

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390421

研究課題名(和文) アポトーシスおよび非アポトーシス細胞死機序における cPLA2 の関与について

研究課題名(英文) Involvement of cPLA2 in apoptotic and non-apoptotic cell death

研究代表者

中村 卓 (NAKAMURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：30172406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000 円

研究成果の概要(和文)：当該科研による研究では、細胞死の様々な形式において cPLA2 がどのような様式で関与しているのかを多角的に研究した。3年間の研究の骨子は以下のごとくである。

(1) 確立した cPLA2 ノックアウトマウスより胎児線維芽細胞および肺線維芽細胞株を樹立することができた。(2) DNA 障害の場合と低酸素分圧下でのストレス応答は共通した UPR 系路を使っていることが判明した。(3) これらの異なる細胞死経路と cPLA2 との直接的な関連については解明することができなかった。

研究成果の概要(英文)：Our study evaluated the role of cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) in the mechanisms of various cell death, including apoptosis, necroptosis, and autophagy. We obtained the following results: (1) We have established a cPLA2^{-/-} mouse lung embryonal fibroblast cell line from the CKO-cPLA2^{-/-} mice. (2) We found that hypoxic and DNA damaging stresses trigger a common endoplasmic reticulum (ER) stress response and unfolded protein response (UPRs) signalling pathway leading to apoptotic cell death. Also, we found that autophagic in addition to apoptotic cell death occurs in the cells exposed to the external stresses. (3) The results obtained during this study suggested that plasma membrane-associated proteins such as mucin-1 (MUC1) and phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt/glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) complexes may play a critical role in the ER stress and UPR signalling pathway in dying cells.

研究分野：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：アポトーシス 非アポトーシス cPLA2

1. 研究開始当初の背景

放射線やある種の化学療法剤による DNA 修復は確かに細胞内 DNA 修復機構の initiator であり、DNA 修復機構は修復のための「時間稼ぎ」をしてきている。しかしながら、実際に細胞死を引き起こす death effector は修復機構とは別に存在し、その作用点も機序も、細胞によりまた DNA 損傷刺激の種類により異なっている。さらに、DNA 損傷以外の原因で生じる細胞死では、また別の death effector が関与していると考えられる。かように、細胞を「死」に至らしめる過程はさまざまであるが、そもそも「細胞死」とはなんなのであろうか？細胞がエネルギー産生能力をなくし、活動をもうそれ以上続けることができなくなった状態かもしれない。あるいは、細胞が細胞外環境から自己を守るに必要なテリトリーをもはや維持できなくなった状態といえるかもしれない。何がエネルギー産生能力を低下させ、何がテリトリー保全能力を失わせるのであろうか？

2. 研究の目的

この申請では、Ca²⁺ 依存性 cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) の細胞死過程における役割を解明するため、cPLA2 knock-out マウスを用いて in vivo および in vitro の両面にわたる多角的な研究を立案する。われわれは細胞内 cPLA2 が細胞死、特にネクローシスや DNA 障害によって惹起される細胞死における最終的な決定因子ではないかと考えている。この仮説を証明する目的で cPLA2 knock-out マウス個体の成長・分化の過程において、また cPLA2 knock-out マウスより単離した細胞に電離放射線、薬剤、heat-shock など様々なストレスを与えた際、ストレスを受けた組織中の細胞や培養細胞が cPLA2 活性を失った環境はどのように異なった反応を示すかを解析してみたい。特に、細胞死の代表的な形態であるアポトーシスと非アポトーシスとで、cPLA2 の役割の違いに注目している。

3. 研究の方法

(1) 平成 24 年度は cPLA2 conditional knock-out マウスを確立し、次年度からの研究利用を可能にする。これまで確立された cPLA2 knock-out マウスは不妊を伴うため、ヘテロで維持をする必要があり、したがって生まれた仔の genotype を Southern blotting にてそのつど確認する膨大な作業が必要であった。ために供給量に難点があったことを

鑑み、本研究では、維持を cPLA2 conditional knock-out マウスでおこない、必要に応じて Cre-recombinase (Cre) を発現しているマウスとかけ合わせることで、cPLA2 knock-out マウスを作ることができるシステムを取り入れた計画とした。cPLA2 conditional knock-out マウス作成のための targeting vector 構築にあたっては、Gateway system を利用する。

(2) 平成 25 年度では、前年度開発・作成した cPLA2 knock-out マウスを使って、正常の発生・分化過程あるいは外部からのストレスによって起こる細胞死において、cPLA2 が果たす役割を臓器レベルで検証したい。対象とする臓器は、脳、水晶体、大唾液腺、胸腺である。(1) 脳については、一過性の脳虚血により生じた皮質神経細胞死を、(2) 水晶体では、細胞死を伴う分化の過程を、(3) 大唾液腺においては、X-線照射による細胞死を、また(4) 胸腺においては、胸腺内 T 細胞分化のメカニズムの一つである negative selection に及ぼす cPLA2 欠損の影響を解析する。

(3) 本研究の最終年度である平成 26 年度では、細胞死機序における cPLA2 の役割について、細胞レベルでの解析をすすめる。この目的にそって、cPLA2-knock-out マウスおよび正常マウス肺から単離した線維芽細胞 (mouse lung fibroblast, MLF) あるいはマウス胎児より単離した線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) の初代培養を用いた細胞死の in vitro モデルを用いて、異なるタイプの細胞死機序のなかで cPLA2 が必須なのはどのタイプの細胞死なのか、また関与しているとすればどこにどのように働いているのかについて解明したい。本研究で対象とするのは、(1) staurosporine や camptothecin によって誘導されるアポトーシス、(2) 電離放射線によって起こるポリ (ADP-リボース) 合成酵素 依存性細胞死、(3) 低酸素分圧環境下 (hypoxia) において起こる小胞体ストレス (endoplasmic reticulum stress, ER stress) が原因の細胞死、および (4) heat-shock によって引き起こされる細胞死である。

4. 研究成果

当該科研による研究では、細胞死の様々な形式において cPLA2 がどのような様式で関与

しているのかを多角的に研究した。3年間の研究の骨子は以下のごとくである。

1) cPLA2 欠損ミュータントマウスの確立と cPLA2 欠損ミュータントマウスより単離した肺線維芽細胞株の確立。2) 細胞外からの異なるストレスに対して生じる細胞死が3つの形式、すなわち (a) apoptosis, (b) necroptosis, および (c) autophagy のうちのいずれの形式を利用して起こっているかを解明すること。さいごに 3) これら3つの細胞死において cPLA2 の果たす役割の解明。

1) の項目については、予定よりも多少時間がかかったもののほぼ満足のいく成果が得られた。確立したミュータントマウスは共同研究者である理化学研究所に登録済みである。

2) の項目については、放射線やその他 DNA 障害を惹起する薬剤を持ちいた DNA 切断によって生じるストレスならびに低酸素分圧ストレスの2点に焦点を絞って研究を進めた。その結果、いずれのストレスにおいても、細胞死に至る経路として GSK3 依存性の ER ストレス-unfolded Protein Response (UPR) 経路を利用していることがわかった。これらの結果は、DNA 障害と低酸素分圧環境という一見異なった刺激が実は同じストレス応答経路を利用している、という仮説を引き出したことになる。これらの成果の一部は、Cell Death & Disease に報告した (2015 Apr 16;6:e1719. doi: 10.1038/cddis.2015.90)。この GSK3 の上流には PI3K 蛋白が細胞膜近傍で働いていることがわかっている。しかしながら cPLA2 とこれら多様な細胞死との密接な関係については、十分に説得力のある答えを導き出すことができず、これについては今後の課題となった。したがって、今後の研究の目標としては、(a) PI3K が実際にこれらのストレス経路活性化の際にも働いているかどうかについての検証、また (b) DNA 障害や低酸素分圧ストレスの際の関与が示唆されている膜局在蛋白 MUC との相互作用の有無についての検討に置きたい。さらに、cPLA2 と MUC との関係についても検討を加えていきたい。

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1件)

佛坂由可、片山郁夫、van LeyenK、中村卓 : GSK-3 -dependent downregulation of -taxilin and NAC merge to regulate ER stress responses.

Cell Death Dis. 2015 Apr 16;6:e1719. doi: 10.1038/cddis.2015.90.

PMID:25880086 査読有り

[学会発表](計4件)

榮田 智、Marc Van Cauteren、佛坂由可、Makoto Obara、Tomoaki Okuaki、片山郁夫、佐々木美穂、角 美佐、中村 卓 :

Differentiation Between Apoptotic and Non-Apoptotic Cell Death Using Diffusion-Weighted MR

2013 ISMRM (Salt Lake)2013年4月21日
ポスター

田代茂樹、中村 卓 : cPLA2 コンデシヨナルノックアウトマウスの作成。

第54回日本歯科放射線学会総会・学術大会 福岡県立ももち文化センター (福岡市) 2013年6月1日

片山郁夫、佛坂由可、角 美佐、中村 卓 : FEN1 欠損によって惹起される細胞老化の p53 依存性について。

第54回日本歯科放射線学会総会・学術大会 福岡県立ももち文化センター (福岡市) 2013年6月1日

佛坂由可、榮田 智、片山郁夫、佐々木美穂、角 美佐、中村 卓 : In Vitro

Measurement Of Apoptotic And Non-apoptotic Cells Using Diffusion-Weighted MR.

19th International Congress of the IADMFR (Norway) 2013年6月23日 ポスター

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中村 卓 (NAKAMURA Takashi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授
研究者番号：30172406

(2)研究分担者

角 美佐 (SUMI Misa)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授
研究者番号：90284702

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA Yuka)
長崎大学・病院(歯学系)・講師
研究者番号：10244089

佐々木 美穂 (SASAKI Miho)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号：1043874

片山 郁夫 (KATAYAMA Ikuo)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教
研究者番号：80295089

田代 茂樹 (TASHIRO Shigeki)
長崎大学・病院(医学系)・助教
研究者番号：20300882

市川 陽子 (ICHIKAWA Youko)
長崎大学・病院(歯学系)・助教
研究者番号：90380857

(3)連携研究者

(なし)

研究者番号：