

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：84409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650078

研究課題名(和文)独自のin vivoイメージングを利用したマウスのプログラム細胞死の網羅的解析

研究課題名(英文)Study of programmed cell death in mice using in vivo imaging method

研究代表者

辻本 賀英(Tsujimoto, Yoshihide)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立成人病センター(研究所)・その他部局等・研究所長

研究者番号：70132735

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): プログラム細胞死は、多細胞生物において形態形成や組織の恒常性維持などに関わっておりアポトーシスに加え、我々が提唱しているように非アポトーシス型細胞死(NAPD)機構も重要な役割を演じている。我々は蛍光色素PIを利用したNAPDのin vivoイメージング法を開発し、それをを用いこれまで網羅的・定量的解析が可能でなかったマウスの個体発生期でのNAPD機構の役割について解析を行った。アポトーシス欠損マウスにおいてもPIシグナルが消失しない細胞死系を見出し、特に骨形成領域で起きるプログラム細胞死は、ATG9aに依存した非アポトーシス型プログラム細胞死機構によることを明らかにした。

研究成果の概要(英文): Programmed cell death (PCD) plays a crucial role in developmental morphogenesis and maintenance of tissue homeostasis in metazoans. PCD is mediated by not only apoptosis but also, as we have been proposing, non-apoptotic programmed death (NAPD) mechanism. We have developed an in vivo imaging method using propidium iodide for NAPD in mice. Using this method, we have performed quantitative and extensive study of developmental PCD in mice and identified PI-stained PCD, which was not affected by apoptosis-deficiency, indicating the occurrence of NAPD in vivo. One of them is PCD occurring during bone formation. We found that this NAPD is mediated by a process dependent on ATG9 which is involved in autophagy.

研究分野: 分子細胞生物学

キーワード: programmed cell death apoptosis necrotic cell death autophagy propidium iodide

## 1. 研究開始当初の背景

細胞死研究はアポトーシス研究を中心に進展し、我々のグループも大きく貢献してきたが、そのフレームワークの大筋は解明され現在成熟期にある。ただ、以下に述べるように、哺乳動物の個体発生期の形態形成、成体組織での新旧細胞の交代や有害細胞の除去などに関わる生理的な細胞死(プログラム細胞死)におけるアポトーシスの重要性は過大評価されており、「プログラム細胞死の大半はアポトーシス機構に依る」という考え方がドグマ化しているのが現状である。しかし、このドグマには確固たる証拠もなく、一方で、アポトーシス機構欠損マウスが正常発生する事実や *C. elegans* において生物学的意義を示すプログラム細胞死は非アポトーシス機構で担われていることなどを考慮すると、プログラム細胞死にアポトーシス以外の機構も重要な役割を演じていると考えられる。そのような観点から、我々は上記のドグマに挑戦すべく研究を続け、実際にマウスの複数のプログラム細胞死系で(小腸絨毛上皮細胞のプログラム細胞死や脚芽の骨形成時のプログラム細胞死などに)、非アポトーシス型細胞死機構が主要な役割を演じていることを見出した。この事は、上記のドグマに重大な欠陥があることを示しており、同時に研究のパラダイムシフトの必要性を喚起している。

また細胞死分野で長年成功していなかった非アポトーシス型細胞死の *in vivo* イメージングに、我々は最近成功した。このような経緯から、哺乳動物におけるプログラム細胞死の真の理解のために、今まで特に網羅的・経時的解析が不可能であった非アポトーシス型細胞死に焦点を合わせ、新たな発展につながるプログラム細胞死の解析を行なうことを提案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では我々が開発した非アポトーシス型細胞死の *in vivo* イメージング法と細胞死関連の幾つかのノックアウトマウスを用い、これまで網羅的・定量的解析が可能でなかった非アポトーシ

ス型細胞死機構について解析を行い、特にマウスの個体発生中での非アポトーシス型細胞死の時空間的マップを作製し、その細胞死の役割について解析を行い、プログラム細胞死の真の理解に貢献しようというものである。

## 3. 研究の方法

非アポトーシス型細胞死(ネクローシスを含む)を起こした細胞を *in vivo* イメージングするために蛍光色素 propidium iodide (PI)を、一方アポトーシス細胞を *in vivo* イメージングするために、汎用されているアクリジンオレンジ(AO)を用いる。PIは、マウスの胎盤を通過しないため、色素はマウス胚の血管にマイクロインジェクション法により投与する。種々のステージにある妊娠マウスのマウス胚にその静脈よりPIとAOを投与する。一定時間(約30分)の後、マウス胚を摘出し凍結の後、切片を作製する。これら切片を蛍光顕微鏡下に観察し、PIとAOの蛍光シグナルを取得することにより、マウス胚における細胞死の時空間的マップを作製する。また、そこに関わる細胞死機構については、以下のノックアウトマウスを利用して情報を得る。

- (1) Atg9a ノックアウトマウス(Atg9は、オートファジーに関与する因子の一つである)
- (2) Bax/Bak ダブルノックアウトマウスおよび Caspase-9 ノックアウトマウス(Bax/Bakと caspase-9はともに、アポトーシスに関与する重要な因子であり、これらを欠損するとアポトーシスは起きない)

## 4. 研究成果

PIとAOを用い、野生型マウスの個体発生期(E9.5~E16.5)のプログラム細胞死の時空間的観察を行った。その結果、公認な時空間領域にAOおよびPIシグナルが観察されることが分かった。特に、PI陽性死細胞の発生機序つまり関与する細胞死機構を知るために、まずアポトーシス因子欠損マウス(Bax/BakダブルKOマウスおよびCaspase-9 KOマウス)で同様の観察を行った

結果、アポトーシス因子欠損により消失する PI 陽性死細胞と消失しない PI 陽性死細胞が存在することが判明した。前者はアポトーシスによる二次的ネクローシスに相当するものと考えられるが、後者は、非アポトーシス型プログラム細胞死機構が intrinsic に関与する系と考えられた。特に骨形成領域に観察されたPI陽性を示すプログラム細胞死は電子顕微鏡観察においても、非アポトーシス型細胞死の形態を示していることを確認した(PI 陽性細胞そのものの電子顕微鏡像を取得する技術を確立した)。この細胞死に関する因子を同定するために、細胞死関連の複数のノックアウトマウスを検討したが、オートファジーに関与する ATG9a 遺伝子を欠損したマウスでは、in vivo イメージングでこのPI陽性のプログラム細胞死が消失していることが判明した。このことから、骨形成領域で起きるプログラム細胞死は、ATG9a に依存した新規の非アポトーシス型プログラム細胞死機構によると結論した。この骨形成における非アポトーシス型プログラム細胞死に関する成果は、現在、論文発表に向けて準備中である。

## 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5件)

1. Matsuoka, Y. and Tsujimoto, Y. A role of RIP1 in physiological enterocyte turnover in mouse small intestine via non-apoptotic death. *Genes Cells*, 20: 11-28, 2015.  
DOI: 10.1111/gtc.12193.
2. Saito, C., Shinzawa, K. and Tsujimoto, Y. Synchronized necrotic death of attached hepatocytes mediated via gap junction. *Sci. Rep.* 4: 5169-5176, 2014.  
DOI: 10.1038/srep05169
3. Moriishi, T., Kawai, Y., Komori, H., Rokutanda, S., Eguchi, E., Tsujimoto, Y.,

Asahina, I. and Komori, T. Bcl2 Deficiency Activates FoxO through Akt Inactivation and Accelerates Osteoblast Differentiation. *PLOS One*. 9: e8629.

DOI:10.1371/journal.pone.0086629

4. Mizushima, T., Arakawa, S., Sanada, Y., Yoshino, I., Miyazaki, D., Urushima, H., Tsujimoto, Y., Ito, T. and Shimizu, S. Inhibition of epithelial cell death by Bcl-2 improved chronic colitis in IL10 KO mice. *Am. J. Pathol.* 183: 1936-1944, 2013. DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.08.012

[学会発表](計8件)

1. 斎藤千恵子、新沢康英、辻本賀英  
Acetaminophen induces synchronized necrotic death of attaching hepatocytes via gap junction  
第20回肝細胞研究会(国際会議)2013年9月23日大阪
2. C. Saito, K. Shinzawa, Y. Tsujimoto  
Acetaminophen induces synchronized necrotic death of attaching hepatocytes via gap junction.  
Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases  
2013年11月4日  
Washington DC (USA)
3. 伊藤圭介、恵口豊、辻本賀英  
神経細胞における新規細胞死機構の解析  
日本分子生物学会 2013年12月11日 神戸
4. 伊藤奎亮、恵口豊、赤井周司、辻本賀英  
MPP+に誘導される新規ネクローシス型神経細胞死の誘導機序について  
日本分子生物学会年会 2014年11月26日  
横浜
5. 渋谷俊治、辻本賀英  
**The Study of Mitochondrial Permeability Transition: identification of potential Cyclophilin D-binding partners.**  
日本分子生物学会年会 2014年11月26日  
横浜

6. 松岡洋祐、辻本賀英

マウス小腸絨毛先端部における生理的細胞死  
の分子機構の解明

日本分子生物学会年会 2014 年11月26日  
横浜

7. 今川佑介、辻本賀英

マウス胚発生において見いだした新規非アポ  
トーシス型プログラム細胞死

日本 Cell Death 学会 2014 年7月18日 東京  
医科歯科大学

8. 今川佑介、辻本賀英

マウス胚発生において見いだした新規非アポ  
トーシス型プログラム細胞死

細胞生物学会 2014 年6月11日 奈良県新公  
会堂

〔図書〕(計1件)

辻本賀英

細胞死研究の今 疾患との関わり、創薬に向  
けてのアプローチ

遺伝医学 MOOK 別冊 2013 年9月

〔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

[http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/  
department/saibou/](http://www.mc.pref.osaka.jp/laboratory/department/saibou/)

6. 研究組織

(1)研究代表者

辻本 賀英 (TSUJIMOTO Yoshihide)

大阪大学大学院医学系研究科・教授(H25)

大阪大学大学院医学系研究科・招聘教授

(H26)

大阪府立成人病センター研究所・所長

(H26)

研究者番号：70132735

(2)研究協力者

今川 佑介 (IMAGAWA Yusuke)

奈良先端科学技術大学院バイオサイエン  
ス研究科・特別研究員

大阪府立成人病センター研究所・研究員

研究者番号：20614770

(3)研究協力者

松岡 洋祐 (MATSUOKA Yosuke)

大阪大学大学院医学系研究科・特別研究員

大阪府立成人病センター研究所・非常勤研  
究員

研究者番号：60263258