

令和 5 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：2020～2022

課題番号：20K05238

研究課題名(和文)敗血症モデルにおける計画的ネクローシスのFRETイメージング

研究課題名(英文)FRET imaging of regulated necrosis in mouse sepsis model

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では組織内での計画的ネクローシス(RN)誘導を時空間的に解析するため、RN誘導を継時的にモニターできるFRETバイオセンサーを全身性に発現するトランスジェニックマウスを作製した。このマウスを利用した病態モデルにおける生体内FRETイメージングの結果、以下の知見を得た。

- 1) 敗血症モデルにおいて空腸陰窩上皮細胞でRNが誘導されたことから、腸上皮細胞の消失は腸陰窩上皮細胞のRNが原因になっていること。
- 2) 急性腎障害モデルにおいて近位尿管の閉塞にともない尿管上皮細胞でRNが誘導されたことから、尿管損傷の原因が尿管閉塞をトリガーとした尿管上皮細胞におけるRNの誘導であること。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では虚血性疾患や炎症性疾患において計画的ネクローシス(RN)誘導による病態増悪のメカニズムを継時的に解析するためのトランスジェニックマウスを作製した。マウス病態モデルにおいてRN誘導部位の特定と組織障害までを継時的にモニターすることに国内外を通じて初めて成功した。作製したトランスジェニックマウスはバイオリソースとして高い独自性を有しており、さまざまな病態モデルに利用することで疾患の原因となるRNを時空間的に解析するという新規性の高い研究を創造できる。

研究成果の概要(英文)：We generated transgenic mice systemically expressing a FRET biosensor that can monitor the induction of regulated necrosis (RN) in living cells in order to determine where and when RN is induced in the pathological tissue. As a result of in vivo FRET imaging in mouse models for human diseases using the transgenic mouse, the new findings were obtained regarding the mechanism by which RN exacerbates the pathological condition as followed.

- 1) RN was induced in jejunal crypt epithelial cells in a mouse sepsis model by excess TNF, suggesting that this causes tissue damage with loss of intestinal epithelial cells.
- 2) In an acute kidney injury model, from the results that RN was induced in renal tubular epithelial cells after the proximal tubular occlusion by cisplatin administration, it was suggested that the cause of renal tubular damage was the induction of RN in renal tubular epithelial cells triggered by tubular occlusion.

研究分野：病態医化学

キーワード：ネクローシス FRETイメージング RIPK3 敗血症 急性腎疾患

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ตอบสนอง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急性腎傷害や虚血再還流障害などの急性疾患、敗血症や全身性エリテマトーデスなどの炎症性疾患、あるいはパーキンソン病やアルツハイマー病などの難治性神経疾患など多様な病態の増悪や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。計画的ネクローシスはアポトーシスと異なり、細胞死実行時の細胞膜傷害に伴い Damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) を放出することで周囲の細胞に炎症の惹起やさらなる細胞死を誘導するとされている。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。しかし計画的ネクローシスの誘導から実行までを連続的にかつ特異的に検出する方法はなく、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、SMART (a sensor of MLKL activation by RIPK3 based on FRET) と命名した。SMART を培養細胞に導入して FRET 解析したところ、計画的ネクローシス実行時の細胞膜傷害に先行して FRET 現象がおこることを見出した。この計画的ネクローシス誘導時の SMART による FRET 現象は RIPK3 活性の阻害や MLKL の発現ノックアウトによって観察されなくなることから、SMART が計画的ネクローシスを生細胞で特異的にモニターできる FRET バイオセンサーであることを報告した (Murai et al., *Commun Biol*, 2022)。

2. 研究の目的

(1) SMART を利用してマウス病態モデルにおける組織内での計画的ネクローシスの FRET タイムラプスイメージングを行う目的で SMART を全身性に発現するトランスジェニックマウスを作製する。

(2) 作製したトランスジェニックマウスから調製した初代培養細胞を用いて種々の細胞死誘導時の FRET タイムラプスイメージングを *in vitro* で実施し、培養細胞同様トランスジェニックマウス由来の初代培養細胞においても計画的ネクローシスが SMART により特異的にモニターできることを確認する。

(3) SMART を全身性に発現するトランスジェニックマウスの組織における *in vivo* での計画的ネクローシスのタイムラプスイメージングの結果から、マウス病態モデルにおける計画的ネクローシスの組織内での三次元的な分布とその時間的変化について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスゲノム上の Rosa26 遺伝子座に SMART を挿入し全身に発現するトランスジェニックマウス (SMART-マウス) を作製する (研究協力 隅山健太博士、理研・BDR)。2光子顕微鏡による SMART の蛍光強度の測定から、作製された SMART-マウスの臓器における SMART の発現量が *in vivo* での FRET 解析に十分なシグナル強度であることを確認する (研究協力 松田道行博士、京大・医)。解析に十分な S/N 比が得られない場合は、ゲノム上の高発現領域への遺伝子導入が期待できるトランスポゾン系の発現系を利用して SMART-マウスを作製する。

(2) 作製した SMART-マウスの腹腔にチオグリコレートを投与し3日後に腹腔からマクロファージを調製する。細菌由来のリポ多糖 LPS あるいはその構成脂質 (lipid IV および lipid A) によって計画的ネクローシス、あるいはパイロトーシスを誘導し *in vitro* で FRET タイムラプスイメージングを実施する。さらに別の初代培養細胞として SMART-マウスから MEF を調製し TNF によって計画的ネクローシス、あるいはアポトーシスを誘導し FRET タイムラプスイメージングを実施する。これらの FRET 解析の結果から SMART-マウス由来の細胞においてもすでに報告している培養細胞の結果と同様に SMART によって計画的ネクローシスのみが特異的にモニターできることを確認する。

(3-1) 敗血症モデル: マウス尾静脈より TNF α (個体あたり 10 μ g) を投与すると敗血症をおこし、6時間以内に致死となる。このモデルにおいて計画的ネクローシスによる組織障害がおこる

画的ネクローシスによってその新生および分化が破綻することが腸管での組織損傷の原因となっていることを示唆する結果となった。これらの結果から回腸陰窩での計画的ネクローシスが敗血症の病態の起点となっている可能性が示唆された。

(3-2) SMART-マウスにシスプラチンを腹腔投与し急性腎障害を誘導した。その結果シスプラチン投与2日後には近位尿細管の閉塞や尿細管上皮細胞の損傷がみられ、計画的ネクローシスが誘導されていることがリン酸化RIPK3抗体による免疫染色によって明らかとなった(図3a)。またシスプラチン投与によってアポトーシスも検出できたものの、投与2日後では計画的ネクローシスが優位に誘導されていることが明らかとなった(図3a)。この病態モデルにおいてSMART-マウスにシスプラチンを投与して2日後 *in vivo* FRET イメージングを行なった。その結果、シスプラチン投与により近位尿細管が閉塞し、それに伴いFRETが観察された(図3b, c)。このことから、尿細管閉塞が計画的ネクローシスを誘導している可能性が示唆された。また傷害を受けた尿細管上皮細胞の一部でも計画的ネクローシスが誘導されていることから、近位尿細管の閉塞が計画的ネクローシス誘導のトリガーとなっており、それによって尿細管上皮傷害を増悪させている可能性が示唆された。さらにRIPK3ノックアウト/SMART-マウスではシスプラチン投与により尿細管の閉塞はみられずFRET現象も見られなかった(図3d)。しかし既報とは異なりシスプラチン投与後にアポトーシスが亢進し、尿細管の損傷が増悪していることが明らかとなった。以上より腎障害による尿細管傷害にはアポトーシスと計画的ネクローシスの両者が関与しており、計画的ネクローシスがアポトーシスに比べ優位に起こっていること、計画的ネクローシスを阻害するとアポトーシスが亢進すること、アポトーシスは尿細管閉塞とは関連のないことが明らかとなった。さらに計画的ネクローシスによる組織損傷は、尿細管閉塞と密接に関連している可能性が示唆された。

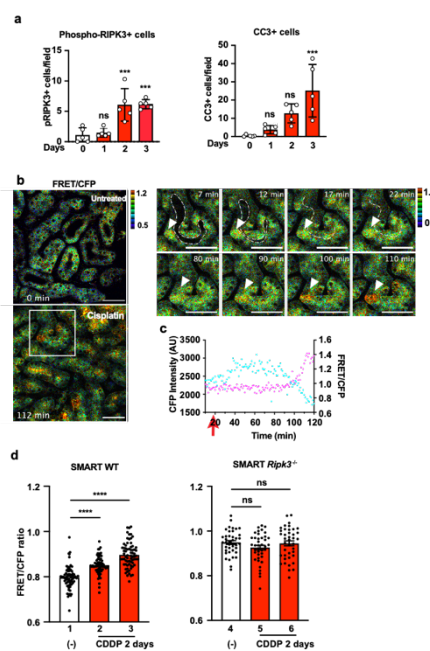


図3 SMART-マウスTNF投与急性腎傷害モデルにおける計画的ネクローシスのFRETイメージング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Murai Shin, Shirasaki Yoshitaka, Nakano Hiroyasu	4. 巻 2274
2. 論文標題 Time-Lapse Imaging of Necroptosis and DAMP Release at Single-Cell Resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 353 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_29	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 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyake Sanae, Murai Shin, Kakuta Soichiro, Uchiyama Yasuo, Nakano Hiroyasu	4. 巻 527
2. 論文標題 Identification of the hallmarks of necroptosis and ferroptosis by transmission electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 839 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.04.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakabayashi Osamu, Takahashi Hirotaka, 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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murai Shin, Takakura Kanako, Sumiyama Kenta, Moriwaki Kenta, Terai Kenta, Komazawa-Sakon Sachiko, Seki Takao, Yamaguchi Yoshifumi, Mikami Tetuo, Araki Kimi, Ohmuraya Masaki, Matsuda Michiyuki, Nakano Hiroyasu	4. 巻 5
2. 論文標題 Generation of transgenic mice expressing a FRET biosensor, SMART, that responds to necroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04300-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Yuka, Hashiuchi Emi, Watanabe Hitoshi, Kimura Kumi, Oshima Yu, Tsuchiya Kohsuke, Murai Shin, Takahashi Chiaki, Matsumoto Michihiro, Kitajima Shigetaka, Yamamoto Yasuhiko, Honda Masao, Kaneko Shuichi, Kasuga Masato, Nakano Hiroyasu, Harada Kenichi, Inoue Hiroshi et al	4. 巻 14
2. 論文標題 The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-35804-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村井晋, 隅山健太, 森脇健太, 高倉加奈子, 山口良文, 駒澤幸子, 寺井健太, 三浦正幸, 松田道行, 中野裕康
2. 発表標題 SMART Tgマウス由来細胞を用いたネクロプトーシスのライブセルイメージング
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中林修, 高橋宏隆, 村井晋, 大竹史明, 駒澤幸子, 土屋勇一, 佐伯泰, 吉田雪子, 山崎創, 徳永文稔, 森脇健太, 澤崎達也, 中野裕康
2. 発表標題 cFLIPのユビキチン化による新たなアポトーシス抑制機構の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村井晋
2. 発表標題 SMART Tgマウスを用いたネクロプトーシスのin vivoイメージングとDAMPs放出メカニズムの解析
3. 学会等名 第3回 細胞死コロキウム
4. 発表年 2022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
研究分担者	中野 裕康 (Nakano Hiroyasu) (70276476)	東邦大学・医学部・教授 (32661)	

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
---------	---------