

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21502

研究課題名（和文）小型魚類モデルを用いた変異モザイク疾患の発症機序の解明

研究課題名（英文）Clarification of the cell-quality-control systems eliminating unhealthy cells from embryonic tissue and their dysregulation

研究代表者

石谷 太（Ishitani, Tohru）

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：40448428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゼブラフィッシュをモデルに疾患と不良細胞除去機構の関係の解明を目指した。まず、ゼブラフィッシュ稚魚上皮に出現した前がん細胞が隣接細胞に感知されて細胞老化を誘導されて増殖活性を抑制され、体外に物理的に押し出されることを発見した。また、p53変異を持つ上皮やDNAダメージが蓄積した上皮では、前がん細胞は排除されずに生存し、隣接正常細胞に増殖あるいは二次的な細胞老化を誘導して初期の腫瘍を誘導することを発見した。このように、発生期に生じた不良細胞を隣接細胞が感知・排除する新たなメカニズムを明らかにし、さらに、追加変異や環境因子がこの排除機構を抑制し、疾患発症を駆動することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゼブラフィッシュを用いたイメージング解析により、新たな疾患発症機構を明らかにした。これは、発生学のみならず医学においても重要な発見である。また、近年、動物愛護の考え方から哺乳類モデルを使った制限が徐々に制限され始めているが、本成果は非哺乳類モデルの医学研究における有用性を示す重要な成果と言える。

研究成果の概要（英文）：We aimed to elucidate the relationship between mosaic disease and cell-quality-control system using zebrafish as a model. We succeeded to reveal that, in zebrafish larvae, neighboring normal cells sense precancerous cells and then induce senescence and physically push out these precancerous cells. In addition, in epithelia with p53 mutations or DNA damage, precancerous cells survive without being eliminated, and induce proliferation or secondary cellular senescence in adjacent normal cells to induce primary tumors. Thus, we have clarified a new mechanism by which neighboring cells sense and eliminate defective cells during development. Furthermore, we have clarified that additional mutations and environmental factors suppress this elimination mechanism and drive disease development. Our results would provide a new understanding of the pathogenesis of human diseases.

研究分野：発生細胞生物学

キーワード：モザイク疾患 不良細胞

## 1. 研究開始当初の背景

我々ヒトを含む多細胞生物のからだは、細胞が複製・分裂を繰り返すことで作り上げられる。このため、免疫細胞など一部の例外を除いて多細胞生物のからだを構成する細胞は「同一のゲノム」を有すると考えられてきた。しかし、近年の次世代シーケンサー解析などの技術革新により、これまで均質と考えられてきたヒト胚組織の細胞が実は均質ではなく、発生初期から遺伝子変異を持った細胞が頻りに生じていることがわかってきた。驚くべきことに、一卵性双生児のゲノムを対象とした最新の研究では、初期発生過程で平均5.2個のde novo遺伝子変異が生じることも示されている。また、容易に連想できることだが、胚発生時のde novo変異細胞を起源とするモザイクは、多くの疾患に関わる。特に先天性疾患については研究が進んでおり、よく知られる例としてはProteus症候群がある。Proteus症候群の患者は、AKT1遺伝子の体細胞変異をモザイクに持っているが、出生時にはほぼ見た目の異常が無いものの、成長につれて骨や臓器のモザイク状の過剰成長や腫瘍が生じる。また、外見上の異常を伴わない変異モザイク疾患も多数報告されている。例えば、胎生期にPI3K/Akt/mTOR経路の活性化変異を持つ個性細胞が大脳半球に生じてモザイクを形成すると、てんかん症状を高確率で引き起こす。また、一部のアルツハイマー病や自閉症の患者の病変部にもそれぞれの疾患と関連する遺伝子変異あるいはエピゲノム異常を持つモザイクが見られ、細胞系譜解析によりそれらの起源が胚発生時に生じたエピゲノム異常細胞であることが示唆されている。加えて、これらの神経疾患のみならず、発生期に生じた遺伝子変異細胞・エピゲノム異常細胞を起源とするモザイクは、糖尿病など成人病の発症にも関与することが明らかになりつつある。さらに興味深いことに、親の世代の胚発生過程において生殖細胞に生じた遺伝子変異が次世代においてヘテロ変異として継承され疾患を引き起こすケースもある。このように胚に生じた変異細胞を起源とするモザイクが多様な疾患に関与する可能性が示されたものの、変異モザイクに注目した疾患モデル動物は報告例がほとんどなく、これに関連し、発生期に生じたde novo変異細胞がどのようなプロセスを経て疾患を引き起こすのかは不明である。

一方で近年、動物胚が突発的に生じた不良細胞を積極的に除去するシステムを持つことが明らかになりつつある。例えば、マウス初期胚においてp53遺伝子やMyc遺伝子の発現が異常な細胞を人為的に少数誘導すると、これらの細胞が隣接する正常細胞とのコミュニケーションを経て細胞死により除去される。我々も最近、ゼブラフィッシュ胚を用いた解析により、発生過程においてWntシグナルを正常に伝達できない不良細胞(Wntシグナル機能不全細胞)が生じると、隣接正常細胞がWntシグナル機能不全細胞の出現を感知し、機能不全細胞に細胞死を導くことを発見した(Nature Commun 2019)。さらに、この排除機構を破綻させた個体では、Wntシグナル機能不全細胞が蓄積、増殖し、結果として、稚魚の一部に頭部や体幹の変形や局所的な腫瘍形成などモザイク状の形態異常が誘導された。また、孵化時の稚魚では一部の個体でしか外見上の異常がなかったが、成長につれて局所的な形態異常を持つ個体が増加した(Nature Commun 2019)。このようなことから、胚発生時における不良細胞の除去が変異モザイクの発生抑制と健康な個体構築に寄与することが示唆された。上述のように不良細胞の除去はマウスでも起こることから、ヒトを含む哺乳類胚においても不良細胞除去機構が正常な発生を支え、変異モザイクの発生を防ぐ可能性が大いに期待できる。しかし一方で、このようなシステムがあるにも関わらず、どうして変異モザイクが生じてしまうのだろうか？二つの可能性が考えられる。一つは、変異の種類や変異細胞が生じる環境によっては除去されない、もう一つは、変異モザイクによる疾患(モザイク疾患)の患者では、不良細胞除去機構が機能低下している可能性(あるいは発生時にさらされた外的攪乱により不良細胞除去機構が抑制された)が考えられる。しかし、変異モザイクと不良細胞除去機構の関係は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、胚発生における細胞動態のイメージングに適したモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュを用いて、変異モザイクに起因する疾患(モザイク疾患)と不良細胞除去機構の関係の分子・細胞・個体レベルでの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

これまでに、特定遺伝子の異常を持つ不良細胞をゼブラフィッシュ初期胚にモザイク状に誘導し、その動態を解析する技術は確立済みであり、この手法を用いてゼブラフィッシュ胚に不良細胞を少数誘導し、それらの挙動をイメージング解析する。種々の不良細胞を誘導し、モザイクが形成され、病態を再現できるか検討する。また、不良細胞除去機構を破綻させ、モザイク形成を促す環境要因を探る。

## 4. 研究成果

**結果1) pH 変化が不良細胞除去機構を破綻させる：** 我々は、胎児の発生異常や先天性疾患の原因の一部は、母胎の環境変化により不良細胞除去機構が破綻した結果生じた不良細胞モザイクにあるという仮説を立て、ヒト発生に悪影響を与える環境要因と不良細胞除去機構の関連を

解析した。糖尿病を発症した妊婦においてはアシドーシスが起き、胎児の発生に負の影響を及ぼすことが知られている。そこで、pH 環境の変化が不良細胞除去機構に影響を及ぼす可能性を検討した。胎児が発生する羊水などヒトの多くの細胞外環境の pH は中性 (pH=7) 付近に維持されている。我々は、少数の Wnt シグナル機能不全細胞を人為的に誘導したゼブラフィッシュ胚における不良細胞排除活性が pH 変化によって影響を受けるかを検討した。その結果、pH=7 においてもっとも効率的に Wnt シグナル機能不全細胞が排除され、弱酸性環境 (pH=6) や弱アルカリ性環境では外見上胚発生は正常に進むものの Wnt シグナル機能不全細胞の排除が起きないことがわかってきた。メカニズムを解析したところ、pH の上昇および低下の双方によって細胞膜のカドヘリンが減少し、結果として機能不全細胞が感知されず生存することもわかった(投稿準備中)。この事実は、胚発生時の pH 環境の異常がモザイク疾患を引き起こす可能性を示唆しており、興味深い。今後は、pH 変化によって生存した不良細胞がモザイクを形成し、疾患を引き起こすプロセスを明らかにしていきたい。

**結果 2) 多重変異や DNA ダメージ蓄積が前がん細胞除去機構を破綻させる：**ゼブラフィッシュ稚魚上皮に出現した前がん細胞が隣接細胞に感知されて細胞老化を誘導されて増殖活性を抑制され、最終的に体外に物理的に押し出されることを発見した。また、p53 変異を持つ上皮や DNA ダメージが蓄積した上皮では、前がん細胞は排除されずに生存し、隣接正常細胞に増殖あるいは二次的な細胞老化を誘導して初期の腫瘍を誘導することを発見した (Nature Commun 2022; Cell Rep 2022; Curr Biol 2022)。すなわち、発生期に生じた不良細胞を隣接細胞が感知・排除する新たなメカニズムを明らかにし、さらに、変異蓄積や環境因子がこの排除機構を抑制し、疾患発症を駆動することも示した。本研究成果は、ヒト疾患発症プロセスの新たな理解をもたらすものと期待される。

**その他：**本研究で確立したゼブラフィッシュ疾患モデル解析系を利用して、臨床研究者と共同研究を実施し、新たなヒト先天性疾患の原因遺伝子を複数突き止めることに成功した (Sci Rep 2020; Genet Med 2021; Hum Mol Genet 2022 など)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Haraoka Yukinari, Akieda Yuki, Nagai Yuri, Mogi Chihiro, Ishitani Tohru	4. 巻 13
2. 論文標題 Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1417
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29061-6	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Lohani Sweksha, Funato Yosuke, Akieda Yuki, Mizutani Kiyohito, Takai Yoshimi, Ishitani Tohru, Miki Hiroaki	4. 巻 135
2. 論文標題 A novel role for PRL in regulating epithelial cell density by inducing apoptosis at confluence	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs258550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.258550	査読の有無 有
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 Inoue Masanori, Miyahara Hiroaki, Shiraishi Hiroshi, Shimizu Nobuyuki, Tsumori Mika, Kiyota Kyoko, Maeda Miwako, Umeda Ryohei, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Leucyl-tRNA synthetase deficiency systemically induces excessive autophagy in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87879-4	査読の有無 有
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 -
1. 著者名 Nishina Sachiko, Hosono Katsuhiko, Ishitani Shizuka, Kosaki Kenjiro, Yokoi Tadashi, Yoshida Tomoyo, Tomita Kaoru, Fukami Maki, Saitsu Hiroto, Ogata Tsutomu, Ishitani Tohru, Hotta Yoshihiro, Azuma Noriyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Biallelic CDK9 variants as a cause of a new multiple-malformation syndrome with retinal dystrophy mimicking the CHARGE syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-021-00909-x	査読の有無 有
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 Zarate YA, Uehara T, Abe K, Oginuma M, Harako S, Ishitani S, 他25名, Hirose Y, Ishitani T, Kosaki K.	4. 巻 -
2. 論文標題 CDK19-related disorder results from both loss-of-function and gain-of-function de novo missense variants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetics in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41436-020-01091-9	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Yatsuka Hiroyuki, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Umeda Ryohei, Morisaki Ikuko, Urushibata Hiroto, Shimizu Nobuyuki, Sebastian Wulan Apridita, Hikida Takatoshi, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Shimada Tatsuo, Kimoto Kenichi, Kubota Toshiaki, Hanada Toshikatsu	4. 巻 533
2. 論文標題 Exosc2 deficiency leads to developmental disorders by causing a nucleotide pool imbalance in zebrafish	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1470 ~ 1476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.10.044	査読の有無 有
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 Akamine S, Okuzono S, Yamamoto H, Setoyama D, Sagata N, Ohgidani M, Kato TA, Ishitani T, Kato H, Masuda K, Matsushita Y, Ono H, Ishizaki Y, Sanefuji M, Saito H, Matsumoto N, Kang D, Kanba S, Nakabeppu Y, Sakai Y, Ohga S.	4. 巻 34
2. 論文標題 GNAO1 organizes the cytoskeletal remodeling and firing of developing neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 16601 ~ 16621
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001113R	査読の有無 有
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 Uehara Tomoko, Abe Kota, Oginuma Masayuki, Ishitani Shizuka, Yoshihashi Hiroshi, Okamoto Nobuhiko, Takenouchi Toshiki, Kosaki Kenjiro, Ishitani Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Pathogenesis of CDK8-associated disorder: two patients with novel CDK8 variants and in vitro and in vivo functional analyses of the variants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-74642-4	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Inoue Masanori, Hada Kazumasa, Shiraishi Hiroshi, Yatsuka Hiroyuki, Fujinami Hiroyuki, Morisaki Ikuko, Nishida Yoshihiro, Matsubara Etsuro, Ishitani Tohru, Hanada Reiko, Matsumoto Masaki, Penninger Josef M., Ihara Kenji, Hanada Toshikatsu	4. 巻 525
2. 論文標題 Tyrosine pre-transfer RNA fragments are linked to p53-dependent neuronal cell death via PKM2	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 726 ~ 732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.02.157	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本かな子、穠枝佑紀、石谷 太
2. 発表標題 モルフォゲン勾配のロバストネスの分子基盤を細胞競合から理解する
3. 学会等名 日本細胞生物学会ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷太
2. 発表標題 環境要因による胚の細胞品質管理機構の破綻と成体におけるモザイク関連疾患の理解
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原岡由喜也、穠枝佑紀、石谷 太
2. 発表標題 Additional TP53 mutation switches oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷 太
2. 発表標題 小型魚類ゼブラフィッシュの特性を活かしてヒト先天性疾患の発症メカニズムに迫る
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第66回大会 第28回日本遺伝子診療学会大会 合同開催シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷 太
2. 発表標題 Wntモルフォゲン勾配を利用した不良細胞感知・排除機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷 太
2. 発表標題 Cell competition contributes to the autonomous error correction of morphogen gradient.
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本かな子、穠枝佑紀、石谷 太
2. 発表標題 モルフォゲン勾配のロバストネスの分子基盤を細胞競合から理解する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松本かな子、穠枝佑紀、石谷 太
2. 発表標題 モルフォゲン勾配のロバストネスの分子基盤を細胞競合から理解する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会ポスター
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原岡由喜也、穠枝佑紀、石谷 太
2. 発表標題 がん原細胞-隣接細胞間の競合的・協調的コミュニケーションを小型魚類イメージングで解き明かす
3. 学会等名 日本分子生物学会年会ポスター
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 原岡由喜也、穠枝佑紀、石谷 太
2. 発表標題 Zebrafish imaging reveals TP53 mutation switching oncogene-induced senescence from suppressor to driver in primary tumorigenesis
3. 学会等名 6th ICSA
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷太
2. 発表標題 細胞競合が支える発生ロバストネス
3. 学会等名 炎症再生医学会シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 石谷太
2. 発表標題 細胞競合によるエラー修復は脊椎動物の発生と組織恒常性を支える
3. 学会等名 日本分子生物学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 穠枝 佑紀、小神野 翔平、石谷 太
2. 発表標題 Cell-cell communication-mediated error correcting mechanism of Wnt morphogen gradient
3. 学会等名 Wnt研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石谷 太
2. 発表標題 魚が切り拓くヒト疾患・老化研究
3. 学会等名 日本循環器学会 meet the expert（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 石谷太（分担執筆）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 メディカルドゥ	5. 総ページ数 7
3. 書名 遺伝子医学 4 0 号 IRUD-Beyond：小型モデル生物および患者iPS細胞を用いた希少・未診断疾患へのアプローチ	

1. 著者名 石谷太（分担執筆）	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニューサイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊細胞「細胞の個性と競合」・53巻	

1. 著者名 穠枝佑紀、石谷太（分担執筆）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 医学のあゆみ 細胞競合による生体制御とがん；生理的な細胞競合	

〔産業財産権〕

〔その他〕

石谷研究室HP <a href="https://ishitani-lab.biken.osaka-u.ac.jp/">https://ishitani-lab.biken.osaka-u.ac.jp/</a> 石谷研究室HP <a href="https://ishitani-lab.biken.osaka-u.ac.jp/">https://ishitani-lab.biken.osaka-u.ac.jp/</a>
--

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

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
---------	---------

米国	University of Arkansas	University of Vermont Medical Center	University of Utah	他2機関
フィンランド	University of Helsinki	Blueprint Genetics		
ドイツ	Medical Center Hamburg- Eppendorf	University of Leipzig	Berlin Institute of Health	他2機関