の細胞死研究分野の状況から、生理的な細胞死と疾患に関与する病理的な細胞死を深く理解するには、アポトーシス機構のより深い理解はいうまでもないが、非アポトーシス型細胞死機構の解明が必須であると考え、本研究では、哺乳動物細胞が持つ細胞死機構の全貌解明に向け、アポトーシスの解析の継続と、種々の手法を駆使した非アポトーシス型細胞死機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) アポトーシスの解析

① 共通経路の解析としてのアポトーシス時のミトコンドリア外膜の透過性亢進現象の解明

アポトーシス時のミトコンドリア外膜の透過性亢進を制御する Bcl-2 ファミリーたんぱく質の生化学的機能と生理機能の解析を、それぞれこれまで用いてきた単離ミトコンドリア系、培養細胞系とノックアウトマウスを用いた発生工学系を利用して継続する。

② 刺激特異的経路の解析

酸化ストレス、DNA 損傷や小胞体ストレスで誘導されるアポトーシスのシグナル伝達経路の解析を行う。

(2) 培養細胞株を用いた非アポトーシス型細胞死の解析

① オートファジー依存的プログラム細胞死の解析

我々がオートファジー依存的プログラム細胞死を発見した培養細胞系 (Bax/Bak 欠損細胞株など) を用い (Nature Cell Biol. 2004)、そのシグナル伝達経路の詳細な解析を行う。

② 新規の非アポトーシス型細胞死機構の解析

非アポトーシス型細胞死がメインに関与する細胞死系を確立し、その分子機構を明らかにする。特に、神経細胞死の解析として、神経芽腫細胞株を用い神経に分化させた

postmitotic な細胞を利用する系を確立する。

(3) 病理的細胞死の解析

① シクロフィリン D (ミトコンドリア膜透過性遷移現象) 依存的細胞死の解析

我々は、シクロフィリン D 欠損マウスを作成・解析することで (マウスは正常に生まれ、生育する)、シクロフィリン D がミトコンドリア膜透過性遷移現象 (mitochondrial membrane permeability transition: MPT) に必須の分子であり、MPT が酸化ストレスなどによるネクローシスにおいて重要な役割を演じていることを明らかにした (Nature 2005)。現時点ではその分子機構が不明である MPT の分子レベルでの解析を目指した。

② iPLA2 β が関与する細胞死機構の解析

iPLA2 β 欠損マウスは、非アポトーシス型の神経細胞死へ移行する神経軸索やシナプスの変性症状を呈し、ヒトの遺伝疾患である軸索変性疾患 (Infantile neuroaxonal dystrophy) のマウスモデルになることを見出しているため、iPLA2 β の欠損がどのような機構により軸索やシナプスの変性につながるかの解析を行う。

(4) マウス生体内で起こるプログラム細胞死の解析

マウス個体内で起こるプログラム細胞死の解析のために、個体発生期の形態形成と成体組織での新旧細胞の交替に関わる細胞死系から幾つか選別し、詳細な解析を行う。

4. 研究成果

アポトーシスの解析

アポトーシスのより詳細なメカニズムの解明を目指し、以下に示す発見を含め幾つかの重要な成果を上げた。

我々が長年解析してきた Bcl-2 ファミリーたんぱく質はミトコンドリアで機能し、caspase の活性化に関わるシトクロム c などの遊離を制御している。我々は Bax/Bak により惹起されるこのシトクロム c 遊離に VDAC が関与することを提唱してきた。この延長上で、MEF を用い Bax のシトクロム c 遊離機能に VDAC2 が関わる証拠を報告した。また、Bax/Bak に依存しないシトクロム c の遊離メカニズムを見出した。

病理的細胞死の解析

心筋梗塞などの虚血性疾患に関与する細胞死機構の解析を行うとともに、iPLA2 β 欠損に起因する幼児性神経軸索変性疾患の病態解析のためマウスモデル (同様の病態を呈する iPLA2 β 欠損マウス) の解析を行った。虚血性疾患には、シクロフィリン D 依存的なミトコンドリア膜透過性遷移現象により惹起されるネクローシスが関与することを示してきたが、その分子機構解明の一環としてシクロ

フィリン D に結合する因子を幾つか同定し、その機能を現在も解析中である。シクロフィリン D は疾患治療の標的分子の一つであり、その結晶構造を明らかにした。また、シクロフィリン D の生理的機能の一つとして、高次神経機能（学習記憶や情動行動）に関与することを見出した。

一方、神経軸索変性疾患の解析では、単離ミトコンドリアを用い iPLA2 β 欠損細胞由来のミトコンドリアは種々のストレスに対し脆弱であることを示し、iPLA2 β 欠損マウスの神経組織の解析から、神経細胞内に分布するミトコンドリアの内膜と前シナプス膜における代謝障害と膜変性が選択的に生じて軸索変性を引き起こすことを示した。

培養細胞株を利用した非アポトーシス型細胞死機構の解析

非アポトーシス型細胞死機構が関与する培養細胞株を用いた細胞死系を 3 種類確立し（オートファジー依存的細胞死、神経芽腫由来の細胞株を利用した神経細胞死、熱や酸化ストレス誘導性細胞死）、それぞれにおいてその細胞死を抑制する薬剤を同定した。これら薬剤はこれらの非アポトーシス型細胞死機構の解明の重要な糸口となる。また、オートファジー依存的細胞死に関しては、シグナル伝達経路に JNK が ATG5 の下流で関与することを明らかにした。また、オートファジー依存的細胞死の解析の延長上で、これまでに解析されてきた ATG5/ATG7 に依存的なマクロオートファジー（conventional な機構）とは異なる新規のオートファジー（alternative 機構）を発見し解析を行った。

マウス個体内で起こるプログラム細胞死の解析

マウスにおいて個体発生や成体組織での新旧細胞の交替に関わるプログラム細胞死の解析から、胎盤形成（栄養膜細胞）、小腸絨毛上皮細胞の交替および骨形成時に見られるプログラム細胞死系で主に非アポトーシス型細胞死機構が関与することを明らかにした。胎盤形成（栄養膜細胞）のプログラム細胞死に Notch2 が関与することを示し、Notch2 欠損による胎盤形成異常の原因の一つを明らかにした。また小腸の系では、Necrostatin-1 (Nec-1) により抑制されること、しかしながら RIP1/RIP3 に依存することが知られ Nec-1 で抑制されることが知られている necroptosis とは異なることを明らかにした (RIP3 ノックアウトマウスにおいて小腸絨毛上皮細胞の交替は正常に起こっていることを示した)。また、非アポトーシス型細胞死を in vivo イメージングする方法を確立し、個体発生期のプログラム細胞死（アポトーシスと非アポトーシス型細胞死）の時空間的観察がおよびその定量化を可能にした。上記の骨形成時に見られる非アポトーシス型

細胞死機構によるプログラム細胞死は、このイメージング法により同定・解析したものである。幾つかの細胞死関連遺伝子を欠損したマウスを用いた解析からこの骨形成時のプログラム細胞死にオートファジー関連因子の一つが関与することが明らかになった。このように研究は当初の目的に沿って順調な進捗を示し、重要な成果をあげた。

5. 主な発表論文等

(下線は研究代表者および研究分担者)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Shibuva, T. and Tsujimoto, Y. Deleterious effects of mitochondrial ROS generated by KillerRed photodynamic action in human cell lines and *C. elegans*. *J. Photochem. Photobiol. Biol.* 117: 1-12, 2012
2. Tsujimoto, Y. Multiple ways to die: Non-apoptotic forms of cell death. *Acta Oncol.* 51: 293-300, 2012
3. Ueno, N., Taketomi, Y., Yamamoto, K., Hirabayashi, T., Kamei, D., Kita, Y., Shimizu, T., Shinzawa, K., Tsujimoto, Y., Ikeda, K., Taguchi, R., and Murakami, M. Analysis of two major intracellular phospholipase A2s in mast cells reveals crucial contribution of cPLA2{alpha}, not iPLA2{beta}, to lipid mobilization in proximal mast cells and distal fibroblasts. *J Biol Chem.* 286: 37249-37263, 2011
4. Beck, G., Sugiura, Y., Shinzawa, K., Kato, S., Setou, M., Tsujimoto, Y., Sakoda, S., and Sumi-Akamaru, H. Insufficient remodeling of membranes of mitochondria and axon terminals causes neuroaxonal dystrophy in calcium-independent phospholipase A2 β deficiency. *J. Neurosci.* 31: 11411-11420, 2011
5. Youn, D.-Y., Yoon, J.-S., Kim, Y.K., Yeum, C.E., Lee, S.-B., Youn, H.-J., Tsujimoto, Y. and Lee, J.-H. Deletion of the bis gene results in a marked increase in the production of corticosterone which is associated with thymic atrophy in mice. *Ame. J. Physiol. Endocrinology and Metabolism*, 301: E223-231, 2011
6. Hikita, H., Takehara, T., Kodama, T., Shimizu, S., Shigekawa, M., Hosui, A., Miyagi, T., Tatsumi, T., Ishida, H., Li, W., Kanto, T., Hiramatsu, N., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. and Hayashi, N. Delayed-onset caspase-dependent massive

- hepatocyte apoptosis upon Fas activation in Bak/Bax-deficient mice. *Hepatology*, 54: 240-251, 2011
7. Tsujii, H., Eguchi, Y., Chenchik, A., Mizutani, T., Yamada, K., and Tsujimoto, Y. Screening of cell death genes with a mammalian genome-wide RNAi library. *J. Biochem.* 148: 157-170, 2010
8. Ideguchi, K., Shimizu, S., Okumura, M. and Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition is not involved in neurodegeneration in mnd2 mutant mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393: 264-267, 2010
9. Aikawa, T., Shinzawa, K., Tanaka, N. and Tsujimoto, Y. Noxa is necessary for hydrogen peroxide-induced caspase-dependent cell death. *FEBS Letter*, 584: 681-688, 2010
10. Shimizu, S., Konishi, A., Nishida, Y., Mizuta, T., Nishina, H., Yamamoto, A. and Tsujimoto, Y. Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* 29: 2070-2082, 2010
11. Mouri, A., Noda, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., and Nabeshima, T. The role of cyclophilin D in learning and memory. *Hippocampus*, 20 (2) 293-304, 2010
12. Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. Discovery of ATG5/ATG7-independent alternate macroautophagy. *Nature* 461: 654-658, 2009
13. Yamagata, H., Shimizu, S., Nishida, Y., Watanabe, Y., Craigen, W. J. and Tsujimoto, Y. Requirement of voltage-dependent anion channel 2 for pro-apoptotic activity of Bax. *Oncogene* 28: 3563-3572, 2009
14. Aoto, M., Shinzawa, K., Suzuki, Y., Ohkubo, N., Mitsuda, N. and Tsujimoto, Y. Essential role of p38 MAPK in caspase-independent, iPLA₂-dependent cell death under hypoxia/low glucose conditions. *FEBS letter* 583: 1611-1618, 2009
15. Lee, D.-H., Lim, M.-H., Youn, D.-Y., Jung, S. E., Ahn, Y. S., Tsujimoto, Y. and Lee, J.-H. hnRNP L binds to CA repeats in the 3' UTR of bcl-2 mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 382(3): 583-7, 2009
16. Youn, D.-Y., Lee, D.-H., Lim, M.-H., Yoon, J.-S., Lim, J. H., Jung, S. E., Yeum, C. E., Park, C. W., Youn, H.-J., Lee, J.-S., Lee, S.-B., Ikawa, M., Okabe, M., Tsujimoto, Y. and Lee, J.-H. Bis deficiency results in early lethality with metabolic deterioration and involution of the spleen and thymus. *American J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 295: E1349-1357, 2008
17. Shinzawa, K., Sumi, H., Ikawa, M., Matsuoka, Y., Okabe, M., Sakoda, S. and Tsujimoto, Y. Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A₂ deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease. *J. Neurosci.* 28: 2212-2220, 2008
18. Kajitani, K., Fujihashi, M., Kobayashi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. and Miki, K. Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96 Å resolution. *Proteins* 70: 1635-1639 2008
19. Mizuta, K., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Nakagawa, T. and Tsujimoto, Y. A Bax/Bak-independent mechanism of cytochrome c release. *J. Biol. Chem.* 282: 16623-16630, 2007
- [学会発表] (計 29 件)
- (1) 今川佑介、辻本賀英
Study of non-apoptotic programmed cell death during embryogenesis in mice by in vivo imaging
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13 日 福岡国際会議場
- (2) 渋谷利治、辻本賀英
KillerRed により産生されるミトコンドリア由来 ROS のヒト培養細胞および線虫への影響
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡国際会議場
- (3) 斎藤千恵子、新沢康英、辻本賀英
アセトアミノフェンにより誘導される接着肝細胞の同期的な細胞死
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日 福岡国際会議場
- (4) 恵口豊、辻本賀英
Necrostatin-1 と Diindolyl-methane で抑制される新規タイプのネクローシス
第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 パシフィコ横浜
- (5) 辻本賀英
A role of non-apoptotic death in programmed cell death in mice
ECD02011 Euroconference on Apoptosis 「招待講演」 2010 年 9 月 17 日ストックホルム

ム Norra Latin (スウェーデン)
(6) 辻本賀英
生体におけるプログラム細胞死
第43回日本臨床分子形態学会「招待講演
(特別講演)」2011年9月9日大阪医科大学
(7) 辻本賀英
マウス個体内で起こるプログラム細胞死
第20回日本 Cell Death 学会年会 2011
年7月29日東京大学
(8) 辻本賀英
マウスにおけるプログラム細胞死
日本顕微鏡学会第67回学術講演会「招待講演」
2011年5月16日福岡国際会議場
(9) 渋谷利治、辻本賀英
Cell death induced by mitochondrial ROS
generated by photodynamic action of
KillerRed protein 第33回日本分子生物
学会年会 2010年12月10日神戸国
際会議場
(10) 松岡洋祐、辻本賀英
Mechanism of enterocyte shedding from tips
of mouse small intestinal villi 第33
回日本分子生物学会年会 2010年12
月10日神戸国際会議場
(11) 浜田義雄、辻本賀英
Role of non-apoptotic cell death during
mouse placental vasculogenesis
The 16th International Society of
Differentiation Conference
2010年11月15日奈良新公会堂
(12) 辻本賀英
Programmed cell death in mouse: Multiple
ways to die
Korean Society of Anatomy「招待講演」2
010年10月14日 Jeju Island (大韓民
国)
(13) 渋谷利治、辻本賀英
Study of cell death induced by
photodynamic action of mitochondrial
KillerRed protein
Gordon Conference on Cell Death 2010
年8月25日 Newport, RI (米国)
(14) 新沢康英、辻本賀英
iPLA2beta 欠損マウスは神経軸索ジストロフ
ィーを発症する
第19回日本 Cell Death 学会年会 2010
年7月31日 愛知県産業労働会館
(15) 辻本賀英
マウスにおけるプログラム細胞死
第19回日本 Cell Death 学会年会 2010
年7月31日 愛知県産業労働会館
(16) 西田 友哉、荒川 聡子、辻本賀英、

清水重臣
Discovery of Atg5/Atg7 independent
alternative macroautophagy and its
molecular analysis
第32回日本分子生物学会年会 2009年
12月12日パシフィコ横浜
(17) 山形弘隆、清水重臣、渡辺義文、W.
Craigen、辻本賀英
Bax 依存的アポトーシスにおける VDAC2 の役
割
第31回日本分子生物学会年会 平成20年
12月9日神戸国際会議場
(18) 相川知徳、新沢康英、辻本賀英
酸化ストレス誘導性アポトーシスの解析
第31回日本分子生物学会年会 平成20年
12月9日神戸国際会議場
(19) 新沢康英、隅 寿恵、松岡洋祐、佐
古田三郎、辻本賀英
The roles of Ca²⁺-independent group VIA
phospholipase A2 (iPLA2 β) in hypoxic
death and neuroaxonal dystrophy.
The 7th International Cell Death Society
Symposium Shanghai, China 2008年6月
8日 上海 (中国)
(20) 辻本賀英
Roles of Bcl-2 in apoptosis and necrosis
International Euroconference "Mechanisms
of Cell Death and Diseases: Advances in
Therapeutic Intervention and Drug
Development"「招待講演」2008年11月
1日カスカイス (ポルトガル)
(21) 新沢康英、相川知徳、辻本賀英
ストレス刺激で誘導されるグローバルヒス
トン脱アセチル化機構
第30回日本分子生物学会年会 2007
年12月18日パシフィコ横浜
(22) 辻本賀英
Multiple ways to die
The 19th Annual Meeting of the Korean
Society for Molecular and Cellular Biology
「招待講演」2007年6月19日ソウル
(大韓民国)
(23) 辻本賀英
Multiple mechanisms of cell death and
their regulation by Bcl-2
Beijing Symposium "Cell Signaling in
Cancer, Development and Stem Cells"「招
待講演」2007年6月14日北京 (中国)

[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.med.osaka-u.ac.jp/pub/gene/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻本 賀英 (TSUJIMOTO YOSHIHIDE)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70132735

(2) 研究分担者

恵口 豊 (EGUCHI YUTAKA)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：20243214
新沢 康英 (SHINZAWA KOEI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70403186
渋谷 利治 (SHIBUYA TOSHIHARU)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70448033
浜田 義雄 (HAMADA YOSHIO)
基礎生物学研究所・細胞社会学・助教
研究者番号：10132739