

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月18日現在

機関番号：16101
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590286
 研究課題名（和文） 新規アポトーシス制御分子ヌクリングの炎症性及び腫瘍性疾患発症への作用機序の解明
 研究課題名（英文） Studies on signaling pathways mediated by Nucling, a novel apoptosis-associated protein, in the development of inflammatory disorders and tumors.
 研究代表者
 坂井 隆志（SAKAI TAKASHI）
 徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授
 研究者番号：80284321

研究成果の概要（和文）：ヌクリングノックアウトマウスやヌクリングノックダウンの系を用い、ヌクリングの遺伝子欠失は NF- κ B 活性化異常に伴うアポトーシス経路の異常を誘導し、その結果として細胞障害性ストレスに対して抵抗性を獲得していることを明らかにした。これが肝炎・肝癌発症率の上昇をもたらしている一因であることが強く示唆された。以上の成果は肝炎・肝癌発症機構の解明及び新規治療戦略への発展に結びつくことが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We revealed that Nucling is important for the strict regulation of NF- κ B signal in resting state. Aberrant activation of NF- κ B in Nucling-deficient tissues or cells showed defect of apoptosis pathways resulted in the resistance against cytotoxic stress. It is possibly one of the factors for the high prevalence ratios of hepatitis and hepatic cancer. These results will lead to the elucidation of the regulatory mechanism of the pathogenesis of the diseases or to the development of novel therapeutic strategies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：ヌクリング、NF- κ B、アポトーシス、炎症性疾患、発ガン

1. 研究開始当初の背景

マウスヌクリング遺伝子は全長1411アミノ酸をコードし、またその配列中にはアンキリンリピート、ロイシンジッパーモチーフ及び二つのt-SNARE コイルドコイルドメイ

ンといったタンパク質間相互作用に重要と思われる複数のモチーフが同時に存在する構造を有する。それまでの研究成果より、我々は本遺伝子のコードする蛋白分子が細胞障害性ストレス時に誘導される複数の細

胞死（アポトーシス）誘導情報伝達経路を制御していることを示す知見を得ていた。ヌクリングは種々の細胞外ストレスにより細胞内に発現が誘導され、アポトーシス誘導分子Apaf-1と分子間相互作用して、そのアポトーシス誘導時の核移行及び細胞内発現を制御することにより、Apaf-1/カスパーゼ9 経路（アポトゾーム経路）の活性化に関与している。さらに、Nuclear factor- κ B (NF- κ B)とも相互作用し、その核移行を制御することにより、NF- κ Bの標的である種々のアポトーシス関連遺伝子（ガレクチン3等）の転写活性を制御している。また、抗アポトーシス分子ガレクチン3との相互作用により、アポトーシス抑制経路の制御にも関与が強く示唆されていた。細胞障害性ストレスによるアポトーシス細胞死が主たる病態として考えられている一例として、パーキンソン病が挙げられる。パーキンソン病は脳黒質ドーパミン産生細胞の脱落を中心とした神経変性疾患であり、その機序の全容は未だ解明されていない。パーキンソン病モデル動物として1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)投与動物がしばしば用いられる。MPTPの生体内代謝産物1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)は黒質神経細胞に選択的に作用し、パーキンソン病の病態と同様のミトコンドリア電子伝達系の破綻を引き起こす事により、細胞を死に至らしめる。このMPTPによる黒質神経特異的細胞死にApaf-1/カスパーゼ9 経路が関与していることを示唆する結果はそれまで幾つか報告されていた。我々はヌクリングノックアウトマウスにMPTPを投与することにより、実際にこのパーキンソン病モデルマウスではApaf-1/カスパーゼ9 経路が発症に重要であり、その神経細胞死にヌクリングが重要な役割を担っていることを明らかとてきた。ヌクリングの関与が示唆されるNF- κ B経路は、近年発ガン機構への関与が注目されてきている。特に肝炎に伴う肝ガンの発症機構においては、肝実質細胞及びクッパー細胞におけるNF- κ Bの活性化及びそれに伴うアポトーシス抑制が極めて重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。ヌクリングノックアウトマウスでは初代培養胚細胞においてNF- κ Bの持続的活性化が観察されていたが、生体肝組織においても多くのヌクリングノックアウトマウス個体においてNF- κ Bの持続的活性化を最近確認している。また、同ノックアウトマウスでは肝炎・肝ガンの自然発症率が生後一年を経過した集

団で著増することが観察されている。また、同ノックアウトマウスでは肝クッパー細胞数が激減していることが最近確認された。このクッパー細胞の減少はアポトーシスによることを複数のアポトーシスマーカーで確認している。肝ガン発症症例におけるクッパー細胞の減少は今のところ報告が確認されておらず、肝ガン発症におけるクッパー細胞の新たな関与機構の発見へ繋がることが期待される。現在我々はこのクッパー細胞死の制御機構の解明を目指して研究を進めている段階である。

2. 研究の目的

本研究は、我々が単離同定した新規細胞死（アポトーシス）制御分子「ヌクリング (Nucling)」の、ヒト生体内における生理機能と病態における意義の解明を最終目標としている。本研究では、ノックアウトマウスを主たる研究材料に用い、「炎症性及び腫瘍性疾患に関連した、病態の発症機構への関与の解明」を中心テーマに据えた研究を推進する。

3. 研究の方法

(1) ヌクリングノックアウトマウスにおけるNF- κ B活性化異常の発症機序を解明するために、ヌクリングのNF- κ B経路における作用機序を詳細に検討した。

① ヌクリングは細胞障害性ストレス応答蛋白として、特にTNF α 刺激による発現誘導が強い。TNF α はNF- κ B経路の活性化因子でもある。ヌクリングの発現にTNF α -NF- κ B経路が関与しているかどうかを検討した。具体的にはNF- κ B活性化が認められないp50遺伝子欠失マウス由来の細胞（徳大ヘルスバイオサイエンス研究部林良夫教授より供与予定）を用いて、TNF α 刺激によるヌクリングの発現をRT-PCR, Northern blot, Western blot等で検討した。

② リポポリサッカライド(LPS)は生体内に進入するとTo11様受容体(TLR4)を介してNF- κ Bを活性化し種々の生理活性物質産生を誘導することにより生体内に多大な影響を及ぼすことが知られていることから、この系をヌクリングKOマウスに導入し、その反応性を詳細に検討した。

4. 研究成果

ヌクリングノックアウト(KO)マウスでは肝炎・肝癌の自然発症率上昇が観察された。また、その背景に NF- κ B シグナルの活性化異常が疑われた。そこで、我々は実際に NF- κ B の異常活性化をヌクリング KO マウス由来の細胞や組織で確認し、更にこの異常に関連して、同 KO マウスでは肝炎・肝癌発症率の上昇をはじめとする種々の炎症性疾患を呈することを明らかとした(図1)。

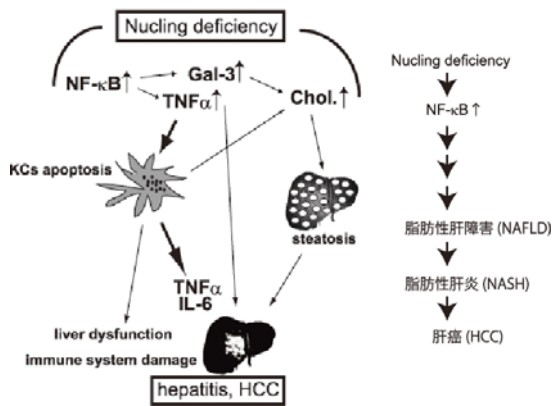


図1 ヌクリング KO マウスにおける肝炎、肝癌発症機序モデル

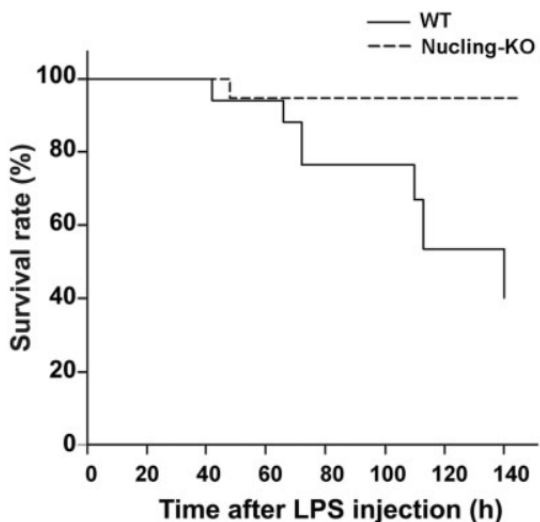


図2 ヌクリング KO マウスは LPS 毒性に対する抵抗性を獲得した

そこでこのような NF- κ B の異常が本当に生理的異常を引き起こしうるのかどうかを検討することにした。リポポリサッカライド(LPS)は生体内に進入すると Toll 様受容体(TLR4)を介して NF- κ B を活性化し種々の生理活性物質産生を誘導することにより生体内に多大な影響を及ぼすことが知られていることから、この系をヌクリング KO マウスに導入することにした。野生型マウスで100%死に至らしめるに十分な量を同 KO マウスに腹腔投与したところ、致死率数%とい

う高い耐性を示した(図2)。LPSによって誘導されるサイトカインの標的臓器である肝臓に於いて、アポトーシス細胞死の有意な低下が野生型に比較して認められた。また分子レベルで検討したところ、同 KO マウスでは NF- κ B によって制御されている抗アポトーシス分子(cIAP1/2)の増加や、アポトーシス誘導分子 Apaf1 の減少などが確認された(図3)。

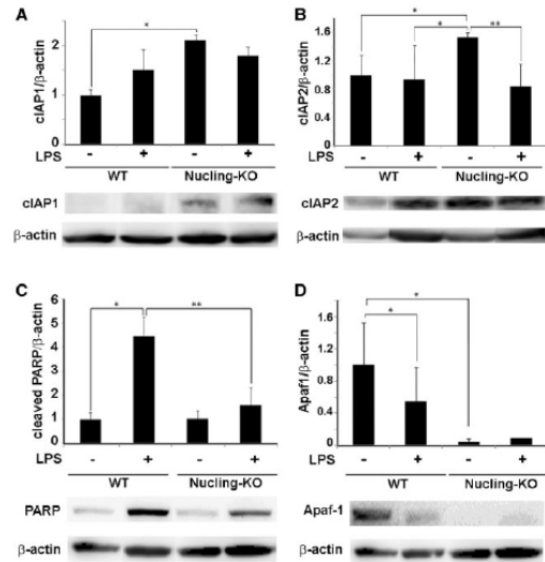


図3 ヌクリング KO マウスでは LPS により誘導されるはずのアポトーシス経路が障害されている

以上より、ヌクリングの遺伝子欠失は NF- κ B 活性化異常に伴うアポトーシス経路の異常を誘導し、その結果として細胞障害性ストレスに対して抵抗性を獲得していることが明らかとなった。これが肝炎・肝癌発症率の上昇をもたらしている一因であることが強く示唆された。以上の成果は肝炎・肝癌発症機構の解明及び新規治療戦略への発展に結びつくことが期待されるため、これをまとめ、報告した。

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4件)

- ① Sun Mi Kim, Sakai, T., Huy Van Dang, Nam Hoang Tran, Ono, K., Ishimura, K. and Fukui, K., Nucling, a novel protein associated with NF- κ B, regulates endotoxin-induced apoptosis *in vivo*, J. Biochem., 査読有り, Vol. 153, No. 1, 2013, pp. 93-101
DOI: 10.1093/jb/mvs119)

- ② Kiso, K., Ueno, S., Fukuda, M., Ichi, I., Kobayashi, K., Sakai, T., Fukui, K., Kojo, S, The role of kupffer cells in carbon tetrachloride intoxication in mice, Biol. Pharm. Bull.、査読有り、Vol. 35, No. 6, 2012, pp. 980-983
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22687543).
- ③ Sakai, T., Liu, L., Teng, X. C., Ishimaru, N., Mukai-Sakai, R., Tran, N. H., Kim, S. M., Sano, N., Hayashi, Y., Kaji, R. and Fukui, K.、Inflammatory disease and cancer with a decrease in Kupffer cell numbers in Nucling-knockout mice, Int. J. Cancer、査読有、Vol. 126, 2010, pp. 1079-1094 DOI; 10.1002/ijc.24789
- ④ Tran N H, Sakai, T., Kim, S. M. and Fukui, K.、NF-kappaB regulates the expression of Nucling, a novel apoptosis regulator, with involvement of proteasome and caspase for its degradation, J Biochem.、査読有り、Vol. 148, No. 5, 2010, pp. 573-580 DOI; 10.1093/jb/mvq089

[学会発表] (計9件)

- ① 坂井隆志、新規NF-κB制御分子ヌクリングは非アルコール性脂肪肝及び糖尿病発症抑制に重要で或る、第16回日本心血管内分泌代謝学会学術総会、2012.11.23、(東京都港区)
- ② 佐古有季哉、ホモシステイン代謝系における新規NF-κB制御因子ヌクリングの関与、日本ビタミン学会第64回大会、2012.6.23、(岐阜市)
- ③ 金善美、新規NF-κB制御分子ヌクリングの炎症性病態への関与についての検討、第53回日本生化学会 中国・四国支部例会、2012.5.18、(岡山市)
- ④ 坂井隆志、新規アポトーシス/ NF-κB制御分子ヌクリングの機能解析: 第86

回日本生化学会大会、2011.9.13、(京都市)

- ⑤ 金善美、新規NF-κB制御分子ヌクリングの免疫系における役割の検討: 第52回日本生化学会 中国・四国支部例会、2011.5.13、(広島市)
- ⑥ Sakai T., Intracellular metabolism of Nucling, a novel apoptosis regulator、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010.12.8、(神戸市)
- ⑦ 金善美、Physiological function of a novel NF-κB-regulating molecule, Nucling, in immune system、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会、2010.12.8、(神戸市)
- ⑧ Sakai, T.、Nucling, a novel apoptosis-associating protein, regulates NF-κB pathway、OzBio2010 (the 12th IUBMB, 21st FAOBMB & ComBio2010 Conferences) 2010.9.27 (Melbourne, Australia)
- ⑨ Kim S. M.、Physiological function of a novel NF-κB-regulating molecule, Nucling, in immune system、OzBio2010 (the 12th IUBMB, 21st FAOBMB & ComBio2010 Conferences)、2010.9.27 (Melbourne, Australia)

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称: 新規アポトーシス誘導タンパク質及びそれをコードする遺伝子

発明者: 福井 清、坂井 隆志

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特許第 3985131 号

取得年月日: 平成 19 年 7 月

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 隆志 (SAKAIK TAKASHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・准教授

研究者番号: 80284321

(2) 研究分担者

福井 清 (FUKUI KIYOSHI)

徳島大学・疾患酵素学研究センター・教授

研究者番号：00175564

(3) 連携研究者
()

研究者番号：