

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460280

研究課題名(和文) 持続的ストレスがもたらす細胞死多様性の研究

研究課題名(英文) The commonality of multiple cell death caused by continuous stress.

研究代表者

小川 登紀子 (OGAWA, TOKIKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：30382229

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：持続的なストレスを5日間負荷したラットでは、下垂体のメラノトロフ細胞と肝細胞の一部に細胞死が起こっていた。異なる機能を有する二種類の細胞に起こる細胞死を電子顕微鏡で観察すると、多様な細胞死像が確認された。一方で、これらの細胞死には、ストレスの持続により“特定の細胞機能の亢進が長時間続く”ことで、“細胞内のリサイクルシステムの異常”が生じることが、共通の原因と考えられた。5日間のストレスにより起こる細胞死は限定的であるが、ストレスがより長期化すると、細胞死がこれらの器官の恒常性維持にとってリスク因子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The multi-morphological cell death was founded in at least two organs of continuous stress (CS) loaded rat. One of them was appeared in the pituitary intermediate cells, melanotrophs, which was activated hormone production and secretion under CS. The other was detected in the liver. Some hepatocyte located perivenous area expressed necrotic morphology. In the CS rat, perivenous hepatocytes continuously increased lipid metabolism and this might induce oxidative stress. On the other hand, anti-oxidant reactions and intracellular recycling systems were activated as protective effects, but a part of hepatocyte seemed to be unavoidable from the stress. The dyeing processes both in hepatocytes and melanotrophs under CS were common characteristic. Such as cell death possibly become a risk factor for the organ homeostasis in the case of stress prolongation more long time.

研究分野：細胞生物学、細胞形態学

キーワード：細胞死 慢性的ストレス 下垂体中間葉細胞 肝細胞

1. 研究開始当初の背景

慢性的なストレスが、慢性疲労症候群、うつ、不眠症や突然死など、様々な疾患に関連していることは広く知られている。一方で、生体が受ける慢性的なストレスが、細胞レベルでどのような変化をもたらすのかは、十分な情報が得られていなかった。本研究で用いた動物モデルは、疲労研究を目的として開発されたラットモデルであり、5日間継続してストレスを負荷することで、比較的均一なモデルを作出できる。これまで様々な研究成果が報告されており、本研究に適切なモデル動物と考えられた。この持続的ストレス (continuous stress: CS) を負荷したラット (CS ラット) では、本研究の開始当初までに、下垂体中間葉を形成するメラノトロフ細胞に細胞死が起こることが明らかになっていた。そこでこの細胞死を、CS が器官の恒常性を攪乱する要因の一つと捉え、細胞レベルでの研究に着手した。

生体に生じる細胞死は、発生や器官形成における生理的な細胞死のほか、様々な疾患と密接に関連している。糖尿病や神経系疾患の原因となる細胞死においては、これを回避し細胞を生存させることが重要となる。一方癌治療においては、癌細胞を細胞死に誘導することが必要となる。このように細胞死をどのように制御するかは、組織の恒常性の維持において重要な課題となる。本研究で対象とした“持続的なストレスによる細胞死”については、メカニズムのみならずその存在自体が十分に知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、CS ラットの下垂体中間葉のホルモン分泌細胞、メラノトロフに起こる細胞死の系を用いて、慢性的ストレス下に起こる細胞死メカニズムを明らかにしようとした。メラノトロフ細胞の細胞死の特徴としては、(1)通常分泌刺激の解除によってリセットされるべきホルモン分泌が、長時間持続することによって、もたらされる細胞死であり、(2)細胞死像が様々な微細形態学的特徴の異なる像を示すことがあげられた。このような細胞死が起こる理由として次の仮説を提示した。一定期間持続するストレス状態では、その間持続的に活性化される機能を有する細胞で、細胞変性・細胞死が起こる。細胞機能の活性化が続く過程では、ストレス応答反応が次々と繰り返され、細胞死が起こるタイミングにより、細胞死形態が異なる。これらの仮説を実証するために、モデルラットのメラノトロフ細胞の細胞死と、本研究課題の遂行中に新たに見いだした、肝細胞の細胞死の二つの系を解析対象とした。

また、モデルラットのメラノトロフ細胞のうち、細胞死するものは一部であり、多くの細胞は生残する。この生死を分けるメカニズムを明らかにするために、ストレス応答性に発現するいくつかの転写因子について解析

を行うこととした。CS ラットメラノトロフの細胞死が起こる領域では、しばしば C/EBP-homologous protein (CHOP) 分子の核集積像がみられた。CHOP は、小胞体ストレスによるアポトーシスを誘導する転写因子として知られている。メラノトロフ細胞の細胞死領域に発現する CHOP の機能について解析を行うこととした。

3. 研究の方法

(1)本研究には、成体ラットを深さ 1.5cm の水を張ったケージ内で5日間維持することで CS ラットを作製し、研究に用いた。細胞死モデルとして、CS ラットの下垂体中間葉のメラノトロフ細胞と、新たに見いだした肝細胞の細胞死を対象とした。また、メラノトロフ細胞の細胞死および分子発現の解析に、ラット中間葉から分離したメラノトロフ細胞の初代培養系と、CHOP ノックアウトマウスを用いた CS モデルの作出を試みた。

(2)メラノトロフ細胞死の解析

CS ラットの下垂体中間葉組織は、細胞内小器官のマーカーを用いた免疫組織染色と、透過型電子顕微鏡による微細形態観察により、変性・細胞死の同定と細胞内小器官の変化を観察した。

この情報に基づいて、ラットメラノトロフの培養細胞をホルモン分泌が活性化した状態に誘導し、想定されるストレス防御反応を阻害することで細胞死の再現を行った。

マウスの CS モデルにより、wild type マウスで CHOP 分子の発現を確認し、CHOP ノックアウトマウスとの比較を行った。

(3)肝細胞の細胞死解析

CS ラットの肝臓は、複数のストレスマーカー分子についての免疫組織染色と、透過型電子顕微鏡による微細形態観察により、変性・細胞死の同定と細胞内小器官の変化を観察した。

細胞死の背景となる肝細胞機能亢進の本態を明らかにするために、代謝およびストレス関連分子の遺伝子・蛋白発現の変化と、肝細胞の代謝機能を解析した。

4. 研究成果

(1)下垂体メラノトロフ細胞に起こる細胞死のメカニズムと形態学的多様性の解析

メラノトロフの細胞死は、形態学的特徴の異なる細胞死像が同時に観察され、複数の細胞死メカニズムが介在すると考えられる点でユニークな細胞死である。一方で、観察される細胞死像には、蛋白や細胞内小器官の分解・リサイクルの過程 (リサイクルシステム) に異常が生じていると考えられ、最終的にネクローシス様細胞死の形態を示す、という共通点があった。

ストレスが続くことで異常な蛋白や細胞内小器官が増加し、リサイクルシステムを活性化させることは、細胞の恒常性を維持する

うえで極めて重要である。ストレスを受けたラットのメラノトロフでは、ホルモンの産生・分泌の亢進により、リサイクルシステムが活性化するが、ストレスが長引くことで次第に停滞する。このことが新たなストレスとなっていることがわかってきた。すなわち、このようなリサイクルシステムの異常とそれによって引き起こされる細胞死は、慢性的なストレス時に特有の現象と考えられた。

メラノトロフ細胞死像には細胞膜の破綻が確認され、ネクローシスと呼ばれる細胞死と考えられた。そこでラットメラノトロフ細胞の培養系を用いて、リサイクルシステムの異常がネクローシスを引き起こすかを確認した。あらかじめホルモン産生を活性化させた培養メラノトロフ細胞に、リサイクルシステムを阻害する薬剤を作用させたところ、複数の阻害剤で、細胞膜の破綻を伴う細胞死 (PI 陽性核で識別) が起こることが確認された (図 1)。同時に、リサイクルシステムのどの過程を阻害するかによって、細胞死の形態が異なる可能性が明らかになり、細胞死形態の多様性と関連あるものと考えられた。

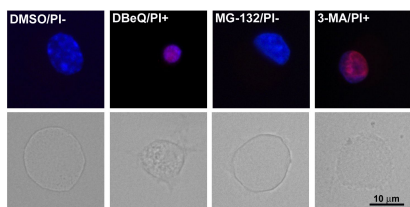


図 1. 培養メラノトロフ細胞にリサイクルシステム阻害剤を添加すると、PI 陽性核 (赤) を有する細胞死が観察された。

(2) 下垂体メラノトロフの細胞死における CHOP 分子の役割

メラノトロフの初代培養細胞を用いた実験からは、細胞内分解系の阻害剤を用いることでネクローシス様細胞死が起こることを明らかにしたが、この際 CHOP の発現は確認されなかった。一方で、ネクローシスの起こらない別の阻害剤を添加すると、一部の細胞で CHOP の発現がみられたことから、CHOP はメラノトロフのネクローシスを直接誘導する分子ではないと考えられた。また、野生型 (wild) および CHOP ノックアウト (CHOP-ko) マウスをラットモデルに準じて、少量の水を容れたケージで飼育し 3 日間のストレスを負荷したマウスモデルを作製した。wild マウスモデルでは、メラノトロフ細胞の一部に CHOP の核集積が認められた。電子顕微鏡観察により、wild および CHOP-ko マウス双方でネクローシス様の細胞死像が確認された。このことから、CHOP はネクローシス様の細胞死には直接関与していないものと考えられた。

メラノトロフの細胞死過程に発現する CHOP 分子の機能解析を行うツールとして、CS ラットのメラノトロフ細胞では、CHOP の発現率が低く、分子レベルでの解析が困難であった。そこで、CHOP を高率に発現させる実験系として、CS の負荷期間を改変したラットモデルや培養メラノトロフ細胞での実験系の作製を試みたが、解析に十分な発現系を得るこ

とができなかった。また、マウスメラノトロフ細胞における CHOP の発現動態が、ラットとは異なることが明らかになり、マウスを用いた解析を継続することは断念した。以上の理由により、当初予定していた CHOP 分子の機能解析は成果を上げることはできなかった。

(3) リサイクルシステムの活性化を指標とした細胞死スクリーニング

下垂体メラノトロフの細胞死の知見から、ストレス持続下で何らかの機能亢進が持続する細胞においては、リサイクルシステムが活性化し続け、結果としてリサイクルシステムの働きが停滞する可能性があると考えられた。そこで、下垂体以外の組織においても、リサイクルシステムに変化が生じていないか、CS ラットのいくつかの臓器を対象としたスクリーニングを行った。その結果、肝臓においてリサイクルシステム機能の亢進が生じており、異常を示す細胞が確認された。

(4) 肝細胞変性・細胞死の多様性

CS ラットの肝臓では、H-E 染色により細胞膜が不明瞭な肝細胞が散見された。また、免疫組織染色により、リサイクルシステム機能の亢進を示す多様な染色像が確認された。これらの肝細胞の微細形態を観察したところ、ミトコンドリアの様々な形態異常を伴う、ネクローシスの像を示す細胞が確認された。これらは下垂体メラノトロフの変性細胞と共通する特徴であった。さらにこのような変性肝細胞は、中心静脈周囲の領域に局限して観察された (図 2)。

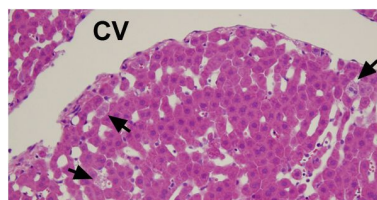


図 2. CS ラット肝臓の H-E 染色像。中心静脈 (cv) 周囲領域に変性細胞 (矢印) が認められた。

(5) CS ラット肝臓の酸化ストレス応答

CS ラットの肝臓では、酸化ストレスが亢進しているとする報告があり、酸化ストレスと肝細胞の細胞死との関連に注目した。酸化ストレスマーカーを用いた免疫組織染色を行ったところ、中心静脈周囲の領域に陽性細胞が確認され、これらの細胞変性・細胞死が酸化ストレスと関連したものであると考えられた。

In situ hybridization と免疫組織染色により、CS ラットの肝臓に発現する酸化ストレス関連分子を解析した。この結果、CS ラットの中心静脈周囲領域で活性化する転写因子と、その下流の抗酸化分子を特定した (図 3)。CS により、肝臓では中心静脈周囲領域では、これらの分子を介した抗酸化反応が起こり、肝細胞の防御に寄与していることが明らかになった。

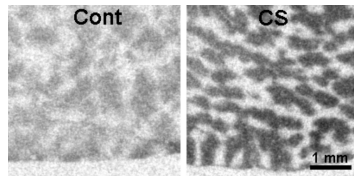


図 3. ラット肝臓の中心静脈領域に発現する抗酸化分子の mRNA は、CS ラットで、通常(Cont)よりも増加した。

(6) 肝臓の酸化ストレスと CS ラットの代謝変化

モデルラットの肝臓における酸化ストレスは、中心静脈周囲に特有の肝細胞の働きと密接に関連しているものと考えことから、肝細胞の代謝に着目した。CS ラットは通常飼育のラットに比べ、摂餌量が増加する一方で体重は増加せず、末梢血液中のトリグリセリド値が低下し、肝細胞内の中性脂肪は増加しなかった。

中心静脈周囲領域に発現する脂肪酸代謝に関わる分子の発現の解析(図4)から、CS ラットでは脂肪酸の消費が高まっていると考えられた。CS ラット肝臓の中心静脈周囲領域で、脂肪酸代謝が大きく変化することが酸化ストレスの原因となり、これに対する防御反応が起こっていることが明らかになった。

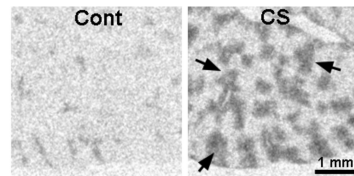


図 4. ラット肝臓での脂肪酸代謝関連分子 mRNA の発現。CS ラットの中心静脈領域(矢印)で、通常(Cont)よりも発現が増加した。

(7) CS ラットの細胞死多様性と共通性

研究開始当初、CS ラットにおいては、下垂体中間葉細胞の一部に細胞死が起こることが明らかになっていた。この細胞死は、CS が数日間続くことで、ホルモン合成・分泌機能が異常な長時間亢進した結果として生じる、いふなれば細胞の過労死と位置づけられる。本研究により、この細胞死は、形態学的にはネクローシスの特徴を備えており、細胞内リサイクルシステムの異常を伴っていることが明らかになった。一方、肝臓において観察された細胞死は、メラノトロフ細胞死と共通して、ネクローシスの特徴を示すことが明らかになった。細胞死の経過としては、CS に伴い肝細胞における脂肪酸代謝が長時間継続的に亢進することで、酸化ストレスを引き起こし、これが細胞死の原因になっていると考えられた。すなわち、脂肪酸代謝の亢進が活性酸素種を大量に発生させることで過酸化物が増加し、これを分解するために細胞内リサイクルシステムが活性化し、結果的にその停滞が生じるという経過が想定された。肝細胞死においても、メラノトロフ細胞死に類似したプロセスがあることが明らかになりつつある。

このように CS ラットでは、少なくとも機能の異なる二つの組織において、慢性的なストレス状態で起こる細胞機能の亢進が続く

ことで、非常に類似した細胞死が生じていることが明らかになった。このような細胞死の存在は、ストレス状態がより長期化することで、様々な器官の恒常性の維持において、リスク要因となる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 6 件)

小川登紀子 他、疲労モデルラットの肝細胞変性・細胞死は脂肪酸代謝の変化により引き起こされる。第 13 回日本疲労学会総会・学術集会、2017.5.27-28.「名古屋大学野依記念学術交流館(愛知県・名古屋市)」

小川登紀子 他、持続的ストレス負荷ラットの肝細胞変性メカニズムの検討。第 122 回日本解剖学会総会・全国学術総会、2017.3.30.「長崎大学医学部(長崎県・長崎市)」

小川登紀子 他、疲労モデルラットにおける肝細胞変性とストレス関連転写因子の発現。第 12 回日本疲労学会総会・学術集会、2016.5.20-21.「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

小川登紀子 他、持続的ストレスにより肝細胞に起こるオートファジーの亢進と細胞変性。第 11 回日本疲労学会総会・学術集会、2015.5.15-16.「山口県総合保健会館(山口県・山口市)」

小川登紀子 他、持続的ストレス負荷ラットに起こる下垂体メラノトロフ細胞の多様性。第 120 回日本解剖学会総会・全国学術総会および第 92 回日本生理学会大会合同大会、2015.3.21.「神戸国際会議場・展示場(兵庫県・神戸市)」

小川登紀子 他、持続的ストレスラット下垂体メラノトロフの細胞死は細胞内リサイクルシステムの破綻によって起こる。第 10 回日本疲労学会総会・学術集会、2014.5.30-31.「コングレコンベンションセンター(大阪府・大阪市)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 登紀子 (OGAWA Tokiko)

大阪市立大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号：30382229