

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790216

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と機能解析

研究課題名(英文)Analysis of switching mechanisms in two-types cell-death, necrosis and apoptosis

研究代表者

佐藤 聡 (SATO, AKIRA)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40530663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：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制御する因子の探索とその機能解析を行い、細胞死の決定機構を明らかにすることを目的としている。本研究から、ネクローシスとアポトーシスの細胞死を制御するmicroRNA(miRNA)を見出した。アポトーシスを起す細胞で多く発現しているmiRNAを、本来ネクローシスを起す細胞に過剰発現させるとその細胞死がアポトーシスに変化することを明らかにした。また、このmiRNAを過剰発現した細胞では核膜の構造タンパク質であるlamin-B1がタンパク質レベルで減少することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using mouse tumor cells in culture, we have been studying mechanisms of cell-death, necrosis and apoptosis, caused by an anti-cancer drug. A cellular microRNA (miRNA) was found to regulate the two death-modes. This miRNA is up-regulated in apoptosis-fated cells but not in necrosis-fated cells. We introduced to the necrosis-fated cells an over-expression of the miRNA by transfecting an miRNA-mimic, and found that the cells then underwent apoptosis. We then found that the cells now changed to die by apoptosis show a decrease in the nuclear scaffold protein lamin-B1.

研究分野：細胞死制御

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞死制御 ネクローシス アポトーシス ATF3 Lamin-B1 Cytokeratin-19 MicroRNA siRNA

1. 研究開始当初の背景

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。がん細胞がアポトーシスを起こした場合にはがんの消失、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(壊死)は、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。これはがん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となっている。

研究代表者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5-fluoro-2'-deoxyuridine(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。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。ネクローシスとアポトーシス誘導時に発現パターンの著しく異なる6遺伝子を同定した(Sato et al. *Genomics* 2008)。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、候補因子として核膜の構造タンパク質であるlamin-B1と細胞骨格タンパク質であるcytokeratin-19を同定した(Sato et al. *J Proteome Res* 2010)。得られた候補因子は、siRNA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た。Lamin-B1とcytokeratin-19をそれぞれ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FUdRを作用させることによってアポトーシスに特徴的な形態変化を示すことから、これらタンパク質が細胞死の形態を決める因子であることを明らかにしている(Sato et al. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; Sato et al. *J Proteome Res* 2010)。

研究代表者はFUdRを作用させるとネクローシスを起こすF28-7株にheat shock protein 90(Hsp90)の阻害剤であるgeldanamycin(GA)を併用すると細胞死の形態がアポトーシスに変化することを見出しており、Hsp90もし

くはHsp90クライアントタンパク質がネクローシスとアポトーシスの細胞死制御に関与することを明らかにしている(Sato et al. *Genomics* 2008)。また、F28-7株にFUdRを作用したネクローシス誘導時と、FUdRとGAを併用したアポトーシス誘導時のプロテオーム解析からlamin-B1、cytokeratin-19がFUdRとGAを併用したアポトーシス誘導時に減少していることが明らかになっている。

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、その機能解析を行うことでネクローシスとアポトーシスの細胞死分子機構を明らかにすることを目的としている。

これまでに、細胞死のモデル細胞を用いた研究から、ネクローシスとアポトーシスの細胞死を制御する因子(lamin-B1、cytokeratin-19、Hsp90)及び制御する候補因子を見出している。したがって、本研究ではネクローシスとアポトーシスの細胞死制御機構における制御因子の役割を明らかにし、細胞がネクローシスとアポトーシスの死の選択をどのように行っているか理解する。

3. 研究の方法

ネクローシスとアポトーシスの細胞死を決定する制御因子について機能解析を行い、細胞が死の選択をどのように行っているか明らかにすることを目的として、以下の計画で研究を実施した。

- (1) これまでの研究から見出している細胞死制御因子の候補について、siRNAを用いて機能解析を行い細胞死の表現系に与える影響を調べた。また、siRNAによる各因子のノックダウン効果をリアルタイムPCR及びウエスタンブロット法で調べた。
- (2) FUdRを作用させるとネクローシスを起こす細胞に、Hsp90阻害剤GAを併用すると、アポトーシスを起こすが、この時の各細胞死制御因子のmRNA、タンパク質レベルをリアルタイムPCR及びウエスタンブロット法で調べた。
- (3) これまでの研究から見出している細胞死制御因子(lamin-B1、cytokeratin-19、Hsp90、転写因子)について、各因子に対するsiRNAによるノックダウン及び免疫沈降法を用いて各因子間の関連性を調べた。
- (4) マイクロアレイを用いて、ネクローシスを起こす細胞とアポトーシスを起こす細胞で特徴的に発現しているmicroRNA(miRNA)を調べた。また、特徴的に発現しているmiRNAについて、その発現量をリアルタイムPCRで解析した。

- (5) ネクローシスを起す細胞とアポトーシスを起す細胞で発現量の異なる miRNA について、miRNA mimic 及び miRNA inhibitor を用いて miRNA の過剰発現または阻害実験を行い、細胞死の表現系に与える影響を調べた。
- (6) 細胞のネクローシスとアポトーシスを決定づける miRNA について、lamin-B1、cytokeratin-19、ATF3 の発現制御における役割を調べた。

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) ネクローシスを起している細胞で発現量が増加する 2 つの転写因子 (activating transcription factor 3; ATF3、転写因子 X) を、それぞれノックダウンすると、FUdR を作用させると本来ネクローシスを起す細胞がアポトーシスを起すことを明らかにした。ATF3 に関する研究成果は *FEBS Journal* に発表した (Sato et al. *FEBS J* 2014)。
- (2) FUdR を作用させるとネクローシスを起す細胞に、Hsp90 阻害剤 GA を併用すると、アポトーシスを起す。この時、ネクローシスを起す細胞で発現が増加する 2 つの転写因子 (ATF3、転写因子 X) が、Hsp90 の阻害により、mRNA レベルで抑制されることを明らかにした。ATF3 に関する研究成果は *FEBS Journal* に発表した (Sato et al. *FEBS J* 2014)。
- (3) これまでの研究から見出している細胞死制御因子 (lamin-B1、cytokeratin-19、Hsp90、ATF3) について、それぞれの siRNA を用いてノックダウンしても他の因子の発現量は変化しないことが明らかになった。また、分子シャペロン Hsp90 と lamin-B1、cytokeratin-19、ATF3 との直接的なタンパク質-タンパク質相互作用は見られなかった。
- (4) マイクロアレイを用いた解析から、ネクローシスを起す細胞とアポトーシスを起す細胞でそれぞれ特徴的に発現している miRNA を見出した。
- (5) アポトーシスを起す細胞で多く発現している miRNA を、本来ネクローシスを起す細胞に過剰発現させると、その細胞死がアポトーシスに変化することを明らかにした。
- (6) ネクローシスを起す細胞に、細胞死を制御する miRNA を過剰発現させると、タンパク質レベルで lamin-B1 が減少することを明らかにした。また、cytokeratin-19 及び ATF3 の発現は、この miRNA を過剰発現しても影響を受けないことが明らかになった。

本研究課題から、新たにネクローシスとア

ポトーシスを制御する miRNA を見出した。また、この miRNA はこれまでの研究から見出している細胞死制御因子の中で、核膜の構造タンパク質である lamin-B1 の発現を制御している可能性が明らかになった。今後、新たに細胞死の制御因子として同定した miRNA とこれまでに見出している制御因子との関連性を詳細に調べることで、ネクローシスとアポトーシスの制御機構の一端が明らかになると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Sato A., Nakama K., Watanabe H., Satake A., Yamamoto A., Hiramoto A., Masutani M., Wataya Y., Kim H.-S. Role of Activating Transcription Factor 3 Protein ATF3 in Necrosis and Apoptosis Induced by 5-Fluoro-2'-deoxyuridine. *FEBS Journal*, 281, 1892-1900, 2014.

Ueda Y., Takeda M., Mori K., Dansako H., Wakita T., Kim H.-S., Sato A., Wataya Y., Ikeda M., Kato N. New preclinical antimalarial drugs potently inhibit hepatitis C virus genotype 1b RNA replication. *PLOS ONE* 8, e72519, 2013.

〔学会発表〕(計 15 件)

佐藤 聡, 渡部 裕紀, 金 恵淑, 益谷 美都子, 綿矢 有佑. 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. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸, 兵庫.

佐藤 聡, 伊藤 祐, 齋藤 総一郎, 藤森 浩彰, 平井 崇久, 新井 康仁, 櫻井 良憲, 田中 浩基, 今堀 良夫, 村上 康文, 伊丹 純, 中村 浩之, 鈴木 実, 小野 公二, 増永 慎一郎, 益谷 美都子. ホウ素中性子捕捉反応に対するがん細胞の応答機構の解析. 平成 25 年度京都大学原子炉実験所専門研究会「BNCT の新展開-特殊な療法から一般的な療法への移行を目指して-」, 2013 年 12 月 10-11 日, 熊取, 大阪.

佐藤 聡, 益谷 美都子, 早津 彦哉, 金 恵淑, 綿矢 有佑. 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. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜, 神奈川.

伊藤 祐, 佐藤 聡, 齋藤 総一郎, 藤森 浩彰, 平井 崇久, 新井 康仁, 村上 康文, 今堀 良夫, 伊丹 純, 鈴木 実, 小野 公二, 増永 慎一郎, 益谷 美都子. ホウ素中性子捕捉反応後のヒトがん細胞株における細胞死応答の transcriptome 解析. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 3-5 日, 横浜, 神奈川.

佐藤 聡, 伊藤 祐, 齋藤 総一郎, 藤森 浩彰, 平井 崇久, 今堀 良夫, 村上 康文, 伊丹 純, 中村 浩之, 鈴木 実, 小野 公二, 増永 慎一郎, 益谷 美都子, 櫻井 良憲, 田中 浩基. ホウ素中性子捕捉反応に対するがん細胞の応答機構のプロテオーム解析. 第 10 回日本中性子捕捉療法学会 学術大会, 2013 年 9 月 7-8 日, 岡山, 岡山. 伊藤 祐, 佐藤 聡, 齋藤 総一郎, 藤森 浩彰, 平井 崇久, 新井 康仁, 今堀 良夫, 村上 康文, 伊丹 純, 中村 浩之, 鈴木 実, 小野 公二, 増永 慎一郎, 益谷 美都子, 櫻井 良憲, 田中 浩基. 口腔がん細胞株 SAS におけるホウ素中性子捕捉反応後の遺伝子発現解析. 第 10 回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2013 年 9 月 7-8 日, 岡山, 岡山.

佐藤 聡, 益谷 美都子, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 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分子の探索研究. 平成 25 年度がん若手研究者ワークショップ, 2013 年 9 月 4-7 日, 蓼科, 長野.

佐藤 聡, 渡部 裕紀, 大見 拓也, 山本 朗央, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを制御する因子の探索研究. 第 22 回日本 Cell Death 学会学術集会, 2013 年 7 月 19-20 日, 京都, 京都.

佐藤 聡, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを制御するマイクロ RNA の探索とその機能解析. 第 17 回日本がん分子標的治療学会, 2013 年 6 月 12-14 日, 京都, 京都.

佐藤 聡, 大見 拓也, 山本 朗央, 渡部 裕紀, 綿矢 有佑, 金 惠淑. 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 MicroRNA の探索研究. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜, 神奈川.

渡部 裕紀, 佐藤 聡, 山本 朗央, 綿矢 有佑, 金 惠淑. 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. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 27-30 日, 横浜, 神奈川.

伊藤 祐, 佐藤 聡, 齋藤 総一郎, 藤森 浩彰, 平井 崇久, 今堀 良夫, 伊丹 純, Yaroslav Senshin, Diaz Baiseitov, Kulzhan Berikhanova, Zhaxybay Zhumadilov, 村上 康文, 中村 浩之, 鈴木 実, 小野 公二, 増永 慎一郎, 益谷 美都子. BNCT に対する腫瘍細胞の応答性の解析(Response of tumor cells to BNCT). 平成 24 年度京都大学原子炉実験所専門研究会「BNCT の新展開-特殊な療法から一般的な療法への移行を目指して-」, 2013 年 2 月 15-16 日, 熊取, 大阪.

佐藤 聡, 大見 拓也, 山本 朗央, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 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

因子の探索とその機能解析. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡, 福岡.

佐藤 聡, 大見 拓也, 山本 朗央, 綿矢 有佑, 金 惠淑. 細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを制御する因子の探索研究. 第 21 回日本 Cell Death 学会, 2012 年 7 月 27-28 日, 名古屋, 愛知.

佐藤 聡, 大見 拓也, 山本 朗央, 金 惠淑, 綿矢 有佑. 細胞がネクローシスで死ぬかアポトーシスで死ぬかを制御する因子の探索研究. 第 31 回分子病理学研究会, 2012 年 7 月 21-22 日, 恵那, 岐阜.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/02bioc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 聡 (SATO, Akira)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号: 40530663