

令和 2 年 3 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2014～2018

課題番号：26114003

研究課題名(和文) 表皮組織のバリア機能を維持する細胞競合因子の同定と作用機序の解明

研究課題名(英文) Identification of cell competition mediators that maintain barrier function of epidermis

研究代表者

倉永 英里奈(Kuranaga, Erina)

東北大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：90376591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 49,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ショウジョウバエ蛹期にみられる上皮細胞再構築の過程を生理的細胞競合の一例と捉え、遺伝学的を用いることで非自立的細胞死を誘導する因子の探索を実施した。勝者側の因子として血管内皮細胞増殖因子のショウジョウバエホモログであるPvf1を同定した。敗者側の因子として、小胞輸送に關与するミオシンVIが同定された。その他の上皮細胞集団における細胞競合様現象も解析の対象に入れて研究し、細胞競合の解析を可能にする実験手法立ち上げて論文として報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの細胞競合研究には人工的な遺伝子操作が必須であり、その作製した細胞競合モデルを安定的に解析することによって、制御メカニズムの解明が効率的に行われてきた実績がある。一方で、生理的環境下における細胞競合が關与する生命現象およびその生理的意義に関する研究は未だ稀少である。本研究では、細胞競合の生理的環境下における細胞競合の制御メカニズムを探索し、進化的保存性の高い成長因子と小胞輸送に關与する分子を発見した。本研究で同定された分子が、前がん細胞の排除や上皮細胞の恒常性維持に重要であることが示唆されるため、今後の詳細なメカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we considered the process of epithelial cell remodeling in *Drosophila* during metamorphosis as an example of physiological cell competition, and searched for factors that induce non-autonomous cell death by using genetic screening. Pvf1, a *Drosophila* homolog of vascular endothelial growth factor, was identified as a factor on the winner cell side. As a loser-side factor, myosin VI involved in vesicle transport endocytosis was identified. In addition, we also analyzed cell competition-like phenomena in other epithelial cell populations. We established an experimental material that enables analysis of cell competition in epithelial rearrangement and published it.

研究分野：細胞生物学、発生生物学

キーワード：上皮組織 バリア機能 恒常性維持 細胞死

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

表皮組織の形態形成や維持の過程では、上皮のバリア機能を維持して恒常性を保つため、または過剰な増殖による腫瘍化を防ぐために、その増殖と細胞死の進行を厳密に釣り合わせる必要があると考えられるが、それらを制御するメカニズムについては不明な点が多い。細胞増殖と細胞死が密接に関与する細胞間相互作用として、細胞競合という現象が知られている。細胞競合は、細胞間において増殖能の異なる細胞が隣接している場合に、増殖能の高い細胞が低い細胞に対して細胞非自律的細胞死を誘導する現象として、ショウジョウバエ成虫翅原基をモデルに実証された (Morata & Ripol, 1975)。最近ではマウス原外胚葉でも細胞競合の存在が実証され (Claveria et al, 2013) 種を越えて保存された現象であることが明らかになった。加えて細胞競合は、組織のサイズ制御やがん組織の成長を制御する細胞機能の1つであることが示唆され、注目を集めている。そこで我々は、細胞死と周辺細胞の増殖が協調的に相互作用する生命現象を、細胞競合の *in vivo* モデルとして採用し、ショウジョウバエ遺伝学と生化学及びライブイメージングを駆使してその制御メカニズムを明らかにする。

細胞死と周辺細胞との協調過程を安定的に観察するためのモデルとして、蛹期にみられる「腹部表皮入れ替わり」に注目した。ショウジョウバエの腹部表皮は蛹期において、幼虫期に身体の側端に位置する成虫表皮細胞 (成虫細胞) が増殖し、それまで体表を覆っていた幼虫表皮細胞 (幼虫細胞) が、細胞死実行のキーマediatorであるカスパーゼ依存的に細胞死して入れ替わる。この過程では、増殖している成虫細胞との局所的な相互作用によって幼虫細胞の細胞死が細胞非自律的に誘導されるという、生理的な細胞競合現象の存在が強く示唆される (Nakajima et al, 2011)。一方で細胞競合因子の実態、およびその制御メカニズムについては未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ蛹期表皮入れ替わりを *in vivo* 細胞競合モデルとして採用し、ショウジョウバエ遺伝学 (*in vivo* RNAi スクリーニング) と生化学 (トランスクリプトーム解析) 及びライブイメージングを駆使して、正常発生においてみられる細胞競合を正や負に制御する因子を網羅的に単離・同定することとした。これらの因子の役割と動作機序を遺伝学的およびライブイメージングを用いて解析するとともに、得られた知見を既知のショウジョウバエ細胞競合モデル系に適用してその普遍性を明らかにする。また、正常発生過程においてみられる生命現象をモデルとして解析することで、細胞社会における細胞競合そのものの生理的意義の解明に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) 生理的環境下における細胞競合因子の *in vivo* RNAi スクリーニング

ショウジョウバエ蛹期においてみられる表皮の入れ替わりを指標に、ショウジョウバエ全遺伝子の約9割をカバーする一連の RNAi システムライブラリーを用いた細胞競合因子のスクリーニングを行う。RNAi のターゲットとして、アルゴリズム予測及び、成虫表皮細胞の細胞周期を遺伝学的に停止させた系統と正常系統との比較トランスクリプトーム解析で正常より低下した遺伝子群を選択する。dsRNA の *in vivo* 発現には Gal4-UAS システムを利用する。成虫表皮細胞に特異的に発現するプロモーター制御下で遺伝子ノックダウンを行うことで、成虫表皮細胞で産生される細胞競合因子の遺伝学的スクリーニングを行う。

### (2) 細胞競合制御因子の遺伝学的機能解析と *in vivo* イメージングを用いた動作機序の解明

(1) のスクリーニングで得られた因子群の役割と動作機序を遺伝学的に解析し、細胞競合の分子機構の解明に迫る。解析にあたって必要なツール (ゲノム編集によるノックインや過剰発現系統) を作製する。候補分子が既知の細胞競合に関与する分子群と相互作用するかどうか、人工的な細胞競合モデルを用いて、遺伝学的相関を確認する。また、トランスクリプトーム解析によって得られた情報を解析し、候補遺伝子の選別、検証実験についてさらに遂行する。

### (3) 他の細胞競合モデル系における同定した分子の普遍性の検証

*in vivo* RNAi スクリーニングやトランスクリプトーム解析から同定された分子が、細胞競合現象において普遍的に機能するかどうかを明らかにするため、古典的な細胞競合モデル系および、他の生理的細胞競合現象が観察される上皮組織の系を用いる。細胞競合を誘導した成虫原基において、同定した分子の機能を阻害したときに、細胞競合が抑制されるかどうか調べる。また、他の細胞競合現象が観察される上皮組織において、同定した分子が関与するかどうか検証する。

#### 4. 研究成果

本研究では、ショウジョウバエ蛹期にみられる腹部表皮細胞の入れ替わりを細胞競合の一例と捉え、遺伝学的スクリーニングを用いることで細胞間に介在する非自律的細胞死を誘導する因子の同定を目指している。

(1) RNAi 系統を用いて、成虫細胞（勝者）側で特異的に遺伝子をノックダウンし、遺伝学的スクリーニングを行った。成虫細胞側で機能する分子の同定のため、細胞非自律的に作用する可能性が高い膜局在シグナルや分泌シグナルを有するタンパク質をアルゴリズムに基づいて予測し、スクリーニングのターゲットとした（1226 遺伝子）。一方、幼虫細胞側で機能する分子の同定のため、アポトーシスや上皮極性、細胞骨格系などに関与することが知られている遺伝子をターゲット配列にもつ RNAi 系統（500 系統、200 遺伝子）を用いた。これらの RNAi 系統を用いて、表皮組織特異的に遺伝子ノックダウンを行ったとき、腹部表皮に異常な表現型を示した RNAi 系統を候補遺伝子とした。次に、幼虫細胞のアポトーシス誘導への影響を直接評価するため、表皮入れ替わりの様子を、カスパーゼ活性を検出可能な FRET プローブを用いたライブイメージングで観察した。さらに、幼虫細胞のアポトーシスが実際に抑制された遺伝子について詳細な分子機能の解析を行った。

##### (2-1) 勝者細胞側の細胞競合制御因子の機能解析

勝者（成虫細胞）側で機能する分子として、血小板由来成長因子 PDGF および血管内皮増殖因子 VEGF のホモログで、分泌性タンパク質の Pvf1 を同定した。Pvf1 を成虫細胞特異的にノックダウンすると、表皮入れ替わりとともに、幼虫細胞のカスパーゼの活性化が抑制されたことから、Pvf1 は細胞非自律的に機能することが示唆された。また、Pvf1 の受容体として知られる Pvr を幼虫細胞特異的に阻害すると表皮入れ替わりが遅れることが明らかとなり、本細胞非自律的な細胞死は Pvf1/Pvr シグナルを介していることが示唆された。内在性 Pvf1 を染色可能な抗体を用いて、Pvf1 の発現を観察したところ、Pvf1 は成虫細胞にも幼虫細胞にも観察された。Pvf1 のノックダウンを成虫細胞のみで行ったところ、Pvf1 のシグナルは成虫細胞、幼虫細胞の両方で消失した。この結果より、Pvf1 が成虫細胞で産生され、幼虫細胞に取り込まれることによって、細胞競合に関与することが示唆された（Hayashi et al., 投稿準備中）。

また、本モデルの特徴として、蛹期の決まった時期になると勝者細胞が増殖を開始して敗者細胞を排除することは述べたが、それ以前にも、勝者細胞は敗者細胞と接しているにもかかわらず敗者細胞を排除しない。つまり、Pvf1 が時期特異的細胞競合現象に関与する可能性が示唆されたため、まず、Pvf1 の時空間的発現・局在パターンを観察するために、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムを用いて、蛍光タンパク質 Venus を挿入した Pvf1::venus ノックインショウジョウバエを作製して、さらなる解析を行っている。

##### (2-2) 敗者細胞側の細胞競合制御因子の機能解析

敗者（幼虫細胞）側で機能する分子として、非定型ミオシンである哺乳類ミオシン VI のホモログ jaguar (jar) を同定した。Jar は細胞膜のリモデリングやエンドサイトーシスの制御に関与することが示唆されていることから、エンドサイトーシスを介した細胞競合の制御経路が示唆された。（Hoshika et al., in press）。

##### (3) 他の細胞競合モデル系における同定した分子の普遍性の検証

ショウジョウバエ蛹期の表皮以外の上皮細胞集団における細胞競合様現象を、同定した分子の解析対象として研究を行った。Pvf1 は、既存の細胞競合モデル系において敗者側が貪食される際の因子としてすでに報告されていた。そこで、Pvf1 の他の細胞競合現象における機能を解析するために、生理的細胞競合現象が観察される上皮組織に注目した。生殖器原基を取り囲む上皮細胞集団が移動するタイミングでは、集団内に一定の割合で細胞死が観察され、その細胞死を抑制すると移動が抑制される。この細胞死は、移動する細胞集団と移動しない上皮との境界に多く観られたことから、物理的負荷が高い領域に多く存在することが示唆された。つまり、細胞移動に伴う物理的負荷による細胞死が、周辺細胞からの圧力による生理的細胞競合シグナルの活性化を伴うものであると想定した。Pvf1 の受容体である、Pvr のドミナントネガティブタンパク質を移動する細胞集団に発現させたところ、細胞死は抑制され、集団移動の抑制も観察された。以上のことから、Pvf1/Pvr シグナルは、特に上皮細胞における生理的細胞競合においては、細胞死誘導シグナルとして機能することが示唆された。その一方で、jar についてはこの上皮細胞集団移動において観察される細胞死との関連性が示されなかったことから、ショウジョウバエの幼虫細胞特異的な細胞死受容シグナルであることが考えられた。

この上皮細胞集団移動における細胞競合現象について、物理的な張力・圧力の人工的操作法を開発し、論文報告を行った（Uechi and Kuranaga, 2019）。この上皮細胞においてみられる物理的負荷の高低による細胞競合現象は世界的にも注目されており、生理的細胞競合の新たなモデル系として今後も研究推進していく。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

- (1) Hoshika S, Sun X, \*[Kuranaga E](#), \*Umetsu D. Reduction of endocytic activity accelerates cell elimination during tissue remodeling of the *Drosophila* epidermal epithelium. *Development*, 査読有, in press.
- (2) Uechi H, \*[Kuranaga E](#). The tricellular junction protein Sidekick regulates vertex dynamics to promote bicellular junction extension. *Dev Cell*, 査読有, 50(3), 327-338, 2019
- (3) \*Hiraiwa T, Wen F-L, \*Shibata T, \*[Kuranaga E](#). Mathematical Modeling of Tissue Folding and Asymmetric Tissue Flow during Epithelial Morphogenesis. *Symmetry*, 査読有, 11(1), 113, 2019
- (4) \*Okuda S, [Kuranaga E](#), \*Sato K. Apical Junctional Fluctuations Lead to Cell Flow while Maintaining Epithelial Integrity. *Biophys J*. 査読有, 116(6):1159-1170., 2019
- (5) Tsuboi A, Ohsawa S, Umetsu D, Sando Y, [Kuranaga E](#), Igaki T, \*Fujimoto K. Competition for Space Is Controlled by Apoptosis-Induced Change of Local Epithelial Topology. *Curr Biol*. 査読有, 28(13):2115-2128., 2018
- (6) Tsuboi A, \*Umetsu D, [Kuranaga E](#), \*Fujimoto K. Inference of Cell Mechanics in Heterogeneous Epithelial Tissue Based on Multivariate Clone Shape Quantification. *Front Cell Dev Biol*. 査読有, 5:68., 2017
- (7) Hiraiwa T, [Kuranaga E](#), \*Shibata T. Wave Propagation of Junctional Remodeling in Collective Cell Movement of Epithelial Tissue: Numerical Simulation Study. *Front Cell Dev Biol*. 査読有, 5:66., 2017
- (8) Nakajima YI, \*[Kuranaga E](#). Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ*. 査読有, 24(8):1422-1430., 2017
- (9) Kawamoto Y, Nakajima YI, \*[Kuranaga E](#). Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors. *Int J Mol Sci*. 査読有, 17(12). pii: E2144., 2016
- (10) Sato K, Hiraiwa T, Maekawa E, Isomura A, Shibata T, \*[Kuranaga E](#). Left-right asymmetric cell intercalation drives directional collective cell movement in epithelial morphogenesis. *Nat Commun*. 査読有, 6:10074., 2015

〔学会発表〕(計 38 件)

- (1) 飯島寛大、梅津大輝、[倉永英里奈](#)「組織コンパートメント境界維持機構における Toll 受容体の機能」第 8 回細胞競合コロキウム、札幌、2019 年
- (2) 白澤諒太、岩月貴之、[倉永英里奈](#)「上皮細胞が集団で移動する仕組み –アポトーシスと細胞増殖の視点から–」第 8 回細胞競合コロキウム、札幌、2019 年
- (3) 星加真一郎、梅津大輝、[倉永英里奈](#)「細胞除去を伴う頂端部収縮のエンドサイトーシスによる制御機能」第 41 回日本分子生物学会、横浜、2018 年
- (4) 岩月貴之、前川絵美、上地浩之、[倉永英里奈](#)「上皮細胞が集団で移動する仕組み –G1 期同期による集団移動能の獲得–」第 41 回日本分子生物学会、横浜、2018 年
- (5) 飯島寛大、梅津大輝、[倉永英里奈](#)「組織コンパートメント境界維持機構における Toll 受容体の関与」第 41 回日本分子生物学会、横浜、2018 年
- (6) 岩月貴之、梅津大輝、[倉永英里奈](#)「RNAseq 解析によるショウジョウバエの上皮の入れ替わりにおける非自律的なアポトーシス誘導因子の同定」細胞競合同若手ワークショップ 2018、熱海、2018 年
- (7) 梅津大輝、[倉永英里奈](#)「PTP61F による細胞増殖の力学的制御と細胞競合への関与」細胞競合同若手ワークショップ 2018、熱海、2018 年
- (8) 上地浩之、川元悠平、原遼、[倉永英里奈](#)「MyoVI による隣接細胞増殖に呼応した細胞排除機構の可能性」第 7 回細胞競合コロキウム、札幌、2018 年
- (9) 星加真一郎、梅津大輝、[倉永英里奈](#)「表皮組織リモデリングにおけるエンドサイトーシスの関与」第 30 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2018 年
- (10) 岩月貴之、前川絵美、上地浩之、[倉永英里奈](#)「上皮細胞が集団で移動する仕組み –G1 期同期による集団移動能の獲得–」第 30 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム、高遠、2018 年
- (11) Iwatsuki T. and [Kuranaga E](#), “RNAseq analysis to identify factors that induce non-autonomous apoptosis during the epidermal rearrangement in *Drosophila*.” 3rd International Symposium on Cell Competition、札幌、2017 年

- (12) Kuranaga E., “Mechanical perspective of collective cell movement in looping morphogenesis”: EMBO workshop “Dynamics of living systems”, コルシカ島 (フランス) 2017 年
- (13) Kuranaga E., “Collective cell movement in looping morphogenesis”: Joint meeting of GfE and JSDB, キール (ドイツ) 2017 年
- (14) Kuranaga E., “in vivo analysis of spontaneous competitive apoptosis in *Drosophila* epidermis”: 2<sup>nd</sup> International Symposium of Cell Competition, apoptosis and cancer”: マドリード (スペイン) 2016 年
- (15) Kuranaga E., “Collective cell movement in looping morphogenesis”: Crete EMBO conference, クレタ島 (ギリシア) 2016 年
- (16) Kuranaga E., “Collective cell movement in looping morphogenesis”: 75<sup>th</sup> SDB and 19<sup>th</sup> ISD joint meeting, ボストン (アメリカ) 2016 年
- (17) 梅津大輝、倉永英里奈「PTP61F の制御機構が細胞競合と細胞増殖の力学的制御のつながりを示唆する」第 5 回 細胞競合コロキウム、札幌、2016 年
- (18) 川元悠平、倉永英里奈「ミオシン VI が関与する細胞非自律的アポトーシス」第五回 細胞競合コロキウム、札幌、2016 年
- (19) Umetsu D. and Kuranaga E. “A link between mechanical control of tissue growth and cell competition”: 1<sup>st</sup> Morphomeostasis meeting, 三島、2016 年
- (20) Kuranaga E. “*In vivo* analysis of spontaneous competitive apoptosis in *Drosophila* epidermis”: 1<sup>st</sup> International Symposium on Cell Competition, Cell Competition in Development and Cancer, 京都、2015 年
- (21) Umetsu, D. and Kuranaga E. “Identification of mechanisms that protect cells from cell competition at anteroposterior compartment boundary in developing *Drosophila* wings”: 1<sup>st</sup> International Symposium on Cell Competition, Cell Competition in Development and Cancer, 京都、2015 年
- (22) Kawamoto Y. and Kuranaga E. “*In vivo* analysis of competitive apoptosis during *Drosophila* epidermal rearrangement”: 1<sup>st</sup> International Symposium on Cell Competition, Cell Competition in Development and Cancer, 京都、2015 年
- (23) Umetsu, D. and Kuranaga E. “Tissue proliferation control by mechanical stresses”: The 26<sup>th</sup> CDB Meeting, Mechanistic Perspectives of Multicellular Organization, 神戸、2015 年
- (24) 梅津大輝、倉永英里奈「機械的ストレス応答による組織増殖の制御機構」“Tissue proliferation control by mechanical stresses” 第 27 回 高遠・分子細胞生物学シンポジウム、比叡山、2015 年
- (25) 梅津大輝、倉永英里奈「コンパートメント境界における細胞競合の防護メカニズムの解明」『第四回 細胞競合コロキウム』、札幌、2015 年
- (26) 川元悠平、倉永英里奈 “Competitive apoptosis during tissue remodeling regulated by Myosin VI” 第 38 回 日本分子生物学会、神戸、2015 年
- (27) Kuranaga E. “*In vivo* RNAi screening to identify the molecular mechanism underlying spontaneous competitive apoptosis in the *Drosophila* epidermis” 第 37 回日本分子生物学会ワークショップ『組織恒常性を維持する適者生存 -細胞の競合と協調-』、横浜、2014 年
- (28) 川元悠平、倉永英里奈 “*In vivo* analysis for identification of the competitive apoptosis factors during *Drosophila* epidermal rearrangement” 第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：梅津 大輝、上地 浩之  
ローマ字氏名：Daiki Umetsu, Hiroyuki Uechi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。