

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26110005

研究課題名(和文) 生体内における多様な細胞死シグナルの可視化・検出系の開発

研究課題名(英文) Visualization and significance of various types of regulated cell death in vivo

研究代表者

山口 良文(Yamaguchi, Yoshifumi)

北海道大学・低温科学研究所・教授

研究者番号：10447443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 59,300,000円

研究成果の概要(和文)：生体内における多様な細胞死動態の可視化とその意義の解明を目指し研究を行なった。パイロトーシス可視化プローブ、ネクロトーシス可視化プローブの作出に成功した(Cell Rep 2014, Nature Commun 2018)。これと並行して、マウス発生過程における細胞死の意義と制御機構について解析し、神経管閉鎖過程での細胞死動態とその制御に新知見を得るとともに新規細胞死の役割を明らかにした(Dev Cell 2015, Development 2017, Genes Cells 2018, BMC Dev Biol 2018, Cell Death Differ 2017)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わたしたちの体の中では日々細胞死が生じている。この細胞死を周辺細胞の挙動とともにリアルタイムに可視化・検出することができれば、細胞が死ぬ際の死細胞のふるまいおよび周辺組織への影響を検討することが可能となり、それにより細胞死の生体内での役割についての理解を深めることができる。本研究では、生体内で生じる様々な細胞死のうち、これまでに構築していたアポトーシスに加え、パイロトーシス、ネクロトーシスといった細胞死のリアルタイム検出系の構築に成功した。さらにそれらを用いて、哺乳類胎児の神経管形成時の細胞死の役割を明らかにした。これらの成果は、炎症や発ガン、胎児奇形の発生等に様々な洞察を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：To elucidate dynamics and significance of various types of regulated cell death in vivo, we developed novel fluorescent probes that allow us to detect pyroptosis and necroptosis in a real-time manner (Cell Rep 2014, Nature Commun 2018). To address the roles and regulation of cell death during mouse development, we analyzed mice deficient for genes regulating apoptosis and revealed involvement of apoptotic machinery in cellular movement during and after neural tube closure, during which a lot of cell death occur with dramatic rewiring of energy metabolic pathway (Dev Cell 2015, Development 2017, Genes Cells 2018, BMC Dev Biol 2018). In addition, we also found that alternative autophagic cell death compensates for apoptosis-deficiency during development (Cell Death Differ 2017).

研究分野：発生生物学

キーワード：細胞死 発生生物学

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

1. 研究開始当初の背景

生体における細胞死の多くはアポトーシスによると考えられてきたが、組織・細胞の種類に応じた多様な細胞死の様式が存在も明らかになってきた。これら多様な細胞死の様式や生体内動態、さらに機能的意義の解明は、幅広い生理・病理現象を理解する上で重要な課題である。しかし、細胞死の生体内動態や意義は未だ不明な点が多い。細胞死の生理的意義の理解を阻む理由として、(1)ひとつの細胞死を止めても他の様式の細胞死が生じてしまう場合が多い、(2)多様な細胞死を見分ける手法が電子顕微鏡観察以外に殆ど無い、(3)死細胞は速やかに除去されるため、死細胞が惹起する周辺組織応答の現場を捉え評価することが困難、等があげられた。

2. 研究の目的

以上のような背景を踏まえ、本研究では、生体内における多様な細胞死動態の可視化と、その意義の解明を目的とした。具体的な達成目標として、多様な細胞死動態の新規可視化プローブの開発、多様な細胞死動態の可視化を通じたその生物学的意義の解明、を設定した。

3. 研究の方法

生体内の細胞死動態を捕捉するために、生体内での検出方法の存在しないパイロトーシスおよびネクロトーシスの可視化プローブの作成を試みた。具体的には、2種類の蛍光タンパク質の間で生じる FRET の変化を検出するプローブとした。パイロトーシス検出プローブ SCAT1 は、パイロトーシスの際に活性化するカスパーゼ1により切断されるアミノ酸配列、ネクロトーシス検出プローブ SMART はネクロトーシスに関与する MLKL の部分配列をそれぞれリンカーとした。細胞死動態の生物学的意義の解明のため、哺乳類であるマウス胎児発生過程における細胞死動態に着目し、アポトーシス実行因子欠損胚を中心に解析を行った。

4. 研究成果

本研究においては以下の成果が得られた。パイロトーシス可視化プローブ SCAT1 (Liu, et al., Cell Rep 2014、東京大学、理化学研究所、他との共同研究) の作出に成功した。さらにこのプローブを用いることで、炎症性サイトカイン IL1b の放出は死んだマクロファージからデジタル方式で生じることを明らかにした。ネクロトーシス可視化プローブ SMART (Murai, et al., Nature Commun 2018、東邦大学、東京大学、他との共同研究) の作出に成功した。さらにこのプローブを用いて、ネクロトーシスの際には核膜がまず傷害されその後細胞膜が破裂することも明らかにした。マウス発生過程におけるアポトーシスおよび新規細胞死の意義およびその制御機構について解析し、神経管閉鎖過程においてアポトーシス実行因子カスパーゼは周辺細胞運動に影響を与えること、細胞死の制御に関わるエネルギー代謝に大きな変化が生じること、等の新たな知見を得た (Dev Cell 2015, Development 2017, Genes Cells 2018, BMC Dev Biol 2018)。さらに発生過程においてアポトーシス以外の新規細胞死の役割を明らかにした (Cell Death Differ 2017)。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計29件)

1. Polykratis A, Martens A, Onur ER, Shirasaki Y, Yamagishi M, Yamaguchi Y, Uemura S, Miura M, Holzmann B, Kollias G, Armaka M, Loo VG, Pasparakis M. A20 prevents inflammasome-dependent arthritis by inhibiting macrophage necroptosis through its ZnF7 ubiquitin-binding domain. *Nature Cell Biology*. 2019 May 13. doi: 10.1038/s41556-019-0324-3. 査読有
2. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen D, Hattori T, Le Thuong, Hori O, Mahib M, Yamaguchi Y, Masayuki M, Kinoshita T, Kushiya H, Sakurai M, Shiroishi T, Suda T. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nature Communications*. 2019 May 7;10(1):2091. doi: 10.1038/s41467-019-09753-2. 査読有
3. A FRET biosensor for necroptosis uncovers two different modes of the release of DAMPs. 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. *Nature Communications*. 2018 Oct 26;9(1):4457. doi:

- 10.1038/s41467-018-06985-6. 査読有
4. Mammalian embryos show metabolic plasticity toward the surrounding environment during neural tube closure. Miyazawa H, Yamamoto M, Yamaguchi Y, Miura M. *Genes to Cells*. 2018 Sep;23(9):794-802. doi: 10.1111/gtc.12626. 査読有
 5. Caspases and matrix metalloproteases facilitate collective behavior of non-neural ectoderm after hindbrain neuropore closure. Shinotsuka N, Yamaguchi Y, Nakazato K, Matsumoto Y, Mochizuki A, Miura M. *BMC Dev Biol*. 2018 Jul 31;18(1):17. doi: 10.1186/s12861-018-0175-3. 査読有
 6. The CCR4-NOT deadenylase complex controls Atg7-dependent cell death and heart function. Yamaguchi T, Suzuki T, Sato T, Takahashi A, Watanabe H, Kadowaki A, Natsui M, Inagaki H, Arakawa S, Nakaoka S, Koizumi Y, Seki S, Adachi S, Fukao A, Fujiwara T, Natsume T, Kimura A, Komatsu M, Shimizu S, Ito H, Suzuki Y, Penninger JM, Yamamoto T, Imai Y, Kuba K. *Science Signaling*. 2018 Feb 6;11(516). pii: ean3638. doi: 10.1126/scisignal.aan3638. 査読有
 7. Hyperoxidation of ether-linked phospholipids accelerates neutrophil extracellular trap formation. Yotsumoto S, Muroi Y, Chiba T, Ohmura R, Yoneyama M, Magarisawa M, Dodo K, Terayama N, Sodeoka M, Aoyagi R, Arita M, Arakawa S, Shimizu S, Tanaka M. *Scientific Reports*. 2017 Nov 22;7(1):16026. doi: 10.1038/s41598-017-15668-z. 査読有
 8. Arl8b is required for lysosomal degradation of maternal proteins in the visceral yolk sac endoderm of mouse embryos. Oka M, Hashimoto K, Yamaguchi Y, Saitoh SI, Sugiura Y, Motoi Y, Honda K, Kikko Y, Ohata S, Suematsu M, Miura M, Miyake K, Katada T, Kontani K. *J Cell Sci*. 2017 Oct 15;130(20):3568-3577. doi: 10.1242/jcs.200519. 査読有
 9. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy. Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, Shimizu S. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2017;93(6):378-385. doi: 10.2183/pjab.93.023. 査読有
 10. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. Arakawa S, Tsujioka M, Yoshida T, Tajima-Sakurai H, Nishida Y, Matsuoka Y, Yoshino I, Tsujimoto Y, Shimizu S. *Cell Death Differ*. 2017 Sep;24(9):1598-1608. doi: 10.1038/cdd.2017.84. 査読有
 11. Rewiring of embryonic glucose metabolism via suppression of PFK-1 and aldolase during mouse chorioallantoic branching. Miyazawa H, Yamaguchi Y, Sugiura Y, Honda K, Kondo K, Matsuda F, Yamamoto T, Suematsu M, Miura M. *Development*. 2017 Jan 1;144(1):63-73. doi: 10.1242/dev.138545. 査読有
 12. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. *EMBO Rep*. 2016 Nov;17(11):1552-1564. 査読有
 13. In Situ Characterization of Bak Clusters Responsible for Cell Death Using Single Molecule Localization Microscopy. Nasu Y, Benke A, Arakawa S, Yoshida GJ, Kawamura G, Manley S, Shimizu S, Ozawa T. *Scientific Reports*. 2016 Jun 13;6:27505. doi: 10.1038/srep27505. 査読有
 14. Programmed Cell Death and Caspase Functions During Neural Development. Yamaguchi Y, Miura M. *Curr Top Dev Biol*. 2015;114:159-84. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.016. 査読有
 15. Identification of a novel compound that inhibits both mitochondria-mediated necrosis and apoptosis. Arakawa S, Nakanomyo I, Kudo-Sakamoto Y, Akazawa H, Komuro I, Shimizu S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Nov 27;467(4):1006-11. doi:10.1016/j.bbrc.2015.10.022. 査読有
 16. Programmed cell death in neurodevelopment. Yamaguchi Y, Miura M. *Developmental Cell* 2015 Feb 23;32(4):478-90. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.019. 査読有
 17. Single-cell imaging of caspase-1 dynamics reveals an all-or-none inflammasome signaling response. Liu T, Yamaguchi Y, Shirasaki Y, Shikada K, Yamagishi M, Hoshino K, Kaisho T, Takemoto K, Suzuki T, Kuranaga E, Ohara O, Miura M. *Cell Reports* 2014 Aug 21;8(4):974-82. doi: 10.1016/j.celrep.2014.07.012. 査読有

他 1 2 編

[学会発表](計 2 8 件)

1. Yoshifumi Yamaguchi “Elucidating the roles and regulation of cell death in mammalian development and physiology”. Australia-Japan Meeting on Cell Death

2018

2. Yamaguchi, Y., Matsumoto, M., Hamachi, M., Nonomura, K., Shinotsuka, N., Miura, M. "Elimination of the boundary cells by apoptosis in the dorsal midline of the midbrain after the neural tube closure". Gordon Research Conference "Cell Death" 2016
3. Yoshifumi Yamaguchi. "Live-imaging analysis of apoptosis and pyroptosis at a single cell resolution". Imaging Cell Death. Japan Australia Meeting on Cell Death 2015

他 2 5 件

〔図書〕(計 0 件)

〔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：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：荒川 聡子

ローマ字氏名：SATOKO ARAKAWA

所属研究機関名：東京医科歯科大学

部局名：難治疾患研究所

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 90415159

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。