

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840035

研究課題名(和文)細胞内局在特異的なIKK を介したネクローシスの制御と炎症と発がんの連関

研究課題名(英文)Nuclear IKKbeta regulates necroptosis and hepatocellular carcinoma

研究代表者

土谷 佳弘(Tsuchiya, Yoshihiro)

広島大学・医歯薬学保健学研究院(医)・助教

研究者番号：90611301

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、核内IKK による細胞死の制御機構と、肝炎と肝発がんへの関与を解明する。Cre発現マウス(Alb-cre)と交配して肝細胞特異的に内在性IKK 遺伝子を欠失させたマウス(Tg-NLS-IKK KN IKK hep)では、出生直後から肝小葉における広汎なネクローシスが進行し、線維組織の進展により重篤な肝硬変の病態を呈した。さらにこのマウスに対してDEN投与による肝発がん誘発モデル実験を行った。肝細胞特異的IKK 遺伝子欠損マウス(IKK hep)では高頻度に肝細胞がんが発生するのに対して、Tg-NLS-IKK KN IKK hepマウスでは顕著に減少していた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to reveal roles of the cytosolic and nuclear IKK in decision of cell life and death in vivo. Tg-NLS-IKK KN IKK hep mice presented with severe liver injury and fibrosis progression. Administration of diethylnitrosamine (DEN) to Tg-NLS-IKK KN IKK hep mice shown lower a level of hepatocellular carcinoma than that observed in IKK hep mice.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝障害 肝がん IKK

1. 研究開始当初の背景

NF- κ B は細胞の生と死を制御する転写因子であり、炎症や発がんで重要な役割を担う。腫瘍壊死因子(TNF α)は細胞質の I κ B キナーゼ β (IKK β)を活性化して NF- κ B 阻害タンパク質 I κ B をリン酸化する。リン酸化された I κ B は β -TrCP によるユビキチン化をうけて分解され、NF- κ B が活性化される(古典経路)(図 1)。TNF α はカスパーゼを介したアポトーシスにより細胞死を誘導する。またカスパーゼが抑制されているときには RIP-1 と RIP-3 のリン酸化が誘導され、MLKL を介した「プログラムされたネクローシス」(ネクロプトーシス)による細胞死を誘導する。

我々は紫外線(UV)照射などのストレスに応答した NF- κ B の活性化には、核内 IKK β が関与することを世界に先駆けて解明した(Tsuchiya. Mol.Cell,39,570(2010))。UV による NF- κ B 活性化(ストレス経路)は二つの特徴を有する。第一は核内 IKK β がアダプターとして機能することである。UV に応答して I κ B は核内に移行して IKK β に会合し、さらに IKK β に会合した β -TrCP によるユビキチン化を受けて分解される。第二の特徴は NF- κ B の活性化が細胞死を促進することである。この制御で重要な役割を担うのが細胞死抑制因子 IAPs(cIAP1/2 など)である。IAPs はカスパーゼ阻害活性によりアポトーシスを抑制し、さらにユビキチンリガーゼ活性を介して RIP-1 のリン酸化を阻害してネクローシスを抑制することにより細胞死を防ぐ。TNF α により活性化された NF- κ B は細胞死抑制因子 IAPs の遺伝子発現を誘導して、細胞死の誘導を防止する。ところが UV により活性化された NF- κ B にはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が会合し、IAPs 遺伝子のプロモータ領域に特異的に結合して遺伝子発現を抑制する。これらのことから、細胞質と核内の IKK β を介した NF- κ B の制御により、細胞の生と死の運命が決定されると考えられた。また、細胞死は炎症や発がんに密接に関連する。細胞質と核内の IKK β を介した細胞死の制御は、炎症と発がんのメカニズムを解明する上でも重要な課題であると考えられる。

2. 研究の目的

NF- κ B は炎症や細胞の生と死を制御する転写因子である。TNF α は細胞質の IKK β を介して NF- κ B を活性化するが、UV 照射や酸化ストレスによる NF- κ B の活性化には核内 IKK β が関与することを我々は明らかにしてきた。本研究では、核内 IKK β による細胞死の制御機構と、肝炎と肝発がんへの関与を解明する。

3. 研究の方法

(1) IKK β 遺伝子改変マウスを用いた炎症と発がんのモデル実験

これまでに NF- κ B による細胞死の制御が肝障害に関連することや(Cell, 120, 649, 2005)、肝発がんに関連すること明らかにされている(Cell, 121,977, 2005)。本研究では肝細胞特異的 IKK β 遺伝子改変マウスについて、肝臓における炎症と発がんの連関を解析する。またジエチルニトロサミン(DEN)をマウス腹腔に投与する肝がんを引き起こすことができる。IKK β 遺伝子改変マウスについて DEN による発がんのモデル実験を行い、肝臓での発がんにおける古典経路とストレス経路の役割を明らかにする。

(2) 培養細胞系を用いたネクローシスの解析

Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep} マウスから初代肝細胞を調製し、TNF α や酸化ストレスの負荷による細胞死を解析する。

カスパーゼ阻害剤(zVAD)や RIP-1 阻害剤(ネクロスタチン 1)の効果。RIP1、RIP3、MLKL、カスパーゼなどの細胞死関連タンパク質解析。

DNA マイクロアレイ解析による遺伝子発現の網羅解析によりネクロプトーシスの誘導機構を解明する。

4. 研究成果

(1) キナーゼ活性非依存的な核内 IKK β の炎症と発がんにおける役割を解明するために、核移行シグナル(NLS)を付加したキナーゼ活性化欠損型遺伝子(NLS-IKK β KN)を *IKK β ^{f/f}* マウスの受精卵に導入してトランスジェニックマウス(*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{f/f}*)を作成した。

このマウスを Cre 発現マウス (*Alb-cre*) と交配して肝細胞特異的に内在性 IKK β 遺伝子を欠失させたマウス (*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}*) を作成したところ、出生直後から肝小葉における広汎なネクローシスと細胆管反応が進行し、持続的な炎症細胞の浸潤に伴った線維組織の進展により重篤な肝硬変の病態を呈した (図 1)。

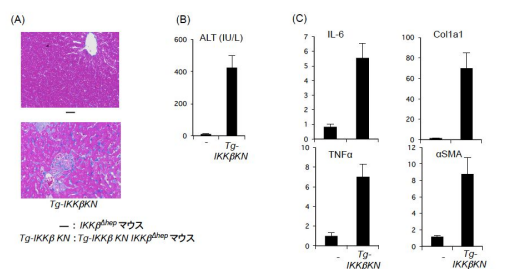


図 1 肝線維化と炎症 (A) 肝線維化 (Azan染色) (B) 肝細胞死(ALT) (C) 遺伝子発現 (RT-PCR)

さらにこのマウスに対して DEN 投与による肝発がん誘発モデル実験を行った。驚くべきことに肝細胞特異的 IKK β 遺伝子欠損マウス (*IKK β ^{hep}*) では高頻度に肝細胞がんが発生するのに対して、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスでは顕著に減少していた (図 2)。

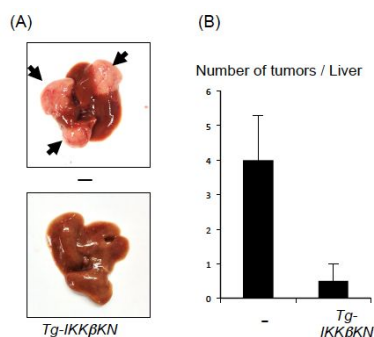


図 2 DENによる肝がん発症

P-H2AX 抗体を用いた組織染色法より、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスの肝臓では DEN 投与により誘導される DNA 損傷が軽減されていることが明らかとなった。DNA マイクロアレイ解析より、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスの肝臓において薬物代謝酵素である Cytochrome P450 遺伝子発現が低下していることが判明した。これまでに *Cyp2E1* 欠損マウスに DEN を投与しても肝発がんが抑制されることが報告されている。このことから Cytochrome P450 の発現低下に伴い、変異原性による肝発がんが抑制されたと考えられた。これまでに HNF や CAR などの核内受容体

によって Cytochrome P450 の遺伝子発現が制御されていることが報告されている。今後、IKK β -NF- κ B シグナルによる核内受容体の活性化制御機構を解析し、Cytochrome P450 の発現制御機構を解明したいと考えている。

(2) *Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスから肝細胞の初代培養を試みたが、肝細胞死の誘導より肝細胞を培養することができなかった。そこで、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{f/f}* マウスから肝細胞を単離・初代培養し、Adenovirus を用いて Cre を発現させ、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{-/-}* 肝細胞を作成した。この細胞は TNF α 刺激により野生型と比べて細胞死が亢進し、RIP-1 阻害剤であるネクロスタチン 1 を投与すると細胞死の誘導が抑制された。これに対してカスパーゼ阻害剤では細胞死が抑制されなかった。このことから核内 IKK β は肝細胞のネクロプトーシスを誘導することが示唆された。

DNA マイクロアレイ解析より *Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{-/-}* 肝細胞では MLKL の mRNA やタンパク質の発現が増加していることが判明した。このことから核内 IKK β -NF- κ B シグナルを介した MLKL の発現増加が肝細胞のネクロプトーシスの誘導に関連していることが示唆された。今後、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスを、TNF α 受容体 1 欠損マウスや RIP-3 欠損マウスと交配し、核内 IKK β -NF- κ B シグナルを介した MLKL の発現変化を解析する。

我々が開発した *Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスは、出生直後からの肝臓のネクローシスと肝線維化の進展にもかかわらず肝細胞癌発症が抑制されるというユニークな表現型を示すマウスである。これまでにメチオニン・コリン欠乏食 (MCD)、胆管結紮 (BDL)、四塩化炭素 (CCl₄) 投与、*Mdr2* 遺伝子欠損マウス (*Mdr2^{-/-}*) などの肝線維化のモデル実験系が開発されてきた。いずれも数ヶ月を経て線維化が進行して肝細胞がんが亢進されるモデル系である。*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{hep}* マウスは、これらの従来のモデル系とは線維化の進行過程や、肝細胞がん発症の抑制のいう点で異

なっている。今後、IKK β の新たな分子機能の解明に取り組み、この解析で明らかにされる研究成果は、炎症と発がんの分子機構にも重要な知見をもたらすことが期待される。

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6件)

1. Yasuka Matsunaga, Yusuke Nakatsu, Toshiaki Fukushima, Hirofumi Okubo, Misaki Iwashita, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Takeshi Yamamotoya, Akifumi Kushiya, Shin-ichiro Takahashi, Yoshihiro Tsuchiya, Hideaki Kamata, Fuminori Tokunaga, Kazuhiro Iwai, and Tomoichiro Asano. LUBAC formation is impaired in the livers of mice with MCD-dependent nonalcoholic steatohepatitis. *Mediators of Inflammation*, 2015, 125380, 2015. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/125380> (査読有)
2. Ryuhei Kanaoka, Akifumi Kushiya, Yasuyuki Seno, Yusuke Nakatsu, Yasuka Matsunaga, Toshiaki Fukushima, Yoshihiro Tsuchiya, Hideyuki Sakoda, Midori Fujishiro, Takeshi Yamamotoya, Hideaki Kamata, Akio Matsubara, Tomoichiro Asano. Pin1 inhibitor juglone exerts anti-oncogenic effects on LNCaP and DU145 cells despite the patterns of gene regulation by Pin1 differing between these cell lines. *PLOS ONE*, 10(6), e0127467, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0127467. (査読有)
3. Takanori Shinjo, Yusuke Nakatsu, Misaki Iwashita, Tomomi Sano, Hideyuki Sakoda, Hisamitsu Ishihara, Akifumi Kushiya, Midori Fujishiro, Toshiaki Fukushima, Yoshihiro Tsuchiya, Hideaki Kamata, Fusanori Nishimura, and Tomoichiro Asano. DPP-IV inhibitor anagliptin exerts anti-inflammatory effects on macrophages, adipocytes, and mouse livers by suppressing NF- κ B activation. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, 309(3), E214-23, 2015. doi:10.1152/ajpendo.00553.2014. (査読有)

4. Jun Zhang, Yusuke Nakatsu, Takanori Shinjo, Ying Guo, Hideyuki Sakoda, Takeshi Yamamotoya, Yuichiro Otani, Hirofumi Okubo, Akifumi Kushiya, Midori Fujishiro, Toshiaki Fukushima, Yoshihiro Tsuchiya, Hideaki Kamata, Misaki Iwashita, Fusanori Nishimura, Hideki Katagiri, Shin-ichiro Takahashi, Hiroki Kurihara, Takafumi Uchida, Tomoichiro Asano. Par14 protein associates with insulin receptor substrate 1 (IRS-1), thereby enhancing insulin-induced IRS-1 phosphorylation and metabolic actions. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(28), 20692-701, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.485730. (査読有)
5. Yuichiro Otani, Yusuke Nakatsu, Hideyuki Sakoda, Toshiaki Fukushima, Midori Fujishiro, Akifumi Kushiya, Hirofumi Okubo, Yoshihiro Tsuchiya, Haruya Ohno, Shin-ichiro Takahashi, Fusanori Nishimura, Hideaki Kamata, Hideki Katagiri, Tomoichiro Asano. Integrator complex plays an essential role in adipose differentiation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 434(2), 197-202, 2013. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.03.029 (査読有)
6. 土谷 佳弘, 鎌田 英明. TNF- α によるリン酸化シグナルと酸化ストレスのクロストークと細胞死. *医学のあゆみ*, 医歯薬出版会社, 806-810, 2013. (査読無)

[学会発表](計5件)

1. 土谷佳弘, 樋口 徹, 松永 泰花, 高橋 江奈, 中津 祐介, 浅野 知一郎, 鎌田 英明, 「Cytoplasmic RelA/TAD regulates IKK activation」BMB2015, 神戸, 2015.12.2
2. 土谷佳弘, 金本麻裕, 浅野知一郎, 鎌田英明「転写活性非依存性のRelAを介したIKK活性制御機構」第37回日本分子生物学会年会, 横浜, 2014.11.25
3. 土谷佳弘, 金本麻裕, 浅野知一郎, 鎌田英明, 「RelAによる遺伝子発現非依存のIKK活性制御機構」第87回日本生化学会大会, 京都, 2014.9.11
4. 土谷佳弘, 浅野知一郎, 鎌田英明, 「RelA associates Hsp70 and suppresses IKK β activity in a transcription-independent manner」第36回日本分子生物学会, 神戸,

2013.12.5.

5. 土谷佳弘, 金本麻裕, 浅野知一郎, 菅野雅元, 鎌田英明, 「ストレス応答による核内 IKK を介した NF- B 活性化と細胞死」第 86 回日本生化学会大会, 横浜, 2013.9.13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 佳弘 (Tsuchiya Yoshihiro)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院(医)

・助教

研究者番号 : 90611301