

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：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390100

研究課題名(和文)細胞死に伴う炎症制御機構の基盤的研究

研究課題名(英文)Regulation of inflammation associated with cell death

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) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞、腸上皮細胞、表皮細胞特異的にcFLIPを欠損したマウスを樹立したところ、いずれのマウスも出生前後に細胞死が亢進した結果致死となった。以上よりcFLIPはこれらの組織の恒常性維持に必須の分子であることが明らかとなった。また肝細胞でcFLIPの発現の低下したマウスを用いてクッパー細胞と血中から浸潤してくる単球の肝炎後の炎症の収束における役割を検討した。クッパー細胞ではなく、末梢血から流入する単球を除去したマウスでは肝炎が劇症化し、著明に炎症性サイトカインの産生が亢進することが判明した。細胞死後の炎症の収束には末梢血から流入してくる単球が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To investigate a role for cFLIP in tissue homeostasis, we generated conditional cFLIP-deficient mice. Hepatocyte-, intestinal epithelial cell-, and epidermis-specific cFLIP-deficient mice died perinatally due to enhanced apoptosis or necroptosis of respective tissues, suggesting that cFLIP plays an essential role in maintaining tissue homeostasis. We also generated mice, in which expressions of cFLIP in hepatocytes were decreased (cFLIP^{Hep}low mice) to half compared to those of wild-type mice. Upon TNF injection, cFLIP^{Hep}low mice spontaneously developed transient and mild hepatitis. We next investigated whether Kupffer cells or infiltrated monocytes were required for suppression of inflammation associated with cell death. Depletion of infiltrated monocytes, but not Kupffer cells resulted in exacerbation of hepatitis along with strong elevation of inflammatory cytokines, suggesting that infiltrated monocytes, but not Kupffer cells play a crucial role in suppression of inflammation.

研究分野：生化学

キーワード：アポトーシス ネクローシス cFLIP 肝炎 腸炎 皮膚炎 骨髄移植 TNF α

1. 研究開始当初の背景

発生や老化の過程で不要となった細胞や生体にとって有害な細胞は、細胞死により排除される。長年にわたり細胞死は細胞の一生の最終過程であり、死んだ細胞は単に捨て去られる存在であると考えられてきた。ところが近年、細胞死が誘導された後の死細胞それ自身が周囲の細胞や組織に多様なシグナルを発信し、様々な生体応答を引き起こすことが分かってきた (Kono et al, *Nat Rev Immunol* 2008)。これまで細胞死に伴い HMGB1, HSP, SAP130 などの danger associated molecular patten (DAMP)s と呼ばれる様々な分子が放出され、細胞死に伴う炎症に関与することが示されてきた。また、ショウジョウバエではアポトーシスに伴い死細胞から増殖因子が放出され、それらが残存した生細胞に増殖シグナルを誘導することで、組織の恒常性維持に関与していることが示されている(代償性増殖) (Ryo et al, *Dev Cell* 2004)。一方で、ほ乳類細胞では細胞死に伴い放出され代償性増殖に関与する因子として prostaglandin E2 が同定された (Li et al, *Sci Signal* 2011)。このように様々な因子が死細胞から放出されることは明らかになってきたものの、生体内において死細胞がどのような局面で、どのようなメッセージを発しているかの全貌の解明には至っていない。

申請者らは、これまでに炎症に中心的な役割を果たす転写因子 NF- κ B の活性化のメカニズムの研究に一貫して従事しており (Nakano et al, *PNAS* 1998, 1999; Tokunaga et al, *Nature* 2011)、世界に先駆けて NF- κ B による細胞死抑制の新たなメカニズムが ROS 産生の抑制にあることを報告した (Sakon et al, *EMBO* 2003; Xue et al, *J Biol Chem* 2005)。その後申請者らは、NF- κ B による細胞死抑制に中心的な役割を果たす分子が cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) であるということを示した (Nakajima et al, *EMBO* 2006, *J Biol Chem* 2008, *Oncogene* 2008; Nakano et al, *Cell Death Differ* 2006)。

2. 研究の目的

(1) 肝細胞、腸上皮細胞、表皮細胞特異的な cFLIP 欠損マウスを樹立し cFLIP の組織の恒常性維持における役割を明らかにする。
(2) 肝細胞特異的な cFLIP 発現低下マウスを用いて、死細胞貪食に関与する 2 種類の食細胞を一過性に個別に欠失させたモデルマウスを樹立する。これらのマウスに細胞死を誘導し、死細胞の貪食やその後の炎症の収束過程がブロックされることで、どのような病態が誘導されるのか明らかにする。さらに、死細胞および死細胞に反応する食細胞から放出される炎症制御因子をトランスクリプトーム解析およびメタボローム解析を用いて同

定する。

3. 研究の方法

(1) cFLIP^{flox/flox} マウスを組織特異的に Cre リコンビネースを発現するトランスジェニックマウスと交配し、組織特異的な cFLIP 欠損マウスを樹立する。
(2) 樹立したマウスの組織を活性化型カスパーゼ 3 抗体や Ki67 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、アポトーシスや細胞増殖が亢進しているかを検討する。
(3) 各組織を電子顕微鏡により観察し、アポトーシスやネクローシスが亢進しているかを検討する。
(4) cFLIP 肝細胞低下マウスにクロドロネートリポソームを投与し、肝臓に常在する Kupffer 細胞を一過性に除去する。
(5) cFLIP 肝細胞低下マウスに、ジフテリアトキシシン(DT)により食細胞を一過性に除去することのできるマウス(DTR)の骨髄を移入したキメラマウスを作製し、DT 投与により骨髄由来の単球や好中球を一過性に除去することの可能なマウスを樹立する。上記 2 種類のマウスに TNF α を投与し、ある特定の食細胞を欠損させたマウスに肝炎を誘導し、細胞死後の炎症やサイトカイン産生にどのような影響が見られるかを検討する。

4. 研究成果

(1) 腸上皮細胞や肝細胞で特異的な cFLIP を欠損したマウスを樹立したところ、いずれのマウスも出生後 2 日以内に致死となることが判明した。cFLIP を欠損した腸上皮細胞や肝細胞はアポトーシスだけではなく、計画的ネクローシス(ネクロプトーシス)も亢進していることが判明した。TNFR1 欠損マウスと腸上皮特異的な cFLIP 欠損マウスを交配したところ、致死的な表現型は部分的に回復したことから、TNF シグナルが致死的な腸炎の発症に関与していることが示された。一方で、TNFR1 欠損マウスと肝細胞特異的な cFLIP 欠損マウスを交配しても、致死的な肝炎は抑制されなかったことから、肝細胞死の抑制には TNF シグナルのブロックだけでは不十分である可能性が示された。さらにインターフェロン誘導性肝細胞特異的な cFLIP 欠損マウスの解析から、cFLIP は TNF α , TRAIL, FasL などから誘導される細胞死から肝細胞を防御する上で必須の因子であることが判明した。以上より cFLIP は腸上皮細胞や肝細胞のアポトーシスおよび計画的なネクローシスを抑制し、腸管や肝臓などの組織の恒常性維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった (Piao et al, *Sci Signal* 2012)。

(2) 皮膚の恒常性維持における cFLIP の役割を検討するために表皮特異的な cFLIP 欠損 (cFLIP Δ Epi) マウスを作製した。既に論文に報告されているように

cFLIP Δ Epi マウスはケラチノサイトのアポトーシスが出生前に亢進し胎生致死となることが明らかとなった。表皮においてTNF α の発現が亢進していたことから、ケラチノサイトの細胞死亢進の原因がTNF α 依存性であるかを検討するためにTNFR1 欠損マウスと交配したところ胎生致死の表現型が解消された。cFLIP Δ Epi; TNFR1 二重欠損マウスはメンデルの法則に従って出生してきたものの、出生後4~5日目から皮膚炎が出現し、最終的には7~10日目には全個体が致死となった。このことから cFLIP 欠損表皮細胞で認められる細胞死は、出生前はTNFR1 依存性であり、出生後はTNFR1 非依存性であることが初めて明らかとなった。出生後5日目の組織学的検索では表皮細胞の初期分化マーカーであるケラチン 5 やケラチン 14 の発現は cFLIP Δ Epi マウスでも正常に検出されたが、後期分化マーカーであるロリクリンの発現は消失していた。この事から cFLIP の欠損により細胞死の亢進した表皮では分化障害が誘導されていることが明らかとなった。

(3) cFLIP の肝細胞特異的に発現の低下したマウス (完全に欠損したマウスは出生直後に致死となるため) に少量のTNF α を投与することにより一過性の肝障害が誘導されることを見出した。組織学的な解析ではTNF α 投与に伴い死んだ肝細胞の周囲に多数のCD11b陽性やLy-6G陽性の単球や好中球が浸潤してくることを見出した。この肝炎モデルを用いて死んだ肝細胞除去やその後の炎症の収束に肝臓内に常在するマクロファージであるクッパー細胞と骨髄から流入してくる単球や好中球の役割を検討した。予想外な事にクッパー細胞をクロドロネートリポソームにより除去しても肝死細胞の除去や、その後の炎症の収束にはまったく影響しないことが明らかとなった。骨髄から流入する単球や好中球を除去するためにヒトジフテリアトキシン受容体(DTR)をライソザイムプロモーター下流にノックインしたマウスの骨髄を用いて、cFLIP 肝細胞低下マウスとの骨髄キメラマウスを樹立した。DTR マウス骨髄を移入し、前もってジフテリアトキシンを投与し骨髄から流入する単球や好中球を除去したマウスでは、TNF α 投与後1~2時間という非常に早期に肝炎が劇的に増悪し、炎症性サイトカインであるIL-6やTNF α が大量に産生されることが明らかとなった。このことは血液中から流入してくる単球や好中球が細胞死に伴う炎症の抑制に積極的に関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 24 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
9. Piao, X., S. Komazawa-Sakon, T. Nishina, M. Koike, J.H. Piao, H. Ehlken, H. Kurihara, M. Hara, N. Van Rooijen, G. Schutz, M. Ohmura, Y. Uchiyama, H. Yagita, K. Okumura, Y.W. He, and H. Nakano. 2012a. c-FLIP Maintains Tissue Homeostasis by Preventing Apoptosis and Programmed Necrosis. *Sci Signal* 5:ra93. 10.1126/scisignal.2003558
 10. Piao, J.H., H. Yagita, K. Okumura, and H. Nakano. 2012b. Aberrant accumulation of interleukin-10-secreting neutrophils in TRAF2-deficient mice. *Immunol Cell Biol* 90:881-888. 10.1038/icb.2012.22
 11. Nishina, T., S. Komazawa-Sakon, S. Yanaka, X. Piao, D.M. Zheng, J.H. Piao, Y. Kojima, S. Yamashina, E. Sano, T. Putoczki, T. Doi, T. Ueno, J. Ezaki, H. Ushio, M. Ernst, K. Tsumoto, K. Okumura, and H. Nakano. 2012. Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation. *Sci Signal* 5:ra5. 10.1126/scisignal.2002056
 12. Minami, T., K. Kuwahara, Y. Nakagawa, M. Takaoka, H. Kinoshita, K. Nakao, Y. Kuwabara, Y. Yamada, C. Yamada, J. Shibata, S. Usami, S. Yasuno, T. Nishikimi, K. Ueshima, M. Sata, H. Nakano, T. Seno, Y. Kawahito, K. Sobue, A. Kimura, R. Nagai, and K. Nakao. 2012. Reciprocal expression of MRTF-A and myocardin is crucial for pathological vascular remodelling in mice. *EMBO J* 31:4428-4440. 10.1038/emboj.2012.296
 13. Klionsky DJ, H. Nakano, et al. 2012. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445-544. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22966490>
 14. 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.
以上すべて査読あり。
 15. 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.
 16. 中野裕康. 2013. 代償性増殖と酸化ストレス. 化学と生物. 2-6.
 17. 仁科隆史, 中野裕康. 2012. 酸化ストレスによる生体の恒常性維持機構. 実験医学増刊号 30:123-129.
 18. 中野裕康, 米原伸. 2012. 細胞死研究を超えて. 実験医学 30:538-544.
 19. 中野裕康, 仁科隆史. 2012. 細胞死に伴う酸化ストレスによる生体の恒常性維持機構. 実験医学 30:578-582.
以上査読なし、他日本語総説 5 件
- [学会発表] (計 22 件)
1. 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.
 2. 中野裕康. 2014.9.4-5. 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.
 3. 中野裕康. 2014.7.18-19. 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.
 4. 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.
 5. 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.
 6. 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. Quebec, Canada.
 7. 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.
 8. Nakano H. 2012.12.17. Oxidative stress maintains tissue homeostasis by inducing compensatory proliferation. International Symposium 2012 on Signaling Functions of Reactive Oxygen Species. Kyushu Univ. Fukuoka, Japan.
 9. 中野裕康. 2012.12.13. c-FLIP maintains tissue homeostasis by preventing apoptosis and necroptosis. 第 35 回日本分子生物学会年会. 福岡国際会議場、福岡県、福岡市.
 10. Nishina T, Piao X, Putoczki T, Doi T, Ernst M, Tsumoto K, Okumura K, Nakano H. 2012.10.23. Interleukin 11 links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation. In 12th Biennial International Endotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting. Gakushikaikan, Tokyo, Japan.

11. Nakano H. 2012.7.26. Interleukin 11 links Oxidative Stress and Compensatory Proliferation. The 33rd NAITO Conference on Oxygen Biology: Hypoxia, Oxidative Stress and Diseases. Chateraise Gateux Kingdom Sapporo, Sapporo, Japan.
12. Nakano H, Piao X, Komazawa-Sakon S, Nishina T, Piao JH, Ehlken H, He YW, Okumura K. 2012.1.18. An Indispensable Role for c-FLIP in Postnatal Survival of Hepatocytes by Preventing Apoptosis and Necrosis. Symposium on Biological Complexity: Immunity and Inflammation. 6th Annual meeting of Salk Institute, Fondation ISPEN, and Nature. San Diego, USA.
他 10 件学会発表

〔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