

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03475

研究課題名(和文)新規細胞死ネクロトーシスの新たな制御機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms underlying the execution of necroptosis

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：MLKLの1分子イメージングと細胞膜崩壊の指標であるDAMPs放出の同時イメージングを行うために、MLKL-Halo-TagとHMGB1-mCherryを同時に発現する細胞を樹立した。その細胞にネクロトーシスを誘導しMLKLの細胞膜上の挙動とDAMPs放出の同時イメージングに成功した。ネクロトーシスをFRETを用いて可視化できるバイオセンサーSMARTを発現するトランスジェニックマウスを樹立し、そのマウス由来の細胞でネクロトーシスに伴いFRET比が上昇することを見出した。またSMART Tgマウスにシスプラチン誘導性腎障害を誘導し、尿管上皮細胞でFRET比が上昇することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

制御された細胞死であるネクロトーシスの実行分子MLKLの1分子イメージングと、DAMPsの1種であるHMGB1の放出の細胞レベルでのリアルタイムイメージングに成功した。このイメージングにより細胞膜障害とDAMPsの放出について新たな知見が得られることが期待される。またネクロトーシスを生体内で観察することのできるマウスを世界に先駆けて樹立することに成功した。このマウスに様々な病気モデルを誘導することで、様々な病気におけるネクロトーシス細胞の運命を観察することができ、ネクロトーシス後の生体応答を詳細に観察可能となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted single molecule imaging of MLKL in cells expressing MLKL-Halo-Tag and HMGB1-mCherry using total internal reflection fluorescence microscopy. While MLKL shuttled from the cytosol to the cytoplasmic membrane in unstimulated cells, it formed oligomers up to 8 mers on the cytoplasmic membrane, ultimately resulting in the release of HMGB1-mCherry following stimulation.

We generated transgenic (Tg) mice expressing a fluorescence resonance energy transfer (FRET) biosensor, SMART that specifically responded to the execution of necroptosis in different tissues. The FRET ratio exhibited an increase in necroptosis, but not in apoptosis or pyroptosis, in primary cells. Furthermore, the FRET signals were elevated in renal tubular epithelial cells of cisplatin-treated SMART Tg mice compared to untreated SMART Tg mice. Therefore, SMART Tg mice can serve as a valuable tool for monitoring necroptosis in different cell types, both in vitro and in vivo.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：ネクロトーシス 1分子イメージング 全反射顕微鏡 DAMPs FRET SMART シスプラチン in vivo イメージング

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年アポトーシス以外の制御された細胞死が次々と発見され、新規細胞死の分子メカニズムや生理的あるいは病理的な役割の解明が飛躍的に進歩しつつある。なかでもネクロトーシス様の細胞死形態を示すネクロプトーシスは、最もよく研究されている新規細胞死であり、TNF、polyI:C やウイルス感染時に誘導される(Nakano, *Curr Top Microbiol Immunol* 2017)。細胞死抑制因子の Inhibitor of apoptosis (IAP)阻害剤とカスパーゼ阻害剤存在下で TNF 刺激を行うと、RIPK1/RIPK3/MLKL から構成されるネクロソームが形成される。その結果セリンスレオニンキナーゼである RIPK1 により RIPK3 が活性化され、さらに MLKL がリン酸化され多量体を形成し、細胞膜に穴が開き細胞膜障害が生じ、ネクロプトーシスが誘導される。

我々は 2018 年に FRET (Forster resonance energy transfer)の原理を応用することで、ネクロプトーシスをライブセルでイメージングできる SMART と命名した FRET バイオセンサーの開発に世界で初めて成功した (Murai, *Nat Commun* 2018)。さらに共同研究者である東大の白崎博士らの開発した 1 細胞分泌実時間イメージング法を用いることで、ネクロプトーシスのイメージングとネクロプトーシス細胞から放出される HMGB1 と呼ばれる核内タンパク質のイメージングを同時に行い、HMGB1 の放出には非常に早い burst モードと遅い sustained モードが存在することを見出した。さらに 2 種類の HMGB1 の放出は、細胞膜の修復に関与する ESCRT-III タンパク質群に属する CHMP4B により制御されていることも明らかにした (Murai, *Nat Commun* 2018)。しかし未刺激あるいは刺激後にネクロプトーシスが誘導される状況で、MLKL の細胞質および細胞膜への移行や細胞内での分解がどのように制御されているかについては、不明な点が多い。

また一方でアポトーシスと異なり細胞内容物が早期に細胞外へと放出されるネクロプトーシス細胞が、in vivo でどのように処理されるのか、あるいはネクロプトーシス細胞はどのような生体応答を誘導するかをリアルタイムで可視化する技術も開発されていない。これまで我々は腸管上皮細胞、肝細胞、気道上皮細胞、表皮細胞などにおいて細胞死の亢進したマウスを樹立し、細胞死後に誘導される生体応答の解析をおこなってきた (Piao, *Sci Signal* 2012; Tsurusaki, *Cell Death Dis* 2019; Piao, *Hepatology* 2017; Kurosawa, *Genes Cells* 2019; Piao, *J Allergy Clin Immunol* 2019)。さらに最近ではネクロプトーシス細胞が起点となって、特殊なリンパ球を活性化することで腸管上皮細胞にアポトーシスが誘導されることを明らかにした (Shindo, *iScience* 2019)。そこでネクロプトーシス細胞が誘導する生体応答をリアルタイムでイメージングするために、SMART を発現するトランスジェニック (Tg)マウスの樹立することが、喫緊の課題であると考えられた。

2. 研究の目的

- 1) MLKL 分子の細胞内および細胞表面上での動態を 1 分子イメージングを用いて解析することにより、MLKL のネクロプトーシス誘導における細胞膜上の挙動や DMAPs 放出との関連を明らかにする。
- 2)本研究では SMART を発現するマウスを樹立して、様々な病態モデルを誘導し、in vivo でネクロプトーシス細胞を可視化できるか、さらにネクロプトーシス実行後にどのような生体応答が誘導されるかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) MLKL の 1 分子イメージング

(1)MLKL を 1 分子イメージングするために MLKL の C 末側に HaloTag (細胞の外から HaloTag リガンドを添加することで MLKL をラベルできる)を融合させた遺伝子を発現する MLKL 欠損細胞を樹立する (以下 MLKL-Halo-Tag 発現細胞と略す)。この細胞を用いてネクロ

プトーシス誘導刺激前後における MLKL の細胞質から細胞膜への移行や、細胞膜上での多量体形成を全反射蛍光顕微鏡を用いて 1 分子イメージングを行う。

(2) 細胞膜障害と MLKL の一分子イメージングを同時に行うために MLKL-HaloTag 発現細胞に HMGB1-mCherry 遺伝子を導入し、ネクロプトーシス誘導刺激に MLKL の細胞膜の挙動と、HMGB1-mCherry の放出 (細胞膜障害の出現) の同時イメージングを行う。

2) SMART Tg マウスの樹立

(3) ROSA26-loxP-stop-loxP (LSL) の遺伝子座に SMART cDNA をノックインしたトランスジェニック (Tg) マウスを樹立する。

(4) SMART Tg マウスに大量に TNF を投与する全身性炎症性症候群モデルや、シスプラチンを投与する腎尿細管障害モデルを誘導し、ネクロプトーシス細胞を *in vivo* でモニタリングできないかを検討する。

4. 研究成果

1) MLKL の 1 分子イメージング

(1) MLKL の 1 分子イメージングを行うためにまず *Mkl1* 欠損マウス表皮細胞に Halo-Tag 融合タンパク質を発現する細胞を樹立した。Halo-Tag はそれ自身では蛍光を発しないために、Halo-Tag リガンドでラベルする必要があるが、EGFP や mCherry などの蛍光タンパク質と比較して、レーザーによる減衰が弱く、かつシグナルの定量性が高いという利点をもっている。MLKL-Halo-Tag の細胞膜近辺の動態を全反射顕微鏡により観察した。まず未刺激状態の細胞では細胞膜近傍と細胞質とを MLKL-Halo-Tag がシャトリングしていることを見出した。

(2) 刺激することで細胞膜近傍に存在する MLKL が一時的に減少し、その後徐々に細胞膜上の MLKL-Halo-Tag が増加し、かつオリゴマーサイズが増加することを見出した。

(3) 刺激後に細胞膜上で形成されるオリゴマーサイズを計算したところ 2, 4, 6 mers が増加していた (図 1)。

(4) 1 分子イメージングの観察中に、細胞膜障害に伴う細胞内容物の漏出を検討するために、Sytox を倍地中に添加して行ったところ、MLKL-Halo-Tag オリゴマーを形成している中心から Sytox 陽性の物質 (おそらくミトコンドリア、あるいはミトコンドリアゲノム DNA) が放出される像が観察された。さらにネクロプトーシス誘導前後

の培養上清を用いてミトコンドリアゲノム遺伝子の qPCR を行った。ネクロプトーシス誘導後にミトコンドリアゲノム遺伝子である 3 種類の遺伝子が培養上清中に検出され

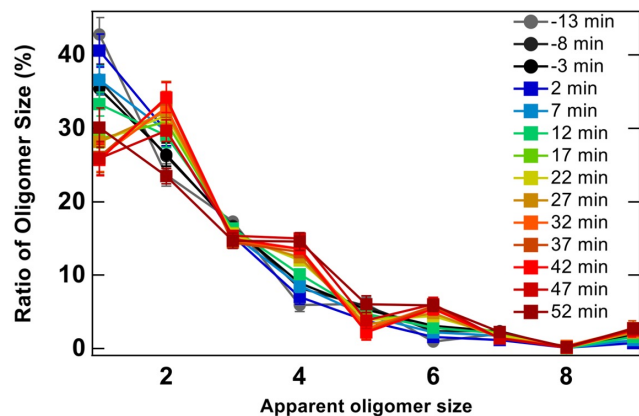


図1. ネクロプトーシス刺激後のMLKLオリゴマーサイズの増加。MLKL-Halo-Tagの蛍光強度からオリゴマーサイズを計算。刺激後に2, 4, 6 mersが増加した。

HMGB1-mCherry細胞外への放出 (隣の細胞から)

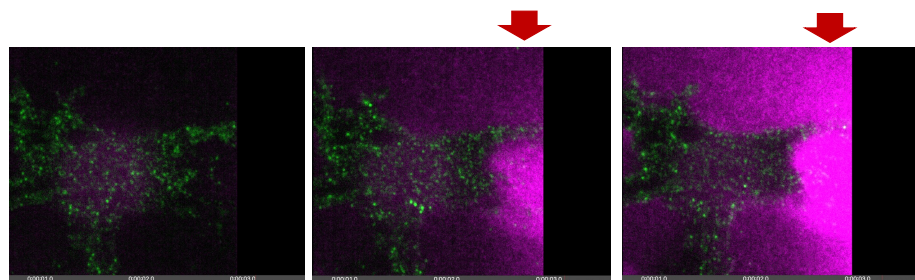


図2. MLKL KO MEFs-MLKL-Halo-Tag/HMGB1-mCherry発現細胞のLCI-Sと1分子イメージングによる同時撮影 (ネクロプトーシス誘導刺激後)。MLKL-Halo-Tagはgreenの輝点として観察され、細胞膜破裂に伴うHMGB1-mCherryの細胞外への放出はMagentaのシグナルとして観察される。(左)は細胞膜崩壊は生じていないが、時間経過とともに、(中)では細胞膜崩壊が生じ、(右)ではさらに膜崩壊が進行した結果、HMGB1-mCherryの細胞外への放出が最大となっている。

たが、一方で染色体 DNA にコードされる *actin* の遺伝子は検出されなかった。このことからネクロプトーシス細胞では早期にミトコンドリア自身あるいはミトコンドリアゲノム DNA が放出されることが明らかとなった。

(5)細胞膜非透過性 Dye は核の DNA とキレートして初めて蛍光シグナルを発することから、この蛍光を指標として細胞膜障害を検出することは、底面から約 100 nm の深度にある蛍光物質を検出する TIRF 顕微鏡では困難である。そこで、細胞膜障害を効率よく検出するために、MLKL-Halo-Tag 発現細胞にさらに HMGB1-mCherry を発現する細胞を樹立した。また細胞外への HMGB1-mCherry の検出をより効果的に行うために、細胞を播種するプレートを前もって抗 mCherry 抗体で固相化し、TIRF 顕微鏡により LCI-S (live cell imaging for secretion activity) と 1 分子イメージングを同時に行った。その結果 MLKL の細胞膜上での動態と HMGB1-mCherry の細胞外への放出を同時に観察することが可能となった (図 2)。しかし、MLKL の多量体化が見られる底面からの HMGB1-mCherry の放出される像は、非常に少ない細胞でしか観察できなかった (図 2)。この原因としてはネクロプトーシスによる細胞膜崩壊が細胞がプレートに付着している底面ではなく、側面や表面から多く放出される可能性が考えられた。

2) SMART Tg マウスを用いた in vivo におけるネクロプトーシス実行の解析

(6)トランスポゾンベクターを使用し、蛍光強度の強い SMART Tg マウス 1 ラインを樹立することができた。まず SMART が全ての組織で発現していることを確認した (図 3)。その後、腹腔からマクロファージを調整し、BV6 + zVAD で刺激することでネクロプトーシスを誘導した。予測通り BV6 + zVAD 刺激によりネクロプトーシスが誘導され、それに伴い FRET 比の上昇が見られた。一方でパイロトーシスやアポトーシスでは FRET 比の上昇は認められなかった。

(7)次に SMART Tg マウスから初代培養の胎児線維芽細胞 (MEFs) を調整し、TNF + BV6 + zVAD 刺激によりネクロプトーシスを誘導し、FRET 比が上昇するかを検討した。その結果ネクロプトーシス刺激により FRET 比は上昇し、一方でアポトーシス刺激では FRET 比の上昇は認められなかった。以上より SMART Tg マウス由来の腹腔マクロファージや MEFs はネクロプトーシスに伴い選択的に FRET 比が上昇していることが明らかとなった (図 4)。

(8)in vivo で誘導されるネクロプトーシスを SMART Tg マウスではモニタリングできるかを検討した。まずこれまでの報告にあった大量の TNF を投与して誘導される SIRS モデルを用いて多光子顕微鏡により小腸上皮細胞で FRET 比が上昇するかを検討した。その前にまず SIRS (systemic inflammatory response syndrome)モデルの小腸でネクロプトーシス細胞がどの程度出現するかをリン酸化 RIPK3 の抗体の免疫染色により検討したところ、既報と異なり少数の細胞が pRIPK3 が陽性となることがわかった。実際に in vivo imaging を行ったところ、ごく一部の小腸上皮細胞では TNF 投与により FRET 比の上昇が認められたが、小腸の蠕

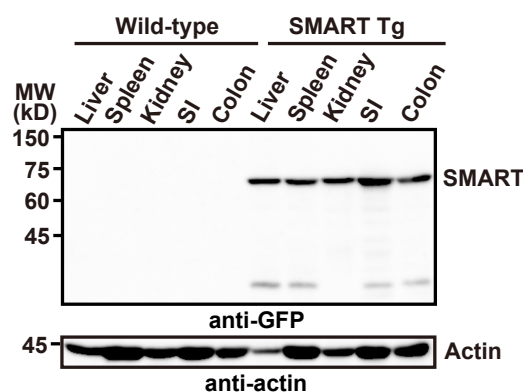


図3. SMART TgマウスにおけるSMARTの発現。それぞれの組織抽出液を用いた Western blot。

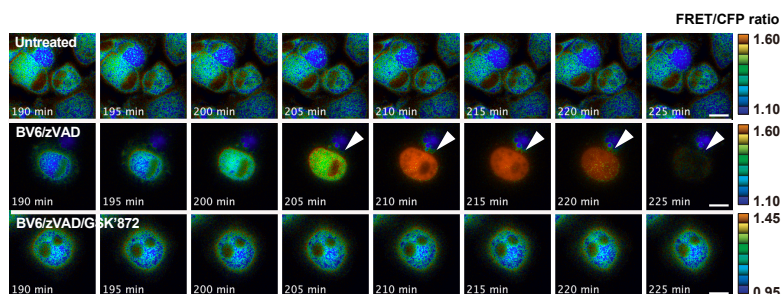


図4. 腹腔マクロファージでのFRET比の上昇。SMART Tgマウスから腹腔マクロファージを調整して刺激してネクロプトーシスを誘導。ネクロプトーシス細胞 (BV6/zVAD)ではFRET比が上昇した。

蠕動は、一方で染色体 DNA にコードされる *actin* の遺伝子は検出されなかった。このことからネクロプトーシス細胞では早期にミトコンドリア自身あるいはミトコンドリアゲノム DNA が放出されることが明らかとなった。

動運動が激しいために、長時間のイメージングには不適切と考え、SIRS モデルは途中で中断した。

(9)次にシスプラチン投与により誘導される腎臓の尿細管上皮障害モデルについて検討した。まずシスプラチンを投与した後に1、2、3日と経時的に血清中のクレアチニンと尿素窒素(BUN)、腎組織のHE染色像、活性化型カスパーゼ3(CC3)やリン酸化RIPK3(pRIPK3)に対する抗体による免疫染色を行い検討した。その結果クレアチンやBUNはシスプラチン投与後1日目から上昇したが、pRIPK3陽性細胞は2日目から、CC3陽性細胞は3日目から出現することを見出した。このことはシスプラチン投与によりまず尿細管上皮細胞でネクロプトーシスが起これ、その後アポトーシスが誘導されていることを示している。

(10)In vivo imaging を2日にわたりマウスを生きたままで行うことは、手技的に不可能なことから、シスプラチン投与前のSMART Tgマウスとシスプラチン投与2日後のSMART Tgマウスの腎臓のスナップショット(one point)でのFRET比の解析を行った。その結果SMART Tgマウスでは、尿細管上皮細胞でのFRET比がシスプラチン投与前の細胞に比較して、投与後の細胞では上昇していることが明らかとなった(図5)。また投与2日目にin

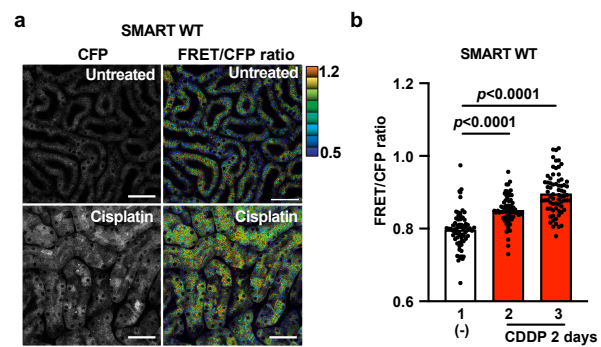


図5. シスプラチン投与によりFRET比は上昇。SMART Tgマウスにシスプラチン投与48時間目のFRET比の擬似カラー像 (a)。シスプラチン投与前、投与後2日目の尿細管上皮細胞のFRET比の比較 (b)。

vivoでのFRET解析を経時的にイメージングしたところ、開いていた尿細管の管腔が閉鎖し、さらにその後一部の尿細管上皮細胞のFRET比が上昇してくる様子を経時的にイメージングすることに成功した(Murai et al, *Commun Biol* 2022)。以上よりSMART Tgマウスはin vivoでネクロプトーシスをモニタリングすることが可能であり、今後様々な病態モデルにおけるネクロプトーシスの実行やその後の生体応答の解析に有用なツールとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計34件（うち査読付論文 29件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 21件）

1. 著者名 Inaba Yuka、他5名、Murai Shin、Takahashi Chiaki、Matsumoto Michihiro、Kitajima Shigetaka、Yamamoto Yasuhiko、Honda Masao、Asahara Shun-ichiro、Ravnskjaer Kim、Horike Shin-ichi、Kaneko Shuichi、Kasuga Masato、Nakano Hiroyasu、Harada Kenichi、Inoue Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-023-35804-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishina Takashi、Deguchi Yutaka、Kawauchi Mika、Xiyu Chen、Yamazaki Soh、Mikami Tetuo、Nakano Hiroyasu	4. 巻 26
2. 論文標題 Interleukin 11 confers resistance to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105934 ~ 105934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2023.105934	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murakami Tomohiko、Takahata Yoshifumi、Hata Kenji、Ebina Kosuke、Hirose Katsutoshi、Ruengsinpinya Lerdluck、Nakaminami Yuri、Etani Yuki、Kobayashi Sachi、Maruyama Takashi、Nakano Hiroyasu、Kaneko Takehito、Toyosawa Satoru、Asahara Hiroshi、Nishimura Riko	4. 巻 15
2. 論文標題 Semaphorin 4D induces articular cartilage destruction and inflammation in joints by transcriptionally reprogramming chondrocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.abl5304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Murai Shin、Takakura Kanako、Sumiyama Kenta、Moriwaki Kenta、Terai Kenta、Komazawa-Sakon Sachiko、Seki Takao、Yamaguchi Yoshifumi、Mikami Tetuo、Araki Kimi、Ohmuraya Masaki、Matsuda Michiyuki、Nakano Hiroyasu	4. 巻 5
2. 論文標題 Generation of transgenic mice expressing a FRET biosensor, SMART, that responds to necroptosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-04300-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamazaki Soh, Inohara Naohiro, Ohmuraya Masaki, Tsuneoka Yousuke, Yagita Hideo, Katagiri Takaharu, Nishina Takashi, Mikami Tetuo, Funato Hiromasa, Araki Kimi, Nakano Hiroyasu	4. 巻 15
2. 論文標題 I B controls IL-17-triggered gene expression program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents Th17-associated pathologies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1321 ~ 1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-022-00554-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Fukuoka Tomoya, Moriwaki Kenta, Takamatsu Shinji, Kondo Jumpei, Tanaka-Okamoto Miki, Tomioka Azusa, Semba Manami, Komazawa-Sakon Sachiko, Kamada Yoshihiro, Kaji Hiroyuki, Miyamoto Yasuhide, Inoue Masahiro, Bessho Kazuhiko, Miyoshi Yoko, Ozono Keiichi, Nakano Hiroyasu, Miyoshi Eiji	4. 巻 41
2. 論文標題 Lewis glycosphingolipids as critical determinants of TRAIL sensitivity in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4385 ~ 4396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-022-02434-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Semba Manami, Takamatsu Shinji, Komazawa-Sakon Sachiko, Miyoshi Eiji, Nishiyama Chiharu, Nakano Hiroyasu, Moriwaki Kenta	4. 巻 23
2. 論文標題 Proscillaridin A Sensitizes Human Colon Cancer Cells to TRAIL-Induced Cell Death	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6973 ~ 6973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23136973	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Konishi Yoshinobu, Terai Kenta	4. 巻 43
2. 論文標題 In vivo imaging of inflammatory response in cancer research	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s41232-023-00261-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakano Hiroyasu, Murai Shin, Moriwaki Kenta	4. 巻 479
2. 論文標題 Regulation of the release of damage-associated molecular patterns from necroptotic cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical Journal	6. 最初と最後の頁 677 ~ 685
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20210604	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriwaki Kenta, Park Christa, Koyama Kazuha, Balaji Sakthi, Kita Kohei, Yagi Ryoko, Komazawa-Sakon Sachiko, Semba Manami, Asuka Tatsuya, Nakano Hiroyasu, Kamada Yoshihiro, Miyoshi Eiji, Chan Francis K. M.	4. 巻 15
2. 論文標題 The scaffold-dependent function of RIPK1 in dendritic cells promotes injury-induced colitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 84 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-021-00446-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murai Shin, Shirasaki Yoshitaka, Nakano Hiroyasu	4. 巻 2274
2. 論文標題 Time-Lapse Imaging of Necroptosis and DAMP Release at Single-Cell Resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 353 ~ 363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_29	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawakami Kouki, Yanagawa Masataka, Hiratsuka Suzune, Yoshida Misaki, Ono Yuki, Hiroshima Michio, Ueda Masahiro, Aoki Junken, Sako Yasushi, Inoue Asuka	4. 巻 13
2. 論文標題 Heterotrimeric Gq proteins act as a switch for GRK5/6 selectivity underlying -arrestin transducer bias	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-28056-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsuhiro Abe, Asami Makino, Motohide Murate, Francoise Hullin-Matsuda, Masataka Yanagawa, Yasushi Sako, Toshihide Kobayashi	4. 巻 37
2. 論文標題 PMP2/FABP8 induces PI(4,5)P2-dependent transbilayer reorganization of sphingomyelin in the plasma membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109935-109935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.109935	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Keiichi Kojima, Yuki Matsutani, Masataka Yanagawa, Yasushi Imamoto, Yumiko Yamano, Akimori Wada, Yoshinori Shichida, Takahiro Yamashita	4. 巻 7
2. 論文標題 Evolutionary adaptation of visual pigments in geckos for their photic environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 109935
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.abj1316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yutaro Kuwashima, Masataka Yanagawa, Mitsuhiro Abe, Michio Hiroshima, Masahiro Ueda, Makoto Arita, Yasushi Sako	4. 巻 22
2. 論文標題 Comparative Analysis of Single-Molecule Dynamics of TRPV1 and TRPV4 Channels in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22168473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Momoko Akiyama, Ryosuke Ueki, Masataka Yanagawa, Mitsuhiro Abe, Michio Hiroshima, Yasushi Sako, Shinsuke Sando	4. 巻 60
2. 論文標題 DNA Based Synthetic Growth Factor Surrogates with Fine Tuned Agonism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 22745-22752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202105314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masataka Yanagawa, Yasushi Sako	4. 巻 2274
2. 論文標題 Workflows of the Single-Molecule Imaging Analysis in Living Cells: Tutorial Guidance to the Measurement of the Drug Effects on a GPCR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 391~441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1258-3_32	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichise Hiroshi, Tsukamoto Shoko, Hirashima Tsuyoshi, Konishi Yoshinobu, Oki Choji, Tsukiji Shinya, Iwano Satoshi, Miyawaki Atsushi, Sumiyama Kenta, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional visualization of NK cell-mediated killing of metastatic single tumor cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e76269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.76269	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Taisei, Konishi Yoshinobu, Ichise Hiroshi, Tsukiji Shinya, Matsuda Michiyuki, Terai Kenta	4. 巻 46
2. 論文標題 A Dual Promoter System to Monitor IFN- Signaling in vivo at Single-cell Resolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Structure and Function	6. 最初と最後の頁 103 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.21052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lin Shuhao, Hirayama Daiki, Maryu Gembu, Matsuda Kimiya, Hino Naoya, Deguchi Eriko, Aoki Kazuhiro, Iwamoto Ryo, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Redundant roles of EGFR ligands in the ERK activation waves during collective cell migration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202101206	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 He Jiazhou, Yamamoto Masamichi, Sumiyama Kenta, Konagaya Yumi, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki, Sato Shinya	4. 巻 35
2. 論文標題 Two photon AMPK and ATP imaging reveals the bias between rods and cones in glycolysis utility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e21880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101121R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Konishi Yoshinobu, Ichise Hiroshi, Watabe Tetsuya, Oki Choji, Tsukiji Shinya, Hamazaki Yoko, Murakawa Yasuhiro, Takaori-Kondo Akifumi, Terai Kenta, Matsuda Michiyuki	4. 巻 81
2. 論文標題 Intravital Imaging Identifies the VEGF?TXA2 Axis as a Critical Promoter of PGE2 Secretion from Tumor Cells and Immune Evasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 4124 ~ 4132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-20-4245	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 柳川 正隆, 佐甲 靖志	4. 巻 61
2. 論文標題 Gタンパク質共役型受容体の生細胞1分子計測を薬効薬理評価に応用する	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生物物理	6. 最初と最後の頁 366-369
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2142/biophys.61.366	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 柳川 正隆, 佐甲 靖志	4. 巻 53
2. 論文標題 GPCRの細胞内1分子イメージング	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 12-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 森脇 健太、中野 裕康	4. 巻 53
2. 論文標題 ネクロプトーシスの制御機構と病理的意義	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 667-670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishina Takashi、他21名、Nakano Hiroyasu	4. 巻 12
2. 論文標題 Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22450-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakabayashi Osamu, Takahashi Hirotaka, Moriwaki Kenta, Komazawa-Sakon Sachiko, Ohtake Fumiaki, Murai Shin, Tsuchiya Yuichi, Koyahara Yuki, Saeki Yasushi, Yoshida Yukiko, Yamazaki Soh, Tokunaga Fuminori, Sawasaki Tatsuya, Nakano Hiroyasu	4. 巻 4
2. 論文標題 MIND bomb 2 prevents RIPK1 kinase activity-dependent and -independent apoptosis through ubiquitylation of cFLIPL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01603-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katagiri Takaharu, Kameda Hideto, Nakano Hiroyasu, Yamazaki Soh	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunological Medicine	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/25785826.2021.1872838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Soichi, Miyoshi Shion, Nishio Junko, Mizutani Satoshi, Yamada Zento, Kusunoki Natsuko, Sato Hiroshi, Kuboi Yoshikazu, Hoshino-Negishi Kana, Ishii Naoto, Imai Toshio, Mikami Tetuo, Nakano Hiroyasu, Kawai Shinichi, Nanki Toshihiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Effects of CX3CL1 inhibition on murine bleomycin-induced interstitial pneumonia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Inflammation	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/2058739220959903	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Torii Satoru, Yamaguchi Hirofumi, Nakanishi Akira, Arakawa Satoko, Honda Shinya, Moriwaki Kenta, Nakano Hiroyasu, Shimizu Shigeomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of a phosphorylation site on Ulk1 required for genotoxic stress-induced alternative autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15577-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyake Sanae, Murai Shin, Kakuta Soichiro, Uchiyama Yasuo, Nakano Hiroyasu	4. 巻 527
2. 論文標題 Identification of the hallmarks of necroptosis and ferroptosis by transmission electron microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 839 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.04.127	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kojima Yuko, Nishina Takashi, Nakano Hiroyasu, Okumura Ko, Takeda Kazuyoshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Inhibition of Importin 1 Augments the Anticancer Effect of Agonistic Anti-Death Receptor 5 Antibody in TRAIL-resistant Tumor Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1123 ~ 1133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-19-0597	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hildebrand Joanne, 64名、Nakano Hiroyasu, Ferguson Polly J., Murphy James M., Alexander Warren S., Silke John	4. 巻 11
2. 論文標題 A missense mutation in the MLKL brace region promotes lethal neonatal inflammation and hematopoietic dysfunction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16819-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 中野 裕康、駒澤 幸子、進藤 綾大	4. 巻 74
2. 論文標題 胎児期の小腸上皮細胞のネクロプトーシスは3型リンパ球を過剰に活性化し、重篤な回腸炎を誘導する	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 566-572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計24件(うち招待講演 7件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 関崇生、三好嗣臣、森脇健太、山崎創、中野裕康
2. 発表標題 Cell death-deficient mice develop T cell exhaustion
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soh Yamazaki, Naohiro Inohara, Yousuke Tsuneoka, Hideo Yagita, Takaharu Katagiri, Takashi Nishina, Tetuo Mikami, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 IkappaBzeta regulates IL-17-triggered gene program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents autoimmune disorders
3. 学会等名 第51回 日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋勇一、関崇生、田中稔、中野裕康
2. 発表標題 FGF18は肝星細胞を活性化して肝線維化を誘導する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 仁科隆史、三上哲夫、中野裕康
2. 発表標題 線維芽細胞が産生するInterleukin-11は、腸管恒常性ならびに大腸がん形成を制御する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中野裕康
2. 発表標題 新規ネクローシス様細胞死と疾患
3. 学会等名 第86回日本皮膚科学会 東部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関崇生、三好嗣臣、森脇健太、山崎創、米原伸、中野裕康
2. 発表標題 Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia
3. 学会等名 第30回日本 Cell Death 学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村井晋、隅山健太、森脇健太、高倉加奈子、山口良文、駒澤幸子、寺井健太、松田道行、中野裕康
2. 発表標題 SMART Tg マウスを用いた急性腎障害によるネクロプトーシスの in vivo FRET 解析
3. 学会等名 第30回日本 Cell Death 学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuta Yamada, Masayuki Yamashita, Jinjing Yang, Shin Murai, Kenta Sumiyama, Hiroyasu Nakano, Atsushi Iwama
2. 発表標題 MLKL mediates age-related attrition of hematopoietic stem cells and ineffective hematopoiesis in myelodysplastic syndrome
3. 学会等名 65th American Society of Hematology of Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Nishina, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 Fibroblasts-produced interleukin-11 confers resistance to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice
3. 学会等名 Cytokines 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soh Yamazaki, Shin Yonehara, Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 Mice lacking death ligand-induced cell death develop Pneumocystis pneumonia
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kenta Moriwaki、Hiroyasu Nakano、Francis Chan
2. 発表標題 The scaffold-dependent function of RIPK1 in dendritic cells promotes injury-induced colitis
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 勇一、小林 謙太、関 崇生、駒澤 幸子、西山 千春、三上 哲夫、今村 亨、田中 稔、中野 裕康
2. 発表標題 肝細胞特異的cFLIP欠損はチオアセトアミド投与による慢性肝障害と肝線維化を亢進させる
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村井 晋、隅山 健太、森脇 健太、高倉 加奈子、山口 良文、駒澤 幸子、寺井 健太、三浦 正幸、松田 道行、中野 裕康
2. 発表標題 SMART Tgマウス由来細胞を用いたネクロプトーシスのライブセルイメージング
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林 謙太、土屋 勇一、関 崇生、駒澤 幸子、西山 千春、三上 哲夫、今村 亨、田中 稔、中野 裕康
2. 発表標題 FGF18はNASH における肝線維化に関与する
3. 学会等名 第29回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Nishina、Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 Interleukin-11-producing fibroblasts promotes the development of colorectal cancer.
3. 学会等名 Cytokines 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takashi Nishina、Deguchi Yutaka、Wakami Takeda、Satoshi Ueha、Yuko Kojima、Mizuho Nakayama、Masanobu Oshima、Hideo Yagita、Tetuo Mikami、Kouji Matsushima、Hiroyasu Nakano
2. 発表標題 Interleukin-11-expressing fibroblasts control a feed-forward loop in the tumor microenvironment.
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 細胞内多色1分子イメージングの自動化による次世代ハイコンテンツ解析への展望
3. 学会等名 第95回 日本薬理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳川 正隆、桑島 佑太郎、阿部 充宏、廣島 通夫、上田 昌宏、有田 誠、佐甲 靖志
2. 発表標題 細胞膜中のTRPV1・TRPV4チャネルの1分子動態の比較解析
3. 学会等名 第59回 日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 膜受容体の細胞内1分子計測を 薬効薬理評価に応用する
3. 学会等名 第13回光塾（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆
2. 発表標題 GPCRの細胞膜中の拡散動態計測を薬効薬理評価に応用する
3. 学会等名 機能物性研究セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳川 正隆, 桑島 佑太郎, 有田 誠, 佐甲 靖志
2. 発表標題 脂質膜ドメイン間の分配に基づく 膜受容体のシグナル伝達制御
3. 学会等名 生理学研究所 研究会 「イオンチャネルと生体膜のダイナミズム： 構造生物学の先にあるもの」（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片桐翔治、進藤綾大、 駒澤幸子、 仁科隆史、山崎創、 亀田秀人、 中野裕康
2. 発表標題 CタイプレクチンReg3 は大腸炎に防御的に働く
3. 学会等名 第48回日本臨床免疫学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中林修、高橋宏隆、村井晋、大竹史明、駒澤幸子、土屋勇一、佐伯泰、吉田雪子、山崎創、徳永文稔、森脇健太、澤崎達也、中野裕康
2. 発表標題 cFLIPのユビキチン化による新たなアポトーシス抑制機構の解析
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片桐翔治、進藤綾大、駒澤幸子、竹田若水、仁科隆史、山崎創、亀田秀人、中野裕康
2. 発表標題 CタイプレクチンReg3タンパク質による大腸炎の制御
3. 学会等名 第41回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 清水重臣 企画（中野裕康 分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医学のあゆみ	5. 総ページ数 563
3. 書名 細胞死のすべて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://tohobiochemi.jp https://www.toho-u.ac.jp/press/2022_index/20230119-1263.html https://www.eurekalert.org/news-releases/976781 https://www.toho-u.ac.jp/press/2022_index/20221207-1260.html https://www.eurekalert.org/news-releases/973970 https://www.nikkei.com/article/DGXZRS638788_U2A820C2000000/ https://www.toho-u.ac.jp/press/2022_index/20220824-1226.html https://research-er.jp/articles/view/113755 https://www.eurekalert.org/language/japanese/home https://www.usaco.co.jp/article/index.html https://www.facebook.com/USAC0corporation https://www.toho-u.ac.jp/press/2021_index/20210416-1127.html https://www.eurekalert.org/news-releases/533095 https://cancercommunity.nature.com/posts/interleukin-11-expressing-fibroblasts-have-a-unique-gene-signature-correlated-with-poor-prognosis-of-colorectal-cancer?channel_id=465-behind-the-paper https://eurekalert.org/pub_releases/2021-04/tu-ans042221.php https://www.toho-u.ac.jp/press/2020_index/20210120-1114.html https://www.eurekalert.org/pub_releases/2021-01/tu-tus012721.php

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺井 健太 (Terai Kenta) (20616073)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	
研究分担者	柳川 正隆 (Yanagawa Masataka) (70609792)	国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員 (82401)	
研究分担者	関 崇生 (Sekai Takao) (00832205)	東邦大学・医学部・助教 (32661)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Harvard University	Michigan University	University of Washington	
ドイツ	Kiel University	University Hospital Aachen	University Hospital Frankfurt	
ベルギー	University of Ghent			
オーストラリア	Walter Eliza Hall Institute	Monash University		
スイス	University Children's Hospital Zurich			
イタリア	University of Pavia			