

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670167

研究課題名(和文)モザイク状細胞死誘導マウスを用いた代償性増殖機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism underlying apoptosis-induced compensatory proliferation using a murine model

研究代表者

中野 裕康 (NAKANO, Hiroyasu)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：70276476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が細胞死に伴い積極的に増殖因子を放出し周囲の生存細胞の増殖を誘導する現象は代償性増殖と呼ばれている。本研究ではcFLIPsと呼ばれる遺伝子をX染色体に選択的に導入した(KI)マウスを作製し、死細胞から放出される細胞増殖因子の同定を目指した。cFLIPs KIマウスは胎児の腸管でアポトーシスが亢進するが、多くのマウスは正常に出生することが明らかとなった。そこで組織修復に関与するどのような遺伝子の発現が誘導されているかをマイクロアレイ法により解析したところ組織修復に関与するRegIIIbおよびRegIIIg遺伝子の発現上昇が腸管で認められた。現在その遺伝子欠損マウスを作製中である。

研究成果の概要(英文)：Apoptotic cells might produce growth factors that subsequently induce proliferation, which is referred to as compensatory proliferation. The aim of the study is to identify growth factors released from dying cells and elucidate the mechanisms underlying compensatory proliferation. We generated mice that harbored cFLIPs gene at a locus on X chromosome. Intestinal epithelial cells of cFLIPs KI mice underwent apoptosis, however, female cFLIPs KI mice were born and developed without abnormality, and fertile. To identify candidate genes that are potentially involved in proliferation, we performed genome-wide transcriptome analysis using intestines of cFLIPs KI embryos and we found that RegIIIb and RegIIIg involved in tissue repair were significantly elevated in the intestine of cFLIPs KI embryos compared to wild-type embryos. Now, we are going to generate mice lacking both RegIIIb and RegIIIg to elucidate a role for these genes in compensatory proliferation.

研究分野：生化学

キーワード：細胞死 マウス cFLIP アポトーシス ネクロプトーシス 腸炎 X染色体不活性化 代償性増殖 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエでは、個体発生の過程で外界からのストレスにより大量のアポトーシスが誘導されても、周囲の細胞が増殖し最終的には正常な個体として発育することが知られていた(代償性増殖)。長らくその分子メカニズムは不明であったが、アポトーシス細胞が積極的に増殖因子を放出し、周辺細胞の増殖を促進していることが明らかにされた(Ryo et al, *Dev Cell* 2004)。一方でほ乳類でもそのようなメカニズムの存在が推測されていたが、そのメカニズムの詳細については不明な点が多かった。最近我々は、Interleukin (IL)-11 と呼ばれるサイトカインが死細胞から放出され、代償性増殖に関与していることを明らかにした(Nishina et al, *Sci Signal* 2012)。しかしながら、ショウジョウバエの研究では発生過程における代償性増殖のメカニズムと、発生後に休止期にある組織の代償性増殖の分子メカニズムは異なることが示されており、ほ乳類でも同様に複数の代償性増殖に関与するシグナルが働いている可能性がある。

我々はこれまでにNF- κ Bの活性化のメカニズムの解析に従事し(Nakano et al, *PNAS* 1998, 1999; Sakon et al, *EMBO J* 2003; Tokunaga et al, *Nature* 2011)、またNF- κ Bによる細胞死抑制に中心的な役割を果たしているのはcellular FLICE inhibitory protein (cFLIP)と呼ばれる分子であることを明らかにしてきた(Nakajima et al, *EMBO J* 2006; *Oncogene* 2008; *J Biol Chem* 2008)。さらに我々は組織特異的なcFLIP欠損マウスを樹立し、肝臓や腸上皮でcFLIPを欠損させると、アポトーシスやネクロトーシスが著明に亢進した結果、生後2日以内にほぼ全例が死亡するという実験結果を得ている(Piao et al, *Sci Signal* 2012)。cFLIPはオルタナティブスプライシングによりcFLIP_LとcFLIP_Sが産生されるが、in vitroの実験からcFLIPsはアポトーシスを抑制するだけでなく、計画的ネクロトーシス(ネクロプトトーシス)を選択的に誘導することが明らかにされた(Oberst et al, *Nature* 2011)。

2. 研究の目的

cFLIPsをX染色体の特定の遺伝子座へノックイン(KI)させ、X染色体のランダムな不活性化という現象を利用し、モザイク状にcFLIPsを発現するマウスを樹立する。♂のKI陽性マウスはすべての組織でcFLIPsが発現し、ネクロプトトーシスが誘導されることが予測され、胎生致死となる可能性がある。一方でKI陽性の♀のマウスの場合には、ネクロプトトーシス細胞と生細胞とが同一組織内においてモザイク状に存在することが期待される。このマウスを用いる事で、正常の発生過程において細胞死が誘導された場合にどのような因子が死細胞から放出され、代償性増殖が

誘導されるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ♀の場合には片側のアリのX染色体遺伝子の発現がランダムに抑制されるという現象を利用するために、cFLIPs遺伝子をX染色体にノックインさせたマウスを樹立する。CAGプロモーターの下流にcFLIPs遺伝子を挿入した置換ベクターを作成し、Creリコンビネース発現ベクターと共にこのES細胞に遺伝子導入し、X染色体にcFLIPs遺伝子をノックイン(KI)させたES細胞を樹立する。さらにこのES細胞を用いて常法にのっとり遺伝子改変マウスを作製する。

(2) cFLIPs KIマウスの♂および♀の個体においてどのような組織学的な変化が生じ、♂の個体が胎生致死になっているかを組織学的に検討する。HE染色、活性化型カスパーゼ3染色、TUNEL染色、Ki67染色などを行う。

(3) ネクロプトトーシスに必須の分子であるRIPK3欠損マウスとcFLIPs KIマウスと交配し、ネクロプトトーシスをブロックすることで致死的な表現型がレスキューされるかを検討する。

(4) ほとんどの♀KIマウスは正常に出生し、妊娠も可能であった。このことは胎生期にネクロプトトーシスにより生じた組織欠損を周囲の正常細胞が増殖し、代償していることを示している。そこで発生過程の各時期においてトランスクリプトーム解析を行い、細胞外へと分泌される分子に焦点を絞りどのような遺伝子プログラムが働いているかを明らかにする。

4. 研究成果

(1)共同研究者の大村谷らの樹立したX染色体上に変異loxP部位の挿入されているES細胞を用いて、ヒトcFLIPs遺伝子をX染色体に選択的に導入した遺伝子改変(cFLIPs KI)マウスを樹立した(図1)。予想外な事に全身性にcFLIPsを発現する♂KIマウスは全個体が胎生致死となり、♀マウスは正常に出生し、外見上正常であり妊娠可能であることが明らかとなった。

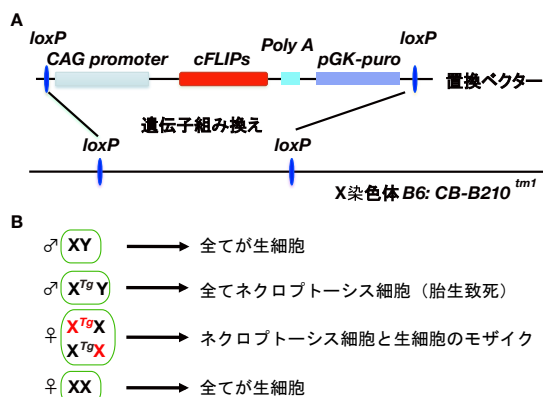


図1. (A) cFLIPs遺伝子挿入のための置換ベクターと挿入されるX染色体上の遺伝子座(B210) (B) cFLIPs遺伝子のランダムな発現抑制(赤字は発現抑制されたX染色体)

(2) 胎生致死の原因を明らかにするために、timed mating を行い胎生何日目に♂KI マウスが致死となっているかを解析した。その結果胎生 18.5 日目には消化管上皮の著明な細胞死が認められた (図 2)。免疫染色の結果から活性化型カスパーゼ 3 や TUNEL 染色が陽性であり、アポトーシスに陥っていることが判明した。興味深いことに♀KI マウスでも程度は弱いものの腸上皮細胞のアポトーシスが認められた。多くの♀KI マウスは正常に出生し、妊娠できることから胎生期の腸上皮細胞死は代償され、その後の腸管の形成や発達には影響しなかった。

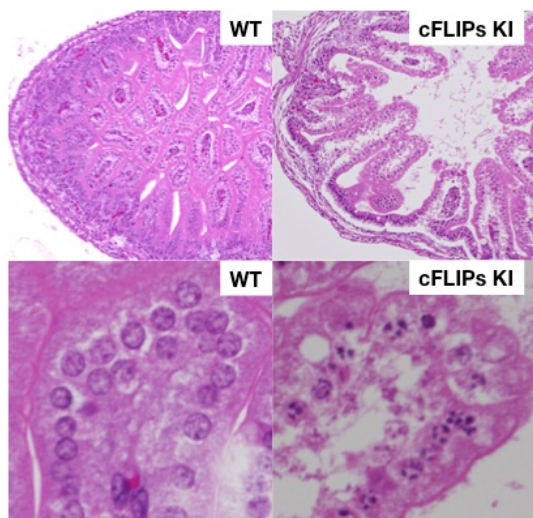


図2. 胎生18.5日の♂のc-FLIPs KIマウスで見られる腸管の上皮の脱落と上皮の核の変性および細胞質の膨化

(3) 以上の結果は死んだ腸上皮細胞から増殖因子が放出され、周辺の生細胞に増殖を誘導している可能性を示している。その因子を同定するために胎生期の腸管を用いてマイクロアレイを用いて検討したところ組織修復に関与するRegIIIb やRegIIIg 遺伝子を含む多数の遺伝子の発現が cFLIPs KI マウス由来の腸管では上昇していた。なかでも RegIIIb やRegIIIg 遺伝子は出生直後には成長に伴い野生型マウスでも著明な誘導がかかるが、出生前には野生型マウスでの発現誘導は認められず、出生後の誘導のメカニズムと出生前の細胞死に伴う誘導のメカニズムは異なっている可能性が明らかとなった。cFLIPs KI マウスと RIPK3 欠損マウスと交配することにより、腸管上皮細胞のアポトーシスは抑制され、RegIIIb やRegIIIg の発現も低下することが明らかとなった。この事は傷害を受けた上皮細胞から、あるいは傷害を受けた上皮細胞に応答した周辺細胞でRegIIIb やRegIIIg の発現が誘導されることを示している。

(4) 免疫染色を行ったところ、RegIIIb やRegIIIg はKI マウスの腸管上皮細胞で発現し、消化管内腔にも分泌されていることが明らかとなり、その程度は腸管上皮細胞の傷害の程度と相関している可能性が示された。現在RegIIIb やRegIIIg が胎生期における代償性

増殖に関与しているかを個体レベルで明らかにするために、Crisper/Cas9 法を用いて二重欠損マウスを作製中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Nagashima, H., Y. Okuyama, A. Asao, T. Kawabe, S. Yamaki, H. Nakano, M. Croft, N. Ishii, and T. So. 2014. The adaptor TRAF5 limits the differentiation of inflammatory CD4(+) T cells by antagonizing signaling via the receptor for IL-6. *Nat Immunol* 15:449-456. 10.1038/ni.2863
2. Doe, K., K. Nozawa, K. Hiruma, Y. Yamada, Y. Matsuki, S. Nakano, M. Ogasawara, H. Nakano, T. Ikeda, T. Ikegami, M. Fujishiro, M. Kawasaki, K. Ikeda, H. Amano, S. Morimoto, H. Ogawa, K. Takamori, I. Sekigawa, and Y. Takasaki. 2014. Antibody against chromatin assembly factor-1 is a novel autoantibody specifically recognized in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 23:1031-1041. 10.1177/0961203314536245
3. Bian, Z., J. Dai, H. Nakano, Guan, Y. Yuan, L. Gan, H. Zhou, J. Zong, Y. Zhang, F. Li, L. Yan, D. Shen, H. Li, and Q. Tang. 2014. Disruption of tumor necrosis factor receptor associated factor 5 exacerbates pressure overload cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Cell Biochem* 115:349-358. 10.1002/jcb.24669
4. Wang, L., Y. Lu, H. Guan, D. Jiang, Y. Guan, X. Zhang, H. Nakano, Y. Zhou, Y. Zhang, L. Yang, and H. Li. 2013. Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Factor 5 is an Essential Mediator of Ischemic Brain Infarction. *J Neurochem* 126:400-414. 10.1111/jnc.12207
5. Speight, P., H. Nakano, T.J. Kelley, B. Hinz, and A. Kapus. 2013. Differential topical susceptibility to TGFbeta in intact and injured regions of the epithelium: key role in myofibroblast transition. *Mol Biol Cell* 24:3326-3336. 10.1091/mbc.E13-04-0220
6. Shindo, R., H. Kakehashi, K. Okumura, Y. Kumagai, and H. Nakano. 2013. Critical contribution of oxidative stress to TNFalpha-induced necroptosis downstream of RIPK1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 436:212-216. 10.1016/j.bbrc.2013.05.075
7. Ly, D.L., F. Waheed, M. Lodyga, P.

- Speight, A. Masszi, H. Nakano, M. Hersom, S.F. Pedersen, K. Szaszi, and A. Kapus. 2013. Hyperosmotic stress regulates the distribution and stability of myocardin-related transcription factor, a key modulator of the cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C115-127. 10.1152/ajpcell.00290.2012
8. Ashida, H., H. Nakano, and C. Sasakawa. 2013. Shigella IpaH0722 E3 Ubiquitin Ligase Effector Targets TRAF2 to Inhibit PKC-NF-kappaB Activity in Invaded Epithelial Cells. *PLoS Pathog* 9:e1003409. 10.1371/journal.ppat.1003409
以上すべて査読あり。
 9. 進藤綾大、中野裕康. 2015. ネクロプトーシスによる生体応答制御機構. 臨床免疫・アレルギー科 63:401-405.
 10. 土屋勇一、中野裕康. 2015. 慢性炎症と悪性腫瘍. 臨床免疫・アレルギー科 63:1-6.
 11. 中野裕康. 2014. cFLIP の生体の恒常性維持における役割. 生化学 86:400-403. (査読あり)
 12. 仁科隆史、中野裕康. 2013. 細胞死と代償性増殖. 医学のあゆみ 246:419-425.
 13. 仁科隆史、中野裕康. 2013. 細胞死に伴う酸化ストレスの生体恒常性維持における役割. 医学のあゆみ 247:949-954.
 14. 中野裕康, 朴雪花. 2013. c-FLIP の腸管や肝臓の恒常性維持における役割. 実験医学 31:1290-1294.
 15. 中野裕康. 2013. 代償性増殖と酸化ストレス. 化学と生物. 2-6.
11 を除き 9~15 は査読なし。
- [学会発表] (計 16 件)
1. Nakano H, Ohmuraya M, Komazawa-Sakon S, M. S, Murai S, Araki K, and S. R. 2015.5.20. Targeted integration of human cFLIPs gene on X chromosome results in RIPK3-dependent apoptosis and necroptosis. In 15th International TNF conference. Ghent, Belgium.
 2. 中野裕康. 2014.10.16. cFLIP による細胞死と炎症の制御. 第 87 回日本生化学会. 国立京都国際会館、京都府、京都市.
 3. 進藤綾大、駒澤幸子、小池正人、内山安男、大村谷昌樹、中野裕康. 2014.10.16. X 染色体の不活性化を利用した cFLIPs トランスジェニックマウスの樹立. 第 87 回日本生化学会大会. 第 87 回日本生化学会. 国立京都国際会館、京都府、京都市.
 4. 仁科隆史、大塚正人、中村衣里、多田昇弘、中野裕康. 2014.10.16. IL-11 を介した腸管の恒常性維持機構の解明. 第 87 回日本生化学会大会. 第 87 回日本生化学会. 国立京都国際会館、京都府、京都市.
 5. 中野裕康. 2014.9.4. cFLIP による生と死の運命決定機構. 第 67 回日本酸化ストレス学会. 同志社大学、京都府、京都市.
 6. 中野裕康. 2014.7.18. 皮膚の恒常性維持における cFLIP の役割. 第 23 回日本 Cell Death 学会. 東京医科歯科大学、東京、文京区.
 7. Piao X, Tanaka M, Ohmuraya M, Miyake S, Okumura K, Tanaka M, Nakano H. 2013.12.13. Generation of mice that amplifies signals released from dying hepatocytes. 第 44 回日本免疫学会総会. 幕張メッセ、千葉県、千葉市.
 8. 進藤綾大、掛橋秀直、熊谷嘉人、奥村康、中野裕康. 2013.9.13. 抗酸化剤は RIPK1 のリン酸化およびネクロプトーシスを抑制する. 第 83 回日本生化学会大会. パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市.
 9. 中野裕康. 2013.9.11. c-FLIP による生体の恒常性維持における役割. 第 86 回日本生化学会大会. パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市.
 10. 仁科隆史、新開泰弘、熊谷嘉人、奥村康、中野裕康. 2013.9.11. 親電子リガンドによる IL-11 産生機構の解明. 第 83 回日本生化学会大会. パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市.
 11. 中野裕康. 2013.7.19. c-FLIP による細胞の生と死の運命決定機構の解明. 第 22 回日本 Cell Death 学会. 芝蘭会館、京都府、京都市.
 12. 進藤綾大、掛橋秀直、熊谷嘉人、奥村康、中野裕康. 2013.7.19. 酸化ストレスは RIPK1 の下流でネクロプトーシスに参与する. 第 22 回日本 Cell Death 学会. 芝蘭会館、京都府、京都市.
 13. Nishina T, Shinkai Y, Kumagai Y, Okumura K, Nakano H. 2013.7.9. Interleukin-11 is responsible for stress-induced proliferation of intestinal epithelial cells. 14th International TNF Conference. Qubec, Canada.
 14. Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Okumura K, He YW, and Nakano H. 2013.7.9. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. In 14th International TNF Conference. Qubec, Canada.
 15. Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Okumura K, He YW,

Nakano H. 2013.4.17. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and programmed necrosis. Cold Spring Harbor Asia Conference “Non-apoptotic cell death”. Suzhou, China.

16. 仁科隆史, 新開泰弘, 熊谷嘉人, 奥村康, 中野裕康. 2013.2.1. 親電子リガンドによる IL-11 産生機構の解明, 第 12 回分子予防環境医学研究会. 筑波大学、茨城県、つくば市.

〔図書〕 (計 1 件)

1. Nakano H., X Piao, R Shindo, S Komazawa-Sakon. 2015. Cellular FLICE-inhibitory protein regulates tissue homeostasis. Springer International Publishing AG. 印刷中.
(査読なし)

〔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

<http://tohobiochemi.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 裕康 (NAKANO, Hiroyasu)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号 : 70276476