

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月25日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659155

研究課題名（和文） 細胞寿命を決定する因子群の探索

研究課題名（英文） Molecular basis for regulation of the cellular life span

研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)

神戸大学・医学研究科・教授

研究者番号：80252782

研究成果の概要（和文）：

個々の組織を形成する細胞は、それぞれ固有の寿命をもつことが知られている。しかしながら、細胞ごとの異なる寿命決定のメカニズムについてはこれまでほとんど明らかにされていない。また、個々の細胞のターンオーバーは、何らかの生物学的必然性に基づき定まっているはずであるが、その理由もほとんど明らかではない。そこで、本研究においては腸上皮細胞をモデルとして、網羅的な解析も含めた新たな研究方法を構築し、これまで全く明らかにされていない細胞寿命の決定メカニズムの解明に挑戦した。

研究成果の概要（英文）：

Cells constituting organs in the mammals have cell-type-specific life span after their terminal differentiation. The differences in cellular life span are though to be dependent on cell characteristics and functions. However, the molecular basis underlying the regulation of the life span of terminally differentiated cells is not fully elucidated. Moreover, the biological significance of cell-type-specific life span still remains unclear. To clarify the mechanism of the regulation of cellular life span, we performed approaches using mouse intestinal epithelial cells as a model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：遺伝子、シグナル伝達、生体分子、マイクロアレイ、老化

1. 研究開始当初の背景

個々の組織を形成する細胞は、最終分化を遂げた後、それぞれ固有の寿命をもつことはよく知られている。ここでいう細胞寿命とは最終分化をとげ成熟した細胞が死滅するまでの期間をさす。ヒトやマウスにおいて、腸上皮細胞で約3日、皮膚ケラチノサイトで約1

ヶ月、赤血球で約3ヶ月、骨細胞で約10年、脳神経細胞で数10年の寿命があると言われているが、どのようにして最終分化後の細胞の寿命が決定されているかについては明らかとなっていない。例えば神経細胞が長期にわたり生存しなければならない必然性は、記憶の保持という脳の最重要機能から容易に想像

はできるが、この長期にわたる生存を可能にしている分子基盤についてはほとんど明らかにされていない。一方、寿命が最も短い細胞の代表である腸管の腸上皮細胞は、細胞死までの約3日の寿命が、どのようにして制御されているか、その分子機構についてもほとんど何も分かっていないのが現状である。さらに言えば、腸上皮細胞の寿命が何故このように短くあるべきかの生物学的意義も十分明らかにされていない。しかし細胞寿命の制御が重要であることを支持する結果として、腸上皮細胞の細胞死が抑制された遺伝子改変マウスでは腸炎を発症するとの報告がある (Gunther, Nature, 2011)。また皮膚の乾癬と呼ばれる疾患では、細胞の入れ替わり速度に異常が誘導されることで角質化が過剰になることが知られている (Nickoloff, Clin Dermatol, 2007)。このように個体の恒常性維持の観点から、個々の細胞の寿命制御は重要であると考えられているが、研究開始当初は国内、国外の双方において、本研究課題が対象とする研究分野は、未だ萌芽期にあると言った過言ではなかった。

2. 研究の目的

上述の様に個々の組織を形成する細胞は、それぞれ固有の寿命をもつことが知られている。しかし、この分化成熟後の多様な細胞の寿命決定のメカニズムについて、これまでほとんど明らかにされていなかった。また、この「分化成熟後細胞の寿命」は、その細胞が属する組織・臓器の恒常性の維持や機能を発揮する上で、何らかの生物学的な必然性に基つき定まっているはずであるが、その理由も多くは解明されていなかった。この課題に対峙する研究が立ち後れている理由は、まずこれを解析する技術的な困難さが挙げられる。そこで本研究では、分化後の寿命が最も短い細胞である腸上皮細胞を解析のモデルとして用い、網羅的な解析も含めた新たな研究方法を構築し、これまで全く明らかにされていない細胞寿命の決定メカニズムの解明に挑戦した。

3. 研究の方法

(1) 腸上皮細胞の寿命測定方法の確立

腸上皮細胞は、腸絨毛下端のクリプトに存

在する幹細胞より分化し、腸絨毛を上行し絨毛の頭頂部分に到達したのち、細胞死により腸絨毛より遊離し消滅すると考えられている。そこで野生型マウス腹腔に BrdU をインジェクションすることで分裂細胞をラベルし、ラベルされた腸上皮細胞について経時的な観察を行うことで腸上皮細胞の寿命を観察する実験系の構築を試みた。

(2) 絨毛上部の腸上皮細胞に特異的に発現する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 の解析

これまでに研究代表者は、腸上皮細胞に高度に発現する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 を同定している (Sadakata et al., Genes Cells, 2009)。この SAP-1 は、培養細胞に強制発現した際に細胞のアポトーシスを誘導し細胞増殖を抑制的に制御することを既に明らかにしている。さらに、SAP-1 が、ある種のイムノグロブリンスーパーファミリー分子を脱チロシンリン酸化基質とすることも明らかにしている (未発表データ)。非常に興味深いことに、SAP-1 は腸絨毛下部やクリプトの腸上皮細胞には発現が無いが極めて乏しいが、腸上皮細胞が絨毛の頭頂部分に移動するにつれて強く発現することを見出している。以上の知見から、SAP-1 とその基質分子が腸上皮細胞の寿命決定に重要な役割を果たす候補分子であると想定し、これらの分子の KO マウス、TG マウスの作製とその解析を行った。

(3) レーザーマイクロダイセクションを利用した腸上皮細胞の寿命決定因子の網羅的解析

腸絨毛の下端から上端に存在する細胞を部位ごとに分別採取し、異なる領域より得られた細胞に発現する分子を比較検討すれば、腸上皮細胞の寿命決定に関わる因子を抽出できる可能性が高い。そこで、マウス腸の凍結切片を作製し、1つの腸管絨毛を crypt-villus axis に沿ってクリプト部、下端、中部、上部に大別し、各領域より腸上皮細胞のみを、レーザーマイクロダイセクションを用い選択的に分別採取した。

4. 研究成果

(1) 腸上皮細胞の寿命測定方法の確立

野生型マウス腹腔に BrdU をインジェクションすることで分裂細胞をラベルし、ラベルされた腸上皮細胞について経時的な観察を行うことで腸上皮細胞の寿命を観察する実験系の構築を試みたところ、インジェクション2時間後にクリプトの細胞がラベルされ、インジェクション24時間後には BrdU 陽性腸上皮細胞が腸絨毛を上行していることが確認できた。回腸においてはインジェクション48時間後に絨毛の頭頂部分に BrdU 陽性腸上皮細胞が到達し、インジェクション72時間後には BrdU 陽性腸上皮細胞が消滅することが確認できた。以上のように腹腔に BrdU をインジェクションすることで腸上皮細胞の分裂や移動、消滅を経時的に観察出来る実験系を確立し、この方法を以下の実験に供した。

(2) 絨毛上部の腸上皮細胞に特異的に発現する受容体型チロシンホスファターゼ SAP-1 の解析

上記(1)の実験手法によって、SAP-1 ノックアウトマウスの腸上皮細胞について観察を行ったところ、SAP-1 ノックアウトマウスでは腸上皮細胞の移動が早く、寿命が短いことを見出した。

そこで、SAP-1 の基質分子のトランスジジェニックマウスやノックアウトマウスを作製し、現在はこれらのトランスジジェニックマウスやノックアウトマウスについても腸上皮細胞の寿命について観察を行っている。

(3) レーザーマイクロダイセクションを利用した腸上皮細胞の寿命決定因子の網羅的解析

マウス腸の凍結切片を作製し、1つの腸管絨毛を crypt-villus axis に沿ってクリプト部、下端、中部、上部に大別し、各領域より腸上皮細胞のみを、レーザーマイクロダイセクションを用い選択的に分別採取することを試みた。現在、各領域の腸上皮細胞より cDNA を合成し、マイクロアレイ解析により各領域に発現する分子の増減を比較検討する計画を進めている。さらに、同じサンプルを用い2次元電気泳動と質量分析を組み合わせたプロテオミクス解析を行い、各領域に発現する分子の増減を比較検討する計画も進めている。

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13件)

- (1) Daniwijaya EW, Murata Y, Kotani T, Kitamura Y, Mantilidewi KI, Kusakari S, Ohnishi H, Okazawa H, Matozaki T. Tyrosine phosphorylation of Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 20 and its functional roles. Kobe Journal of Medical Sciences. (査読あり) in press. 掲載確定
- (2) Yamauchi T, Takenaka K, Urata S, Shima T, Kikushige Y, Tokuyama T, Iwamoto C, Nishihara M, Iwasaki H, Miyamoto T, Honma N, Nakao M, Matozaki T, Akashi K. Polymorphic Sirpa is the genetic determinant for NOD-based mouse lines to achieve efficient human cell engraftment. Blood. (査読あり) 121, 1316-1325, 2013
doi: 10.1182/blood-2012-06-440354.
- (3) Hayashi Y, Kusakari S, Sato-Hashimoto M, Urano E, Shigeno M, Sekijima T, Kotani T, Murata Y, Murakami H, Matozaki T, Ohnishi H. Hypothermia-dependent and -independent effects of forced swim on the phosphorylation states of signaling molecules in mouse hippocampus. Biochemical and Biophysical Research Communications. (査読あり) 428, 475-481, 2012
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.083.
- (4) Marschinke F, Hashemian S, Matozaki T, Oldenburg PA, Stromberg I. The Absence of CD47 promotes nerve fiber growth from cultured ventral mesencephalic dopamine neurons. PloS One. (査読あり) e45218, 2012
doi: 10.1371/journal.pone.0045218.
- (5) van Beek EM, Zarate JA, van Bruggen R, Schornagel K, Tool AT, Matozaki T, Kraal G, Roos D, van den Berg TK. SIRPalpha controls the activity of the phagocyte NADPH oxidase by restricting the expression of

- gp91(phox). Cell Reports. (査読あり)
2, 748-755, 2012
doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.027.
- (6) Alenghat FJ, Baca QJ, Rubin NT, Pao LI, Matozaki T, Lowell CA, Golan DE, Neel BG, Swanson KD.
Macrophages require Skap2 and Sirpalpha for integrin-stimulated cytoskeletal rearrangement. Journal of Cell Science. (査読あり) 125, 5535-5545, 2012
doi: 10.1242/jcs.111260.
- (7) Wang L, Lu Y, Deng S, Zhang Y, Yang L, Guan Y, Matozaki T, Ohnishi H, Jiang H, Li H.
SHPS-1 deficiency induces robust neuroprotection against experimental stroke by attenuating oxidative stress. Journal of Neurochemistry. (査読あり) 122, 834-843, 2012
doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07818.x.
- (8) Kaneko T, Saito Y, Kotani T, Okazawa H, Iwamura H, Sato-Hashimoto M, Kanazawa Y, Takahashi S, Hiromura K, Kusakari S, Kaneko Y, Murata Y, Ohnishi H, Nojima Y, Takagishi K, Matozaki T.
Dendritic cell-specific ablation of the protein tyrosine phosphatase Shp1 promotes Th1 cell differentiation and induces autoimmunity. Journal of Immunology. (査読あり) 188, 5397-5407, 2012
doi: 10.4049/jimmunol.1103210.
- (9) Maruyama T, Kusakari S, Sato-Hashimoto M, Hayashi Y, Kotani T, Murata Y, Okazawa H, Oldenborg PA, Kishi S, Matozaki T, Ohnishi H.
Hypothermia-induced tyrosine phosphorylation of SIRP α in the brain. Journal of Neurochemistry. (査読あり) 121, 891-902, 2012
doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07748.x.
- (10) Ohnishi H, Murata Y, Okazawa H, Matozaki T.
Src family kinases: modulators of neurotransmitter receptor function and behavior. Trends in Neurosciences. (査読あり) 34, 629-637, 2011
doi: 10.1016/j.tins.2011.09.005.
- (11) Zhao XW, van Beek EM, Schornagel K, Van der Maaden H, Van Houdt M, Otten MA, Finetti P, Van Egmond M, Matozaki T, Kraal G, Birnbaum D, van Elsas A, Kuijpers TW, Bertucci F, van den Berg TK.
CD47-signal regulatory protein- α (SIRP α) interactions form a barrier for antibody-mediated tumor cell destruction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (査読あり) 108, 18342-18347, 2011
doi: 10.1073/pnas.1106550108.
- (12) Verjan Garcia N, Umemoto E, Saito Y, Yamasaki M, Hata E, Matozaki T, Murakami M, Jung YJ, Woo SY, Seoh JY, Jang MH, Aozasa K, Miyasaka M.
SIRP α /CD172a regulates eosinophil homeostasis. Journal of Immunology. (査読あり) 187, 2268-2277, 2011
doi: 10.4049/jimmunol.1101008.
- (13) Sato-Hashimoto M, Saito Y, Ohnishi H, Iwamura H, Kanazawa Y, Kaneko T, Kusakari S, Kotani T, Mori M, Murata Y, Okazawa H, Ware CF, Oldenborg PA, Nojima Y, Matozaki T.
Signal regulatory protein α regulates the homeostasis of T lymphocytes in the spleen. Journal of Immunology. (査読あり) 187, 291-297, 2011
doi: 10.4049/jimmunol.1100528.
- [学会発表] (計 27 件)
- (1) Daniwijaya E. W.
Tyrosine phosphorylation of CEACAM20 and its functional roles
第 10 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス 2013.2.8. 国立がん研究センター (東京)
- (2) Murata Y.
Regulation of intestinal immunity by the protein tyrosine phosphatase SAP-1
第 10 回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス 2013.2.8. 国立がん研究センター (東京)

- (3) Matozaki T.
Protein tyrosine phosphatases and the CD47-SIRP α System that mediates cell-to-cell communication
The First Taiwan Phosphatase Conference 2012. 11. 10. National Cheng Kung University (台湾・台南)
- (4) Matozaki T.
The phosphotyrosine Signaling and its Deregulation in Inflammation and Cancers
2nd Bandung Biomolecular Medicine Conference 2012. 10. 5. Padjadjaran University (インドネシア・バンドン)
- (5) 的崎尚
チロシンホスファターゼの機能と病態
群馬大学・秋田大学連携グローバルCOEプログラム「生体調節シグナルの統合的研究」最終シンポジウム 2012. 2. 9. 群馬大学 (群馬)
- (6) 小谷武徳
腸微絨毛特異的な発現を示す受容体型チロシンホスファターゼSAP-1による腸管免疫制御
第5回プロテインホスファターゼ研究会学術集会 2012. 1. 19. 大阪大学 (大阪)
- (7) Matozaki T.
The R3 subtype of receptor-type protein tyrosine phosphatases: Expression, localization, and biological function
The First Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatases 2011. 12. 2. 基礎生物学研究所 (愛知)
- (8) Matozaki T.
A new phosphotyrosine signaling pathway related to autoimmune diseases and cancers
2nd International Joint Symposium Frontier In Biomedical Sciences:From Genes to Applications 2011. 11. 18. Faculty of Medicine, Universitas Gadjah Mada (インドネシア・ジョグジャカルタ)
- (9) 大西浩史
Regulation by protein tyrosine phosphorylation of depression-like behavior

Neuroscience 2011 2011. 9. 17. パシフィック横浜 (神奈川)

- (10) 岡澤秀樹
チロシンホスファターゼSAP-1の機能と病態
第10回生体機能研究会 2011. 7. 30. 清流の郷ブルーヴィラあなぶき (徳島)
- (11) 的崎尚
チロシンホスファターゼの機能と病態
日本生化学会東北支部第77回例会・シンポジウム 2011. 7. 23. 東北大学さくらホール (宮城)

[その他]
ホームページ等
<http://www.med.kobe-u.ac.jp/tougou/signa1/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

的崎 尚 (MATOZAKI TAKASHI)
神戸大学・医学研究科・教授
研究者番号：80252782

(2) 連携研究者

大西 浩史 (OHNISHI HIROSHI)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：70334125