みにれびゅう

cFLIP の生体の恒常性維持における役割

中野　裕康

1.　はじめに

これまでの研究から転写因子 NF-κB はさまざまな標的遺伝子の発現を介して細胞死を抑制することで，生体の恒常性維持に関与していることが明らかにされてきている[1]（**図 1**）．たとえば，NF-κB の活性化に必須の遺伝子である *Nemo* の組織特異的な遺伝子欠損マウスの解析から，*Nemo* を欠損した腸上皮細胞，肝細胞，あるいはケラチノサイトはアポトーシスが亢進し，出生後しばらくして強い炎症が惹起されることが明らかにされた[1]．これまで NF-κB の細胞死抑制に中心的な役割を果たす分子が cellular FLICE-inhibitory protein（cFLIP）であることを我々は *in vitro* の実験から提唱してきた．マウスの個体レベルでも cFLIP が細胞死抑制に中心的な役割を果たしていることが最近の組織特異的 *cFlip* 欠損マウスの解析から明らかとなった．

2.　cFLIP の構造と機能

cFLIP は tumor necrosis factor α（TNFα）や Fas リガンド（FasL）などにより活性化されるイニシエーターカスパーゼであるカスパーゼ 8 と構造的には非常に類似しているが，酵素活性中心に変異を有することからカスパーゼ 8 と会合し，アポトーシスを抑制する因子である（**図 2**）．*cFlip* はオルタナティブスプライシングにより $cFLIP_L$ と $cFLIP_s$ の 2 種類のタンパク質を発現する．cFLIP の発現量は細胞質内で比較的低く保たれており，細胞の種類によっては NF-κB 依存性に発現が誘導されることが知られている．さらに，我々や Karin らのグループは NF-κB の活性化が cFLIP のタンパク質の安定化に関与していることをこれまでに報告してきた[2,3]．

東邦大学医学部医学科生化学講座（〒143-8540　東京都大田区大森西 5-21-16）

A role for cFLIP in maintaining tissue homeostasis

Hiroyasu Nakano（Department of Biochemistry, Toho University School of Medicine, 5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan）

3.　cFLIP と計画的ネクローシス

全身性の *cFlip* 欠損マウスは 2000 年に Yeh らにより作製されたが，驚いたことに胎生 10.5 日に致死となることが明らかとなった[4]．これまでに報告されたさまざまな NF-κB コンポーネントの欠損マウスは，胎生 12.5～14.5 日の間に肝細胞のアポトーシスが亢進した結果，胎生致死となることが報告されており[1]，*cFlip* 欠損マウスのこの表現型は NF-κB のいずれの欠損マウスの表現型よりも重篤なものであった．興味深いことにデス受容体を介するアポトーシス誘導に関与する分子である *Fadd* や *Caspase 8* の全身性の欠損マウスも胎生 10.5 日に致死となることが報告されており，これらの 3 種類の分子はデス受容体により誘導されるアポトーシスの実行という機能以外に別の機能を有しており，その機能が欠損したためにこのような早期の致死的な表現型を呈していると考えられてきた．最近になり *Caspase 8* や *Fadd* の欠損マウスの致死的な表現型は *Ripk1* や *Ripk3* と呼ばれるキナーゼとの二重欠損マウスを作製することで，レスキューされることが明らかとなった[5~7]．その原因は *Caspase 8* や *Fadd* が欠損することで胎生期に計画的ネクローシスが亢進してしまい胎生致死になること，FADD-Caspase 8 依存性のシグナルが RIPK1 や RIPK3 の活性化を通常では抑制しており，その結果個体発生が正常に進行するということが明らかにされた．さらにその後の解析から *cFlip* 欠損マウスは *Caspase 8* や *Fadd* の欠損マウスとは異なり，*Ripk3* 欠損マウスと交配するだけでは不十分であり，*cFlip*/*Ripk3*/*Caspase 8* の三重欠損マウスを作製して初めて出生してくることから，少なくとも胎生期において cFLIP はアポトーシスと計画的ネクローシスの両者をブロックしていることが明らかとなった．さらにアポトーシス経路と計画的ネクローシス系路のブロックされた *cFlip*/*Ripk3*/*Caspase 8* の三重欠損マウスは週齢を経るにつれてリンパ節腫大や自己抗体産生などの自己免疫疾患を自然発症してくることが判明した[8]．

4.　血球系特異的 *cFlip* 欠損マウスの解析

このような研究の背景と前後してリンパ球特異的 *cFlip*

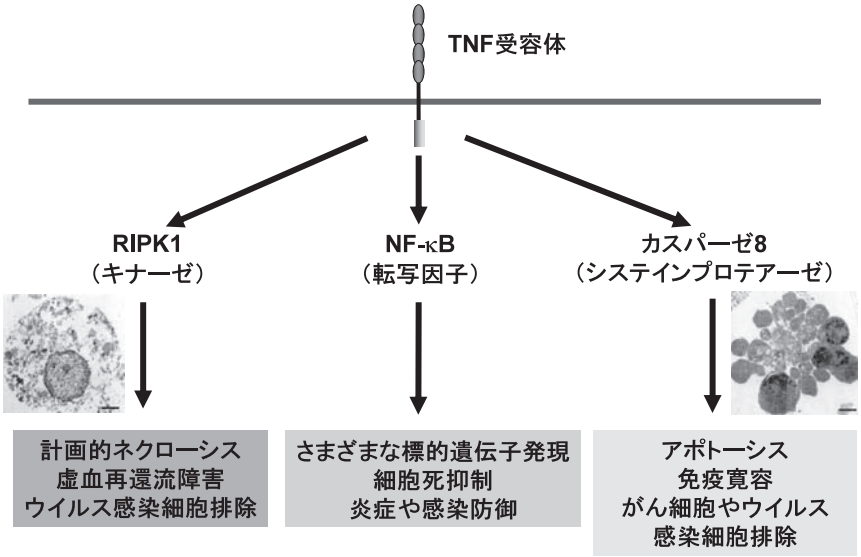
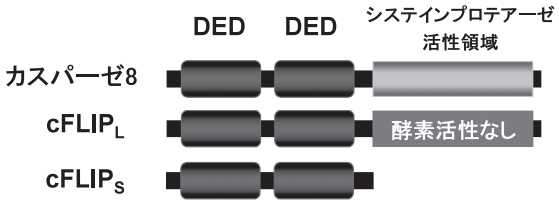


図 1　TNFα により誘導されるシグナル伝達経路
TNFα が TNF 受容体に会合することで，NF-κB の活性化が誘導され，さまざまな標的遺伝子の発現を介して，細胞生存や炎症や感染防御に関与する．一方で，カスパーゼ 8 を介して細胞にアポトーシスが誘導される．この両者の経路のバランスにより細胞の生と死が決定されると考えられてきた．最近になり，RIPK1 と呼ばれるキナーゼ依存性に計画的ネクローシスが誘導されることが明らかにされた．



	アポトーシス	計画的ネクローシス
カスパーゼ8	促進	?
$cFLIP_L$	抑制	抑制
$cFLIP_S$	抑制	促進

図 2　cFLIP の構造と機能
cFlip はオルタナティブスプライシングにより $cFLIP_L$ および $cFLIP_S$ の 2 種類のタンパク質を産生する．$cFLIP_L$ はカスパーゼ 8 に構造的に非常に類似しているが，酵素の活性中心に変異があるために，システインプロテアーゼを発揮せず，カスパーゼ 8 と会合することで，アポトーシスを抑制する．最近の研究から $cFLIP_L$ は計画的ネクローシスも抑制するが，$cFLIP_S$ はアポトーシスを抑制するが，　計画的ネクローシスは促進することが示されている．

欠損マウスが樹立された．T 細胞特異的 *cFlip* 欠損マウスではダブルポジティブ細胞からシングルポジティブ細胞へと移行する過程でアポトーシスの亢進のために，胸腺および末梢組織における CD4 や CD8 シングルポジティブ細胞が減少する[9]．同様に B 細胞特異的 *cFlip* 欠損マウスでは，脾臓やリンパ節における B 細胞の細胞数の減少と，アポトーシスの亢進がみられる[10]．一方で，マクロファージ特異的 *cFlip* 欠損マウスは非常に複雑な表現型を呈しており，マクロファージの成熟が障害され，末梢血における好中球や単球が増加し，末梢組織への多数の好中球の浸潤が認められた[11]．

5.　腸上皮細胞特異的 *cFlip* 欠損マウス

NF-κB の細胞死抑制に中心的な役割を果たす分子が cFLIP であるという我々の仮説を *in vivo* で検証するために，NF-κB の標的臓器の一つである腸上皮細胞で特異的に *cFlip* を欠損するマウスを作製した．このマウスはメンデルの法則に従って出生してきたものの，生後 2 日以内にほぼ全個体が死亡することが明らかとなった[12]．出生直後の腸上皮細胞特異的 *cFlip* 欠損マウスの腹部は黒褐色を呈しており，著明な消化管出血が生じていることが明らかとなった．組織学的な検討では，正常の腸絨毛はほぼ完全に消失し，核の凝集した多数の上皮細胞が認められ，これらの細胞はアポトーシスに陥っていると考えられた．さらに

活性化型カスパーゼ3染色，および電子顕微鏡の観察により腸上皮細胞はアポトーシスだけではなく，ネクローシスにも陥っていることが明らかとなった．以上の結果から，cFLIPは腸上皮細胞のアポトーシスおよび計画的なネクローシスを抑制することで，腸管の恒常性維持に必須の役割を果たしていることが初めて明らかとなった．また腸管でのTNFαのmRNAの発現が上昇していること，腸上皮細胞特異的*cFlip*欠損マウスの致死的な表現型が*Tnfr1*欠損マウスと交配することで一部のマウスはレスキューされ長期生存したことから，腸上皮細胞の細胞死にはTNFαシグナルが関与していることが示された．さらに興味深いことに*cFlip*；*Tnfr1*二重欠損マウスの一部は長期生存し，腸管の短縮，腸間膜リンパ節の腫大，脱肛などの典型的な慢性腸炎を発症することが明らかとなった（未発表データ）．このことは，*cFlip*欠損腸上皮細胞の細胞死誘導にはTNFR1以外のシグナルも関与していることを示している．今後そのシグナルを同定することが重要な課題と考えられる．

一方で，GreenらはTamoxifenという薬剤誘導性に腸上皮細胞で*cFlip*を欠損させることのできるマウスを樹立し，成獣になってから腸上皮細胞特異的に*cFlip*を欠損させた場合にも重篤な腸炎が発症し，数週間以内には死亡することを報告している[13]．

6. 肝細胞特異的*cFlip*欠損マウス

最初に報告された肝細胞特異的*cFlip*欠損マウス（*cFlip-flox/flox*マウスと*Albumin-Cre*マウスを交配したマウス）の表現型は腸上皮特異的*cFlip*欠損マウスと比較して，非常にマイルドなものであった[14]．すなわち，正常にマウスは成長するが，Concanavalin A投与や抗Fas抗体投与により誘導される肝炎に対して感受性が亢進しているという報告であった．我々も同様の現象を見いだしていたが，腸上皮細胞特異的*cFlip*欠損マウスの表現型との乖離に疑問を抱いていた．肝細胞におけるcFLIPのタンパク質レベルの発現を検討したところ，cFLIPは肝細胞で完全に消失していなかったことから，肝細胞特異的*cFlip*欠損マウスのマイルドな表現型の原因としては，cFLIPの肝細胞死抑制への関与が相対的に低いわけではなく，cFLIPの欠損が不十分なためである可能性が残された．そこで，*Albumin-Cre*マウスよりもプロモーターが強力といわれている*Alpha-fetoprotein-Cre*マウスと*cFlipflox/flox*マウスを交配したところ，cFLIPの肝臓における発現は完全に消失し，予想どおり肝細胞のアポトーシスとネクローシスの亢進により生後2日以内に死亡することが明らかとなった．興味深い点は，肝細胞特異的*cFlip*欠損マウスの致死的な表現型は腸管上皮細胞特異的*cFlip*欠損マウスと異なり，*Tnfr1*欠損マウスとの二重欠損マウスでもレスキューされず，TNFαだけでなく，TRAILやFasLなどからのデスシグナルも抑制する必要があると推測された．

7. 皮膚特異的*cFlip*欠損マウス

GreenとLeverkusらの二つのグループから皮膚特異的*cFlip*欠損マウスが最近報告された．薬剤誘導性*cFlip*欠損マウスを用いてケラチノサイトで*cFlip*を欠損させたところケラチノサイトのアポトーシスが亢進し，炎症細胞の浸潤が認められた[13,15]．さらにこの皮膚の表現型も抗TNFα中和抗体の投与により著明に改善することから，腸上皮細胞と同様にTNFR1シグナルがケラチノサイトの細胞死誘導には重要な役割を果たしていることが明らかとなった．一方で，先天的にケラチノサイトで*cFlip*を欠損させたマウスは胎生致死となることも同時に報告された．これまでNF-κB活性化因子やNF-κBのコンポーネントのケラチノサイト特異的な欠損マウスの解析では，胎生致死となるマウスの報告はなく，*cFlip*はケラチノサイトの生存にほかのどの因子よりも重要な役割を果たしていることが明らかとなった．興味深いことに細胞死が亢進した*cFlip*欠損マウスの皮膚ではケラチノサイトの増殖や角化の亢進が認められており，どのようなメカニズムにより細胞死に伴い細胞増殖が誘導されているかについては，今後の検討課題であると考えられる．最近Pasparakisらのグループはケラチノサイト特異的な*Ikkb*欠損マウスを解析し，TNFα刺激により活性酸素種（ROS）依存性にMAPキナーゼ経路の一つであるERK経路が持続的に活性化され，その結果IL-24の産生が誘導され，皮膚の炎症と角化の亢進が引き起こされることを報告した[16]．我々は肝炎を用いた系で活性酸素依存性にERK経路の活性化と，それに伴いIL-11の産生が誘導されるという現象をすでに報告しており[17]，これまでに細胞死に伴うMAPキナーゼ経路としてはJNK経路が注目されていたが，ERK経路も重要な役割を果たしていることをこの二つの論文は示している．

8. おわりに

組織特異的*cFlip*欠損マウスの解析から，いずれの組織において*cFlip*を欠損させた場合でもアポトーシスやネクローシスの亢進の結果，非常に重篤な表現型を呈することが明らかとなった．このことはNF-κBによる細胞死抑制に関与する中心的な分子がcFLIPであることの*in vivo*における証明であると考えられる．今後の研究の展望としては，細胞死が亢進した結果，どのようなメカニズムによりその後の炎症や組織修復がもたらされるのか，またある状

況では正常の組織が構築されるのに対して，他の状況では組織のリモデリングを伴う慢性炎症へと至るかについての解析が必要であると考えられる．

1）Pasparakis, M.（2009）*Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 778–788.
2）Nakajima, A., Komazawa-Sakon, S., Takekawa, M., Sasazuki, T., Yeh, W.C., Yagita, H., Okumura, K., & Nakano, H.（2006）*EMBO J.*, **25**, 5549–5559.
3）Chang, L., Kamata, H., Solinas, G., Luo, J.L., Maeda, S., Venuprasad, K., Liu, Y.C., & Karin, M.（2006）*Cell*, **124**, 601–613.
4）Yeh, W.C., Itie, A., Elia, A.J., Ng, M., Shu, H.B., Wakeham, A., Mirtsos, C., Suzuki, N., Bonnard, M., Goeddel, D.V., & Mak, T.W.（2000）*Immunity*, **12**, 633–642.
5）Oberst, A., Dillon, C.P., Weinlich, R., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G.S., & Green, D.R.（2011）*Nature*, **471**, 363–367.
6）Kaiser, W.J., Upton, J.W., Long, A.B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L.P., Hakem, R., Caspary, T., & Mocarski, E.S.（2011）*Nature*, **471**, 368–372.
7）Welz, P.S., Wullaert, A., Vlantis, K., Kondylis, V., Fernandez-Majada, V., Ermolaeva, M., Kirsch, P., Sterner-Kock, A., van Loo, G., & Pasparakis, M.（2011）*Nature*, **477**, 330–334.
8）Dillon, C.P., Oberst, A., Weinlich, R., Janke, L.J., Kang, T.B., Ben-Moshe, T., Mak, T.W., Wallach, D., & Green, D.R.（2012）*Cell Rep.*, **1**, 401–407.
9）Zhang, N. & He, Y.W.（2005）*J. Exp. Med.*, **202**, 395–404.
10）Zhang, H., Rosenberg, S., Coffey, F.J., He, Y.W., Manser, T., Hardy, R.R., & Zhang, J.（2009）*J. Immunol.*, **182**, 207–215.
11）Gordy, C., Pua, H., Sempowski, G.D., & He, Y.W.（2011）*Blood*, **117**, 618–629.
12）Piao, X., Komazawa-Sakon, S., Nishina, T., Koike, M., Piao, J. H., Ehlken, H., Kurihara, H., Hara, M., Van Rooijen, N., Schutz, G., Ohmuraya, M., Uchiyama, Y., Yagita, H., Okumura, K., He, Y.W., & Nakano, H.,（2012）*Sci. Signal.*, **5**, ra93.
13）Weinlich, R., Oberst, A., Dillon, C.P., Janke, L.J., Milasta, S., Lukens, J.R., Rodriguez, D.A., Gurung, P., Savage, C., Kanneganti, T.D., & Green, D.R.,（2013）*Cell Rep.*, **5**, 340–348.
14）Schattenberg, J.M., Zimmermann, T., Worns, M., Sprinzl, M.F., Kreft, A., Kohl, T., Nagel, M., Siebler, J., Bergkamen, H.S., He, Y.W., Galle, P.R., & Schuchmann, M.（2011）*J. Hepatol.*, **55**, 1272–1280.
15）Panayotova-Dimitrova, D., Feoktistova, M., Ploesser, M., Kellert, B., Hupe, M., Horn, S., Makarov, R., Jensen, F., Porubsky, S., Schmieder, A., Zenclussen, A.C., Marx, A., Kerstan, A., Geserick, P., He, Y.W., & Leverkus, M.（2013）*Cell Rep.*, **5**, 397–408.
16）Kumari, S., Bonnet, M.C., Ulvmar, M.H., Wolk, K., Karagianni, N., Witte, E., Uthoff-Hachenberg, C., Renauld, J. C., Kollias, G., Toftgard, R., Sabat, R., Pasparakis, M., & Haase, I.（2013）*Immunity*, **39**, 899–911.
17）Nishina, T., Komazawa-Sakon, S., Yanaka, S., Piao, X., Zheng, D.M., Piao, J.H., Kojima, Y., Yamashina, S., Sano, E., Putoczki, T., Doi, T., Ueno, T., Ezaki, J., Ushio, H., Ernst, M., Tsumoto, K., Okumura, K., & Nakano, H.（2012）*Sci. Signal.*, **5**, ra5.

著者寸描

●中野裕康（なかの　ひろやす）

東邦大学医学部医学科生化学講座教授．医学博士．

■略歴　1960年茨城県に生る．84年千葉大学医学部卒業．95年同大学院医学研究科博士課程（内科系）修了，医学博士．95年順天堂大学医学部助手（免疫学）．2000～03年戦略的創造研究推進事業「さきがけ」PRESTO研究員．01年同講師，07年より同准教授．14年より東邦大学医学部医学科生化学講座教授．

■研究テーマと抱負　細胞死がどのようにして生体の恒常性維持に関与するのか，また細胞死の制御異常がどのようなメカニズムでさまざまな疾患の発病に関与するかを明らかにしたいと思っています．

■ホームページ　http://www.med.toho-u.ac.jp/lab/lab_biochemi/lab_biochemi.html

■趣味　MLBテレビ観戦，読書，数独．