

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790078

研究課題名(和文)

細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを決定づける因子の探索

研究課題名(英文)

Molecular mechanisms in two cell death-types, necrosis and apoptosis, induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine

研究代表者

佐藤 聡 (SATO AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40530663

研究成果の概要(和文)：

我々は、抗がん剤を作用させるとネクローシスを起こす哺乳動物細胞とこれとは異なる細胞株でアポトーシスを起こす細胞を用いて、細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを決定づける因子の探索を行った。その結果、核膜の構造タンパク質である Lamin-B1、細胞骨格タンパク質である Cytokeratin-19、およびネクローシスを起こしている細胞でのみ発現増加する転写因子が重要な役割を持っていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

We have investigated the cell-death mechanisms of necrosis and apoptosis induced by this anti-tumor drug. We found that the nuclear inner membrane protein lamin-B1, the cytoplasmic intermediate filament-protein cytokeratin-19, and the transcription factor may have key roles in regulating cell-death morphology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			0
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞死制御

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞死、ネクローシス、アポトーシス、プロテオーム解析、トランスクリプトーム解析、Heat shock protein 90、転写因子、細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

細胞死の研究は癌、免疫、エイズ等の疾病を理解するうえで極めて重要である。細胞死は

その形態的特徴からネクローシスとアポトーシスの二つに大別される。アポトーシスを起こした細胞は縮小し、アポトーシス小体と

呼ばれる細胞断片を形成する。その後、生体内で貪食細胞によって取り除かれる。癌細胞がアポトーシスを起こした場合には癌の消失、あるいは減退がおこる。このようにアポトーシスを誘導することが多くの抗がん剤の作用機構となっている。一方、ネクローシスは以前から壊死と呼ばれており、細胞が膨張し、最終的に細胞内容物が細胞外に漏出することで周辺細胞（組織）に炎症を起こす。これは癌治療において副作用として認識されている。また、脳梗塞、心筋梗塞等の疾患において組織の壊死は患者に大きなダメージをもたらすため、ネクローシスの制御は臨床においても不可避の課題である。

以前から我々はマウス乳がん由来 FM3A 細胞に抗がん剤 5-Fluorouracil のデオキシリボース体である FUDR が誘導する細胞死の分子機構の解析を行ってきた。FM3A 細胞に FUDR を作用させるとネクローシスを起こすが、継代培養を続けていたところ FUDR を作用させるとアポトーシスを起こす形質の異なる細胞が出現したためクローニングを行い、ネクローシスを起こす F28-7 株からアポトーシスを起こす F28-7-A 株を樹立した (Kakutani T., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 247, 773-779.)。人為的に遺伝子導入をしていない状態で、一つの細胞株からアポトーシス及びネクローシスを起こす細胞株を樹立している例は他にない。これら細胞株を樹立したことで、細胞がネクローシスを起こすか、アポトーシスを起こすかを決定付ける因子の探索が可能となった。そこで細胞死を決定付ける候補因子の同定を目的として mRNA、タンパク質レベルの発現量を網羅的に調べた。mRNA レベルは両細胞株に FUDR を作用させ、経時的にマイクロアレイを用いて調べた。統計学的手法を用いて膨大な遺伝子発現データを解析した結果、ネクローシスとアポトーシス誘導時に発現パターンが著しく異なる 7 因子を同定した (Sato A., et al. *Genomics*, 2008, 92, 9-17.)。また、タンパク質レベルは二次元電気泳動法と質量分析装置を用いて解析し、候補因子として 40 タンパク質を同定した。得られた候補因子を RNAi の手法を用いてノックダウンし、FUDR が誘導する細胞死の形態変化を調べている。すでにこれら候補因子の中から、核膜の構造維持に関与するタンパク質である Lamin B1 をノックダウンすると、本来ネクローシスを起こす F28-7 株がアポトーシスに特徴的な形態変化を示すことを明らかにしており、細胞死の形態を決める一つの因子であることを見出している (Sato A., et al. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2008, 27, 433-438.)。

## 2. 研究の目的

本研究は、細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを決定づける因子を見出し、ネクローシスとアポトーシスの細胞死の分子機構を明らかにすることを目的としている。細胞死は大別するとネクローシスとアポトーシスの二つに分類される。アポトーシスは近年注目され、研究の進んでいる分野であるが、ネクローシスの研究は進んでいないのが現状である。我々は抗がん剤である 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) を作用させるとネクローシスを起こす哺乳動物細胞 FM3A 細胞野生株である F28-7 株とこれとは異なる細胞株でアポトーシスを起こす F28-7-A 株を有しており、すでにこれら両細胞株のネクローシス誘導時、アポトーシス誘導時の mRNA、タンパク質の発現パターンを明らかにしている。したがって、本研究でネクローシスとアポトーシスの細胞死を規定する制御因子の探索、同定を行い、細胞がネクローシスとアポトーシスの選択をどのように行っているのかという分子機構を明らかにする。

## 3. 研究の方法

細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを決定づける因子を見出し、ネクローシスとアポトーシスの細胞死の分子機構を明らかにすることを目的として、以下の計画で研究を遂行した。

(1) トランスクリプトーム及びプロテオーム解析で選別した候補因子に対して特異的な siRNA を用いて、候補因子をノックダウンさせ、FUDR が誘導する細胞死の形態を調べた。

(2) 本来ネクローシスを起こす F28-7 株に Hsp90 の阻害剤である Geldanamycin (GA) と FUDR を併用するとアポトーシスを起こすことから、FUDR と GA を F28-7 株に併用し、トランスクリプトーム及びプロテオーム解析を行った。

(3) (2) の解析結果から、F28-7 株に FUDR 作用時のネクローシスと、FUDR と GA 併用時のアポトーシスで mRNA、タンパク質レベルで発現パターンの異なる因子を選抜した。

(4) (3) の解析から、選抜した候補因子に対して特異的な siRNA を用いて、候補因子をノックダウンさせ、FUDR が誘導する細胞死の形態を調べた。

(5) (1) 及び (4) の実験結果から有望な因子については、細胞死の制御機構における機能解析を行った。また、Hsp90 との関連性についても検討した。

## 4. 研究成果

本研究課題において、以下の研究成果を得た。

(1) プロテオーム解析から見出した候補因子について、siRNAを用いてノックダウンを行い、FUDRが誘導する細胞死の形態（ネクロシス、アポトーシス）が変化するかを調べた。結果、候補因子の中でF28-7-A株と比較するとF28-7株で3.3倍多い細胞骨格タンパク質であるCytokeratin-19をノックダウンすると、本来ネクロシスを起こすF28-7株が、アポトーシスを起こすことが明らかになった。したがって、Lamin-B1、Cytokeratin-19などの中間径フィラメントの増減は、ネクロシスとアポトーシスの細胞死形態に影響を与えていると考えられる。この研究成果は*Journal of Proteome Research*に発表した。

(2) F28-7株にHsp90の阻害剤であるGAとFUDRを併用するとアポトーシスを起こすことから、トランスクリプトーム及びプロテオーム解析を行った。その結果、ネクロシス誘導時と比較してFUDRとGAを併用したアポトーシス、F28-7-A株にFUDRを作用させたアポトーシス誘導時に共通して増加する因子として転写、細胞死などに関与する因子を同定した。また、アポトーシス誘導時にのみ減少する因子として細胞骨格の維持、ストレス応答などに関与する因子を同定した。

(3) トランスクリプトーム解析から見出した候補因子について、siRNAを用いてノックダウンを行い、FUDRが誘導する細胞死が変化するか調べた。結果、候補因子の中でネクロシスを起こしている細胞で時間依存的に発現増加する転写因子Xをノックダウンすると、本来ネクロシスを起こすF28-7株が、アポトーシスを起こすことが明らかになった。

(4) F28-7株にGAとFUDRを併用するとアポトーシスが起るが、この時の転写因子XのmRNAレベル、タンパク質レベルをReal-time PCR及びWestern blottingで調べた。その結果、F28-7株においてFUDRとGA併用によって起こるアポトーシスでは、転写因子Xの発現増加は観察されなかった。以上の結果から転写因子Xの発現量の違いは、細胞がネクロシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを決定づけていると考えられる。

本研究課題において、細胞がネクロシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを制御する因子として、転写因子X、Cytokeratin-19、Lamin-B1を見出した。これら因子はネクロシスを起こす細胞とアポトーシスを起こす細胞でその発現パターンが大きく異なっており、細胞内でのこれら制御因子の発現パターンの違いが、細胞がネクロシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを決定づけていると考えられる。LeistとNicoteraの提唱(Leist M., Nicotera P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 236, 1-9.)と同様に、我々はネクロシスもアポトーシスも途中まで同じ経路を經由しており、あるポイントでスイッチのON/OFF

によって細胞死の形態が決定されるのではないかと考えている(Kakutani T., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, 247, 773-779.)。本研究成果はこの仮説を立証する一つであり、世界に先駆けてネクロシスとアポトーシスの細胞内スイッチのON/OFFシステムの一端を明らかにした。今後、転写因子X、Cytokeratin-19、Lamin-B1、Hsp90などの細胞死制御因子の詳細な機能解析を行い、さらにこれら制御因子の関連性を調べることで、ネクロシスとアポトーシスの細胞死分子機構が明らかになると考える。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① Sato A., Naito T., Hiramoto A., Goda K., Omi T., Kitade Y., Sasaki T., Matsuda A., Fukushima M., Wataya Y., Kim H.-S. Association of RNase L with a Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 in mediating the apoptosis of a human cancer cell-line. *FEBS Journal* 277, 4464-4473, 2010. 査読有。
- ② Sato A., Satake A., Hiramoto A., Wataya Y., Kim H.-S. Protein expression profiles of necrosis and apoptosis induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine in mouse cancer cells. *Journal of Proteome Research* 9, 2329-2338, 2010. 査読有。
- ③ Sato A., Satake A., Hiramoto A., Okamatsu A., Nakama K., Kim H.-S., Wataya Y. Association of nuclear-intermediate filament lamin B1 with necrotic- and apoptotic-morphologies in cell death induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *Nucleic Acids Symposium Series* 53, 293-294, 2009. 査読無。
- ④ Wataya Y., Naito T., Sato A., Hiramoto A., Kitade Y., Sasaki T., Matsuda A., Fukushima M., Kim H.-S. Molecular mechanisms of apoptosis induced by 3'-ethynylcytidine. *Nucleic Acids Symposium Series* 53, 291-292, 2009. 査読無。

[学会発表] (計17件)

- ① 佐藤 聡, 山本 朗央, 中間 健太郎, 平本 晃子, 綿矢 有佑, 金 惠淑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析研究～ネクロシスとアポトーシスを制御する因子の探索～. 日本薬学会第131年会, 2011年3月30日, 静岡, 静岡。
- ② 中間 健太郎, 佐藤 聡, 山本 朗央, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'

- deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析研究 ～ネクローシスとアポトーシスを制御する因子の探索～. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸, 兵庫.
- ③ 山本 朗央, 佐藤 聡, 中間 健太郎, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR)が誘導する細胞死分子機構の解析研究 ～ネクローシスとアポトーシスの制御因子としてのHSP90 機能～. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸, 兵庫.
- ④ 大見 拓也, 内藤 智春, 佐藤 聡, 平本 晃子, 松田 彰, 佐々木 琢磨, 福島 正和, 北出 幸夫, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 抗腫瘍性ヌクレオシドアナログ 3'-Ethylnylcytidine (ECyd)によるアポトーシス誘導機構の解明. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会, 2010年12月10日, 神戸, 兵庫.
- ⑤ Yusuke Wataya, Akira Sato, Tomoharu Naito, Takuya Omi, Akiko Hiramoto, Yukio Kitade, Takuma Sasaki, Akira Matsuda, Masakazu Fukushima, Hye-Sook Kim. Molecular mechanisms of cell death induced by 3'-ethynylcytidine. The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, November 10, 2010, Yokohama, Japan.
- ⑥ Akira Sato, Kentaro Nakama, Akihiro Yamamoto, Akiko Hiramoto, Hye-Sook Kim, Yusuke Wataya. Association of intermediate filament proteins with necrosis and apoptosis in cell death induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. The 37<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2010, November 10, 2010, Yokohama, Japan.
- ⑦ 山本 朗央, 佐藤 聡, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析研究～ネクローシスとアポトーシスの制御因子の探索研究～. 日本がん分子標的治療学会 第14回学術集会, 2010年7月8日, 東京.
- ⑧ 大見 拓也, 佐藤 聡, 松田 彰, 佐々木 琢磨, 福島 正和, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 新規抗腫瘍ヌクレオシドアナログ 3'-Ethylnylcytidine (ECyd; TAS-106)によるアポトーシス誘導機構の解明. 日本がん分子標的治療学会 第14回学術集会, 2010年7月8日, 東京.
- ⑨ 中間 健太郎, 佐藤 聡, 岡松 朗子, 山本 朗央, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析研究 ～ネクローシスとアポトーシスの制御因子の探索～. 第130年会日本薬学会, 2010年3月30日, 岡山, 岡山.
- ⑩ 山本 朗央, 佐藤 聡, 中間 健太郎, 岡松 朗子, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析研究 ～ネクローシスとアポトーシスの制御因子としてのHSP90の機能～. 第130年会日本薬学会, 2010年3月30日, 岡山, 岡山.
- ⑪ 大見 拓也, 内藤 智春, 佐藤 聡, 平本 晃子, 松田 彰, 佐々木 琢磨, 福島 正和, 北出 幸夫, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 抗腫瘍性ヌクレオシドアナログ 3'-Ethylnylcytidine (ECyd, TAS-106)によるアポトーシス誘導機構の解明. 第130年会日本薬学会, 2010年3月30日, 岡山, 岡山.
- ⑫ 佐藤 聡, 中間 健太郎, 山本 朗央, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析～オミクス解析を用いたネクローシスとアポトーシスを決定する因子の同定～ 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月12日, 横浜, 神奈川.
- ⑬ 佐藤 聡, 中間 健太郎, 山本 朗央, 岡松 朗子, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死分子機構の解析～ネクローシスとアポトーシスを決定する因子の同定～ 第82回日本生化学会大会, 2009年10月23日, 神戸, 兵庫.
- ⑭ Akira Sato, Akito Satake, Akiko Hiramoto, Akiko Okamatsu, Kentaro Nakama, Hye-Sook Kim, and Yusuke Wataya. Association of nuclear-intermediate filament lamin B1 with necrotic- and apoptotic-morphologies in cell death Induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. Sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 29, 2009, Takayama, Gifu, Japan.
- ⑮ Yusuke Wataya, Tomoharu Naito, Akira Sato, Akiko Hiramoto, Yukio Kitade, Takuma Sasaki, Akira Matsuda, Masakazu Fukushima, and Hye-Sook Kim. Molecular Mechanisms of Apoptosis induced by 3'-Ethylnylcytidine. Sixth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 29, 2009, Takayama, Gifu, Japan.
- ⑯ 佐藤 聡, 平本 晃子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 5-Fluoro-2'-deoxyuridineが誘導する細胞死のオミクス解析. 第13回がん分子標的治療学会, 2009年6月26日, 徳島, 徳島.

⑰ 綿矢 有佑, 平本 晃子, 佐藤 聡, 金 惠  
淑. 新規抗腫瘍ヌクレオシドアナログ  
1-(3-*C*-ethynyl- $\beta$ -D-*ribo*-pentofuranosy  
l)cytosine (ECyd, TAS-106)によるアポト  
ーシス誘導機構の解明. 第13回がん分子  
標的治療学会, 2009年6月26日, 徳島, 徳  
島.

[その他]  
ホームページ等

<http://www.pharm.okayama-u.ac.jp/lab/joh>

o/

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 聡 (SATO AKIRA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教

研究者番号：40530663