

戦略的創造研究推進事業
発展研究 (SORST)

研究終了報告書

研究課題
「細胞死シグナル伝達分子を標的とした
疾患治療薬の開発」

研究期間：平成 14 年 1 月 1 日～
平成 20 年 3 月 31 日

研究代表者氏名
(所属、役職)

辻本 賀英
(大阪大学大学院医学系研究科、教授)

1. 研究課題名

細胞死シグナル伝達分子を標的とした疾患治療薬の開発

2. 研究実施の概要

細胞死制御の破綻が関与した疾患は多数知られており、心筋梗塞などの虚血性疾患、神経変性疾患などはその代表的なものである。これら疾患の治療や予防のための一つのストラテジーは、細胞死の人為的な抑制であり、そのために細胞死のメカニズムの詳細を明らかにする必要がある。哺乳動物細胞が持つ細胞死機構の一つは、アポトーシスであり、精力的な解析が行われてきた。少なくともある種の疾患はアポトーシス制御の破綻に起因するものと思われるが、アポトーシスでない細胞死機構が関与する疾患も想定され、アポトーシスを含め哺乳動物細胞が持つ細胞死機構をより包括的に解析することが望まれていた。

CREST研究において、アポトーシスのシグナル伝達の解析を行い、細胞死の基礎研究において幾つか重要な成果を上げた。また、アポトーシスの主要な制御因子である Bcl-2 ファミリーたんぱくの解析から、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の N 末に近い BH4 ドメインと呼ばれる領域がその機能に必須かつ十分であることを見出し、疾患治療薬となる可能性を提示した。実際に、この BH4 ペプチドに膜透過性を付与する protein-transduction-domain (PTD) を附加した BH4-PTD は、細胞レベルにとどまらず、ラットにおいても心筋梗塞における細胞死を抑制し、心機能を保護する活性を有することを見出し、このペプチドが心筋梗塞などの治療薬候補となりうることを示した。この成果は、「細胞死研究から、疾患治療に適用できる薬剤が開発されうる」という考えに論理的根拠を与えることになり、SORSTにおいては、このアプローチを継続・発展させ、哺乳動物細胞が持つ細胞死機構の解明、疾患発症に関わる細胞死機構の同定と、そこから得られる成果をもとに細胞死制御破綻に起因する疾患の治療のためのターゲット分子を提示することを主目的とした。

この目的のために、(1) アポトーシス、(2) 他の細胞死機構、(3) 疾患に関わる細胞死機構、などに焦点を絞り、分子細胞生物学的手法、生化学的手法、生体工学的手法など種々の手法を駆使した解析を行い、これらの分子メカニズムを解明し、検証可能な細胞死機構に関しては疾患との関連を検討し、疾患に関わる細胞死関連因子に関しては、それらを利用した疾患治療のストラテジーを構築することとした。

これらの解析から多くの成果を得たが、ここでは重要な成果のみを記載する。

(1) アポトーシスの解析

アポトーシス研究においては、種々の刺激で惹起された刺激特異的なアポトーシスシグナルがミトコンドリアに集約される機構と、その後に起るミトコンドリア外膜の透過性亢進（カスペース活性化因子としてのシトクロム c などの漏出）の分子機構に焦点を合わせて解析を行った。このステップはアポトーシス制御上、最も重要なステップの一つであり、疾患治療においてもアポトーシス制御のための重要な標的場所である。

アポトーシス時に起るミトコンドリア外膜の透過性亢進の分子機構を解明するために、ミトコンドリアを抗原として多くのモノクローナル抗体を作製し、ミトコンドリア外膜透過性亢進を抑制する抗体を選択し、重要な機能分子を同定するというストラテジーを立て研究を行った結果、目的の活性を有する複数のモノクローナル抗体を取得した。

ミトコンドリアへのアポトーシスシグナル伝達機構に関しては、複数のアポトーシス系の解析を行ったが、X 線照射による DNA 2 重鎖切断により起るアポトーシスの場合、マウス肝由来の単離ミトコンドリアに対する外膜透過性亢進活性を指標にそのプロセスに関する因子を X 線照射細胞由来の抽出液から単離精製するという手法により、リンカーヒストン H1.2 を同定した。X 線照射による DNA 2 重鎖切断により、リンカーヒストン H1.2 は、p53 依存的にしかし転写活性非依存的に核から細胞質に移行し、ミトコンドリアに直接的に作用することで、外膜の透過性亢進を誘導するという新規のアポトーシスシグナル伝達経路を発見した。

アポトーシス時のミトコンドリア外膜透過性亢進の分子機構解明の一環として、モデルの一つとして提唱されていたミトコンドリア膜透過性遷移現象（mitochondrial membrane

permeability transition 「MPT」：ミトコンドリア内膜の透過性亢進に引き続き起るミトコンドリアの膨潤と外膜の崩壊で特徴付けられる現象）の解析を行い、ノックアウトマウスを作製することで、MPT にミトコンドリアに局在するシクロフィリンであるシクロフィリン D が必須であることを示した。シクロフィリン D 欠損マウス由来の細胞は、対照細胞と同様に種々の刺激に対してアポトーシスを起こすことから、「MPT がアポトーシスに関与する」というモデルを否定した。

（2）非アポトーシス型細胞死機構の解析

生理的な細胞死であるプログラム細胞死の代表的な機構としてアポトーシスが位置づけられてきたが、最近の研究から、アポトーシス以外の細胞死機構の関与も強く示唆されている。また種々の疾患に関わる細胞死をみても、アポトーシスで全ては語ることができず、これらを理解するためには、非アポトーシス型細胞死機構の解析が極めて重要である。

アポトーシス以外の細胞死機構の解析にアポトーシスを起こさない細胞株（Bax/Bak 欠損あるいは Bcl-2 過剰発現マウス胚纖維芽細胞株など）は有用である。我々はこれらの細胞株を種々のアポトーシス誘導剤（エトポシドやスタウロスポリンなど）で処理するとアポトーシスとは異なる細胞死機構が活性化され、細胞は死に至ることを見出した（コロニー形成能の減少と細胞膜の破綻を示す propidium iodide による染色）。電子顕微鏡観察により、オートファゴソームやオートリソームが多数観察され、オートファジが活性化されていることが分かった。実際に、オートファジ関連遺伝子（ATG5 や Beclin 1）を silencing すると細胞死が抑制されたことから、通常、飢餓条件下などでは細胞の生存に利用されるオートファジが細胞死にも利用されることが判明した。形態的な観察を通じ以前から知られていたが、その機構に関しては全く不明であったプログラム細胞死タイプ II と形態的に類似しており、この実験系は、アポトーシスとは異なるプログラム細胞死機構の詳細を解析できる有用なものとなっている。

（3）疾患に関わる細胞死機構の解析

上記のシクロフィリン D 欠損マウス由来の細胞を用いた解析から、シクロフィリン D 欠損細胞は、酸化ストレスや過剰な Ca²⁺により誘導されるネクローシスに有意に耐性を示すことが明らかになった。これらの刺激は、虚血・再灌流傷害時に発生するものであり、シクロフィリン D 欠損マウスは心筋梗塞などの虚血・再灌流傷害に抵抗性を示す可能性が示唆された。実際、シクロフィリン D 欠損マウスは心筋梗塞モデルにおいて強い耐性を示した。このことは、シクロフィリン D 依存的な MPT 誘導性の細胞死（ネクローシス）機構が虚血・再灌流傷害時の細胞死に関わっていることを示しており、シクロフィリン D や MPT に関する因子が心筋梗塞や脳梗塞の治療薬ターゲットになりうることを提示している。シクロフィリン D に特異的な阻害剤の探索に向け、シクロフィリン D・阻害剤シクロスピリン A 複合体の結晶化を行い、0.96 オングストロームのレベルでの構造解析に成功した。

培養細胞株を用いた虚血（低酸素と低グルコース）による細胞死は、核の収縮を伴うカスペース非依存的細胞死であり、Ca²⁺非依存的フォスフォリパーゼ A2 (iPLA2β) が関与することを示したが、この研究をさらに発展させるために、iPLA2β 欠損マウスを作製したところ、軸索変性を伴う運動神経変性を呈することが明らかになった。病理解析により、中枢神経および末梢神経において spheroid や vacuole が多数観察されることが判明した。最近、ヒトの遺伝性疾患である INAD (infantile neuroaxonal degeneration) や NBIA (Neurodegeneration with brain ion accumulation) などに iPLA2β 遺伝子の変異が見出されることが報告された。これらの疾患も神経組織に spheroid 形成があることを特徴しており、我々が作製した iPLA2β 欠損マウスの解析結果は、iPLA2β 機能欠損がこれら遺伝性疾患の必要十分条件になっていることを示している。このように、我々の作製した iPLA2β 欠損マウスは、INAD や NBIA の良い疾患マウスモデルであり、疾患発症メカニズムの解明や治療法開発のための有用な材料となっている。

3. 研究構想

細胞死制御破綻に起因する種々の疾患の治療を念頭に、哺乳動物細胞が持つ細胞死機構の解明、疾患に関わる細胞死機構の同定とその成果をもとに、細胞死制御破綻に起因する疾患の治療のためのターゲット分子を提示することを、本研究プログラムの主目的とした。

上記の目的のために、分子細胞生物学的手法、生化学的手法、生体工学的手法などを駆使することにより、(1) アポトーシス、(2) アポトーシス以外の細胞死機構、(3) 疾患に関わる細胞死機構を分子レベルで解明し、疾患に関わる細胞死関連因子に関しては、疾患治療へのストラテジーを構築することとした。具体的には以下の解析を行った。

(1) アポトーシスの解析 :

ミトコンドリアの外膜透過性の亢進は、アポトーシス制御の最も重要なステップの一つであり、我々が長年解析している Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能場所である。アポトーシスの制御破綻による疾患の治療を考えても、重要な標的である。

- ・ミトコンドリアにアポトーシスシグナルが集約されるメカニズムの解析
- ・ミトコンドリア膜透過性亢進のメカニズムの解析

(2) アポトーシス以外の細胞死機構の解析 :

個体発生期の形態形成や組織での細胞交代に関わるプログラム細胞死の代表的な機構としてアポトーシスが位置づけられてきたが、最近の研究から、アポトーシス以外の細胞死機構の関与も強く示唆され、また種々の疾患に関わる細胞死をみても、少なくない疾患でアポトーシス以外の細胞死機構が関与している可能性が大である。このような状況下で、非アポトーシス型細胞死の解析が極めて重要である。

- ・アポトーシスを起こさない細胞株を利用した非アポトーシス型細胞死機構の解析
- ・虚血による細胞死のメカニズムの解析

(3) 疾患に関わる細胞死機構の解析 :

・上記解析で得られた情報をもとに、関わる細胞死機構が不明な疾患に対し、関与する細胞死機構の同定とその解析

- ・虚血・再灌流傷害時の細胞死のメカニズムの解析
- ・軸索変性を伴う神経変性疾患の解析

4. 研究実施内容

4. 1 “細胞死シグナル伝達分子を標的とした疾患治療薬の開発” (辻本グループ)

(1) 実施の内容

(I) アポトーシス研究の解析

アポトーシス研究においては、種々の刺激で惹起された刺激特異的なアポトーシスシグナルがミトコンドリアに集約される機構と、その後に起るミトコンドリア外膜の透過性亢進の分子機構に焦点を合わせた解析を行った。

(i) ミトコンドリア外膜の透過性亢進機構の解析

ミトコンドリア外膜の透過性亢進は、ミトコンドリア膜間隙の因子の細胞質への流出を誘導し、その中に含まれるシトクロム c は細胞質のたんぱくである Apaf-1 と ATP からなる複合体を形成し、カスペース（アポトーシスに利用されるシステインプロテアーゼ）を活性化させる。このミトコンドリア外膜透過性亢進のステップは、アポトーシス制御上、最も重要な箇所であり、我々が長年解析してきた代表的なアポトーシス制御因子である Bcl-2 ファミリーたんぱくの機能場所でもある。ミトコンドリア外膜の透過性亢進の分子機構に関しては、我々が提唱したモデルを始め幾つかのモデルが提唱されているが、現時点においても、統一的な見解には至っていない。我々は、これまでの Bcl-2 ファミリーたんぱくのミトコンドリア膜上での機能の解析を継続しつつ、新たなアプローチとして、このプロセスに関与する他の因子の割り出しを目指した。用いた手法は、マウス肝由来の単離ミトコンドリアを抗原として多くのモノクローナル抗体を作製し、その中から、単離ミトコンドリアを用いた実験系においてアポトーシス時の外膜透過性亢進を抑制する抗体を選択し、

重要な機能分子を同定するというストラテジーである。数千のクローンの中から、*Bid* により誘導されるミトコンドリア外膜透過性亢進を強く抑制するクローンを数種類取得することに成功した。これらの抗体は、これまで膜透過性亢進に関与することが示唆されている分子とは反応しないことから新規の因子が関与していることが示唆され、今後の標的分子の同定が急務である。

アポトーシス時におけるミトコンドリア外膜の透過性亢進は、*Bcl-2* ファミリーメンバーである *Bax* あるいは *Bak* に依存することが知られており、*Bax/Bak* 欠損細胞は、多くの刺激に対してアポトーシス抵抗性を示す。しかし、我々はアラキドン酸とカルシウムイオノフォアを併用する刺激で、*Bax/Bak* 非依存的にミトコンドリア外膜の透過性亢進が起こり、アポトーシスが誘導されることを見出した。このことは、ミトコンドリア外膜の透過性亢進に複数のメカニズムが存在することを示唆している。あるいは、この刺激は *Bax/Bak* の下流のプロセスを活性化している可能性もある。いずれにしても、この系は、アポトーシス時のミトコンドリア外膜透過性亢進の分子機構を理解する上で有用な実験系となっている。

(ii) DNA 損傷により誘導されるアポトーシスのシグナル伝達経路の解析

種々のアポトーシス刺激で惹起される細胞内アポトーシスシグナルの多くは、最終的にミトコンドリアに集約されることが知られており、*Bcl-2* ファミリーの BH3-only たんぱくがその役割を担っていると考えられている。しかし、これで全貌が捉えられている保証はなく、我々は、幾つかのアポトーシス誘導系でミトコンドリアへのシグナル伝達機構の解析を行ってきた。特に、X線照射などによる DNA の 2重鎖切断により誘導されるアポトーシスについては、核からミトコンドリアへのシグナル伝達機構への興味にとどまらず、DNA 損傷後に細胞は相反する 2つの選択肢—DNA 損傷の修復による生存とアポトーシスの誘導による死—を取り得るため、この 2つの応答の選択機構がどのようなものであるのかにも興味があった。そこで、シグナル伝達機構の解明への一つのアプローチとして、X線照射後にミトコンドリアからシトクロム c を遊離させる因子が細胞質に蓄積するものと予想し、この因子を X 線照射した細胞の抽出液からカラムクロマトグラフィーを用いた生化学的手法により分離精製することを試みた。その結果、リンカーヒストンの一つである H1.2 が同定された。H1.2 たんぱくは、単離ミトコンドリアからシトクロム c を遊離させる活性を有しており、他のアイソフォーム (H1.3 や H1.4 など) はこの活性を有していなかった。細胞レベルの解析から、X 線照射により H1 が核から細胞質に移行することを見出した。2重鎖 DNA 切断により誘導されるアポトーシスは転写因子である p53 に依存することが知られているが、p53 が機能しない条件下では、X 線照射により誘導される H1 の核からの移行が抑制されていた。また 2重鎖 DNA 切断を誘発する抗がん剤エトポシド処理によっても H1 の核外移行は観察されたが、2重鎖 DNA 切断を誘発しない紫外線照射やスタウロボリンなどの他のアポトーシス誘導刺激は、H1 の核外移行を誘導しなかった。このことから H1 の核から細胞質への遊離は、2重鎖 DNA 切断に特異的な現象と考えられる。2重鎖 DNA 切断により誘導されるアポトーシスにおける H1.2 の役割を証明するために、アンチセンス RNA によるサイレシングを利用したが、H1.2 の機能が抑制された条件下では、2重鎖 DNA 切断により誘導されるアポトーシスが抑制された。さらに H1.2 欠損マウスを利用し、H1.2 を欠損した胸腺細胞や小腸上皮細胞は、X 線照射によるアポトーシスに有意な耐性であることを示した。これらの結果から、2重鎖 DNA 切断により誘導されるアポトーシスにおいて、リンカーヒストンの一つである H1.2 が重要なシグナル伝達因子として機能していることが明らかになった。

(II) 非アポトーシス型細胞死機構の解析

(i) オートファジ依存的細胞死の解析

アポトーシスの解析で、アポトーシスを起こさない細胞株 (*Bax/Bak* 欠損あるいは *Bcl-2* 過剰発現マウス胚纖維芽細胞株) を利用していた折に、これらの細胞は種々の刺激でアポトーシスは起こさないが、依然として細胞は死に至ることに気が付いた：ドラッグ処理、除去後のコロニー形成能の低下と細胞膜の破綻を示す propidium iodide ポジティブ染色に

よる。このように非アポトーシス型細胞死機構の解析に、アポトーシスを起こさない細胞株は有用である。Bax/Bak 欠損マウス胚纖維芽細胞株をエトポシド処理し電子顕微鏡観察を行うと、予想通りアポトーシスに特徴的な形態は観察されず、オートファゴソームやオートリソソームが多数観察された（図1）。オートファゴソームの形成は、GFP-LC3 を用いた実験からも、細胞死刺激後にドット状局在を示すことにより確証を得た（図1）。このことは、この細胞死系においてオートファジ（自食反応）が活性化されていることを示している。実際に、オートファジ関連遺伝子（ATG5 や Beclin-1）を silencing すると、あるいは ATG5 欠損細胞株を用いると、または 3-メチルアデニン（3MA）などのオートファジ阻害剤を用いると、この種の細胞死が強く抑制されたことから、通常、飢餓条件下などでは細胞の生存に利用されるオートファジが細胞死にも利用されうることが判明した（図2）。同様の結果は、他の種々のアポトーシス誘導刺激によっても観察された。

この細胞死は、プログラム細胞死タイプ II（オートファジック細胞死：形態的な観察から以前から知られていたが、適切な解析系の欠如によりその機構の詳細に関しては全く不明である）に、形態的に類似しており、この実験系は、アポトーシスとは異なるプログラム細胞死機構の詳細を解析できる有用な実験系となっている。さらに、この細胞死のシグナル伝達機構の解析を行い、細胞死誘導時に、ATG5 や Beclin-1 が高発現することやアポトーシス抑制因子 Bcl-xL がこの細胞死に必要とされることが明らかになった。また、JNK の活性化が見られ、JNK の阻害は、この細胞死を有意に抑制することから、また ATG5 の silencing により JNK の活性化が抑制されることから、オートファジの活性化の下流で JNK の活性化が起り、この活性化が細胞死に重要であることが明らかになった。今後、特に、オートファジ依存的細胞死に特異的なマーカーや遺伝子を同定することが急務である。

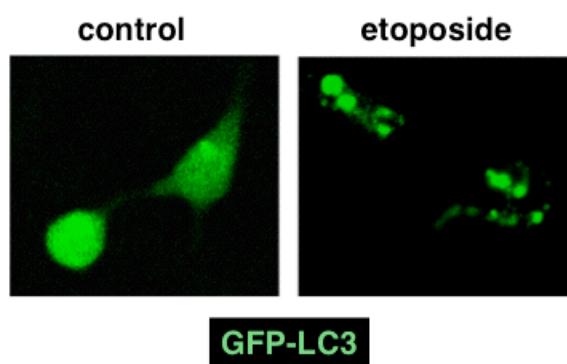
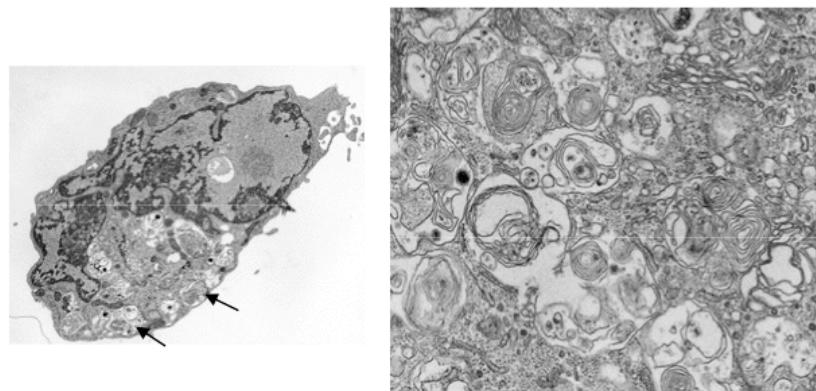


図1 エトポシド処理による Bax/Bak 欠損マウス細胞でのオートファジの活性化
上は、エトポシド処理した Bax/Bak 欠損マウス胚纖維芽細胞の電子顕微鏡写真で、オートファゴソーム（矢

印) が見られる(上右は、拡大図)。下は、Bax/Bak 欠損マウス胚纖維芽細胞に GFP-LC3 遺伝子を導入後、エトボシド処理したもので、処理前には diffuse な分布を示していた GFP-LC3 が、オートファジーが活性化されるとオートファゴソーム上に局在するため、ドット状分布を示すようになる。

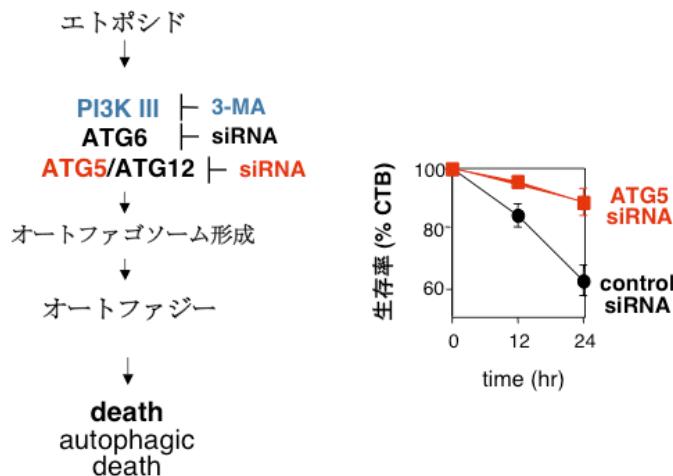


図 2 Bax/Bak 欠損マウス細胞におけるエトボシド誘導性細胞死のオートファジー依存性
ATG5 を silencing した Bax/Bak 欠損マウス胚纖維芽細胞と対照細胞をエトボシドで処理し、経時的に細胞死を CTB 法により測定した。ATG5 を silencing することにより細胞死が軽減されている。同様の結果が、ATG6 (Beclin 1) の silencing やオートファジーの阻害剤 3 メチルアデニン(3-MA)を用いた場合にも見られた。

(ii) シクロフィリン D 依存的細胞死機構の解析
アポトーシス時のミトコンドリア外膜透過性亢進のモデルの一つとしてミトコドリア膜透過性遷移現象 (mitochondrial membrane permeability transition: MPT) が提唱されていた。MPT は、ミトコンドリアが、内膜の透過性亢進とそれに引き続き起る膨潤・外膜崩壊により脱機能に陥る現象である。シクロスピリン A で抑制されることからミトコンドリア局在のシクロフィリンであるシクロフィリン D の関与が示唆されていた。実際に我々は、ノックアウトマウスを作製することで、MPT にシクロフィリン D が必須であることを示した。シクロフィリン D 欠損マウスの肝由来のミトコンドリアは、Ca²⁺や酸化ストレス (例えば、H₂O₂ 処理) などの種々の刺激によっても MPT を起こさない (図 3)。このシクロフィリン D 欠損マウス由来の種々の細胞を用いて、アポトーシスの多寡を検討したが、シクロフィリン D 欠損マウス由来の細胞は、対照細胞と同様に種々の刺激に対してアポトーシスを起こすことが分かった (図 4)。このことにより「MPT がアポトーシス時のミトコンドリア外膜透過性亢進の機構である」というモデルを否定した。一方、シクロフィリン D 欠損マウス胎児由来の纖維芽細胞株は、カルシウムイオノフォアや H₂O₂ による酸化ストレスによって誘発される細胞死に有意な耐性を示した (図 5)。この細胞死は、形態的にアポトーシスの特徴を示さず、カスペースの活性化もみられないことなどからネクローシスと結論した (図 5)。従って、過剰な Ca²⁺や酸化ストレスにより、シクロフィリン D 依存的、MPT 依存的ネクロテイック細胞死が惹起されることが分かった。全てのネクローシスがこのタイプでないことから (例えば熱処理によるネクローシスはシクロフィリン D 欠損により影響を受けないことなどから)、シクロフィリン D の関与の有無により、複数種類あると考えられるネクローシスの一部の分類が可能になった。

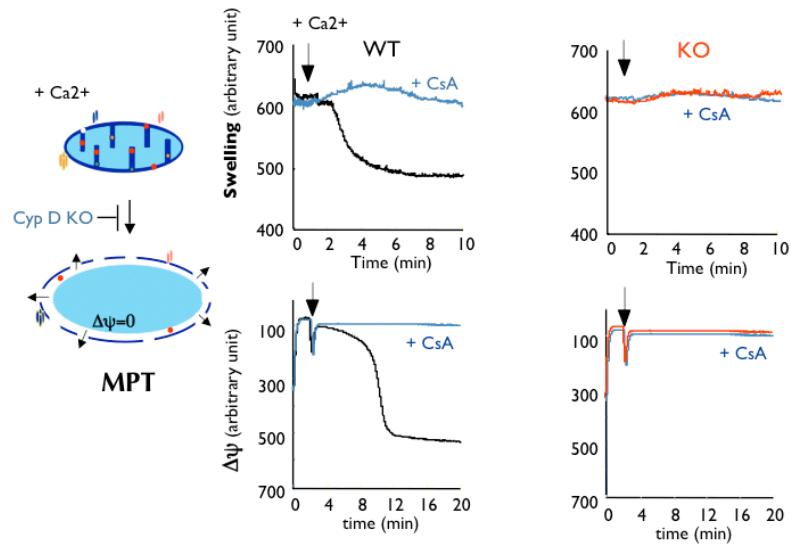


図3 シクロフィリンD欠損(KO)ミトコンドリアはCa²⁺などにより誘導されるMPTに耐性を示す。Ca²⁺(50 μM)の添加後、MPTはミトコンドリアの膨潤(上)と内膜の電位低下(下)により測定した。CsA(シクロスボリンA)はシクロフィリンDの阻害剤である。同様の結果は、他のMPT誘導剤(H₂O₂など)を用いた時にも観察された。

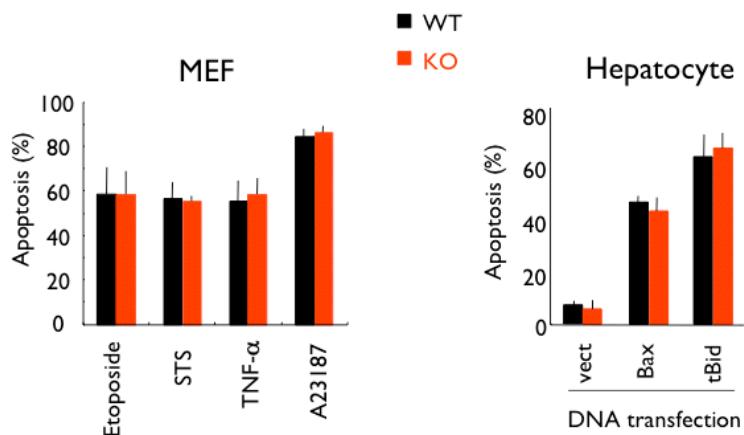


図4 シクロフィリンD欠損細胞(KO)は、対照細胞(WT)と同様にアポトーシスを起こす。代表例として、胚纖維芽細胞と hepatocyte を種々のアポトーシス刺激で処理した時のアポトーシスの頻度を示している。アポトーシスは PI/Annexin V 染色により測定した。

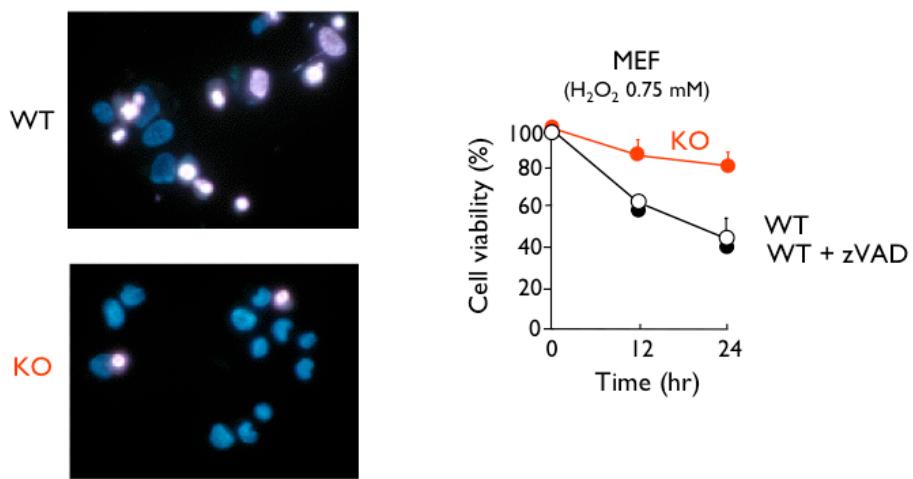


図5 シクロフィリンD欠損胚纖維芽細胞(KO)は過酸化水素により誘導されるネクローシスに耐性を示す。左は、核をヘキスト33342で染色したもの。右は、PI染色による過酸化水素処理後の細胞生存率を示す。

(III) 疾患に関わる細胞死の解析

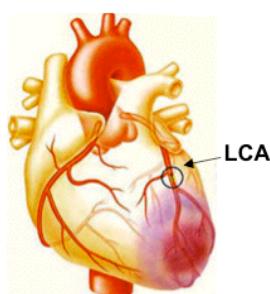
(i) 虚血・再灌流傷害における細胞死の解析

シクロフィリンD欠損マウス由来の細胞を用いた解析から、過剰な細胞内Ca²⁺や酸化ストレスにより、シクロフィリンD依存的、MPT依存的細胞死(ネクローシス)が惹起されることが分かった。これらの刺激は、虚血・再灌流傷害時に発生することが知られており、シクロフィリンD欠損マウスは虚血・再灌流傷害に耐性を示すことが予想された。実際に、心虚血・再灌流モデル(左冠動脈を30分結紮虚血・再灌流2時間)において、シクロフィリンD欠損マウスの心臓は、病理組織学的に、対照マウスのそれに比較し、梗塞サイズが強く抑制されていた(図6)。このことは、心筋梗塞などの虚血・再灌流傷害による細胞死に、シクロフィリンD依存的、MPT依存的細胞死(ネクローシス)が関わっていることを示している。この成果は、細胞死制御破綻に起因する疾患において、それに関わる細胞死の機構を特定した数少ない例となっている。

- Male mice at 8-10 weeks of age

Cardiac infarction model

LCA
30 min occlusion
2 hr reperfusion



EV (blue)
non-risk area
TTC (red)
viable area

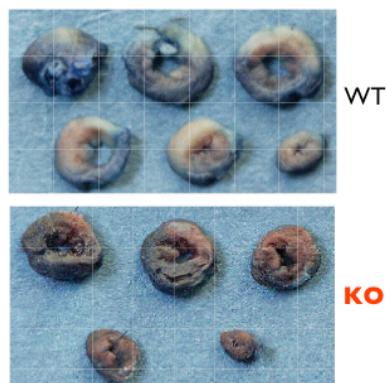


図6 シクロフィリンD欠損マウスは、心臓の虚血・再灌流傷害に耐性を示す。

マウスにおいて心臓の左冠動脈を 30 分結紾し、2 時間再灌流を行った後、心臓を摘出、EV と TTC により染色した後に切片にしたもの。細胞死による梗塞領域が白く見えるが、シクロフィリン D 欠損マウス (KO) の場合、その梗塞サイズが強く抑制されている。

シクロフィリン D が MPT や MPT 依存的な細胞死に必須であることを示したが、その分子機構は不明のままである。シクロフィリン D は peptidyl prolyl cis-trans isomerase (PPIase) 活性を有するため、ターゲット分子の構造を変化させて機能することが予想されているが、現時点では、真のターゲット分子の同定には至っていない。しかし、その活性からシクロフィリン D の機能や MPT の分子機構を解くためには、たんぱくの構造解析が必須であり、また、シクロフィリン D は上記の虚血・再灌流傷害による疾患の治療のための標的分子の一つであるため、シクロフィリン D の構造解析はそれに対する特異的な阻害剤の探索にも有効であると考えられる。そこで、まず、大腸菌で作製したリコンビナントシクロフィリン D とシクロフィリンの阻害剤として知られているシクロスボリン A 複合体の結晶を作製し、それを用い構造解析を行った。その結果、0.96 オングストロームレベルでの構造を解くことに成功した（図 7）。シクロフィリン D とシクロスボリン A の結合様式も詳細に見る事が出来（図 8）、シクロフィリン D に特異的な阻害剤の探索のための有用な基礎情報となった。

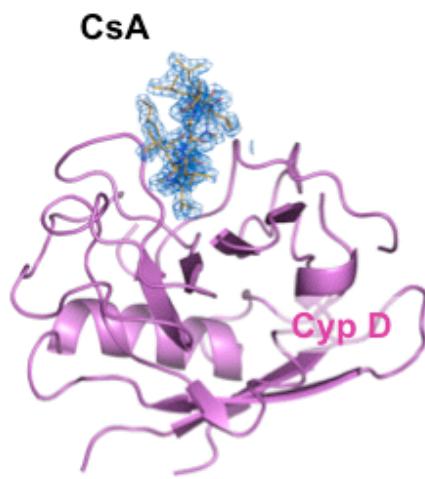


図 7 ヒトシクロフィリン D とシクロスボリン A 複合体の結晶（上）とその高次構造（下）

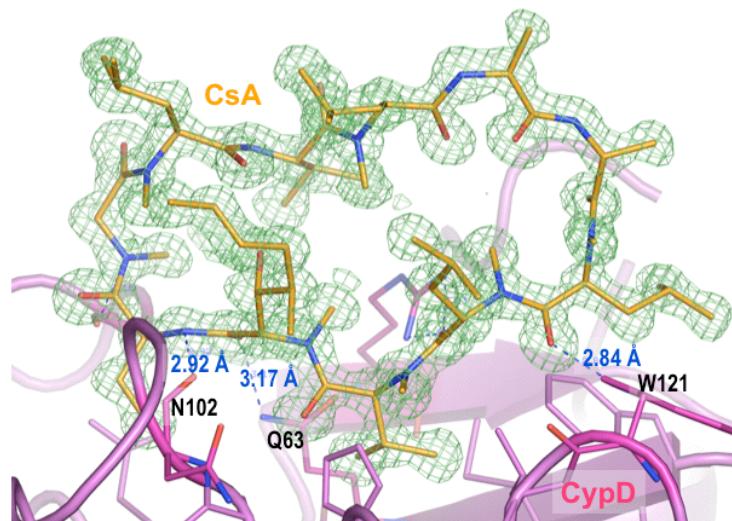


図8 シクロフィリンDとシクロスボリンA複合体の結合領域の詳細な構造

(ii) 軸索変性

虚血による非アポトーシス型細胞死に、iPLA 2β が関与することを示したが、この研究をさらに発展させるために、iPLA 2β 欠損マウスを作製した。iPLA 2β 欠損マウスは、正常に生まれ育ったが、加齢とともに体重の現象が見られ、2年齢までにすべてのマウスが、特に後肢の歩行異常や尾を持ってつり下げる時の反射反応に異常を示すようになった（図9）。金網を用いたグリップテストでは、30週齢頃から異常を検知できることがわかった。病理組織解析の結果、中枢神経および末梢神経において多数の spheroid や vacuole が観察されたことから、神経軸索のジストロフィーを特徴とした神経変性疾患であることが明らかになった（図10）。最近、ヒトの遺伝性疾患である INAD (infantile neuroaxonal degeneration) や NBIA (Neurodegeneration with brain ion accumulation) に iPLA 2β 遺伝子の変異が見出されることが報告された。これらの疾患も神経組織に spheroid 形成があることを特徴としており、我々が作製した iPLA 2β 欠損マウスの結果は、iPLA 2β 機構欠損がこれら遺伝性疾患の必要十分条件になっていることを示している。このマウスは、INAD と同様に、小脳の萎縮や脾臓での異常細胞の蓄積を示す。このように、iPLA 2β 欠損マウスは、INAD や NBIA の良い疾患マウスマルクモデルであり、疾患発症メカニズムの解明や治療法開発のための有用な材料となっている。

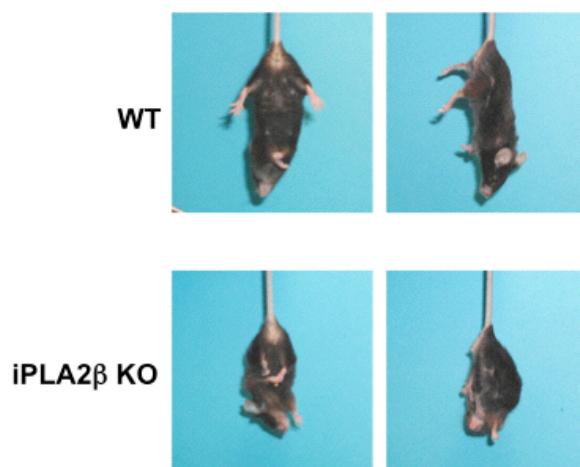


図9 iPLA2 β 欠損マウスは、神経変性疾患を発症する。
尾を持ってつり下げるとき、正常なマウスは反射により後肢を広げてバランスを取ろうとするが、iPLA2 β 欠損マウスは、神経変性のため後肢を交差している。この症状は多くの神経変性疾患モデルマウスで観察されている。

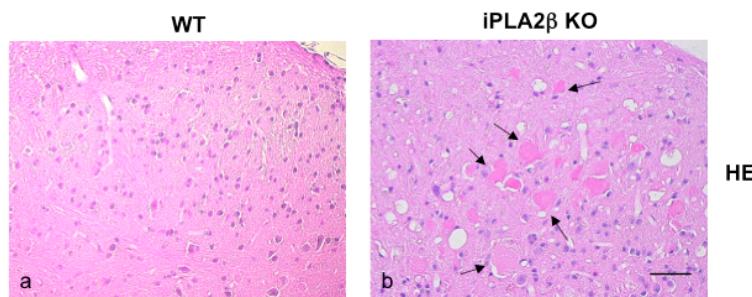


図10 正常マウスと iPLA2 β 欠損マウスの神経組織像
iPLA2 β 欠損マウスの神経組織には、多くの spheroid (矢印) や vacuole が観察され、神経軸索ジストロフィーがおこっていることが分かる。

(2) 得られた研究成果の状況及び今後期待される効果

アポトーシス研究において、DNA 損傷誘導性アポトーシスに関する新規のシグナル伝達経路を発見した。DNA 損傷誘導性アポトーシスに関しては、国内外で多くの研究がなされてきたが、その全貌の理解にはまだかなり遠い状態であり、今回の発見は DNA 損傷誘導性アポトーシスの理解に大きく貢献するものと考えている。p53 の関与に関しても、転写活性化を中心に研究されてきたが、今回の発見は、p53 の転写非依存的な役割を浮き彫りにしており重要な知見となっている。抗がん剤の多くは DNA 損傷誘導剤であり、がん細胞に DNA 損傷誘導性アポトーシスを惹起することで作用している。しかし、この種の抗がん剤は、生き残ったがん細胞に DNA 損傷（遺伝子変異）を与えることになる。この種の変異導入は、がん細胞の悪性化を引き起こす可能性もあり、抗がん剤に望まれるのは DNA 損傷を誘導することなく、効果的にアポトーシスを誘導する能力である。DNA 損傷誘導性アポトーシスのシグナル伝達機構の詳細な解析は、将来、このようなアプローチを可能にするかも知れない。また、Bcl-2 ファミリー因子の変化によりミトコンドリアレベルでアポトーシスシグナル伝達経路が抑制されている「がん」が知られているが、これらの治療に、我々が見出した Bax/Bak 非依存的機構を利用することは、具体的にはこの機構を活性化するような薬剤の探索などは、がん治療のための有用なアプローチの一つになるかも知れない。

オートファジーに依存した細胞死機構の発見は、世界に先駆けたものであり、ほぼ同時期に細胞株を用いた特殊な系で米国 NIH の Mike Lenardo のグループによっても報告され、その後、他の幾つかの細胞実験系で確認が続いている。個体発生期の形態形成や組織での細胞交代に関わるプログラム細胞死の代表的な機構としてアポトーシスが位置づけられてきたが、最近の解析から、アポトーシス以外の細胞死機構の関与が重要視され始めており、今回、我々が発見したオートファジーに依存した細胞死機構の解析は、プログラム細胞死の理解において重要な情報を提供するものと思われる。また、神経変性疾患や筋疾患など細胞死制御が破綻した種々の疾患の異常組織で、形態的にオートファジーを伴った死細胞が観察されており、この細胞死機構はこれら疾患の発症にも関わる可能性がある。今後、オートファジーに依存した細胞死機構に特異的なマーカーや遺伝子が同定されれば、これらの諸問題により直接的に答えていくことが可能になるであろう。

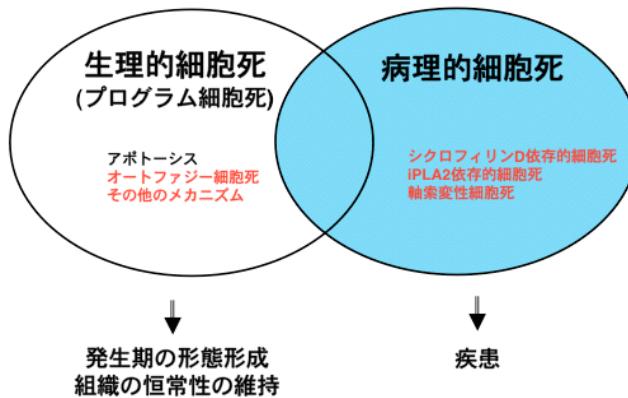


図 1 1 生理的プログラム細胞と病理的細胞死：いずれも複数の機構が関与

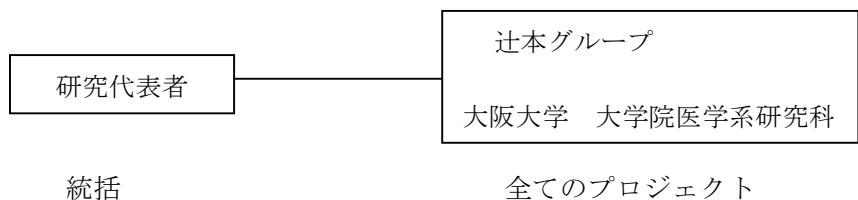
アポトーシス時のミトコンドリア外膜透過性亢進の分子機構のモデルの一つとして、ミトコドリア膜透過性遷移現象（MPT）が長年提唱されていたが、シクロフィリンD欠損マウスを用いた解析から、これを否定することができた。この発見は、細胞死研究における一つの金字塔的な成果となっている。我々の論文と同時に、同雑誌に、米国の J. Molkentin グループから同様の報告が掲載されている。このマウスを用いた解析から、心筋梗塞などの虚血・再灌流傷害による細胞死に、シクロフィリンD依存的、MPT依存的細胞死（ネクローシス）が関わっていることを明らかにすることが出来、過剰な細胞死による多くの疾患の中で、その細胞死機構を特定した数少ない例となっている。また、米国の S. Korsmeyer らは、同様のマウスを用い、脳梗塞モデルにおいてもシクロフィリンD欠損マウスが強い耐性を示すことを報告している。これらの成果は、少なくともある種のネクローシスも人為的にコントロールしうることを示したもので、医学的意義が大きい。また、心筋梗塞や脳梗塞の治療のために、シクロフィリンDやMPTに関わる他の因子が適切な標的であることを示しており、近い将来、シクロフィリンDやMPTをターゲットにした特異的な阻害剤が開発され、これら疾患の治療に利用されるものと期待される。治療薬開発に向け、我々が行ったシクロフィリンDとその阻害剤シクロスボリンA複合体の詳細な構造解析結果は、シクロフィリンD特異的な阻害剤のモデリングや構築に向け有用な情報を提供するものと思われる。

5. 類似研究の国内外の研究動向・状況と本研究課題の位置づけ

国内外の細胞死研究では、これまでアポトーシスを中心に解析が進められてきたが、近年になり、アポトーシスはプログラム細胞死メカニズムの一つであること、また細胞には他に複数の非アポトーシス型の細胞死機構が存在することも示され始め、細胞死研究は大きな新しい発展の兆しを見せている。この細胞死研究の新しい流れ作りに、我々のグループも大きく貢献してきている。特に、オートファジー依存的細胞死機構の存在を、我々は米国の M. Lenardo グループと独立に世界に先駆けて報告しており、この成果はプログラム細胞死研究上、重要な位置を占めている。また疾患関連細胞死の研究においても、シクロフィリンD依存的細胞死（ネクローシスの1種）が虚血・再灌流傷害において重要な役割を演じていることを世界に先駆けて示した。この成果は、多くのヒト疾患の中で、それに関わる細胞死の機構を同定した数少ない例の一つとなっており、また、虚血・再灌流傷害による疾患の治療ストラテジーの構築の観点からも重要な位置を占めている。さらに、このシクロフィリンDの解析により、アポトーシスの機構として長らく提唱されてきたMPT関与のモデルを否定することができ、細胞死研究の学術的な面においても金字塔的な成果となっている。このように、細胞死研究の領域で、我々の行ってきた研究は先導的な役割を果たしてきたと考えている。

6. 研究実施体制

(1) 体制



(2) メンバー表

辻本グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
辻本 賀英	大阪大学大学院医学系研究科	教授	統括	平成14年11月～平成20年3月
恵口 豊	大阪大学大学院医学系研究科	助教授(准教授)	遺伝学的手法を用いた細胞死シグナル伝達機構の解析	平成14年11月～平成20年3月
清水 重臣	大阪大学大学院医学系研究科・東京医科歯科大学難治疾患研究所	助教授(准教授)・教授	非アポトーシス型プログラム細胞死の解析	平成14年11月～平成18年10月・平成20年3月
新沢 康英	大阪大学大学院医学系研究科	COE 特任助手・助教	ストレスに対する細胞応答反応の解析	平成14年11月～平成20年3月
柳田 寛太	大阪大学大学院医学系研究科	特任研究員	生化学的手法を用いた細胞死シグナル伝達機構の解析	平成14年11月～平成17年3月
Zhang Lilin	大阪大学大学院医学系研究科	SORST 研究員	Bak の活性化機構の解析	平成15年4月～平成16年9月
佐々木加代子	大阪大学大学院医学系研究科	SORST 研究員	新規細胞死関連因子の探索	平成16年4月～平成19年3月
高谷 朋夏	大阪大学大学院医学系研究科	SORST 研究員	非アポトーシス型プログラム細胞死関連因子の遺伝学的探索	平成16年4月～平成17年3月
松岡 洋祐	大阪大学大学院医学系研究科	SORST 研究員・COE 特任助教	個体におけるプログラム細胞死の解析	平成16年10月～平成20年3月
児玉 高志	大阪大学大学院医学系研究科	SORST 研究員	細胞死関連たんぱくの構造学的解析	平成17年4月～平成19年10月
崔 正国	大阪大学大学院医学系研究科	SORST 研究員	ミトコンドリア膜透過性制御機構の解析	平成18年4月～平成20年3月

杉岡 梨恵	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	tat-BH4 ペプチドの解析	平成14年11月～平成17年3月
中川 崇	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	ミトコンドリア膜透過性遷移現象の解析	平成14年11月～平成17年3月
中尾 斎仙	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	Bax の活性化機構の解析	平成14年11月～平成20年3月
山形 弘隆	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	ミトコンドリア膜透過性制御機構の解析	平成14年11月～平成20年3月
水田 健	大阪大学大学院医学系研究科・東京医科歯科大学難治疾患研究所	大学院生・特任助教	ミトコンドリア膜透過性制御機構の解析	平成14年11月～平成19年3月・平成20年3月
大島 久代	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	小胞体ストレス誘導性アポトーシスの解析	平成16年11月～平成20年3月
相川 知徳	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	酸化ストレスに対する細胞応答反応の解析	平成16年11月～平成20年3月
長谷田 泰成	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	DNA 損傷誘導性細胞死の解析	平成16年11月～平成20年3月
新熊 忠信	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	小胞体ストレス誘導性アポトーシスの解析	平成16年11月～平成20年3月
出口 寛	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	シクロフィリンD 欠損マウスの解析	平成17年4月～平成20年3月
西田 友哉	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	オートファジ依存的細胞死の解析	平成17年10月～平成20年3月
小林 尚	大阪大学大学院医学系研究科	大学院生	ストレスに対する細胞応答反応の解析	平成19年4月～平成20年3月

7. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

開催なし。

(2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Sten Orrenius (Institute of Environmental Medicine · Karolinska	第81回日本生理学会大会 IUPS symposium にて講	札幌 大阪	平成16年5月30日～6月4日

Institute, Professor of Toxicology)	演及び情報交換。大 阪大学でのセミナ ーと情報交換。		
Tomomi Kuwana (La Jolla Institute for Allergy and Immunology, Research Scientist)	第 81 回日本生理学 会 大 会 IUPS symposium にて講 演及び情報交換。	札幌	平成 16 年 6 月 1 日～6 月 4 日

8. 発展研究による主な研究成果

- (1)論文発表 (英文論文 23 件 邦文論文 0 件)
- Konishi, A., Shimizu, S., Hirota, J., Takao, T., Fan, Y., Matsuoka, Y., Zhang, L., Yoneda, Y., Fujii, Y., Skoultchi, A. I., and Tsujimoto Y. Involvement of histone H1.2 in apoptosis induced by DNA double-strand breaks. *Cell* 114: 673–688, 2003
- Sugioka, R., Shimizu S., Funatsu, T., Tamagawa, K., Sawa Y., Kawakami, T and Tsujimoto, Y. BH4-domain peptide from Bcl-xL exerts anti-apoptotic activity in vivo. *Oncogene*, 22: 8432–8440, 2003
- Shinzawa, K. and Tsujimoto, Y. PLA₂ activity is required for nuclear shrinkage in caspase-independent cell death. *J. Cell Biol.*, 163: 1219–1230, 2003
- Tsuruta, F., Sunayama, J., Mori, Y., Hattori S., Shimizu, S., Tsujimoto, T., Yoshioka, K. and Gotoh, Y. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 23: 1889–1899, 2004
- Hitomi, J., Katayama, T., Eguchi, Y., Kudo, T., Taniguchi, M., Koyama, Y., Manabe, T., Yamagishi, S., Bando, Y., Imaizumi, K., Tsujimoto, Y. and Tohyama M. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Ab-induced cell death. *J. Cell Biol.* 165: 347–356, 2004
- Zhang, L., Shimizu, S., Sakamaki, K., Yonehara, S., and Tsujimoto, Y. A caspase-8-independent signalling pathway activated by Fas ligation leads to exposure of Bax N-terminus. *J. Biol. Chem.* 279: 33865–33874, 2004
- Lee, J.-H., Jeon M.-H., Seo Y.-J., Lee, Y.-J., Ko J. H., Tsujimoto, Y. and Lee, J.- H. CA repeats in the 3' UTR of bcl-2 mRNA mediate constitutive decay of bcl-2 mRNA. *J. Biol. Chem.* 279: 42758–42764, 2004
- Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, K., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B., and Tsujimoto, Y. A role of Bcl-2 family of proteins in non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nature Cell Biol.* 6:1221–1228, 2004
- Sugioka, R., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279: 52726–52734, 2004
- Kanamori, D., Okamura, T., Yamamoto, H., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., and Ueyama, N. Structure of the small-molecule Bcl-2 inhibitor (BH3I-2) and its related simple model in protonated and deprotonated forms. *Bull Chem. Soc. Jap.* 77: 2057–2064, 2004
- Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y., Hunter, T. Nuclear Translocation of Caspase-3 Is Dependent on Its Proteolytic Activation and Recognition of a Substrate-like Protein(s). *J. Biol. Chem.*, 280: 857–860, 2005
- Cadden, IS., Johnston, BT., Connolly, R., Gates, D., Tsujimoto, Y., Eguchi, Y., McGinty, A. An investigation into the role of Bcl-2 in neuroendocrine differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 326: 442–448, 2005

- Ono, M., Sawa, Y., Ryugo, M., Alechine, A.N., Shimizu, S., Sugioka, R., Tsujimoto, Y., and Matsuda, H. BH4 peptide derivative from Bcl-xL attenuates ischemia/reperfusion injury thorough anti-apoptotic mechanism in rat hearts. Eur. J. Cardiothorac. Surg. 27:117-121, 2005
- Zhang, L., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. Two distinct Fas-activated signaling pathways revealed by an anti-tumor drug D609. Oncogene, 24:2954-2962, 2005
- Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic death. Nature 434: 652-658, 2005
- Elinder, F., Akanda, N., Tofighi, R., Shimizu, S., Tsujimoto, Y., Orrenius, S. and Ceccatelli, S. Opening of plasma membrane voltage-dependent anion channels (VDAC) precedes caspase activation in neuronal apoptosis. Cell Death Diff. 12: 1134-1140, 2005
- Mizuta, K., Shimizu, S., Matsuoka, Y., Nakagawa, T. and Tsujimoto, Y. A Bax/Bak-independent mechanism of cytochrome c release. J. Biol. Chem. 282: 16623-16630, 2007
- Kajitani, K., Fujihashi, M., Kobayashi, Y., Shimizu, S., Tsujimoto, Y. and Miki, K. Crystal structure of human cyclophilin D in complex with its inhibitor, cyclosporin A at 0.96 Å resolution. Proteins, 70: 1635-1639 2008
- Han, M. S., Park, S. Y., Shinzawa, K., Kim, S., Chung, K. W., Lee, J. H., Kwon, C. H., Lee, K. W., Lee, J. H., Park, C. K., Chung, W. J., Hwang, J. S., Yan, J. J., Song, D. K., Tsujimoto, Y., Lee, M. S. Lysophosphatidylcholine as a death effector in the lipoapoptosis of hepatocytes. J Lipid Res. 49: 84-97, 2008
- Shinzawa, K., Sumi, H., Ikawa, M., Matsuoka, Y., Okabe, M., Sakoda, S. and Tsujimoto, Y. Neuroaxonal dystrophy caused by group VIA phospholipase A₂ deficiency in mice: a model of human neurodegenerative disease. J. Neurosci. In press

「総説」

- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. Another way to die: autophagic programmed cell death. Cell Death Diff. 12: 1528-1534, 2005
- Tsujimoto, Y., Nakagawa, T. and Shimizu, S. Mitochondrial membrane permeability transition and cell death. Biochem. Biophys. Acta (BBA) - Bioenergetics. 1757: 1297-1300, 2006
- Tsujimoto, Y. and Shimizu, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. Apoptosis 12:835-840, 2007

(2) 口頭発表

①学会

国内 8 件, 海外 14 件

②その他

国内 1 件, 海外 5 件

(3) 特許出願 (SORST 研究の成果に関わる特許 (出願人が JST 以外のものを含む))

	件数
国内出願	0
海外出願	0
計	0

(4) その他特記事項

論文の高い引用回数に関する記事が、日本経済新聞 2003年2月17日（月曜日）、日経産業新聞 2003年2月19日（水曜日）に掲載された。

シクロフィリンD 依存的細胞死に関する研究成果を Nature 誌に報告した折には、プレス発表を行い、朝日新聞（2005年3月31日）を始め新聞各紙に取り上げられた。また、この成果は、米国雑誌「The Scientist」（2007年4月号）に掲載された。

21世紀 COE のメンバーとして研究内容などが、科学新聞（2006年1月13日）掲載された。

9. 結び

CREST 研究に引き続き、切れ目なく更に5年間サポートして頂け、この5年間に多くの成果を上げることが出来ました。当初の目的の一つである疾患治療へのストラテジーの提示という意味でも、虚血・再灌流傷害による疾患に関して、目的を達成することができたことを喜んでおります。また、基礎的な細胞死研究でも今後の発展に繋がるような発見ができました。ここにサポートに対して深謝の意を表します。

