

# 博士論文

## 論文題目

TNF $\alpha$  誘導性 SIRS における急性炎症制御因子としての  
KLHDC10 の新規機能

氏名 山口 奈美子

## 【目次】

序論	・	・	・	・	・	・	・	3
方法	・	・	・	・	・	・	・	12
結果	・	・	・	・	・	・	・	23
考察	・	・	・	・	・	・	・	32
総括	・	・	・	・	・	・	・	45
付属	・	・	・	・	・	・	・	47
略称一覽	・	・	・	・	・	・	・	55
参考文献	・	・	・	・	・	・	・	59
図表	・	・	・	・	・	・	・	77
謝辞	・	・	・	・	・	・	・	108

## 【序論】

### **KLHDC10 の *in vitro* における生理的意義**

KLHDC10 (Kelch domain containing 10) は、当研究室におけるショウジョウバエの遺伝子発現系を用いたスクリーニングにより、ストレス応答性 MAP3K の 1 つである ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) の新規活性化因子として同定された (Sekine et al., 2012). より詳細には、スクリーニングにおいて *Drosophila* ASK1 の新規活性化因子として Slim (Scruin like at the midline) が同定され、アミノ酸配列の比較により、そのヒトオオソログとして KLHDC が同定された (Figure 1A). これまでに、KLHDC10 が ASK1 の脱リン酸化を介した不活性化因子である PP5 (Protein phosphatase 5) (Morita et al., 2001) に結合し、そのホスファターゼ活性を抑制することで、酸化ストレス依存的な ASK1 の持続的活性化および細胞死を亢進することが明らかにされた (Figure 1C ; (Sekine et al., 2012)). また、KLHDC10 は、そのアミノ酸一次配列の特徴や、当研究室で行った pull-down の結果から、複合体型ユビキチン E3 ligase である CRL2 (Cullin2 RING E3 ligase) 複合体 (Bosu and Kipreos, 2008) の基質認識受容体として機能することが示唆されている (Figure 1D ; (Mahrouf et al., 2008)). CRL2 複合体は、スキヤフォールドタンパク質である Cullin 2 を中心とした複合体で、基質認識受容体を複数使い分けることで、様々な基質のユビキチン化を可能にする (Petroski and Deshaies, 2005) が、現段階では KLHDC10 の基質は同定されていない。さらに、前述した KLHDC10 の ASK1 活性化機能は、CRL2 複合体非依存的であることも当研究室において明らかにされている (Sekine et al., 2012).

また、KLHDC10 は、Kelch repeat タンパク質ファミリーに属し、Kelch motif の 6 回くり返し構造から成る Kelch repeat domain を持つ (Figure 1B). 本 domain は、立体構造学的にタンパク質間相互作用に重要であるとされる  $\beta$ -propeller 折り畳み構造を持つことから (Adams et al., 2000; Li et al., 2004; Padmanabhan et al., 2006;

Prag and Adams, 2003), KLHDC10 もタンパク質間相互作用を介した機能を持つことが示唆される (Figure 1B).

## **KLHDC10 の *in vivo* における病態生理学的機能の探索**

一方で, KLHDC10 の *in vivo* における機能については未解明であった. そこで私は, 当研究室において作出された KLHDC10 欠損マウスを用いて, 本分子の *in vivo* での生理学的もしくは病態生理学的機能の解明を試みた. 本マウスは, 通常飼育条件下では, 体重や体温などの点で野生型マウスと顕著に異なる表現型を示さない. そのため, 発症機構に酸化ストレスの関与が報告されている病態モデルを中心に, Acetaminophen 誘導性肝障害 (Nakagawa et al., 2008; Ramachandran et al., 2013), Cerulein 誘導性膵炎 (He et al., 2009; Tsuji et al., 2012), LPS 誘導性敗血症 (Deng et al., 2015; Matsuzawa et al., 2005), TNF $\alpha$ 誘導性全身性炎症反応症候群 (Cauwels et al., 2003; Duprez et al., 2011), の4モデルについて表現型の検討を行った. その結果, TNF $\alpha$ 誘導性全身性炎症反応症候群モデルにおいて, KLHDC10 欠損マウスが耐性を示すことを見出した (Figure 3).

## **SIRS とは**

全身性炎症反応症候群 (SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome) は, ヒトでは手術や細菌感染, 膵炎, 外傷, 熱傷等の侵襲によって引き起こされる全身性の急性炎症であり, 急性呼吸窮迫症候群や播種性血管内凝固症候群 (DIC : Disseminated Intravascular Coagulation), 多臓器不全に発展して死に至る症例の多い重篤な病態である (Volpin et al., 2014; 磯崎ら, 2008). 罹患後の致死率は, 重篤度により 20-60%にも上る. また, 罹患者数が非常に多く, SIRS のいち病態である敗血症に限定しても, 米国内で年間 90 万人が罹患し, 全世界では常時 200-300 万人の罹患者がいるとされる (MERCK MANUAL; Wenzel, 2002). さらに, その致死率の高さ

と相俟って、米国内で年間 21 万人、全世界では年間 1,500 万人が敗血症で命を落とす (MERCK MANUAL; Wenzel, 2002). なお、これは全世界で 2-3 秒に 1 人が敗血症で亡くなる換算となる.

SIRS は、1992 年に米国胸部疾患学会 (ACCP : American College of Chest Physicians) と集中治療学会 (SCCM : Society of Critical Care Medicine) による合同会議 (Consensus Conference) において初めて提唱された概念で、 $TNF\alpha$ をはじめとするサイトカインが中心的な役割を果たすと考えられてきた (Bone, 1992). しかしながら、多段階から成る非常に複雑な病態であり、未解明の機構も多い. 臨床的には、①体温  $>38^{\circ}C$  または  $<36^{\circ}C$ , ②心拍数  $>90$  回/min, ③呼吸数  $>20$  回/min または  $PaCO_2$  (二酸化炭素分圧)  $<32$  Torr (32 mmHg), ④白血球数  $>12,000$  個/ $mm^3$  または  $<4,000$  個, あるいは未熟顆粒球  $>10\%$ , の 4 項目のうち 2 項目以上が該当するとき、SIRS と診断する (ACCP/SCCM Consensus Conference の定義 ; (Bone et al., 2009)). また、特に外傷に起因する SIRS については、血清中 ①IL-4 量の減少, ②IL-6 量の上昇, ③IL-8 量の上昇, ④TGF- $\beta$ 量の上昇, の 4 つが診断のバイオマーカーになり得るとの報告がある (Volpin et al., 2014). 現在までに、病態分子機構に基づく治療法は確立されておらず、臨床的には SIRS からいかに早く回復するかが大きな課題となっている.  $TNF\alpha$ やサイトカインを標的とする生物学的製剤を用いた実験的な抗炎症治療の試みが、これまでほぼすべて失敗に終わっていることから、SIRS を例えて「バイオテック企業の墓場」と呼ぶこともある.

## **TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS の発症機構**

マウスモデルでは、 $TNF\alpha$ を尾静脈もしくは腹腔内より大量に投与することで、実験的に SIRS の病態を模倣できることが知られる (Tracey et al., 1986; Vandevyver et al., 2012). 実際に、 $TNF\alpha$ を大量 (1.8 mg/kg body weight) に投与した野生型マウスにおいて、低血圧、代謝性アシドーシス、血液濃縮、高血糖、高カリウム血症、呼吸

不全といった、ヒト SIRS 患者の場合と類似した症状が現れることが報告されている。また、当該マウス剖検では、消化管の虚血性・出血性病変、急性腎尿細管ネクロシス（※報告当時は、アポトーシス以外の細胞死をネクロシスと総称していた）に加え、びまん性肺炎症・出血が見られ、こちらもヒト SIRS 患者剖検と類似の病理学的所見であった (Tracey et al., 1986)。

TNF $\alpha$ に対する細胞応答は、ヒト・マウスに共通して、TNF 受容体 1 と TNF 受容体 2 の 2 種類の受容体を介して誘導される。前者は全身性にユビキタスに発現する一方、後者は主に CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞や、内皮細胞、ミクログリアをはじめとする免疫細胞に発現する (Aggarwal, 2003; Baker and Reddy, 1998; Faustman and Davis, 2010; Fujita et al., 2008)。Human TNF $\alpha$ は、マウス TNF 受容体 1 に作用する一方、マウス TNF 受容体 2 には作用しないことが知られる。これを野生型マウスへ投与した場合に、前段落で述べたような表現型が観察されることから、マウスにおける TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS の発症機構には、少なくとも TNF 受容体 1 が関与すると考えられている (Ameloot et al., 2002; Cauwels et al., 2003; Tracey et al., 1986)。

現在までの報告より、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS には、

①TNF $\alpha$ による、細胞死のいち形態である RIP1/3 kinases 依存的な Necroptosis (Duprez et al., 2011; Newton et al., 2014)

②Necroptosis 細胞から放出された内因性炎症惹起物質 DAMPs (Damage-associated molecular patterns) を受容した炎症細胞による、IL-1 $\beta$ や IL-6 等の炎症性サイトカインの過剰産生 (Duprez et al., 2011; Everaerd et al., 1994; Starnes et al., 1990)

という 2 つの段階が関与することが知られる (Figure 2)。さらに、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS は、炎症細胞から放出された大量のサイトカインが生存細胞に再作用することで、上記過程が反復的かつ遷延的に起こるという特徴を持つ。最終的には、①組織傷害、②呼吸不全、③体温・血圧低下、がそれぞれ直接的な引き金となって個体死に至ることが報告もしくは示唆されているため、ここで概説したい。

①組織傷害については、サイトカインによる直接の組織傷害、また、サイトカインを受容した炎症細胞群およびサイトカインに誘引された好中球が放出する活性酸素・プロテアーゼに起因する組織傷害 (Dang et al., 2006; Dewas et al., 2003; Duprez et al., 2011; Huys et al., 2009; Starnes et al., 1990; Takahashi et al., 2008; Tracey et al., 1986; Van Molle et al., 2002; Vandevyver et al., 2012; Zhang et al., 2010) の関与が示唆されている。

②呼吸不全については、上記①のようなサイトカインおよび産生された活性酸素・プロテアーゼによる肺胞上皮組織、肺胞毛細血管内皮組織の傷害や、好中球が放出する顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulation Factor) および顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor) による炎症反応に伴い、血管透過性が増して間質と肺胞内が血液性の滲出液で満たされ、肺での  $O_2/CO_2$  の換気不全に至ることが示唆されている (Zhang et al., 2010).

③体温・血圧低下については、サイトカインを受容した血管内皮細胞が産生する NO (一酸化窒素) が平滑筋内に拡散し、平滑筋細胞内の可溶性グアニル酸シクラーゼと結合および活性化することで平滑筋を弛緩させ、血管拡張を起こし、最終的に体温低下と血圧低下を誘発することが報告されている (Cauwels et al., 2003; Cauwels et al., 2000).

以上のように、 $TNF\alpha$ 誘導性 SIRS はヒト SIRS と同様、多くの段階が時間推移的および同時並行的に進行する非常に複雑な病態である。したがって、本病態において KLHDC10 が関与する段階と細胞種、およびその詳細な分子機構を明らかにすることは、非常に challenging ではあるが、本病態に関与する新たな分子シグナルを同定できる点、また将来的には世界初の SIRS 治療薬開発の基盤となりうる点で大きな意義を持つ。

## **KLHDC10 の TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデル各段階への関与**

上記に基づき、私はまず、TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルの 2 つの発症段階における KLHDC10 の関与を検討した。その結果、KLHDC10 欠損マウスでは、Necroptosis の低下は全身性には見られない一方で、IL-6 の血清中への放出量、および脾臓中での mRNA 誘導量が有意に低下していることが明らかとなった (Figure 4-6)。さらに、脾臓がマクロファージなどの炎症細胞に富んだ臓器であることから、炎症細胞における KLHDC10 の機能に着目して解析を進めた。一連の解析の結果、*in vitro* の実験系では KLHDC10 欠損により、炎症細胞限定的に RIP1/3 依存性 Necroptosis が亢進することを見出した (Figure 10)。これは、KLHDC10 欠損による炎症細胞の Necroptosis 亢進が、IL-6 産生量を低下させる要因のひとつである可能性を示唆し、さらには、TNF $\alpha$  誘導性 SIRS 病態における耐性の獲得につながる可能性をも示唆するものである (Figure 12)。

## **RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis の分子機構**

1990 年代まで、細胞死研究の主流は Caspase 依存的な Apoptosis であった。細胞膜の Integrity を保ったまま死に至る Apoptosis は、その形態から “Immunologically silent death mode” と称されていた一方で、細胞膜が破裂し内容物が放出されるといふ、形態の異なる細胞死が存在することも知られていた。この細胞死は、“Pro-inflammatory death mode” と呼ばれ、Apoptosis 以外の細胞死という意味合いで Necrosis と総称されていた。

2000 年、Caspase 欠損や Caspase 阻害剤処置下などの Apoptosis が誘導されない状況において、Death receptor のアゴニスト依存的な細胞死誘導に、RIP1 (Receptor-interacting protein 1) の kinase 活性が必要であることが示された (Holler et al., 2000)。これ以降、Necrosis の中でも RIP1 の kinase 活性依存的に誘導される細胞死が Necroptosis と称されるようになった。その後、RIP1 の kinase 活性阻害を



介して Necroptosis を抑制する低分子化合物 Necrostatin が複数得られたことで、Necroptosis 研究は急速に進んだ (Degterev et al., 2008; Degterev et al., 2005). なお、現在に至るまで主流に用いられている低分子化合物 Necrostatin-1 は、上記の中でも RIP1 の kinase 活性をアロステリックに阻害する低分子化合物である。本阻害剤を用いた種々の解析により、Necroptosis が、虚血性脳障害、心筋梗塞、神経の興奮毒性、化学療法誘導性細胞死など、多くの病態関連細胞死に関与することが明らかにされた (Degterev et al., 2005; Han et al., 2007; Li et al., 2008; Smith et al., 2007).

さらに、2009 年には、ゲノムワイド siRNA スクリーニングが行われ、TNF 受容体 1 下流において、RIP1 と並ぶ新たな Necroptosis の制御因子として RIP3 (Receptor-interacting protein 3) kinase が同定された。本報告においてはまた、RIP3 の kinase 活性が Necroptosis 誘導に必要であることが示されている (He et al., 2009). その後の解析により、RIP1 と RIP3 は、Caspase8 の活性欠損下において、Ripoptosome もしくは Necrosome と呼ばれる複合体を形成すること、また、それぞれが自己リン酸化および相互リン酸化により活性化することが明らかにされた (Orozco et al., 2014; Vandenabeele et al., 2010; Wu et al., 2014). 加えて、RIP1/3 が下流分子 MLKL (Mixed lineage kinase domain-like) のリン酸化を介して Necroptosis を誘導すること、MLKL は Pseudokinase として機能することが示された (Hildebrand et al., 2014; Murphy et al., 2013; Zhao et al., 2012). 最終的には、リン酸化 MLKL が 4 量体を形成することで  $\text{Na}^+$  の細胞内流入を促し、Necroptosis に至るとする説と (Chen et al., 2014)、リン酸化 MLKL が 3 量体を形成することで、TRPM7 チャネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  の細胞内流入を促し、Necroptosis に至るとする説とがあり (Cai et al., 2014). 現在に至るまで議論が続いている (Galluzzi et al., 2014). なお、前者はマウス皮下結合組織由来繊維芽細胞株の L929 細胞、後者はヒト結腸腺癌由来細胞株の HT-29 細胞と、それぞれ異なる細胞種における解析結果であることを申し添えておく。

また、近年では、JNK 持続的活性化および ROS の Necroptosis への関与も報告さ

れている (Kamata et al., 2005; Kim et al., 2007; Zhao et al., 2012). これらが Necroptosis 誘導において, RIP1/3 kinases もしくは MLKL の下流で機能するとの報告がある一方 (Xu et al., 2006; Zhao et al., 2012), RIP1/3 kinases と独立して機能するとの報告や (Newton et al., 2014; Polykratis et al., 2014; Sosna et al., 2014) , そもそも RIP1/3 依存性 Necroptosis 誘導に必要でないとする報告 (He et al., 2009) もある. すなわち, 細胞種間の共通性と相違性を含めた Necroptosis 誘導シグナルの全容は, 未だに解明されていない部分が多い.

## 本研究の目的

以上のように私は, KLHDC10 欠損マウスが耐性を示すことを見出した TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルの解析を通じ, KLHDC10 が本病態に関与する段階および分子メカニズムを明らかにすることを目指し, 本研究を行った. その結果, KLHDC10 が炎症細胞限定的に RIP1/3 依存性 Necroptosis 誘導に関与することを見出した.

上述のとおり, Necroptosis 誘導に至る分子シグナルの研究は, 比較的歴史が浅く, 現在でも未解明の点が多く残されている. したがって, 本研究結果は, RIP1/3 依存性 Necroptosis に関与する新規分子として KLHDC10 を見出した点において, 細胞死研究にとって大きなブレイクスルーとなることが期待される.

さらに, 臨床応用の観点からも非常に興味深い. 上述のとおり, TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS は, 多段階の事象が時間推移的および同時並行的に進行する非常に複雑な病態である. その複雑さが故に治療薬開発の取り組みは困難を極め, 現在に至るまで病態分子機構に基づく治療法は確立されていない. したがって, 本病態において KLHDC10 が関与する分子メカニズムを明らかにすることは, 将来的には世界初の SIRS 治療薬開発の基盤となりうる点で大きな意義を持つ.

また, *in vitro* の実験系で KLHDC10 が関与することを明らかにした Necroptosis シグナルは, TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS のみならず, 膵炎やチフス菌感染症など様々な病態に

関与することが知られている (He et al., 2009; Robinson et al., 2012). したがって, RIP1/3 依存性 Necroptosis 誘導シグナルにおいて, KLHDC10 が関与する分子メカニズムの詳細を明らかにすることは, これら病態の発症分子機構の解明, さらには新規治療薬標的の創出につながることを期待される.

## 【方法】

### 1. 細胞培養

#### ○OL929 細胞

マウス皮下結合組織由来，繊維芽細胞形態の NTCT clone 929 (L929) 細胞は，10% fetal bovine serum (FBS ; Vitromex)，100 units/ml Penicillin G (Meiji Seika ファルマ) を添加した 1.5 g/L glucose 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma) 中で，37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下にて培養した。

#### ○RAW 264.7 細胞

Abelson マウス白血病ウイルス誘導性腫瘍由来，マクロファージ形態の RAW 264.7 細胞は，10% FBS，100 units/ml Penicillin G を添加した Roswell Park Memorial Institute (RPMI) -1640 (Sigma) 中で，37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下にて培養した。

#### ○不死化 MEF 細胞

初代マウス胚性繊維芽 (MEF) 細胞は，野生型マウス E12.5 の妊娠メスより採取したものを 10% fetal bovine serum，100 units/ml Penicillin G を添加した 4.5 g/L glucose 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma) 中で，37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下にて数日間培養した後，pMK-SV40T (ori-) を Lipofectamine 2000 (Invitrogen) によりトランスフェクションすることで不死化した。不死化後も，上記と同様の条件下で培養した。

#### ○Neuro 2a 細胞

マウス脳由来，神経芽細胞の Neuro 2a 細胞は，10% fetal bovine serum，100 units/ml Penicillin G を添加した 4.5 g/L glucose 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM ; Sigma) 中で，37°C，5% CO<sub>2</sub> 条件下にて培養した。

### 2. 刺激用試薬および阻害剤

下記のとおり、刺激用試薬および阻害剤を使用した。刺激用試薬は Milli-Q に、阻害剤は DMSO (Dimethyl sulfoxide ; Sigma) にそれぞれ溶解し、1000 倍希釈で培地に添加した。また、コントロールとして 同量の Milli-Q もしくは DMSO を添加した。

#### ○刺激用試薬

- ・ mTNF $\alpha$  (Recombinant murine TNF- $\alpha$  ; peprotech)
- ・ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hydrogen Peroxide ; Wako)

#### ○阻害剤

- ・ Z-VAD-fmk (Sigma)
- ・ Smac-mimetic (LCL-161 IAP inhibitor ; Active Biochem)
- ・ Necrostatin-1 (Sigma)
- ・ t-BHQ (tert-Butylhydroquinone ; Sigma)

### **3. siRNA**

各標的遺伝子に対して、下記の配列の Stealth<sup>TM</sup> siRNA (Invitrogen) を使用した。また、コントロールとして、Stealth RNAi<sup>TM</sup> siRNA Negative Control Medium GC Duplex および Stealth RNAi<sup>TM</sup> siRNA Negative Control Medium GC Duplex #3 (いずれも Invitrogen) を使用した。

#### ○siRNA 配列

##### mouse KLHDC10 #1

AUGAGUUCCUGUGUGAGUCCAAGGU

ACCUUGGACUCACACAGGAACUCAU

##### mouse KLHDC10 #2

AAGACAUAAAGGGACCCAUUGAUGA

UCAUCA AUGGGUCCCUUUAUGUCUU

mouse KLHDC10 #3

UUUCAUGUCUGUACCUCUCCUCCGG

CCGGAGGAGAGGUACAGACAUGAAA

mouse Nox2 #2

CCAUCCACACAAUUGCACAUCUCUU

AAGAGAUGUGCAAUUGUGUGGAUGG

mouse Nox2 #3

UGCCAUCCAUGGAGCUGAACGAAUU

AAUUCGUUCAGCUCCAUGGAUGGCA

#### **4. siRNA の導入**

12 well プレートに細胞を  $0.5-1.0 \times 10^5$  cells/well で播種し、RAW 264.7 細胞および不死化 MEF 細胞についてはただちに、L929 細胞および Neuro 2a 細胞については 16-20 時間培養後に、トランスフェクションカクテルを添加した。

トランスフェクションカクテルは、100  $\mu$ l OPTI-MEM (Invitrogen) 中で、20-40 pmol siRNA, 3  $\mu$ l RNAi MAX (Invitrogen) を混和し、室温に 15 分静置して作製した。

さらに、siRNA 標的遺伝子のタンパク質発現が抑制されるまで 48 時間培養を行い、各種アッセイを行った。

#### **5. 細胞死アッセイ**

下記のとおり、培養上清中への LDH 放出量を指標とした細胞死の定量を行った。

12 well プレートに播種した細胞への刺激前に、培養上清を 500  $\mu$ l メディウムに交換した。刺激の一定時間後に、培養上清を回収し、2,000 rpm、室温にて 5 分間遠心した。また、培養上清を除去した細胞に、1 ml の 0.1% Triton-X (Sigma) 含有 PBS (Phosphate buffered saline; 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 12 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) を加え、室温にて 5 分間震盪して細胞を溶解した。前述した遠心後の上清を別チューブに分取し (以下、これを液 A と表記する)、残ったペレットに細胞溶解液を加え、vortex した後、13,500 rpm、4°C にて 5 分間遠心した。上清を別チューブに分取し (以下、これを液 B とする)、液 A 50  $\mu$ l と液 B 50  $\mu$ l について、LDH-細胞毒性テストワコー (Wako) の発色試薬および停止液を添加した後に、Labsystems Multiskan® BICHROMATIC (Labsystems) を用いて 570 nm での吸光度を測定した。なお、ブランクとして、液 A については当該メディウムの吸光度を、液 B については 1% Triton-X (Sigma) PBS の吸光度を測定し、各サンプルの吸光度からこれらを差し引いた値を用いて、培養上清中への LDH 放出量を算出した。

## **6. 定量 RT-PCR**

マウス各臓器 1/2 片に 1 ml の ISOGEN (ニッポンジーン) を加え、氷上にて電動ホモジナイザーで破碎、または 12 well plate に  $1.0 \times 10^5$  cells/well にて播種後 48 時間培養した RAW 264.7 細胞 1well あたりに 1 ml の ISOGEN を加え、室温で 5 分間震盪した。200  $\mu$ l のクロロホルム (Wako) を加えて転倒混和後、13,500 rpm、4°C にて 15 分間遠心した。この上清に 500  $\mu$ l のイソプロパノール (Wako) を加え、転倒混和後、13,500 rpm、4°C にて 10 分間遠心した。マウス肝臓片については、クロロホルム添加から上清分取までの作業を 2 度くり返した。上清を取り除き、1 ml の 70% EtOH (Ethanol 99.5% <Wako> を DEPC <Diethyl pyrocarbonate> 処理 Milli-Q にて希釈した) を添加後、13,500 rpm、4°C にて 5 分間遠心した。上清を取り除き、沈殿を風乾させた後、20  $\mu$ l (細胞)、100-600  $\mu$ l (臓器) の DEPC 処理 Milli-Q を添加し、55°C

にて 10 分間インキュベートした。

上記の方法で得られた RNA から, ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (Toyobo) を用いて逆転写することにより cDNA を作製した。この cDNA を鋳型とし, 以下のプライマーセットを用いて定量 RT-PCR を行った。検出試薬として Power SYBR® Green PCR Master Mix (Roche) を, また検出機器には LightCycler® (Roche) を用いた。それぞれの遺伝子発現量は, 40S ribosomal subunit protein S18 の mRNA の発現量を用いて標準化した。

#### ○プライマー配列

##### mouse S18

(Forward) 5' TCCAGCACATTTTGGCGAGTA 3'

(Reverse) 5' CAGTGATGGCGAAGGCTATT 3'

##### mouse IL-1 $\beta$

(Forward) 5' AGAATCTATACCTGTCCTGTGTAATGAAAG 3'

(Reverse) 5' TGGGTATTGCTTGGGATCCA 3'

##### mouse IL-6

(Forward) 5' GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA 3'

(Reverse) 5' CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA 3'

##### mouse IL-4

(Forward) 5' AGATCATCGGCATTTTGAACG 3'

(Reverse) 5' TTTGGCACATCCATCTCCG 3'

および



(Forward) 5' CGAGCTCACTCTCTGTGGTG 3'

(Reverse) 5' TGAACGAGGTCACAGGAGAA 3'

mouse IL-10

(Forward) 5' CCCTTTGCTATGGTGTCCCTT 3'

(Reverse) 5' TGGTTTCTCTTCCCAAGACC 3'

mouse IL-13

(Forward) 5' GCTTATTGAGGAGCTGAGCAACA 3'

(Reverse) 5' GGCCAGGTCCCACTCCATA 3'

mouse TGF- $\beta$

(Forward) 5' TGACGTCCTGGAGTTGTACGG 3'

(Reverse) 5' GGTTTCATGTCATGGATGGTGC 3'

mouse mitochondria cytochrome B

(Forward) 5' CTTAGCCATACACTACACATCAG 3'

(Reverse) 5' ATCCATAATATAAGCCTCGTCC 3'

mouse mitochondria cytochrome c oxidase III

(Forward) 5' ACGAAACCACATAAATCAAGCC 3'

(Reverse) 5' TAGCCATGAAGAATGTAGAACC 3'

mouse mitochondria NADH oxidase

(Forward) 5' AGCCTCAAACCTCCAAATACTC 3'

(Reverse) 5' CCCTGATACTAATTCTGATTCTCC 3'

## 7. 抗体

### ○一次抗体

抗 KLHDC10 モノクローナル抗体は, mouse KLHDC10 ΔEx2 のリコンビナントタンパク質を抗原とし, 当研究室でラットリンパ節法により作製されたものを用いた.

また, 市販の一次抗体として, 下記のものを用いた.

- ・ 抗 phospho-JNK ポリクローナル抗体 (Cell Signaling)
- ・ 抗 total JNK ポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology)
- ・ 抗 actin モノクローナル抗体 (Sigma)
- ・ 抗 α-tubulin モノクローナル抗体 (Serotec)
- ・ 抗 Nox2 (gp91 phox) モノクローナル抗体 (BD)
- ・ 抗 RIP1 モノクローナル抗体 (BD)
- ・ 抗 RIP3 ポリクローナル抗体 (abcam)

### ○二次抗体

HRP 標識二次抗体として, 下記のものを用いた.

- ・ 抗 rat IgG 抗体 (GE healthcare, Cell Signaling)
- ・ 抗 rabbit IgG 抗体 (Cell Signaling)
- ・ 抗 mouse IgG 抗体 (Cell Signaling)

## 8. イムノブロット

培養上清を除去した細胞に IP Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1% Triton X-100, 10 mM EDTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μg/ml Leupeptin) を加え, 4°Cで 10 分間溶解した. リン酸化タンパク質を検出する

場合には、上記に対し、さらに Phosphatase inhibitor cocktail (200 mM NaF, 300 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 25 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 30 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 125  $\mu\text{M}$  Cantharidin, 50 mM Imidazole) を 25 倍希釈で添加した。細胞溶解液を 13,500 rpm, 4°Cにて 10 分間遠心し、得られた上清に SDS sample buffer (4% SDS, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 10% bromophenol blue, 36% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol) を等量加え、98°Cで 3 分間加熱した後、SDS-PAGE によって分離した。ゲルから PVDF 膜 (Fluoro Trans®  $\phi$ 0.2  $\mu\text{m}$ ; Pall Corporation) にセミドライ方式によって転写し、PVDF 膜を 5% スキムミルク (雪印) 含有 TBS-T (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% Tween 20) 中で室温にて 1.5 時間ブロッキングし、5% BSA (bovine serum albumin; 岩井化学) および 0.1%  $\text{NaN}_3$  含有 TBS-T で希釈した一次抗体を 4°Cで一晩反応させた。さらに、5% スキムミルク含有 TBS-T で希釈した二次抗体を加え、室温で 2 時間反応させた。その後、PVDF 膜を TBS-T で洗浄し、ECL (enhanced chemiluminescence) システム (GE healthcare) によって検出を行った。バンド強度の定量には、画像解析ソフト ImageJ 1.47 を用いた。

## 9. リコンビナントタンパク質

### 1. タンパク質の精製

当研究室で作製された GST-mouse  $\text{TNF}\alpha$ (83-225 a.a.) (pGEX-6T1) を大腸菌 BS21 株に形質導入し、20 mg/l Ampicillin (Sigma) 含有 LB (Sigma) 培地 50 ml 内で 150 rpm, 37°Cにて一晩震盪培養した。500 ml にスケールアップしてさらに 150 rpm, 37°Cにて 2 時間震盪培養し、氷上にて数分冷やした後、IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside; Sigma) を最終濃度 0.1 mM となるように添加し、150 rpm, 30°Cにて 1.5 時間震盪培養した。5,000 rpm, 4°Cにて 20 分間遠心し、上澄みを捨てて得られたペレットを 10 mM EDTA (Sigma) 含有 PBS で懸濁した後、3,000 rpm, 4°Cにて 30 分間遠心した。上澄みを捨てて得られたペレットを再度 10 mM EDTA

含有 PBS で懸濁し、ホモジナイザーで破碎した後、Triton-X を最終濃度 1% になるよう添加した。超音波破碎を 1 分間行い、氷上で 1 分間静置する作業を 5 回くり返した後、18,500 rpm, 4°C にて 30 分間遠心した。得られた上清を 2 サンプル分まとめ、10 mM EDTA 含有 PBS で予洗いした Glutathione Sepharose™ 4B (GE Healthcare) をビーズ量換算で 1 ml 添加し、4°C にて 2 時間転倒混和した。1,500 rpm, 4°C にて 5 分遠心し、上澄みを捨てた後に 10 mM EDTA 含有 PBS を添加し転倒混和する作業を 2 回くり返し、さらに 1,500 rpm, 4°C にて 5 分遠心し、上澄みを捨てた後に Cleavage buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 1 mM DTT (dithiothreitol)) を添加し転倒混和する作業を 2 回くり返した。1,500 rpm, 4°C にて 5 分遠心し、上澄みを捨てた後、1 ml の Cleavage buffer, 60 µg の PreScission protease (当研究室にて作製された) を順に添加し、4°C にて一晩転倒混和した。1,500 rpm, 4°C にて 5 分遠心し、得られた上清を回収し、さらに残ったビーズを Cleavage buffer で洗い込み、上清とまとめた。PreScission protease による切断後に生じた GST を取り除くため、Cleavage buffer で予洗いした Glutathione Sepharose™ 4B をビーズ量換算で 200 µl 加え、4°C にて 2 時間転倒混和した。1,500 rpm, 4°C にて 5 分遠心し、得られた上清を回収し、残ったビーズを Cleavage buffer で洗い込んで上清とまとめ、最終画分とした。

## 2. エンドトキシンの除去

ToxinEraser™ Endotoxin Removal Resin (GenScript) をカラムに充填し、Regeneration Buffer (1% Sodium deoxycholate) を用いて活性化した後、Cleavage buffer で平衡化し、ここに前述の最終画分を 3 回くり返し通すことを行った。さらに、除去後のタンパク質溶液について、ToxinSensor™ Chromogenic LAL Endotoxin Assay Kit (GenScript) を用いてエンドトキシン量が 1 EU/ml 以下であることを確認した。

### 3. タンパク質の定量

エンドトキシン除去の作業後、DC Protein Assay (BIO-RAD) を用いて行った。Cleavage buffer で適切な倍率に希釈したサンプルに対し、reagent S 20  $\mu$ l と reagent A 1ml の混合溶液を 25  $\mu$ l 加え、さらに reagent B を 200  $\mu$ l 添加した後、室温で 15 分間静置した。Labsystems Multiskan® BICHROMATIC (Labsystems) を用いて 650 nm での吸光度を測定し、適切な濃度の BSA サンプルを用いて作成した検量線をもとに、タンパク質量を算出した。

## 10. マウス個体モデル

### 1. 維持・管理

本研究科付属の動物施設において、SPF (Specific pathogen free) 環境下で繁殖・飼育した C57BL6/J 系統の野生型マウス、および当研究室において作出された同系統の ASK1 欠損マウス、KLHDC10 欠損マウスを用いた。飼料には、ガンマ線照射飼料 NMF 30kGy (オリエンタル酵母工業) を使用した。

### 2. TNF $\alpha$ 投与

実験当日の朝に SPF 施設よりマウスを搬出し、コンベンショナル飼育室に移送した。mTNF $\alpha$ を滅菌処理済 PBS に溶解し、mTNF $\alpha$  5  $\mu$ g/200  $\mu$ l PBS となるように調製した後、マイジェクター 1 ml 29G インスリン用シリンジ (Terumo) を用いて 200  $\mu$ l/mouse にて尾静脈よりマウスに投与した。なお、投与は午前 8 時から午前 11 時までの間に行い、投与後のマウスは 1 匹/ケージで維持した。

### 3. 体温測定

マイクロプローブサーモメータ BAT-12 (室町機械) を用いた直腸温測定により行った。

#### 4. 血清・臓器の採取

マウスの胸腔を開いて全採血を行い、マイクロティナ™マイクロガード™チューブ/イエロー（BD）内で 13,500 rpm、室温にて 1 分間遠心した後、上澄みの血清を採取した。また、マウスの胸腔を開いて各臓器を採取し、ただちに液体窒素により凍結した。

#### 5. 血中パラメーター測定

前述の方法で採取した血清を、SRL 社に委託することで行った。

## **11. ELISA**

前述の方法で採取した血清を、原液もしくは適切な倍率に希釈した後、サイトカイン定量のため ELISA に用いた。Mouse IL-1 $\beta$ /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit, Mouse IL-6 Quantikine ELISA Kit, Mouse IL-4 Quantikine ELISA Kit（すべて R&D Systems）を使用し、下記の方法で測定を行った。

マイクロプレートに 50  $\mu$ l の Assay Diluent、続いて 50  $\mu$ l の血清サンプルもしくは Control、検量線作成用の Standard を加え、室温で 2 時間静置した。これらの液を捨て、各 well を 400  $\mu$ l の Wash Buffer で 5 回洗浄した。次に、各 well に 100  $\mu$ l の Conjugate を添加し、室温で 2 時間静置した。Conjugate を捨て、各 well を 100  $\mu$ l の Wash Buffer で 5 回洗浄した。最後に、各 well に 100  $\mu$ l の Substrate Solution を加え、室温で 30 分静置した後、100  $\mu$ l の Stop Solution を添加し、ただちに Labsystems Multiskan® BICHROMATIC（Labsystems）を用いて 450 nm および 540 nm での吸光度を測定した。バックグラウンド補正のため、450 nm での吸光度から 540 nm での吸光度を差し引き、この値を用いてサイトカイン量を算出した。

## 【結果】

### 1. KLHDC10 欠損マウスは、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示す

本モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスは、野生型マウスに比べ有意な生存期間の延長と体温低下の抑制という表現型を示した (Figure 3A, B). 体温低下の表現型については、TNF $\alpha$ 投与 8 時間後以降は死亡するマウス個体が出たため、TNF $\alpha$ 投与 6 時間後 1 点のタイムポイントにおける体温の比較もあわせて行った。個体数を上記よりも増やして比較を行った結果、体温低下の時間推移を追った上記と同様、KLHDC10 欠損マウスは、野生型マウスに比べ有意に高い体温を示した (Figure 3C). さらに、TNF $\alpha$ の溶媒として使用する PBS のみを尾静脈から同量投与したさいには、野生型マウスおよび KLHDC10 欠損マウスにおいて、顕著な体温低下は見られなかった (Figure 3D). したがって、上記の表現型は注射による外的なショックによるものではなく、投与した TNF $\alpha$ の生理作用に由来するものであると考えられる。

また、これらの表現型について、KLHDC10 欠損マウスが ASK1 欠損マウスと比べても有意な耐性を示したことから、本モデルにおいては KLHDC10 が ASK1 以外のターゲット分子をも制御している可能性が示唆された (Figure 3A-C).

### 2. KLHDC10 欠損マウスでは、Necroptosis 低下は全身性には見られない

前述した知見に基づき、各段階における KLHDC10 の関与について検討を進めた (Figure 1). まず、KLHDC10 欠損マウスにおいて、「①TNF $\alpha$ による RIP1/3 kinases 依存的な Necroptosis」が全身性に低下している可能性を検証した。TNF $\alpha$ 投与 6 時間後の血清において、組織傷害マーカーである LDH および ALT 放出量、さらに DAMPs の 1 種である mtDNA (mitochondria DNA) 量 3 種類をそれぞれ比較したところ、い

ずれのマーカーについても野生型マウスとKLHDC10欠損マウス間で顕著な差は見られなかった (Figure 4A-E). なお, TNF $\alpha$ 投与 2 時間後の血清においてもこれらマーカーの比較を行ったが, そもそも PBS 投与群と比べて値の上昇が見られない, もしくは個体間の差が大きいという理由から, 評価に値しなかった (data not shown). 以上を総合して, TNF $\alpha$ 誘導性の Necroptosis の段階において, KLHDC10 が全身性に関与する可能性は低いことが示唆された.

### **3. KLHDC10 欠損マウスの血清および脾臓において, 炎症性サイトカイン IL-6 の産生量が低下している**

次に, KLHDC10 欠損マウスにおいて, 「②炎症性サイトカインの過剰産生」が低下している可能性を検証した. TNF $\alpha$ 投与 2 時間後および 6 時間後の血清中で, 炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ および IL-6 の放出量を比較したところ, 後期 (投与 6 時間後) の IL-6 量についてのみ, KLHDC10 欠損マウスにおける有意な低下が見られた (Figure 5A-D). ここで, TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおける致死性は, Anti-IL-6 抗体の投与により完全にレスキューされることが報告されている (Figure 5E ; (Starnes et al., 1990)). すなわち, 本モデルにおいては, IL-6 が致死性に関わる重要な役割を担っていることが示唆される.

さらに, TNF $\alpha$ 投与 2 時間後および 6 時間後に, 臓器レベルで IL-6 mRNA 誘導量を比較したところ, 後期 (投与 6 時間後) の脾臓において KLHDC10 欠損による有意な低下が見られた (Figure 6A, D). 脾臓は, ヒト SIRS 患者において, 病理学的に「感染脾」と呼ばれる急性炎症が確認される臓器であることから, 本モデルにおいても IL-6 産生に重要な役割を担うことが示唆される (MERCK MANUAL). 一方で, 肝臓および小腸においては, いずれのタイムポイントでも KLHDC10 欠損による IL-6 mRNA 誘導量の有意な低下が認められなかった (Figure 6B, C, E, F).

以上より, KLHDC10 欠損マウスにおける炎症性サイトカイン IL-6 量の低下が, 本



モデルにおける耐性のひとつの要因と考えられる。また、KLHDC10 欠損により IL-6 mRNA 誘導量の低下が見られた脾臓が、マクロファージなどの炎症細胞に富んだ臓器であることを鑑みると、本結果からは、KLHDC10 欠損により炎症細胞での DAMPs 応答性 IL-6 産生能が低下している可能性が示唆される。

#### **4. KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、抑制性サイトカイン IL-10 の mRNA 誘導量増加は見られない**

ところで、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS のように、生体内において炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ などが過剰に放出された場合には、その恒常性維持のために、二次的に抑制性サイトカインである IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 等の放出量が上昇し、ネガティブフィードバック制御により炎症性サイトカインの産生量が低下する現象が知られている (Figure 7C ; (de Waal Malefyt et al., 1991; Donnelly et al., 1991; Fiorentino et al., 1991; Sultani et al., 2012; te Velde et al., 1990; Vannier et al., 1992)). そこで、上述 3. で述べた表現型が、抑制性サイトカインの産生量上昇によるものである可能性を検証した。

TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS に特定の抑制性サイトカインが関与するとの報告は未だ出ていないため、代表的な抑制性サイトカインである IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ および IL-13 に関して、脾臓において TNF $\alpha$ 投与依存的な mRNA の誘導量上昇が見られるか検討を行った。その結果、IL-10 についてのみ、誘導量の上昇が確認された (Figure 7A, B)。なお、誘導量の上昇は、投与 2, 6 時間後の両タイムポイントにおいて認められた。続いて、野生型マウスと KLHDC10 欠損マウスで脾臓における IL-10 mRNA 誘導量を比較したところ、KLHDC10 欠損マウスにおける誘導の亢進は認められず、むしろ低下するという結果を得た (Figure 7A, B)。さらに、血清中 IL-4 放出量 (野生型マウスにおける通常濃度は、約 3 pg/ml 以下 (Ruger et al., 1999) ) を測定した結果、PBS および TNF $\alpha$ 投与 2, 6 時間後において、野生型マウス、KLHDC10 欠損マウスともに系の検出限界 (7.8 pg/ml) 以下であったこと (data not shown) から、KLHDC10 欠損マウ

スの血清で、IL-4 放出量が顕著に増加している可能性は低いと考えられる。したがって、KLHDC10 欠損マウスにおける IL-6 産生量の低下に、抑制性サイトカインのネガティブフィードバック制御が関与する可能性は低いことが示唆された。

## **5. KLHDC10 発現抑制により， DAMPs 刺激下での炎症細胞 1 細胞あたりの IL-6 mRNA 誘導量は低下しない**

続いて、炎症性サイトカイン IL-6 量を低下させる要因の探索を進めた。脾臓がマクロファージなどの炎症細胞に富んだ臓器であることから、まず、KLHDC10 欠損によりそれら 1 細胞あたりの IL-6 産生“量”が低下している可能性について検証した。

前述したとおり、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいては、DAMPs が IL-6 産生を誘導することが知られる。DAMPs は、通常の生細胞内での機能によって、大きく以下の 2 種類に分けられる。①生細胞内においては非炎症性の機能を持つが、細胞ストレス・衝撃・傷害などによってひとたび放出・分泌・修飾もしくは細胞表面へ露出されると、immunomodulatory な性質を獲得するもの、②生細胞内においてサイトカイン様の作用を持ち、細胞溶解時に放出された後にも炎症応答に寄与するもの、である。前者の例として、放出後に主に TLR (Toll-like receptor) を介して immunomodulatory な機能を発揮する HMGB1 (High-mobility group box 1), HSPs (Heat shock proteins), mitochondria DNA などが挙げられる (El Mezayen et al., 2007; Kaczmarek et al., 2013; Scaffidi et al., 2002; Wheeler et al., 2009; Zhang et al., 2010)。中でも、mitochondria DNA については、実際の TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて、血清中の値が上昇することが報告されている (Duprez et al., 2011)。また、後者の例として、放出後に P2Y/P2X 受容体を介して作用する ATP や、IL-1 受容体を介する IL-1 $\alpha$ , RAGE を介する S100B などが挙げられる (Eigenbrod et al., 2008; Iyer et al., 2009; Kovalenko et al., 2009; Li et al., 2010; Rider et al., 2011)。

上述のような DAMPs を広く含む刺激として、TNF $\alpha$ を投与した野生型マウスから

採取した血清, および  $\text{TNF}\alpha$  + pan-caspase 阻害剤の Z-VAD-fmk 刺激により Necroptosis を誘導した L929 細胞の培養上清, の 2 種類を DAMPs 模倣刺激用に調製した (Figure 8A). これらをそれぞれ別個に, マクロファージ様細胞株である RAW 264.7 細胞に添加したさいの IL-6 mRNA 誘導量を定量する系を確立し, 検討を行った (Figure 8B-D). 系を評価するためのネガティブコントロールとして, 前者においては PBS を投与した野生型マウスから採取した血清を, また後者においては,  $\text{TNF}\alpha$  + Z-VAD-fmk + Necrostatin-1 刺激を施した L929 細胞の培養上清を調製した. これらのネガティブコントロール添加時には, それぞれ DAMPs 模倣刺激の添加時と比べて IL-6 mRNA 誘導が抑えられていた (Figure 8C, D). なお, 系の確立に際しては, マウスの脳ライセートを骨髄由来樹状細胞に添加したさいの IL-12 mRNA 誘導量を定量している実験系を参考にした (Shichita et al., 2012).

検討の結果, いずれの DAMPs 模倣刺激についても, RAW 264.7 細胞における IL-6 mRNA 誘導量は KLHDC10 発現抑制によって低下せず, むしろ亢進する傾向を示した (Figure 8E, F). 以上より,  $\text{TNF}\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおいて, KLHDC10 欠損マウス脾臓中の, 炎症細胞 1 細胞あたりの DAMPs 誘導性 IL-6 産生は低下していないことが予想された.

## **6. KLHDC10 発現抑制により, DAMPs 刺激下で炎症細胞の細胞死が亢進し, その一部に RIP1/3 依存性 Necroptosis が関与する**

次に, KLHDC10 欠損マウス脾臓において IL-6 の誘導量低下が見られる原因として, 炎症細胞の“数”が減少している可能性を検証した. 序論で述べたとおり,  $\text{TNF}\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおいて, 炎症細胞は過剰な DAMPs に曝されていると考えられる. 本モデルにおいて, DAMPs 誘導性細胞死の報告はいまだ存在しないが, *in vitro* の実験系では, 一部の DAMPs が細胞死を誘導することが報告されている (Zhou and Yuan, 2014). そこで, 本モデルにおける KLHDC10 欠損が, DAMPs 誘導性の細胞死を亢進

する可能性について検証した (Figure 9A). 上述 5. と同様,  $\text{TNF}\alpha$ +Z-VAD-fmk 刺激により Necroptosis を誘導した L929 細胞の培養上清を DAMPs 模倣刺激用に調製し, これを RAW 264.7 細胞に添加したさいの細胞死を定量する系を確立し, 検討を行った (Figure 9B). 細胞死の定量は, 細胞上清中への LDH 放出量を指標として行った. 添加した DAMPs 液そのものにも LDH が含まれているため, 刺激後の RAW 264.7 細胞上清中の LDH 量から, DAMPs 液にもとから含まれていた LDH 量を差し引くことで, RAW 264.7 細胞による細胞死を定量した.

その結果, KLHDC10 発現抑制下では, DAMPs 誘導性の細胞死が有意に亢進することが明らかとなった (Figure 9C). ここで, 系のネガティブコントロールとしての  $\text{TNF}\alpha$ +Z-VAD-fmk 単純刺激では細胞死誘導が見られなかったことから, 本細胞死が DAMPs の受容を介して誘導されていることが確認できた. さらに, 細胞死の形態にも着目したところ, 本細胞死の一部が RIP1 の kinase 阻害剤である Necrostatin-1 (Degterev et al., 2005) 処置により抑制されたことから, KLHDC10 発現抑制により亢進する DAMPs 誘導性の細胞死には, RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が少なくとも部分的に関与することが示唆された (Figure 9C).

以上より,  $\text{TNF}\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて, KLHDC10 欠損マウスで IL-6 量が低下したひとつの要因として, DAMPs 誘導性細胞死亢進により, 炎症細胞の数が減少している可能性が示唆された.

## **7. KLHDC10 発現抑制により, Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激下で炎症細胞限定的に RIP1/3 依存性 Necroptosis が亢進する**

では, KLHDC10 は, どのような分子メカニズムを介して炎症細胞の細胞死を制御しているのだろうか. 前述 6. において, KLHDC10 発現抑制による炎症細胞での細胞死亢進に, 部分的に関与することを明らかにした RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis に着目し, 分子メカニズムの解析を進めた.

序論で述べたとおり、Necroptosis は RIP1/3 kinases の活性化を介して誘導されるが、RIP1 の下流では、これ以外にも生存、炎症応答、Apoptosis といった様々な細胞応答が制御されている。このような RIP1 下流のシグナル伝達経路において、*in vitro* で Necroptosis を誘導する代表的な刺激として、IAP 阻害剤である Smac-mimetic (He et al., 2009; Lin et al., 2004) および pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-fmk の同時処置が知られている (He et al., 2009)。Smac-mimetic は RIP1 下流での NF- $\kappa$ B 経路を介した生存シグナルを抑制し、Z-VAD-fmk は Caspase の活性を介した Apoptosis を抑制する。すなわち、本 Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激は、RIP1 下流で生存、炎症応答、Apoptosis などの機能を抑制することで Necroptosis を導く (Figure 10A)。なお、以降、これらの同時刺激を「SZ 刺激」と表記する。

以上のような SZ 刺激を用い、炎症細胞における KLHDC10 発現抑制により、RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が亢進する可能性を検証した。本実験においても、上述 6. と同様、培養上清中への LDH 放出を指標とした細胞死の定量を行った。その結果、RAW 264.7 細胞における KLHDC10 発現抑制により、SZ 刺激誘導性の細胞死が有意に亢進することが見出された (Figure 10B, C)。加えて、細胞死が RIP1 の kinase 阻害剤である Necrostatin-1 処置により完全に抑制されたことから、KLHDC10 発現抑制により亢進する SZ 刺激誘導性細胞死は、RIP1/3 kinases 依存的な Necroptosis であることが示唆された (Figure 10B, C)。

興味深いことに、この SZ 刺激を繊維芽細胞株である L929 細胞および不死化 MEF 細胞に処置したさいには、RAW 264.7 細胞と同様に RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis の誘導は見られたものの、KLHDC10 発現抑制による細胞死の亢進は見られなかった (Figure 10D, E)。この結果は、上記 2. で述べた、野生型マウスと KLHDC10 欠損マウス間で、Necroptosis の顕著な差が全身性には認められなかったことと矛盾しないと考えられる。

以上より、KLHDC10 発現抑制により、炎症細胞限定的に RIP1/3 依存性 Necroptosis

が亢進することが明らかとなった。

## **8. 炎症細胞における Necroptosis 誘導および JNK 持続的活性化には、ROS 産生分子である Nox2 が少なくとも部分的に関与する**

ここで、KLHDC10 が関与する分子メカニズムの解明を目指し、Necroptosis 誘導シグナルの 1 つである、NADPH oxidase による ROS 産生を介した経路に着目した。現在までの報告より、繊維芽細胞株の L929 細胞においては、Nox1 (NADPH oxidase 1) が、TNF $\alpha$  刺激誘導性に、ラジカル性 ROS の Superoxide を産生し、JNK の持続的活性化を介して Necroptosis に至ることが報告されている (Figure 11A ; (Kim et al., 2007))。一方、マクロファージや好中球などの貪食細胞においては、同じ NADPH oxidase ファミリーに属する Nox2 (NADPH oxidase 2) を介して Superoxide が産生されること、また、これは貪食細胞が食作用により包み込んだ異物を殺菌するという生理的意義を持つことが知られていた (Figure 11B ; (Dang et al., 2006; Dewas et al., 2003; Frey, 2002))。Nox2 は、主として貪食細胞に特異的に発現する (Kim et al., 2007; Lambeth, 2004)。そこで、RAW 264.7 細胞においても Nox2 を介した Superoxide 産生が起こると想定し、先ほどの SZ 刺激が誘導する RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis への Nox2 および JNK の関与を、発現抑制実験により検証した。

その結果、Nox2 発現抑制により、SZ 刺激誘導性 Necroptosis が部分的ながらも有意に抑制されたことから、本 Necroptosis 誘導シグナルの一部は、Superoxide 産生分子の Nox2 を介していることが明らかとなった (Figure 11B, D)。これと関連し、ラジカル捕捉剤 t-BHQ 処置によっても、SZ 刺激誘導性 Necroptosis が部分的ながらも有意に抑制されたことから、本 Necroptosis 誘導シグナルの一部は、Nox2 が産生する Superoxide を介していることが示唆された (Figure 11C)。また、Nox2 下流での JNK 活性化についても検証したところ、細胞死と同様、Nox2 発現抑制下では、リン酸化シグナルを指標とした JNK の持続的活性化が減弱していることが明らかとなっ

た (Figure 11E).

以上の検討により, RAW 264.7 細胞における Necroptosis 誘導には, 模式図のようなシグナルが関与することが明らかとなった (Figure 11F). Nox2 発現抑制による Necroptosis および JNK 持続的活性化の減弱は部分的であったことから, 本研究においては未同定の Factor X を介した別経路の存在も否定はできないが, 炎症細胞における Necroptosis 誘導には, Nox2 を介した JNK 持続的活性化が少なくとも部分的に関与することが示唆された.

## **9. KLHDC10 発現抑制により, 炎症細胞の Necroptosis 亢進と関連して JNK 持続的活性化が亢進する**

続いて, KLHDC10 発現抑制が亢進する Necroptosis が, 上述 8. のシグナル伝達経路における JNK 持続的活性化に関与するかについて検討を行った. その結果, KLHDC10 発現抑制下では JNK 持続的活性化の亢進が見られたことから, KLHDC10 発現抑制は, JNK の上流で本経路の活性化亢進を担っていることが示唆された (Figure 11G, H).

## 【考察】

### はじめに

本研究において、私は、KLHDC10 欠損マウスが TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示すことを見出した (Figure 3)。また、KLHDC10 欠損マウスでは、Necroptosis の低下は全身性には見られない一方で (Figure 4)、炎症性サイトカイン IL-6 の血清中への放出量が有意に低下していたことから (Figure 5)、後者が本モデルに対する耐性獲得のひとつの要因と考えられる。さらに、KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、IL-6 mRNA 誘導量の有意な低下が見られたこと (Figure 6)、また、脾臓がマクロファージなどの炎症細胞に富んだ臓器であることから、炎症細胞に着目して解析を進めた。その結果、KLHDC10 欠損により、炎症細胞限定的に RIP1/3 依存性 Necroptosis が亢進することを明らかにした (Figure 10)。

上記の結果から、現在は、

「KLHDC10 欠損は、炎症細胞における細胞死を亢進することで、IL-6 産生量を低下させ、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS への耐性に寄与するのではないか」

との仮説を立てている (Figure 12)。したがって、今後は、

① TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスでは、*in vivo* レベルの炎症細胞の細胞死亢進が見られるか

について検証するとともに、

② KLHDC10 発現抑制による、炎症細胞限定的な RIP1/3 依存性 Necroptosis 亢進は、どのような分子メカニズムを介して引き起こされるのか

を明らかにすることが課題である。本 2 項目を中心に、以下で考察を述べたい。

なお、上記①、②は、下記の大項目 1. および 2. にそれぞれ対応している。

### 1. TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスで炎症



## 細胞の細胞死亢進が見られるかについての検証

### 1-1. KLHDC10 欠損マウスで IL-6 誘導量低下が見られた脾臓は、炎症細胞に富んだ臓器である

くり返しになるが、本研究では、KLHDC10 欠損によって、炎症細胞限定的に RIP1/3 依存性 Necroptosis が亢進することを明らかにした (Figure 10)。ここで、炎症細胞に着目した理由として、KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、IL-6 mRNA 誘導量の有意な低下が見られたこと (Figure 6)、また、脾臓がマクロファージなどの炎症細胞に富んだ臓器であることが挙げられる。したがって、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて、KLHDC10 欠損マウスで炎症細胞の細胞死亢進が見られるかを検証するにあたっては、脾臓が第一選択の臓器であると考えた。そこで、次項目以降では、脾臓に焦点を当てて議論を進めたい。

### 1-2. SIRS における脾臓の役割

脾臓が、広く急性炎症におけるサイトカイン産生に重要な役割を果たす臓器であることはよく知られており、ヒト SIRS 患者においても以下の内容が報告されている。

SIRS において、細菌や内因性炎症惹起物質が血管を介して脾臓に流れ込むと、マクロファージや肥満細胞が応答して IL-1 $\beta$ 、IL-6 等の炎症性サイトカインを放出し、そのオートクライン作用により各細胞が炎症性変化を起こす。炎症性変化を起こした細胞は、炎症性サイトカイン IL-8 や、ケモカイン CXCL2、化学伝達物質ロイコトリエン B4 をはじめとする、種々の好中球遊走刺激因子を放出し、好中球を誘引する (Schiffmann et al., 1975; Zhang et al., 2010)。このような一連の過程において、脾臓に急性炎症が生じることが知られ (MERCK MANUAL)、これは病理学的に「感染脾」と呼ばれる所見である。本所見が SIRS のいち病態である敗血症の死後剖検上の診断基準にも含まれることから、脾臓は SIRS の発症および進行に重要な役割と担うと考

えられている (MERCK MANUAL).

### **1-3. 臓器レベルでの RIP1/3 依存性 Necroptosis の検出法**

前項目で述べたとおり, TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS マウスモデルにおいても, 脾臓が炎症性サイトカイン産生およびその後の好中球誘引等を介して, 重要な機能を果たしていることが予想される. したがって, 本モデルの解析を進めるにあたり, 脾臓に着目する意義が十分にあるものと考えられる.

しかしながら, KLHDC10 欠損マウス脾臓において, 炎症細胞の Necroptosis を中心とした細胞死亢進が見られるかを検証するにあたっては, 1つ問題点がある. 現段階では, 臓器レベルで Necroptosis を特異的に検出する方法が存在しないという点である. 先行報告においても, HE (Hematoxylin-eosin) 染色における「核の濃縮と細胞質のエオジン好性 (好酸性)」という形態変化や (Duprez et al., 2011), 共免疫染色における TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 染色陽性と Caspase 3 染色陰性から Necroptosis を主張するに留まっている (Moriwaki et al., 2014). すなわち, 上記のような方法によってのみ, 脾臓での Necroptosis 亢進を主張することは厳しい評価を受けると予想される. したがって, 脾臓での Necroptosis 亢進に伴って生じると想定される, 他の事象についても並行して確認することが重要となるだろう. 例えば, 脾臓での Necroptosis 様細胞死亢進と, 好中球誘引といった機能関連変化の抑制との相関性を評価することが必要であるかもしれない.

また, 上記と関連して, 現在までに得られている結果についても考察したい. まず, 脾臓は形態学的に, 白脾髄と赤脾髄という大きく2つの組織から成る. 前者はT細胞を中心とした白血球から構成され, 脾臓断面においては円形かつ全体に散らばる形で存在する. また, 後者は赤血球, マクロファージ, 顆粒球等から成る組織であり, 脾臓断面において白脾髄を囲むように存在している (MERCK MANUAL). 実際に, 脾臓切片を用いた免疫染色により, マクロファージマーカーである F4/80 および CD11b

の各陽性細胞がほぼ赤脾髄のみに見られたことから、少なくともマクロファージは赤脾髄限定的に分布していることが確認された (data not shown)。

さらに、先行報告を参考にし (Robinson et al., 2012), 私自身の手によっても、脾臓切片における F4/80 と TUNEL の共免疫染色系を立ち上げることに成功した。今後、本免疫染色系を用いることで、KLHDC10 欠損マウス脾臓における細胞死亢進の可能性を検証していく予定である。大変興味深いことに、TNF $\alpha$ 投与 6 時間後の野生型・KLHDC10 欠損両マウス脾臓切片では、HE 染色において赤脾髄特異的な核の減少という形態変化が見られる傾向があり (data not shown), 上記の共免疫染色の結果とあわせて評価していきたいと考えている。

以上より、今後は KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、上記方法により Necroptosis 様の細胞死が亢進しているかを検討することと並行し、好中球誘引や急性炎症のような機能関連変化の抑制が相関して観察されるかを確認していくことが必要である。

#### **1-4. 脾臓以外の臓器の関与について**

上記のとおり、第一選択として脾臓に着目した検討および考察を行ってきたが、これは TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに脾臓以外の臓器が関与することを否定するものではない。実際に、KLHDC10 欠損マウスで IL-6 mRNA 誘導量の有意な低下が見られなかった臓器においても、肝臓のクッパー細胞や、小腸の腸管マクロファージといったように、炎症細胞が局在していることが知られる。私は、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて、これら臓器の炎症細胞でも、KLHDC10 欠損によって RIP1/3 依存性 Necroptosis 亢進が生じるものと推測している。ただし、肝臓や小腸では、臓器全体に占める炎症細胞の割合もしくは数が脾臓と比べて少ないために、KLHDC10 欠損マウスにおける、IL-6 mRNA 誘導量の有意な低下という表現型が見られなかったのではないかと考えている。

## 2. KLHDC10 発現抑制による，炎症細胞限定的な RIP1/3 依存性 Necroptosis 亢進は，どのような分子メカニズムを介して引き起こされるのか

### 2-1. KLHDC10 は，TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルと IL-6 産生に着目した解析において，ASK1 以外の標的分子をも制御している可能性が示唆された

結果 1. で述べたとおり，生存期間と体温低下の表現型について，KLHDC10 欠損マウスが ASK1 欠損マウスと比べても有意な耐性を示したことから，本モデルにおいては KLHDC10 が ASK1 以外のターゲット分子をも制御している可能性が示唆された (Figure 2A-C). また，KLHDC10 欠損マウスにおける血清中 IL-6 量は，野生型マウスに加え，ASK1 欠損マウスと比べても有意に低下していた (data not shown). したがって，IL-6 産生に着目して行ったそれ以降の解析結果においても，KLHDC10 が ASK1 以外の分子をも標的としている可能性が示唆された。

### 2-2. KLHDC10 発現抑制により，Neuro 2a 細胞および炎症細胞における過酸化水素誘導性細胞死は減弱する

KLHDC10 は，ASK1 の新規活性化因子として同定された分子であり，Neuro 2a 細胞における，過酸化水素依存的な細胞死誘導に必要であることが知られていた (Figure 1C). 一方，本研究において，炎症細胞における SZ 誘導性細胞死は，上記とは逆に KLHDC10 発現抑制によって亢進することが明らかとなった。また，SZ 誘導性細胞死には，少なくとも部分的に Nox2 を介した Superoxide 産生の関与が示唆されたことから (Figure 11B-D)，同じ ROS である上記の過酸化水素依存的な細胞死との関連を調べるため，炎症細胞における過酸化水素誘導性細胞死に対する

KLHDC10 の関与を検討した。その結果、KLHDC10 発現抑制により、炎症細胞における過酸化水素誘導性細胞死は、Neuro 2a 細胞と同様に減弱した (Sup. Figure 1B, D)。したがって、炎症細胞においても、ROS 下流で KLHDC10 が PP5-ASK1 経路を介した細胞死誘導を促進している可能性が示唆された。さらに、阻害剤を用いた実験により、これらの細胞死は、Caspase および RIP1/3 kinases のいずれにも非依存的な細胞死であると考えられる (Sup. Figure 1A-D)。これは Necroptosis とは別形態の細胞死であることから、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルの表現型からも示唆されるとおり (Figure 3)、KLHDC10 発現抑制下で亢進する炎症細胞の SZ 誘導性 Necroptosis には、PP5-ASK1 経路以外のシグナルが関与する可能性が高いと考えられる。

## つぎに

TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルでは、上述のとおり、KLHDC10 が PP5-ASK1 経路以外の分子シグナルをも制御する可能性が示唆された。では、炎症細胞において、KLHDC10 は具体的にどのような分子およびシグナルを介して、RIP1/3 依存性 Necroptosis を制御しているのだろうか。

前述した結果 8. のとおり、炎症細胞において、KLHDC10 発現抑制下では JNK 持続的活性化の亢進が見られた (Figure 11G, H)。したがって、KLHDC10 は、JNK 持続的活性化を上流で制御していることが示唆された。そこで、RIP1/3 依存性 Necroptosis に関与するシグナル伝達分子の中でも、JNK の上流で機能することが本研究もしくは報告から示唆される、

- ・ RIP1/3
- ・ Nox2

の 2 分子について議論したい。

また、当研究室の先行研究において明らかにされた、KLHDC10 の下記 3 つの分子機能との関連もあわせて考察したい。

- ・ ホスファターゼ PP5 の抑制
- ・ ケルヒリピートタンパク質としての、タンパク質間相互作用
- ・ 複合体型 E3

### **2-3. KLHDC10 の RIP1/3 への関与**

まず、KLHDC10-PP5 経路による、リン酸化制御機能に関して考察したい。序論において述べたとおり、RIP1/3 依存性 Necroptosis は、両分子のリン酸化を介して誘導されることが知られる。これら分子のリン酸化を特異的に検出できる抗体は市販されていないため、現在までの報告においては、phos-tag<sup>®</sup> (Wako) を用いた検討や、イムノブロットでの RIP1/3 のバンドシフトによってリン酸化を評価している (Robinson et al., 2012; Shindo et al., 2013)。

そこで、炎症細胞における SZ 刺激下でも RIP1/3 のバンドシフトが見られるか検討したところ、刺激後 4 時間において、RIP1 のバンド変化が観察された (Sup. Figure 2)。また、このバンド変化は、Necrostatin-1 処置により完全にキャンセルされたことから、RIP1 のリン酸化に関連した何らかの翻訳後修飾に起因するものと考えられる。さらに、KLHDC10 発現抑制下においては、RIP1 のバンド変化が亢進することが明らかとなった (Sup. Figure 2)。この結果は、KLHDC10 発現抑制下での Necroptosis および JNK 持続的活性化の変化と相関があることから、少なくとも Necroptosis 誘導シグナルに関連した RIP1 の翻訳後修飾をモニターしていると考えられる。

なお、RIP3 については使用した抗体で明確なバンドを検出できなかった。そのため、RIP3 リン酸化への KLHDC10 の関与については今後の検討課題である (data not shown)。

したがって、今後は、上記のバンド変化がリン酸化をモニターしているかについて、phos-tag<sup>®</sup> (Wako) や RIP1 リン酸化抗体の作製などの方法によって検証する必要がある。さらに、バンド変化がリン酸化であった場合には、それが PP5 を介した修飾

であるかを、発現抑制実験や戻し実験によって検討したい。また最近、RIP3 の脱リン酸化を介して Necroptosis を負に制御するホスファターゼとして、Ppm1b が同定された (Chen et al., 2015)。Ppm1b が RIP1 のリン酸化状態に与える影響についての詳細は不明だが、RIP1/3 が相互リン酸化する分子であることを考えると (Orozco et al., 2014; Vandenabeele et al., 2010; Wu et al., 2014), 上記の検討にさいしては、PP5 と Ppm1b との関連性にも留意すべきであろう。

次に、KLHDC10 のケルヒリピートタンパク質としての機能の観点から考察したい。序論で述べたとおり、ケルヒリピートタンパク質は、タンパク質間相互作用に重要であるとされる $\beta$ -propeller 折り畳み構造を持つこと (Adams et al., 2000; Kim et al., 2007; Li et al., 2004; Padmanabhan et al., 2006; Prag and Adams, 2003), KLHDC10 もタンパク質間相互作用を介した機能を有することが示唆される (Figure 1B)。本 Necroptosis 誘導シグナルにおける結合ターゲットとしては、RIP1/3 のほか、RIP1/3 との結合が Necroptosis 誘導に必要であることが報告されている、MLKL が挙げられる (Galluzzi et al., 2014; Zhao et al., 2012)。これら3つの分子については、共通して、Necroptosis 誘導時に JNK 持続的活性化の上流で働くとの報告が存在することから (He et al., 2009; Kim et al., 2007; Zhao et al., 2012), まずは本3分子を候補として解析を進めたい。

最後に、KLHDC10 は複合体型 E3 としての機能をも持つことから、炎症細胞において、KLHDC10 が定常的もしくは SZ 刺激誘導性に、RIP1/3 の分解を担う可能性についても今後検討していく予定である。なお、RIP1 に K48 型ユビキチン鎖を付加してプロテアソーム分解に導く E3 として Triad3A が (Chen et al., 2002; Fearnly et al., 2006), また、RIP1 上の K63 型ユビキチン鎖を K48 型ユビキチン鎖に置換することで、プロテアソーム分解に導く E3 として A20 が (He and Ting, 2002; Lin et al., 2008; Wertz and Dixit, 2014), すでに報告されている。そのため、解析にあたっては、これら E3 との協調性および独立性についても留意する必要がある。

## 2-4. KLHDC10 の Nox2 への関与

本研究では、KLHDC10 発現抑制により亢進する、炎症細胞における Necroptosis 誘導と JNK 持続的活性化に、Nox2 が部分的に関与することを明らかにした (Figure 11)。また、ラジカル捕捉剤 t-BHQ を用いた検討により、上記における Nox2 の ROS 産生機能の関与が示唆された (Figure 11C)。Nox2 は、主として貪食細胞に特異的に発現することから (Kim et al., 2007; Lambeth, 2004)、KLHDC10 が Nox2 を制御する分子機構を明らかにすることで、KLHDC10 が制御する炎症細胞選択的な Necroptosis 誘導の分子機構に迫ることが可能になると考えられる。したがって、本項目 2-6. においては、本研究結果に関連する Nox2 の ROS 産生機構に対し、KLHDC10 の既知機能という観点から考察を加えたい。

### 〈Nox2 による ROS 産生の分子機構〉

本項目では、Nox2 が導く ROS 産生の分子機構について概説したい。

マクロファージや好中球などの貪食細胞においては、NADPH oxidase ファミリーに属する Nox2 (NADPH oxidase 2) を介して Superoxide が産生されること、また、これは貪食細胞が食作用により包み込んだ異物を殺菌するという生理的意義を持つことが知られていた (Figure 11B; (Dang et al., 2006; Dewas et al., 2003; Frey, 2002))。

Nox2 は、gp91phox もしくは b-245 として、NADPH oxidase ファミリーの中で最初に同定された分子である (Royer-Pokora et al., 1986; Teahan et al., 1987)。N 末端と C 末端が細胞質側を向いた  $\alpha$ -helix の 6 回膜貫通構造から成るタンパク質であり、ROS 産生においては、Regulatory subunit である p47phox・p67phox・p40phox および GTPase Rac1/2/3 から成る複合体において、p22phox とともに Catalytic subunit として機能する (Lambeth, 2004; Vignais, 2002)。

Nox2 の活性化は、大きく①プロテインキナーゼによるリン酸化、②脂質代謝酵素、



③GTPase Rac 活性化を担うヌクレオチド交換タンパク質, の3つのシグナルが関与して, 細胞膜上で複合体が形成されることによって導かれる. 以下にそのメカニズムを概説する.  $TNF\alpha$ をはじめとする上流からの刺激に応答して, PKC (Protein Kinase C) が p47phox の autoinhibitory domain をリン酸化すると, p47phox は構造変化を生じ, 細胞膜に存在する p22phox と結合する (Inanami et al., 1998). なお, p22phox は定常状態から Nox2 と結合しており, Flavocytochrome b558 と呼ばれる複合体を形成している. また, PKC は p47phox の Phox homology domain をもリン酸化し, 脂質との結合を可能にする. このさい, p67phox は定常状態から p47phox に結合しているため, p47phox に引きずられる形で細胞膜へ移動する. また, 細胞膜内で PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) と Phospholipase D が, それぞれ PtdInsP (3-phosphorylated phosphatidylinositols) および Phosphatidic acid を産生し, これらより供給された脂質を介して, p40phox と p47phox が結合する (Brown et al., 2003; Kanai et al., 2001; Yaffe, 2002; Zhan et al., 2002). すなわち, 刺激応答性に, p47phox・p67phox・p40phox の3者は細胞膜にリクルートされ, Nox2 および p22phox と複合体を形成する. さらに, 刺激応答性のグアニンヌクレオチド交換因子の活性化により, 細胞質内の Rac1/2/3-GDP が GTP と結合することで構造変化を生じ, 抑制因子である RhoGDI から解離するとともに, 親和性の高い脂質が存在する細胞膜上へ移動する. また, 構造変化により, p67phox の TPR domain との結合が可能になるため, 前述の p47phox・p67phox・p40phox・Nox2 および p22phox の5分子とともに複合体を形成する (Abo et al., 1991; Knaus et al., 1991; Koga et al., 1999; Lapouge et al., 2000).

ROS 産生は, 本複合体における, p67phox Activation domain の Nox2 との結合, および GTPase Rac1/2/3 とが連動して Nox2 を活性化することが引き金となって生じる. その機構を以下に示す. まず, NADPH が還元され, 一電子がその結合タンパク質である FAD (Flavin Adenine Dinucleotide) に転移する. さらに, Nox2 の膜貫通ド

メイン内に結合するヘム(2価の鉄原子とポルフィリンから成る錯体)のFeがelectron carrier として機能し、細胞外の O<sub>2</sub> を酸化、すなわち一電子を付加する。このようにして生じた O<sub>2</sub><sup>-</sup>が Superoxide と呼ばれる ROS の本体であり、速やかに自己反応を起こして H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>に変化することが知られる (Han et al., 1998; Nisimoto et al., 1999).

### 〈KLHDC10 の既知機能をふまえた Nox2 への関与の考察〉

次に、上述した一連の機構において、KLHDC10 が関与しうる分子シグナルについて、本分子の既知機能をふまえて考察したい。

まず、KLHDC10 のケルヒリピートタンパク質としての機能に着目すると、Nox2 もしくはそれとともに複合体を形成することが ROS 産生に必要である。p22phox, p47phox, p67phox, p40phox および GTPase Rac1/2/3 のいずれかに結合することで、複合体形成を阻害している可能性が考えられる。また、ファミリー分子の Nox1 については、L929 細胞において、TNF $\alpha$ 刺激に応答して TNF 受容体 1 下流に TRADD (TNFR-associated death domain protein), RIP1, Nox1 がこの順にリクルートされ、互いに結合することが、Superoxide 産生と下流の JNK 持続的活性化、さらには Necroptosis 誘導に必要であると報告されている (Kim et al., 2007)。Nox2 に関しては、このような分子メカニズムの必要性は報告されていないものの、類似のメカニズムが存在する可能性は十分にあると考えられる。実際に、本研究において、炎症細胞における Nox2 発現抑制により、JNK 持続的活性化と Necroptosis 誘導の有意な低下が相関して見られている (Figure 11B-F)。また、考察 2-3. で述べたとおり、KLHDC10 発現抑制によっては JNK 持続的活性化が亢進することから (Figure 11G,H)、Nox2 と KLHDC10 はいずれも JNK を上流で、かつ逆方向に制御していることが示唆される。したがって、Nox2 が TNF 受容体 1 下流で Nox1 と類似のスキヤフォールド複合体を形成している、と仮定した場合には、KLHDC10 が Nox2 もしくはそのスキヤフォールド構成分子と結合することで、複合体形成を阻害している可能性が考えられる。

また、補足的に、Nox2 と RIP1 の上下関係についても考察を述べたい。炎症細胞における Nox2 発現抑制により、RIP1 のバンド変化が減弱していること (Sup. Figure 2)、さらに、この変化が Necroptosis および JNK 持続的活性化の抑制と関連していることを鑑みると (Figure 11B-F)、Nox2 は RIP1 の上流で機能していることが想定される。ただし、この場合、想定における Nox2-RIP1 という上下関係が、上記報告内の RIP1-Nox1 とは逆転していることになる。これが、細胞種による分子機構の相違であるのか、もしくは上記発現抑制実験の結果が、Nox2 から RIP1 へのフィードバック制御によるものであるのか、など様々な可能性が考えられ、現時点で結論を出すことは困難である。

以上を総合すると、Nox2 が複合体形成以外にも、TNF 受容体 1 下流で上記の分子と結合している可能性や、KLHDC10 がその結合を阻害している可能性についても、今後検証する必要がある。

一方、KLHDC10 の複合体型 E3 としての機能に着目した場合には、上記の複合体構成因子や、それらの細胞膜へのリクルートに必要な PKC を基質として分解している可能性が考えられる。炎症細胞における Nox2 自身については、KLHDC10 発現抑制により、イムノブロット上でバンド強度の増大が見られなかったことから、KLHDC10 が基質として分解している可能性は低いと考えている。この点については、今後、タンパク質合成阻害剤やプロテアソーム阻害剤を用いた詳細な実験によって精査していきたい。

以上に挙げた可能性について、それが TNF $\alpha$ もしくは SZ 刺激依存的な機能であるか否かも含めて検証していくことが、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルおよび炎症細胞での Necroptosis における KLHDC10 の標的分子同定に向けた足がかりになるだろう。

## おわりに

KLHDC10 が RIP1/3 および Nox2 の制御に関与する分子メカニズムについては、以

上のおり、様々な可能性が考えられる。これらがそれぞれ、TNF $\alpha$ もしくは SZ 刺激依存的な機能であるか否かも含めて検証していくことが、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルおよび炎症細胞での Necroptosis における KLHDC10 の標的分子同定に向けた足がかりになるだろう。

結びに、本分子メカニズムの解明が、臨床応用に与える意義について述べたい。

## **2-5. 臨床応用の観点における意義**

序論で述べたとおり、RIP1/3 依存性 Necroptosis シグナルは、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS のみならず、膵炎やチフス菌感染症など様々な病態に関与する (He et al., 2009; Robinson et al., 2012)。したがって、炎症細胞限定的な RIP1/3 依存性 Necroptosis 誘導に KLHDC10 が関与する分子メカニズムを明らかにできれば、これら病態の発症分子機構の解明はもちろんのこと、新規の治療薬標的の創出にもつながる点で大きな意義を持つ。

また、Nox2 も多くの病態・疾患との関連が報告されている分子である。一例として、Nox2 の欠損および遺伝子変異により、先天性免疫不全症である慢性肉芽腫症 (CGD: Chronic Granulomatous Disease) を発症することが知られる (Segal, 1996)。本疾患は、食細胞の ROS 産生と異物に対する殺菌作用が阻害されることに起因するもので、慢性的な易感染症状を呈する (Reeves et al., 2002; Roos and Winterbourn, 2002)。CGD と RIP1/3 依存性 Necroptosis との関連はいまだ報告されていないが、KLHDC10 を橋渡しとして、Nox2 が RIP1/3 依存性 Necroptosis に関与する分子メカニズムを明らかにできれば、本疾患に対する新たな治療薬標的をも提示することが可能になる。

## 【総括】

私は本学博士課程の研究において、

「KLHDC10 欠損マウスが、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおいて生存期間と体温低下の表現型で耐性を示し、また、炎症性サイトカイン IL-6 の血清中への放出量および脾臓中での mRNA 誘導量の低下という表現型を示すこと」

および

「上記 IL-6 量を低下させるひとつの要因として、炎症細胞での DAMPs 誘導性の細胞死亢進が関与する可能性」

を見出した。

また、

「KLHDC10 発現抑制による、炎症細胞での DAMPs 誘導性の細胞死亢進には、部分的に RIP1/3 依存性 Necroptosis が関与すること」

が示唆され、さらに、

「KLHDC10 発現抑制により、炎症細胞限定的に Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激下での RIP1/3 依存性 Necroptosis が亢進すること、また、それと相関して JNK 持続的活性化が亢進すること (Figure 11)」

を明らかにした。

本研究において明らかとなった結果からは、

「KLHDC10 欠損は、炎症細胞における細胞死を亢進することで、IL-6 産生量を低下させ、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS への耐性に寄与するのではないか」

との仮説を立てることができる (Figure 12)。

KLHDC10 発現抑制による、Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激下での RIP1/3 依存性 Necroptosis の亢進が炎症細胞に限定的であること、また、Necroptosis には ROS 産

生分子である Nox2 (gp91 phox) の貪食細胞特異的な関与が示唆されていることから、KLHDC10 が JNK 活性化の上流で Nox2 もしくは Nox2 依存的な ROS 産生に何らかの関与を持つ可能性が示唆された。

今後は、*in vivo* レベルで仮説の検証を進めるとともに、上記を含め KLHDC10 が関与する詳細な分子およびシグナルを同定することが課題である。将来的には、それらを分子標的とすることで、世界初の SIRS 治療薬開発を目指すことが可能になる。

## 【付属】

### 1. TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS に関する報告のまとめ

本項目では、現在までの TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS に関する報告を概説する。KLHDC10 の関与を実験上もしくは考察上で評価できなかった分子およびシグナル経路を紹介するとともに、特に本研究において着目したサイトカイン産生や ROS に関する報告については、今後 KLHDC10 の標的分子を絞り込むうえでの一助としたい。なお、図表中にも、本項目のまとめを記載している (Table 1)。

#### <RIP1/3 依存性 Necroptosis>

##### ①RIP3 と Necrostatin-1 (Duprez et al., 2011)

RIP3 欠損マウス、および Necrostatin-1 を前投与した野生型マウスは、体温低下と生存期間の表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに有意な耐性を示す。

また、上記マウスにおいて、血清中組織傷害マーカー (LDH, ALT, AST, HEX activity, CK, mitochondria DNA) や、後期 (投与 4-8 時間後) の血清中炎症性サイトカイン量 (IL-1, IL-6) が有意に減少している。

##### ②RIP3 と RIP1 kinase 活性欠損変異体 (Newton et al., 2014; Polykratis et al., 2014)

RIP3 欠損マウス、および RIP1 D138N (kinase inactive mutant) ノックインマウスは、体温低下と生存期間の表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに有意な耐性を示す。なお、RIP1 欠損マウスは、生後数日で死に至るため、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおける表現型を検討した報告は存在しない。

#### <Necroptosis および Apoptosis>

##### ③IKK $\alpha/\beta$ 複合体 kinase 活性 (Dondelinger et al., 2015)

IKK $\alpha/\beta$ 複合体は、TNF 受容体 1 下流で NF- $\kappa$ B 経路と独立して RIP1 を脱リン酸化

し、RIP1/3 kinases 依存性 Apoptosis/Necroptosis から細胞を保護することが *in vitro* の実験系で示されている。本内容の *in vivo* 系での検証として、IKK $\alpha/\beta$  kinase 阻害剤の TPCA-1 を投与した野生型マウスは、体温低下や生存期間、血清中組織傷害マーカー (LDH, ALT, AST)、肝臓中 Caspase-3 活性などの表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに有意な耐性を示すことが報告された。また、IKK $\alpha/\beta$  kinase 阻害剤の TPCA-1 を投与した RIP1 K45A (kinase inactive mutant) ノックインマウス、および RIP3 欠損マウス、Necrostatin-1 を併せて投与した野生型マウスでは、前述の表現型がキャンセルされることも確認されている。

## <Apoptosis>

### ④ Glucocorticoid Receptor 2 量体化 (Vandevyver et al., 2012)

GR (Glucocorticoid receptor) の dimer 化が MKP1 (MAPK phosphatase 1) の誘導とその下流での JNK2 リン酸化抑制を介して、TNF $\alpha$ 誘導性の肝臓・腸における Apoptosis と致死性炎症からの保護効果を示す。GR<sup>dim/dim</sup> マウス (GR 配列内に 1 アミノ酸置換を入れ、dimer 形成能を阻害したマウス) では、上述のメカニズムが阻害されるため、上記および最終的な体温低下と生存期間の表現型において感受性を示す。

### ⑤ Caspase 活性 (Duprez et al., 2011)

Caspase1, 3, 7 それぞれの単独欠損マウスは、体温低下や生存率の表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに保護効果も増悪効果も示さない。

また、Caspase3 欠損マウスにおいては、実際に小腸で Apoptosis が抑制されているほか、血清中組織傷害マーカー (LDH, HEX activity) や、血清中炎症性サイトカイン量 (IL-1 $\alpha$ , IL-6) には影響を与えない。

## <生理活性物質と ROS>

### ⑥ cPLA2-lysoPL-PAF 経路と ROS (Cauwels et al., 2003)



まず、前提知識として、PLA2 (phospholipase A2) は、PL (phospholipids) を加水分解することで、アラキドン酸と lysoPL を産生する。アラキドン酸は、COX (Cyclooxygenase) と LOX (Lipoxygenase) の活性により、ラジカル中間体を介してプロスタノイドに変換される。lysoPL は、血管作動性かつ炎症性リン脂質である PAF (Platelet-activating factor) に変換される。また、*in vitro* の実験系において、cPLA2 (cytosolic PLA2) は Caspase1, 3, 4, 7, 8 の活性依存的に切断されることが示されている。

上記の各阻害剤を用いた検討により、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS の体温低下および致死性においては、cPLA2-lysoPL-PAF 経路、およびミトコンドリア電子伝達系複合体 I を介した ROS 産生が、少なくとも部分的に病態亢進に関与することが示された。なお、cPLA2-アラキドン酸-プロスタノイド経路については、ラジカル中間体（すなわち ROS）側からの関与については、本報告内で検討されていない。

## <サイトカイン>

### ⑦ IL-1 (Everaerd et al., 1994)

野生型マウスへの IL-1 受容体アンタゴニストの処置は、生存期間において TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに保護的な効果を示すが、血清中 IL-6 量には影響を与えない。

### ⑧ IL-6 (Starnes et al., 1990)

野生型マウスへの anti-IL-6 抗体の投与は、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルの致死性をレスキューする。

### ⑨ IL-17 (Takahashi et al., 2008)

IL-17 受容体欠損マウス、および野生型マウスへの anti-IL-17 抗体の投与は、体温低下と生存期間、また血清中 IL-6 および NO 量などの表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに有意な耐性を示す。

この要因として、小腸 Paneth 細胞からの IL-17A 放出が、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデ

ルの病態亢進に関与していることが示された。

⑩IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  (Huys et al., 2009)

IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ 受容体の各単独欠損マウスは、体温低下と生存期間、また血清中 IL-6 などの表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに有意な耐性を示す。

この要因として、Type I IFNs (IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ ) が細胞死亢進とケモカイン誘導、白血球の組織浸潤を介して、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルの病態亢進に関与していることが示された。

<NO>

⑪アルギニン経路を介した NO 産生 (Kilbourn et al., 1990)

イヌへの N<sup>G</sup>-Methyl-L-arginine 処置は、TNF $\alpha$ 誘導性のアルギニン依存的経路を介した NO 産生を抑制することで、低血圧症状を改善する。その他のパラメーターについては解析されていないものの、NO の TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルへの関与を初めて報告した点で重要性が高いと考えられる。

⑫可溶性グアニル酸シクラーゼと iNOS (Cauwels et al., 2003; Cauwels et al., 2000)

野生型マウスへの可溶性グアニル酸シクラーゼ (sGC) 阻害剤処置は HR (Heart rate) と MAP (Mean arterial pressure) を改善し、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルの致死率を下げるが、野生型マウスへの NO 合成酵素 (NOS) 阻害剤処置および iNOS 欠損マウスは、むしろ致死率を上げる (血清中 NO 産生量は減弱させる)。

この要因として、iNOS および産生された NO が、sGC に非依存的な経路で TNF $\alpha$  誘導性 SIRS 表現型に対して保護的に働くことが示唆されている。

<熱ショックタンパク質>

⑬ HSP70 (Van Molle et al., 2002)

野生型マウスへの、TNF $\alpha$ 投与 12 時間前の 42°C, 20 min Heat Shock (HS) 処置が、生存期間や体温低下、血清中 IL-6 および NO 量などの表現型において、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルに保護的な効果を示す。

上記の処置により、TNF $\alpha$ 投与時には HSP70 が肝臓、空腸、結腸においてタンパク質レベルで発現誘導されていること、また、hsp70.1 欠損マウスに対して上記の処置を施しても保護効果が確認されないことから、これらの臓器における HSP70 が上述の保護効果を発揮しているとされる。

## **2. TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS に関する報告への考察**

### **2-1. TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルにおける NF- $\kappa$ B 経路の関与**

本研究では、KLHDC10 発現抑制によって、炎症細胞における DAMPs 刺激応答性の IL-6 mRNA 誘導量は低下せず、むしろ亢進する傾向を示すことを明らかにした (Figure 8E, F)。

ここで、*in vitro* で炎症性サイトカイン産生が誘導されるメカニズムには、DAMPs 応答性経路以外に、TNF $\alpha$ 刺激応答性の NF- $\kappa$ B 経路を介した機構も報告されている (Lee et al., 2004; Newton et al., 2004)。しかしながら、後者については、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS モデルへの関与を否定する以下のような報告が存在する。

まず、RIP3 ノックアウトマウスにおける血清中サイトカイン量が、NF- $\kappa$ B 経路のような一過性の応答による早期 (投与 2 時間後) では野生型と比べ大きな差が見られなかった一方、持続性の応答による後期 (投与 6 時間後) では有意に減少していたこと、さらに、RIP3 ノックアウトマウスにおける血清中 Necroptosis パラメーターは、投与 2 時間後から野生型と比べて減少しており、前述のサイトカイン量の減少に先立つこと、の 2 点を根拠に、本モデルへの関与を否定する報告が挙げられる (Duprez et al., 2011)。さらに、NF- $\kappa$ B 経路活性化の指標であるリン酸化 I $\kappa$ B $\alpha$ シグナルおよび I $\kappa$ B $\alpha$

分解が、RIP1 D138N (kinase inactive mutant) ノックインマウス由来の骨髄由来マクロファージや MEF 細胞において、野生型マウス由来細胞におけるシグナルと同程度であったことを根拠に、上記の主張を *in vitro* の実験系から部分的に示唆する報告もある (Newton et al., 2014; Polykratis et al., 2014).

ただし、上述の報告 (Duprez et al., 2011) において、RIP3 欠損マウスでは、Necrostatin-1 を前投与した野生型マウスと比べて血清中 AST 量の抑制度合いが同等である一方、血清中 IL-6 量と体温低下の抑制度合いが大きい点に疑問が残る。RIP1/3 はいずれも、kinase 活性非依存的に NF- $\kappa$ B 経路を介した炎症性サイトカイン産生に寄与することが知られており (RIP3 については次項目 2-2. にて詳述する)、Necrostatin-1 は本経路を抑制しない (Moriwaki et al., 2014; Wang et al., 2014). これに対し、RIP3 欠損は NF- $\kappa$ B 経路を介した炎症性サイトカイン産生と Necroptosis 誘導の両者を抑制すると考えられる。すなわち、本報告は、RIP1/3 kinases の Necroptosis への寄与と RIP3 のサイトカイン産生への寄与をひとからげに評価している可能性がある点で懐疑的である。

上述の報告内容を総合すると、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS に NF- $\kappa$ B 経路が関与する可能性を一概に否定することはできないと考えられる。そこで、炎症細胞 (RAW 264.7 細胞および骨髄由来マクロファージ) における、KLHDC10 発現抑制下での TNF $\alpha$ 刺激応答性の IL-6 mRNA 誘導についても評価する必要があると考え、検討を行った。しかしながら、TNF $\alpha$ 濃度および刺激時間を変えて検討した限りでは、そもそも IL-6 mRNA の発現誘導が無刺激時の 1.5 倍程度以下にしか見られなかった (data not shown)。なお、この結果は他の炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ についても同様であった。

後者の骨髄由来マクロファージについては、分化により NF- $\kappa$ B 経路活性化に必要な一部分子の発現誘導が担われており、本分化誘導・培養条件ではそのような分子の発現誘導量が不足もしくは過剰であった可能性が考えられる。したがって、TNF $\alpha$ 刺激応答性の IL-6 mRNA 誘導が他の炎症細胞種で見られるか、見られた場合には上記 2

種類の炎症細胞との相違点は何であるか、に着目して検討を進めたい。また、上述した報告内容との関連を含め、精査および評価していきたい。

## **2-2. RIP1/3 のサイトカイン産生への関与**

前項目冒頭のくり返しになるが、本研究では、KLHDC10 発現抑制によって炎症細胞における DAMPs 刺激応答性 IL-6 mRNA 誘導量は低下せず、むしろ亢進する傾向を示すことを明らかにした (Figure 8E, F)。一方で、KLHDC10 発現抑制により、炎症細胞限定的に SZ 刺激下での RIP1/3 依存性 Necroptosis が亢進することも明らかにした (Figure 10)。RIP1 については、TNF 受容体および DAMPs 受容体下流での IL-6 産生経路と、Necroptosis 誘導経路の両者にそれぞれ関与が報告されてきた一方 (He et al., 2011; He et al., 2009; Lee et al., 2004; Liew et al., 2005; Miles et al., 2009; Newton et al., 2004)、RIP3 に関しては、長い間、前者に関与するとの報告はなく、後者にのみ kinase 活性依存的に関与すると考えられてきた。

しかしながら、近年、RIP3 が Necroptosis に非依存的な経路を介したサイトカイン産生に必要であることが報告された (Moriwaki et al., 2014; Wang et al., 2014)。TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルへの関与が知られる炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ についても、RIP3 が、デキストラン硫酸ナトリウム誘導性炎症性腸疾患モデルにおいて、骨髄由来樹状細胞で caspase-1 の活性化を介して IL-1 $\beta$ の産生を誘導すること (Moriwaki et al., 2014)、また、RNA ウイルス応答性に、NLRP3 インフラマソームの活性化を介して IL-1 $\beta$ の産生を誘導することが報告されている (Wang et al., 2014)。前者においては、RIP3 が同モデルおよび細胞で、NF- $\kappa$ B 経路の活性化を担うことも報告されていることから、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS に関与する炎症性サイトカイン IL-6 についても、同様に産生誘導を担う可能性がある。なお、前者の報告では、IL-1 $\beta$ 産生誘導機能に RIP3 の kinase 活性は必要でないことが示されており、後者の報告では、RIP3 の kinase 活性の必要性は明らかにされていない。

以上を総合して、RIP1/3 は kinases 活性依存的な Necroptosis のみならず、両分子の kinase 活性非依存的な炎症性サイトカイン産生機能によっても、TNF $\alpha$ 誘導性 SIRS の病態に関与する可能性が示唆された。炎症細胞における KLHDC10 欠損は、上記 Necroptosis と炎症性サイトカイン産生の両者を亢進したことから、すでに着目してはいるものの、これらを共通して制御する RIP1/3 への関与を解析することが、KLHDC10 の標的分子同定の足がかりとなる可能性が再確認された。

## 【略称一覧】

本論文内で用いた略称について、各正式名称との対応一覧を、下記にアルファベット順にて記載する。なお、本文中で正式名称を併記したものについても、下記に改めて記載している。

ACCP : American College of Chest Physicians

ALT : Alanine aminotransferase

ASK1 : Apoptosis signal-regulating kinase 1

AST : Aspartate aminotransferase

ATP : adenosine 5'-triphosphate

CGD : Chronic Granulomatous Disease

CK : Creatine kinase

(c)PLA2 : (cytosolic) phospholipase A2

COX : Cyclooxygenase

CRL2 : Cullin2 RING E3 ligase

CXCL2 : Chemokine (C-X-C motif) ligand 2

Co3 : Cytochrome c oxidase III

CyB : Cytochrome B

DAMPs : Damage-associated molecular patterns

DEPC : Diethyl pyrocarbonate

DIC : Disseminated Intravascular Coagulation

DMSO : Dimethyl sulfoxide

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

FAD : Flavin Adenine Dinucleotide

G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulation Factor  
GDP/GTP : Guanosine 5'-diphosphate/triphosphate  
GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulation Factor  
GR : Glucocorticoid receptor  
HE : Hematoxylin-eosin  
HEX : N-acetyl- $\beta$ -D-hexosaminidase  
HMGB1 : High-mobility group box 1  
HR : Heart rate  
HSP : Heat shock protein  
IAP : Inhibitor of apoptosis protein  
IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  : Interferon- $\alpha$ ,  $\beta$   
I $\kappa$ B $\alpha$  : Inhibitor of NF- $\kappa$ B  
IKK $\alpha/\beta$  : I $\kappa$ B kinase  $\alpha/\beta$   
IL-XX : Interleukin-XX  
iNOS : inducible Nitric oxide synthase  
JNK : c-jun N-terminal kinase  
KLHDC10 : Kelch domain containing 10  
LDH : Lactate dehydrogenase  
LOX : Lipoxygenase  
LPS : Lipopolysaccharide  
MAP3K : Mitogen-activated protein kinase kinase kinase  
MAP : Mean arterial pressure  
MKP1 : MAPK phosphatase 1  
MLKL : Mixed lineage kinase domain-like  
mt- : mitochondria-



NADH : NADH oxidase

NF- $\kappa$ B : Nuclear factor- $\kappa$ B

NO : Nitrogen monoxide

Nox1, 2 : NADPH oxidase 1, 2

PAF : Platelet-activating factor

PAGE : Polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : Phosphate buffered saline

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

PKC : Protein Kinase C

PL : phospholipids

PP5 : Protein phosphatase 5

PtdInsP : 3-phosphorylated phosphatidylinositols

RAGE : Receptor for advanced glycation end products

RIP1, 3 : Receptor-interacting protein 1, 3

ROS : Reactive oxygen species

S100B : S100 calcium binding protein B

S18 : 40S ribosomal subunit protein S18

SCCM : Society of Critical Care Medicine

SDS : Sodium lauryl sulfate

sGC : soluble Guanylyl cyclase

SIRS : Systemic Inflammatory Response Syndrome

Slim : Scruin like at the midline

t-BHQ : tert-Butylhydroquinone

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor- $\beta$

TLR : Toll-like receptor

TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

TPR : Tetratricopeptide repeat

TRADD : TNFR-associated death domain protein

TRPM7 : Transient receptor potential melastatin 7

Triad3 : Triad domain-containing protein 3

TUNEL : TdT-mediated dUTP nick end labeling

## 【参考文献】

Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C.G., and Segal, A.W. (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature* 353, 668-670.

Adams, J., Kelso, R., and Cooley, L. (2000). The kelch repeat superfamily of proteins: propellers of cell function. *Trends Cell Biol* 10, 17-24.

Aggarwal, B.B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* 3, 745-756.

Ameloot, P., Takahashi, N., Everaerd, B., Hostens, J., Eugster, H.P., Fiers, W., and Brouckaert, P. (2002). Bioavailability of recombinant tumor necrosis factor determines its lethality in mice. *Eur J Immunol* 32, 2759-2765.

Baker, S.J., and Reddy, E.P. (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17, 3261-3270.

Bone, R.C. (1992). Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *Jama* 268, 3452-3455.

Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., and Sibbald, W.J. (2009). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. *Chest* 136, e28.

Bosu, D.R., and Kipreos, E.T. (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div* 3, 7.

Brown, G.E., Stewart, M.Q., Liu, H., Ha, V.L., and Yaffe, M.B. (2003). A novel assay system implicates PtdIns(3,4)P(2), PtdIns(3)P, and PKC delta in intracellular production of reactive oxygen species by the NADPH oxidase. *Mol Cell* 11, 35-47.

Cai, Z., Jitkaew, S., Zhao, J., Chiang, H.C., Choksi, S., Liu, J., Ward, Y., Wu, L.G., and Liu, Z.G. (2014). Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required for TNF-induced necroptosis. *Nat Cell Biol* 16, 55-65.

Cauwels, A., Janssen, B., Waeytens, A., Cuvelier, C., and Brouckaert, P. (2003). Caspase inhibition causes hyperacute tumor necrosis factor-induced shock via oxidative stress and phospholipase A2. *Nat Immunol* 4, 387-393.

Cauwels, A., Van Molle, W., Janssen, B., Everaerd, B., Huang, P., Fiers, W., and Brouckaert, P. (2000). Protection against TNF-induced lethal shock by soluble guanylate cyclase inhibition requires functional inducible nitric oxide synthase. *Immunity* 13, 223-231.

Chen, D., Li, X., Zhai, Z., and Shu, H.B. (2002). A novel zinc finger protein interacts with receptor-interacting protein (RIP) and inhibits tumor necrosis factor (TNF)- and IL1-induced NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 277, 15985-15991.

Chen, W., Wu, J., Li, L., Zhang, Z., Ren, J., Liang, Y., Chen, F., Yang, C., Zhou, Z., Su, S.S., *et al.* (2015). Ppm1b negatively regulates necroptosis through

dephosphorylating Rip3. *Nat Cell Biol* 17, 434-444.

Chen, X., Li, W., Ren, J., Huang, D., He, W.T., Song, Y., Yang, C., Zheng, X., Chen, P., and Han, J. (2014). Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death. *Cell Res* 24, 105-121.

Dang, P.M., Stensballe, A., Boussetta, T., Raad, H., Dewas, C., Kroviarski, Y., Hayem, G., Jensen, O.N., Gougerot-Pocidallo, M.A., and El-Benna, J. (2006). A specific p47phox -serine phosphorylated by convergent MAPKs mediates neutrophil NADPH oxidase priming at inflammatory sites. *J Clin Invest* 116, 2033-2043.

de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C.G., and de Vries, J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 174, 1209-1220.

Degterev, A., Hitomi, J., Gemscheid, M., Ch'en, I.L., Korkina, O., Teng, X., Abbott, D., Cuny, G.D., Yuan, C., Wagner, G., *et al.* (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol* 4, 313-321.

Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G.D., Mitchison, T.J., Moskowitz, M.A., and Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112-119.

Deng, M., Loughran, P.A., Zhang, L., Scott, M.J., and Billiar, T.R. (2015). Shedding of the tumor necrosis factor (TNF) receptor from the surface of hepatocytes during sepsis limits inflammation through cGMP signaling. *Sci*

Signal 8, ra11.

Dewas, C., Dang, P.M., Gougerot-Pocidallo, M.A., and El-Benna, J. (2003). TNF-alpha induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF-alpha and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* *171*, 4392-4398.

Dondelinger, Y., Jouan-Lanhouet, S., Divert, T., Theatre, E., Bertin, J., Gough, P.J., Giansanti, P., Heck, A.J., Dejardin, E., Vandenabeele, P., *et al.* (2015). NF-kappaB-Independent Role of IKKalpha/IKKbeta in Preventing RIPK1 Kinase-Dependent Apoptotic and Necroptotic Cell Death during TNF Signaling. *Mol Cell* *60*, 63-76.

Donnelly, R.P., Fenton, M.J., Kaufman, J.D., and Gerrard, T.L. (1991). IL-1 expression in human monocytes is transcriptionally and posttranscriptionally regulated by IL-4. *J Immunol* *146*, 3431-3436.

Duprez, L., Takahashi, N., Van Hauwermeiren, F., Vandendriessche, B., Goossens, V., Vanden Berghe, T., Declercq, W., Libert, C., Cauwels, A., and Vandenabeele, P. (2011). RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome. *Immunity* *35*, 908-918.

Eigenbrod, T., Park, J.H., Harder, J., Iwakura, Y., and Nunez, G. (2008). Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosis-induced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. *J Immunol* *181*, 8194-8198.

El Mezayen, R., El Gazzar, M., Seeds, M.C., McCall, C.E., Dreskin, S.C., and

Nicolls, M.R. (2007). Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett* *111*, 36-44.

Everaerd, B., Brouckaert, P., and Fiers, W. (1994). Recombinant IL-1 receptor antagonist protects against TNF-induced lethality in mice. *J Immunol* *152*, 5041-5049.

Faustman, D., and Davis, M. (2010). TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nat Rev Drug Discov* *9*, 482-493.

Fearns, C., Pan, Q., Mathison, J.C., and Chuang, T.H. (2006). Triad3A regulates ubiquitination and proteasomal degradation of RIP1 following disruption of Hsp90 binding. *J Biol Chem* *281*, 34592-34600.

Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O'Garra, A. (1991). IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* *146*, 3444-3451.

Frey, R.S. (2002). PKCzeta Regulates TNF-alpha-Induced Activation of NADPH Oxidase in Endothelial Cells. *Circulation Research* *90*, 1012-1019.

Fujita, M., Ikegame, S., Harada, E., Ouchi, H., Inoshima, I., Watanabe, K., Yoshida, S., and Nakanishi, Y. (2008). TNF receptor 1 and 2 contribute in different ways to resistance to *Legionella pneumophila*-induced mortality in mice. *Cytokine* *44*, 298-303.

Galluzzi, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2014). MLKL regulates necrotic plasma membrane permeabilization. *Cell Res* *24*, 139-140.

Han, C.H., Freeman, J.L., Lee, T., Motalebi, S.A., and Lambeth, J.D. (1998). Regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase. Identification of an activation domain in p67(phox). *J Biol Chem* *273*, 16663-16668.

Han, W., Li, L., Qiu, S., Lu, Q., Pan, Q., Gu, Y., Luo, J., and Hu, X. (2007). Shikonin circumvents cancer drug resistance by induction of a necroptotic death. *Mol Cancer Ther* *6*, 1641-1649.

He, K.L., and Ting, A.T. (2002). A20 Inhibits Tumor Necrosis Factor (TNF) Alpha-Induced Apoptosis by Disrupting Recruitment of TRADD and RIP to the TNF Receptor 1 Complex in Jurkat T Cells. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 6034-6045.

He, S., Liang, Y., Shao, F., and Wang, X. (2011). Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 20054-20059.

He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., and Wang, X. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* *137*, 1100-1111.

Hildebrand, J.M., Tanzer, M.C., Lucet, I.S., Young, S.N., Spall, S.K., Sharma, P., Pierotti, C., Garnier, J.M., Dobson, R.C., Webb, A.I., *et al.* (2014). Activation of the pseudokinase MLKL unleashes the four-helix bundle domain to induce membrane localization and necroptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A* *111*, 15072-15077.



Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., Bodmer, J.L., Schneider, P., Seed, B., and Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* *1*, 489-495.

Huys, L., Van Hauwermeiren, F., Dejager, L., Dejonckheere, E., Lienenklaus, S., Weiss, S., Leclercq, G., and Libert, C. (2009). Type I interferon drives tumor necrosis factor-induced lethal shock. *J Exp Med* *206*, 1873-1882.

Inanami, O., Johnson, J.L., McAdara, J.K., Benna, J.E., Faust, L.R., Newburger, P.E., and Babior, B.M. (1998). Activation of the leukocyte NADPH oxidase by phorbol ester requires the phosphorylation of p47PHOX on serine 303 or 304. *J Biol Chem* *273*, 9539-9543.

Iyer, S.S., Pulskens, W.P., Sadler, J.J., Butter, L.M., Teske, G.J., Ulland, T.K., Eisenbarth, S.C., Florquin, S., Flavell, R.A., Leemans, J.C., *et al.* (2009). Necrotic cells trigger a sterile inflammatory response through the Nlrp3 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 20388-20393.

Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., and Krysko, D.V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* *38*, 209-223.

Kamata, H., Honda, S., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H., and Karin, M. (2005). Reactive oxygen species promote TNF $\alpha$ -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* *120*, 649-661.

Kanai, F., Liu, H., Field, S.J., Akbary, H., Matsuo, T., Brown, G.E., Cantley, L.C.,

and Yaffe, M.B. (2001). The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol* 3, 675-678.

Kilbourn, R.G., Gross, S.S., Jubran, A., Adams, J., Griffith, O.W., Levi, R., and Lodato, R.F. (1990). NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3629-3632.

Kim, Y.S., Morgan, M.J., Choksi, S., and Liu, Z.G. (2007). TNF-induced activation of the Nox1 NADPH oxidase and its role in the induction of necrotic cell death. *Mol Cell* 26, 675-687.

Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T., and Bokoch, G.M. (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* 254, 1512-1515.

Koga, H., Terasawa, H., Nunoi, H., Takeshige, K., Inagaki, F., and Sumimoto, H. (1999). Tetratricopeptide repeat (TPR) motifs of p67(phox) participate in interaction with the small GTPase Rac and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *J Biol Chem* 274, 25051-25060.

Kovalenko, A., Kim, J.C., Kang, T.B., Rajput, A., Bogdanov, K., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Brenner, O., and Wallach, D. (2009). Caspase-8 deficiency in epidermal keratinocytes triggers an inflammatory skin disease. *J Exp Med* 206, 2161-2177.

Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4, 181-189.

Lapouge, K., Smith, S.J., Walker, P.A., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Rittinger, K. (2000). Structure of the TPR domain of p67phox in complex with Rac.GTP. *Mol Cell* *6*, 899-907.

Lee, T.H., Shank, J., Cusson, N., and Kelliher, M.A. (2004). The kinase activity of Rip1 is not required for tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B kinase or p38 MAP kinase activation or for the ubiquitination of Rip1 by Traf2. *J Biol Chem* *279*, 33185-33191.

Li, C., Lasse, S., Lee, P., Nakasaki, M., Chen, S.W., Yamasaki, K., Gallo, R.L., and Jamora, C. (2010). Development of atopic dermatitis-like skin disease from the chronic loss of epidermal caspase-8. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 22249-22254.

Li, X., Zhang, D., Hannink, M., and Beamer, L.J. (2004). Crystal structure of the Kelch domain of human Keap1. *J Biol Chem* *279*, 54750-54758.

Li, Y., Yang, X., Ma, C., Qiao, J., and Zhang, C. (2008). Necroptosis contributes to the NMDA-induced excitotoxicity in rat's cultured cortical neurons. *Neurosci Lett* *447*, 120-123.

Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., and O'Neill, L.A. (2005). Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol* *5*, 446-458.

Lin, S.C., Chung, J.Y., Lamothe, B., Rajashankar, K., Lu, M., Lo, Y.C., Lam, A.Y., Darnay, B.G., and Wu, H. (2008). Molecular basis for the unique deubiquitinating activity of the NF- $\kappa$ B inhibitor A20. *J Mol Biol* *376*, 526-540.

Lin, Y., Choksi, S., Shen, H.M., Yang, Q.F., Hur, G.M., Kim, Y.S., Tran, J.H., Nedospasov, S.A., and Liu, Z.G. (2004). Tumor necrosis factor-induced nonapoptotic cell death requires receptor-interacting protein-mediated cellular reactive oxygen species accumulation. *J Biol Chem* 279, 10822-10828.

Mahrour, N., Redwine, W.B., Florens, L., Swanson, S.K., Martin-Brown, S., Bradford, W.D., Staehling-Hampton, K., Washburn, M.P., Conaway, R.C., and Conaway, J.W. (2008). Characterization of Cullin-box sequences that direct recruitment of Cul2-Rbx1 and Cul5-Rbx2 modules to Elongin BC-based ubiquitin ligases. *J Biol Chem* 283, 8005-8013.

Matsuzawa, A., Saegusa, K., Noguchi, T., Sadamitsu, C., Nishitoh, H., Nagai, S., Koyasu, S., Matsumoto, K., Takeda, K., and Ichijo, H. (2005). ROS-dependent activation of the TRAF6-ASK1-p38 pathway is selectively required for TLR4-mediated innate immunity. *Nat Immunol* 6, 587-592.

Miles, K., Clarke, D.J., Lu, W., Sibinska, Z., Beaumont, P.E., Davidson, D.J., Barr, T.A., Campopiano, D.J., and Gray, M. (2009). Dying and necrotic neutrophils are anti-inflammatory secondary to the release of alpha-defensins. *J Immunol* 183, 2122-2132.

Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H., and Ichijo, H. (2001). Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *Embo J* 20, 6028-6036.

Moriwaki, K., Balaji, S., McQuade, T., Malhotra, N., Kang, J., and Chan, F.K. (2014). The necroptosis adaptor RIPK3 promotes injury-induced cytokine expression and tissue repair. *Immunity* 41, 567-578.

Murphy, J.M., Czabotar, P.E., Hildebrand, J.M., Lucet, I.S., Zhang, J.G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A.I., *et al.* (2013). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* *39*, 443-453.

Nakagawa, H., Maeda, S., Hikiba, Y., Ohmae, T., Shibata, W., Yanai, A., Sakamoto, K., Ogura, K., Noguchi, T., Karin, M., *et al.* (2008). Deletion of apoptosis signal-regulating kinase 1 attenuates acetaminophen-induced liver injury by inhibiting c-Jun N-terminal kinase activation. *Gastroenterology* *135*, 1311-1321.

Newton, K., Dugger, D.L., Wickliffe, K.E., Kapoor, N., de Almagro, M.C., Vucic, D., Komuves, L., Ferrando, R.E., French, D.M., Webster, J., *et al.* (2014). Activity of protein kinase RIPK3 determines whether cells die by necroptosis or apoptosis. *Science* *343*, 1357-1360.

Newton, K., Sun, X., and Dixit, V.M. (2004). Kinase RIP3 is dispensable for normal NF-kappa Bs, signaling by the B-cell and T-cell receptors, tumor necrosis factor receptor 1, and Toll-like receptors 2 and 4. *Molecular and Cellular Biology* *24*, 1464-1469.

Nisimoto, Y., Motalebi, S., Han, C.H., and Lambeth, J.D. (1999). The p67(phox) activation domain regulates electron flow from NADPH to flavin in flavocytochrome b(558). *J Biol Chem* *274*, 22999-23005.

Orozco, S., Yatim, N., Werner, M.R., Tran, H., Gunja, S.Y., Tait, S.W., Albert, M.L., Green, D.R., and Oberst, A. (2014). RIPK1 both positively and negatively

regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death Differ* *21*, 1511-1521.

Padmanabhan, B., Tong, K.I., Ohta, T., Nakamura, Y., Scharlock, M., Ohtsuji, M., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yokoyama, S., and Yamamoto, M. (2006). Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* *21*, 689-700.

Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 9-20.

Polykratis, A., Hermance, N., Zelic, M., Roderick, J., Kim, C., Van, T.M., Lee, T.H., Chan, F.K., Pasparakis, M., and Kelliher, M.A. (2014). Cutting edge: RIPK1 Kinase inactive mice are viable and protected from TNF-induced necroptosis in vivo. *J Immunol* *193*, 1539-1543.

Prag, S., and Adams, J.C. (2003). Molecular phylogeny of the kelch-repeat superfamily reveals an expansion of BTB/kelch proteins in animals. *BMC Bioinformatics* *4*, 42.

Ramachandran, A., McGill, M.R., Xie, Y., Ni, H.M., Ding, W.X., and Jaeschke, H. (2013). Receptor interacting protein kinase 3 is a critical early mediator of acetaminophen-induced hepatocyte necrosis in mice. *Hepatology* *58*, 2099-2108.

Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., and Segal, A.W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K<sup>+</sup> flux. *Nature* *416*, 291-297.

Rider, P., Carmi, Y., Guttman, O., Braiman, A., Cohen, I., Voronov, E., White, M.R., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2011). IL-1alpha and IL-1beta recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol* *187*, 4835-4843.

Robinson, N., McComb, S., Mulligan, R., Dudani, R., Krishnan, L., and Sad, S. (2012). Type I interferon induces necroptosis in macrophages during infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Nat Immunol* *13*, 954-962.

Roos, D., and Winterbourn, C.C. (2002). Immunology. Lethal weapons. *Science* *296*, 669-671.

Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., and Orkin, S.H. (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* *322*, 32-38.

Ruger, B.M., Hasan, Q., Erb, K.J., and Davis, P.F. (1999). Progression of renal disease in interleukin-4 transgenic mice: involvement of transforming growth factor-beta. *Int J Exp Pathol* *80*, 113-123.

Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M.E. (2002). Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* *418*, 191-195.

Schiffmann, E., Corcoran, B.A., and Wahl, S.M. (1975). N-formylmethionyl peptides as chemoattractants for leucocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *72*, 1059-1062.

Segal, A.W. (1996). The NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *Mol Med Today* 2, 129-135.

Sekine, Y., Hatanaka, R., Watanabe, T., Sono, N., Iemura, S., Natsume, T., Kuranaga, E., Miura, M., Takeda, K., and Ichijo, H. (2012). The Kelch repeat protein KLHDC10 regulates oxidative stress-induced ASK1 activation by suppressing PP5. *Mol Cell* 48, 692-704.

Shichita, T., Hasegawa, E., Kimura, A., Morita, R., Sakaguchi, R., Takada, I., Sekiya, T., Ooboshi, H., Kitazono, T., Yanagawa, T., *et al.* (2012). Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 18, 911-917.

Shindo, R., Kakehashi, H., Okumura, K., Kumagai, Y., and Nakano, H. (2013). Critical contribution of oxidative stress to TNF $\alpha$ -induced necroptosis downstream of RIPK1 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 436, 212-216.

Smith, C.C., Davidson, S.M., Lim, S.Y., Simpkin, J.C., Hothersall, J.S., and Yellon, D.M. (2007). Necrostatin: a potentially novel cardioprotective agent? *Cardiovasc Drugs Ther* 21, 227-233.

Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Lange, A., Thon, L., Davarnia, P., Herdegen, T., Linkermann, A., Rittger, A., Chan, F.K., *et al.* (2014). TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci* 71, 331-348.

Starnes, H.F., Jr., Pearce, M.K., Tewari, A., Yim, J.H., Zou, J.C., and Abrams, J.S. (1990). Anti-IL-6 monoclonal antibodies protect against lethal *Escherichia coli*



infection and lethal tumor necrosis factor-alpha challenge in mice. *J Immunol* *145*, 4185-4191.

Sultani, M., Stringer, A.M., Bowen, J.M., and Gibson, R.J. (2012). Anti-inflammatory cytokines: important immunoregulatory factors contributing to chemotherapy-induced gastrointestinal mucositis. *Chemother Res Pract* *2012*, 490804.

Takahashi, N., Vanlaere, I., de Rycke, R., Cauwels, A., Joosten, L.A., Lubberts, E., van den Berg, W.B., and Libert, C. (2008). IL-17 produced by Paneth cells drives TNF-induced shock. *J Exp Med* *205*, 1755-1761.

te Velde, A.A., Huijbens, R.J., Heije, K., de Vries, J.E., and Figdor, C.G. (1990). Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and IL-6 by human monocytes. *Blood* *76*, 1392-1397.

Teahan, C., Rowe, P., Parker, P., Totty, N., and Segal, A.W. (1987). The X-linked chronic granulomatous disease gene codes for the beta-chain of cytochrome b-245. *Nature* *327*, 720-721.

Tracey, K.J., Beutler, B., Lowry, S.F., Merryweather, J., Wolpe, S., Milsark, I.W., Hariri, R.J., Fahey, T.J., 3rd, Zentella, A., Albert, J.D., *et al.* (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* *234*, 470-474.

Tsuji, Y., Watanabe, T., Kudo, M., Arai, H., Strober, W., and Chiba, T. (2012). Sensing of commensal organisms by the intracellular sensor NOD1 mediates experimental pancreatitis. *Immunity* *37*, 326-338.

Van Molle, W., Wielockx, B., Mahieu, T., Takada, M., Taniguchi, T., Sekikawa, K., and Libert, C. (2002). HSP70 protects against TNF-induced lethal inflammatory shock. *Immunity* *16*, 685-695.

Vandenabeele, P., Declercq, W., Van Herreweghe, F., and Vanden Berghe, T. (2010). The role of the kinases RIP1 and RIP3 in TNF-induced necrosis. *Sci Signal* *3*, re4.

Vandevyver, S., Dejager, L., Van Bogaert, T., Kleyman, A., Liu, Y., Tuckermann, J., and Libert, C. (2012). Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation. *J Clin Invest* *122*, 2130-2140.

Vannier, E., Miller, L.C., and Dinarello, C.A. (1992). Coordinated antiinflammatory effects of interleukin 4: interleukin 4 suppresses interleukin 1 production but up-regulates gene expression and synthesis of interleukin 1 receptor antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* *89*, 4076-4080.

Vignais, P.V. (2002). The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* *59*, 1428-1459.

Volpin, G., Cohen, M., Assaf, M., Meir, T., Katz, R., and Pollack, S. (2014). Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGFbeta) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. *Int Orthop* *38*, 1303-1309.

Wang, X., Jiang, W., Yan, Y., Gong, T., Han, J., Tian, Z., and Zhou, R. (2014). RNA viruses promote activation of the NLRP3 inflammasome through a RIP1-RIP3-DRP1 signaling pathway. *Nat Immunol* *15*, 1126-1133.

Wenzel, R.P. (2002). Treating sepsis. *N Engl J Med* 347, 966-967.

Wertz, I., and Dixit, V. (2014). A20--a bipartite ubiquitin editing enzyme with immunoregulatory potential. *Adv Exp Med Biol* 809, 1-12.

Wheeler, D.S., Chase, M.A., Senft, A.P., Poynter, S.E., Wong, H.R., and Page, K. (2009). Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res* 10, 31.

Wu, X.N., Yang, Z.H., Wang, X.K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., and Han, J. (2014). Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death Differ* 21, 1709-1720.

Xu, Y., Huang, S., Liu, Z.G., and Han, J. (2006). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 signaling to mitochondria in necrotic cell death requires RIP1/TRAF2-mediated JNK1 activation. *J Biol Chem* 281, 8788-8795.

Yaffe, M.B. (2002). The p47phox PX domain: two heads are better than one! *Structure* 10, 1288-1290.

Zhan, Y., Virbasius, J.V., Song, X., Pomerleau, D.P., and Zhou, G.W. (2002). The p40phox and p47phox PX domains of NADPH oxidase target cell membranes via direct and indirect recruitment by phosphoinositides. *J Biol Chem* 277, 4512-4518.

Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., and Hauser, C.J. (2010). Circulating mitochondrial DAMPs cause

inflammatory responses to injury. *Nature* 464, 104-107.

Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., and Liu, Z.G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 5322-5327.

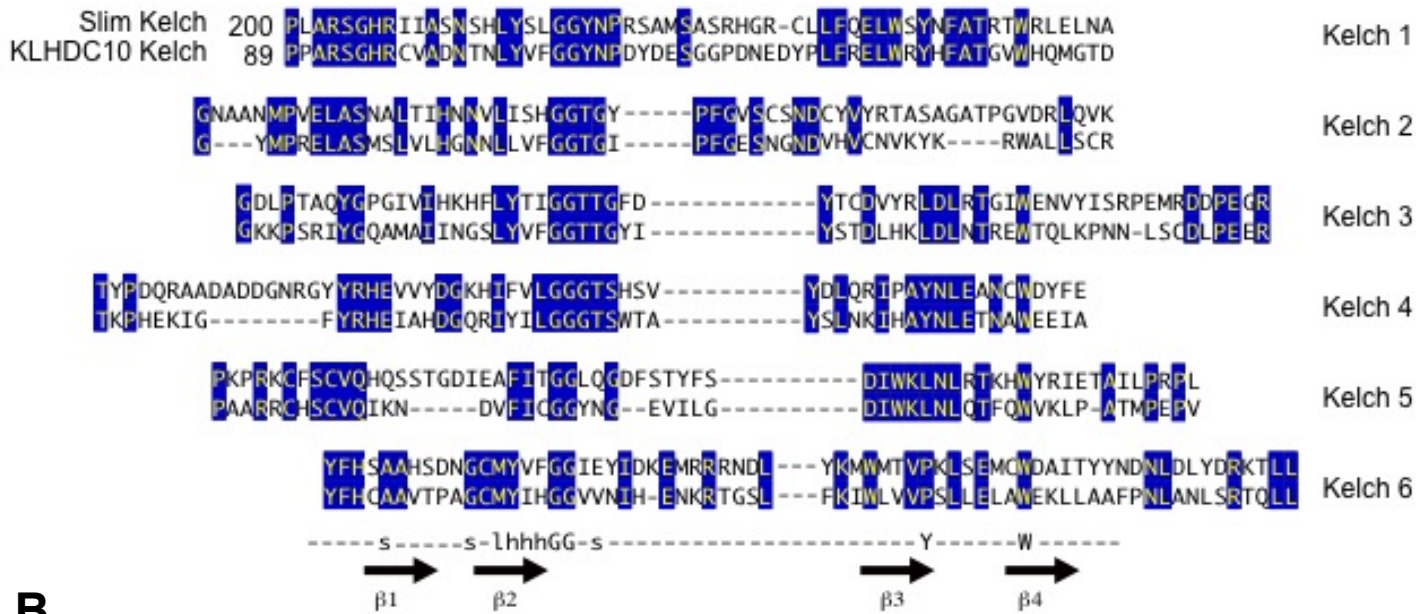
Zhou, W., and Yuan, J. (2014). SnapShot: Necroptosis. *Cell* 158, 464-464 e461.

磯崎 泰介, 臨床透析 vol.24 no.7 2008 219-221 (999-1001)

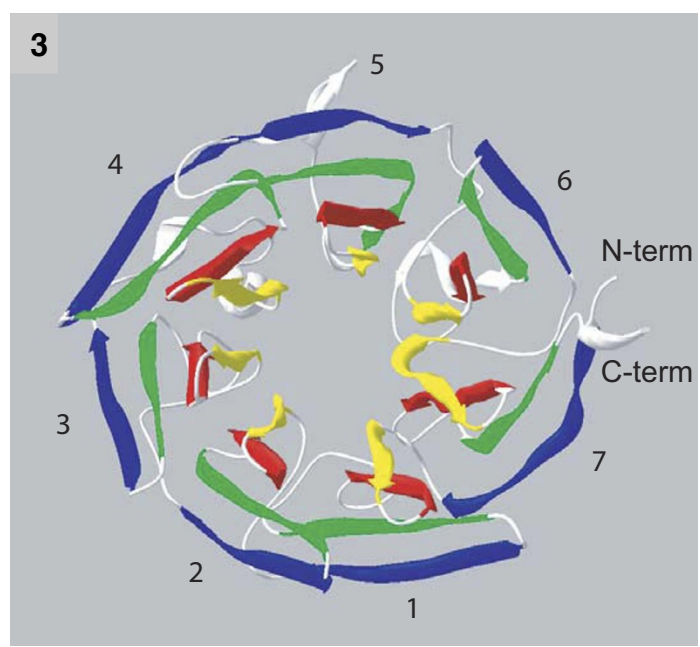
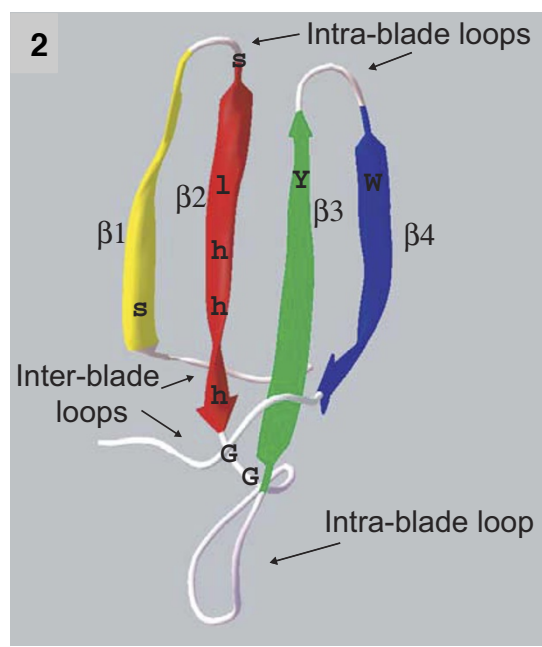
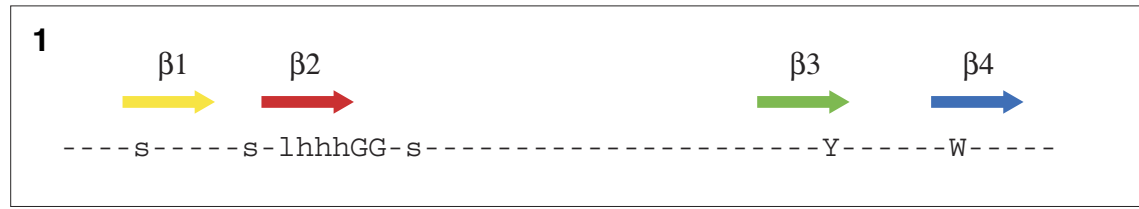
THE MERCK MANUALS ONLINE LIBRARY

(<http://merckmanual.jp/mmpej/index.html>)

# A 【図表】



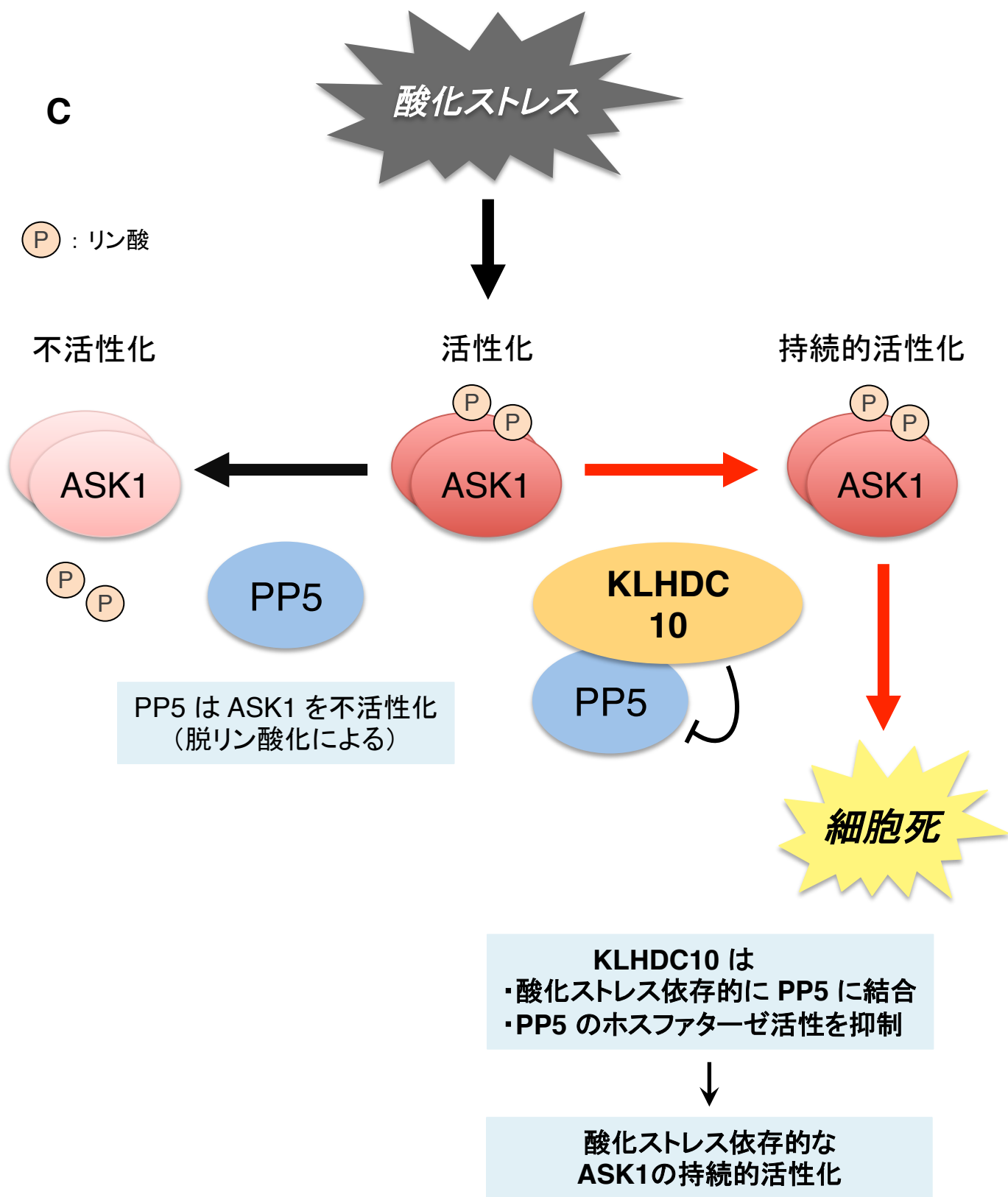
# B



**Figure 1 KLHDC10 の *in vitro* における生理機能**

- A Slim と KLHDC10 アミノ酸配列を ClustalW(Lasergene Megalign)により比較した。また、両配列における、6回くり返し Kelch motif との対応を示した (Sekine et al., *Mol. Cell*, 2012)。
- B 1) Kelch motif のコンセンサス配列。  
 2) ひとつの Kelch motif が形成する β-propeller 折り畳み構造。  
 3) 真菌ガラクトースオキシダーゼの Kelch repeat domain が形成する β-propeller 折り畳み構造 (Prag and Adams, *BMC Bioinformatics*, 2003)。

s : small residue ; l : large residue ; h : hydrophobic residue ;  
 G : glycine ; Y : tyrosine ; W : tryptophan



**Figure 1** KLHDC10 の *in vitro* における生理機能

**C** KLHDC10 は, ASK1 の脱リン酸化を介した不活性化因子である PP5 に結合し, そのホスファターゼ活性を抑制することで, 酸化ストレス依存的な ASK1 の持続的活性化および細胞死を亢進する (Sekine et al., *Mol. Cell*, 2012).

D

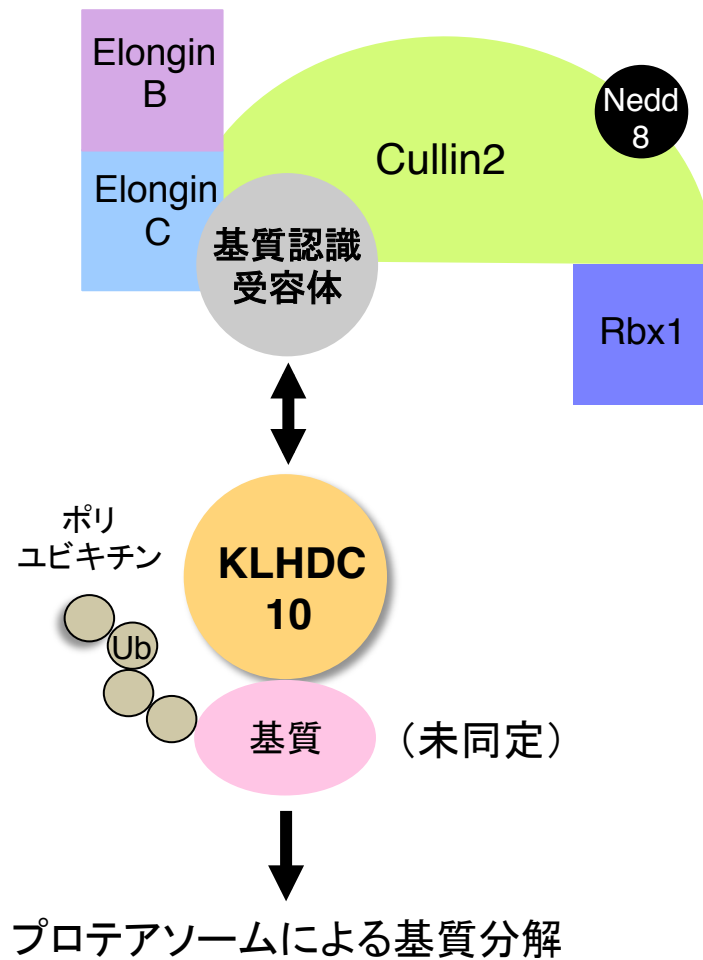


Figure 1 KLHDC10 の *in vitro* における生理機能

D KLHDC10 は, 複合体型ユビキチン E3 ligase である CRL2(Cullin2 RING E3 ligase) 複合体の基質認識受容体として機能することが示唆されているが, 現段階では KLHDC10 の基質は同定されていない.

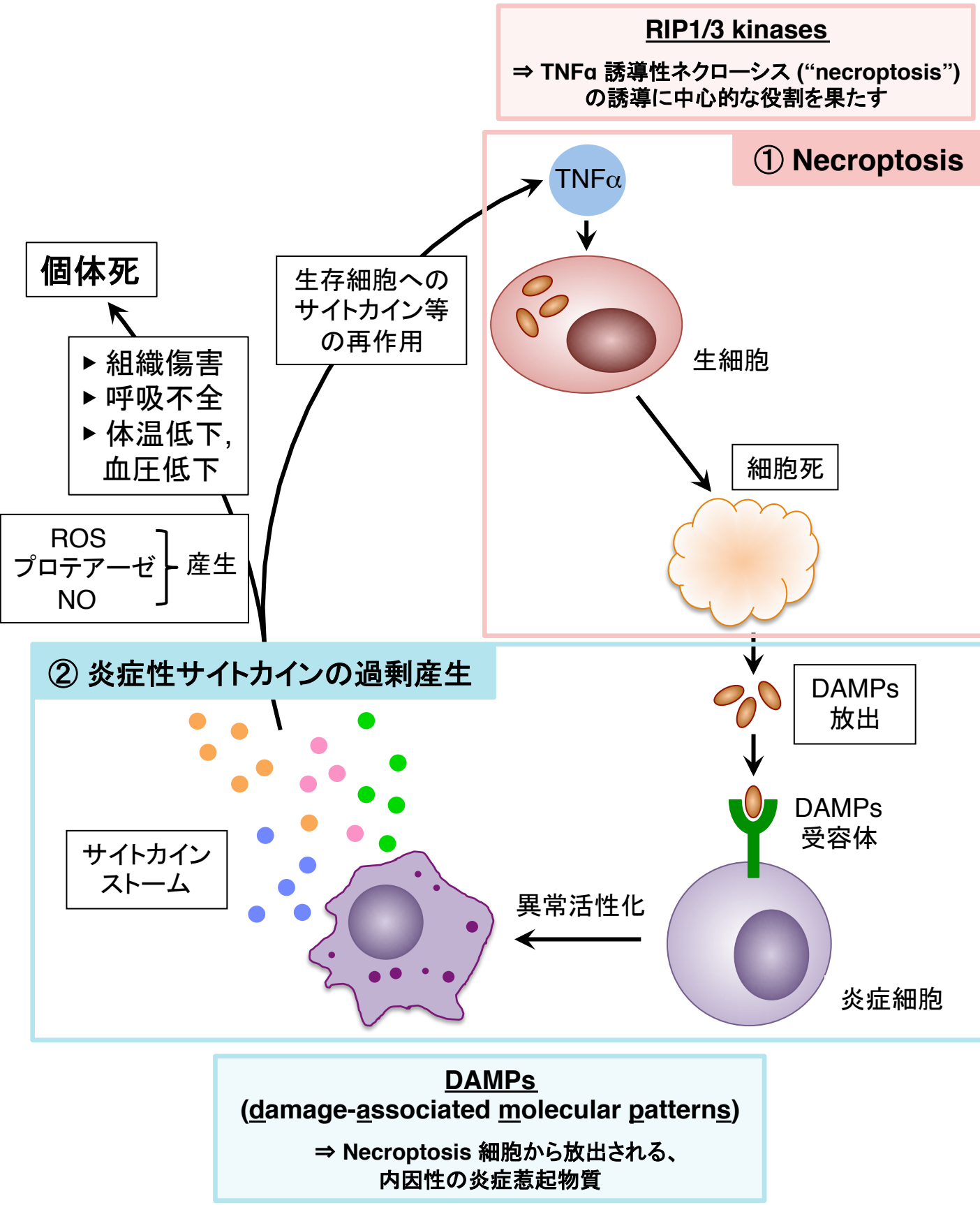
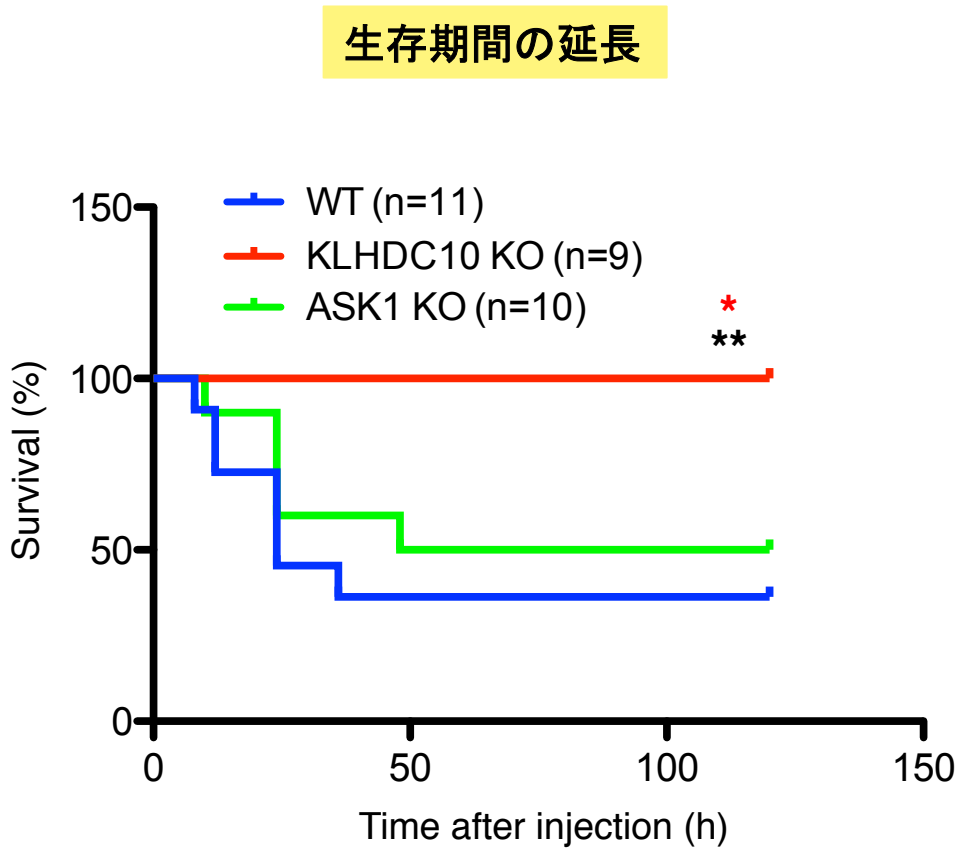


Figure 2 TNFα 誘導性 SIRS の発症機構

TNFα 誘導性 SIRS には、上記2つの段階が関与することが知られる。



A



**Figure 3** KLHDC10 欠損マウスは, TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示す

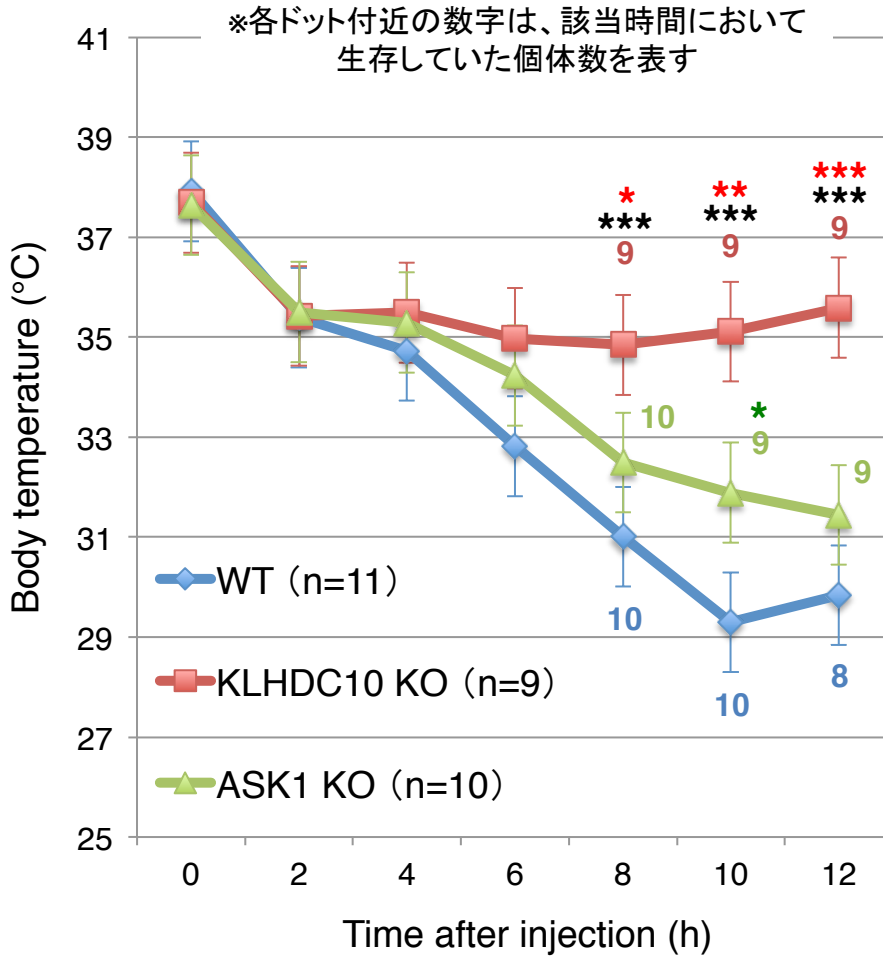
A TNF $\alpha$  投与 12 時間後までは 2 時間ごと, それ以降は 12時間ごとに各個体の生存を確認し, 生存期間を算出した.

mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.

KLHDC10 KO \*\*p<0.01 versus WT,

\*p<0.05 versus ASK1 KO

by Log-rank test followed with Gehan-Breslow-Wilcoxon test

**B****体温低下の抑制****Figure 3 KLHDC10 欠損マウスは、TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示す**

**B** TNF $\alpha$  投与 12 時間後まで、2 時間ごとに直腸温を測定した。  
 投与 8 時間後以降は死亡する個体が出たため、各ドット付近の数字によって、該当時間において生存していた個体数を表している。

mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.

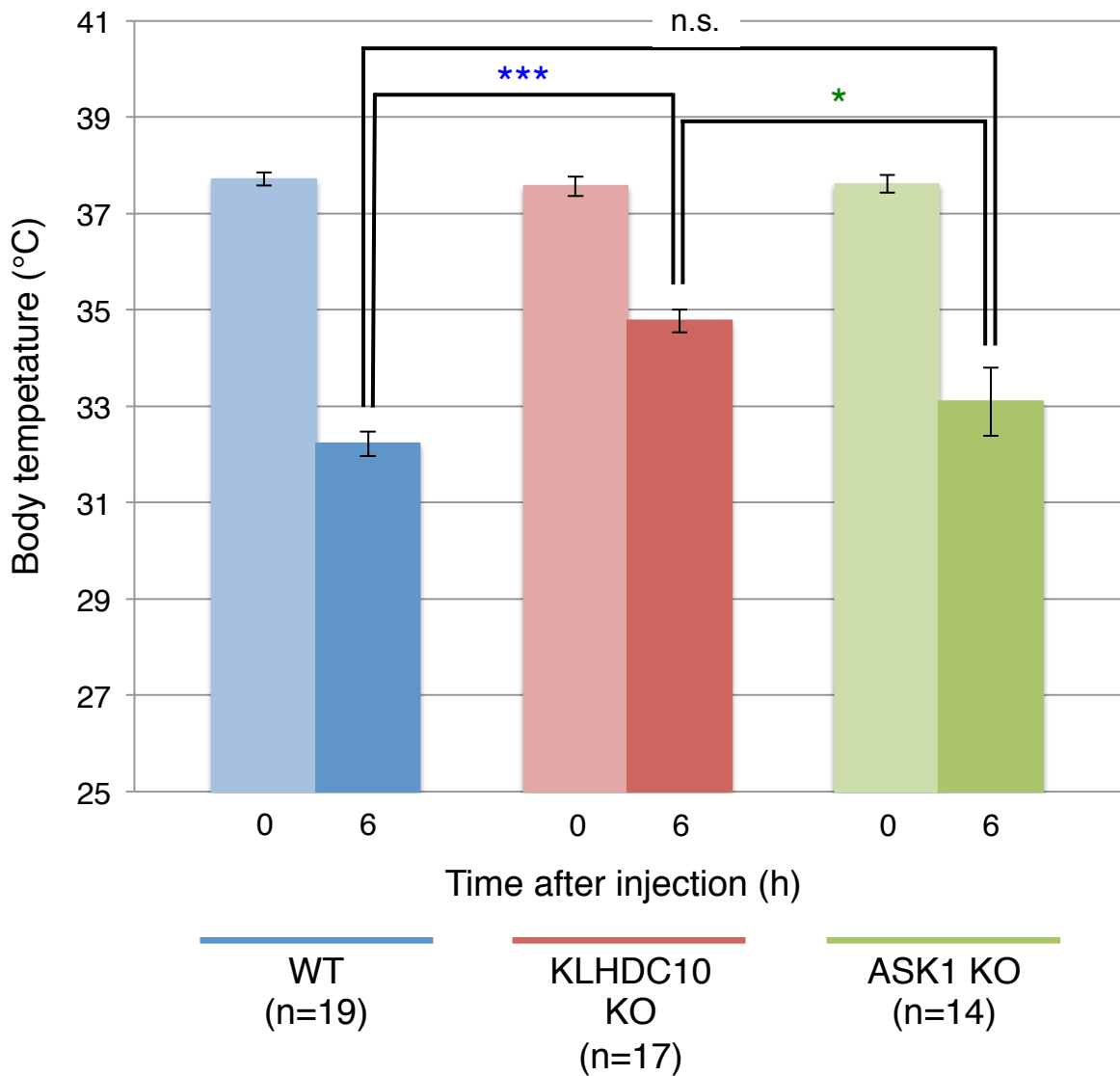
Error bars indicate means $\pm$ SEM.

KLHDC10 KO \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus WT,

\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus ASK1 KO,

ASK1 KO \*p<0.05 versus WT

by two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test

**C****TNF $\alpha$  投与 6 時間後における体温の上昇****Figure 3** KLHDC10 欠損マウスは、TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示す**C** TNF $\alpha$  投与直前(上記 0 時間後)および投与 6 時間後における、直腸温を測定した。0 or 6 hours after mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.Error bars indicate means $\pm$ SEM.

KLHDC10 KO \*\*\*p&lt;0.001 versus WT,

\*p&lt;0.05 versus ASK1 KO,

n.s. : not significant

each by Student's *t* tests

D

PBS 投与群の体温

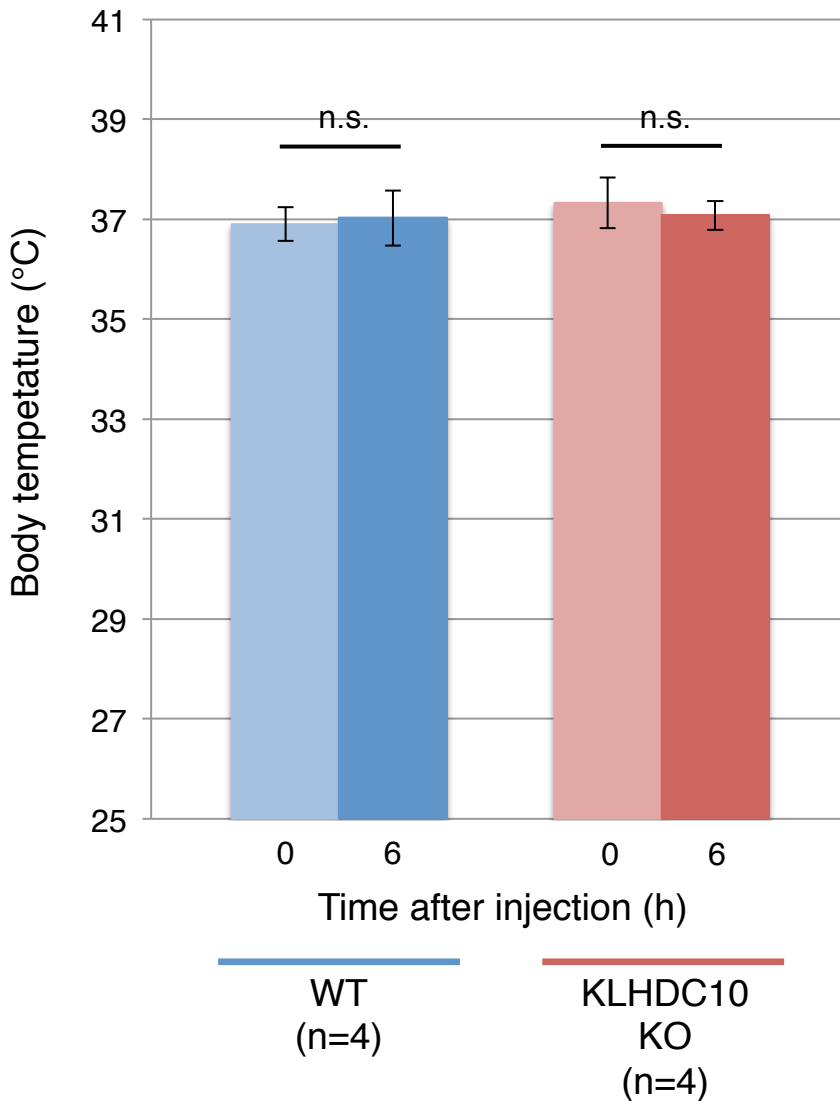


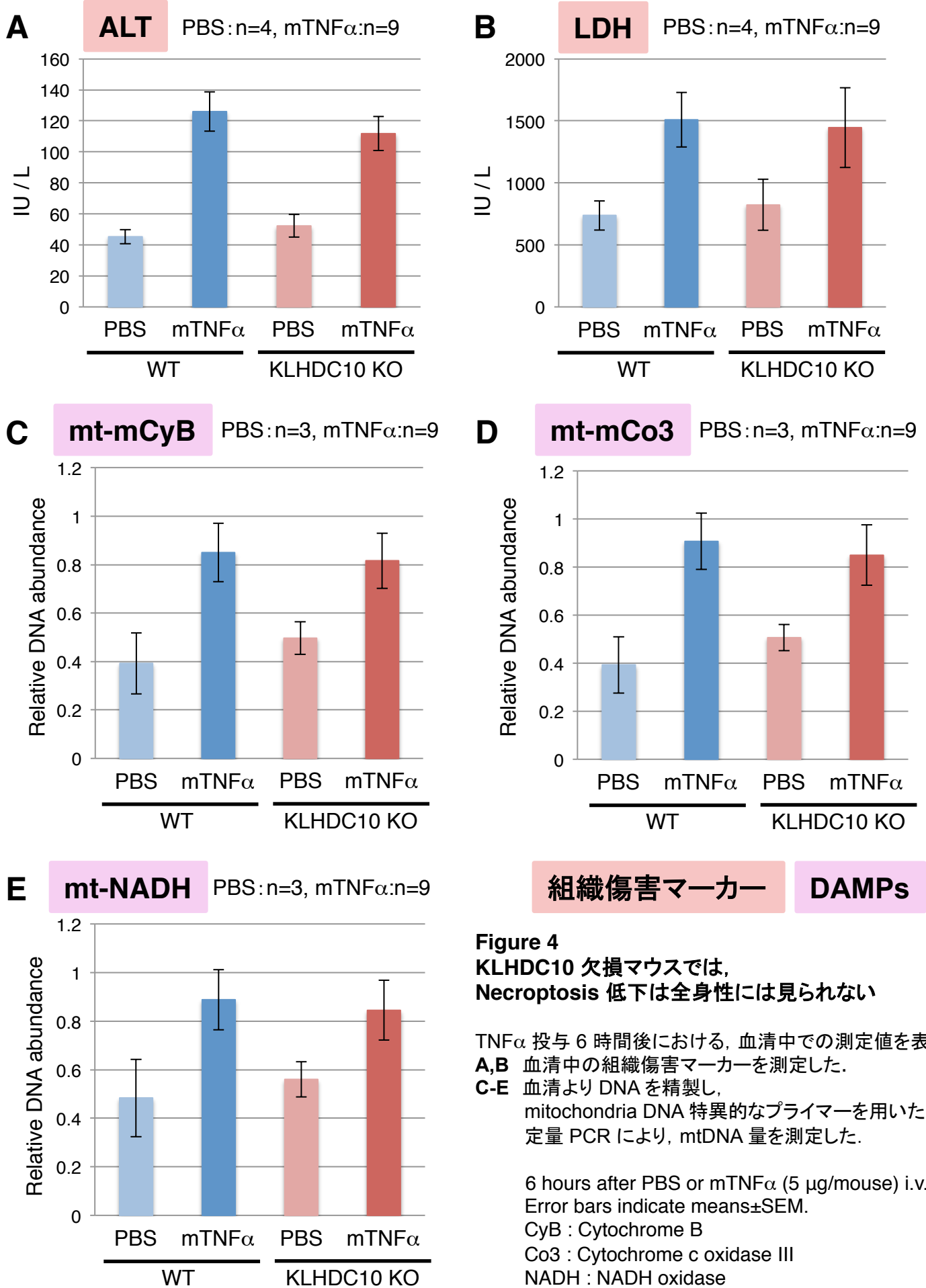
Figure 3 KLHDC10 欠損マウスは,  $TNF\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおいて耐性を示す

D PBS 投与直前(上記 0 時間後)および投与 6 時間後における, 直腸温を測定した.

0 or 6 hours after PBS (200  $\mu$ l/mouse) i.v.

Error bars indicate means $\pm$ SEM.

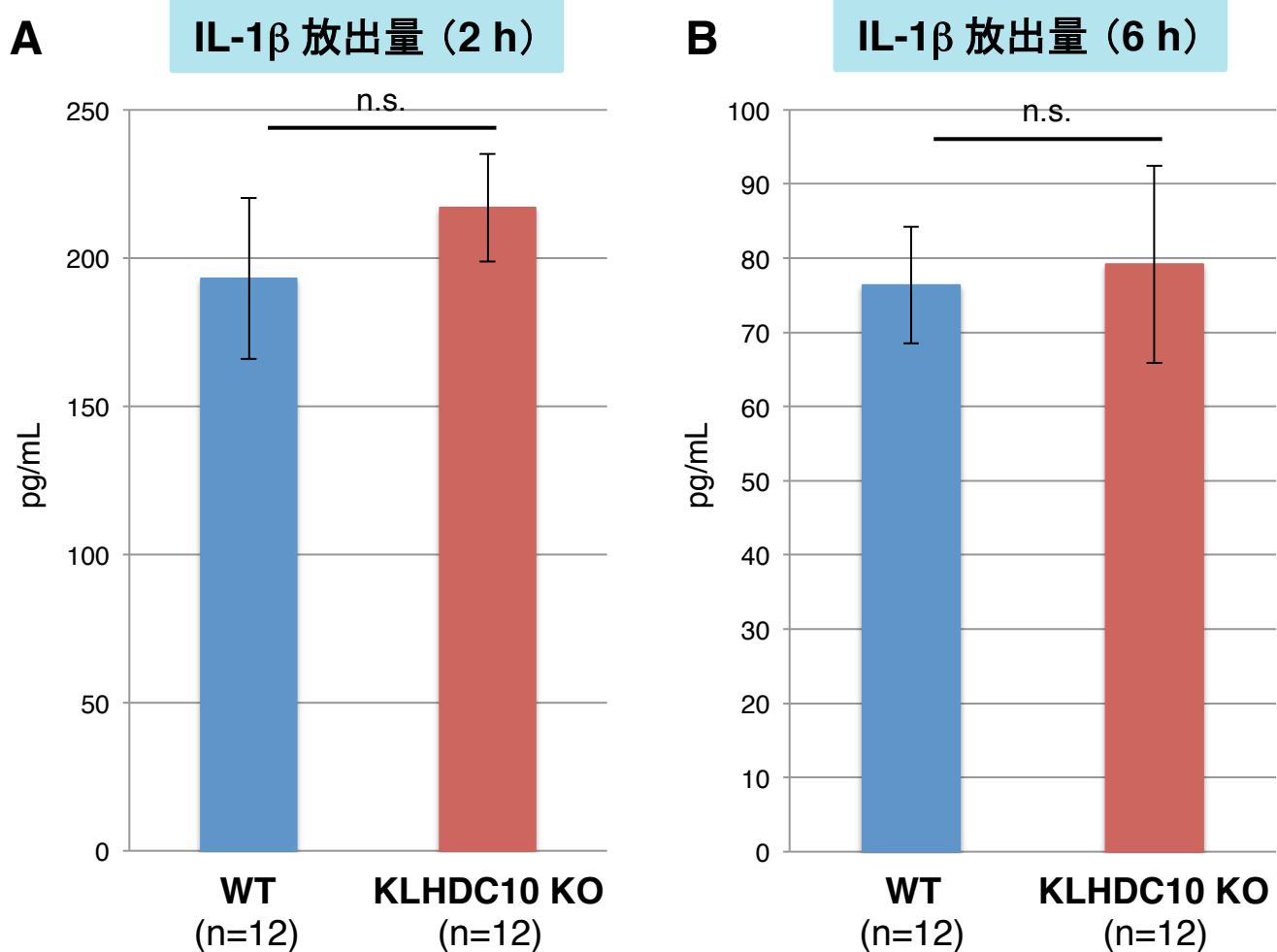
n.s. : not significant by Student's *t* tests



**Figure 4**  
**KLHDC10 欠損マウスでは、**  
**Necroptosis 低下は全身性には見られない**

TNF $\alpha$  投与 6 時間後における、血清中での測定値を表す。  
**A, B** 血清中の組織傷害マーカーを測定した。  
**C-E** 血清より DNA を精製し、mitochondria DNA 特異的なプライマーを用いた定量 PCR により、mtDNA 量を測定した。

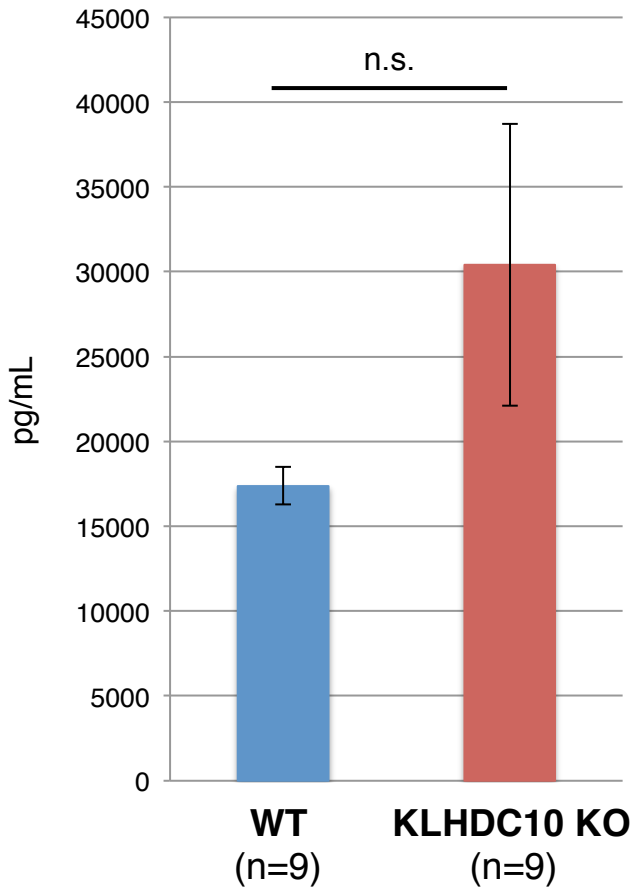
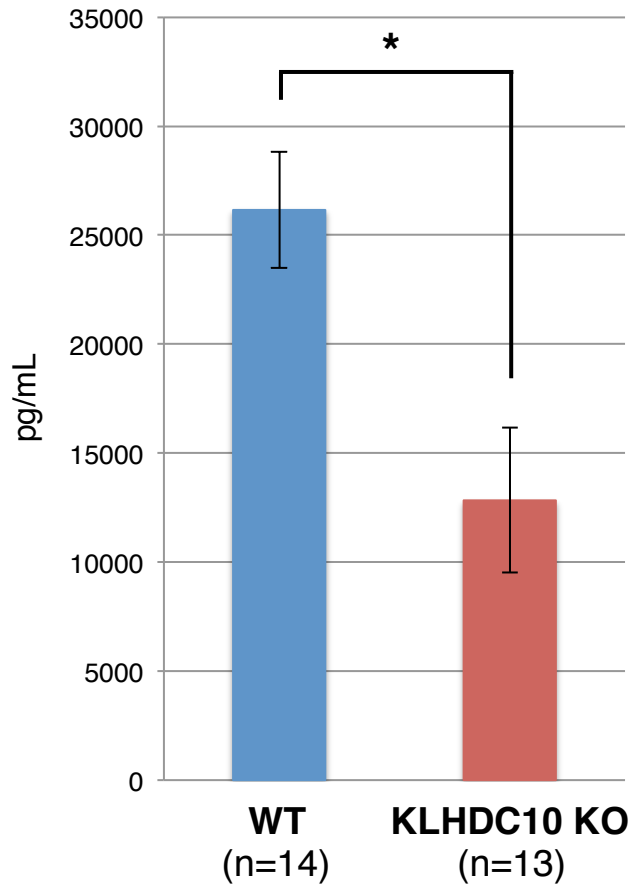
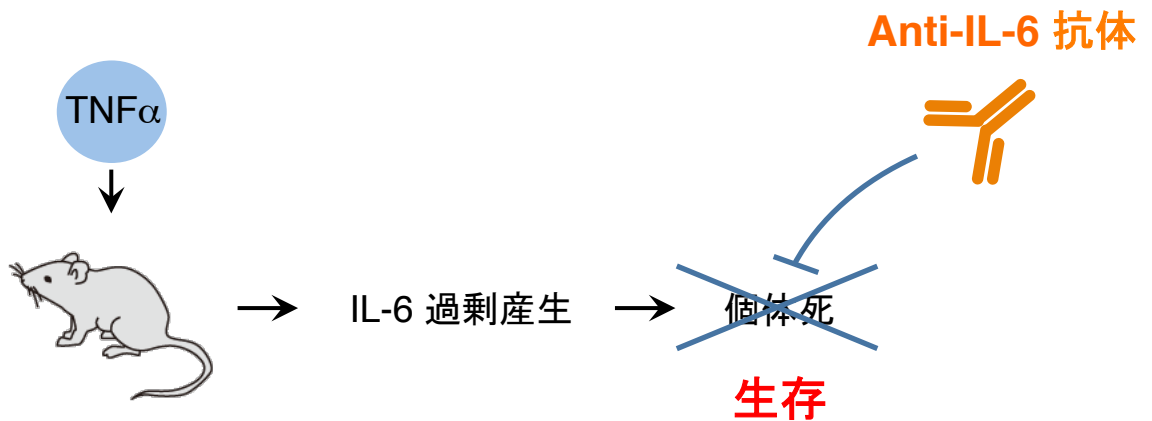
6 hours after PBS or mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.  
 Error bars indicate means $\pm$ SEM.  
 CyB : Cytochrome B  
 Co3 : Cytochrome c oxidase III  
 NADH : NADH oxidase



**Figure 5** KLHDC10 欠損マウスにおいて, 血清中 IL- $\beta$  量は有意に増減しない

**A, B** ELISAにより, TNF $\alpha$  投与 2 時間後 (A), および 6 時間後 (B) における, 血清中 IL-1 $\beta$  の定量を行った.

2 or 6 hours after mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.  
 Error bars indicate means $\pm$ SEM.  
 n.s. : not significant

**C****IL-6 放出量 (2 h)****D****IL-6 放出量 (6 h)****E**

**Figure 5** KLHDC10 欠損マウスにおいて、血清中 IL-6 量は投与後後期で有意に低下する

**C, D** ELISAにより、 $TNF\alpha$  投与 2 時間後 (A), および 6 時間後 (B) における、血清中 IL-6 の定量を行った。

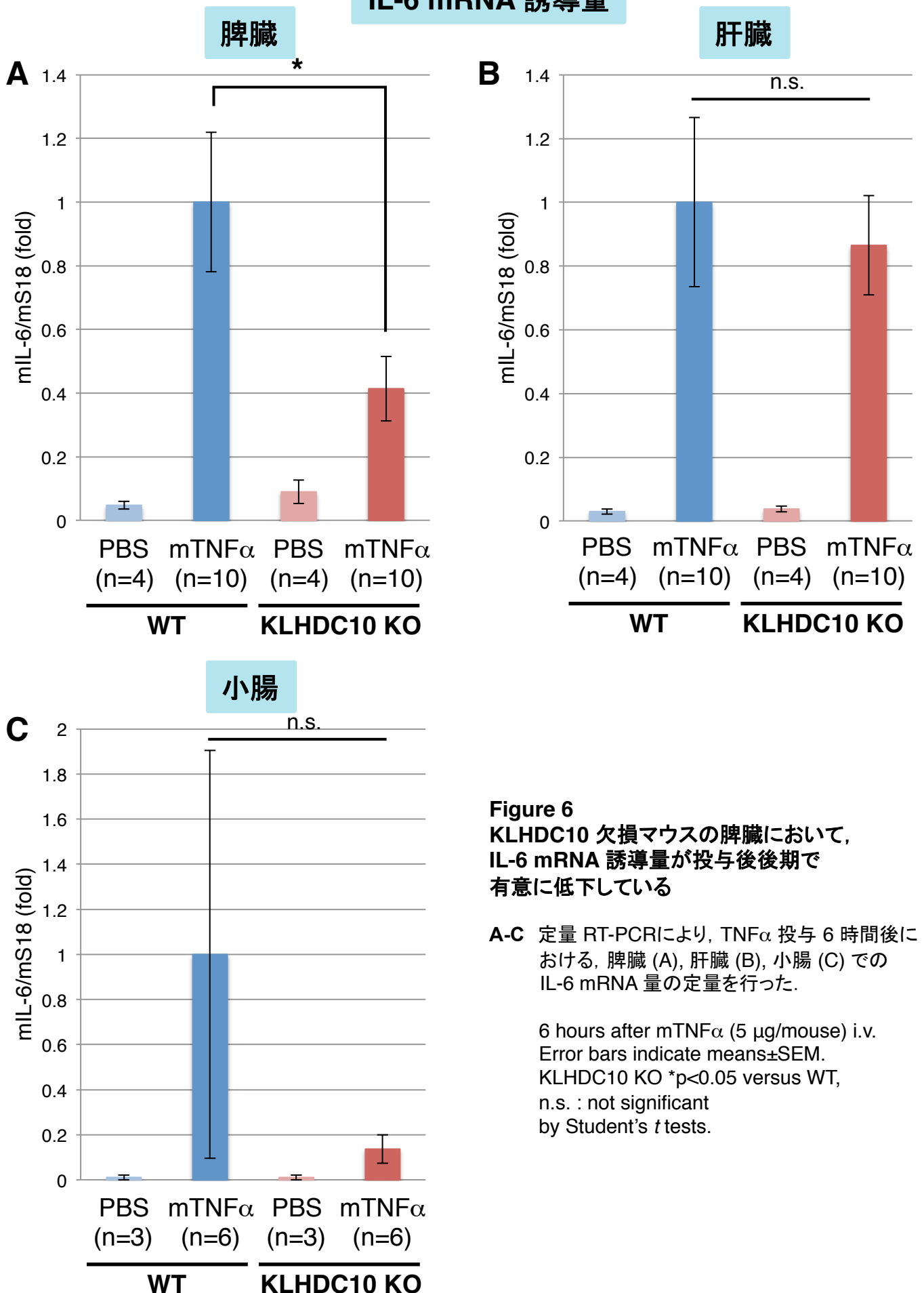
**E**  $TNF\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおける致死性は、Anti-IL-6 抗体の投与によりレスキューされるとの報告内容の模式図 (Starnes et al., *J. Immunol.*, 1990)。

2 or 6 hours after m $TNF\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.

Error bars indicate means  $\pm$  SEM.

KLHDC10 KO \* $p < 0.05$  versus WT, n.s. : not significant by Student's *t* tests.

## IL-6 mRNA 誘導量



**Figure 6**  
**KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、IL-6 mRNA 誘導量が投与後後期で有意に低下している**

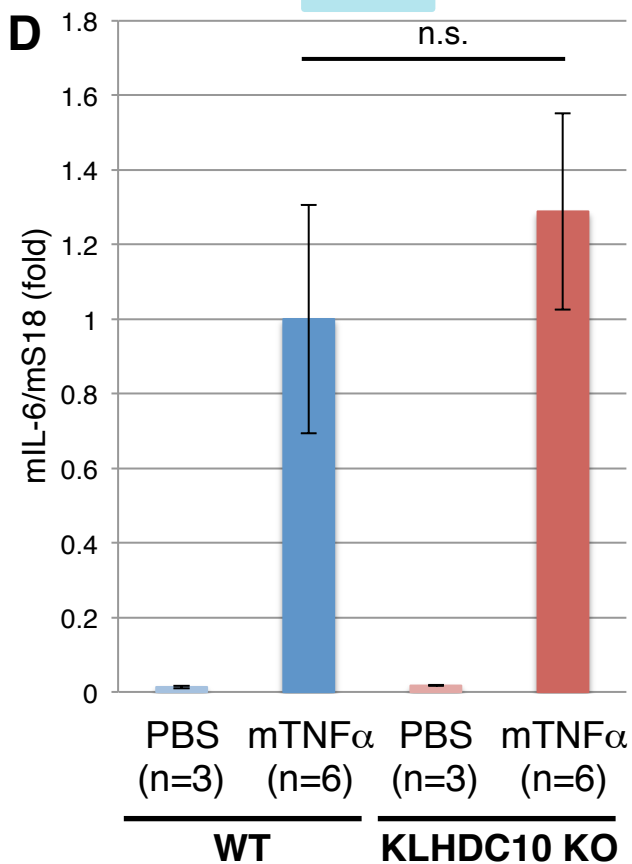
**A-C** 定量 RT-PCRにより、TNF $\alpha$  投与 6 時間後における、脾臓 (A)、肝臓 (B)、小腸 (C) での IL-6 mRNA 量の定量を行った。

6 hours after mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.  
 Error bars indicate means $\pm$ SEM.  
 KLHDC10 KO \* $p$ <0.05 versus WT,  
 n.s. : not significant  
 by Student's  $t$  tests.

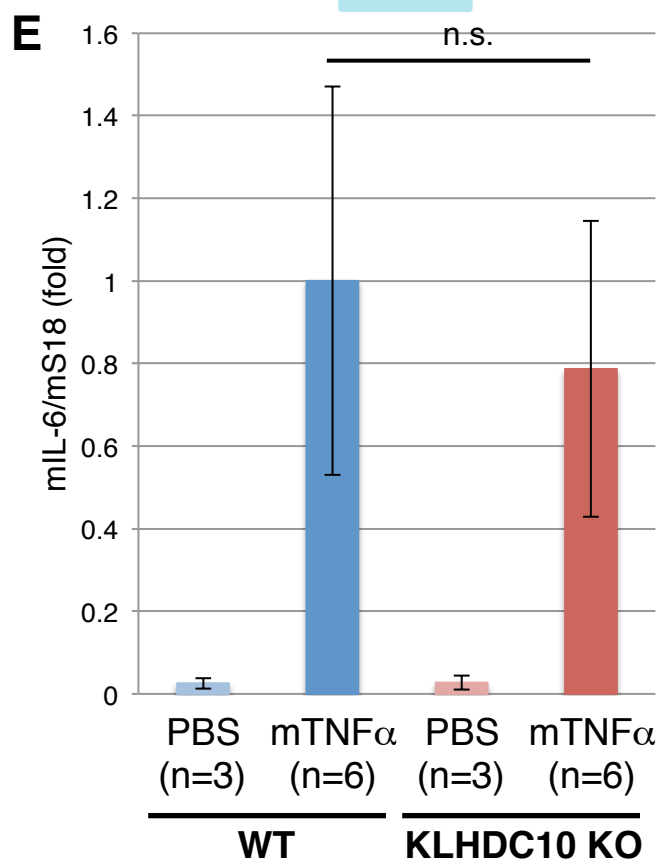


## IL-6 mRNA 誘導量

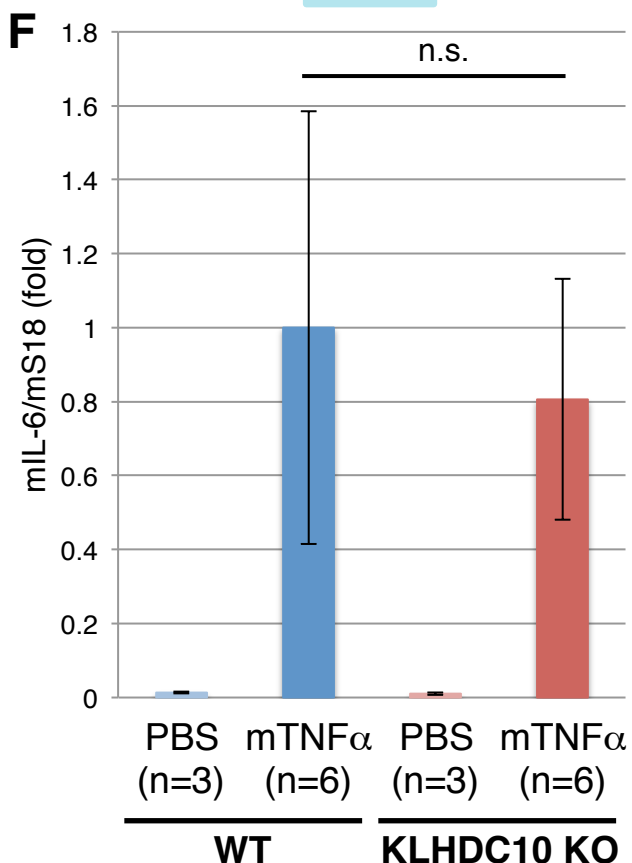
脾臓



肝臓



小腸

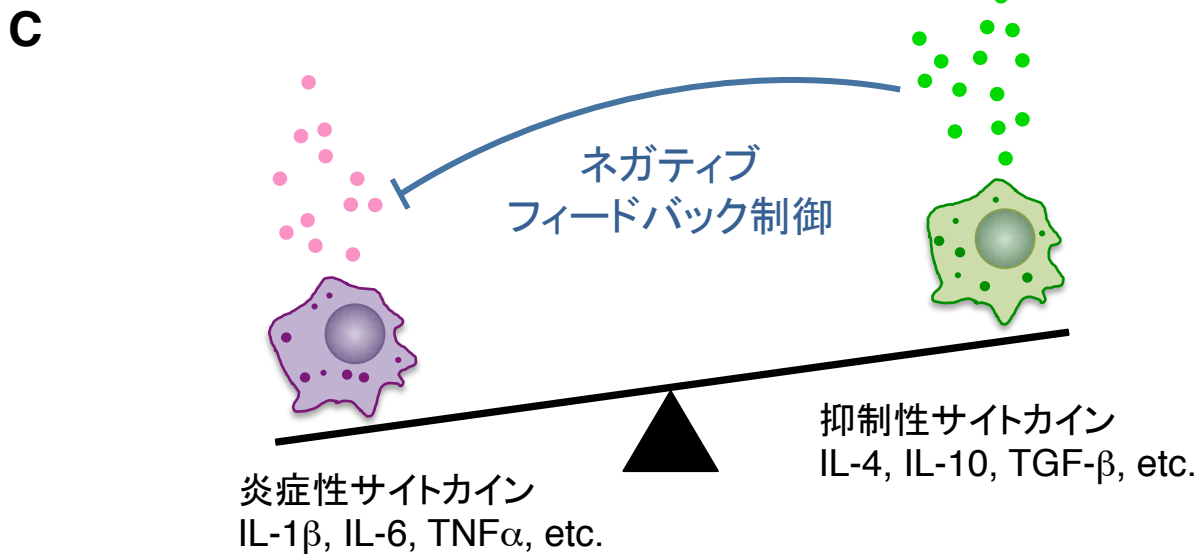
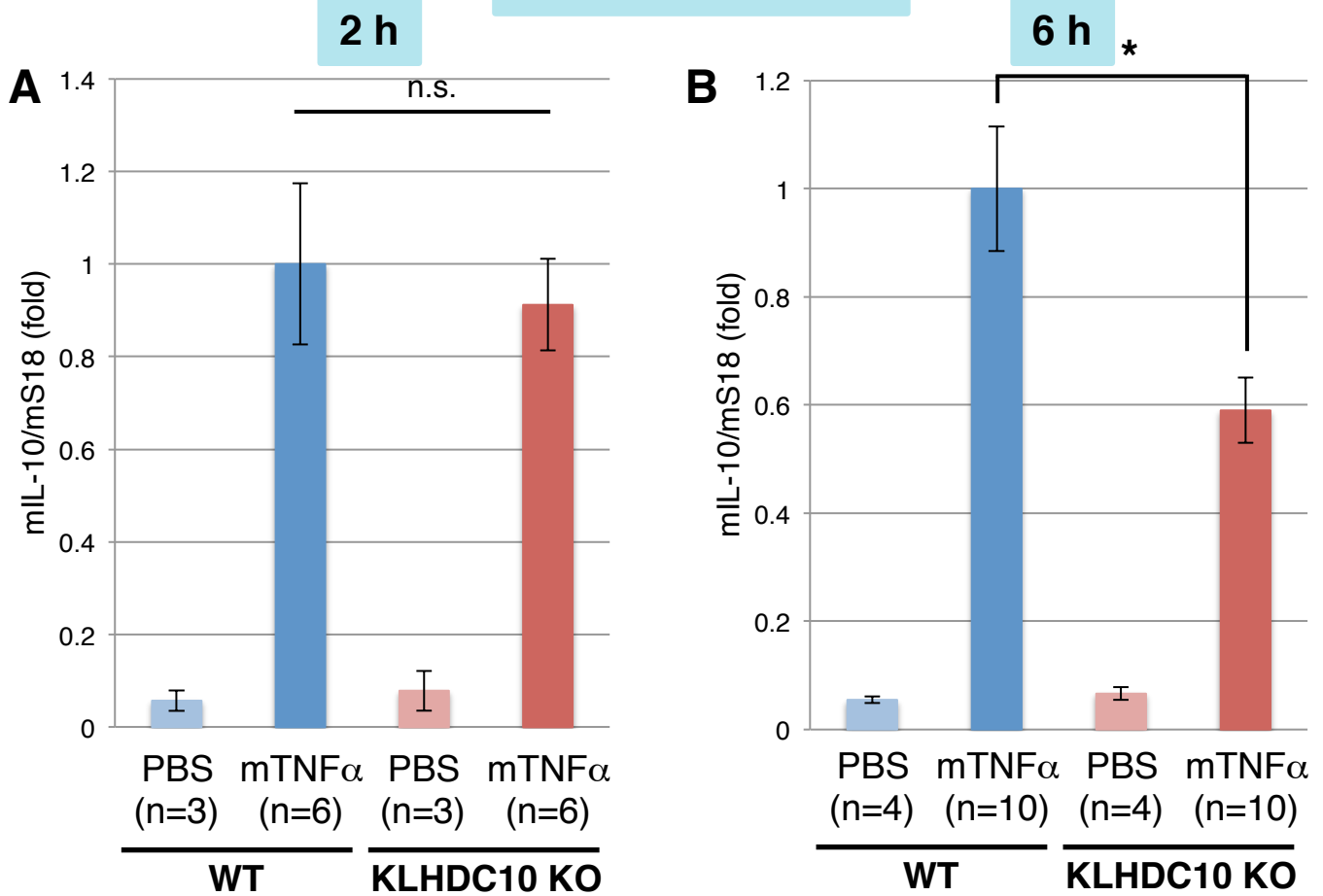


**Figure 6**  
KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、IL-6 mRNA 誘導量が投与後後期で有意に低下している

**D-F** 定量 RT-PCRにより、TNF $\alpha$  投与 2 時間後における、脾臓 (A)、肝臓 (B)、小腸 (C) での IL-6 mRNA 量の定量を行った。

2 hours after PBS or mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v. Error bars indicate means $\pm$ SEM. KLHDC10 KO \* $p$ <0.05 versus WT, n.s. : not significant by Student's  $t$  tests.

# IL-10 mRNA 誘導量



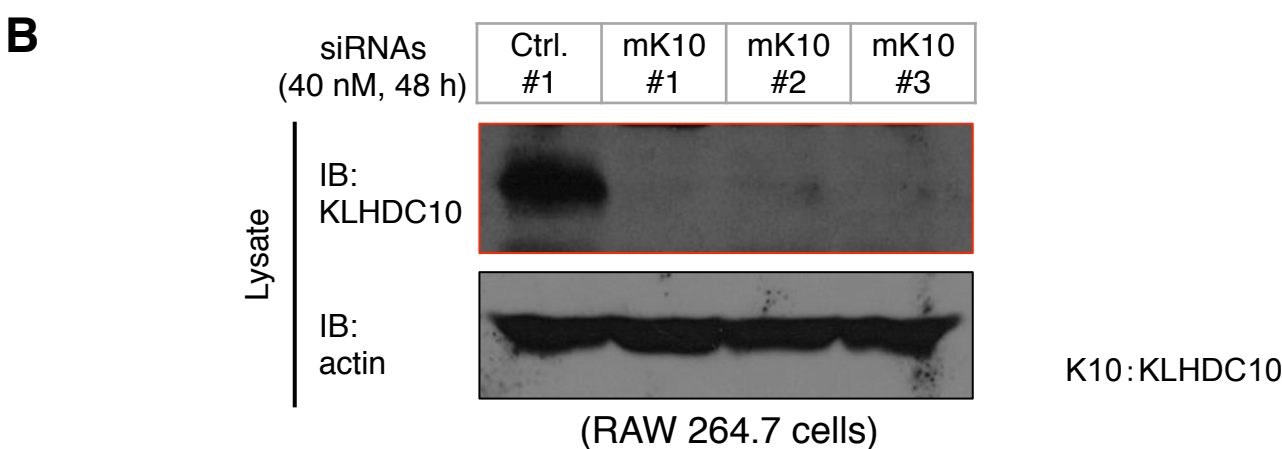
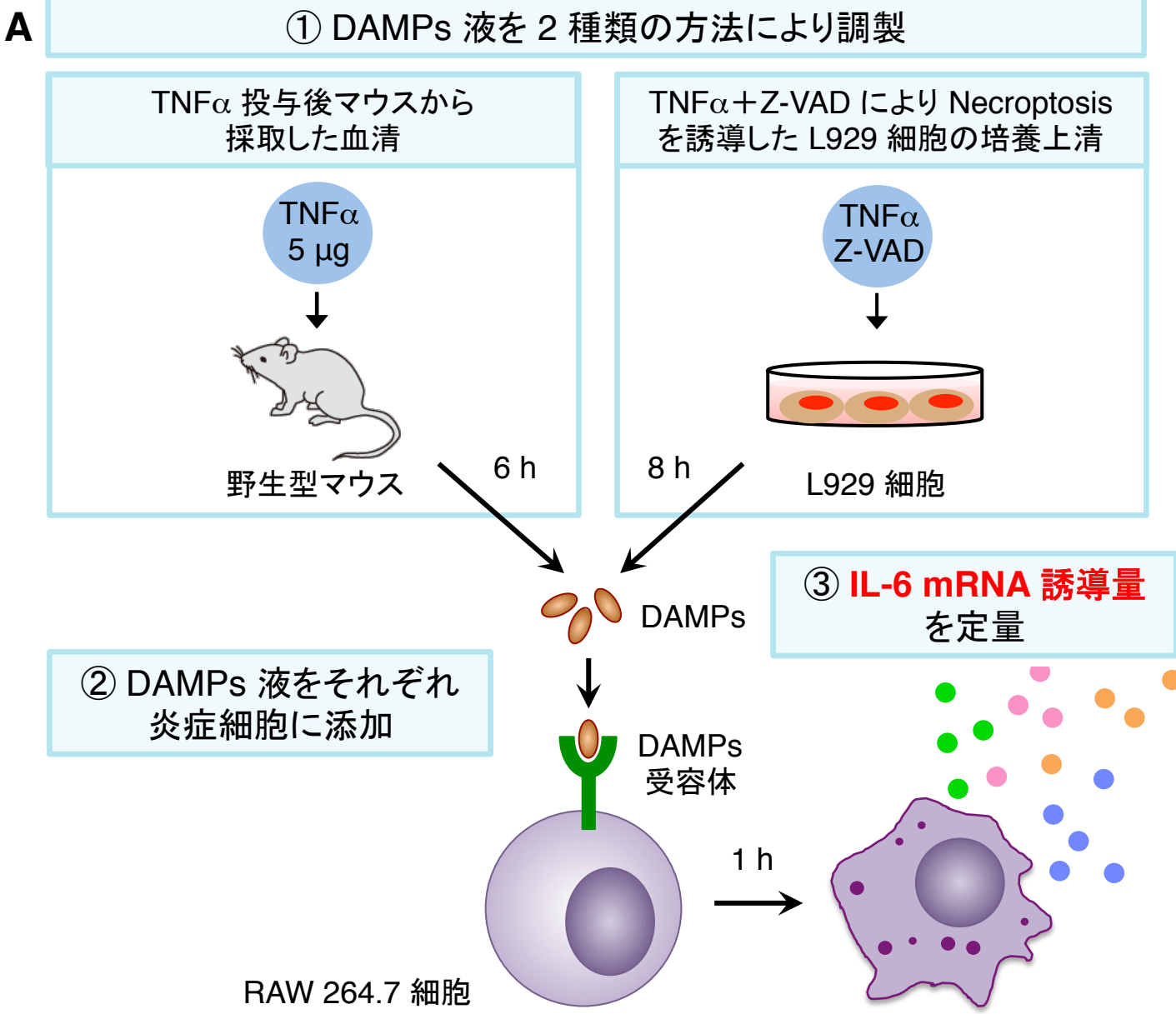
**Figure 7** KLHDC10 欠損マウスの脾臓において、抑制性サイトカイン IL-10 の mRNA 誘導量増加は見られない

**A, B** 定量 RT-PCRにより、TNF $\alpha$  投与 2 時間後 (A)、6 時間後 (B) における、IL-10 mRNA 量を定量した。  
**C** 抑制性サイトカインによる、炎症性サイトカインのネガティブフィードバック制御の模式図。

2 or 6 hours after PBS or mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v.

Error bars indicate means $\pm$ SEM.

KLHDC10 KO \*p < 0.05 versus WT, n.s. : not significant by Student's *t* tests.

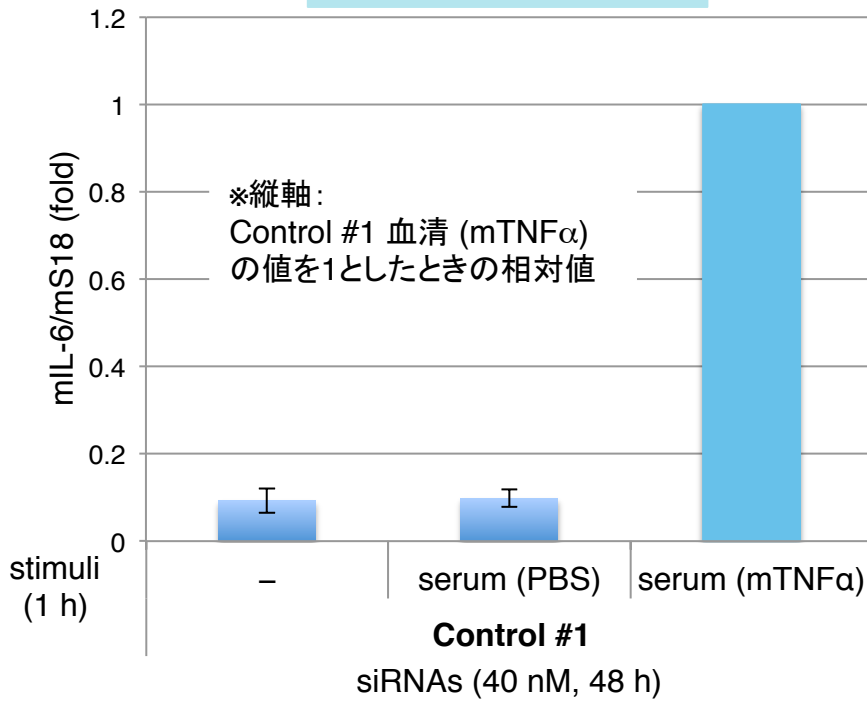


**Figure 8** KLHDC10 発現抑制により, 炎症細胞1細胞あたりの IL-6 mRNA 誘導量は低下しない

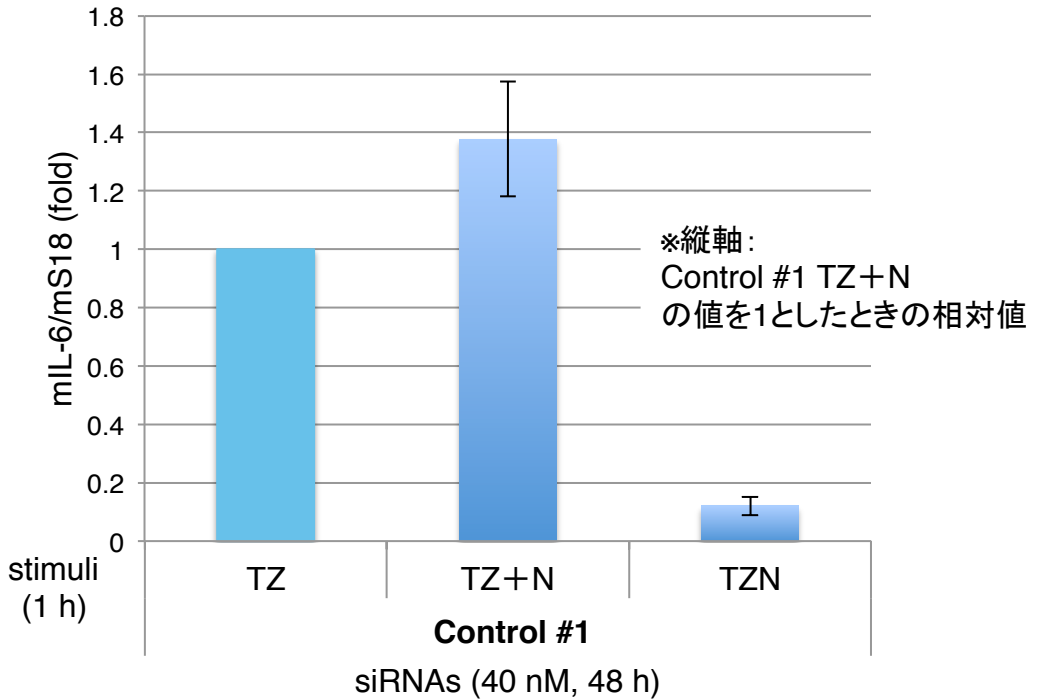
**A** 本実験手順の模式図.  
 左)6 hours after mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v., 右)mTNF $\alpha$  (20 ng/mL), Z-VAD-fmk (10  $\mu$ M)  
**B** 本実験系での RAW 264.7 細胞における KLHDC10 発現抑制効果を, イムノブロットにより確認した.

## IL-6 mRNA 誘導量

C



D



**Figure 8** KLHDC10 発現抑制により, 炎症細胞1細胞あたりの IL-6 mRNA 誘導量は低下しない

C, D TNF $\alpha$  を投与した野生型から採取した血清の10倍希釈液 (C), TNF $\alpha$ +Z-VAD-fmk 刺激により Necroptosis を誘導した L929 細胞の培養上清の2倍希釈液(D), のそれぞれについて, RAW 264.7 細胞へ添加して 1 時間後の IL-6 mRNA 誘導能を定量 RT-PCR により評価した.

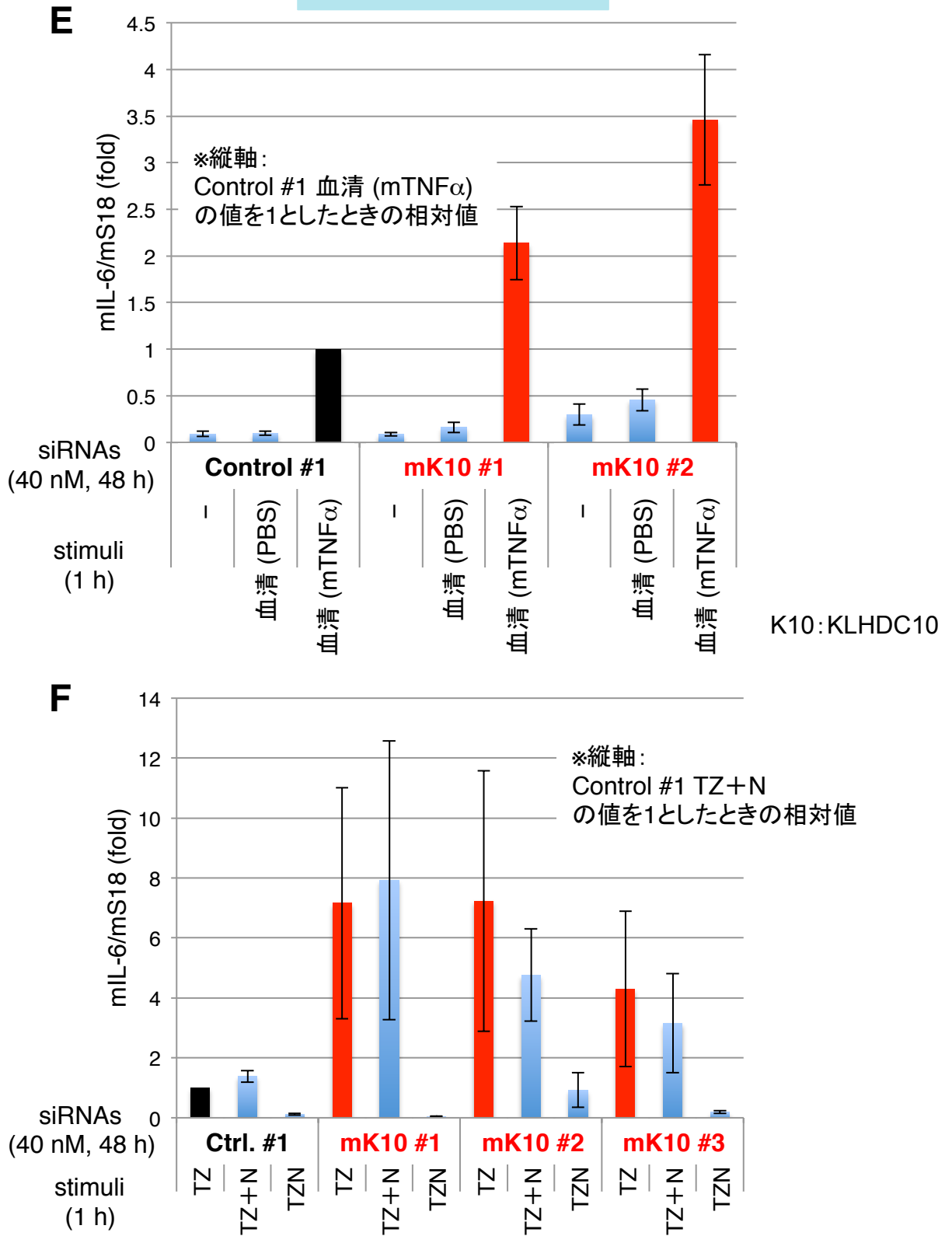
Diluted by RPMI-1640 medium each

C) 6 hours after PBS or mTNF $\alpha$  (5  $\mu$ g/mouse) i.v

D) T : mTNF $\alpha$  (20 ng/mL), Z : Z-VAD-fmk (10  $\mu$ M), N : Necrostatin-1 (10  $\mu$ M)

Error bars indicate means $\pm$ SEM (n=3 respectively).

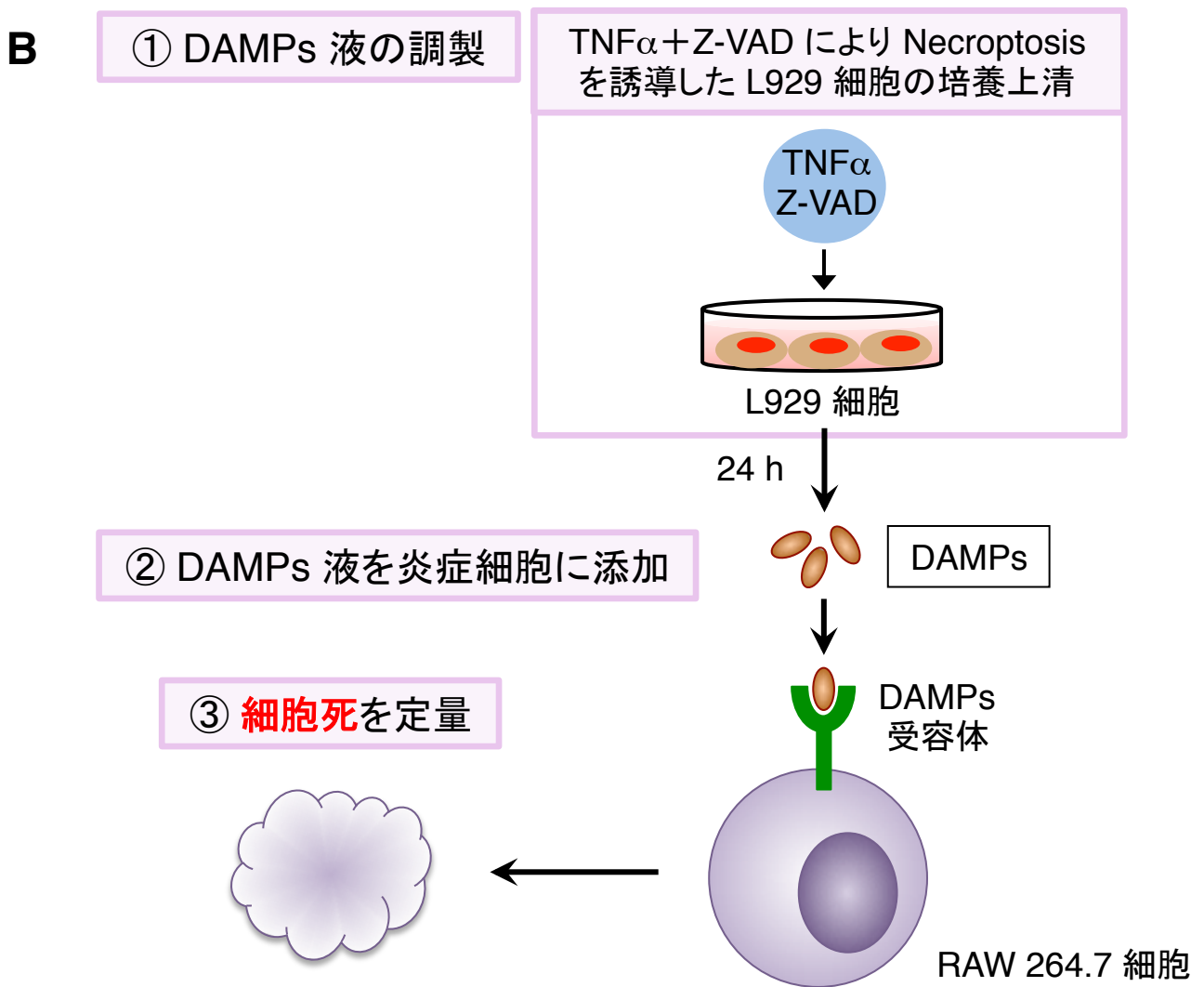
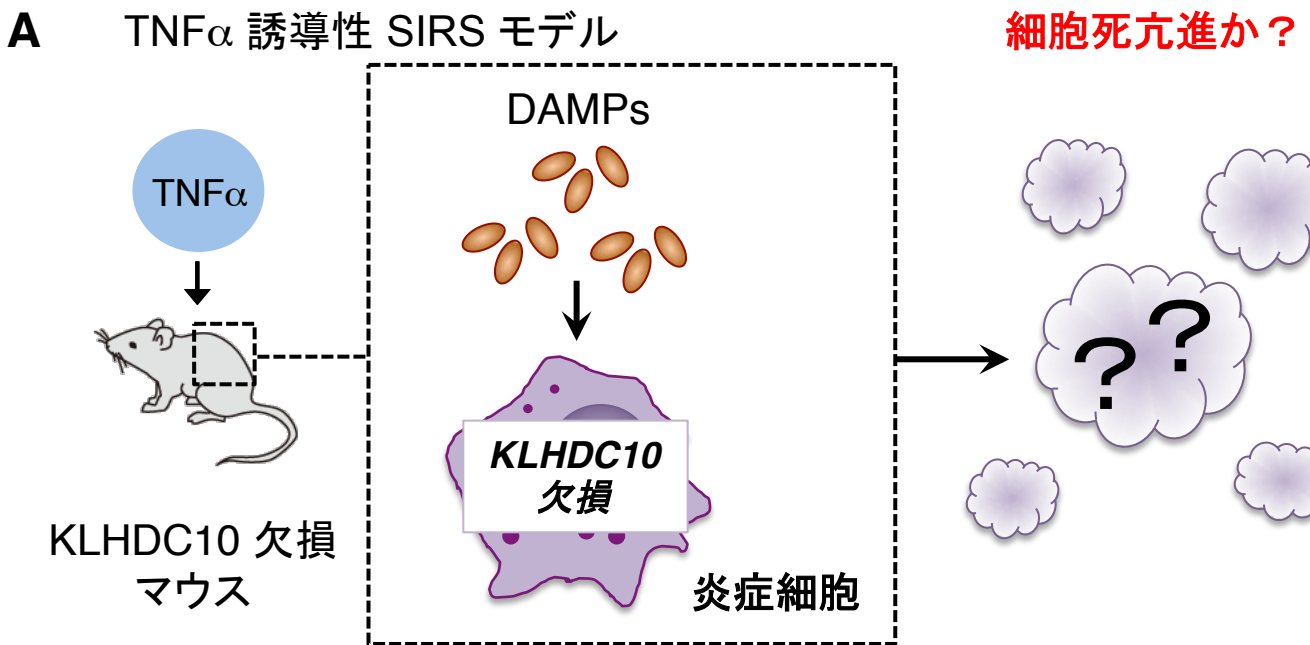
## IL-6 mRNA 誘導量



**Figure 8** KLHDC10 発現抑制により, 炎症細胞1細胞あたりの IL-6 mRNA 誘導量は低下しない

E, F C, D と同様に, RAW 264.7 細胞での KLHDC10 発現抑制下で IL-6 mRNA 誘導量を評価した。

Error bars indicate means $\pm$ SEM (n=3 respectively).  
Other conditions are as same as those in C, D.



**Figure 9** KLHDC10 発現抑制により, DAMPs 刺激下で炎症細胞の細胞死が亢進し, その一部に RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が関与する

**A** 本実験の目的の模式図.

**B** 本実験手順の模式図.

mTNF $\alpha$  (20 ng/mL), Z-VAD-fmk (10  $\mu$ M)

C

細胞死

(細胞上清中への LDH 放出量を指標とする)  
 ※L929 細胞上清中の LDH 量を差し引いた値

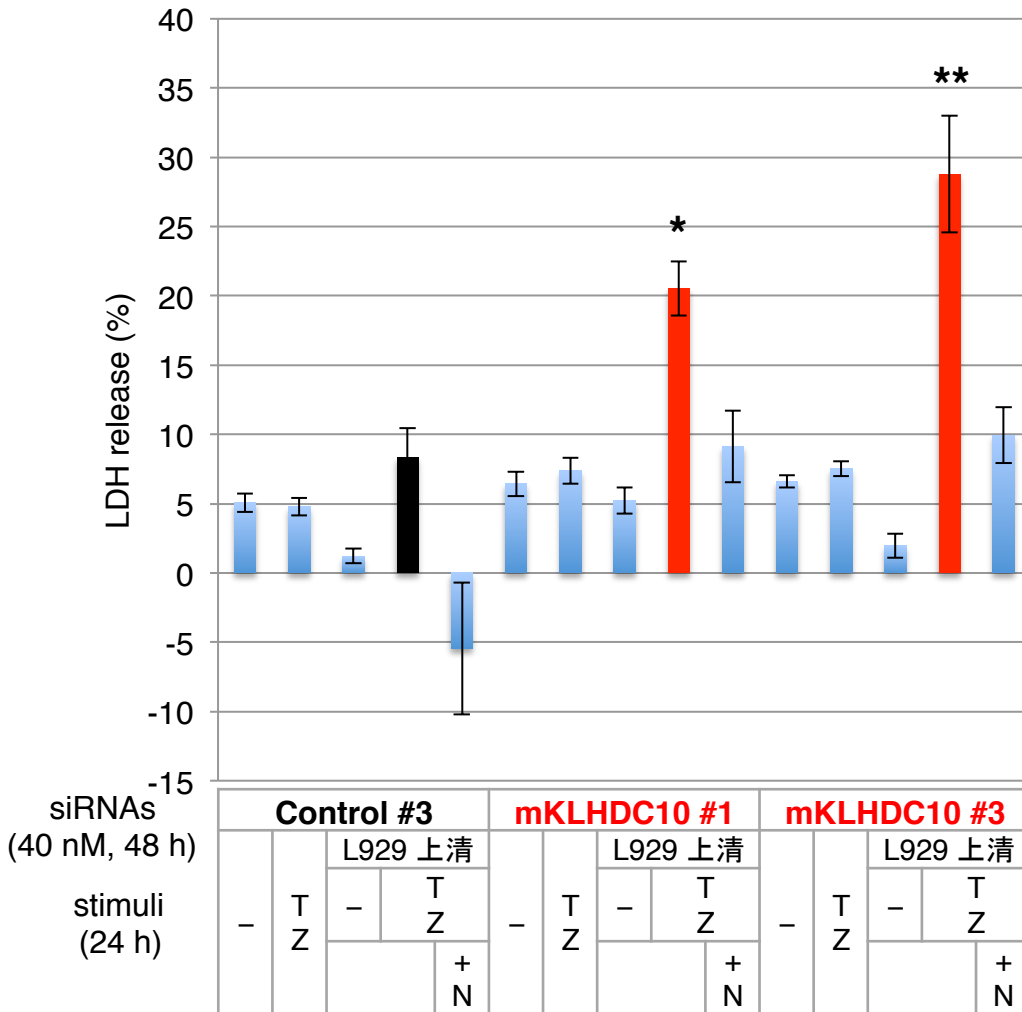


Figure 9 KLHDC10 発現抑制により, DAMPs 刺激下で炎症細胞の細胞死が亢進し, その一部に RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が関与する

C TNF $\alpha$ +Z-VAD-fmk 刺激により Necroptosis を誘導した L929 細胞の培養上清の2倍希釈液を DAMPs 模倣刺激として用いた。  
 これを RAW 264.7 細胞に添加したさいの KLHDC10 発現抑制下での細胞死について, 細胞上清中への LDH 放出量を指標として定量を行った。


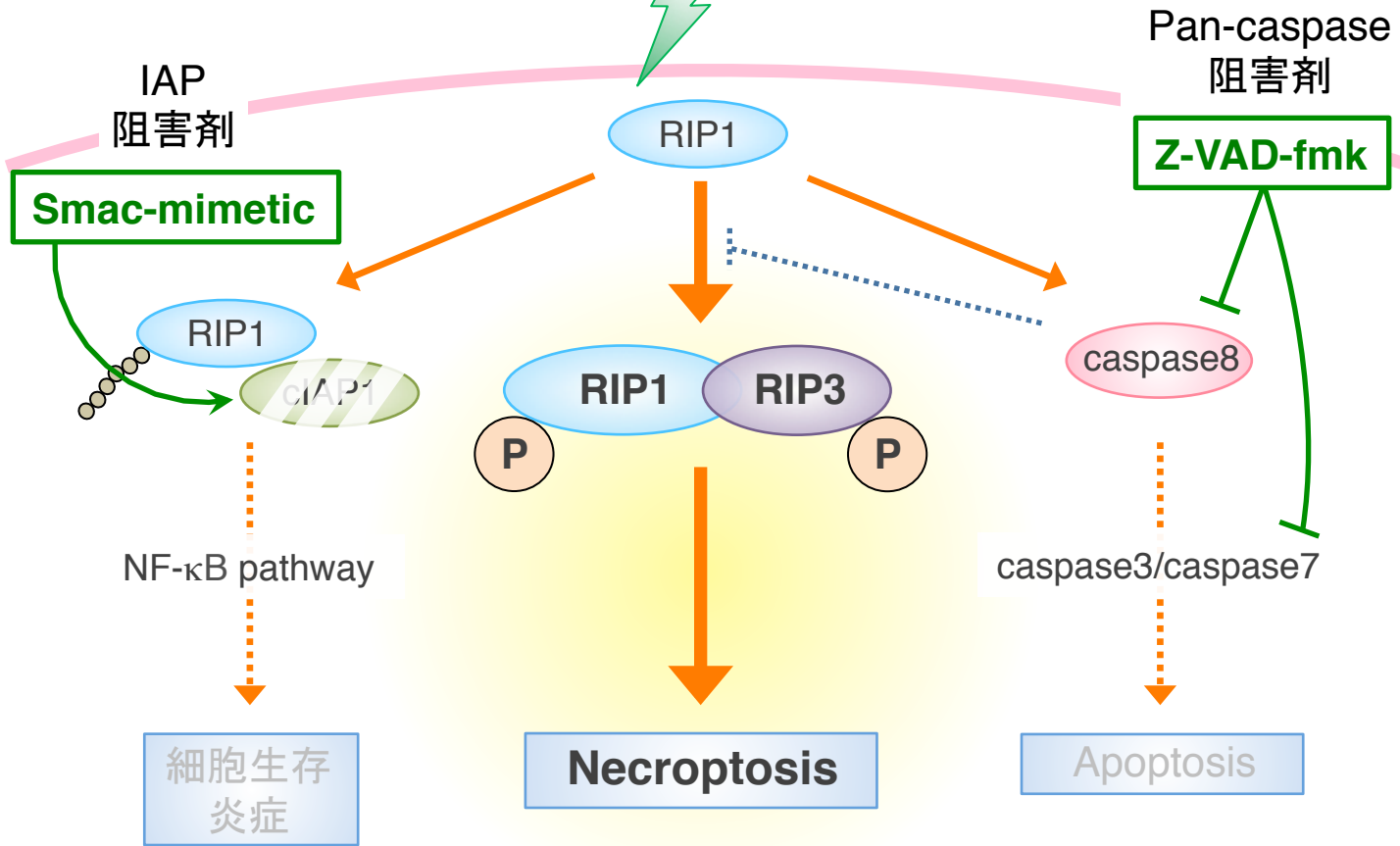
Diluted by RPMI-1640 medium each

T : mTNF $\alpha$  (10 ng/mL), Z : Z-VAD-fmk (5  $\mu$ M), N : Necrostatin-1 (5  $\mu$ M)

Error bars indicate means $\pm$ SEM (n=4).

\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. Control #3 (L929 上清 TZ)

by one-way ANOVA with Dunnette's post-hoc test

**A****Smac-mimetic  
Z-VAD-fmk**

 : ポリユビキチン

**Smac-mimetic** : RIP1 下流での生存シグナルの抑制

**Z-VAD-fmk** : RIP1 下流での Apoptosis シグナルの抑制

→ 併用することで, RIP1 下流での Necroptosis を誘導することができる

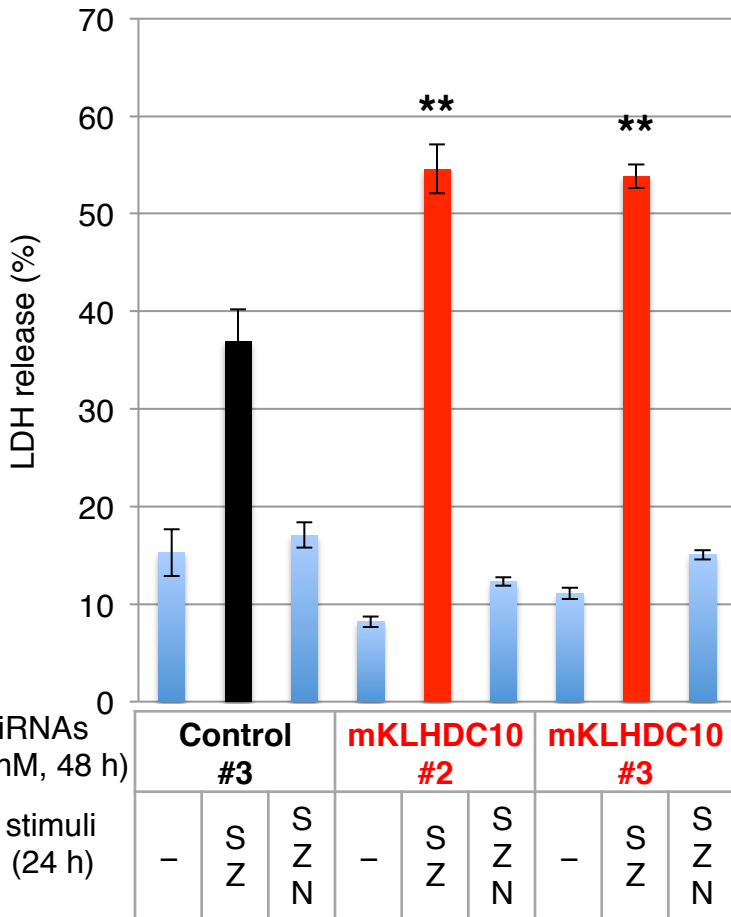
**Figure 10** KLHDC10 発現抑制により, Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激下で炎症細胞限定的に RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が亢進する

**A** Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激によるシグナル伝達経路の模式図.

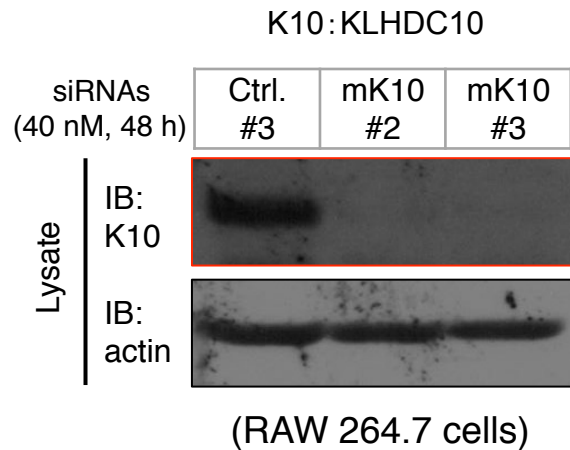


## 細胞死

**B** (細胞上清中への LDH 放出量を指標とする)



**C**



**Figure 10** KLHDC10 発現抑制により, Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激下で炎症細胞限定的に RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が亢進する

**B** Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激を RAW 264.7 細胞に処置したさいの, KLHDC10 発現抑制下における細胞死について, 細胞上清中への LDH 放出量を指標として定量を行った.

S : Smac-mimetic (50 nM), Z : Z-VAD-fmk (10 μM), N : Necrostatin-1 (10 μM)

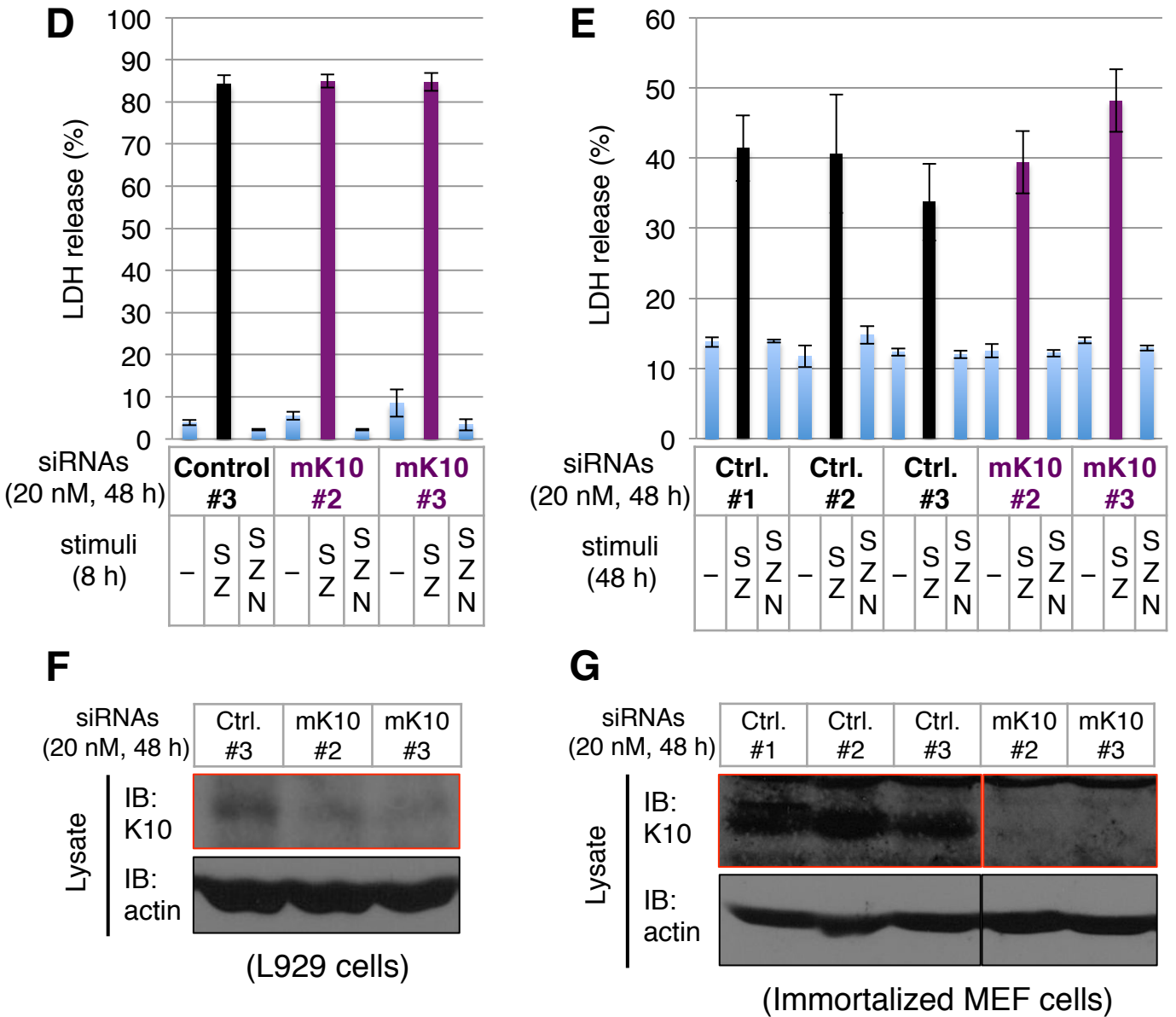
Error bars indicate means±SEM (n=3).

\*\*p<0.01 vs. Control #3 (SZ) by one-way ANOVA with Dunnette's post-hoc test

**C** 本実験系での RAW 264.7 細胞における KLHDC10 発現抑制効果を, イムノブロットにより確認した.

# 細胞死

(細胞上清中への LDH 放出量を指標とする)



K10 : KLHDC10

**Figure 10** KLHDC10 発現抑制により, Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激下で炎症細胞限定的に RIP1/3 kinases 依存性 Necroptosis が亢進する

**D, E** Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激を L929 細胞 (D), 不死化 MEF 細胞 (E) にそれぞれ処置したさいの, KLHDC10 発現抑制下における細胞死について, 細胞上清中への LDH 放出量を指標として定量を行った.  
S : Smac-mimetic (50 nM), Z : Z-VAD-fmk (10 μM), N : Necrostatin-1 (10 μM)  
Error bars indicate means±SEM (n=3 respectively).

**F, G** 本実験系での L929 細胞 (F), 不死化 MEF 細胞 (G) における KLHDC10 発現抑制効果を, イムノブロットによりそれぞれ確認した.

A

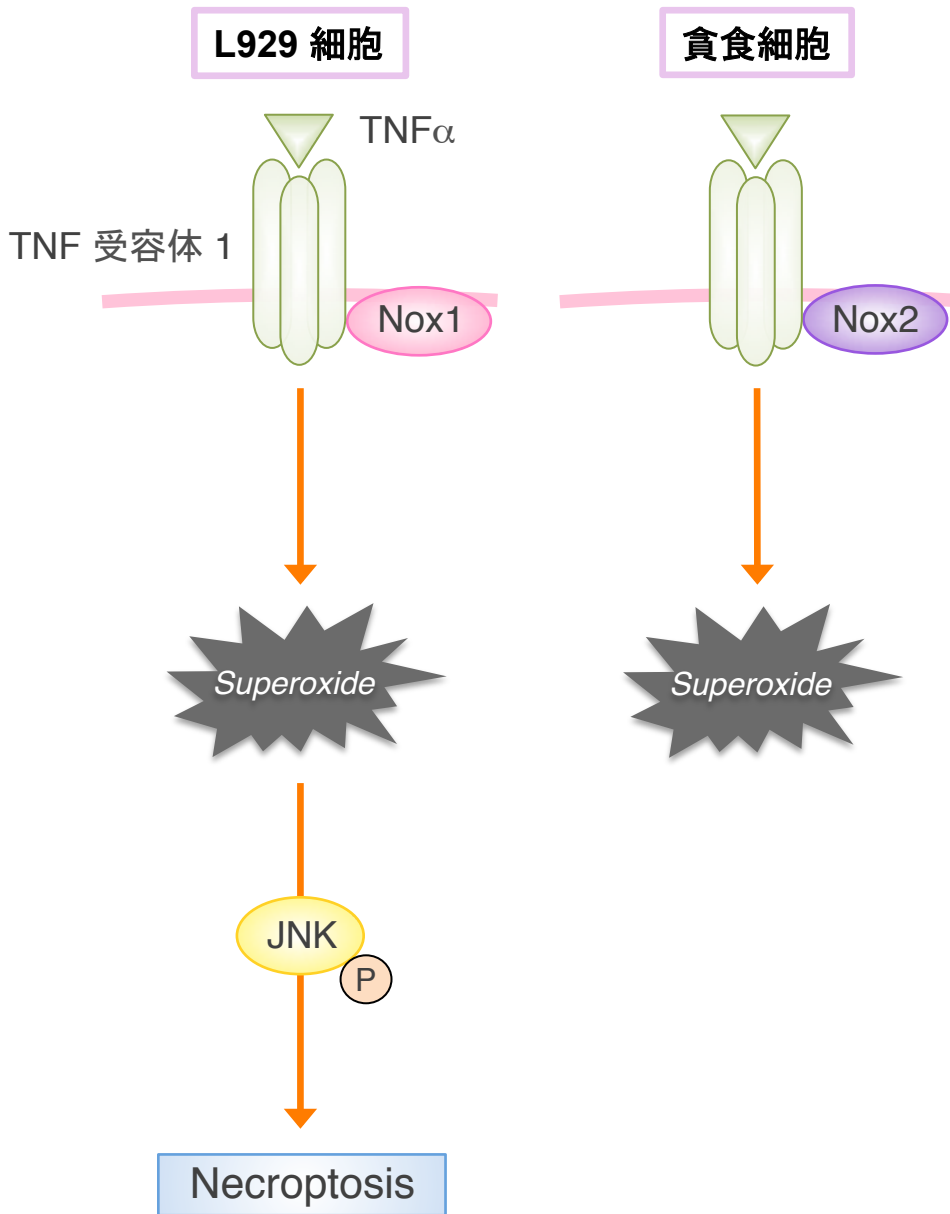
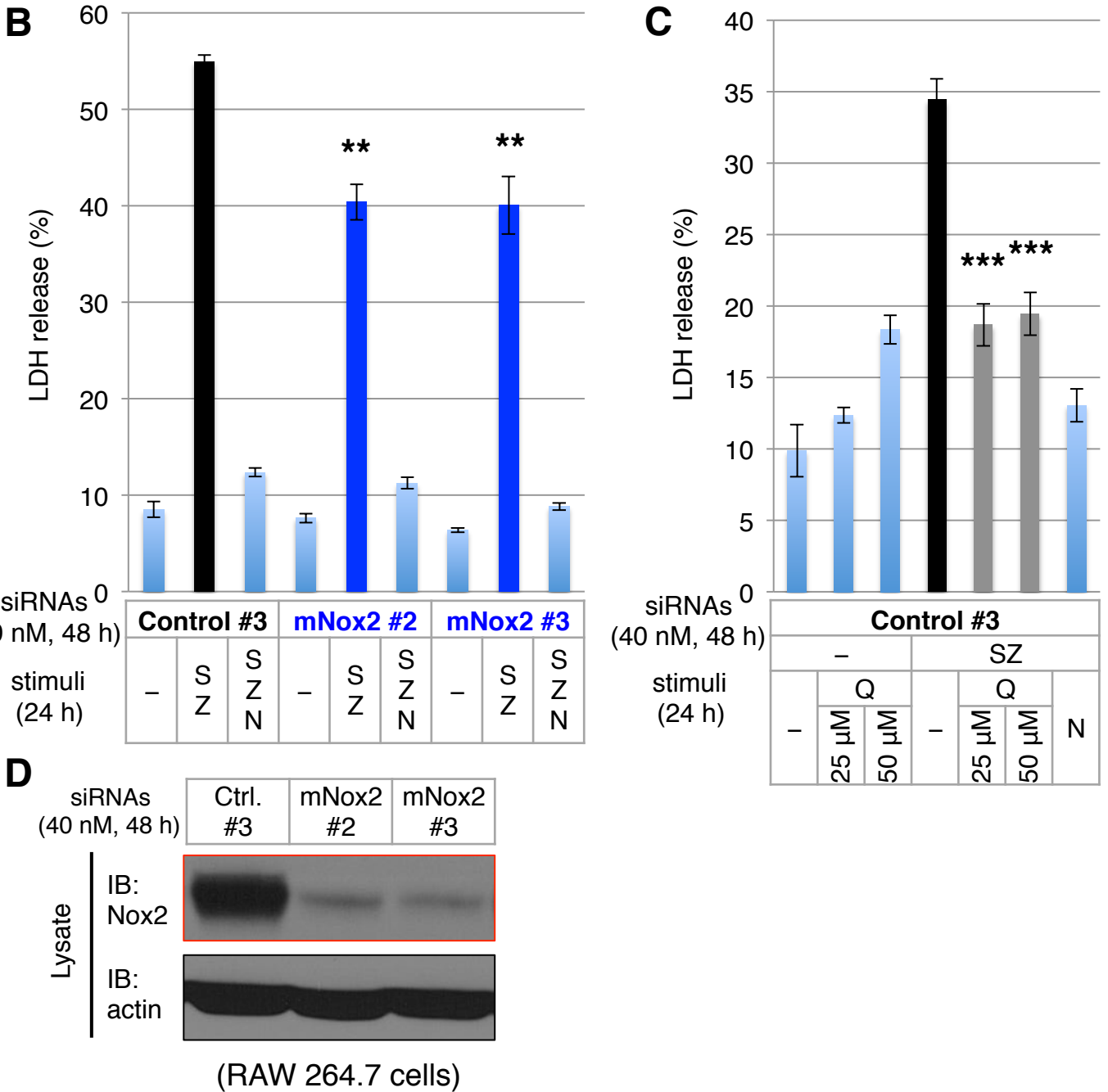


Figure 11 炎症細胞におけるSZ刺激誘導性 Necroptosis および JNK 持続的活性化には、ROS 産生分子である Nox2 が少なくとも部分的に関与する

A ROS 産生を介した Necroptosis 誘導に関する報告内容の模式図。  
(Kim et al., *Mol. Cell*, 2007 ; Frey et al., *Circulation Research*, 2002)

# 細胞死

(細胞上清中への LDH 放出量を指標とする)



**Figure 11** 炎症細胞における SZ 刺激誘導性 Necroptosis および JNK 持続的活性化には、ROS 産生分子である Nox2 が少なくとも部分的に関与する

**B, C** Smac-mimetic + Z-VAD-fmk 刺激を RAW 264.7 細胞に処置したさいの、Nox2 発現抑制下およびラジカル阻害剤 t-BHQ 同時処置下における細胞死について、細胞上清中への LDH 放出量を指標として定量を行った。

S : Smac-mimetic (50 nM), Z : Z-VAD-fmk (10  $\mu$ M), N : Necrostatin-1 (10  $\mu$ M),

Q ; t-BHQ (the indicated concentrations)

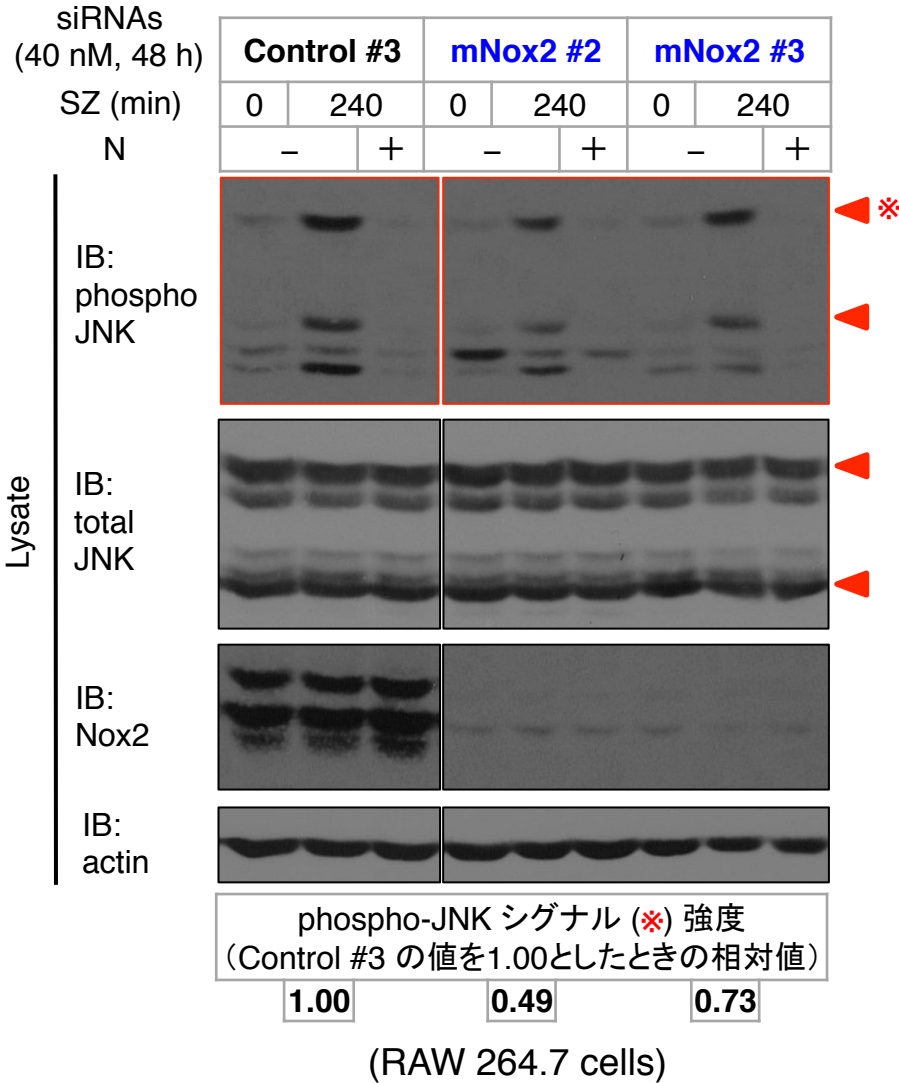
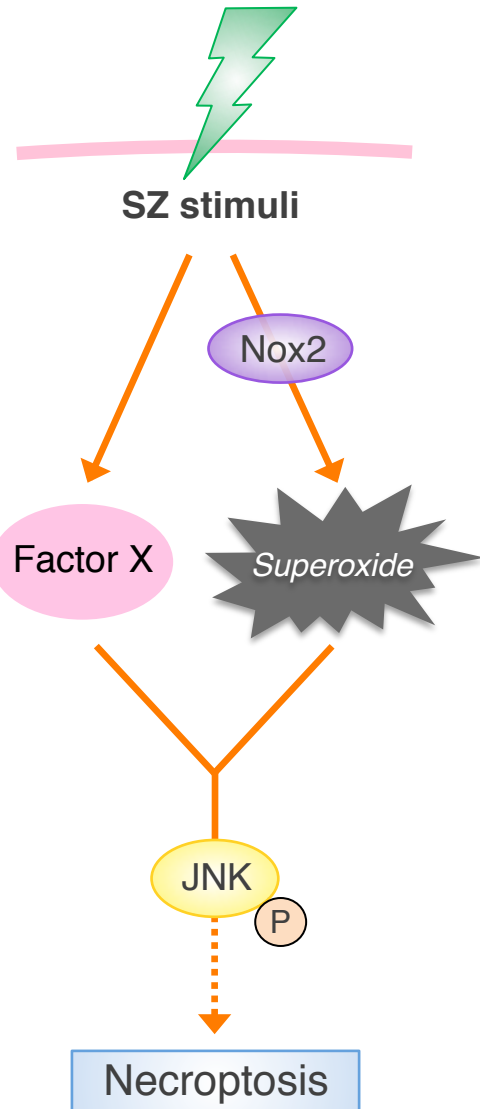
Error bars indicate means  $\pm$  SEM (n=3 respectively).

\*\*p<0.01, \*\*\*p<0.01 vs. Control #3 (SZ) by one-way ANOVA with Dunnett's post-hoc test

**D** 本実験系での RAW 264.7 細胞における Nox2 発現抑制効果を、イムノブロットにより確認した。

**E****JNK 活性化**

(JNK リン酸化シグナルを指標とする)

**F**

**Figure 11** 炎症細胞における SZ 刺激誘導性 Necroptosis および JNK 持続的活性化には、ROS 産生分子である Nox2 が少なくとも部分的に関与する

**E** Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激を RAW 264.7 細胞に処置したさいの、Nox2 発現抑制下での JNK 持続的活性化を、JNK リン酸化シグナルを指標としたイムノプロットにより検討した。

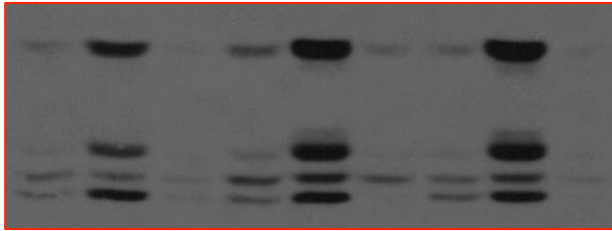
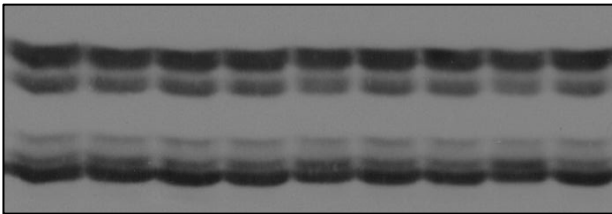
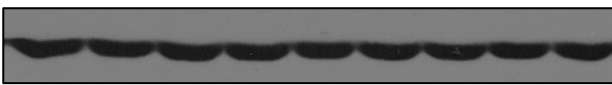
**F** B-D で明らかにした、シグナル伝達経路の模式図。

**G****JNK 活性化**

(JNK リン酸化シグナルを指標とする)

siRNAs  
(40 nM, 48 h)

SZ (min)	Control #3		mKLHDC10 #2		mKLHDC10 #3	
	0	240	0	240	0	240
N	-	+	-	+	-	+

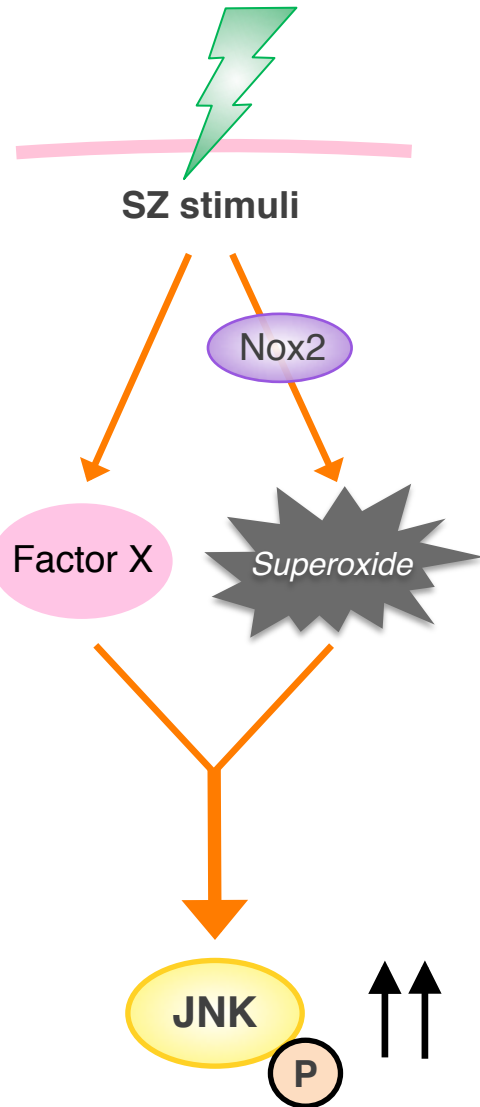
IB:  
phospho  
JNKIB:  
total  
JNKIB:  
actinphospho-JNK シグナル (\*) 強度  
(Control #3 の値を1.00としたときの相対値)

1.00

1.55

1.60

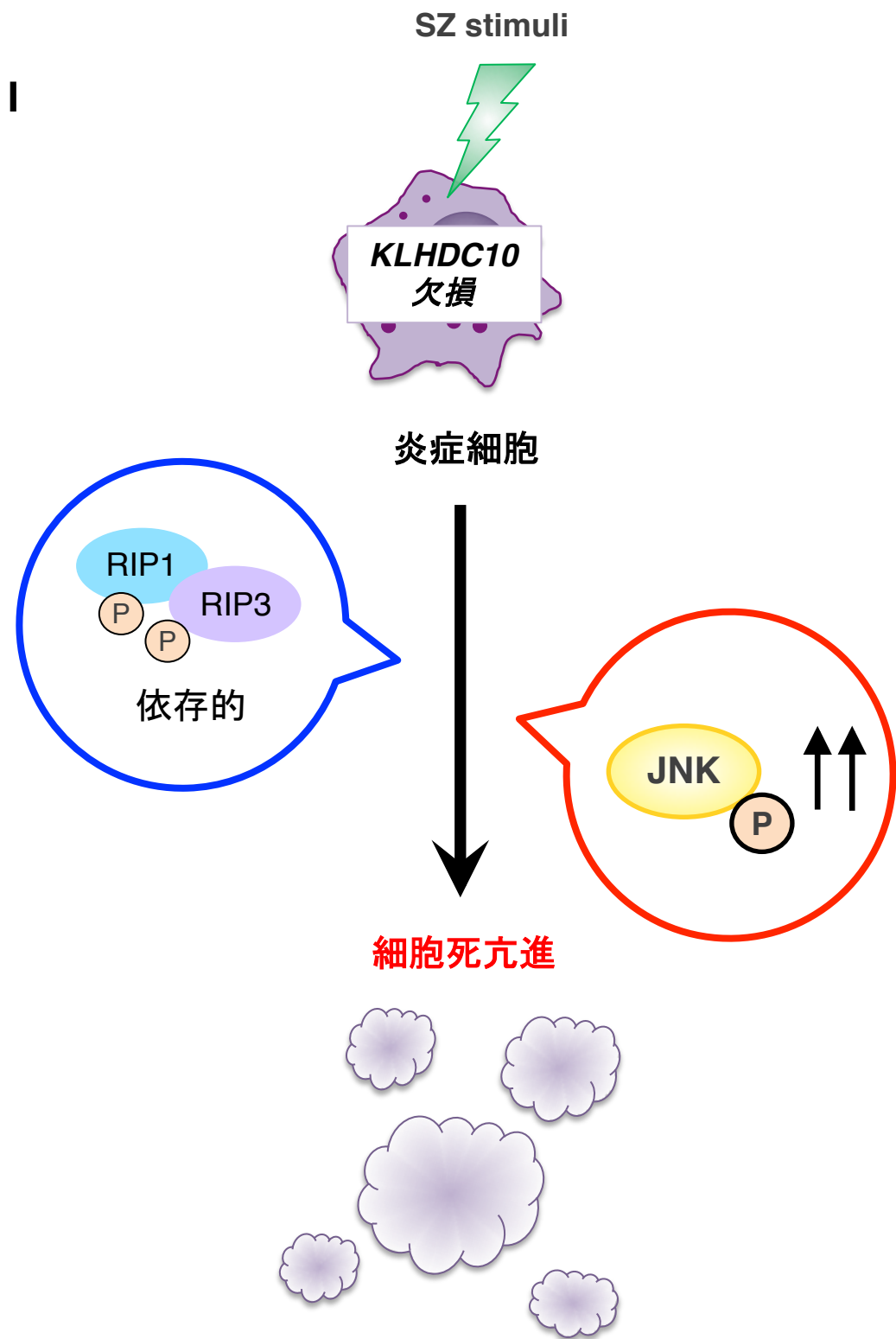
(RAW 264.7 cells)

**H**

**Figure 11** 炎症細胞における SZ 刺激誘導性 Necroptosis および JNK 持続的活性化には、ROS 産生分子である Nox2 が少なくとも部分的に関与する

**G** Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激を RAW 264.7 細胞に処置したさいの、KLHDC 発現抑制下での JNK 持続的活性化を、JNK リン酸化シグナルを指標としたイムノブロットにより検討した。

**H** F で明らかにした、シグナル伝達経路の模式図。



**Figure 11** 炎症細胞における SZ 刺激誘導性 Necroptosis および JNK 持続的活性化には、ROS 産生分子である Nox2 が少なくとも部分的に関与する

I 本 Figure で明らかにした、炎症細胞における KLHDC10 欠損下での 細胞死亢進に関与するシグナル伝達経路の模式図.

KLHDC10 の TNF $\alpha$  誘導 SIRSモデル,  
炎症細胞での細胞死およびシグナル伝達における新規機能

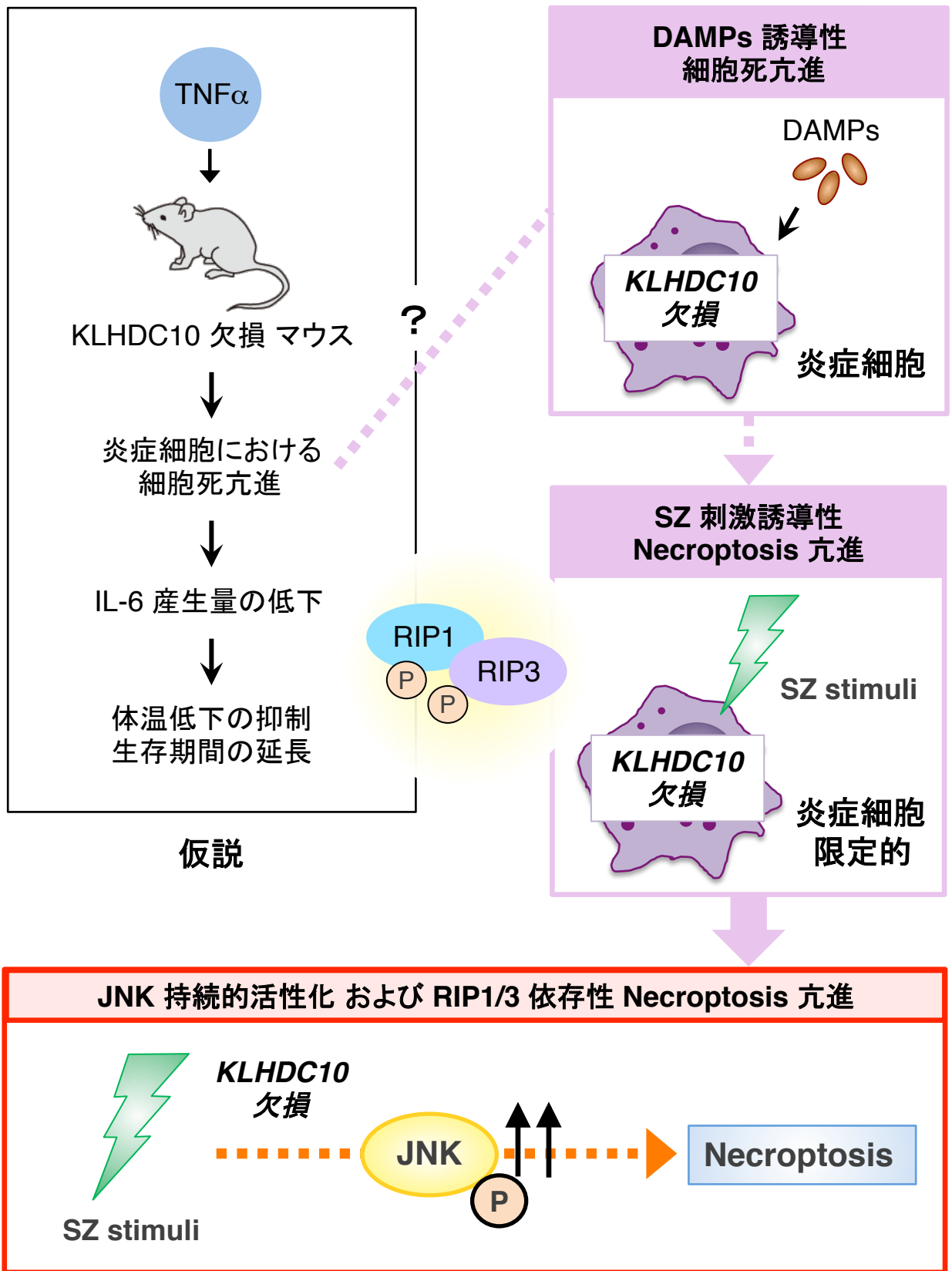
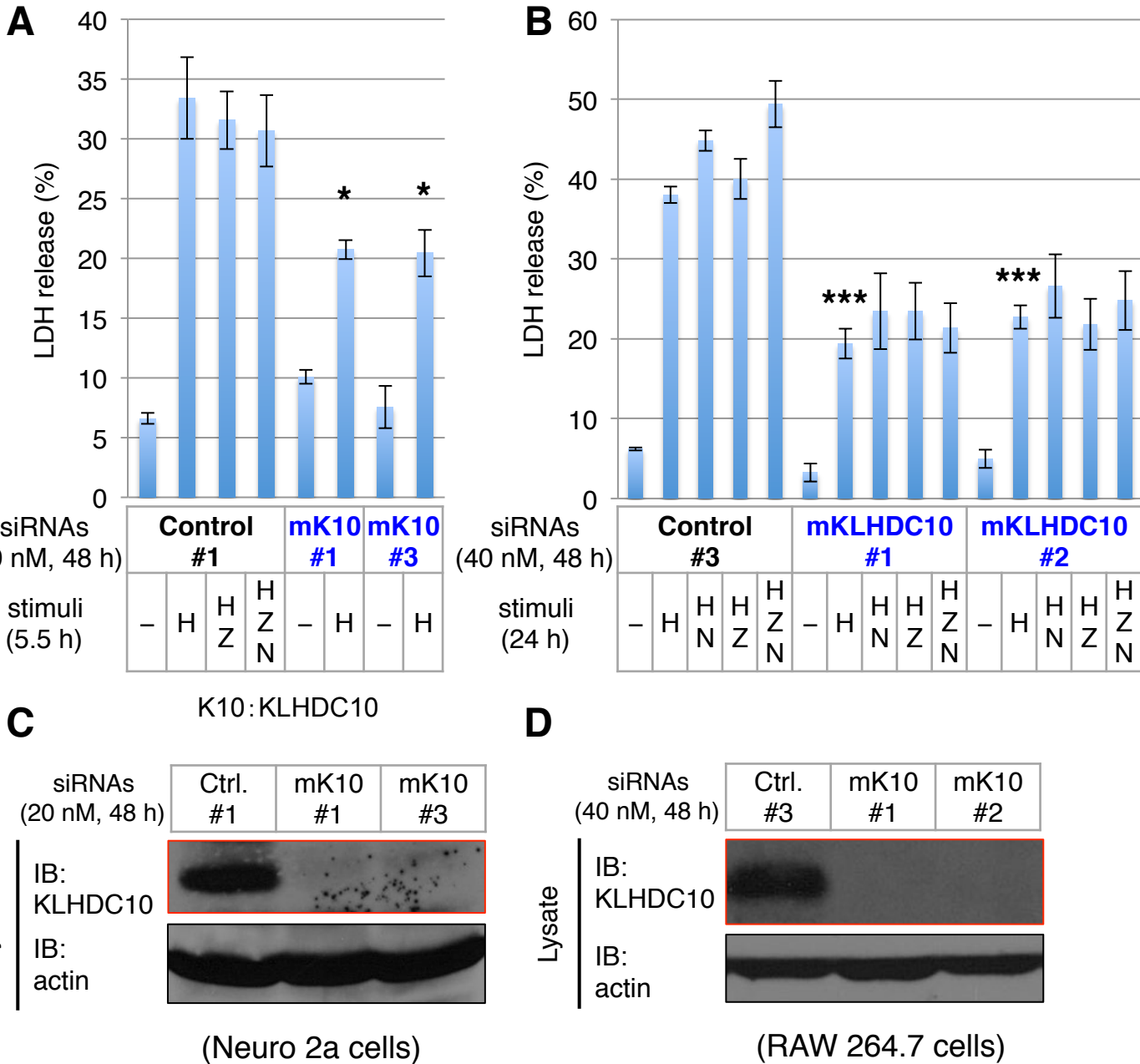


Figure 12 本研究の総括: KLHDC10 の TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルにおける新規機能



# 細胞死

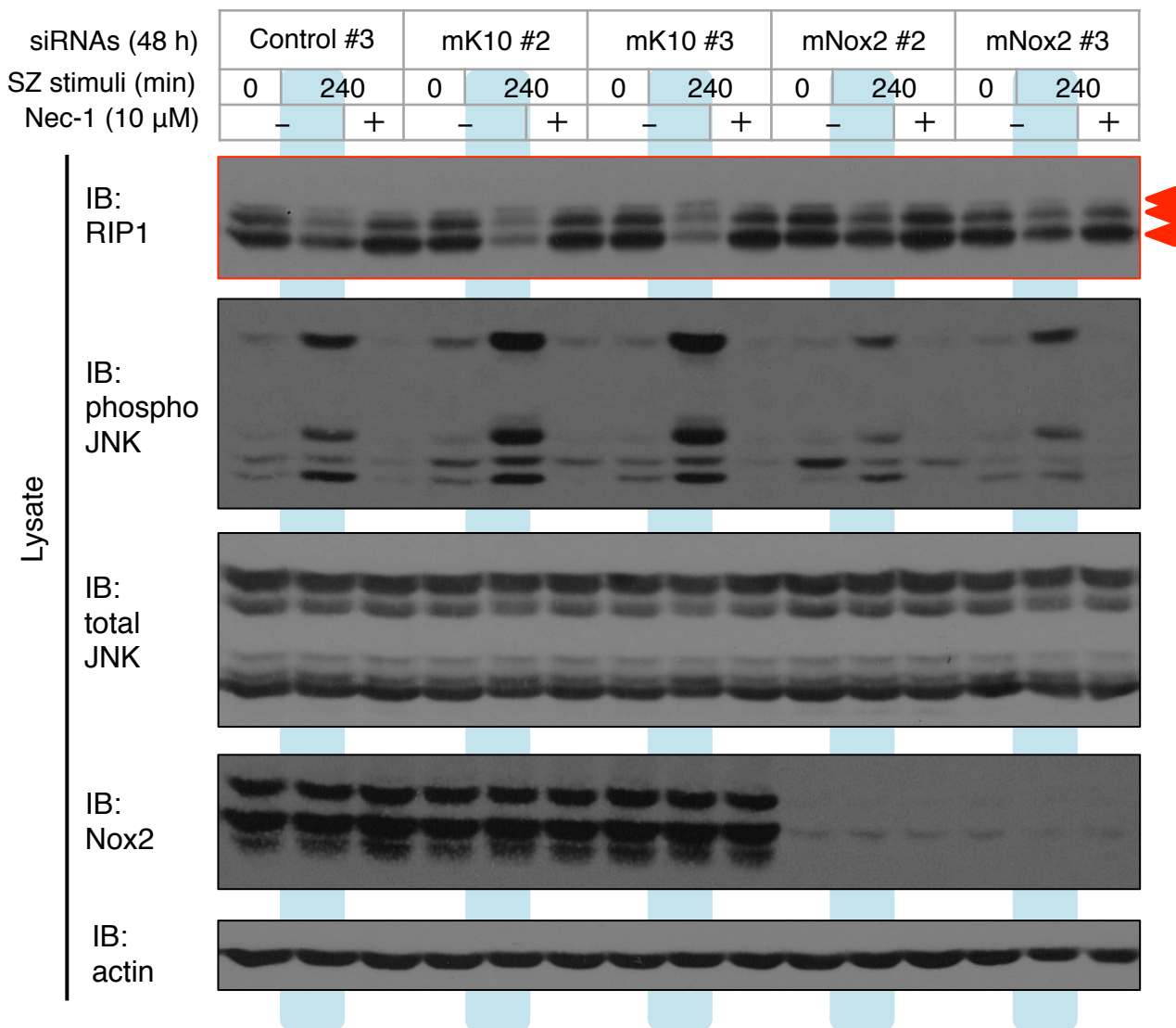
(細胞上清中への LDH 放出量を指標とする)



Sup. Figure 1 KLHDC10 発現抑制により、過酸化水素誘導性細胞死は減弱する

**A, B**  $H_2O_2$  および  $H_2O_2 + Z-VAD-fmk$  刺激を Neuro 2a 細胞 (A), RAW 264.7 細胞 (B), にそれぞれ処置したさいの, KLHDC10 発現抑制下における細胞死について, 細胞上清中への LDH 放出量を指標として定量を行った.  
 H :  $H_2O_2$  (A : 1 mM, B : 0.4 mM), Z : Z-VAD-fmk (10  $\mu$ M), N : Necrostatin-1 (10  $\mu$ M)  
 Error bars indicate means  $\pm$  SEM (n=3 respectively).  
 \*p<0.05 vs. Control #3 (H), \*\*\*p<0.001 vs. Control #3 (H)  
 each by one-way ANOVA with Dunnette's post-hoc test

**C, D** 本実験系での Neuro 2a 細胞 (C), RAW 264.7 細胞 (D) における KLHDC10 発現抑制効果を, イムノブロットによりそれぞれ確認した.



K10: KLHDC10

(RAW 264.7 cells)

**Sup. Figure 2 KLHDC10 発現抑制により, SZ 刺激誘導性の RIP1 バンド変化が亢進する**

Smac-mimetic+Z-VAD-fmk 刺激を RAW 264.7 細胞に処置したさいの, KLHDC10 および Nox2 発現抑制下での RIP1 バンド変化を免疫ブロットにより検討した.

分類	分子・機能		In vivo 検討法		表現型	文献
RIP1/3 依存性 Necroptosis	RIP1 kinase 活性		活性阻害剤投与		耐性	Duprez et al., <i>Immunity</i> , 2012
	RIP3		欠損マウス		耐性	
	RIP1 kinase 活性		ノックインマウス		耐性	Newton et al., <i>Science</i> , 2014 ; Polykratis et al., <i>J. Immunol.</i> , 2014
	RIP3		欠損マウス		耐性	
Necroptosis および Apoptosis	IKK $\alpha$ / $\beta$	-	活性 阻害剤 投与	-	耐性	Donlinger et al., <i>Mol. Cell</i> , 2015
		+RIP1 kinase 活性		+ノック インマ ウス, 活性 阻害剤 投与	上記が キャンセル	
		+RIP3		欠損マ ウス		
Apoptosis	Glucocorticoid receptor (GR) dimer 化		dimer 形成阻害 マウス(*1 i.p.)		感受性	Vandevyver et al., <i>JCI.</i> , 2002
	Caspase 1, 3, 7 活性		欠損マウス		変化なし	Duprez et al., <i>Immunity</i> , 2012
生理活性物質 と ROS	Caspase 1, 3, 4, 7, 8 活性	-	活性 阻害剤 投与	-	感受性	Cauwels et al., <i>Nat. Immunol.</i> , 2003
		+ROS		+阻害 剤投与	上記が キャンセル	
		+cPLA2		+阻害 剤投与		
		+PAF		+阻害 剤投与		
サイトカイン	IL-1		受容体 アンタゴニスト投与		耐性	Everaerd et al., <i>J. Immunol.</i> , 1994
	IL-6		抗体投与		耐性	Starnes et al., <i>J. Immunol.</i> , 1990
	IL-17		受容体欠損マウス, 抗体投与		耐性	Takahashi et al., <i>JEM.</i> , 2008
	IFN- $\alpha$ , $\beta$		各受容体の 単独欠損マウス (*1 i.p.)		耐性	Huys et al., <i>JEM.</i> , 2009
NO	N <sup>G</sup> -Methyl-L-arginine		投与(*2 イヌ)		耐性	Kilbourn et al., <i>PNAS.</i> , 1990
	sGC		阻害剤投与		耐性	Cauwels et al., <i>Immunity</i> , 2000 ; Cauwels et al., <i>Nat. Immunol.</i> , 2003
	iNOS		欠損マウス, 阻害剤投与		耐性	
熱ショック タンパク質	HSP70		発現 誘導	-	耐性	Van Molle et al., <i>Immunity</i> , 2002
				+欠損 マウス	上記が キャンセル	
<b>ケルヒリピート タンパク質</b>	<b>KLHDC10</b>		<b>欠損マウス</b>		<b>耐性</b>	<b>本論文</b>

**Table 1 TNF $\alpha$  誘導性 SIRS モデルに関する文献**

それぞれ, \*1 以外は i.v., \*2 以外はマウスによる検討である.

## 【謝辞】

本研究を行うにあたり、7年間の長きにわたりご指導とご鞭撻をいただきました、  
東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 一條 秀憲 教授  
に深く感謝いたします。

本研究に関して、博士発表においてご指摘をいただき、本博士論文の審査をもご快諾  
いただきました、

東京大学 大学院薬学系研究科 分子生物学教室 後藤 由季子 教授

同 遺伝学教室 三浦 正幸 教授

同 微生物薬品化学教室 垣内 力 准教授

同 薬品作用学教室 小山 隆太 准教授

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、直接のご指導をいただき、研究方針に関して日夜多くのご教  
示をいただきました、

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 関根 史織 助教

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、多くのご教示とご指摘をいただきました、

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室 名黒 功 講師

同 服部 一輝 特任助教

同 本間 謙吾 特任助教

同 渡邊 謙吾 学振特別研究員

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり，研究内容に関する多くのご助言と励ましをいただきました，  
University of Cambridge, Cambridge Institute for Medical Research

関根 悠介 研究員

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり，実験手法および研究の進め方を基礎から教えてくださり，温かい励ましをいただきました，

宮崎大学 医学部 機能制御学講座 機能生化学分野 西頭 英起 教授

同 門脇 寿枝 助教

University of Oxford, Ludwig Institute for Cancer Research 藤澤 貴央 研究員

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり，ご指導とご教示をいただきました，

長崎大学 大学院医歯薬学総合研究科 生命薬科学専攻 細胞制御学分野

武田 弘資 教授

東北大学 大学院薬学系研究科 衛生化学分野 松沢 厚 教授

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり，ご助言をいただき，また様々な面で懇意にさせていただきました，

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野 丸山 剛 助教

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 病態代謝解析学分野 丸山 順一 助教

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、同期として、多くの刺激と励ましを与えてくださいました、

荒木 利博 修士

佐藤 剛裕 修士

早川 亮一 修士

渡邊 謙吾 博士

に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、毎日の研究生活を励ましてくださり、ご助言とご協力をいただきました、

関根グループのみなさま

金丸 雄祐さん、菅原 祥さん

に深く感謝いたします。

最後になりましたが、今日に至るまで研究生活を温かく見守ってくださいました、

巽 圭子 学術支援専門職員 をはじめ、

東京大学 大学院薬学系研究科 細胞情報学教室のみなさま

に心より感謝いたします。

平成 28 年 1 月 8 日