

令和元年6月21日現在

機関番号：84409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15134

研究課題名(和文)独自のin vivoイメージングによる生体内でのネクロシスの生理的役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of physiological role of necrotic cell death with newly-developed in vivo imaging system of cell death.

研究代表者

今川 佑介 (Imagawa, Yusuke)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・主任研究員

研究者番号：20614770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞死は、がんや神経変性疾患、糖尿病、先天性疾患など多くの疾患と関連していることが知られている。本研究では、生体内で誘導される細胞死について時空間的に、またその機構と機能について詳細な解析を行った。その結果、「生理的な細胞死=アポトーシス」というこれまでの考えとは異なり、生理的な状況下でも多くのネクロシス型の細胞死が誘導されていることが明らかとなった。また、生体内で誘導されるネクロシスは、オートファジー依存的細胞死やネクロプトーシスなど既知の制御されたネクロシス型細胞死の機構とは異なるメカニズムにより実行されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、生理的な条件下の生体内で起きる細胞死には、アポトーシスだけでなく他の実行機構により誘導される複数のネクロシス型細胞死が関わっていることを明らかにした。このことは、これまで病的な細胞死と考えられてきたネクロシスに、生理的な役割があるという新しい考えを生むきっかけとなり、学術的に非常に大きな意義があると考えられる。さらにネクロシスの生理的な役割の発見は、これまで原因がわからなかった細胞死が関わる疾患の原因究明や治療への応用にも役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is known that cell death has an important role in cancer, neurodegenerative disease, diabetes, and congenital disorder. In this study, cell death induced under the physiological condition was investigated by spatiotemporal observation in the mouse embryo. The molecular mechanisms and the roles of the cell death induced in embryogenesis were also examined. Several forms of non-apoptotic cell death were identified in mouse embryos (they were not performed with mechanisms of known regulated necrosis such as necroptosis and autophagy-dependent cell death). This finding suggests that necrosis is actively involved in embryogenesis.

研究分野：細胞死

キーワード：生理的ネクロシス プログラム細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞死研究において、アポトーシスだけでなく制御されたネクローシスの重要性が認識され始めている。これまで、「アポトーシス＝制御された細胞死」「ネクローシス＝偶発的な細胞死」と考えられてきたが、最近ではネクローシスにも制御可能なものがあり、生理的な細胞死においても重要な役割を担う可能性が指摘されている。オートファジー依存的細胞死やネクロプトーシスなどいくつかのネクローシス型プログラム細胞死は、その実行メカニズムの解明が進み、これらの細胞死と心筋梗塞や脳梗塞、細菌感染などとの関連が明らかになり、病理的な役割は理解されつつある。一方で、制御されたネクローシスの生理的な役割はほとんどわかっていない。ネクローシス型プログラム細胞死の生理的な役割がほとんど明らかにされていない理由の一つは、アポトーシスと異なり、ネクローシスを生体内で網羅的に捕捉する方法が開発されていないことにある。そこで研究代表は、ネクローシスに共通の指標である細胞膜の破綻に基づいた生体染色法の開発を行ない、マウス個体内においてアポトーシスとネクローシスそれぞれをリアルタイムに網羅的に定量性を持って観察できる *in vivo* イメージング法の開発に成功した。そして、このイメージング法を用いた解析により、生理的条件下のマウス胚の骨形成領域（特に骨表面）において未知のネクローシス型の死細胞を発見した。さらに、この骨形成領域の細胞死が起きない遺伝子欠損マウス（KO マウス）を探索した結果、オートファジー関連遺伝子 *Atg9a* がこの細胞死に関わる（ただし *Atg5* は関与しない）ことを同定した。*Atg9a* KO マウスの骨を観察した結果、骨表面の形成不全が観察された (Imagawa et. al., *Nat. Commun.*, 2016)。これらの結果から、骨形成領域で観察された新しいネクローシスは骨形成とリンクしており、この細胞死（死細胞）が骨形成を誘導する可能性が考えられた。このことは、生理的条件下でネクローシス型のプログラム細胞死が起こっているだけでなく、ネクローシス型細胞死が、生理的な役割を持っている可能性を示唆している。さらに研究代表は、この骨形成領域以外にも、いくつかのネクローシスが胚発生期に誘導されていることも見出している。このことから、研究代表が同定した生理的な役割を持つ *Atg9a* 依存的ネクローシスだけでなく、病理的な役割しか知られていないオートファジー依存的細胞死やネクロプトーシスなど既知のネクローシス型プログラム細胞死にも生理的な役割があるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

生理的条件下のマウス胚で起こる細胞死を網羅的に時空間的に（どの発生ステージのどの部位・組織で細胞死が誘導されるか）マッピングすることで、ネクローシス型のプログラム細胞死が広範に存在することを証明し、それら細胞死が持つ生理的な役割を包括的に明らかにする。それにより、これまで不要細胞・不要組織の除去が主な役割であると考えられてきた細胞死の新たな役割を明らかにし、各ネクローシス型プログラム細胞死の役割を分類することで、様々な実行メカニズムを持つ複数の細胞死が存在する意義についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 独自の *in vivo* 細胞死イメージング法を用いて、野生型マウスの胚発生期に誘導される細胞死を時空間的に同定する。(2) マッピングされたそれぞれの細胞死が、既知のプログラム細胞死の機構により誘導されているか、各細胞死に関連する KO マウスや特異的マーカーを用いて検証する。(3) 死細胞周囲の組織学的解析から、その細胞死に関わる生体内でのプロセスや役割を推定する。(4) これらの細胞死を培養細胞や組織に誘導する方法および化合物を同定し、生体内でのプロセスに類似した反応が誘導されるか確認する。(5) 細胞死がその生体内のプロセスに直接かかわっているか確認する。

4. 研究成果

(1) *in vivo* 細胞死イメージングによる生体内で誘導される細胞死の時空間的マッピング

独自に開発した *in vivo* 細胞死イメージング法を用いて、E12.5-E14.5 の各発生ステージのマウス胎児で誘導される細胞死を全身で網羅的に可視化した。その結果、研究代表が以前に同定した骨形成領域のネクローシス型細胞死だけでなく、胎盤や心臓、肝臓、腎臓、三叉神経節などいくつかの部位および臓器においてネクローシス型の細胞死が、発生時期特異的に誘導されることを見いだした。

(2) 既知のネクローシス型プログラム細胞死の関与を確認

近年、アポトーシスに加えてオートファジー依存的細胞死やネクロプトーシスなど遺伝子により制御を受けるネクローシス型細胞死の存在が知られている。そこで、上述のイメージング法により同定された細胞死がこれらの制御されたネクローシス型細胞死の機構に依存するかを、アポトーシスに関わる caspase-9 遺伝子欠損マウスやオートファジー依存的細胞死に関わる Atg5 遺伝子欠損マウス、ネクロプトーシスに関わる RIP1, RIP3 遺伝子欠損マウスを用いて確認した。また、アポトーシスの指標の1つである caspase-3 の部位特異的切断や、オートファジーの指標の1つである LC3 の増加、ネクロプトーシスの指標である RIP3 のリン酸化および MLKL のリン酸化を免疫組織染色によっても確認した。その結果、生体内で観察されたネクローシス型細胞死の多くは、アポトーシスの機構に依存した二次的ネクローシス（アポトーシスを起こした細胞が除去されずに細胞膜の破綻を起こした細胞死）であることがわかった。一部は、アポトーシスの機構に依存していない細胞死であったが、オートファジー依存的細胞死やネクロプトーシスの機構には依存していなかった。

(3) 死細胞周囲の組織学的解析

生体内の特定の臓器外においてもネクローシス型細胞死が観察されたが、これらは将来骨が形成される領域に多く観察された。このことは、研究代表が以前に同定している骨形成過程に関わる Atg9a 依存的細胞死が様々な骨形成の予定領域においても誘導されていることを示唆している。また、後期胎盤で観察されたネクローシス型細胞死の周囲にもカルシウムの沈着が観察された。このことから、生体内で誘導されるネクローシス型細胞死には、石灰化を誘導する役割があることが推察された。また、心臓においては、左心室の緻密層においてネクローシス型の細胞死が特異的に観察されたことから、左室心筋の緻密化との関わりが考えられた。それ以外の細胞死については、その多くの実行メカニズムがアポトーシスの機構に依存した二次的ネクローシスであったが、周囲の組織像からは、その役割を推定することは困難であった。

(4) 生体内で誘導される細胞死 in vitro での再現

生体内で観察されたネクローシス型細胞死のうち、骨形成にかかわる Atg9a 依存的細胞死について、Atg9a 遺伝子欠損マウス胎仔線維芽細胞 (MEF)を用いて、Atg9a 依存的に細胞死を誘導できる化合物をスクリーニングした。その結果、化合物 X を同定した。この化合物 X によって誘導される細胞死は、オートファジーに必須の遺伝子である Atg5 遺伝子欠損 MEF においても観察されたことから、化合物 X による細胞死はオートファジー依存的細胞死とは異なる機構において誘導されると考えられる。これは、生体内で観察される Atg9a 依存的細胞死が Atg5 欠損マウスにおいても依然として観察される事実と一致している。さらに、この化合物 X と同じ酵素活性を阻害する他の化合物においても、同様に Atg9a 依存的細胞死を誘導できた。このことから、Atg9a 依存的細胞死を誘導するには、この酵素に関わる代謝経路の阻害が重要であることが推測された。このことと一致して、化合物 X によってこの代謝経路を阻害した条件下で、下流の代謝産物を細胞に添加することで、Atg9a 依存的細胞死が抑制できた。すなわち、化合物 X によって阻害される代謝経路の下流の因子の欠乏が、Atg9a 依存的細胞死を誘導することを示唆している。

(5) 細胞死が胚発生期のプロセスを直接誘導するか確認

上述の化合物 X によって誘導される細胞死が骨形成に関わるかを、マウス新生児頭頂骨の in vitro 組織培養系を用いて確認した。その結果、野生型マウスの頭頂骨培養系に化合物 X を添加すると、頭頂骨の骨形成が誘導された。一方、Atg9a 遺伝子欠損マウスの頭頂骨では骨形成の誘導能が減弱していた。また、化合物 X で骨形成が誘導された頭頂骨を薄切し、細胞死の指標である TUNEL 染色を行ったところ、新生骨の下部に多くの TUNEL 陽性細胞が観察された。これらの結果は、Atg9a 依存的細胞死が骨形成を直接誘導する可能性を強く示唆している。

以上の結果は、ネクローシス型細胞死がアポトーシスとは異なる生理的役割を持って生体内で誘導されているという研究代表の考えを強く支持するものであると考えられる。今後、この研究により同定した他のネクローシス型細胞死のメカニズムも解明し、その役割を明らかにすることで、生理的ネクローシスという考えを検証し、確立したいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

- (1) Tsuchiya Y., Saito M., Kadokura H., Miyazaki JI., Tashiro F., Imagawa Y., Iwawaki T. and Kohno K. (2018). "IRE1-XBP1 pathway regulates oxidative proinsulin folding in pancreatic beta cells." *J Cell Biol* 査読有 **217**(4): 1287-1301.
DOI: 10.1083/jcb.201707143

〔学会発表〕（計 2 件）

- (1) 今川 佑介、辻本賀英 「ネクロプトーシスを制御する内因性低分子化合物の同定」
第 27 回 日本 Cell Death 学会 学術集会 2018 年 7 月 27 日～28 日 京都
- (2) 今川 佑介、辻本賀英 「生体内で起こる生理的なネクローシス型プログラム細胞死」
第 26 回 日本 Cell Death 学会 学術集会 2017 年 7 月 24 日～25 日 東京

〔図書〕（計 1 件）

- (1) 今川 佑介 「がんと新しい細胞死」、大阪成人病予防協会、成人病、2017 年、**57**: 24-26

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://oici.jp/laboratory/department/saibou/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：辻本 賀英

ローマ字氏名：Tsujimoto, Yoshihide

研究協力者氏名：曾川 愛守榮

ローマ字氏名：Sogawa, Ashuei

※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。