

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：34304

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19409

研究課題名(和文) ヒト培養細胞を用いた網羅的スクリーニングによる細胞脱落を司る遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes responsible for cell extrusion

研究代表者

川根 公樹 (Kawane, Kohki)

京都産業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60362589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：私達の消化管や呼吸器などを形成する上皮組織は、細胞同士が互いに緊密に連携した細胞社会を形成しており、ここでの細胞の終焉は、周囲の細胞との相互協調作用によって細胞が組織から剥離する様式によって起こります。本研究では、この細胞脱落と呼ばれる細胞終焉様式の実行の機構を明らかにすることを目的に研究を行いました。その結果、脱落する細胞が局所で断片化し、細胞外小胞と呼ばれる膜小胞を形成する過程が、速やかな脱落の実行を促進することを示しました。この成果は、細胞が終焉にあたって組織から離れる機構において、細胞膜の動態が重要な役割を果たすという新たな考えを提示しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管や呼吸器などを形成する上皮組織において、終焉を迎える細胞が秩序だてて組織から排除されないと、炎症や癌などの疾患のリスクを高めることが予想されています。本研究では、細胞脱落と呼ばれるこの細胞終焉様式の実行機構の重要な局面を明らかにしました。得られた知見によって、今後、細胞脱落の異常と種々の疾患の関連性が明らかとなり、炎症や癌などの新たな側面からの理解と新規療法に道を拓くことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：The end of cellular life of epithelial cells is cell extrusion from epithelium. We aimed to reveal the molecular mechanism of cell extrusion and found a novel conserved process, that is extracellular vesicle formation in extruding cells. We further showed the mechanism of vesicle formation as well as its critical role for the prompt execution of cell extrusion. In summary, we characterized a novel mechanism of cell extrusion, the first compelling and conserved one to our knowledge.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞死 細胞脱落 上皮 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞は組織から脱落してその一生を終える。これは血球（浮遊）細胞の終焉が貪食細胞による貪食であるのに対し、組織において細胞社会を形成する接着細胞の終焉の重要な特徴である。脱落は、細胞が互いに接着した組織から効率よく細胞を除去するための洗練された能動機構であり、発生過程、組織のターンオーバーなど種々の局面で観察される普遍現象である。脱落する細胞は、隣接細胞が細胞境界に形成するアクチン-ミオシンリングが収縮することで、押し出されて組織から剥離し除かれる（図1）。またこの時、脱落細胞が占めていたスペースは隣接細胞によってシールされ上皮のバリア機能が損なわれるのを防ぐ。

すなわち脱落は、隣接細胞との相互、協調作用によって行われる“細胞社会における細胞死”であり、主に研究が進んできた細胞自律的な死と異なって分子機構の解明は遅れており多くの命題が未解決である。時間経過が細胞にもたらす変容の実体とこれが脱落の運命（細胞寿命）を決定する機構、隣接細胞が寿命を迎えた細胞を認識し脱落を開始させる機構、脱落の実行装置アクチン-ミオシンリングの形成、収縮、解体の機構など、いずれも理解は乏しい。

加えて、脱落過程での上皮バリアの維持も重要な問題である。細胞が脱落するには脱落細胞と隣接細胞間の細胞接着が消失する必要があるが、その瞬間以降、上皮バリアは破綻する危機に曝される。接着が一旦消失した後、速やかに隣接細胞間で新たな接着が形成されバリアは維持されると考えられているが、これがいかにして達成されるかは不明である。

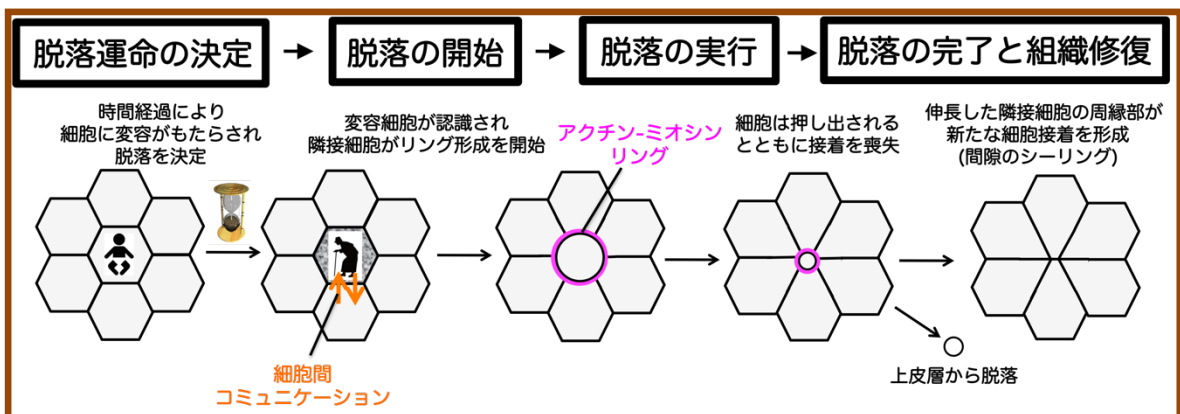


図1. 上皮細胞の終焉様式である細胞脱落の一連の過程

2. 研究の目的

このような背景のもと本研究は、ヒト上皮細胞株を用いてゲノムワイドの網羅的発現スクリーニングにより上皮細胞の未解明の細胞終焉様式である細胞脱落の各過程及び、その際に上皮のバリア機能を維持する機構を司る遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法（研究開始当初のもの）

細胞脱落をおこすことが報告されているイヌ上皮由来の MDCK 細胞では、細胞が confluent（培養皿の底面が増殖した細胞で埋められた状態）に達した後、さらに増殖、分裂を続ける細胞とのバランスを保つ形で細胞脱落をおこすと考えられている。この現象は、生体内の腸上皮組織などで起こる、細胞のターンオーバーによって組織の細胞数を一定に保つ機構を反映していると

考えられ、細胞脱落の研究にとって有用な解析系となる。同様の細胞脱落がおこるヒト上皮培養細胞株を検索し、この細胞においてヒト cDNA ライブラリー（レンチウイルスベクター）を用いたゲノムワイドの網羅的発現スクリーニングを行い、**(1) 脱落の各過程を司る遺伝子、(2) 細胞が脱落する際に上皮バリアの維持を司る遺伝子**、の同定を行う。具体的には、96 well plate に播種した培養細胞にウイルスベクターを感染させて、各々のコードする cDNA を過剰発現させ、上記(1)、(2)の目的についてそれぞれ以下に記載する方法で表現型を判定する。

(1) 脱落の各過程を司る遺伝子のスクリーニング

細胞脱落がおこるヒト上皮培養細胞にウイルスベクターを感染させ、細胞が confluent に達した後、培地に含まれる細胞数を測定することで細胞脱落を定量し、cDNA の過剰発現によって脱落が更新あるいは減少する遺伝子を同定する。具体的には、confluent になった細胞を洗浄した後（この時点で培地中に浮遊している細胞を除くため）、新たな培地を添加する。一定時間（6 時間から 24 時間）経過後、培地を回収し、含まれる細胞（この間に脱落した細胞）の数を自動計測機を用いて計測する。

(2) 細胞が脱落する際に上皮バリアの維持を司る遺伝子のスクリーニング

私達は他の実験系において、ノックダウンにより細胞脱落時にバリア破綻をおこす遺伝子の候補（機能未知）を複数同定している。これらの内、最適なものを選び、その遺伝子に対する RNAi を安定発現させた細胞を用いてスクリーニングを行う。すなわちこの細胞では細胞脱落によってバリア破綻が生じる。ここにウイルスベクターを感染させ、cDNA の過剰発現によって、脱落時におけるバリア機構が回復する遺伝子を同定する。具体的には培養皿底部がメンブレンでできたトランスウェルの 96 well plate を用いて細胞を培養し、上部に蛍光標識したデキストランを添加する。confluent 後の細胞脱落時において、あるいは紫外線照射により大量の細胞脱落を誘発後、下部の培地を回収し蛍光強度を蛍光プレートリーダーを用いて測定することでバリアの破綻を定量評価する。

4. 研究成果

(1) 脱落の各過程を司る遺伝子の同定

当初は、細胞脱落の各過程を司る遺伝子を広くスクリーニングする計画であったが、私達は、細胞の膜動態のライブイメージング解析によって「脱落細胞は脱落過程においてその一部を断片化する」現象を見出したため、この現象に着目し、ここに関与する遺伝子のスクリーニング（候補遺伝子スクリーニング）を培養細胞を用いて行うこととし、結果、複数の遺伝子を同定した。まず、細胞膜の脂質二重層の内層に局在するホスファチジルセリンを外層に露出させる働きを持つスクランブラーゼ、及びホスファチジルセリンの受容体がこれに関与することを明らかにした。続いてこの断片化は、細胞外小胞の形成であり、Arf ファミリータンパク質がこの形成を担うことを明らかにした。さらに、マイクロベシクルが形成、放出されるのは局所的であり、細胞が脱落する方向と逆側でおこる。これら遺伝子のノックダウンを哺乳類培養細胞及びショウジョウバエの生体上皮などで行うと、脱落細胞の断片化が抑制されるだけでなく、細胞が脱落を完了するまでに長時間を要す異常が観察され、脱落細胞の断片化が、細胞脱落のスムーズな実行に重要であることが示された。

以上の結果は、細胞外小胞の形成が、細胞を組織から速やかに剥離させることを促進するという、細胞脱落の実行過程の重要な機構を明らかにした（図 2）。この知見は、これまで細胞骨格の再編成によって細胞を脱落させる駆動力が生み出されると考えられてきた当該分野に、細胞

外小胞の形成と放出という膜動態もまた力の産生に寄与するという細胞脱落の実行の新たなモデルを提示した。細胞外小胞が形成、放出された先には、細胞外マトリクスもしくは侵入してきた隣接細胞が存在するため、形成、放出によって加えられた力の反作用によって脱落方向へ細胞を押し出す推進力が生まれる可能性がある。または、脱落方向に対して反対側の細胞膜を取り除くことで隣接細胞の侵入を可能にし、これが細胞脱落の推進力を生み出している可能性もある。今後、これらの可能性を、数理モデルを用いた解析も含め、種々の解析によって検証する必要がある。また、細胞外小胞の形成が、どのような機構で局所的に制御されているのかも明らかにすべき重要な問題である。

細胞外小胞は、内部にシグナル伝達物質やmicro RNAを含み、増殖、死など種々の情報伝達に働くことや、様々な疾患マーカーとして有用であることから大きな注目を集めている。病理局面での細胞外小胞の産生は多く報告されているが、生理的役割については知見が得られ始めてきた現状であり、生理的状況での細胞外小胞の形成の重要性を具体的役割と共に提示する本研究の成果は、細胞外小胞の生物学においても大きなインパクトをもたらす。

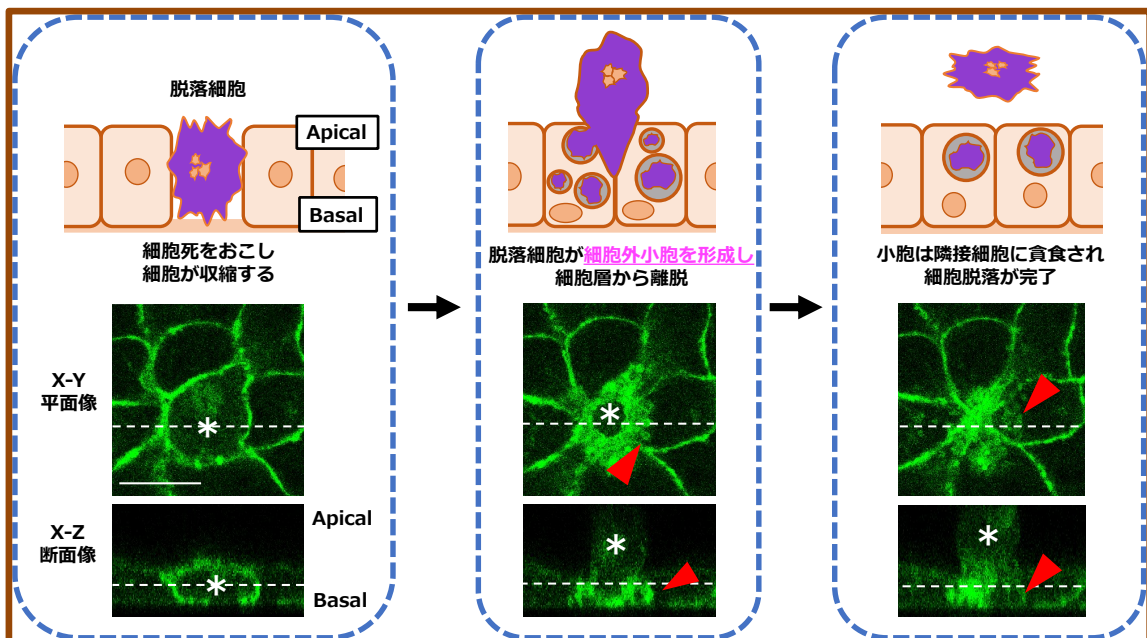


図2. 細胞外小胞が駆動する細胞脱落実行の機構

脱落細胞においてリン脂質のスクランプリングを引き金とする局所的な細胞外小胞の形成がおこり、この過程が細胞の細胞層からの離脱を駆動している。この過程を妨げるとスムーズな細胞脱落の実行が行われなくなる。

アスタリスク：脱落細胞，矢頭：脱落細胞が形成した細胞外小胞

(2)細胞が脱落する際に上皮バリアの維持を司る遺伝子のスクリーニング

当初は、細胞脱落の各過程を司る遺伝子を広くスクリーニングする計画であったが、(1)で同定した、細胞外小胞形成に関わる遺伝子を哺乳類培養細胞においてノックダウンした際に、バリアが破綻することを示唆する結果が得られた。細胞外小胞形成が駆動する速やかな細胞脱落の実行が組織バリアの維持にも重要である可能性が示唆された。

今後は、この知見を、さらにノックアウトマウスを含めた様々な細胞脱落の解析において実証し、細胞外小胞形成による細胞脱落の実行が破綻した場合に、炎症を始めとする様々な疾患が

発症する可能性の検証へと研究を展開することを計画する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 川根公樹	4. 巻 71
2. 論文標題 上皮細胞の終焉様式である細胞脱落	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 臨床免疫・アレルギー科	6. 最初と最後の頁 127-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kira Akihito, Murata Machiko, Saito Keisuke, Tatsutomi Ichiko, Hattori Izumi, Kajita Haruna, Muraki Naoko, Oda Yukako, Satoh Saya, Tsukamoto Yuta, Kimura Seisuke, Kato Hiroki, Kawane Kohki	4. 巻 該当なし
2. 論文標題 Extracellular vesicle formation mediated by local phosphatidylserine exposure promotes efficient cell extrusion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research Square	6. 最初と最後の頁 該当なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-257262/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉良彰人, 村田真智子, 勝山大暉, 服部和泉, 佐藤沙耶, 塚本雄太, 加藤博己, 川根公樹
2. 発表標題 細胞脱落における脱落細胞の断片化と貪食
3. 学会等名 第28回日本Cell Death学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部和泉, 吉良彰人, 村田真智子, 西藤圭祐, 村木直子, 佐藤沙耶, 塚本雄太, 加藤博己, 川根公樹
2. 発表標題 上皮細胞の細胞終焉様式である「細胞脱落」におけるマイクロベシクル形成
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 服部和泉, 中井彩香, 山田信人, 梶田春奈, 村田真智子, 川根公樹
2. 発表標題 上皮細胞の細胞脱落における細胞接着分子の動態解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉良彰人, 勝山大暉, 村田真智子, 川根公樹
2. 発表標題 細胞脱落における貪食
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sayaka Nakai, Nobuto Yamada, Takeru Hayashi, Kohki Kawane
2. 発表標題 細胞脱落時における上皮バリア機構の解析
3. 学会等名 日本Cell Death学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Sayaka Nakai, Nobuto Yamada, Hayashi Takeru, Kohki Kawane
2. 発表標題 細胞脱落時における上皮バリア維持機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Akihito Kira, Izumi Hattori, Kohki Kawane
2. 発表標題 上皮細胞における細胞終焉様式である「細胞脱落」の分子機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 達富 一湖, 吉良 彰人, 服部 和泉, 村田 真智子, 木村成介, 川根 公樹
2. 発表標題 細胞脱落における細胞外小胞の形成
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西藤 圭祐, 吉良 彰人, 村田 真智子, 村木 直子, 小田 裕香子, 佐藤 沙耶, 塚本 雄太, 加藤 博己, 川根 公樹
2. 発表標題 細胞脱落におけるホスファチジルセリンの露出
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 梶田春奈、服部和泉、中井彩香、村田真智子、川根公樹
2. 発表標題 細胞脱落における接着結合の動態の解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	篠原 正浩 (Shinohara Masahiro) (60345733)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
ドイツ	university of Bonn		