

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07399

研究課題名(和文) 新規炎症性細胞死ネクロプトーシスを可視化する生体イメージング技術の開発

研究課題名(英文) Development of techniques to detect necroptosis

研究代表者

森脇 健太 (Moriwaki, Kenta)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：70778068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ネクロプトーシスは、TNF(tumor necrosis factor)などのサイトカインや細菌・ウイルス成分などによって引き起こされる制御性ネクローシスであり、これまでにいくつかの制御分子が同定されてきたが、その分子機構の詳細は不明であり、またネクロプトーシス細胞の検出法の開発が求められていた。我々は、ネクロプトーシス誘導に必須の分子であるRIPK3の活性化を検出する手法を開発し、細胞内でのRIPK3の動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネクロプトーシスが数多くの感染性・非感染性炎症性疾患の病態に関わっていることが報告されており、これらの疾患に対する治療の有用な標的になると期待されている。本研究で開発された手法を用いて分子機構の詳細を明らかにし、また、生体内でのネクロプトーシスの検出法の確立につなげることで、様々な炎症性疾患に対する新たな治療法の開発につながると期待される。

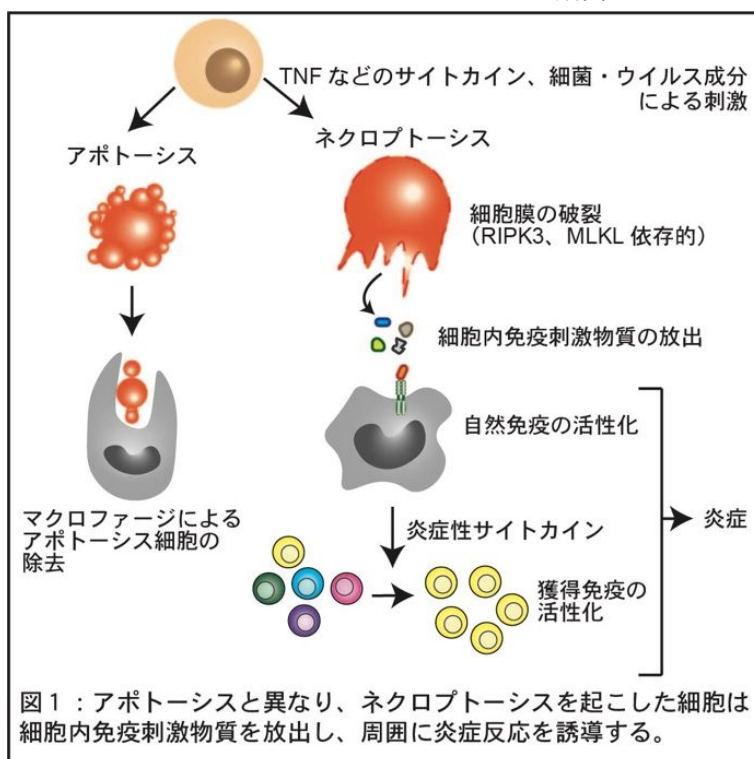
研究成果の概要(英文)：Necroptosis is the regulated necrosis that is induced in response to the stimulation with cytokines such as tumor necrosis factor, and components of bacteria and viruses. Although various regulatory molecules have been identified in past studies, the molecular mechanism underlying necroptosis remains unknown. In addition, development of tools or methods to detect necroptotic cells is needed.

研究分野：病態医化学

キーワード：細胞死

1. 研究開始当初の背景

ネクローシスは、細胞の膨潤と細胞膜の破裂という特徴を示す細胞死の1形態である。その特徴ゆえに、ネクローシス細胞は死に際に細胞内の物質を放出し、周囲に炎症反応を引き起こす(図1)。古くから炎症部位でネクローシス細胞が観察され、ネクローシスと疾患の関係性が示唆されていたが、その細胞がどのように死に、どのように病態と関係しているかは不明であった。これまでネクローシスは物理化学的な要因や栄養の枯渇などによって特定の分子には依存せず引き起こされると考えられてきた。しかし、近年**ネクロプトーシス**と呼ばれる、形態的にはネクローシスであるが、特定の分子を介した細胞内シグナル伝達機構によって制御される細胞死が見つかった。ネクロプトーシスはTNFなどのサイトカインや細菌・ウイルス成分などによって引き起こされ、受容体からのシグナルはRIPK3という細胞質内セリン・スレオニンキナーゼに集約される。RIPK3はネクロプトーシス誘導に必須の分子であり、活性化すると下流分子であるMLKLをリン酸化してシグナルを伝達する。これまでの研究により、RIPK3ノックアウト(KO)マウスでは、数多くの感染性・非感染性炎症性疾患(ウイルス・細菌感染症、虚血性脳・心・腎疾患、リウマチ性関節炎、乾癬、神経変性疾患、膵炎など)における炎症が抑制されることが分かっている。そのため**ネクロプトーシスは炎症性疾患に対する治療の有用なターゲット**になると期待されている。



一方で、ネクロプトーシスの分子機構には未だ不明な点が多く残されており、特に、細胞質に存在するネクロプトーシス誘導に必須の分子であるRIPK3やMLKLが、活性化によって細胞内でどのような挙動を示すかについてはよく分かっていない。また、種々の病態モデルにおいていつどこでネクロプトーシスが起きているかについてもよく分かっていない。RIPK3やMLKLがリン酸化されることによって活性化されるという点に着目し、これまでにそれぞれのリン酸化フォームを認識する抗体が開発され、これらのツールを使用することで、細胞や組織において活性化型RIPK3やMLKLが検出されてきた。しかしながら、これらの抗体には感度・特異度において課題があり、さらに、抗体を用いた手法は特定の時間のスナップショットでの解析に限られる。

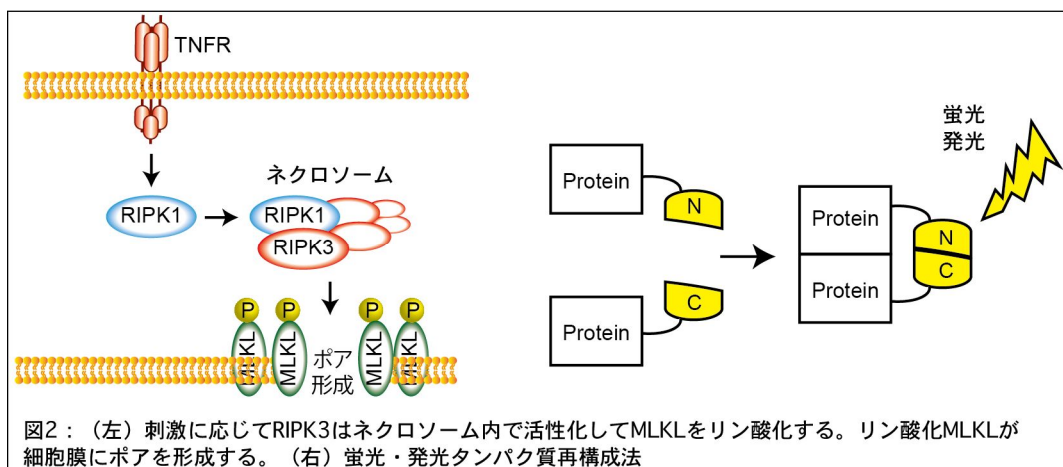
2. 研究の目的

そこで本研究では、ネクロプトーシスを制御する分子の動態をイメージングする手法を開発し、その分子機構の解明と、炎症病態におけるネクロプトーシスの役割の理解へとつなげることを目的とする。

3. 研究の方法

ネクロプトーシスを誘導する刺激が入ると、RIPK3はネクロソームと呼ばれる分子複合体を形成し、その中でRIPK3はアミロイド様のオリゴマーを形成することが分かっている。ネクロソーム内で活性化されたRIPK3は、次に下流分子MLKLをリン酸化する。リン酸化したMLKLはオリゴマーを形成し、細胞膜に孔を開けることによりネクロプトーシスを実行する(図2左)。分子複合体を検出する手法の一つに発光・蛍光タンパク質再構成法がある。この手法は、蛍光もしくは発光を発するタンパク質を二分割し、それぞれを融合させた目的タンパク質が結合した時においてのみ、蛍光・発光タンパク質が再構成され、蛍光・発光が発生するというものである(図2右)。目的タンパク質の二量体形成による再構成で蛍光・発光が発生するが、オリゴマー

形成により更に強い光が発生することが過去に報告されている。そこで、ネクロプトーシス実行の過程で、RIPK3 や MLKL がオリゴマー化することに着目し、発光・蛍光タンパク質再構成法を用いてネクロプトーシスを可視化するためのシステムの開発を行った。



4. 研究成果

蛍光または発光タンパク質を既報に従って二分割し、まず片方に FKBP タンパク質、もう片方に FRB タンパク質を融合させ、それらのタンパク質を発現する細胞を作成した。この細胞でラパマイシン依存的に二量体形成を引き起こした際に蛍光・発光が発生することを確認した。次に、RIPK3、MLKL の N 末端側または C 末端側に蛍光または発光タンパク質の各フラグメントを融合させたプラスミドを作成した。また、融合部位におけるリンカー配列について、長さ・配列の異なる数種類のリンカーを組み込んだプラスミドをそれぞれ作成した。そして、全ての組み合わせで蛍光または発光タンパク質の N 末端側フラグメントと C 末端側フラグメントを共に発現する細胞を作成した。これらの細胞を、カスパーゼ阻害剤と SMAC mimetic 存在下で TNF で刺激することでネクロプトーシスを誘導した（図 3 左）。ネクロプトーシス誘導後にタンパク質再構成が起きているかどうかを時系列を追って確認した。その結果、RIPK3 に融合させた蛍光タンパク質の再構成を確認することができた（図 3 右）。さらに、確認された RIPK3 は細胞内で重合体を形成し、部分的にフィラメント状の構造を取っていることがわかった。このことから、RIPK3 が細胞内でフィラメント状の高次構造体を形成していることが確認された。

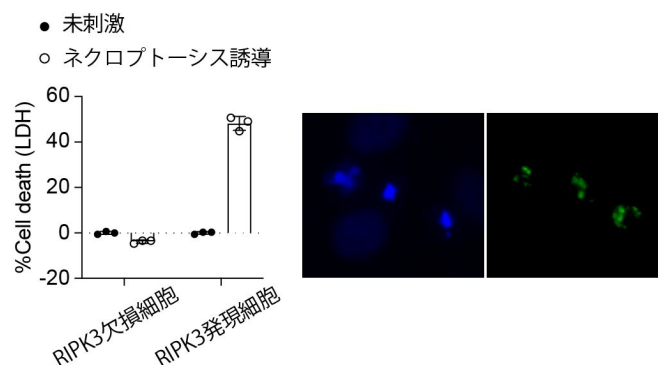


図3：（左）蛍光タンパク質フラグメントを融合させたRIPK3を発現する細胞。（右）蛍光タンパク質再構成法によって検出したRIPK3（緑）。核をHoechst 33342で染色（青）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Moriwaki Kenta, Balaji Sakthi, Ka-Ming Chan Francis	4. 巻 13
2. 論文標題 The death-inducing activity of RIPK1 is regulated by the pH environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eaay7066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aay7066	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwaki Ayano, Moriwaki Kenta, Sobajima Tomoaki, Taniguchi Manabu, Yoshimura Shin ichiro, Kunii Masataka, Kanda Satoshi, Kamada Yoshihiro, Miyoshi Eiji, Harada Akihiro	4. 巻 34
2. 論文標題 Loss of Rab6a in the small intestine causes lipid accumulation and epithelial cell death from lactation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 9450 ~ 9465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202000028R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakabayashi Osamu, Takahashi Hiroataka, Moriwaki Kenta, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohtake Fumiaki, Murai Shin, Tsuchiya Yuichi, Koyahara Yuki, Saeki Yasushi, Yoshida Yukiko, Yamazaki Soh, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya, Nakano Hiroyasu	4. 巻 4
2. 論文標題 MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01603-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Torii Satoru, Yamaguchi Hirofumi, Nakanishi Akira, Arakawa Satoko, Honda Shinya, Moriwaki Kenta, Nakano Hiroyasu, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15577-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇健太	4. 巻 74
2. 論文標題 制御性ネクロシスと炎症	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇健太、中野裕康	4. 巻 73
2. 論文標題 TNFレセプターを介するシグナル伝達経路	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriwaki Kenta, Park Christa, Koyama Kazuha, Balaji Sakthi, Kita Kohei, Yagi Ryoko, Komazawa-Sakon Sachiko, Semba Manami, Asuka Tatsuya, Nakano Hiroyasu, Kamada Yoshihiro, Miyoshi Eiji, Chan Francis K. M.	4. 巻 15
2. 論文標題 The scaffold-dependent function of RIPK1 in dendritic cells promotes injury-induced colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-021-00446-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shindo Ryodai, Ohmuraya Masaki, Komazawa-Sakon Sachiko, Miyake Sanae, Deguchi Yutaka, Yamazaki Soh, Nishina Takashi, Yoshimoto Takayuki, Kakuta Soichiro, Koike Masato, Uchiyama Yasuo, Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi, Mikami Tetuo, Moriwaki Kenta, Araki Kimi, Nakano Hiroyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 536 ~ 551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.05.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Hiroyasu, Murai Shin, Moriwaki Kenta	4. 巻 479
2. 論文標題 Regulation of the release of damage-associated molecular patterns from necroptotic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 677 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20210604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriwaki Kenta, Chan Francis K M, Miyoshi Eiji	4. 巻 169
2. 論文標題 Sweet modification and regulation of death receptor signalling pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 643 ~ 652
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab034	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇健太、中野裕康	4. 巻 53
2. 論文標題 ネクロプトーシスの制御機構と病理的意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 667-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇健太	4. 巻 93
2. 論文標題 RIPキナーゼによる細胞死と炎症の制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 451-465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇健太	4. 巻 91
2. 論文標題 ネクロプトーシス誘導分子RIPK3による細胞死と炎症の制御	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 265-267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森脇健太
2. 発表標題 RIPK1による細胞死と炎症の制御について
3. 学会等名 第93日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoya Fukuoka, Kenta Moriwaki, Miki Komatsu, Emika Noda, Shinji Takamatsu, Yoshihiro Kamada, Masahiro Inoue, and Eiji Miyoshi
2. 発表標題 Identification of characteristic oligosaccharide structures and molecular mechanisms that regulate TRAIL sensitivity
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kenta Moriwaki
2. 発表標題 Regulation of the death receptor pathway by glycosylation: The intrinsic sweet barrier against cancer progression
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森脇健太
2. 発表標題 制御性ネクロシスから迫る医学・生物学の真の理解
3. 学会等名 第32回日本比較免疫学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森脇健太
2. 発表標題 The scaffold-dependent function of RIPK1 in dendritic cells promotes injury-induced colitis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森脇健太
2. 発表標題 Lewis glycolipids augment TRAIL-induced cell death by promoting complex II formation
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Duke University			