

機関番号：14501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770233

研究課題名 (和文) 細胞状況依存的シグナル伝達変換機構に着目した細胞競合機構の解析

研究課題名 (英文) Dissecting cell competition focused on the output switching of JNK signaling

研究代表者

大澤 志津江 (OHSASWA SHIZUE)

神戸大学・大学院医学研究科・グローバル COE 研究員

研究者番号：80515065

研究成果の概要 (和文)：上皮組織にがんのもとになる異常な細胞が生じると、組織はそれを認識・排除することにより恒常性を保つと考えられるが、その分子機構はほとんど不明である。本研究ではショウジョウバエをモデル生物として導入し、がんのもとになる極性崩壊細胞が組織から排除される機構を解析した。その結果、正常な上皮組織は細胞競合を介して JNK を活性化し、これにより貪食能の亢進することで、極性崩壊細胞の排除を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文)：

A newly emerged oncogenic cell in the epithelium has to confront anti-tumor selective pressures in the host tissue. However, the underlying mechanism is poorly understood. Using *Drosophila* model system, we found that normal epithelial cells activate JNK signaling through “cell competition” in response to the emergence of oncogenic polarity-deficient cells, which activates phagocytic pathway, thereby eliminating oncogenic neighbors by engulfment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：遺伝学、発生生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：細胞競合、細胞間コミュニケーション、がん抑制

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の上皮組織にがん原性の異常な細胞が生じると、組織はそれを積極的に認識・排除することによりその恒常性を維持すると考えられる。このような内在性のがん抑制システムはショウジョウバエ上皮においても存在する。ショウジョウバエ上皮組織において進化的に保存された極性遺伝子 *scribble (scrib)* あるいは *discs large (dlg)* に変異の持つ細胞 (極性崩壊細胞) はその周

囲を正常細胞に取り囲まれると細胞死を起こして組織から排除される。興味深いことに、これら極性崩壊細胞はその周囲を正常細胞に取り囲まれない状況においては細胞死を起こすことなくむしろ強い増殖能を発揮する。このことから、極性崩壊細胞の排除現象は、「隣接細胞の性質に依存して細胞運命が変わる (細胞死を起こす)」という“細胞競合”を介した内在性がん抑制機構であると考えられた。しかしながら、このような“細胞

競合”を介した内在性がん抑制機構の分子メカニズムはほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

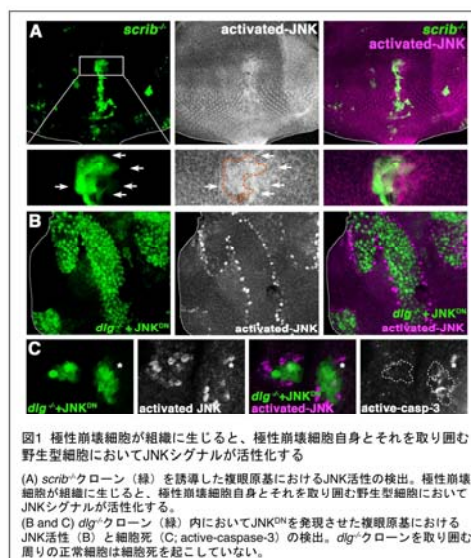
当研究室ではこれまでに、①ショウジョウバエ成虫原基の上皮組織に生じた極性崩壊細胞が c-Jun-N-terminal kinase (JNK) 依存的な細胞死経路により排除されること、およびこの細胞排除は ②正常細胞-異常細胞間で起こる細胞競合に依存し、③極性崩壊細胞がその周囲を正常細胞に取り囲まれたときのみ起こることを見いだした。“細胞競合”とは、組織の中で隣り合う細胞同士がその適応度を競合し、競合の“勝者”が“敗者”を細胞死により排除することでその場を占有する現象である。この場合、正常細胞が競合の“勝者”となり、“敗者”の極性崩壊細胞を細胞死により排除する。本研究では、この細胞競合現象において、“勝者”の正常細胞側から“敗者”の極性崩壊細胞側へと伝達される細胞間コミュニケーション機構を解析することにより、上皮の内在性がん抑制機構を司る細胞競合の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を基盤とした遺伝学的手法とショウジョウバエ成虫原基に対するライブイメージング技術を駆使することにより、内在性がん抑制システムにおける正常細胞群の役割と機能を解析した。

4. 研究成果

上述した通り、ショウジョウバエ上皮に生じた極性崩壊細胞はその周囲を正常細胞により取り囲まれると JNK 依存的な細胞死経路により排除される。われわれは、極性崩壊細胞を取り囲む正常細胞がいかにして細胞排除システムを駆動するのか、そのメカニズムを明らかにするために、正常細胞の振る舞いを詳細に解析した。その結果、興味深いことに JNK シグナルは組織から排除される極性崩壊細胞群のみならず、その周囲の正常細胞においても活性化していることを見いだした。(図 1A, 1B)。この極性崩壊細胞を取り囲む JNK の活性化した正常細胞群は細胞死を起こしていないことから (図 1C)、正常細胞群における JNK 活性は何らかの非細胞死機能を果たしていると考えられた。そこで、この極性崩壊細胞周辺の正常細胞群における JNK 活性の役割を調べるために正常細胞群でのみ JNK を抑制した結果、極性崩壊細胞群の排除が抑制されることが明らかとなった。逆に、正常細胞群における JNK の活



性を強めると、極性崩壊細胞群の排除が促進された。以上の結果から、周囲の正常細胞における JNK 活性は極性崩壊細胞の排除を促進する内在性がん抑制機構として機能していることがわかった。

次に、この内在性がん抑制機構において JNK シグナルの下流で働く分子を探索した。種々の候補遺伝子について調べた結果、PDGF/VEGF 受容体の相同タンパク質である PVR が JNK シグナルの新規ターゲット分子であることが分かった。受容体型チロシンキナーゼである PVR は、リガンド非存在下においてもその発現量に依存して下流シグナルを活性化しうることが知られている。正常細胞群における PVR の役割を遺伝学的に検証したところ、極性崩壊細胞を取り巻く正常細胞は JNK-PVR 経路により極性崩壊細胞の排除を促進していることがわかった。

それでは、正常細胞における JNK-PVR シグナルはどのようにして細胞排除を促進するのだろうか。その疑問を解くために、極性崩壊細胞の細胞死の空間的パターンを詳細に観察した。その結果、興味深いことに死んだ scrib^{-/-}細胞の多くは scrib^{-/-}細胞群と野生型細胞群の境界上あるいは野生型細胞群内に存在することを見いだした (図 2A)。そこでこの scrib^{-/-}細胞が細胞死を起こすダイナミクスを詳細に調べるために、理化学研究所脳科学総合研究センターの宮脇敦史博士と杉村薫博士 (現京都大学物質細胞統合システム拠点) との共同研究により、ショウジョウバエ成虫原基の培養システムを確立し、ライブイメージング解析を行った。その結果、scrib^{-/-}細胞がクローンから離脱して、正常細胞群のほうへ取り込まれた後に断片化して死んでいく様子が観察された。このようなクローンから離脱した極性崩壊細胞群は、食食マーカーである lysotracker によって細胞全

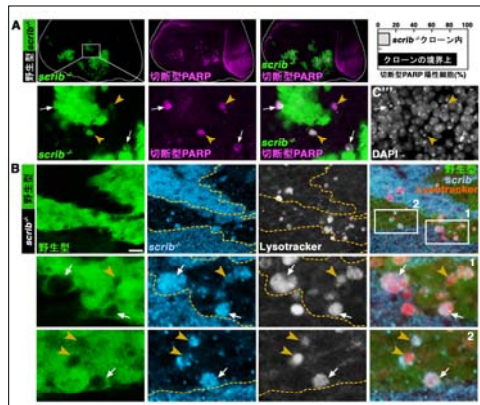


図2 正常細胞による極性崩壊細胞の貪食

(A) *scrib*⁺細胞(Venusで標識)を誘導した複眼原基において細胞死を検出した。ここではヒトPARPタンパク質のカスパーゼ切断配列を含むCD8-PARP-Venusを*scrib*⁺細胞内で発現させ、カスパーゼ依存的なPARPの切断断片を認識する抗体を用いて死細胞を検出した。細胞死を起こした*scrib*⁺細胞の多くは正常細胞群との境界上に存在した。(B) *scrib*⁺細胞(青)を誘導した複眼原基においてlysotrackerにより貪食細胞を検出した。*scrib*⁺細胞群(青)と正常細胞群(緑)の境界上あるいは正常細胞群内において、貪食された変異細胞が多数観察された。矢印(白)は*scrib*⁺細胞群と正常細胞群の境界上で死んでいる*scrib*⁺細胞を、矢頭(黄)は正常細胞群内に取り込まれて死んでいる*scrib*⁺細胞を示す。

体がラベルされることから(図2B)、極性崩壊細胞群は正常細胞によって貪食されることで死んでいる可能性が示唆された。興味深いことに、貪食の過程で細胞骨格の再編成に必須の役割を果たすELMO(engulfment and cell motility, a Ced-12 ホモログ分子)/Mbc(myoblast city, a Ced-5/DOCK180 ホモログ分子)は、ショウジョウバエ変態時の胸部閉鎖(thorax closure)やショウジョウバエ卵巣でのborder cellの移動においてPVRの下流で働くことが知られている。そこで、正常細胞におけるELMO/Mbcの機能と役割を遺伝学的に検証した。その結果、ELMO/Mbcは、正常細胞においてJNK-PVRシグナルの下流で働き、極性崩壊細胞の排除を促進していることが分かった。すなわち、正常細胞は極性崩壊細胞の出現に反応してJNK-PVRシグナルを活性化させ、これがELMO/Mbcを介した貪食能を亢進することで、隣接した極性崩壊細胞を飲み込んで細胞死に至らせると考えられる。以上の結果から、正常な組織はがん原性の極性崩壊細胞が生じると、極性崩壊細胞とその周囲の正常細胞の両者においてJNKシグナルを活性化させ、これが極性崩壊

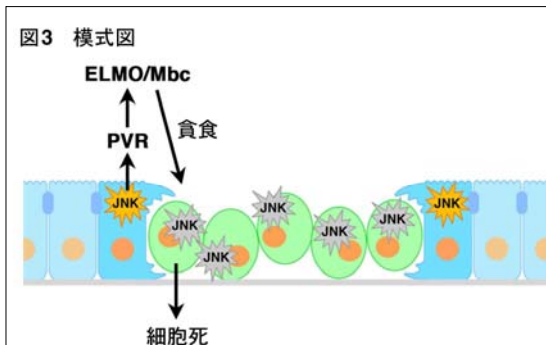


図3 模式図

細胞においては細胞死シグナルとして、正常細胞においては貪食能亢進シグナルとして機能することで、効率的な細胞排除システムを成立させていると考えられた(図3)。

本研究により、極性崩壊細胞と正常細胞とが細胞競合を起こしたときに、競合の“勝者”である正常細胞が“敗者”の極性崩壊細胞を排除する仕組みの一端が明らかになった。今後は、正常細胞が極性崩壊細胞の出現に応じて、いかにしてJNKを介した貪食シグナルを活性化させるのか、細胞競合機構を引き起こす上流シグナルを解析することで、細胞競合機構の全容解明を目指したいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T
“Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in *Drosophila*”
Developmental Cell, 15, 315-328 (2011)
(査読あり)

2. Ohsawa S, Hamada S, Kuida K, Yoshida H, Igaki T, Miura M
“Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity”
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 13366-13371 (2010)
(査読あり)

3. 大澤志津江、井垣達吏
「状況依存的細胞死シグナル制御による上皮のがん抑制」
実験医学増刊 28 129-134 (2010)
(査読なし)

[学会発表] (計10件)

1. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T
“Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated super-competition”
51st Drosophila Research Conference (口頭発表)、2010年4月9日、アメリカ・ワシントンDC

2. Kanemoto Y, Ohsawa S, Igaki T
“Genetic analysis of tumor progression caused by dysregulation of the endocytic machinery”
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本

生化学会大会 合同大会 (口頭発表)、2010年12月7日、神戸ポートアイランド(神戸)

3. Nakamura M, Ohsawa S, Sato Y, Nagao A, Igaki T

“Genetic screen in *Drosophila* for tumor growth and malignancy”

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (口頭発表)、2010年12月9日、神戸ポートアイランド(神戸)

4. Enomoto M, Sato Y, Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T

“RNA processing defects cooperate with oncogenic Ras to stimulate non-cell autonomous tumor growth in *Drosophila*”

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (ポスター発表)、2010年12月9日、神戸ポートアイランド(神戸)

5. Takino K, Ohsawa S, Igaki T

“Analyzing cell competition during normal development in *Drosophila*”

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (ポスター発表)、2010年12月9日、神戸ポートアイランド(神戸)

6. Kizawa D, Ohsawa S, Takino K, Enomoto M, Igaki T

“Genetic screen for genes that regulate cell competition”

第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (ポスター発表)、2010年12月9日、神戸ポートアイランド(神戸)

7. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T

“Genetic analysis of cell-elimination that regulates intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance in *Drosophila*”

The 16th International Conference of the ISD (ポスター発表)、2010年11月15日～18日、奈良県新公会堂(奈良)

8. Igaki T, Kanemoto Y, Ohsawa S

“Genetic analysis of tumor progression caused by dysregulation of the endocytic machinery”

The 16th International Conference of the ISD (ポスター発表)、2010年11月15日～18日、奈良県新公会堂(奈良)

9. Ohsawa S, Takino K, Igaki T

“Genetic analysis of cell-elimination that

regulates intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance in *Drosophila*”

第43回日本発生物学会年会 (ポスター発表)、2010年6月21日～23日、国立京都国際会議場(京都)

10. Takino K, Ohsawa S, Igaki T

“A non-cell autonomous genetic screen for identifying regulators of cell competition”

第43回日本発生物学会年会 (ポスター発表)、2010年6月21日～23日、国立京都国際会議場(京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/igalab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 志津江 (OHSAWA SHIZUE)

神戸大学・大学院医学研究科・グローバルCOE 研究員

研究者番号：80515065

(2) 研究協力者

井垣 達吏 (IGAKI TATSUSHI)

神戸大学・大学院医学研究科・特命准教授
研究者番号：00467648