



DYING CODE ON LINE NEWS LETTER

細胞死を起点とする
生体制御ネットワークの解明

ダイイングコード・オンライン ニュースレター ● 領域事務局: 東京薬科大学 生命科学部 免疫制御学研究室

CONTENTS

① 領域代表者からの挨拶

第3号ニュースレター発刊に寄せて

東京薬科大学・生命科学部 田中正人

② 研究の紹介

計画班・公募班 研究発表

③ 注目論文

Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction

九州大学薬学研究院薬効安全性学分野 仲矢道雄

④ 若手研究者の海外学会発表記

国際学会参加記

Keystone symposiaに参加して

東邦大学医学部生化学講座 博士研究員 進藤綾大

Transducers 2017

東京大学大学院理学系研究科 生物科学専攻 田中優美子

2017 Keystone Symposia Conference J7: Inflammation-Driven Cancer: Mechanismsto Therapy

東邦大学医学部医学科生化学 助教 仁科隆史

⑤ アウトリサーチ活動

- ・研究展示
- ・公開講座「細胞死からの生命探求」
- ・JSPS Science Dialogue
「線虫を用いた神経軸索再生の研究の紹介」
- ・区民公開講座

⑥ 細胞死研究の歴史

細胞死研究の潮流 「オートファジーと細胞死」

東京医科歯科大学・難治疾患研究所 清水重臣

⑦ 支援事業の紹介

モノクローナル抗体の利用法

東京薬科大学・生命科学部 田中正人

細胞死制御化合物

理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室
関関孝介・王 秀玲(袖岡班)

ケミカルスクリーニングの構築

東京医科歯科大学・難治疾患研究所 清水重臣

⑧ 今後の予定

酸素生物学・ダイイングコード
合同若手シンポジウムの日程など

領域代表挨拶

第3号ニュースレター発刊に寄せて

東京薬科大学・生命科学部 田中 正人 1

班員紹介

計画班 A 01	2
公募班 A 01	7
計画班 A 02	16
公募班 A 02	20

注目論文

Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction 九州大学・薬学研究院薬効安全性学分野 仲矢 道雄	31
---	-------	----

若手研究者の海外学会発表記

国際学会参加記～Keystone symposia に参加して～

東邦大学・医学部 進藤 綾大	33
Transducers 2017 東京大学・大学院理学研究科 田中優実子	34
2017 Keystone Symposia Conference J7 : Inflammation - Driven Cancer : Mechanisms to Therapy 東邦大学・医学部 仁科 隆史	35

平成29年度のアウトリーチ活動

研究展示	36
公開講座「細胞死からの生命探究」 JSPS Science Dialogue「線虫を用いた神経軸索再生の研究の紹介」 区民公開講座		

細胞死研究の歴史

細胞死研究の歴史（オートファジー細胞死）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・病態細胞生物 清水 重臣	37
-------------------------------	-------	----

支援について

モノクローナル抗体作製支援について

東京薬科大学・生命科学部 田中 正人	39
細胞死制御化合物 理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室 閻間 孝介・王 秀玲（袖岡班）	40
ケミカルスクリーニング 東京医科歯科大学・難治疾患研究所・病態細胞生物 清水 重臣	41

今後の会議・学会予定

研究班員一覧

計画班	43
公募班	44

第3号ニューズレター発刊に寄せて



東京薬科大学・生命科学部 田中正人

早いもので、新学術領域“ダイニングコード”は、本年度、発足から4年目を迎えました。本年は第二期の公募班の募集が行われ、20の研究課題が採択となりました。約半数は今期から新たにスタートした課題ですが、いずれも細胞死研究に真正面から取り組む意欲的な研究です。また、新規細胞死の分子機構、細胞死における酸化脂質の役割、細胞死イメージングなどの、本研究領域が特に力をいれている分野の課題も多く採択することができ、領域研究として相乗的な効果が期待できると考えております。新学術領域では、研究者間の有機的な連携が重要視されており、既に5月の熊本での班会議で活発な議論が行われ、いくつかの共同研究がスタートしていることと思います。今後多くの具体的な成果が示せるよう、班員の方には共同研究のより一層の推進をあらためてお願い申し上げますとともに、総括班による研究支援もより一層充実させたいと考えています。研究支援に関しては、利用者の皆様がより活用しやすいものにしていきたいと考えておりますので、忌憚のないご意見をお聞かせ頂ければ幸いです。

本研究領域は、国際共同研究加速基金（国際活動支援班）の援助を受け、オーストラリアをはじめとする諸外国の細胞死研究者とのネットワークの構築を目指しています。2015年には、Dr. John Silkeをはじめとする WEHI の細胞死研究者のご協力のもと、オーストラリアメルボルンで、国際共同研究について協議するクローズドの日豪細胞死協議会と、The 1st Japan Australia Meeting on Cell Death と題した国際シンポジウムを開催しました。来年度は、オーストラリアの研究者を日本に招いて、同様の協議会と国際シンポジウムを行うことを企画し準備を進めております。日程と場所は、2018年5月21日に東京医科歯科大学において協議会、22・23日に東京大学一条ホールにおいて、国際シンポジウムを予定しています。このシンポジウムには、PIだけでなく、海外の若手研究者にも参加を呼びかけており、多数の参加が見込まれます。そこで、5月21日には日豪細胞死協議会と並行して、海外と日本の若手研究者との交流の場を設ける予定です。研究代表者だけでなく、研究室の大学院生、ポスドク、助教等の若手研究者の積極的な参加をお待ちしています。

若手研究者の育成に関しては、上記の国際交流の企画に加えて、2018年1月30日-2月1日にかけて、新学術領域の酸素生物学班と合同の若手会議が予定されています。これが3回目の若手会議（いずれも他の新学術領域と合同での開催）で、毎回活発な議論や交流が行われています。また、若手研究者の短期、長期の国際派遣や海外の学会での発表に対しても、旅費や滞在費の援助を行っております。我が国の若手研究者数の減少が顕著になる中、これらの活動を通じて、細胞死分野の若手研究者育成をサポートできればと考えておりますので、積極的な利用をお願い致します。

アポトーシス研究を中心として進められた細胞死研究は、1990年ごろから2000年にかけて隆盛を極め、成熟期を迎えていましたが、近年、あらたな細胞死様式の発見とその分子機構の解明によって、大きな変革期を迎えています。パイロトーシスやネクロプトーシスといった新規細胞死様式は疾患の病理に深く関与していることも明らかになってきており、治療標的としての有用性も注目を集めております。アポトーシス研究では、多くの日本人研究者がその発展に多大な貢献をしましたが、新しい細胞死研究でも世界を牽引できるよう、力を合わせて研究を進めていきたいと考えております。皆様の一層のご協力、ご支援をお願い致します。

パイロトーシスの分子機構と役割



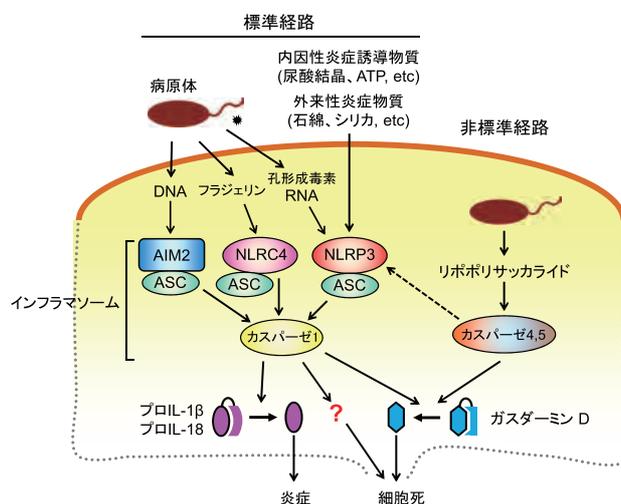
研究代表者：須田 貴司（金沢大学・がん進展制御研究所）

パイロトーシスは細菌やウイルスに感染したマクロファージなどで見られる細胞死である。見かけはネクロトーシスに似ているが、カスパーゼ1と呼ばれる細胞側の蛋白分解酵素の働きによるプログラム細胞死である。AIM2やNLRC4, NLRP3などの細胞質蛋白質が病原体成分や種々の内因性・外因性炎症物質に反応して多量体化すると、アダプター蛋白ASCを介してカスパーゼ1と結合し、インフラマソームと呼ばれる複合体が形成されてカスパーゼ1が活性化される（図）。カスパーゼ1はIL-1 β やIL-18などの炎症性サイトカインを不活性な前駆体型から活性のある成熟型に転換する酵素でもあるため、パイロトーシスを起したマクロファージなどはこれらの炎症性サイトカインを放出する。また、パイロトーシスを起した細胞は細胞膜が早期に崩壊する為に、細胞内の様々な炎症誘導物質が放出される。このため、パイロトーシスは炎症誘導性プログラム細胞死といわれ、それがその名の由来にもなっている。

最近、カスパーゼ1に加えカスパーゼ4や5（マウスではカスパーゼ11）も類似の細胞死を誘導すること、これらのカスパーゼがガスダーミンDと呼ばれる細胞質蛋白質を切断する事で細胞死が誘導されることが示された。しかし、ガスダーミンD欠損マウスのマクロファージでも、カスパーゼ1を活性化すると細胞死起こすことから、カスパーゼ1依存性ガスダーミンD非依存性細胞死経路も存在すると考えられている。我々はガスダーミンD欠損細胞株やマウスを用いて、この新規細胞死経路の分子機構を明らかにしつつある。

また、様々な細胞株にパイロトーシスあるいはアポトーシスを誘導し、それらの培養上清中のメタボライトを比較することで、パイロトーシスに特徴的な新規ダイニングコードを見出し、その機能を解析している（田中正人班、及川博士らとの共同研究）。

我々は、がん細胞にもパイロトーシスを誘導しうることを見出し、がん細胞にアポトーシスを誘導するのとパイロトーシスを誘導するのでは、どちらの治療効果が高いか検討している。これまでの検討から、どちらの細胞死もがんを退縮させられるが、パイロトーシスを誘導した場合の方がより強い腫瘍免疫が誘導され、がんの再発率も低下することが分かってきた。したがって、がん細胞にパイロトーシスを誘導する方法が再発率の低い新しいがん治療法になるのではないかと期待している。



細胞死制御化合物の開発と応用

研究代表者：袖岡 幹子（理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室）

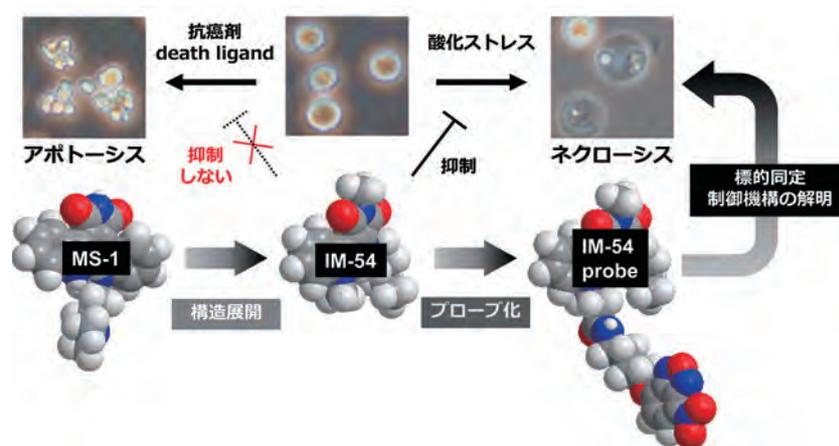
研究分担者：鬮 孝介（理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室）



従来、生体における細胞死の多くはアポトーシスであると考えられて来た。しかし、最近になって、アポトーシス以外の多様な細胞死の存在が明らかとなっている。中でもネクローシスは外界からの傷害により誘導される偶発的な細胞死として考えられてきたが、最近細胞内の特定の因子により誘導されるメカニズムが見いだされ、生体内で重要な細胞死の一つとして認識されるようになった。しかしながら、その分子的な実体は多くは解明されてきたものの、未解明な部分も残されている。さらに、ネクローシス時に放出される分子群が他の細胞に与える影響は多岐に渡ると考えられ、その生理的・病理的な役割にはいまだ不明な点が多い。

このような背景で我々は、従来キナーゼの阻害剤として知られていたビスインドリルマレイミド（BM）誘導体 BM-1がキナーゼとは異なる分子に作用して酸化ストレスにより誘導されるネクローシス様の細胞死を抑制することに着目し、新しい細胞死抑制化合物の設計・合成を行った。種々構造展開を行った結果、キナーゼ阻害活性を分離した新規細胞死抑制化合物インドリルマレイミド（IM）誘導体 IM-54の開発に成功した。IM-54は抗癌剤により誘導されるアポトーシスや Fas リガンドにより誘導されるネクロプトーシスは抑制せず、過酸化水素や t-BuOOH などの酸化ストレスで誘導されるネクローシスを選択的に阻害する。さらに我々は IM-54を用いた評価系により本ネクローシスを選択的に誘導する化合物の探索を行い、種々構造変換を経て本ネクローシスを選択的に誘導できる細胞死誘導剤の開発にも成功している。

本研究課題では、ネクローシス制御化合物の開発で得られた方法論を利用することで、様々な細胞死に対する抑制剤・誘導剤「細胞死制御化合物」の開発研究を進め、得られた細胞死制御化合物に関してその蛍光プローブ化や結合蛋白質の精製などケミカルバイオロジー研究を進める。最終的には、ターゲット分子の同定を行い、細胞死の分子機構を明らかにすることを目的とする。また、細胞レベルでの解析だけでなく、動物レベルでの解析も可能な化合物群の開発も行う。得られた化合物の活性を各種疾患モデルなどで検討し、化合物が制御する細胞死の生体内での生理的・病理的役割を明らかにする。



計画的ネクローシスが担う 生体応答機構の解明

研究代表者：中野 裕康（東邦大学・医学部）



私たちのグループは外因性経路によりもたらされるアポトーシスやネクロプトーシスの抑制に中心的な役割を果たすことの明らかにされている cellular FLICE-inhibitory protein (cFLIP) と呼ばれる遺伝子の組織特異的な欠損マウス、あるいはトランスジェニックマウスを用いて、個体レベルで細胞死に伴い誘導される生体応答の解明を目指しています（図1）。具体的には cFLIP のスプライシングバリエーションを発現したトランスジェニックマウスを樹立して解析を行っています。興味深いことに *in vitro* の実験系ではネクロプトーシスを選択的に誘導する遺伝子が、予想外なことに *in vivo* ではアポトーシスを誘導することを見出しています。このメカニズムを解明するために、アポトーシスやネクロプトーシスの実行因子の遺伝子欠損マウスと交配した結果、*in vivo* においては、何らかの細胞あるいは因子を介してネクロプトーシスがアポトーシスを二次的に誘導している可能性を見出しています。一方で、肝細胞特異的な cFLIP 欠損マウスにコリン欠乏食を負荷することで、ヒト非アルコール性脂肪肝炎（NASH）と類似したマウスモデルを作成したところ、肝細胞の再生に関与する liver progenitor cell (LPC)s が著明に増加することを見出しました。さらにその後の解析からその増加に関与する因子の候補を同定しており、その因子の NASH 進展におけるバイオマーカーとしての役割をマウス及びヒトの臨床検体を用いて解析していきたいと考えております。このような解析を通して、死細胞から放出され、様々な生体応答を誘導するダイニングコードを数多く同定し、この領域の発展に貢献していきたいと考えております。

参考文献

- Piao et al, Sci Signal 2012
- Nishina et al, Sci Signal 2012
- Piao et al, Hepatology 2017
- Nishina et al, J Biol Chem 2017

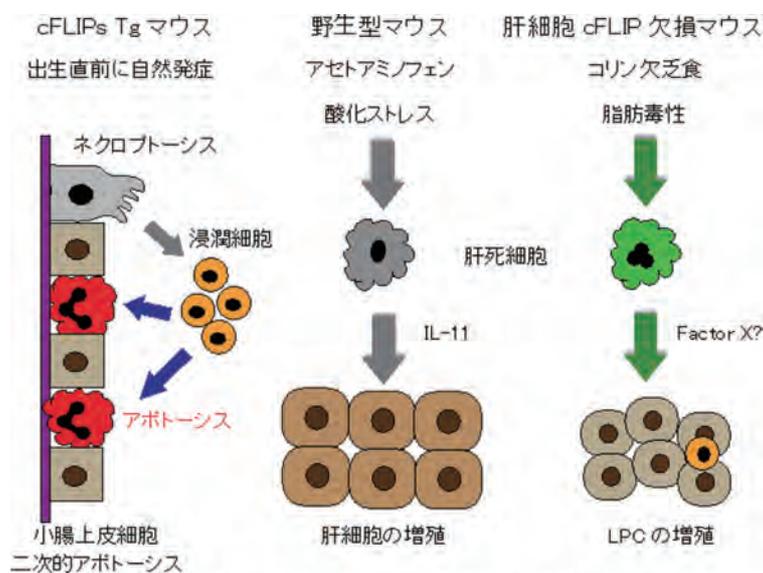


図1. 様々なモデルを用いたダイニングコード同定の試み

慢性膵炎発症過程における ネクロプトーシスの役割



研究分担者：大村谷昌樹（兵庫医科大学）

慢性膵炎モデルマウスの開発

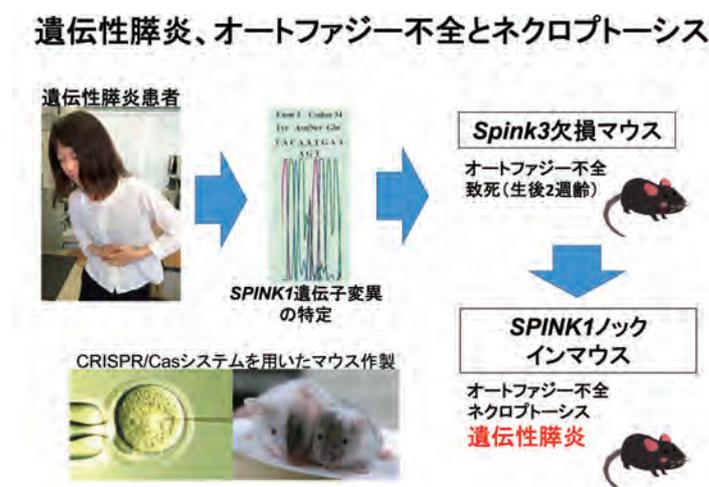
Serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1) は膵臓から単離された膵内在性のトリプシンインヒビターで、2000年に遺伝性膵炎の原因遺伝子として報告した。さらに *SPINK1* 遺伝子のマウスホモログ遺伝子 *Spink3* のノックアウトマウスを作製し、解析を行った結果、*Spink3*^{-/-} マウスは正常に生まれるが、出生直後に膵臓外分泌細胞（膵腺房細胞）に異常なオートファジー（自食作用）が誘導されること、その結果、1-2日後にはすべての膵腺房細胞が細胞死に陥り、生後すぐに膵外分泌機能不全によりマウスが死亡することを明らかにした。

そのため、*SPINK1* 遺伝子を *Spink3* 欠損マウスに cre-loxP システムを用いて置換し、*SPINK1* ノックインマウスを樹立した (*Spink3*^{SPINK1/SPINK1})。 *Spink3* ノックアウトマウスとの交配により *SPINK1* ヘテロノックインマウス (*Spink3*^{-/SPINK1}) を作製し、その解析を行った結果、生後4週齢において、慢性膵炎を発症させることに成功した。このマウスの膵炎発症過程においても、やはりオートファジーに由来する巨大な空胞の出現と、オートファジーの選択的基質である p62タンパクの蓄積が見られた。つまり、SPINK の欠損、および発現低下はオートファジーの異常を引き起こすことで、膵炎を発症するという仮説を実証することが出来た。

さらにこの *Spink3*^{-/SPINK1} マウスとプログラムされたネクロトーシス（ネクロプトーシス）の実行因子である receptor-interacting protein kinase 3 (RIPK3) を欠失させたマウス (*Spink3*^{-/SPINK1};*Ripk3*^{-/-}) 作製したところ、慢性炎症が抑制され、膵炎の重症度が軽減した。このことは、膵炎発症過程で見られる、オートファジー不全による細胞死がネクロプトーシスであることを示唆しており、今後の膵炎の治療標的として、研究を進展させる計画である。

新しいゲノム編集 TALEN、CRISPR/Cas を用いた遺伝子改変マウス作製の技術開発

近年開発された標的ゲノム部位を特異的に変更する「ゲノム編集」技術 TALEN、CRISPR/Cas をマウス受精卵、ES 細胞に導入し、遺伝子改変マウスを短時間で作製する技術開発を行い、昨年5月に異動した兵庫医科大学においても遺伝子改変マウスを作出している。今後も新しい技術を取り入れて、遺伝子改変動物作製の効率化を推進していく計画である。



生体における多様な細胞死シグナルの可視化・検出系の開発

研究代表者：山口 良文（北海道大学・低温科学研究所）
 （前所属：東京大学・大学院薬学系研究科）
 研究分担者：荒川 聡子（東京医科歯科大学・難治疾患研究所）



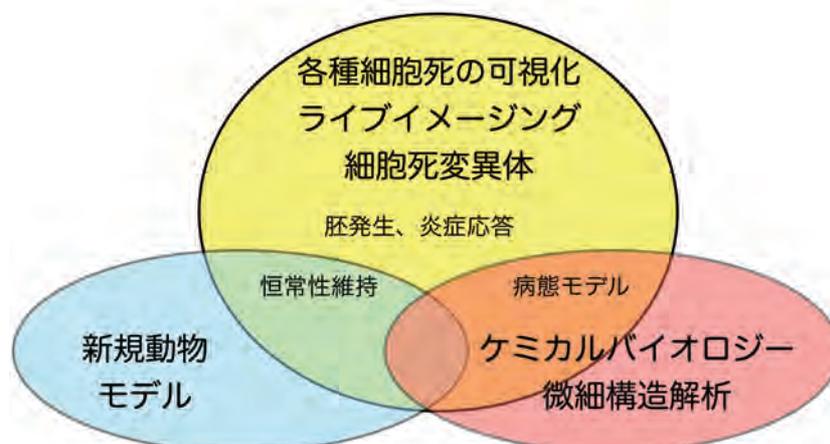
細胞死は、多細胞生物体にとって不可避の現象である。近年、多種多様な細胞死様式の制御機構が明らかになりつつある。しかし、生体内での死細胞動態やその周辺細胞への影響、さらにはそれらの生理的意義については、未だ不明な点が多い。

山口は、生体内で生じる細胞死の主要なものであるアポトーシスの生体胚での可視化、さらにアポトーシスと同じくカスパーゼファミリー分子の活性化を伴う、パイロトーシスの可視化プローブの作成を行ってきた。同時に、近年明らかになりつつある多様な細胞死の新規検出プローブの作成も、領域内外の各種細胞死の専門家と協力して行っている。これらのプローブと各種細胞死変異体を、ライブイメージングによる胎児発生、炎症応答などの解析に活用することで、細胞死の細胞集団における意義や周辺細胞応答、死ぬ細胞の選別機構を明らかにしたい。これらのアプローチに加え、体温が10℃以下に陥る低体温状態でも死なない冬眠する哺乳類モデルを導入することで、恒常性維持における新たな細胞死制御機構の解明も試みる。

荒川は、種々の疾患や病態への応用を前提として、生体における細胞死やオートファジーの役割を明らかにする事を目標に研究を行っている。これまでに、新しい分子機構に基づくオートファジー機構“alternative macroautophagy”の存在を明らかにし、この機構が胎仔期の赤血球分化過程においてミトコンドリアの除去に機能していることを見出した。現在、オートファジー細胞死やアポトーシス以外の細胞死について、遺伝学や生化学的手法と電子顕微鏡による微細構造解析を組み合わせた生理機能解析やケミカルバイオロジーを用いた各細胞死の誘導による抗がん薬の開発を行っている。

以上一連の研究により、生体内におけるアポトーシス・パイロトーシス・新規細胞死の動態制御機構とその生理的意義に迫る。

多様な細胞死シグナル動態可視化と生理的意義の検証



統合的ストレス応答による肝再生過程の細胞死様式の調節メカニズムの解明

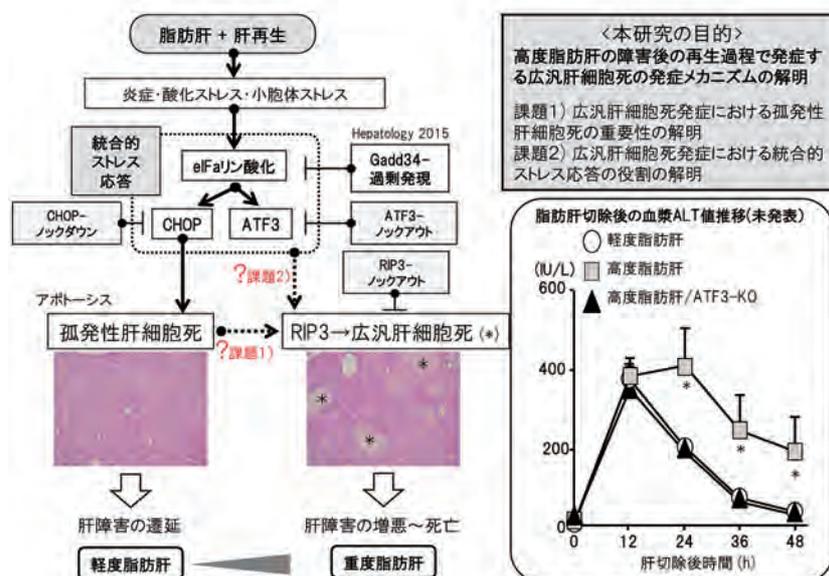


研究代表者：井上 啓 (金沢大学・新学術創成研究機構栄養・代謝研究ユニット)

脂肪肝では、肝障害からの再生が著しく低下しており、この再生障害は、肝切除術後合併症や脂肪肝炎の発症などの原因となっている。脂肪肝再生障害は、肝細胞増殖の低下よりも、むしろ肝細胞死の亢進に起因している。実際に、脂肪肝での70%切除マウスにおいて、肝細胞死を抑制すると、肝細胞増殖障害の軽減が無い状態でも、脂肪肝での肝再生は著しく改善する。再生過程での肝細胞死は、軽度脂肪肝（肝細胞30%以下で脂肪滴）では孤発性肝細胞死にとどまるが、高度脂肪肝（肝細胞60%以上で脂肪滴）では広汎な肝細胞死が起こることが報告されている。特に、高度脂肪肝の再生過程に発生する広汎肝細胞死は、障害の増悪や肝不全の誘因となることから、肝障害の生命予後と密接に関与している。

我々は、脂肪肝の再生過程での細胞死の誘導に、肝細胞における統合的ストレス応答が重要な役割を担うことを明らかにしていき (Hepatology 2015)。統合的ストレス応答は、多様な細胞内ストレスに共通した細胞応答として知られており、eIF2 α リン酸化およびそれに続く転写因子 ATF4の活性化により引き起こされる。さらに、統合的ストレス応答では、ATF4によって、ストレス誘導性転写因子 CHOP・ATF3の増加が起こり、ストレス性タンパクの発現誘導から細胞死に至る幅広い応答が誘導される。軽度な脂肪肝であっても、eIF2 α 脱リン酸化酵素 Gadd34のノックダウンによって、統合的ストレス応答を増強すると、肝再生過程において、広汎な肝細胞死が惹起される。一方で、Gadd34過剰発現では、高度脂肪肝においても、肝切除後の再生が改善する。また、統合的ストレス応答が増強した状況においても、CHOP 欠損によって、再生過程での広汎肝細胞死を抑制することができる。

本研究では、高度脂肪肝の再生過程での広汎肝細胞死の発症において、統合的ストレス応答が果たす役割を解明する。具体的には、ATF3KO や CHOP ノックアウトマウスなどを用いて、この様は広汎肝細胞死の発症メカニズムを解明する。本研究において、統合的ストレス応答による肝細胞死の発症メカニズムを解明することは、臓器・個体におけるダイニングコードの意義の解明や非アルコール性脂肪肝炎や肝臓切除術後合併症の予防・治療へと繋がるものと期待される。



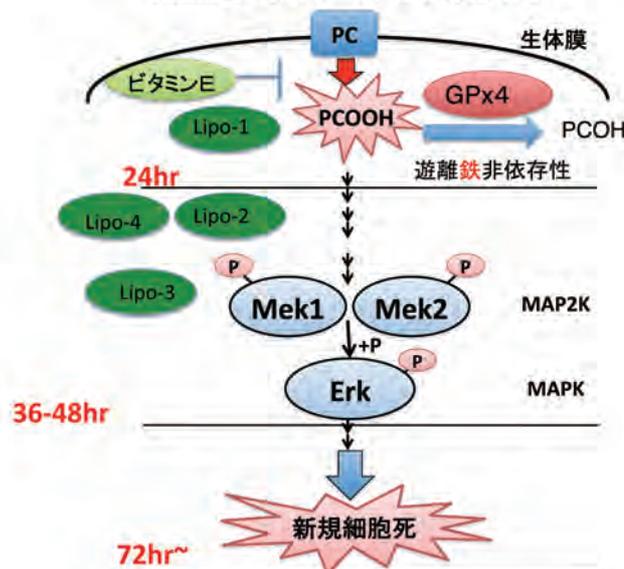
脂質酸化依存的新規細胞死 (リポキシトーシス) 実行因子の 細胞及び個体での機能解析



研究代表者：今井 浩孝 (北里大学・薬学部)

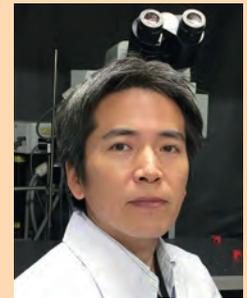
リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (GPx4, PHGPx) は酸化ストレスなどにより生体膜リン脂質に生成したリン脂質ヒドロペルオキシドをグルタチオン依存的に還元する酵素である。我々はこれまでに個体レベルで GPx4 を様々な組織で欠損させると、カスパーゼ非依存的な脂質酸化依存的な新規細胞死が誘導されること、この細胞死はビタミン E の投与で抑制できること、さらにビタミン E 添加食でレスキューできたマウスを通常食にもどすと突然死が誘導されることから、GPx4 とビタミン E による内在性の脂質酸化の抑制が正常細胞の生存に必須であること、このバランスの破綻による脂質酸化の亢進が疾患の原因の一つであることを明らかにした (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 403, 143-170, 2017)。一方で、抗がん剤エラスチンや RSL3 などによる変異 Ras 依存的ながん細胞特異的な細胞死経路において鉄依存性の新規細胞死 (フェルトーシス) が報告され (Cell 49, 1060-72, 2012)、GPx4 による脂質酸化抑制能がフェルトーシスの制御因子であることが報告された (Cell 156, 317-31, 2014)。我々は GPx4 欠損 MEF 細胞死の詳細な解析から、GPx4 欠損による細胞死が鉄非依存的であること、細胞死に至る時間経過が抗がん剤エラスチンや RSL3 と全く異なることから、細胞死のメカニズムが異なると考え、網羅的 shRNA ライブラリーのスクリーニングにより、GPx4 欠損細胞死を抑制できる shRNA 遺伝子を見出し、さらにその cDNA を戻すことにより細胞死を回復できる GPx4 欠損細胞死実行因子群 (Lipo 遺伝子) を見出した。さらに Lipo 遺伝子のノックダウン細胞は、エラスチンや RSL3 によるフェルトーシスを全く抑制できなかった。このことから、我々は GPx4 欠損細胞死をフェルトーシスとは異なる脂質酸化依存的細胞死としてリポキシトーシスと名付けた。本研究では、この Lipo 遺伝子の細胞死誘導メカニズムを明らかにすることを目的とし、Lipo 遺伝子ノックアウトマウスによる個体での機能、さらに Lipo 遺伝子と心臓特異的 GPx4 ダブル欠損マウスを用いて、個体レベルでのリポキシトーシスに対する抑制効果も検証することにより、フェルトーシスとの違いを明らかにしたい。

脂質酸化依存的新規細胞死(リポキシトーシス)実行因子Lipo遺伝子の
細胞及び個体レベルでの機能解析



好中球細胞外トラップを誘導する細胞死メカニズムの解明

研究代表者：上岡 裕治（関西医科大学・附属生命医学研究所）



好中球では、自身のクロマチンから成る高粘着性構造体「好中球細胞外トラップ：NETs」の放出を伴う細胞死「NETosis」が知られています。NETosisは生体内での異物排除メカニズムの一つとして発見当初は考えられていましたが、近年では生体防御の面のみならず、自己免疫疾患や癌転移、外科手術後の急性障害の原因となることが報告されています。これまでの基礎研究によって、NETosisに向かうシグナル伝達メカニズムには、活性酸素種の生成に必要なNADPH oxidaseや、クロマチンリモデリングに関わるPAD4が必要であることなどが知られていますが、NETosisに向かうシグナルの詳細の多くは不明です。好中球は遺伝子導入などの実験操作で活性化されやすく、また短寿命であることから*in vitro*実験系でのNETosis研究には限界があります。今後のNETosis研究には、好中球の「細胞動態」と「細胞活性」を、時間情報と共に*in vivo*で解析することが必要です。

本研究課題では二光子励起顕微鏡を用いた蛍光イメージング技術を駆使し、NETosisの分子メカニズムに関して、以下の3つの課題を明らかにしたいと考えています。

1. ApoptosisとNETosisの選択に関わる細胞接着シグナル

細胞接着は好中球の運命決定・細胞機能に深く関与します。本研究課題1では細胞接着の制御因子である低分子量Gタンパク質Rap1から接着因子Integrinへのシグナル伝達経路の中で、NETosis制御に関する因子を阻害剤、遺伝子破壊細胞株等を用いて探索します。

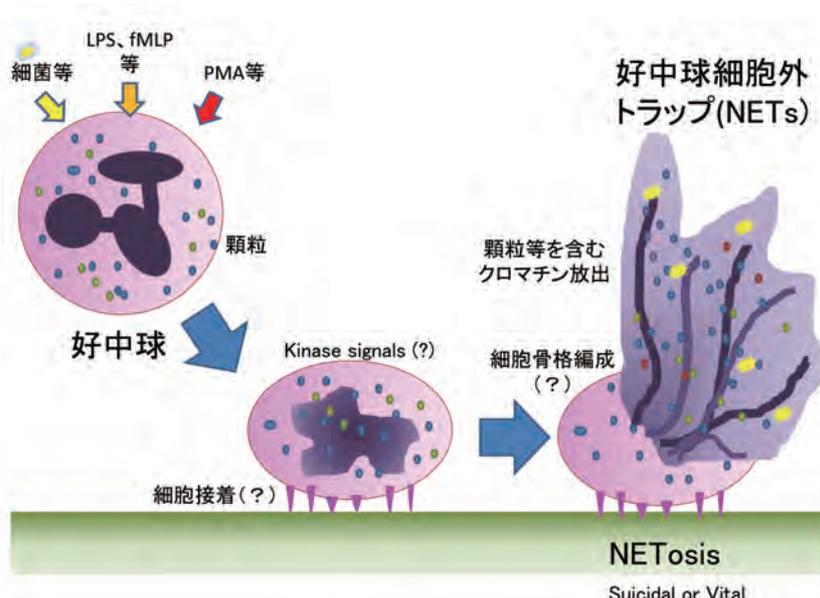
2. NETosisに関わるMAP kinaseの役割

ERK、JNK、p38といったMAP kinaseが細胞接着、細胞運動、ストレス応答に関与していることは既に知られています。しかし、これらのMAP kinaseがNETosisにどう関与するかは未だ明らかではありません。本研究課題2ではNETosisを制御するリン酸化酵素に焦点を当て、suicidal NETosisとvital NETosisの違いを明らかにするため、申請者らが開発したkinaseの活性化をモニターするFRETマウス

を用いた生体イメージングを行う予定です。

3. NETsに伴う細胞骨格の変形、DNAの放出メカニズム

NETsに特徴的なアクチン細胞骨格のダイナミックな変化およびクロマチンDNAの放出に必要な「動力源装置」は未だに明らかになっていません。NETosisの「動力源装置」を効果的に阻害できれば、NETosis特異的な阻害剤開発に繋がる可能性が高いと考えています。



活性酸素誘導性ネクローシスにおける細胞死誘導シグナルの捕捉と可視化

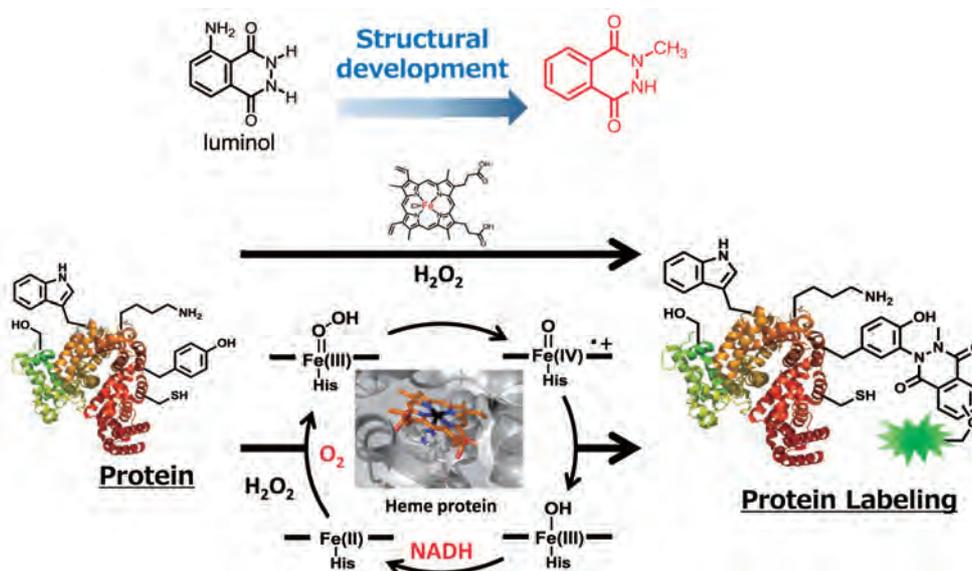
研究代表者：佐藤 伸一（東京工業大学・科学技術創成研究院・化学生命科学研究所）



計画的ネクローシスと細胞内の ROS 生成・代謝は深い関連があるとされ、各種 ROS のプローブについてこれまで多くのものが開発・検討されているが、細胞死に関わる ROS を特定する手法や特定メカニズムのネクローシスを選択的に可視化する技術が不足している。フェロトーチス等の ROS 関与の細胞死に関しては「鉄」による細胞死誘導シグナルの活性化が重要であることから、我々はこれまで、酸化的に活性化したヘムを可視化する技術を開発してきた。

ウエスタンブロッティング等で使われるルミノール発光反応が鉄触媒と過酸化水素で活性化される反応であるということに着想を受け、ヘムを触媒として機能するラベル化剤として新規ルミノール誘導体を独自に開発した。遊離ヘムは ROS 増幅因子として働くダイニングコードであるが、我々のラベル化剤は、遊離ヘムの酸化的活性化に反応してタンパク質ラベル化反応を誘導することが分かった (*ACS Chem. Biol.* 2015)。また、遊離ヘムの活性化度の検出以外にも、低濃度の ROS による peroxidase の活性化や溶存酸素による NADH-oxidase の活性化に反応して機能するラベル化剤の開発に成功しており、単純な ROS 濃度ではなく、ヘムの酸化度に応答したタンパク質ラベル化法が開発できた (*ChemBioChem* 2017)。

一方で、peroxidase をタンパク質ラベル化反応の触媒として活用できるという特徴に着目すると、ラジカル的なラベル化反応は peroxidase 分子周辺の数十 nm の範囲で完結することが知られている。近年では細胞内で機能する peroxidase (APEX2) の周辺数十 nm の範囲でのラベル化反応により、タンパク質の会合状態を探る手法へ応用されている (Ting A. Y. et al. *Science* 2013)。この方法では tyramide というチロシン残基を模倣したプローブと、酸化条件でのチロシン-チロシンのカップリング反応を模倣したラベル化が適用されている。本研究で種々の類縁体の合成が可能なるルミノール型のタンパク質ラベル化剤は tyramide を使った従来法からのラベル化効率向上や触媒分子からのラベル化有効距離を制御できることが期待される。本新学術領域の公募班の研究の中では、ラベル化反応が触媒の近接空間で起きることを利用し、ヘムの活性化が関与する ROS 誘導性ネクローシスの実行因子のラベル化や、細胞死誘導時に細胞内で活性化するタンパク質複合体のラベル化による解析を目的に研究を行っている。

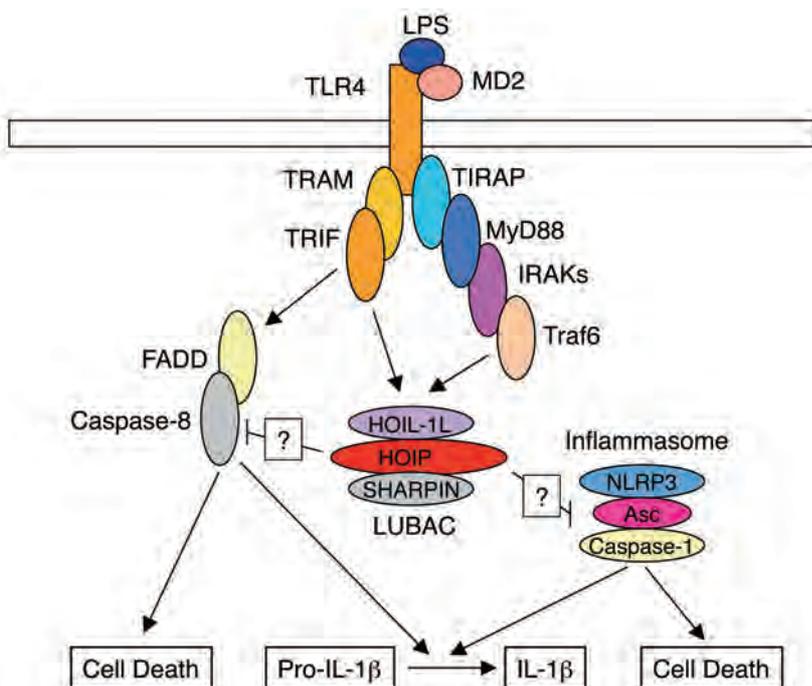


LUBAC による細胞死と IL-1 β 産生調節機構の解析



研究代表者：佐々木義輝（京都大学・大学院医学研究科）

直鎖状ポリユビキチン鎖を選択的に生成するユビキチンリガーゼ複合体 LUBAC (linear ubiquitin assembly complex) はリガーゼ活性を担う分子 HOIP と 2つのアクセサリー分子 HOIL-1L、SHARPIN から構成され、TNF- α 刺激による古典的 NF- κ B 経路の活性化に関与すると同時に細胞死を抑制する機能を有する。TNF- α 刺激によって誘導される細胞死にはアポトーシスとネクロプトーシスがある。アポトーシスの誘導には Caspase-8 が重要な役割を担っているが、その活性が阻害された場合には、RIP1/RIP3 から構成されるネクロソームによってネクロプトーシスが誘導される。LUBAC は、Caspase-8 やネクロソームの活性化を抑制する事で細胞死を制御していると考えられているが、その詳細なメカニズムは明らかとなっていない。私は、これまでに LUBAC の B リンパ球における機能について解析を行い、LUBAC が CD40 や TACI 下流における古典的 NF- κ B および ERK 経路の活性化を制御することで T 細胞依存性抗原、II 型 T 細胞非依存性抗原に対する抗体反応を制御していることを報告してきた (EMBO J 32, 2463-2476, 2013)。さらにその後の解析によって HOIP 欠損 B 細胞は LPS 刺激によって生存が促進されるのではなく細胞死が強く誘導されることから、LUBAC は TNF 受容体だけでなく TLR4 の下流においても細胞死の制御に関わっている事を発見している。TLR4 は MyD88 と TRIF という 2つのアダプター分子を介してシグナルを伝達するが、この TLR4 刺激による細胞死は TRIF を欠損させることで抑制された事から、この細胞死が TRIF を介していることを明らかにしている。このような LPS 刺激による細胞死は B 細胞だけでなく HOIP 欠損マクロファージでも誘導されることを観察しており、加えてマクロファージの場合には細胞死に伴い成熟型 IL-1 β を分泌することを発見している。本来、成熟型 IL-1 β の分泌には pro-IL-1 β を誘導するための TLR 等の刺激と pro-IL-1 β を切断して成熟型 IL-1 β にする酵素 caspase-1 を含む複合体 inflammasome を活性化する刺激が必要である。HOIP 欠損マクロファージが LPS 刺激によって成熟型 IL-1 β を分泌する際に inflammasome が必要であるかなど具体的な機構については不明である。そこで、本研究では LUBAC による細胞死制御機構の解析を通して LPS 刺激による成熟型 IL-1 β 産生のメカニズムを解明し、その炎症反応における役割について明らかにする事を目的とする。



LPS刺激による細胞死とIL-1 β 産生におけるLUBACの機能解析

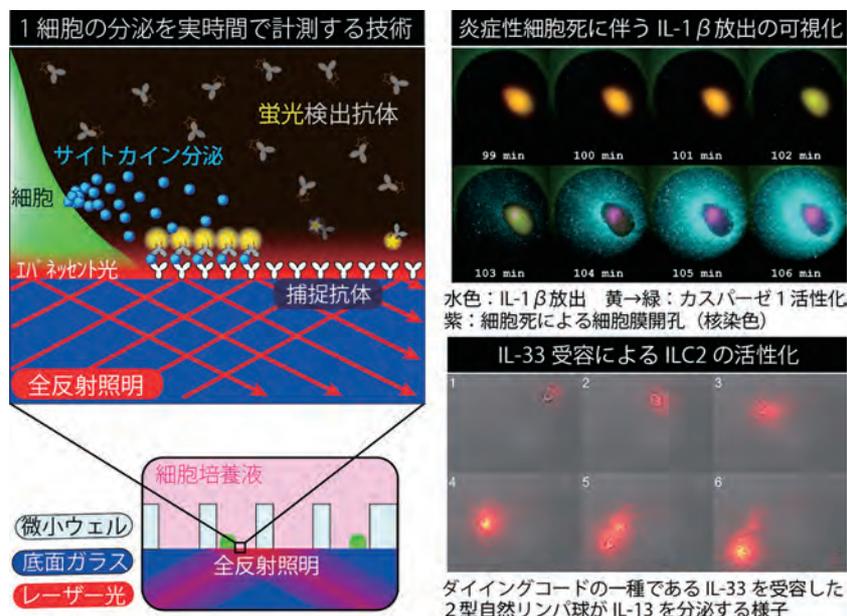
細胞死を起点とする ダイニングコード授受の1細胞実時間 イメージングと遺伝子発現解析



研究代表者：白崎 善隆 (科学技術振興機構/東京大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻)

本領域が研究テーマとして据える「ダイニングコード」は、細胞死に伴って細胞から発せられる種々のタンパク質であり、周囲の細胞に何らかの情報を伝達する最期的手段です。私の研究では、この「ダイニングコード」そのものを観察することによって、放出されるメカニズムや放出された後の情報伝達を明らかにしたいと取り組んでいます。私は、細胞死という不可逆的と思われる細胞活性において、どのタイミングでダイニングコードが発信されるのかに特にフォーカスをし、ダイニングコード放出のライブセルイメージングを行っています。これまでに炎症性細胞死であるパイロトーシスにおけるIL-1 β 、IL-1 α 放出や、ネクロプトーシスにおけるHMGB1放出などを領域内外の共同研究によって行い、ダイニングコードは概して一過的なバースト様放出を示すことを明らかにしています。一方で、ダイニングコードが誘導する自然免疫応答について、細胞障害時に放出されるIL-33を受容することによって多量の2型サイトカインを放出する2型自然リンパ球に着目し、その応答の様相を明らかにしようとしています。

また、本研究プロジェクトでは相転移的に生じる細胞死において、どのような細胞内遺伝子発現情報の変化が生じているのかを明らかにしようと考えています。これには、細胞死が生じた瞬間を捉え、細胞内情報が損失する前に速やかに細胞を回収することが重要となります。これまでの細胞死のライブセルイメージングは、細胞死はすべての細胞で一斉に起きるのではなく、個々の細胞がばらばらのタイミングで起こすことが分かってきています。そのため、従来のバルク操作による細胞回収では、細胞死直後の細胞情報を取得できませんでした。本研究では、個々の細胞の細胞死のタイミングをダイニングコードの放出でモニターしながら細胞死直後に回収し、1細胞からの微量のRNAやDNAの量や配列を網羅的に計測しようとしています。これにより、細胞死過程の細胞遺伝子発現を明らかにすると共に、細胞死を起こす細胞、起こさない細胞の違いやダイニングコードを放出しないで細胞死を起こす細胞などの違いを明らかにすることを目指します。



リン脂質の膜動態と細胞死

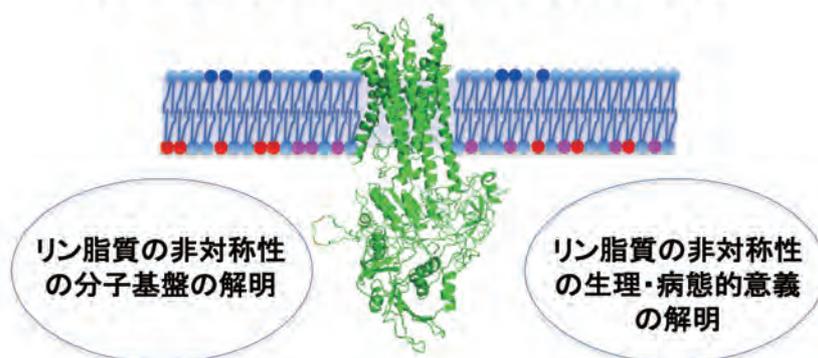
研究代表者：瀬川 勝盛 (大阪大学・免疫学フロンティア研究センター)



細胞膜はリン脂質二重層（外層と内層）で構成され、その分布は非対称である。アミノ基を含むホスファチジルセリン (PtdSer)やホスファチジルエタノールアミンは細胞質側の内層に局限し、ホスファチジルコリンやスフィンゴミエリンは主に細胞外に面する外層に分布する。リン脂質の非対称性は、真核生物で保存された根幹的な現象であり、フリッパーゼとよばれる分子がアミノリン脂質を一方向に移層することで樹立・維持すると考えられてきた。我々はこれまでに、哺乳類細胞の細胞膜で機能するフリッパーゼとして ATP11A と ATP11C を同定し、PtdSer の非対称的分布の分子機構、アポトーシス細胞による PrdSer の露出機構、さらに食細胞による PtdSer の認識機構の一端を明らかにしてきた (Segawa K, *PNAS*, 2011) (Segawa K, *Science*, 2014) (Segawa K, *Trends. Cell. Biol.*, 2015) (Segawa K, *J. Biol. Chem.*, 2016)。ATP11A と ATP11C は、P4型 ATPase (P4-ATPase)とよばれる10回膜貫通型タンパク質のファミリーに属し、ヒト・マウス共にユビキタスに発現する。実際、ATP11A と ATP11C を二重に欠損した細胞は、細胞膜におけるフリッパーゼ活性がほぼ完全に消失する。また、ATP11C 遺伝子欠損マウスは、B細胞の特異的な消失、胆汁うっ滞、貧血などの多彩な表現系を示し、ATP11A 遺伝子欠損マウスは胎生致死となる。しかしながら、“フリッパーゼ活性の減少”あるいは“アミノリン脂質の膜動態の変化”がどのようにこれらの病態を引き起こすのか、そのメカニズムは不明である。本研究では、アミノリン脂質、特に PtdSer の非対称性の分子基盤を解明すること、細胞膜フリッパーゼの欠損マウスでみられる病態を解明することを目指す。

細胞膜におけるリン脂質の非対称性と膜動態

細胞膜フリッパーゼ: ATP11A & ATP11C



低分子化合物で探る マクロファージの 炎症誘導性細胞死の機構

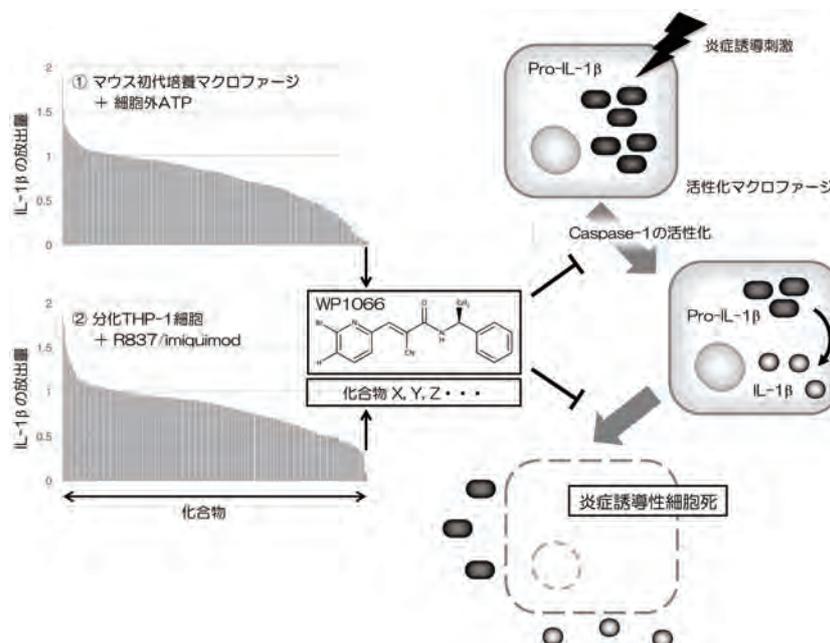


研究代表者：武田 弘資（長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科）

炎症は生体防御機構として生体の恒常性維持に必須の役割を担っているが、いったんその制御が失われると重篤な急性症状やさまざまな慢性疾患の発症につながるため、炎症の制御機構の解明はさまざまな疾患克服に向けての大きな課題である。

炎症の初期においては、マクロファージや樹状細胞などが炎症の引き金となる刺激に直接応答し、インターロイキン 1β (IL- 1β) などのサイトカインを放出することで炎症が惹起される。その際 IL- 1β は、通常分泌タンパク質が有するシグナル配列を持たないにもかかわらず細胞外に放出されるため、細胞死が IL- 1β の主要な放出機構と考えられており、その細胞死は、炎症を積極的に惹起する「炎症誘導性細胞死」と位置づけられている。IL- 1β の成熟化に働くプロテアーゼ caspase-1の活性化にともなって誘導されるパイロトーシス (pyroptosis) がすでに知られている代表的な炎症誘導性細胞死であるが、パイロトーシスについてもその誘導機構や制御機構にはいまだ不明な点が多く、さらに他にも機構の異なる細胞死が存在する可能性が残されている。

我々は、インフラマソーム活性化刺激によるマクロファージからの IL- 1β の放出を抑制する低分子化合物を探索したところ、得られた化合物のすべてが、IL- 1β 放出と同時に起こるマクロファージの細胞死を強く抑制することを見出した。それらのうち STAT3阻害剤 WP1066は、STAT3に対する阻害作用とは独立してインフラマソーム活性化刺激によるマクロファージの細胞死を強く抑制することが分かった。よって、WP1066の新規の標的分子が、マクロファージからの IL- 1β の放出を促す炎症誘導性細胞死の制御因子の一つと予想される。現在我々は、WP1066やそれ以外の細胞死抑制化合物の標的分子の同定を含めた細胞死抑制機構の解析を進めており、マクロファージの炎症誘導性細胞死の機構を明らかにすることで、炎症という生体応答を誘導するダイニングコードを解き明かしたいと考えている。

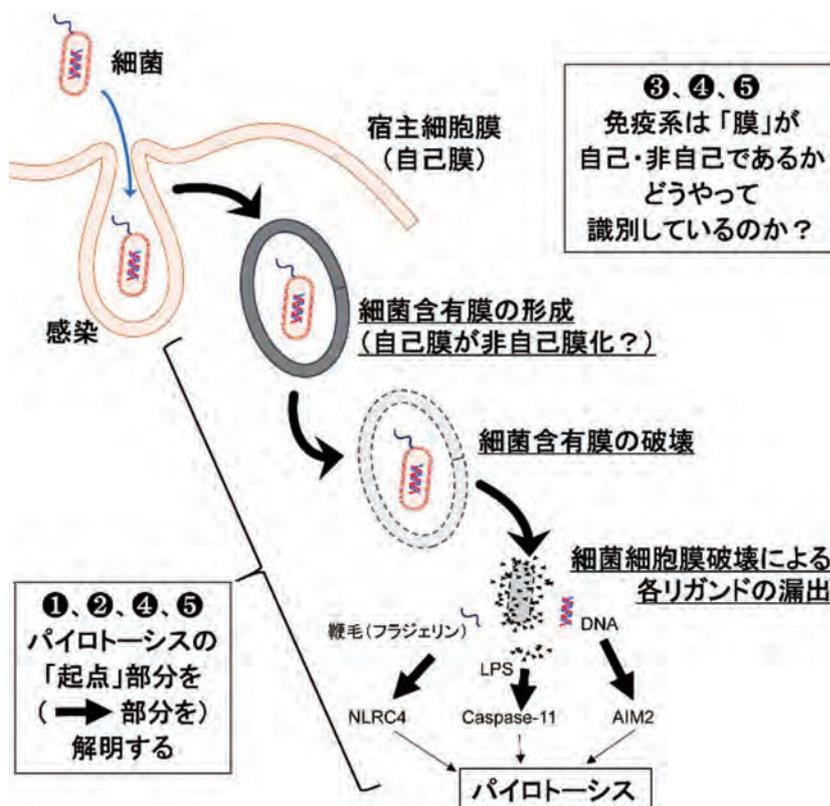


「細菌含有膜破壊による パイロトーシス誘導・ 制御メカニズムの解明」



研究代表者：山本 雅裕 (大阪大学・微生物病研究所/大阪大学・免疫学フロンティア研究センター)

細菌感染によって引き起こされるパイロトーシスとインフラマソームの活性化は、細菌感染防御免疫応答に重要です。パイロトーシスのトリガーとなる細菌由来のリガンドであるリポ多糖 (LPS) や DNA は、細菌が宿主細胞に感染した際に形成する病原体含有膜に包まれ、パイロトーシス誘導受容体である Caspase-11 や Aim2 が存在する細胞質とは別の区画であることから、どのような機序でパイロトーシスリガンドが細胞質に至り受容体と結合するのかは全く不明でした。私たちのグループは前回の公募研究の成果として、インターフェロン (IFN) 刺激によって細菌感染によるパイロトーシスが爆発的に誘導され、それには IFN 誘導性 GTPase である GBP や IRGB10 が関与することを報告しました。細菌感染時のパイロトーシスの研究分野では、私たちのグループが開始した IFN 刺激によるパイロトーシスリガンドの細胞質への暴露機構の研究が最もホットなトピックの一つとなっていますが、病原体含有膜が破壊される分子メカニズムや IFN 誘導性 GTPase の活性・局在制御機構、さらには機能未知の IFN 誘導性 GTPase 群の存在がごく最近明らかになるなど、全容解明には程遠い状態です。その原因として、旧来の Caspase-11 や Aim2 依存性パイロトーシスの研究がリガンドをリポソームなどで人工的に細胞に導入しており、細菌感染など実際に起こる生理的な条件下で試験していなかったことが考えられます。そこで本研究では、未だ機序がよくわかっていない、実際の細菌感染により誘導されるパイロトーシスの最も上流の必須イベントである病原体含有膜破壊機構の担当分子・制御機構の生理的意義の解明を目的とします。



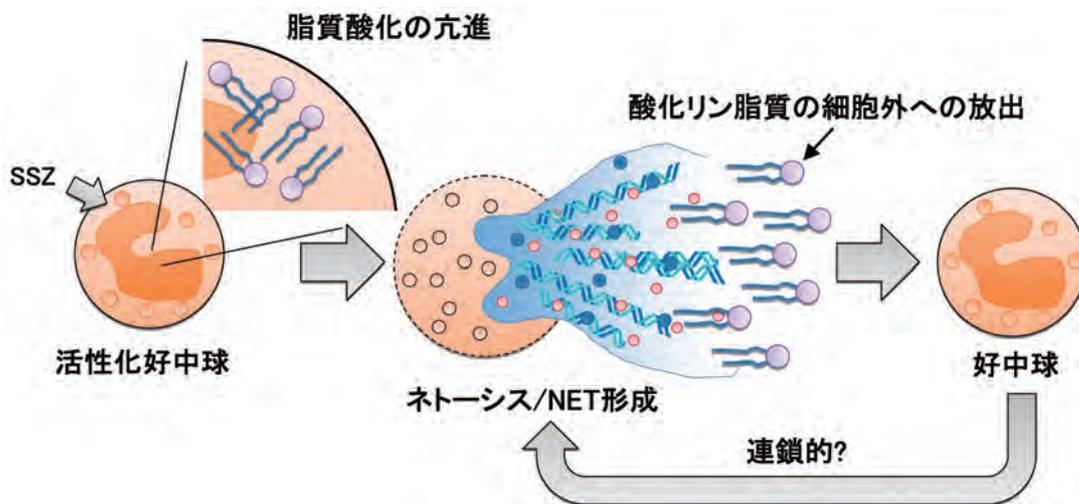
食細胞による死細胞の貪食機構とそれに伴う免疫制御機構の解明



研究代表者：田中 正人（東京薬科大学・生命科学部）

マクロファージ等の食細胞は、死細胞を貪食して排除する。死細胞を貪食した食細胞は、単に死骸を分解するだけでなく、取り込んだ死細胞の性質に応じて、様々な免疫応答や炎症を誘導することが明らかになりつつある。我々はこれまでに、CD169陽性マクロファージが、生体内での死細胞貪食に伴う免疫応答に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。最近、我々は、腸管のCD64陽性の腸管マクロファージの亜集団として、CD169陽性マクロファージが存在することをつきとめ、このマクロファージが腸炎発症の病理に深く関与していることを明らかにした。本マクロファージは粘膜固有層の深部に局在し、腸上皮細胞の傷害を感知して、炎症誘導作用を有するCCL8ケモカインを産生する。現在、このCD169陽性マクロファージによる、腸上皮細胞傷害認識の分子機構について研究を進めている。さらに我々はこのマクロファージに特異的に発現する転写因子を同定し、この転写因子が、同マクロファージのCCL8産生を正に制御していること、およびこの転写自身の発現制御が、炎症における同マクロファージの形質転換に重要な役割を担っていることを明らかにした。

我々は、以前に、CD169陽性マクロファージ非存在下では、好中球の異常活性化により、腎臓の虚血再灌流傷害が劇症化することを明らかにした。最近になって、この劇症化には好中球によるneutrophil extracellular trap (NET) 形成が関与していることをつきとめた。さらに、脂質酸化の亢進が、NET形成促進に関与していること、および、死細胞から放出される酸化脂質が、近傍の好中球に作用して、連鎖的にNET形成を誘導する可能性を見いだした。現在、我々は、この脂質酸化によるNET亢進の分子機構の解明に取り組むとともに、NETの促進および抑制作用を有する化合物を探索し、その標的分子を同定することにより、NET形成の分子機構の解明を試みている。



肝幹細胞による肝再生を促進する ダイニングコードの解明

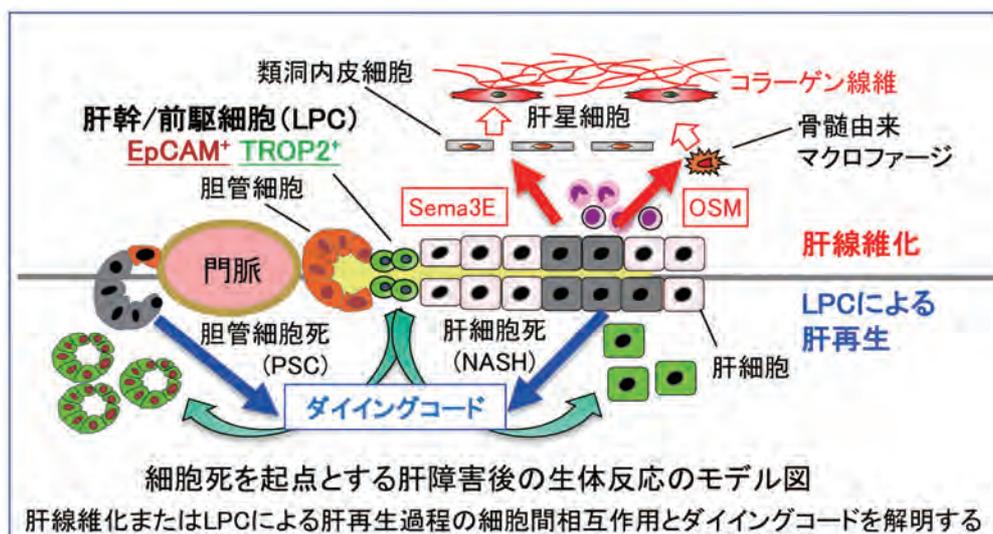


研究代表者：田中 稔 (国立国際医療研究センター研究所)

肝臓は様々な障害に対して高い再生能を有することが知られているが、肝障害が慢性化すると、細胞死と再生を繰り返し肝線維化が進行する。一方、慢性障害肝では、肝細胞と胆管細胞の間に存在するとされる肝幹/前駆細胞 (Liver stem/progenitor cell : LPC) が増殖し、肝細胞と胆管細胞の二方向性に分化することで再生に寄与することも知られている (図)。肝障害の起点には肝細胞死があることから、その死の様式や死細胞から放出される因子が、その後の周囲に及ぼす影響 (ダイニングコード) となり、肝線維化や再生様式の選択に寄与する可能性が考えられる。しかし、その実態はよくわかっていない。我々はこれらの現象をダイニングコードと細胞間相互作用という視点から解明することを目指している。

これまでに我々は肝肝線維化に関わるダイニングコードとして、セマフォリン3e (Sema3e) を同定している。損傷を受けた肝細胞から放出される Sema3e は肝類洞内皮細胞を収縮させ、それを裏打ちする肝星細胞の活性化を増強することで、コラーゲンの過剰産生を誘導し、肝線維化の増悪に関わることを明らかにした (*Am. J. Pathol.* 2014)。さらに最近、Oncostatin M (OSM) が肝線維化に極めて重要な役割を果たすことを見出した。OSM は肝星細胞に直接作用し、Timp-1を誘導することで線維の溶解を阻害する一方で、骨髄由来マクロファージに作用すると profibrotic な活性化を促し、肝星細胞のコラーゲン産生を増強していることを明らかにした (*Hepatology* 2017 in press)。

一方、LPC については、我々が以前に LPC マーカーとして同定した TROP2 (*Development* 2009) に着目し、Cre ノックインマウスを作製して細胞系譜追跡実験を行っている。その結果、TROP2でラベルされた LPC は、原発性硬化性胆管炎 (PSC) モデルでは胆管へ分化し、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) モデルでは肝細胞へ分化することを確認している (図、未発表)。しかし、胆管障害と肝細胞障害という異なる障害により出現する LPC の性状の違いや分化の制御機構は未だ不明である。現在、性状の違いを規定する分子を1つ同定しており、その解析を進めるとともに、分化の方向性に関わるダイニングコードについても解析を進めている。



細胞死制御異常による ヒト遺伝性疾患の病態解明

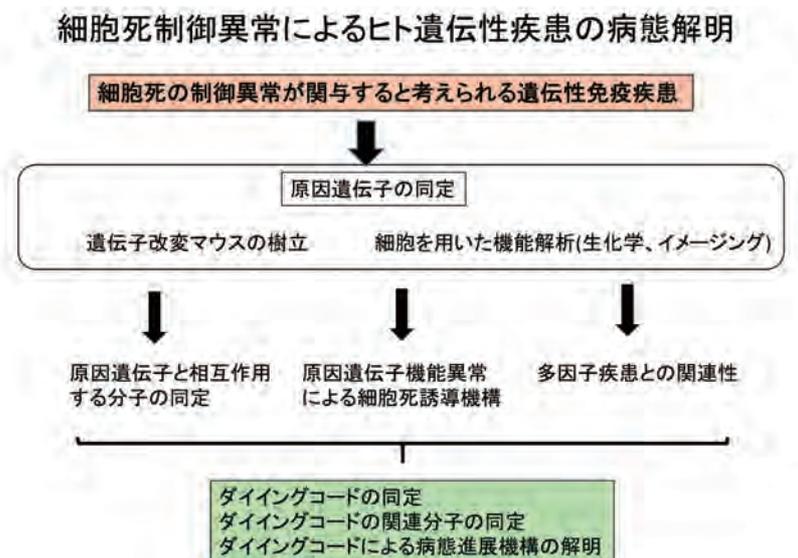
研究代表者：安友 康二（徳島大学・大学院医歯薬学研究部）



細胞死は生体の発生および恒常性の維持に必須の細胞機能である一方で、細胞死の機能異常は様々な疾病の進展に関与しているという知見が蓄積しつつある。しかし、実際にヒト疾患のどのような病態に細胞死の機能異常が関与し、生体恒常性の破綻に寄与しているかについての詳細は不明である。我々の研究グループでは、ヒト遺伝性疾患の病態に焦点を当てて細胞死の機能異常がどのようにヒト疾患の進展に寄与するかについて明らかにし、それに関わるダイニングコードを同定する事を研究目的としている。

複数の疾患を対象とするが、その中の疾患の一つは、クリオピリン関連周期性発熱症候群（CAPS； Cryopyrin-associated periodic syndrome）である。CAPS は症状の違いにより、家族性寒冷自己炎症症候群（FCAS）、マックル・ウェルズ症候群（MWS）、新生児期発症多臓器系炎症性疾患（NOMID）に分類される。いずれの病態にも、IL-1 β 過剰産生と pyroptosis による細胞死の亢進が関与していると考えられている。これまで、CAPS の原因遺伝子としては NLRP3 が知られていたが、我々の研究グループでは FCAS のもう一つの原因遺伝子として NLRC4 を同定した。NLRC4 は細胞内の細菌のセンサーとして機能することが知られている分子であるが、ヒト疾患との関連性は明らかではなかった。我々は、NLRC4 のヘテロ missense 変異によって、NLRC4 タンパクの重合が促進し、重合した NLRC4 は procaspase1 の切断を促し、活性化型 caspase1 は IL-1 β の分泌と pyroptosis を亢進させていることを見いだした。他のグループから、NLRC4 の他の変異では炎症性腸疾患やマクロファージ活性化症候群が発症することが報告され、NLRC4 の過剰活性化は多様な自己炎症性病態を引き起こすことが明らかになった。以上から、本研究では、NLRC4 の活性機構の解明、NLRC4 の活性化を修飾する分子の同定、NLRC4 を阻害する方法論の開発を研究目的としている。また、NLRC4 の活性化を促す内因性のリガンドの存在の有無についても検討する予定である。

CAPS 以外にも細胞死の機能異常がその病態進展に関与する遺伝性免疫疾患が存在しており、その病態進展に関与するダイニングコードを同定し、細胞死の機能異常とヒト疾病の病態との関連性を明らかにすることも研究目的としている。



細胞死に伴って放出される 内因性糖脂質アジュバント の同定

研究代表者：山崎 晶 (大阪大学・微生物病研究所/
免疫フロンティア研究センター/九州大学・生態防御医学研究所)
研究分担者：宮本 智文 (九州大学・薬学部)



近年、自然免疫受容体としてのC型レクチン受容体が注目されてきているが、内因性リガンドの詳細は未だ不明な点が多い。我々は、ストレスに伴ってマクロファージ、樹状細胞、好中球、単球上に発現するC型レクチン受容体であるMincle (Macrophage inducible C-type lectin) が死細胞を認識する活性化受容体であることを見出ししてきた。

一方我々は、Mincle 及びそのファミリー分子が非自己病原体を認識することを見出し、そのリガンドとして、トレハロースジミコール酸をはじめとしたアジュバント活性を有する糖脂質を同定してきている。同定された複数のリガンド糖脂質の類似性から、Mincle は主要な糖としてグルコース、マンノースを有し、脂肪酸鎖を有する両親媒性の糖脂質を認識することが判明した。結晶構造解析の結果、糖結合部位、脂肪酸結合部位も同定され、上記の構造活性相関を裏付ける結果となった。こうした知見は、Mincle が死細胞に起因する内因性の何らかの脂質を認識することで、損傷自己に対する免疫応答に寄与している可能性を示唆する。

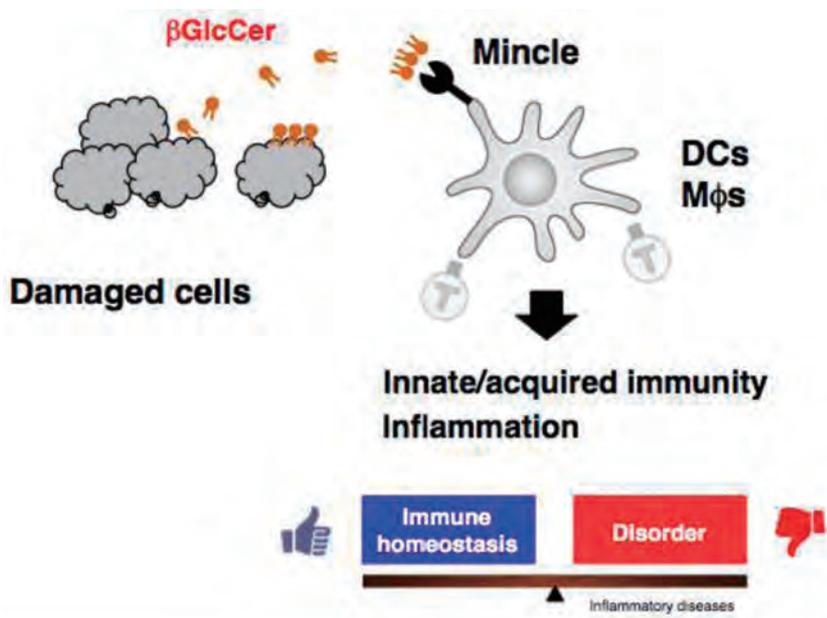
そこで、死細胞、或いは死細胞上清から脂質画分を精製し、クロマトグラフィー分離後、各フラクションのリガンド活性を検討した結果、複数の陽性画分を検出した。更なる分離精製と構造決定の結果、いくつかの内因性脂質が同定された。これらの脂質は実際樹状細胞を活性化して抗原提示機能を亢進させ、獲得免疫応答を増強するアジュバント機能を有することも明らかとなった。

これらの結果から、Mincle が、通常正常な生体の細胞外環境には存在しないような脂質の存在を感知し、生体の危機を知らせ、免疫応答を発動させるセンサーとして働いている可能性が強く示唆された。

Mincle をはじめとしたC型レクチン受容体は、遺伝子重複を繰り返してきたと考えられており、ヒト、マウスゲノム上で遺伝子クラスターを形成している。近年、これらの構造的に類似したC型レクチン受容体はそれぞれ少しずつ異なったリガンドを認識し、それぞれ特有の細胞を活性化する自然免疫受容体として

機能していることも判明してきた。我々は、この中のいくつかの受容体がやはり損傷自己を認識し得ることを見出しつつある。

本研究ではこうした知見に基づき、損傷自己を感知する受容体群の同定と、それらが誘導する生体応答の生理的、病理的意義を明らかにすることを目的とする。



細胞死に伴い産生される リゾリン脂質の機能解明

研究代表者：青木 淳賢（東北大学・大学院薬学研究科）



リゾリン脂質は脂肪酸を1本だけ持つリン脂質である。リゾリン脂質はリン脂質生合成の中間産物やアラキドン酸カスケードの副産物であり、生理活性を持つものとは認識されていなかった。1990年後半以降、リゾホスファチジン酸（LPA）やスフィンゴシン1リン酸（S1P）の受容体が発見され、また、最近ではリゾホスファチジルセリン（LysoPS）、リゾホスファチジルグルコース（LPGlc）に特異的に応答する受容体が発見され、さらに産生経路も解明されてきた。このような経緯から、生体内には種々のリゾリン脂質が脂質メディエーターとしてさまざまな生命現象に関与すると考えられている。

現在の問いは、これらリゾリン脂質が生体内の如何なる場所で産生され、どのような機能を持っているかである。我々は最近、質量分析技術によりLPA、LysoPSを含めた全リゾリン脂質を一斉定量する系を確立した。その結果、通常時LPA、LysoPSは受容体を活性化するに至らない量（数nM程度）しか存在しないことが、さまざまなヒト臨床、マウス病態モデルサンプルでは、リゾホスファチジルコリン（LPC）、リゾホスファチジリエタノールアミン（LPE）、LPA、LysoPS、リゾホスファチジルグリセロール（LPG）のレベルが上昇することがわかった。特に、細胞死を伴うヒト病態、マウス病態モデルでその変動は顕著であった。例えば、心筋梗塞の病態ではヒト病態、マウスモデルのどちらでもドコサヘキサエン酸（DHA）を含有するリゾリン脂質が劇的に上昇していた。また、抗原免疫を行った際、所属リンパ節で活性化したリンパ球は細胞死を起こすことが知られているが、そのような部位でLysoPSが産生されていた。

そこでこのような状況のもと、本研究では細胞死に伴い産生されるリゾリン脂質をダイニングコードと位置づけ、リゾリン脂質産生酵素、受容体のKOマウスを用い、その機能解明を試みる。また、本研究では、質量顕微鏡を含めた質量分析機器を多用するが、本領域の班員の先生方に本技術を公開し本領域の発展に貢献したい。

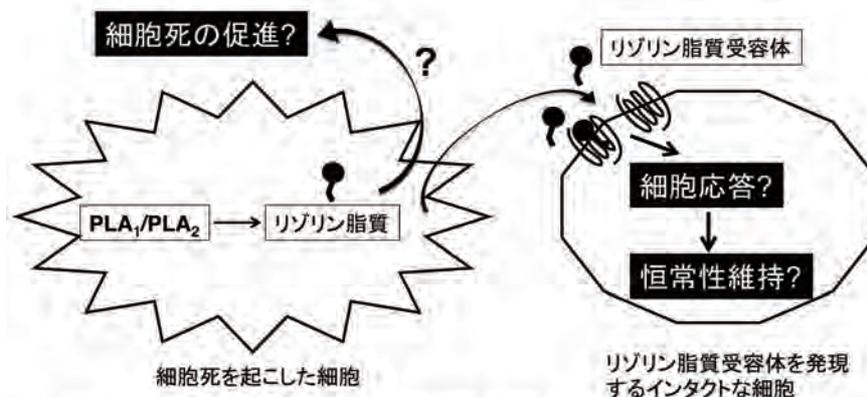


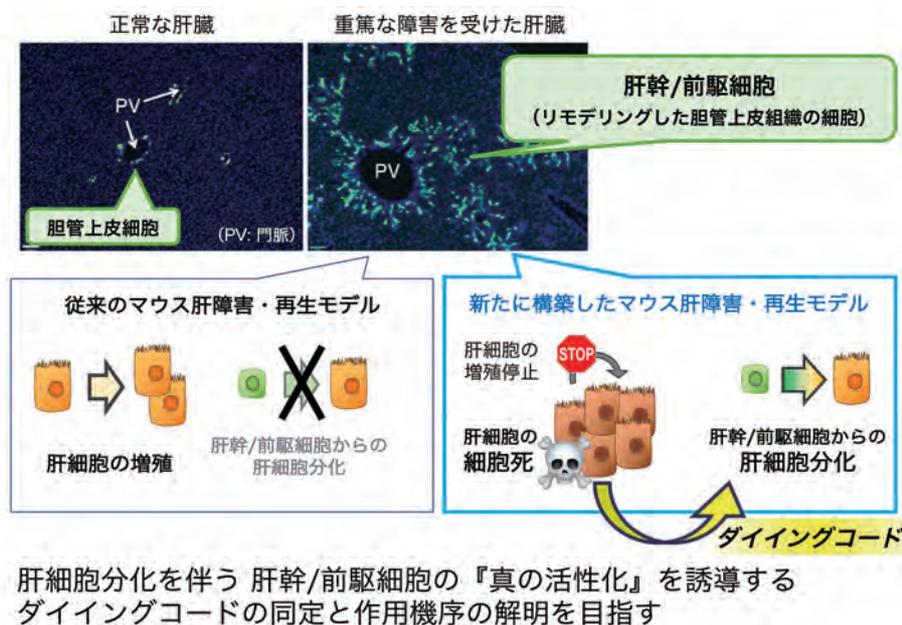
図 リゾリン脂質は細胞死に伴い何らかのPLA₁/PLA₂分子により産生される。産生されたリゾリン脂質は産生細胞内で何らかの機構で細胞死を促進する。一方、死細胞からはリゾリン脂質が周囲に拡散し、インтактな細胞上のリゾリン脂質受容体が活性化され、何らかの細胞応答が引き起こされることで、組織の恒常性が維持される。

「組織幹／前駆細胞の分化による肝臓の再生応答を惹起するダイニングコードの解明」



研究代表者：伊藤 暢（東京大学・分子細胞生物学研究所）

代謝や解毒の中心器官である肝臓は、多様な障害に対する高い再生能力を有しており、病態に応じて異なる様式で再生することが知られています。重篤あるいは慢性的な障害をうけた肝臓では、組織中の肝幹／前駆細胞の活性化が誘導され、再生を担うとされています [Miyajima A, Tanaka M, Itoh T. *Cell Stem Cell*, 2014 (Review)]。肝幹／前駆細胞の活性化という現象は、【肝内の胆管上皮組織構造のリモデリング】と、【胆管上皮組織を構成する細胞から肝細胞への分化】という、2つの異なるプロセスから成り立っています。我々はこれまで、マウス肝内の胆管上皮組織 3 次元構造の可視化という独自の解析手法を構築・駆使することで、胆管上皮組織リモデリングの存在を世界に先駆けて見出し、その制御機構の分子・細胞レベルでの解析に取り組んできました [Takase HM et al. *Genes Dev*, 2013 ; Kaneko K et al. *Hepatology*, 2015 ; Kamimoto K et al. *eLife*, 2016等]。その一方で、胆管上皮組織から肝細胞への分化というプロセスについては、これを実際に生体内で誘導可能なマウス肝障害モデルがこれまで確立されておらず、その実態や制御機構を解明するうえでの大きな障壁となってきました [Itoh T. *Hepatology*, 2016 (Review)]。我々は最近、ヒト慢性肝疾患の病態から着想を得て、生体マウス肝細胞への遺伝子導入により細胞ストレス応答経路の人為的な活性化の誘導を試みました。こうした系により広範な肝細胞での細胞増殖停止と細胞死を誘導することで、胆管上皮組織リモデリングのみならず、胆管上皮組織から肝細胞への分化をも実現する系の構築に成功しました。本研究計画では、この新規マウス肝障害・再生モデルを活用することにより、肝細胞の細胞死を起点として発せられ、肝細胞分化を伴う肝幹／前駆細胞の『真の活性化』を誘導するダイニングコードの同定に取り組みます。そうしたダイニングコードの作用により、肝幹／前駆細胞の活性化・肝細胞への分化を介した再生応答が惹起されるまでの一連の過程を解明することで、肝臓における細胞死を起点とした生体反応誘導ならびに肝再生の原理の理解を目指します。



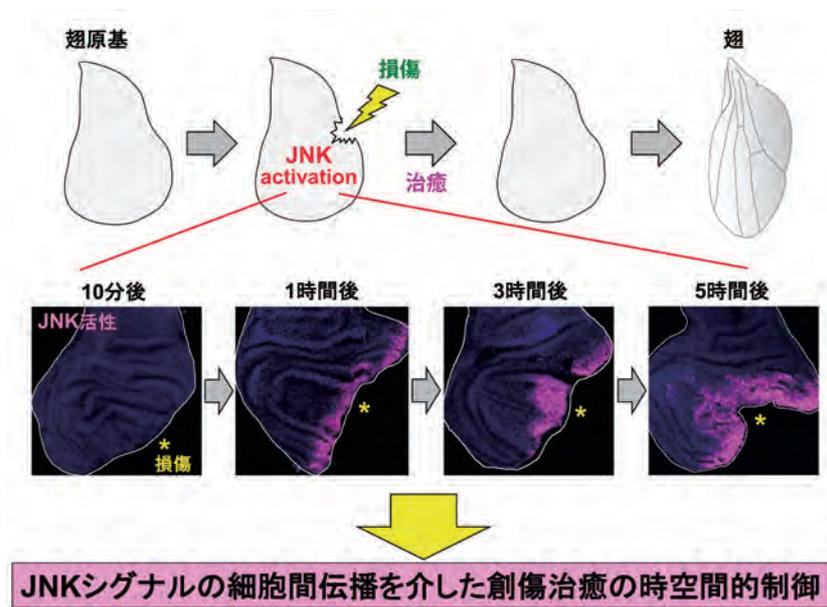
死細胞が残した 細胞間シグナルネットワークを 介した創傷治癒制御



研究代表者：榎本 将人 (京都大学・生命科学研究所)

多細胞生物において組織に損傷が生じたとき、細胞死を引き起こした細胞は単に排除されるだけでなく、周辺の生存細胞にメッセージ（シグナル）を発信することで損傷の修復や組織の再生を促すことが分かりつつあります。例えば、死にゆく細胞は増殖因子やサイトカインを分泌し、周辺細胞の増殖を促す代償性増殖によって組織内の細胞の定足数を維持しています。しかしながら、創傷治癒は死細胞の周辺細胞が増殖すれば完遂するような単純な生体プロセスではなく、細胞骨格・細胞外マトリックスの再構成や損傷によって失われた細胞と同一の細胞を生み出すための生存細胞の細胞運命転換など複数の現象が秩序だてて起こることで実現されています。そのため、創傷治癒の動作原理を真に理解するには、傷害（細胞死）に対する生き残った細胞の振る舞いを組織レベル（細胞集団レベル）で捉えることが重要であると考えられます。

私は最近、ショウジョウバエ上皮をモデルとして創傷治癒の制御メカニズムを明らかにする過程で組織損傷に応答して活性化する JNK シグナルが損傷部位から周辺細胞へと伝播していく現象を見出しました。この JNK シグナルの細胞間伝播メカニズムを解析したところ、Adam プロテアーゼを介した TNF のシェディングによって制御されていることが分かってきました。さらに、JNK シグナルの細胞間伝播を遺伝学的にブロックすると創傷治癒の破綻を引き起こしました。これらの知見は、損傷組織において JNK シグナルが細胞間を伝播していくことで生存細胞の挙動を集団レベルで制御し創傷治癒を促している可能性を示唆しています。そこで私は、組織損傷によって活性化する JNK シグナルの細胞間伝播をダイニングコードと捉えて、死細胞が形成するシグナルネットワークによる創傷治癒の動的制御メカニズムを明らかにして、細胞死を起点とした生体応答制御システムの理解に貢献したいと考えています。



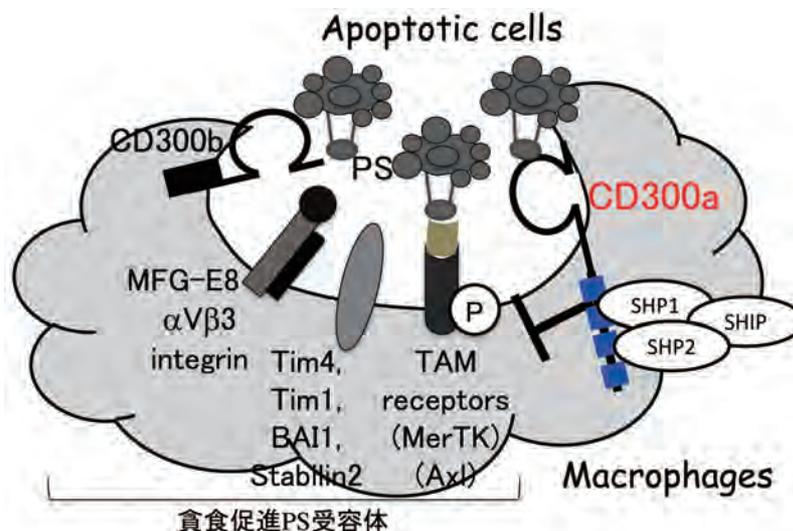
アポトーシス細胞の貪食シグナル に対する負の制御機構と その生理的意義の解明



研究代表者：小田ちぐさ（筑波大学・医学医療系・生命医科学域）

ヒトの体内では毎秒100万個以上の細胞にアポトーシスが誘導されるが、通常はマクロファージなどの貪食細胞による死細胞の貪食が速やかに行われているために、生体の恒常性が維持されている。しかし一方で、貪食機能の過度の亢進は、貪食されるべきでない生細胞の貪食による、血球貪食症候群などの疾患につながる。したがって、生体には貪食機能の適切な制御が必須である。貪食は、死細胞や活性化した細胞で表出してくる、膜リン脂質であるホスファチジルセリン（phosphatidylserine; PS）を目印に、貪食細胞上の Tim-1, Tim-3, Stabilin-2, BAI1, GAS6-TAM receptor や MFG-E8 (Milk fat globule-EGF-factor8) - integrin などの PS 受容体が結合することによって、開始されることが知られている。この PS と結合する貪食細胞上の PS 受容体は、貪食を開始、促進させる受容体のみがこれまで報告されている (Elliott et al. *Developmental Cell* 2016)。しかし、PS を介した貪食を負に制御する機構については不明であった。

私たちは、貪食細胞などの骨髄球系細胞に発現する抑制性免疫受容体である CD300a を同定し、CD300a が新しい PS 受容体であることを明らかにしてきた。最近、私たちは、マクロファージ上に発現する CD300a が PS と結合して、貪食を抑制しているというこれまで知られていなかった現象を見いだした。貪食を抑制する CD300a 受容体の存在は、貪食機能が、ただダイニングコードである PS を表出する死細胞を食べるだけでなく、厳密に制御されたシステムを有することを意味する。本研究では、PS 受容体 CD300a による死細胞の貪食抑制メカニズムと、その病理学的意義を明らかにすることを目的としている。本研究で新たに、ダイニングコードによる貪食促進機能に対する負の制御機構が明らかになれば、生体の恒常性を維持するためのシステムの一部を明らかにすることにつながる。また、その制御メカニズムが明らかになれば、貪食機能を制御することが可能になるため、これまで原因が明らかにならなかった様々な貪食機能の異常を伴う疾患の病態解明および、新たな治療につながる可能性がある。



CD300a受容体によるアポトーシス細胞の貪食抑制メカニズムの解明

パイロトーシスが関与する 稀少疾患の新規遺伝子変異同定と 病態解明



研究代表者：北浦 次郎（順天堂大学・大学院医学研究科・アトピー疾患研究センター）

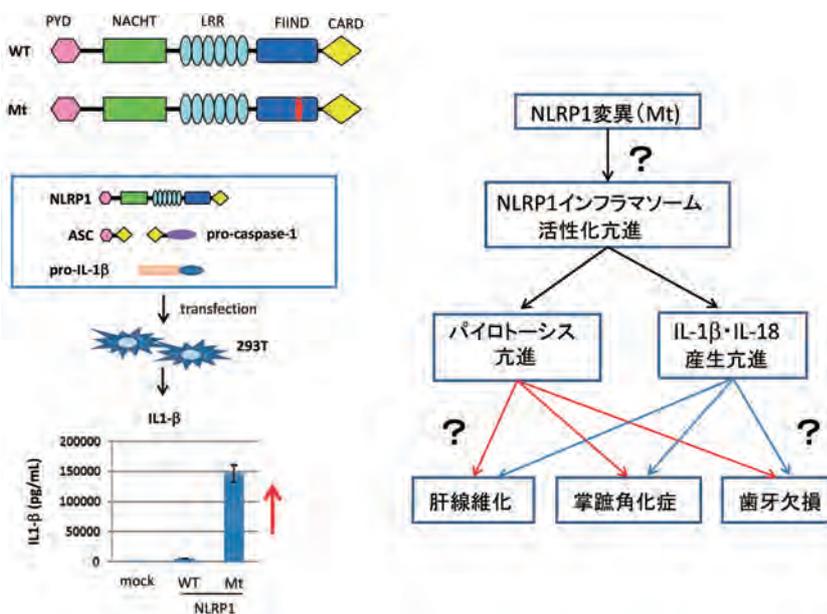
インフラマソームは外来性因子（病原体など）や内在性因子により活性化される細胞質内タンパク質複合体である。NLRP1・NLRP3・NLRC4などのNod-like receptors (NLRs)、procaspase-1、(必要に応じて) ASC で構成されるインフラマソームは、caspase-1の活性化を介してIL-1 β ・IL-18の分泌やパイロトーシスと呼ばれるプログラム細胞死を誘導する。IL-1 β ・IL-18の産生とパイロトーシスは密接に関係しながら感染防御や炎症性疾患の病態形成に関与する。近年、繰り返す発熱などを主徴とする自己炎症疾患の原因としてNLRP3やNLRC4の遺伝子変異が同定された。

我々は、肝臓線維化・歯牙欠損・軽度の掌蹠角化症・SLE 様症状を有する稀少疾患患者由来 DNA のエクソンシーケンスからNLRP1の *de novo* 変異を見出し（連携研究者：安戸裕貴・東大小児科）、「NLRP1の遺伝子変異が本稀少疾患の原因である」可能性を考慮した。実際、293T 細胞にNLRP1、ASC, procaspase-1、pro-IL-1 β を一過性に発現させてIL-1 β の産生量を測定する系において、この変異型NLRP1は著しく多量のIL-1 β 産生を誘導（NLRP1インフラマソームを強力に活性化）することを確認した（未発表）。

ヒトNLRP1にはN末からPyrin・NACHT・LRR・FIIND・CARD ドメインが連なるが、マウスNLRP1にはPyrin ドメインがないNLRP1a・NLRP1bが存在する。NLRP1a 活性化型変異をもつマウスは全身の炎症所見とパイロトーシスの亢進に伴う造血前駆細胞の減少を認める（Masters, Immunity, 2012）。NLRP1インフラマソーム活性化のメカニズムはヒト・マウス間で異なり不明な点が多いが、FIIND ドメインにおけるNLRP1の切断はインフラマソーム活性化に必要とされる。この患者由来のNLRP1変異はFIIND ドメイン内に位置する。最近、NLRP1のPYDあるいはLRR ドメインの変異がそれぞれ multiple self-healing palmoplantar carcinoma (MSPC) と familial keratosis lichenoides chronica (FKLC) の原因となることが示された（Zhong, Cell, 2016）。

これらの背景を基に、我々は、本患者由来のNLRP1変異によるインフラマソーム活性化のメカニズムを

解明しつつ、IL-1 β ・IL-18の産生及びパイロトーシスの亢進と病態（歯牙欠損・肝臓線維化・SLE 様症状・掌蹠角化症）との関連を明らかにする予定である。また、細菌・真菌によるNLRP1インフラマソーム活性化と病態との関連も解析する（連携研究者：金城雄樹・国立感染症研究所と協力して）予定である。



成体脳のニューロン再生における死細胞の貪食過程とその意義



研究代表者：澤本 和延（名古屋市立大学・大学院医学研究科）

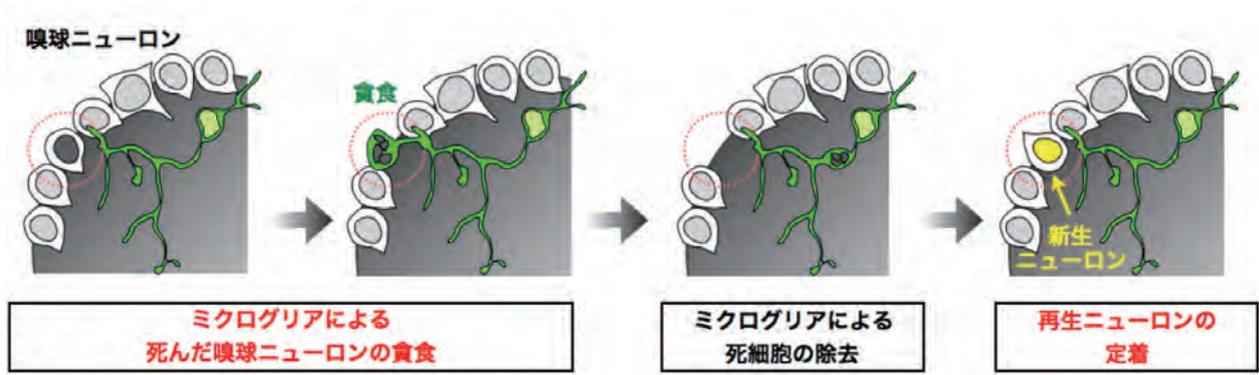
従来、成体脳のニューロンは、細胞死によって減少する一方と考えられてきた。しかし近年の研究により、神経幹細胞から継続的に新しいニューロンが産生され、脳内の特定の領域ではニューロンが入れ替わっていることが明らかになった。

嗅球では、脳室下帯に存在する神経幹細胞から生涯にわたって新生ニューロンが供給される一方、古い細胞は細胞死によって除去される。このようなニューロンのターンオーバーは、嗅覚入力の影響を受け、嗅覚神経回路を維持するとともに、外界の環境に応じて神経回路を最適化する役割を果たしていると考えられる。

我々は、成体脳の脳室下帯で産生される嗅球ニューロンの移動・成熟機構を研究し、そのメカニズムを明らかにしてきた。これまでの研究からニューロンの細胞死がその後の再生を誘導するのではないかと想定されているものの、その具体的な過程については、ほとんど解明されていない。

嗅球においては、細胞が活発に入れ替わっているにも関わらず、組織構築には一見大きな変化は見られない。我々は、このことから、細胞が死んだ場所に新しい細胞が優先的に組み込まれるメカニズムが存在するのではないか？という仮説を立てた。二光子顕微鏡を用いて、細胞が死ぬ場所と新しい細胞が加わる場所を観察したところ、細胞が死ぬ場所に、同じ種類のニューロンが効率よく生着すること、そしてその効率は嗅覚入力によって高くなることを見出した。ダイニングコードの公募研究においては、嗅球内で死んだニューロンを貪食するミクログリアに着目し、死細胞の除去と新しいニューロンの定着における動きを研究中である。

また我々のグループでは、嗅球におけるニューロンの細胞死と再生の研究に加えて、脳梗塞や外傷などの脳疾患の動物モデルを用いて、ニューロンやグリア細胞の再生メカニズムの研究を行っている。これらの病態における細胞死と再生の関係は未解明な点が多い。多様な細胞死のメカニズムを研究する本領域の先生方との共同研究による新たな展開も期待している。



細胞死によって誘導される 脳梗塞後の神経修復メカニズム

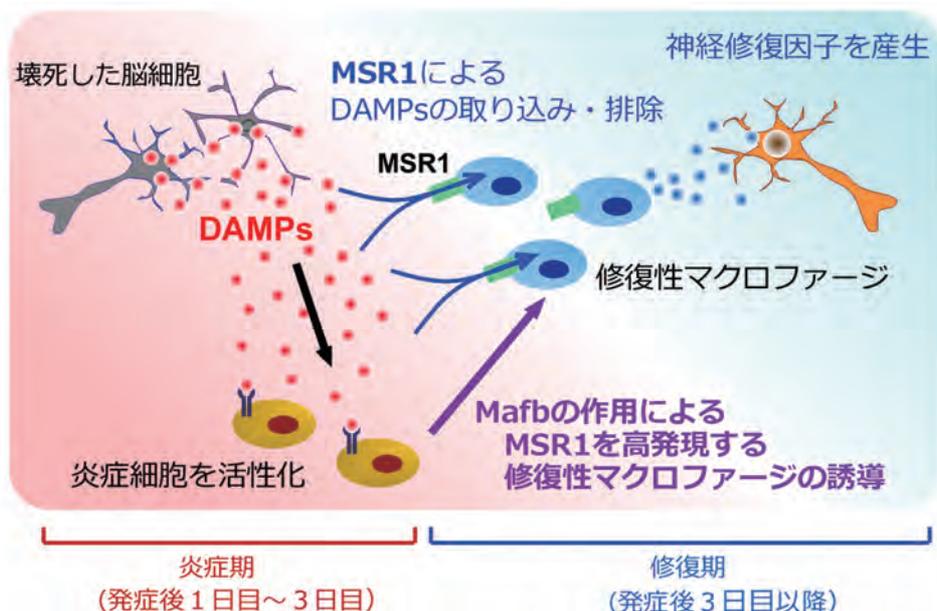
研究代表者：七田 崇（東京都医学総合研究所）



高齢化社会を迎えて本邦では脳卒中患者の増加が懸念されている。脳卒中の約7割が脳梗塞であるが、脳梗塞に対する有効な治療法はまだ乏しく、神経機能を改善する手段に至っては現状、リハビリのみである。脳梗塞に対する有効な治療法の開発には、治療標的となる分子や現象を定める必要がある。

脳梗塞後の炎症は、虚血に伴う脳細胞死によって、細胞内の核酸、タンパク、脂質などが細胞外に放出されて免疫細胞を活性化することにより惹起される。このような内因性の炎症惹起因子は DAMPs (Damage-associated molecular patterns) と呼ばれている。我々は、虚血壊死した脳細胞から放出される DAMPs として Peroxiredoxin を同定し、脳梗塞後に惹起される一連の炎症メカニズムを解明した。さらに DAMPs は脳内に浸潤したマクロファージによって細胞内に取り込まれて排除される。DAMPs の排除メカニズムは脳梗塞後の炎症収束のために重要な役割を担っている。前回の公募研究において、DAMPs を排除する受容体としてスカベンジャー受容体の1つである MSR1 を同定し、脳梗塞後の炎症収束期には MSR1 を高発現するマクロファージが脳内で誘導されることを見出した。MSR1 を高発現するマクロファージは、転写因子 Mafk 依存的に脳内で誘導され、炎症性因子を産生せずに神経栄養因子を産生する明確な修復担当細胞であった（七田ら、*Nat Med* 2017）。

以上のように、脳梗塞後の炎症収束、神経修復に働く細胞集団を同定できたが、その誘導メカニズムにはまだ不明な点が多い。炎症は明らかに修復誘導機構と直結しており、その起点は紛れもなく脳梗塞後の大量の細胞死である。本研究では脳梗塞後の炎症が神経修復を誘導する分子メカニズムを解明する。本邦は高齢化社会を迎えるにあたり脳卒中患者の機能予後を改善するような治療法の開発が急務となっている。本研究課題によって、積極的に炎症を収束させて神経機能の回復を図るような、新たな脳卒中医療を行うための治療標的を決定する。



ダイニングコードによる 組織破壊・修復バランスの 制御機構の解明

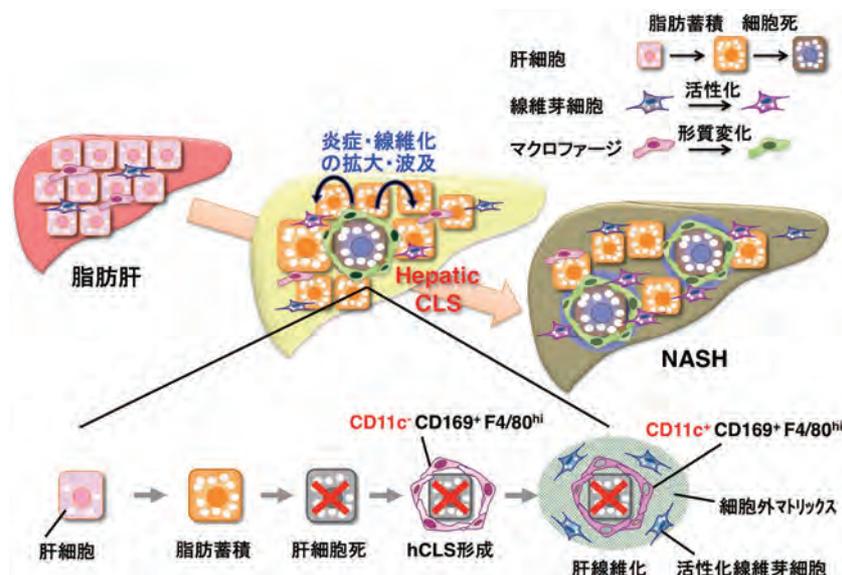


研究代表者：菅波 孝祥（名古屋大学・環境医学研究所）

近年、肥満を中心として発症するメタボリックシンドロームの基盤病態として、「慢性炎症」の重要性が注目されている。慢性炎症では、種々のストレスに対する実質細胞と間質細胞の複雑な細胞間コミュニケーションが持続し、最終的には間質の線維化を来して臓器機能不全に至る。最近、我々は、crown-like structure (CLS) と呼ばれる特徴的な組織像が肥満の脂肪組織や非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に共通して形成され、ここを核として組織線維化が進行することを見出した。CLS では、脂肪を過剰に蓄積して細胞死に陥った実質細胞（肝細胞、脂肪細胞）をマクロファージが取り囲み、貪食・処理している。即ち、CLS は、死細胞を起点とする細胞応答の微小環境であり、過栄養に伴う「代謝性組織リモデリング」の駆動エンジンとして働いている。

本研究において我々は、肝常在性マクロファージ（クッパー細胞、 $F4/80^{hi}$ $CD11b^{+}$ ）の一部が死細胞に応答して形質転換することにより肝線維化促進的に働き、単純性脂肪肝から NASH を発症することを見出した。実際、 $CD169$ -DTR (human diphtheria toxin receptor) マウスを用いて肝常在性マクロファージを消去したところ、CLS は形成されず、肝線維化も認めなかった。さらに、CLS 形成過程を詳細に解析することにより、肝常在性マクロファージが $CD11c$ 陽性に変化することを見出した。そこで、 $CD11c$ -DTR マウスを用いて $CD11c$ 陽性細胞を消去したところ、CLS が消失し肝線維化も抑制された。ヒト肝生検サンプルを用いて検討したところ、 $CD11c$ 陽性 CLS は肝障害や肝線維化を反映し、ヒト NASH における意義も示唆された。

本研究により、肝臓において死細胞を核とする微小環境が線維化に重要な役割を果たすことを見出した。従来、骨髄より肝臓に浸潤するマクロファージが肝線維化に寄与することが知られているが、死細胞により活性化する肝常在性マクロファージの意義が初めて明らかになった。(JCI Insight, *in press*)

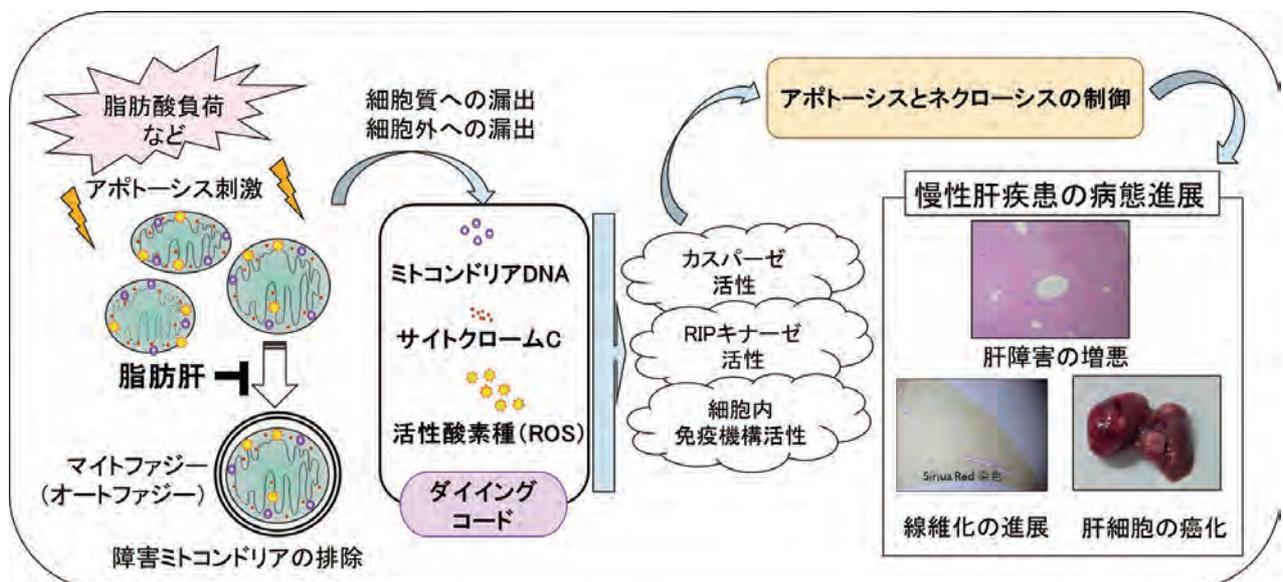


障害ミトコンドリアからの ダイニングコード漏出による 脂肪性肝疾患の進展機序の解明



研究代表者：竹原 徹郎（大阪大学・大学院医学系研究科）

肝細胞に脂肪滴が蓄積する脂肪肝は、極めて有病率の高い生活習慣病の一つである。約10%の症例で非アルコール性脂肪肝炎（NASH）を発症し、肝硬変・肝癌へと進展する。我々は脂肪肝でオートファジーは抑制されていることを明らかにした（Tanaka S, et al. Hepatology. 2016）。一方、脂肪酸負荷をはじめとするアポトーシス刺激はミトコンドリア障害を誘導することも明らかにしてきた（Tanaka S, et al. Hepatology. 2016, Hikita H, et al. Cancer Prev Res. 2015.）。障害されたミトコンドリアはミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーにより速やかに除去されるが、脂肪肝では除去されずに、障害ミトコンドリアの蓄積が認められる。ミトコンドリアはミトコンドリア DNA（mtDNA）をはじめとする種々のダイニングコードを含有したオルガネラであり、障害ミトコンドリアの蓄積はダイニングコードの漏出を惹起すると考えられる。我々は、脂肪肝では mtDNA を分解する酵素活性が低下していること、ミトコンドリア経路のアポトーシスが活性化した肝細胞において、mtDNA の分解を抑制するとネクローシスが増加することを見出している。肝細胞ネクローシスの増加は肝臓の炎症を増悪させる可能性がある。そこで本研究課題では、ミトコンドリア障害の蓄積によるミトコンドリアからの mtDNA を始めとするダイニングコード漏出が、脂肪性肝疾患の病態進展に与える影響を明らかにする。mtDNA による細胞内免疫機構の活性化、サイトクローム c や活性酸素種（ROS）による細胞内免疫機構の修飾および細胞死機構の活性化が、肝臓の炎症・線維化・発癌に与える影響を解明する。本研究の遂行を通じて、障害ミトコンドリアからのダイニングコード漏出という視点から脂肪性肝疾患の病態進展を検討し、ダイニングコードの制御を標的とした、脂肪性肝疾患に対する新規治療戦略の開発につなげたい。



筋線維芽細胞による死細胞の貪食が組織の線維化に及ぼす影響の解析



研究代表者：仲矢 道雄（九州大学・薬学研究院）

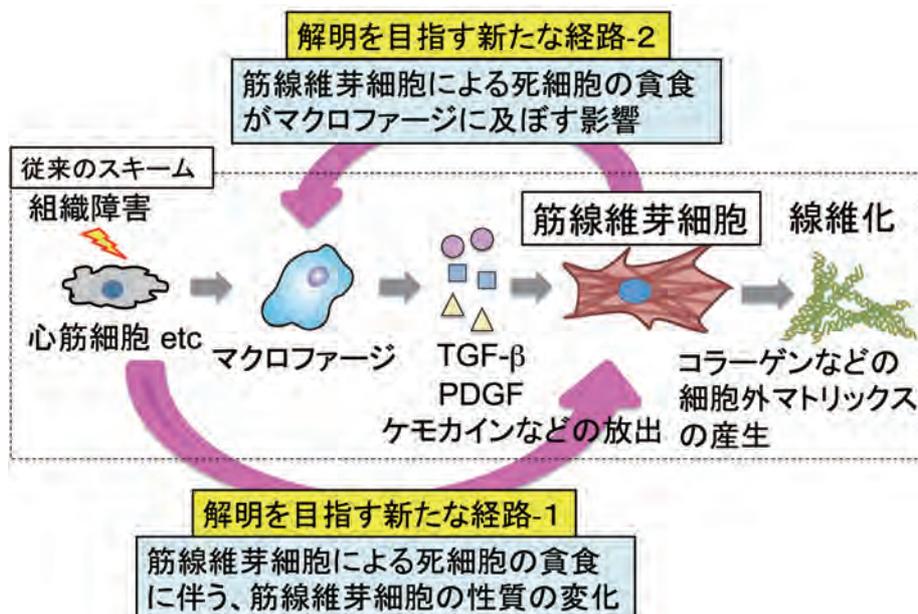
組織が損傷すると、細胞死を契機に、組織の線維化がおこる。従来、線維化の微小環境においては「マクロファージによる炎症惹起物質の認識と死細胞の貪食」→「マクロファージからの TGF- β や PDGF などの放出」→「筋線維芽細胞によるそれら放出物質の感知」→「筋線維芽細胞による線維化の実行」という順に、応答が起こると考えられてきた（研究概要の図、従来のスキーム）。

私達は、心筋梗塞時の死細胞除去機構を研究する過程で、これまで死細胞を貪食すると思われていなかった、筋線維芽細胞が死細胞を効率よく貪食することを見出した。この発見は、これまでマクロファージからの指令を受けて、線維化を実行する細胞としてのみ捉えられていた筋線維芽細胞が、実はマクロファージのみが行うと考えられてきた機能をも担うことを示す。

そこで本研究では、申請者は独自に見出した「筋線維芽細胞がマクロファージと同様に死細胞を貪食する」という発見を基に、新たな線維化スキームの構築を目指し、死細胞を貪食することによる筋線維芽細胞の炎症、線維化特性の変化、及びその変化がマクロファージに及ぼす影響に焦点を当て（研究概要の図の解明を目指す新たな経路-1、2）、研究を行う。具体的には、主として以下の研究を行う。

〈1〉筋線維芽細胞が死細胞を貪食することにより、その「炎症」、「線維化」特性あるいはその他の生理的機能にどのような影響が出るか（研究概要の図、解明を目指す経路-1）、さらには筋線維芽細胞による死細胞の貪食によりマクロファージにどのような影響が出るか（図、解明を目指す経路-2）を *in vitro*, *in vivo* の両面から明らかにする。さらには貪食細胞として筋線維芽細胞がマクロファージのどのような性質までを保有するのかについて明らかにする。

〈2〉急性炎症（心筋梗塞）時に出現する筋線維芽細胞を用いて得られた種々の結果が、慢性炎症（高血圧による心肥大）時に出現する筋線維芽細胞においても当てはまるのかについて検討する。さらには、それら結果が、肝臓、肺の筋線維芽細胞にも当てはまるのかについても検討する。



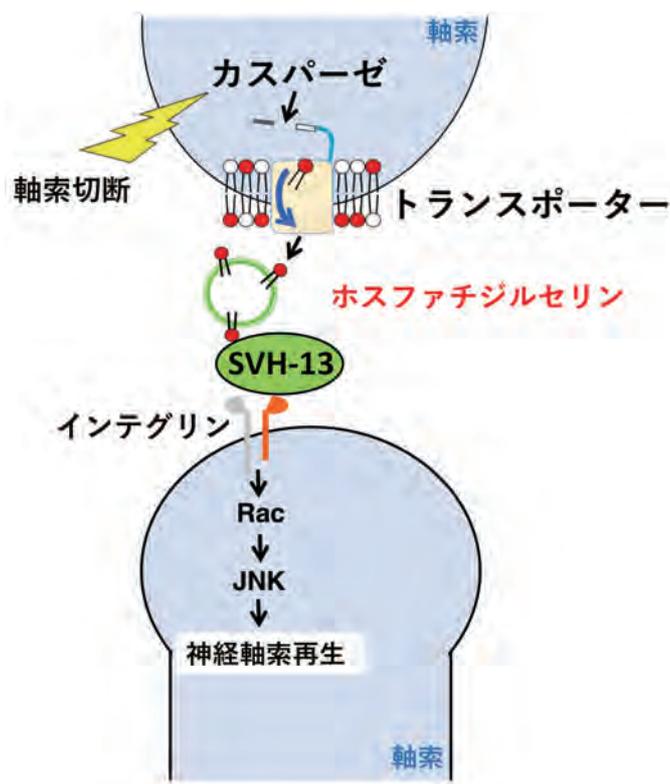
切断軸索からの ダイニングコード

研究代表者：久本 直毅（名古屋大学・大学院理学研究科）



神経軸索の再生機構の解明は、医学的には事故や疾患による神経切断や欠損の治療法を開発する上で重要であり、社会的にも喫緊の研究課題である。切断を受けた軸索は、近位側（細胞体側）と遠位側で異なる運命を辿る。通常、近位側の軸索の多くは消失せず、更に一部は軸索の先端に成長円錐を再形成して伸長するのに対し、遠位側の軸索はしばらく生存しているが、最後にはワーラー変性を起こして「死」を迎え、消失する。しかし、この遠位軸索が周囲の細胞や近位側の軸索にどのようなシグナル(ダイニングコード)を送っているのかは不明の部分が多い。

私は、線虫 *C. elegans* をモデル動物として、切断された神経軸索の再生を誘導するメカニズムについて研究を行っている。最近、切断された神経軸索が、死細胞が提示するダイニングコードのひとつであるホスファチジルセリンを放出することを見出した。またこのホスファチジルセリンの放出は、切断軸索内のトランスポーターがカスパーゼによって切断されて起こっていた。放出されたホスファチジルセリンは、脂質結合因子 SVH-13 に結合し、さらにホスファチジルセリンに結合した SVH-13 は、細胞接着分子であるインテグリンに結合して低分子量 G タンパク質 Rac を活性化し、それが JNK MAP キナーゼ経路を活性化することにより、神経軸索再生を正に制御していた。これらのことから、切断された神経軸索は死細胞のダイニングコードおよびその下流シグナルを利用して神経軸索再生を制御していると考えられる。今後、軸索切断によるカスパーゼの活性化機構およびカスパーゼによるトランスポーターの切断機構について解析することで、軸索再生におけるダイニングコードの詳細を明らかにしていきたい。



Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction

J Clin Invest. 2017 127(1) : 383-401

九州大学・薬学研究院 仲矢 道雄



心筋梗塞は冠動脈が閉塞することで生じる虚血性疾患の1つです。心筋梗塞時には、酸素や栄養が補給されていた心筋細胞が、冠動脈の閉塞によって大量に壊死します。壊死細胞からは細胞内容物が漏出し、強い炎症応答が引き起こされます。従って、梗塞部位における貪食細胞による死細胞の速やかな貪食・除去は、心筋梗塞後の病態進行の抑制に大きく貢献しています。心筋梗塞後にはマクロファージなどの血球系細胞が梗塞部位へ浸潤するため、これらの細胞のみが死細胞の除去を担うと考えられてきました。しかしながら、心筋梗塞時に生じる死細胞の除去を担う細胞が何であるか、そして、心筋梗塞時に死細胞がどのような分子メカニズムを介して貪食されるかについては、これまでほとんどわかっていませんでした。

心筋梗塞時には大量に死細胞が出現するため、マクロファージ以外にも死細胞の除去を担う細胞が存在する可能性が考えられました。そこで我々は、心筋梗塞時に梗塞部位周辺に多く観察される筋線維芽細胞に着目しました。筋線維芽細胞は、損傷時において、常在性の線維芽細胞をはじめとした様々な細胞が分化することにより生じる細胞群です。筋線維芽細胞は高いコラーゲンの産生能を有することから、梗塞部位における線維化を担う主要な細胞であるとされてきました。しかしながら、組織の線維化以外の生理的応答への筋線維芽細胞の関与については、ほとんど明らかになっていません。そこで、本

研究では、筋線維芽細胞が死細胞を貪食する可能性について検討しました。

まず、心筋梗塞処置を施したマウスの心臓から筋線維芽細胞を単離し、ex vivo で蛍光標識したアポトーシス細胞を貪食させ、その貪食能を評価した所、筋線維芽細胞は、マクロファージと同様に、死細胞を貪食することを見出しました。そこで次に実際にin vivo で筋線維芽細胞が死細胞を貪食するかについて、筋線維芽細胞のマーカー分子である α SMAとTUNELの共染色により調べた所、 α SMA陽性の細胞中にTUNEL陽性シグナルが認められ、筋線維芽細胞がin vivoにおいても死細胞を貪食することが明らかとなりました。この結果に対応し、電子顕微鏡を用いて心筋梗塞処置後のマウス心臓の切片を観察した所、死細胞を取り込んでいる筋線維芽細胞が認められました。

筋線維芽細胞が死細胞を貪食することが明らかとなったことから、その貪食を担う分子を探索しました。心筋梗塞処置によって発現量が上昇する貪食関連分子を調べた所、MFG-E8の発現量が有意に増加することを見出しました。MFG-E8とは、アポトーシス細胞表面上に露出する脂質、phosphatidylserineと貪食細胞表面上のインテグリン $\alpha v \beta 3$ 、 $\alpha v \beta 5$ の両方に結合し、両者の橋渡しをして貪食を促進する分泌蛋白質です。そこで次に、MFG-E8が筋線維芽細胞に発現するかについて心筋梗塞処置後のマウス心臓切片を用いて免疫染色等に

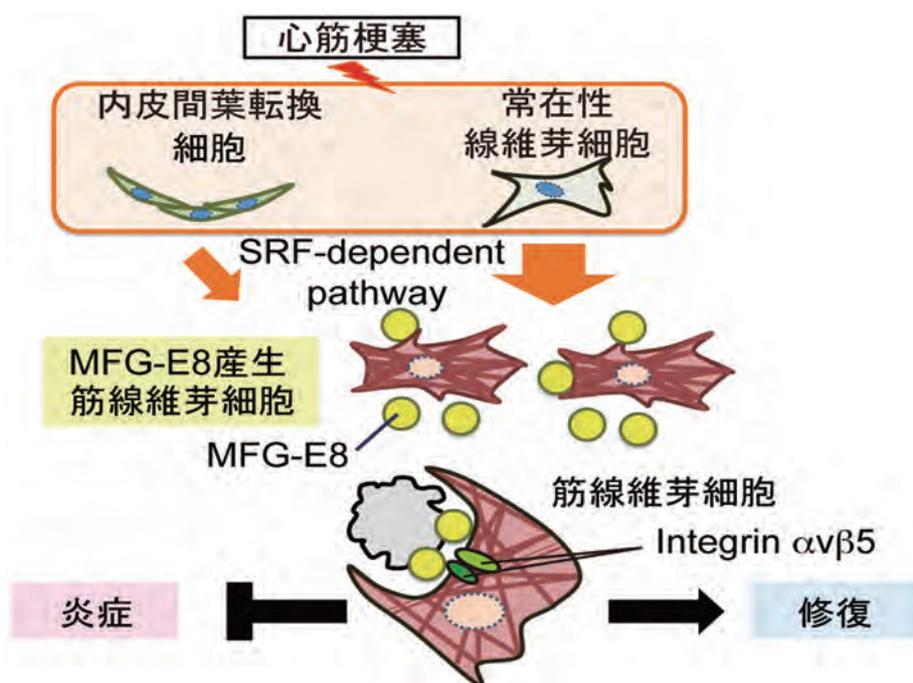
より調べた所、MFG-E8は、筋線維芽細胞に特異的に発現することが明らかとなりました。MFG-E8陽性の筋線維芽細胞は、ヒトの心筋梗塞患者心臓の梗塞部位においても認められました。また、この筋線維芽細胞におけるMFG-E8の発現は、転写因子SRFに依存していることも見出しました。

筋線維芽細胞がMFG-E8を発現していたことから、野生型およびMFG-E8KOマウスから筋線維芽細胞を単離し、その貪食能を比較しました。その結果、MFG-E8KOマウス由来の筋線維芽細胞において有意な貪食能の減少が認められ、筋線維芽細胞の貪食がMFG-E8を介していると考えられました。実際、心筋梗塞処置後3日目のMFG-E8KOマウスの心臓においては、野生型マウスの心臓に比べ、貪食されずに残存したアポトーシス細胞量が増加し、その結果、心臓における炎症の程度が増悪していました。そして、心筋梗塞処置4週間後の

心臓の肥大、線維化の程度および機能が、MFG-E8KOマウスにおいては、有意に悪化していました。

以上の結果から、MFG-E8が心筋梗塞後の心臓において死細胞の貪食を促進し、心保護的に働く蛋白質であることが明らかとなりました。MFG-E8は分泌蛋白質であり、生体への投与が可能です。そこで、心筋梗塞処置直後のマウス心臓の梗塞領域付近に精製したMFG-E8を投与し、梗塞後の病態が改善するかを検討しました。その結果、MFG-E8の投与によって、貪食されずに残存したアポトーシス細胞量および梗塞部位周辺の炎症の程度が有意に減少しました。

これまで、心筋梗塞後の死細胞除去に着目した心筋梗塞の治療法はありません。本研究が、心筋梗塞に対する新たな治療法や治療薬の開発へ繋がることを期待します。



国際学会参加記～Keystone symposiaに参加して～



東邦大学・医学部 進藤 綾大

本参加記の執筆を始める前に、出張経費を御援助いただいたダイニングコード 領域代表である田中正人先生に、この場を借りて厚く御礼申し上げます。

私は H29年 2月 5日から 9日まで米国コロラド州 キーストンで開催された Inflammation-Driven Cancer: Mechanisms to Therapy/Microbiome in Health and Disease に参加し、本学会が人生最初の海外、そして国際学会となりました。両 program を自由に行き来することができるため、渡米前より胸が高鳴っていました。

会期初日、夕刻より執り行われた Welcome mixer では知人・友人との再会で会話に花開き、終始和やかなムードに包まれていました。緊張と興奮により寝不足で迎えた翌朝、Lisa M. Coussens ならびに Sarkis K. Mazmanian による講演で 4日間にわたるワークショップがスタートしました。Inflammation-Driven Cancer: Mechanisms to Therapy ではがん形成に関わる細胞内外のイベント、特に免疫細胞や間質細胞、がん細胞のクロストークの結果もたらされる炎症の誘発・ゲノムの不安定性の増加・細胞の生と死のバランスの破綻・周辺の微小環境変化に焦点が当てられていました。一方 Microbiome in Health and Disease では生体内に数多く生息している常在細菌叢と恒常性維持ないしは疾患誘発の関連性のほか、どのようにしてヒトの常在細菌叢の変化をモニターし、またどのようにして疾患発症のリスクを予測・低下するかがキークエスションとなっていました。

Fiona M. Powrie, Michael Karin, William Michael Dunne, Dan R. Littman をはじめとする世界的権威のトークはどれも非常に興味深く、研究デザインや手技だけでなくプレゼンテーション方法も勉強になった時間

でした。聴衆を惹きつけることができるプレゼンを行うことができるよう研鑽が必要だと強く実感しました。ワークショップ後、夕食を摂った束の間、3時間もの長時間にわたりポスターセッションが行われ、この時間もまたワークショップと同様、時間ギリギリまで白熱した議論がなされていました。

今回私は、“Short form FLICE-inhibitory protein promotes TNF α -induced necroptosis in fibroblasts derived from *CFLARs* transgenic mice” という演題でポスター発表を行ってきました。発表の時間が近くにつれて“畑違いでは?”と一抹の不安にかられましたが、いざ始まると思いついで安んじました。本学会が“がん”そして“常在細菌”のフィールドであったこともあり深いディスカッションには到りませんでしたが、少しでも多くの研究者に現在の細胞死の概念を、また自身の一手技を伝える事ができ有意義な時間であったと思います。何よりも普段使わない英語で誰かと話す、ネイティブの英語に触れる事のできた時間が私には非常に貴重であったといえます。

最終日の夜は、米国らしくダンスパーティーで締めくくられました。フロアに鳴り響くクラブミュージックに心も身体も躍らせ、疲れを吹き飛ばしているようでした（先刻まで全力でディスカッションしていた権威たちからは想像もつきませんでした）。

今回の国際学会で感じたことは“いつの日か選ばれし研究者とともに口頭で発表したい”、そして“今に満足してはいけない”の2つです。大学院生活が終わり博士研究員となった今、初心に還り日々の生活に励もうと思います。初めての渡航は珍道中ではありましたが、本当に良い経験であり心から楽しかったです。

東京大学・大学院理学研究科 田中優美子



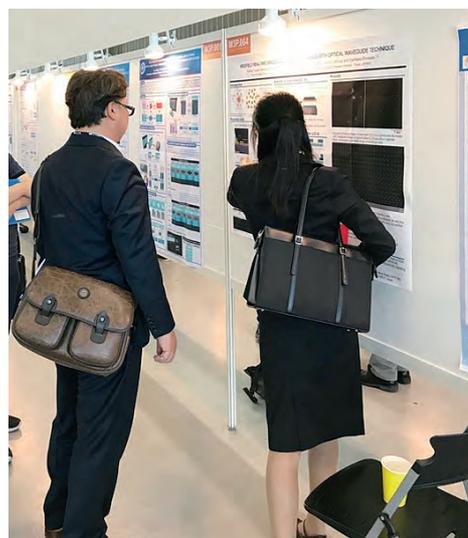
6月18日から22日まで台湾の高雄で開催されたTransducersに参加させて頂きました。様々なアクチュエーターやセンサーのほか、マイクロフルイディクスを用いた細胞制御の技術に関する発表も数多くあり、非常に学ぶことの多い学会でした。私はその中で、細胞死シグナルに応答した免疫細胞のサイトカイン産生をリアルタイムで観察することのできる導波路チップ技術について発表しました。これまで私が参加してきた学会は生物学に焦点を当てたものだったので、技術をメインとする学会に参加できたことは大きな刺激となりました。また、初めての国際学会であり、英語で様々な国の研究者と意見を交わすことの楽しさを知ることができました。

高雄は海に面している町で道は広く作られており、高層ビルと小さな商店が入り混じった独特の車社会を構成していました。近代的な構造の会場に入り、最初に目に付いたのは数々のメーカーが名を連ねた協賛企業のパネルでした。本当にここで生物を対象とした研究内容を自

分は発表するのかと不安になりましたが、生物を扱う研究の割合は高かったです。自分が発表する時も、生物を対象にしていない研究者も含めて多くの方が興味を持ってポスター発表を聞いて下さいました。このような工業色の強い技術も今では生体の制御や計測への応用が盛んに取り組まれていることを感じました。

また、サイトカイン計測のためのデバイスを開発している研究者がアメリカからも参加していました。彼らの技術の特徴はその検出感度にあり、1細胞からの微量な分子の検出に有用に見えました。もし我々の技術と組み合わせることができれば、細胞死から始まるサイトカインを用いたシグナル伝達過程をより詳細に調べることが可能となると考えられました。向こうの教授も、もし興味があれば留学に来て良いと言って下さいました。

新学術領域ダイニングコードの皆様にも、このような貴重な機会と多大なるご支援を下さったことを深く感謝申し上げます。



2017 Keystone Symposia Conference J7 : Inflammation - Driven Cancer : Mechanisms to Therapy



東邦大学・医学部 仁科 隆史

私は、米国キーストンで開催された2017 Keystone Symposia Conference J7 : Inflammation-Driven Cancer : Mechanisms to Therapyに参加し、研究発表をおこないました。本会議は、Microbiome in Health and Disease J8と合同で開催され、がん関連の研究者、ならびに細菌叢関連の研究者、約500名が参加しておりました。

近年、がんの進展と病態の変化は、腸内細菌叢の変化の影響を受けることが報告されており、合同での開催はお互いの分野の相互理解とその発展を目指したものであったと考えられます。そして会議においては、糞便移植や常在菌の変化が具体的に個体の生体応答機構にどのような変化を与えているか、またPD-1 (Programmed cell death 1) /PD-L1に対する抗体の作用機序と抗体治療不応答性機構に着目した研究報告が多くされていました。

加えて、マクロファージ、肥満細胞、ストローマ細胞や血小板に着目した炎症とがんに関する研究も多く発表されていました。特に細胞死に関連した内容では、いく

つかのグループからネクローシス様の細胞死に伴って産生されるインターロイキン (IL)-33に関する報告がされており、IL-33は腫瘍部で産生が亢進しており、大腸癌モデルをもちいた解析から、癌細胞から産生されるIL-33は、癌細胞周囲に存在するIL-33の受容体ST-2を持つ細胞に作用することで、腫瘍形成や、浸潤転移が促進されることが報告されていました。

また本会議において私は、細胞死に伴う酸化ストレスにより産生誘導されることを見出したIL-11に関して、我々が樹立したIL-11レポーターマウスを用いた大腸癌形成時におけるIL-11産生機構の解析結果を報告しました。その結果、多くの海外の研究者の方々に興味をもらい、共同研究も進められることになりました。また、本会議に参加することで多くの助言や、実験手技のコツなども知ることができ、私の研究をさらに発展させる上でも、とても有益な学会参加となりました。

本学会に参加することができたのも、本領域の支援のおかげで有り、ご支援いただいたことに、心より感謝申し上げます。



平成29年度のアウトリーチ活動

研究展示

担当：袖岡幹子、理化学研究所袖岡有機合成研究室
 関岡孝介、同上

日時：平成29年4月22日（土）

場所：理化学研究所（和光）

対象：一般市民（展示来訪者130名程度）

概要：一般市民を対象に領域で作成したアウトリーチパンフレットを配布し、パンフレットの内容に関して展示ポスターを利用して説明した。



公開講座「細胞死からの生命探究」

担当：須田貴司、金沢大学がん進展制御研究所

日時：平成29年6月3日（土）

場所：金沢大学サテライト・プラザ、小松サテライト（配信）、珠洲サテライト（配信）

対象：一般市民（20名程度）

概要：プログラム細胞死の役割、分子メカニズム、がんをはじめとする疾患との関わり、細胞死を標的としたがん治療薬開発の現状などについて解説した。また、文部科学省の支援を受けた本新学術領域研究についてパンフレットを配布して紹介するとともに、本領域研究で得られた最新の研究成果についても紹介した。

JSPS Science Dialogue「線虫を用いた神経軸索再生の研究の紹介」

担当：パストゥホフ ストラヒル、名古屋大学大学院理学研究科（久本班）

日時：平成29年6月17日（土）

場所：沼津東高等学校

対象：高校1、2年生と保護者（約100人）

概要：静岡県沼津東高等学校において科学講演を行った。研究者を目指したきっかけ、線虫を用いた神経軸索再生の研究の背景や最新の研究結果について英語で説明した。さらに母国ブルガリアの文化紹介も行った。講演後、主に日本語で討論を行った。



区民公開講座

担当：中野 裕康、東邦大学医学部医学科

清水 重臣、東京医科歯科大学 難治疾患研究所

田中 正人、東京薬科大学生命科学部

安友 康二、徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部

日時：平成29年7月23日（日）

場所：大田区産業プラザ PiO

対象：社会人（参加人数約50名）

概要：新学術領域研究「ダイニングコード」班と日本 Cell Death 学会および大田区の共催で、区民公開講座「細胞死から病気を考える」を大田区産業プラザ PiO にて開催しました。田中正人、清水重臣、安友康二、中野裕康の4名の講師が「細胞死と病気」、「癌免疫療法」、「抗がん剤」、「細胞死の関係する遺伝性疾患」などについて、分かりやすい講演を行い、一般の方々から質問を受けました。東邦大学免疫学講座の田中ゆり子さんの絶妙な司会のおかげで、無事終了することができました。



細胞死研究の歴史（オートファジー細胞死）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所 清水 重臣



最初に生理的細胞死が記載されたのは1842年のVogtによるものと考えられていますが、当時細胞死は生存プロセスの崩壊によってもたらされる受動的な生命現象であると認識され、生命科学の研究対象としては十分な広がりが見られませんでした。しかしながら、1960年代に入って、電子顕微鏡の解析技術が進むと形態学的な記述が蓄積されはじめ、1972年には、Wyllie, Kerrらが、細胞の凝縮や染色体の分裂を特徴とする死細胞をアポトーシスと命名するに至りました。さらに、1990年には、Clarkeらが、生体で観察される細胞死としてType 1細胞死（アポトーシス）、Type 2細胞死（オートファジーを伴う細胞死）、Type 3細胞死（ネクローシス様細胞死）

を主要な細胞死として記載し、形態学的には一定の知見を得るに至りました。

細胞死の実行メカニズムが、重要な課題であると認知されたのは1990年代後半に入ってからになります。即ち、① Horovitzらによる *C. elegans* を用いたプログラム細胞死の遺伝学的解析と、② Bcl-2やFasなどアポトーシスに関わる分子の発見がその引き金となり、細胞死研究は以後爆発的な広がりを見せることになりました。世界中の研究者がアポトーシス実行機構を探索し、その全体像が、遺伝学的、生化学的、細胞生物学的手法によって決定されていきました。しかしながら、アポトーシスの分子機構が明らかになるにつれて、生命現象を解読したり、疾患、病態の原因を解明したりする為には、アポトーシスの実行機構を明らかにするのみでは不十分であることが判明してきました。特に決定的だったのは、ミトコンドリアの膜透過性を亢進させる2つの分子BaxとBakの2重欠損マウスができたことです。このマウスから単離した細胞は、ミトコンドリアを経由するアポトーシスシグナルを完全にブロックして、アポトー

図1

オートファジーと細胞死がともに観察される時の可能性

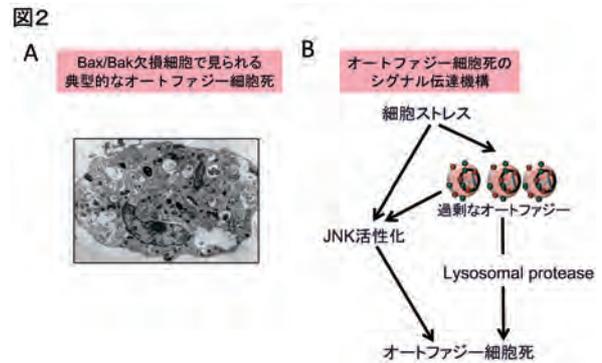
- 1、オートファジーと細胞死が単に随伴している
- 2、オートファジーは細胞死を抑制している
- 3、オートファジーによって細胞死が実行されている

||
オートファジー細胞死

条件：①オートファジーの活性化を伴う
②オートファジー阻害剤やオートファジー実行分子の発現抑制で細胞死抑制

シスが誘導されないことが報告されました。当時はアポトーシスが生体における唯一の細胞死と考えられていたため、論文の記載は、Bax と Bak の 2 重欠損によって「アポトーシスが起こらなくなった」ではなく、「細胞が死ななくなった」と記載されています。しかし、このマウスにおいて「細胞が死なない」と考えると不思議な点がありました。例えば、10%くらいのマウスは、外見上はほぼ正常に生まれてきます。また、胎仔も、ほぼ正常マウスと変わらない外見を示しています。そこで、本当に Bax/Bak 2 重欠損細胞が死なないかどうか検討したところ、いくつか興味深い事実が見いだされました。即ち、① Bax/Bak を直接活性化する BH3-oly タンパク質 (Bim, Puma など20種類程度の分子群) を導入した時には、正常細胞は死ぬが、Bax/Bak 2 重欠損細胞には何も起こらない、②その他のアポトーシス誘導刺激 (DNA 傷害やスタウロスポリン刺激) を Bax/Bak 2 重欠損細胞に加えると、アポトーシスは起こらないが、細胞は死ぬ、③この時、細胞内にはオートファジーが異常に活性化されており細胞質成分の大半が自己消化されている、などの事実です。さらに、詳細な解析により、Bax/Bak2重欠損細胞における細胞死が、オートファジーの活性化によって誘導される (オートファジー活性化を必要条件とする)いわゆる「オートファジー細胞死」であること、生体においては、アポトーシス不全の時に

アポトーシスの代償機構として働いていることなどが見いだされました。通常、オートファジーは細胞の生存のために機能していますが、強いストレスが加わった場合には、無制限にオートファジーが活性化し、最終的に死に至ることになるわけです。その後、このオートファジー細胞死が、形態学的に記述されていた Type 2細胞死 (オートファジーを伴う細胞死) に含まれること、Drosophila の唾液腺がステロイドで退縮するときの生理的細胞死に使われていることなどが明らかにされ、細胞死の一つの様式として認知されるに至りました。



最近になって、オートファジー細胞死がさらに細分化されつつあります。例えば、DNA 傷害に伴うオートファジー細胞死は JNK の活性化を必要としますが、JNK とは無関係で Na/K ATPase が実行因子として関わるオートファジー細胞死は Autosis と命名されています。今後、詳細な解析によりオートファジー細胞死の実態が明確になっていくものと思われます。

モノクローナル抗体作製支援について

東京薬科大学・生命科学部 田中 正人



モノクローナル抗体作製支援は、田中(正)班で行なっております。目的の抗原は、ペプチド、タンパク、抗原発現細胞等の形で依頼者にご用意いただき、支援班で免疫からハイブリドーマの作製までを請け負います。ハイブリドーマのスクリーニングも、原則として支援班で行いますが、特殊な方法の場合には、ハイブリドーマの上清をお送りして、依頼者にスクリーニングをやっていただくことも可能です。目的にあった抗体が得られるかは、スクリーニング方法が適切かどうか大きく依存しますので、事前に十分な検討が必要です。目的の抗体を産生するハイブリドーマが作製できましたら、細胞をお送りすることもできますし、ご希望であれば、支援班で抗体の精製も請け負います。抗体作製の具体的な手順は以下の通りです。

1. 依頼者より抗原となるペプチド、精製タンパク、細胞をお送りいただきます。
(細胞の場合は培地もお送りいただき、こちらで培養してから免疫します)
スクリーニングに使用する抗原が別にある場合(例えば免疫に用いる細胞と別の細胞を用いてスクリーニングをする場合等)には、スクリーニング用の抗原・細胞もご用意ください。
2. ご希望の動物に2回免疫します。
3. 血清を採取して抗体価を測定(ELISAもしくはFACSにて)します。抗体価が上がっていなければ追加で免疫します。

4. 細胞融合する3日前に最終免疫します。
5. 免疫した動物から、脾臓あるいはリンパ節細胞を採取し、ミエローマ細胞と細胞融合をして、96well plateに播種します。
6. 培養上清を用いて一次スクリーニングをします。
(支援班が行う場合は、通常ELISAもしくはFACSになりますが、その他のスクリーニング方法もご相談に応じます。)
7. 陽性wellを限界希釈します。
8. 培養上清を用いて二次スクリーニング(一次スクリーニングと同様)します。
9. 抗体産生ハイブリドーマを培養して凍結保存をします。

得られた抗体産生ハイブリドーマを依頼者にお送りしますが、ご希望があれば培養上清や培養上清から精製した抗体をお送りすることも可能です。

現在までに作製途中のものも含めて、8種類のペプチド、2種類のタンパク、4種類の細胞を抗原とした抗体作製を試みました。多くの場合、1~10クローン程のハイブリドーマを得ることができています。

申込みはホームページ「ダイニングコード」の領域内情報より申込み用紙をダウンロードし、田中正人までメールでお送りください。

細胞死制御化合物

理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室

鬮 孝介・王 秀玲 (袖岡班)



細胞死研究に限らず様々な研究で、低分子阻害剤が果たす役割は大きい。細胞に振りかけるだけで、その標的分子が対象とする現象に関与するどうかを明らかにすることが可能となります。さらに細胞死研究では、そのターゲット分子や周辺のシグナル伝達経路の解析だけではなく、細胞死の種類の間定・判別にも貢献します。一方でこれら化合物は高価であることも多く、気軽に試すということが難しいケースも多々あります。また、同じターゲット分子に対して複数の化合物が市販されている場合もあり、どの化合物を用いれば研究目的に合致するのかを判断しづらい場合もあるかと思えます。そこで領域の支援事業として、市販の化合物で標的分子が既知のもの、一般的に細胞死の研究分野でよく用いられている化合物を「細胞死制御化合物」として一括購入してストックし、初期検討に十分な量配布することをしています。

これまでに我々は細胞死阻害剤を35種類、細胞死誘導

剤を29種類ストックし、DMSO 溶液の状態を提供しております。2014年から配布を開始してその依頼件数は4年で30件を越え、様々な方に使用していただいております。最新の化合物のリストはダイニングコードのホームページよりダウンロードできる配布申込書にて確認できます。使用希望の化合物がございましたら、必要な化合物と希望量を記載の上メール添付でお送りください。内容を確認後、ご希望の化合物を送付します。また、リストに使用したい化合物がない場合でも相談いただければ、こちらで購入してリストに追加することもあります。遠慮なくご希望をお知らせください。また、粉での提供を希望する場合や動物実験での大量に使用することを検討している場合なども別途メールにてご相談ください。同じ化合物でも、試薬会社によってはバルクで購入することで通常より安価に購入できる場合があります。全てのケースに対応できるとは限りませんが、予算や化合物ストック量を考慮の上対応します。

ケミカルスクリーニング



東京医科歯科大学・難治疾患研究所 清水 重臣

低分子化合物を使って生命現象を理解したり、生命現象を操作したりするケミカルバイオロジーの技術の発展は目覚ましいものがある。その結果、細胞機能を調節できる低分子化合物を同定することにより、(1) その細胞機能を制御している分子を同定でき、(2) 創薬への応用が可能となっている。

このための最初のステップとして、ケミカルライブラリーからのスクリーニングを行う必要がある。本領域では、申請書が承認された後に、東京医科歯科大学 難治疾患研究所 病態細胞生物学分野で使用している約2万種類の化合物を、96well プレートに spot した化合物ライブラリー (10mM ; 10 μ L) の形で提供を受けることができる。各研究室では、これを用いて最初のスクリーニングを行い、陽性化合物を同定する。この化合物のプレート番号と番地を、病態細胞生物学分野に連絡することで、化合物の名称と構造を特定することができる。当該化合物の活性を、より確実な方法で確認することによ

り、ヒット化合物と判断できる。その後は、(1) 化合物の構造改良、(2) モデル生物での有効性検討、(3) 薬物代謝動態の測定などを行う。さらに、化合物の標的分子を同定することで、サイエンスを進めることも可能であり、一方で、薬剤の最適化作業を行うことで、創薬開発研究に進むこともできる。(図1)。

実施例 (図2)

マウス肝からミトコンドリアを単離し、96well プレートに散布した。その後、各 well に、ネクローシスまたはアポトーシスを模倣する刺激と同時に、低分子化合物ライブラリーを添加した。一定時間後に、ネクローシスをミトコンドリアの膜電位で、アポトーシスをシトクロムcの漏出で定量評価した。これにより、両方の細胞死を抑制できる TMD-7538化合物の取得に成功した。本化合物は、マウス個体への投与実験で、心筋虚血などの場合に有効性を示した。



図1

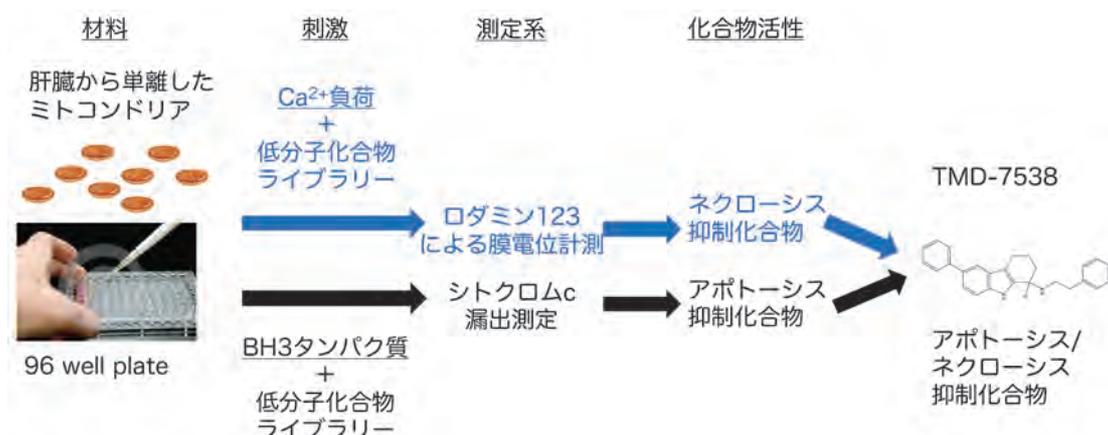


図2

今後の会議・学会予定

ダイニングコード国際シンポジウム

2018年5月22日(火)～23日(水)

東京大学 弥生講堂一条ホール

平成30年度 班会議

2019年1月(予定)

総括班

研究代表者	田中 正人	東京薬科大学・生命科学部
研究分担者	荒川 聡子	東京医科歯科大学・難治疾患研究所
	大村谷昌樹	熊本大学・生命資源研究支援センター
	須田 貴司	金沢大学・がん進展制御研究所
	袖岡 幹子	理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室
	田中 稔	国立国際医療研究センター研究所
	中野 裕康	東邦大学・医学部
	安友 康二	徳島大学・大学院医歯薬学研究部
	山口 良文	北海道大学・大学院薬学系研究科
連携研究者	山崎 晶	九州大学・生体防御医学研究所
	及川 彰	独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター
班友	内山 安男	順天堂大学・大学院医学研究科
	清水 重臣	東京医科歯科大学・難治疾患研究所
研究評価者	辻本 賀英	大阪府立成人病センター研究所
	長田 重一	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター
	三浦 正幸	東京大学・大学院薬学研究科

計画研究班
A 01

研究課題名	研究代表者/分担者	所属・役職
パイロトーシスの分子機構と役割	(代表) 須田 貴司	金沢大学・がん進展制御研究所
細胞死制御化合物の開発と応用	(代表) 袖岡 幹子	理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室
	(分担) 関根 孝介	理化学研究所・袖岡有機合成化学研究室
計画的ネクローシスが担う生体応答機構の解明	(代表) 中野 裕康	東邦大学・医学部
慢性膵炎発症過程におけるネクロプトーシスの役割	(分担) 大村谷昌樹	兵庫医科大学
生体における多様な細胞死シグナルの可視化・検出系の開発	(代表) 山口 良文	北海道大学・低温科学研究所
	(分担) 荒川 聡子	東京医科歯科大学・難治疾患研究所

A 02

研究課題名	研究代表者/分担者	所属・役職
食細胞による死細胞の貪食機構とそれに伴う免疫制御機構の解明	(代表) 田中 正人	東京薬科大学・生命科学部
肝幹細胞による肝再生を促進するダイニングコードの解明	(代表) 田中 稔	国立国際医療研究センター研究所
細胞死制御異常によるヒト遺伝性疾患の病態解明	(代表) 安友 康二	徳島大学・大学院医歯薬学研究部
細胞死に伴って放出される内因性糖脂質アジュバントの同定	(代表) 山崎 晶	大阪大学・微生物病研究所/免疫フロンティア研究センター/九州大学・生体防御医学研究所
	(分担) 宮本 智文	九州大学・薬学部

公募研究班 A 01

研究課題名	研究代表者/分担者	所属・役職
統合的ストレス応答による肝再生過程の細胞死様式の調節メカニズムの解明	(代表) 井上 啓	金沢大学・新学術創成研究機構栄養・代謝研究ユニット
脂質酸化依存的新規細胞死(リポキソトーシス)実行因子の細胞及び個体での機能解析	(代表) 今井 浩孝	北里大学・薬学部
好中球細胞外トラップを誘導する細胞死メカニズムの解明	(代表) 上岡 裕治	関西医科大学・附属生命医学研究所
活性酸素誘導性ネクローシスにおける細胞死誘導シグナルの捕捉と可視化	(代表) 佐藤 伸一	東京工業大学・科学技術創成研究院・化学生命科学研究所
LUBACによる細胞死とIL-1 β 産生調節機構の解析	(代表) 佐々木義輝	京都大学・大学院医学研究科
細胞死を起点とするダイニングコード授受の1細胞実時間イメージングと遺伝子発現解析	(代表) 白崎 善隆	科学技術振興機構/東京大学・大学院理学系研究科・生物科学専攻
リン脂質の膜動態と細胞死	(代表) 瀬川 勝盛	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター
低分子化合物で探るマクロファージの炎症誘導性細胞死の機構	(代表) 武田 弘資	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科
「細菌含有膜破壊によるパイロトーシス誘導・制御メカニズムの解明」	(代表) 山本 雅裕	大阪大学・微生物病研究所/ 大阪大学・免疫学フロンティア研究センター

A 02

研究課題名	研究代表者/分担者	所属・役職
細胞死に伴い産生されるリゾリン脂質の機能解明	(代表) 青木 淳賢	東北大学・大学院薬学研究科
「組織幹/前駆細胞の分化による肝臓の再生応答を惹起するダイニングコードの解明」	(代表) 伊藤 暢	東京大学・分子細胞生物学研究所
死細胞が残した細胞間シグナルネットワークを介した創傷治癒制御	(代表) 榎本 将人	京都大学・生命科学研究科
アポトーシス細胞の貪食シグナルに対する負の制御機構とその生理的意義の解明	(代表) 小田ちぐさ	筑波大学・医学医療系・生命医科学域
パイロトーシスが関与する稀少疾患の新規遺伝子変異同定と病態解明	(代表) 北浦 次郎	順天堂大学・大学院医学研究科・アトピー疾患研究センター
成体脳のニューロン再生における死細胞の貪食過程とその意義	(代表) 澤本 和延	名古屋市立大学・大学院医学研究科
細胞死によって誘導される脳梗塞後の神経修復メカニズム	(代表) 七田 崇	東京都医学総合研究所
ダイニングコードによる組織破壊・修復バランスの制御機構の解明	(代表) 菅波 孝祥	名古屋大学・環境医学研究所
障害ミトコンドリアからのダイニングコード漏出による脂肪性肝疾患の進展機序の解明	(代表) 竹原 徹郎	大阪大学・大学院医学系研究科
筋線維芽細胞による死細胞の貪食が組織の線維化に及ぼす影響の解析	(代表) 仲矢 道雄	九州大学・薬学研究院
切断軸索からのダイニングコード	(代表) 久本 直毅	名古屋大学・大学院理学研究科