

令和元年5月27日現在

機関番号：32661

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19533

研究課題名(和文)ネクロトーシスとDAMPs放出のライブセルイメージング

研究課題名(英文)Live imaging of necroptosis and the release of DAMPs

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、制御された細胞死の1種類であるネクロトーシスを、Forster resonance energy transfer と呼ばれる技術を用いて、蛍光イメージング法により可視化できるセンサータンパク質(SMARTと命名)を開発した。また細胞死に伴い放出されるDanger-associated molecular pattern (DAMP)sの放出に、遅いモードと早いモードが存在し、かつそのモードの決定が細胞膜修復に關与するCHMP4Bというタンパク質により制御されていることを1細胞レベルのイメージングより明らかにした。さらにSMARTを発現するトランスジェニックマウスを樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、蛍光イメージング法によるネクロトーシスの可視化を実現した世界で初めての研究であり、死細胞から放出され周囲の細胞に影響を与え、様々な病態に深く關与しているDAMPsの放出パターンが2種類があることを1細胞レベルで初めて明らかにした研究である。今後、ネクロトーシスやDAMPsが關与する病態の解明や、治療技術の開発に貢献することが期待される。また新規に開発したセンサータンパク質を発現する遺伝子改変マウスなどを作成することで、ネクロトーシスが体の中でどのような状況で起こっているかの新たな解析手法を提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Necroptosis is a regulated form of necrosis that depends on receptor-interacting protein kinase (RIPK)3 and mixed lineage kinase domain-like (MLKL). While danger-associated molecular pattern (DAMP)s are involved in various pathological conditions and released from dead cells, the underlying mechanisms are not fully understood. Here we develop a fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor, termed SMART (a sensor for MLKL activation by RIPK3 based on FRET). SMART is composed of a fragment of MLKL and monitors necroptosis, but not apoptosis or necrosis. SMART monitors plasma membrane translocation of oligomerized MLKL, which is induced by RIPK3. SMART in combination with imaging of the release of nuclear DAMPs and Live-Cell Imaging for Secretion activity (LCI-S) reveals two different modes of the release of High Mobility Group Box 1 from necroptotic cells. We also generated mice stably expressing SMART that will be useful to investigate necroptotic cells in vivo.

研究分野：実験病理

キーワード：ネクロトーシス FRET イメージング DAMPs RIPK3 MLKL 全反射顕微鏡 トランスジェニックマウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ネクロプトーシスは制御された細胞死の一つであり、近年虚血再灌流障害、ウイルス感染の排除、敗血症性ショックなどの様々な病態への関与が示されつつある。ネクロプトーシスは TNF などのサイトカインや、ウイルス感染や polyI:C などにより誘導される。ネクロプトーシス細胞はアポトーシス細胞と異なり、早期に細胞膜の障害が誘導されることから、Danger-associated molecular pattern (DAMP)s と呼ばれる細胞内タンパク質や核酸などが周囲に放出され、強い炎症を誘導すると考えられている。しかし DAMPs の放出と細胞膜障害がどのように制御されているかの詳細は不明であった。一方で、ネクロプトーシスの実行には RIPK1, RIPK3 と呼ばれるセリンスレオニンキナーゼのリン酸化および、最終的な実行因子である MLKL が RIPK3 によりリン酸化され、多量体を形成して、細胞膜に移行してポア形成をすることで細胞死が誘導されると考えられている。これまでにアポトーシスに伴い活性化されるカスパーゼの活性化を Förster resonance energy transfer (FRET) の原理を用いて 1 細胞レベルで可視化する技術 (例えば三浦らの開発した SCAT1 や SCAT3) は開発されていた。一方でこれまでにネクロプトーシスを可視化する技術は開発されておらず、ネクロプトーシスのメカニズムのさらなる解明や、ネクロプトーシスにより誘導される生体応答を解析するためにはネクロプトーシスのライブセルイメージングを可能にする技術の開発が必須であると考えられていた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究課題では、ネクロプトーシスを特異的に検出することのできる FRET バイオセンサーを開発し、かつネクロプトーシスに伴い放出される DAMPs の 1 細胞イメージングを行い、ネクロプトーシスによる細胞膜障害と DAMPs の放出の関係を解明することを目的とした。また SMART Tg マウスを作成し、生体内でネクロプトーシスがどのように実行されているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) N 末に FRET の acceptor である Ypet および C 末に donor である CFP をリンカー配列で連結した FRET vector に、RIPK3 との会合に必要な MLKL の部位を含み、かつ一部を SAGG (セリン、アラニン、グリシン、グリシン) という配列に置換した様々な断片を挿入した FRET ベクターを構築した。構築したベクターを L929 細胞に一過性に発現させ、TNF + zVAD 刺激によりネクロプトーシスを誘導して FRET/CFP 比の上昇が見られるかを検討した。FRET 比の上昇が見られた FRET vector (SMART と命名) を恒常的に発現する細胞を樹立し、ネクロプトーシス以外の刺激 (例えばアポトーシス刺激やネクローシス刺激など) でも FRET が誘導されるかを検討した。

(2) 白崎らの開発した Live Cell Imaging for Secretion activity (LCI-S) という方法を用いて、Danger-associated molecular pattern (DAMP)s の一つである HMGB1 がネクロプトーシス細胞からどのように放出されるかを 1 細胞イメージングを行った。そのために蛍光色素との融合タンパク質 (HMGB1-mCherry) を恒常的に発現する L929 細胞を樹立し、anti-mCherry 抗体で培養皿をコートして、全反射蛍光顕微鏡にて観察した。

(3) ネクロプトーシス細胞を in vivo でイメージングするために ROSA26 遺伝子座に CAG プロモーター + SMART cDNA を受精卵に遺伝子導入し、SMART cDNA を全身で発現するトランスジェニックマウスを樹立した。

### 4. 研究成果

(1) MLKL の遺伝子断片、およびその断片の一部を SAGG 配列に置換した遺伝子断片を Ypet と CFP との間に挿入した FRET ベクターを構築して、L929 細胞に遺伝子導入して、FRET 解析を行い、最終的に SMART (a Sensor for MLKL activation by RIPK3 based on FRET) と命名したプ

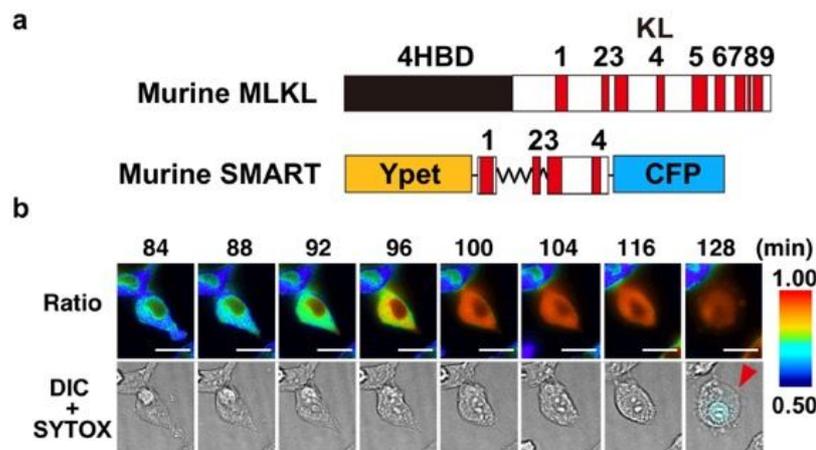


図1. SMARTの構造(a)とTNF+zVAD刺激により誘導されるFRET/CFP比(ratio)の経時的変化。DIC, 微分干渉像; SYTOX, 細胞膜障害の指標

ロープの開発に成功した。SMART は MLKL の kinase-like domain のアルファヘリックス 1~4 からなっており、一部を SAGG リンカー配列に置換したベクターである (図 1a)。SMART を導入した細胞では、ネクロプトーシス刺激に伴い FRET/CFP 比の上昇が見られたが、アポトーシスやネクローシス刺激ではその上昇は認められなかつ

た。この現象は L929 細胞だけではなく、マウス線維芽細胞や大腸上皮細胞でも認められた(図 1b)

さらに SMART がどのようなメカニズムで活性化されるかを検討したところ、内在性の *Ripk3* や *Mkl1* の遺伝子をノックダウンした細胞では、FRET/CFP 比の上昇が見られなくなった。SMART 自身のリン酸化は必要ないものの、RIPK1 や RIPK3 のキナーゼ阻害剤でも FRET/CFP 比の上昇が見られなくなったことから、内在性の RIPK1 や RIPK3 のリン酸化が FRET/CFP 比の上昇には必須であることが判明した。以上を総合すると SMART はネクロプトーシスに伴う RIPK3 と MLKL との相互作用により生じる構造変化の結果、SMART 自身の構造変化が生じて FRET/CFP 比が上昇している可能性が考えられた。

(2) LCI-S と SMART を用いたネクロプトーシスに伴う DAMPs 放出のメカニズムの解析からは、まず SMART の活性化が見られ、次に HMGB1 は最初に核から細胞質に放出され、その後に細胞質から細胞外への放出されるという 2 段階のステップがあることが判明した。一方で、予想外なことに Histone H3 はネクロプトーシス刺激によってもアポトーシス刺激によっても核内から細胞質内や細胞外への放出は認めなかった。興味深いことに HMGB1 の細胞外への放出には比較的ゆっくりとして 100 分以上にもわたり持続する sustained-mode リリースと、10 分以内に急速に終了する burst-mode リリースの 2 種類の細胞が存在することが判明した(図 2a)。さらに 2 つのモードを明らかにするために細胞膜修復に

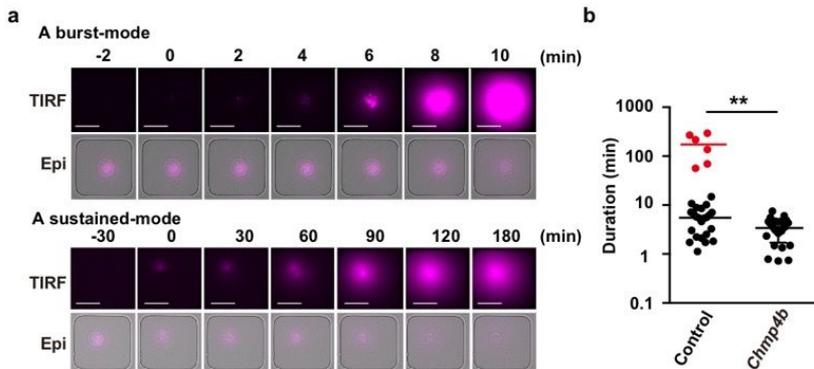


図2. DAMPs放出の2種類のモード。TNF+zVAD刺激により誘導されるHMGB1-mCherryの細胞外放出の全反射顕微鏡(TIRF)および落射型蛍光顕微鏡(Epi)での観察(a)。 (b) *Chmp4b*のsiRNA処理により全ての細胞のDAMPs放出時間が10分以内に短縮される。

急速に終了する burst-mode リリースの 2 種類の細胞が存在することが判明した(図 2a)。さらに 2 つのモードを明らかにするために細胞膜修復に

関与する ESCRT-III タンパク質の構成成分である *Chmp4b* という遺伝子をノック

ダウンしたところ、sustained-mode を示す細胞は全て burst-mode に変換されたことから、CHMP4B が 2 つの mode を決定する重要な分子であることが明らかとなった(図 2b)。

(3) 5 系統の Tg マウスが樹立でき、いずれの系統でも SMART cDNA 由来の蛍光タンパク質の発現を Western blot 法にて確認した(図 3)。まず SMART Tg マウスから採取してきた腹腔マクロファージや、ケラチノサイトにネクロプトーシスを誘導し、FRET/CFP 比の上昇が見られるかを検討したが、これらの細胞では YFP や CFP の蛍光が弱かったために、十分な解析をすることができなかった。そこで次に in vivo でネクロプトーシスを誘導する方法を検討した。既報の論文にあるように 10 ug という大量の TNF を投与することにより誘導される敗血症モデルマウスで、回腸末端から小腸にかけて著明な浮腫が誘導され、組織学的解析から腸上皮細胞にネクロプトーシスの指標となるリン酸化 RIPK3 のシグナルが検出された。さらに TNF 投与による腸上皮障害は *Mkl1* 遺伝子欠損マウスで軽減されることから、確かにネクロプトーシスが関与していることを確認した。そこでこのモデルを用いて 2 光子顕微鏡で in vivo でネクロプトーシスのイメージングを行った。TNF 投与により FRET/CFP 比の上昇が認められる傾向にあったものの、CFP の蛍光強度が YFP 比較して弱かったことからデータの信頼性に問題が残り、現在 ROSA26 遺伝子座への以外の手法での SMART Tg マウスの作成を行っている。

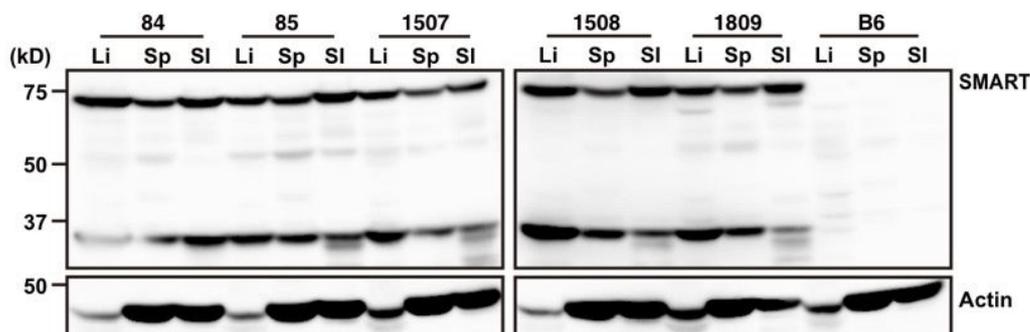


図3. SMART Tgマウスの5系統におけるSMARTの臓器での発現。各系統の臓器からの抽出液を抗GFP抗体によりWestern blotを行った。Li, 肝臓; Sp, 脾臓; SI, 小腸。数字(84, 85, 1507 etc)はそれぞれの系統番号。B6はSMARTを発現していない野生型マウス。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 16 件)

#### (1) ネクロプトーシス関連論文

1. Shindo R, Ohmuraya M, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Deguchi Y, Yamazaki S, Nishina T, Yoshimoto T, Kakuta S, Koike M, Uchiyama Y, Konishi H, Kiyama H, Mikami T, Moriwaki K, Araki K, \*Nakano H. Necroptosis of Intestinal Epithelial Cells Induces Type 3 Innate Lymphoid Cell-Dependent Lethal Ileitis. *iScience* 2019;15:536-551. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.011. 査読あり
2. \*Nakano H, Murai S, Yamaguchi Y, Shirasaki Y, Nakabayashi O, Yamazaki S. Development of novel methods that monitor necroptosis and the release of DAMPs at the single cell resolution. *Cell Stress* 2019;3:66-69. doi: 10.15698/cst2019.02.177 査読あり
3. 三宅早苗, 進藤綾大, 中野裕康. ネクロプトーシス、フェロトーシス、パイロトーシスの分子機構と生体内における機能. *Clinical Calcium* 2019;29:248-253. doi: 10.20837/4201902248 査読なし
4. 村井 晋, 白崎 義隆, 中野 裕康. FRET 解析と LCI-S によるネクロプトーシスのライブセルイメージング. *実験医学* 2019;37:1315-1321. 査読なし
5. Murai S, Yamaguchi Y, Shirasaki Y, Yamagishi M, Shindo R, Hildebrand JM, Miura R, Nakabayashi O, Totsuka M, Tomida T, Adachi-Akahane S, Uemura S, Silke J, Yagita H, Miura M, \*Nakano H. A FRET biosensor for necroptosis uncovers two different modes of the release of DAMPs. *Nat Commun* 2018;9:4457. doi: 10.1038/s41467-018-06985-6 査読あり
6. \*Nakano H, Piao X, Shindo R, Komazawa-Sakon S. Cellular FLICE-Inhibitory Protein Regulates Tissue Homeostasis. *Curr Top Microbiol Immunol* 2017;403:119-141. doi: 10.1007/82\_2015\_448 査読なし

#### (2) DAMPs 関連論文

7. Ishifune C, Tsukumo S, Maekawa Y, Hozumi K, Chung D, Motozono C, Yamasaki S, Nakano H, Yasutomo K. Regulation of membrane phospholipid asymmetry by Notch-mediated flippase expression controls the number of intraepithelial TCR $\alpha\beta$ +CD8 $\alpha\alpha$ + T cells. *PLoS Biol* 2019;17(5):e3000262. doi: 10.1371/journal.pbio.3000262. 査読あり
8. Piao X, Miura R, Miyake S, Komazawa-Sakon S, Koike M, Shindo R, Takeda J, Hasegawa A, Abe R, Nishiyama C, Mikami T, Yagita H, Uchiyama Y, \*Nakano H. Blockade of TNF receptor superfamily 1 (TNFR1)-dependent and TNFR1-independent cell death is crucial for normal epidermal differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 2019;143:213-228 e210. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.043 査読あり
9. Kurosawa T, Miyoshi S, Yamazaki S, Nishina T, Mikami T, Oikawa A, Homma S, \*Nakano H. A murine model of acute lung injury identifies growth factors to promote tissue repair and their biomarkers. *Genes Cells* 2019;24:112-125. doi: 10.1111/gtc.12659 査読あり
10. 三浦亮介, 朴 雪花, 中野裕康. 細胞死の亢進の結果ひき起こされる表皮バリア破綻のメカニズム. *臨床免疫・アレルギー科* 2019;71:192-198. 査読なし
11. 進藤綾大, 中野裕康. 細胞死制御のキー蛋白質. *週刊医学のあゆみ* 2018;267:1136-1142. 査読なし
12. Piao X, Yamazaki S, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Nakabayashi O, Kurosawa T, Mikami T, Tanaka M, Van Rooijen N, Ohmuraya M, Oikawa A, Kojima Y, Kakuta S, Uchiyama Y, Tanaka M, \*Nakano H. Depletion of myeloid cells exacerbates hepatitis and induces an aberrant increase in histone H3 in mouse serum. *Hepatology* 2017;65:237-252. doi: 10.1002/hep.28878 査読あり

#### (3) その他の論文

13. Deguchi Y, Nishina T, Asano K, Ohmuraya M, Nakagawa Y, Nakagata N, Sakuma T, Yamamoto T, Araki K, Mikami T, Tanaka M, \*Nakano H. Generation of and characterization of anti-IL-11 antibodies using newly established *Il11*-deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;505:453-459. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.128 査読あり
14. Yamazaki S, Tanaka Y, Araki H, Kohda A, Sanematsu F, Arasaki T, Duan X, Miura F, Katagiri T, Shindo R, Nakano H, Ito T, Fukui Y, Endo S, Sumimoto H. The AP-1 transcription factor JunB is required for Th17 cell differentiation. *Sci Rep* 2017;7:17402. doi: 10.1038/s41598-017-17597-3 査読あり
15. Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue JI. HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog* 2017;13:e1006162. doi: 10.1371/journal.ppat.1006162 査読あり

16. Nishina T, Deguchi Y, Miura R, Yamazaki S, Shinkai Y, Kojima Y, Okumura K, Kumagai Y, \*Nakano H. Critical contribution of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) to electrophile-induced Interleukin-11 production. *J Biol Chem* 2017;292:205-216. doi: 10.1074/jbc.M116.744755 査読あり

〔学会発表〕(計 32 件)

1. Murai S, Nakano H. A Novel FRET Biosensor for Necroptosis Uncovers Two Different Modes of the Release of DAMPs. Gordon Research Conference; Newry, USA; 2018/08/08.
2. Miura R, Piao X, Miyake S, Komazawa-Sakon S, Nishiyama C, Nakano H. Blockade of TNFR1-dependent and -independent cell death is crucial for normal epidermal differentiation. Gordon Research Conference; Newry, USA; 2018/08/06.
3. Shindo R, Ohmuraya M, Komazawa-Sakon S, Miyake S, Yamazaki S, Nishina T, Pasparakis M, Araki K, Nakano H. RIPK3-dependent necroptosis of intestinal epithelial cells results in ROR $\gamma$ t+ innate lymphoid cell-dependent lethal ileitis. 2<sup>nd</sup> Australia-Japan Meeting on Cell Death; Japan, Tokyo; 2018/05/22.
4. Nishina T, Deguchi Y, Takeda W, Mikami T, Nakano H. Analysis of Interleukin-11-producing cells in a colitis-associated cancer model using IL-11 reporter mice. 2<sup>nd</sup> Australia-Japan Meeting on Cell Death; Tokyo, Japan; 2018/05/22.
5. Nakano H. Development of a novel FRET biosensor, SMART that monitors necroptosis. 2<sup>nd</sup> Australia-Japan Meeting on Cell Death; Tokyo, Japan; 2018/05/22.
6. 中野 裕康. ネクロプトーシスによる生体応答制御. 第 40 回日本分子生物学会年会 第 90 回日本生化学会大会; 神戸; 2017/12/08.
7. 中野 裕康. インターロイキン 11 の産生制御と産生細胞の同定. 第 14 回レドックス・ライフイノベーションシンポジウム; 仙台市; 2017/10/26.
8. Nakano H. ROR $\gamma$ t+ group 3 innate lymphoid cells mediate RIPK3-dependent lethal ileitis. 16th TNF super family meeting; Singapore; 2017/04/18.
9. Shindo R, Yamazaki S, Ohmuraya M, Araki K, Nakano H. Short form FLICE-inhibitory protein promotes TNF $\alpha$ -induced necroptosis in fibroblasts derived from *CFLARs* transgenic mice. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology; Keystone, Colorado, USA; 2017/02/07.
10. Nishina T, Deguchi Y, Nakamura E, Kojima Y, Tada N, Nakano H. Analysis of Interleukin-11-producing cells in a colitis-associated cancer model using IL-11 reporter mice. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology; Keystone, Colorado, USA; 2017/02/07.

その他国内学会 22 件。

〔図書〕(計 1 件)

1. Nagata S, Nakano H, Eds. Apoptotic and Non-apoptotic cell death. Switzerland: Springer, 2017: 1-183.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) の検出方法

発明者: 土屋勇一、中野裕康、永井英成、五十嵐良典

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-245036

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

〔その他〕

(1) 研究室ホームページ, <http://tohobiochemi.jp/>

(2) プレスリリース

・東邦大学医学部研究グループが制御された細胞死「ネクロプトーシス」の可視化を世界で初めて実現, <https://research-er.jp/articles/view/74848>

・表皮細胞の環境変化が重篤な皮膚炎を引き起こすことを発見, <https://research-er.jp/articles/view/69260>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：村井 晋

ローマ字氏名：(MURAI, Shin)

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 ( 8 桁 ): 90287540

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：進藤 綾大

ローマ字氏名：(SHINDO, Ryodai)

研究協力者氏名：中林 修

ローマ字氏名：(NAKABAYASHI, Osamu)

研究協力者氏名：山崎 創

ローマ字氏名：(YAMAZAKI, Soh)