

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15098

研究課題名（和文）FGF21を介した細胞競合による生体内発がん抑制機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the tumor-suppressive mechanism driven by FGF21-mediated cell competition

研究代表者

小川 基行（Ogawa, Motoyuki）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任研究員

研究者番号：10903198

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：細胞競合とは、異なる性質を持った同種の細胞が生存を争う現象である。近年、発がん初期段階においてがん変異細胞が細胞競合により正常組織から排除されることが示され、新たな内在性がん抑制機構の一つとして注目されている。本研究では、正常マウスの肝臓に簡便かつ迅速に細胞競合を誘導可能な新たなin vivo細胞競合解析系を構築した。さらに、培養細胞を用いた解析で発見した細胞競合制御因子FGF21が、生体内でも細胞競合を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築した簡便かつ迅速なin vivo細胞競合解析系は、生体内の細胞競合を活性化する創薬開発を目的としたin vivo創薬スクリーニングのための新規プラットフォームになる可能性がある。また、FGF21による細胞競合を活性化することで競合的細胞間相互作用によるがん変異細胞の排除を促進する新規がん治療戦略を提示した。

研究成果の概要（英文）：Cell competition is a phenomenon in which cells with different properties compete for survival. Recently, it has been shown that cancerous cells are eliminated from normal tissues through cell competition in the early stages of cancer development, highlighting it as a novel endogenous tumor-suppressive mechanism. In this study, we established a new in vivo cell competition model that enables the easy and rapid induction of cell competition in the livers of normal mice. Furthermore, we demonstrated that FGF21, identified as a regulator of cell competition in vitro, induces cell competition in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞競合 FGF21 発がん 細胞間相互作用 細胞死

1. 研究開始当初の背景

上皮組織は常に外界環境に晒されており、外部からの物理化学的ストレスを絶え間なく受ける。こうしたストレスは正常上皮細胞に遺伝子変異を誘発し、異常な増殖能や浸潤能を獲得したがん変異細胞へと形質転換させる。がん変異細胞は後に悪性化し腫瘍を形成することから、正常組織から早期に発見・排除される必要がある。近年、こうしたがん変異細胞や不良細胞などが周囲の正常細胞の働きで組織から積極的に排除される「細胞競合」という現象が

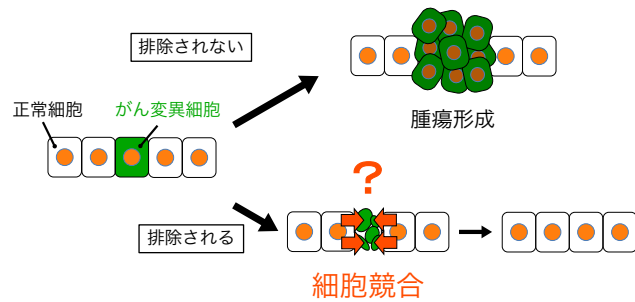


図1. 研究の背景

示されている[Baker, *Nat. Rev. Genet.*, 2020] (図1)。この現象は、上皮組織が自律的に自身の構造・機能を最適化する原理であると想定される。そのためこの分子機構の解明は、新たながん治療戦略の構築に繋がるのみならず、上皮組織の自律的な恒常性維持機構の理解に繋がる研究課題である。これまで、ワールブルグ効果様の代謝変化が細胞競合を誘導することや[Kon *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 2017]、表皮幹細胞の細胞競合が皮膚の若さと恒常性を維持することが示されたが[Liu *et al.*, *Nature*, 2019]、細胞競合を駆動する中心分子や制御機構の全貌は不明である。

これまで研究代表者は、哺乳類細胞を用いてがん抑制因子 *Scrib* を欠損したがん変異細胞が排除される細胞競合モデルを解析してきた。最近、がん変異細胞から分泌される線維芽細胞増殖因子 *FGF21* が細胞競合を誘導することを発見した[Ogawa *et al.*, *Curr. Biol.*, 2021]。FGF21 は、いわば“Kick-me-out”シグナルとして周囲の正常細胞を誘引することで、がん変異細胞が物理的に圧迫され排除されるという、液性因子による新たな細胞競合機構を提唱した(図2)。さらに、FGF21 は *Scrib* 欠損で活性化する ASK1-p38 経路を介して分泌されることを見出した。

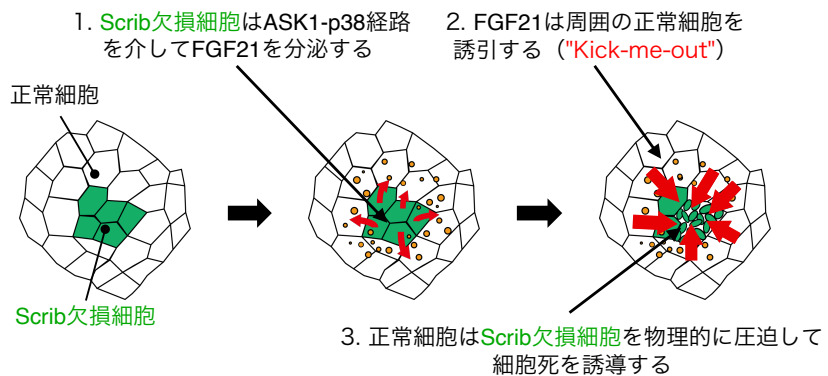


図2. 研究代表者が発見した細胞競合機構

このように研究代表者は、FGF21 を起点として細胞競合の分子機構の一端を解明したが、依然としてその理解は不十分である。特に、細胞競合で中心的に働くシグナル伝達経路や特異的に発現・機能するマーカー分子は未同定であり、当該分野の大きな課題である。また、従来細胞競合をマウスレベルで解析する場合、遺伝子変異を上皮組織の一部に誘導する複雑な遺伝子改変マウスが必要であり、当該分野の大きな障壁となっていた。そこで、マウスレベルで簡便かつ迅速に細胞競合を誘導可能な新たな *in vivo* 細胞競合解析系を構築し、FGF21 による細胞競合が個体レベルで起こることを実証してその分子機構を解析しようと考えた。

2. 研究の目的

本研究では研究代表者が独自に見出した知見を基に、マウスレベルの細胞競合解析系を新たに構築し、FGF21 が生体内で細胞競合を誘導することを実証する。

3. 研究の方法

本研究では、正常マウスの肝臓に簡便かつ迅速に細胞競合を誘導可能な新たな細胞競合解析系を構築する。具体的な手法としては、プラスミドを含んだ大量の生理食塩水を急速尾静注することによる高水圧により外来遺伝子を肝細胞に導入するハイドロダイナミックインジェクション法と外来遺伝子をゲノムへ挿入する *Sleeping Beauty* 法を組み合わせ、正常マウスの肝細胞集団中の一部に遺伝子導入を行う。導入するベクターとしては、① *Scrib* の shRNA 及び GFP を発現するベクターと② トランスポザーゼとルシフェラーゼが発現するベクターの2つを用いる。トランスポザーゼにより、*Scrib* shRNA 及び GFP がゲノムに挿入され長期発現が可能になる。また、*Scrib* が発現抑制された肝細胞を GFP で標識して正常肝細胞と区別可能にする。さらに、ルシフェラーゼも同時に発現させることで、肝臓の lysate を回収してルシフェラーゼ活性を測定することで、遺伝子導入された *Scrib* 欠損肝細胞の存在量を簡便に推定することができる。この方法により、正常肝細胞集団中の一部に *Scrib* 欠損肝細胞を誘導する細胞競合環境を誘導し、

Scrib 欠損細胞が細胞競合により排除されるか検討した。また、Scrib 欠損細胞で FGF21 が発現上昇するか免疫組織化学染色により検討した。さらに、Scrib shRNA と同時に FGF21 shRNA を発現するベクターも作成し、培養細胞と同様に生体内においても細胞競合による Scrib 欠損肝細胞の排除に FGF21 が必要であるか検討した。

4. 研究成果

本研究課題の遂行の結果、正常マウスの肝臓に簡便かつ迅速に細胞競合を誘導可能な新たな *in vivo* 細胞競合解析系を構築した (図3)。この系を用いて、研究代表者が培養細胞を用いて発見した新規細胞競合制御因子 FGF21 が生体内でも細胞競合の誘導に必要であることを見出した。現在、これらの研究成果を発展させた研究を令和 6 年度より開始する若手研究において実施する予定であり、成果がまとまり次第論文を投稿する予定である。

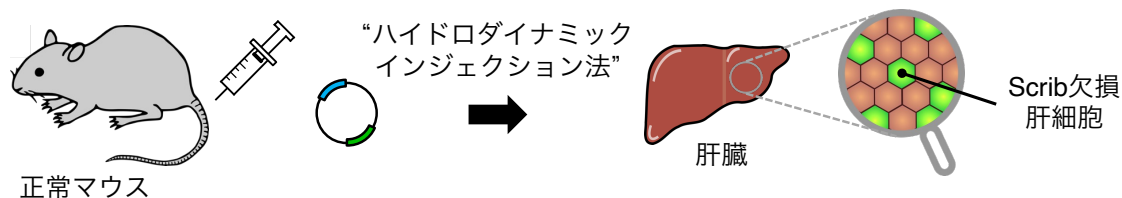


図3. 構築した *in vivo* 細胞競合解析系の概念図

(1) 新規 *in vivo* 細胞競合解析系の構築

まず、Scrib shRNA 及び GFP が発現するベクターを新たに構築した。このベクターとトランスポザラーゼ及びルシフェラーゼが発現するベクターを生理食塩水に溶解し、正常マウスにハイドロダイナミックインジェクション法により導入した。インジェクション効率を定量するため、ハイドロダイナミックインジェクション 6 日後に肝臓を取り出し、肝細胞集団の GFP 陽性割合を定量したところ、およそ 20–30% の肝細胞で GFP 陽性となることが分かった。また、単離肝細胞において免疫染色を行い、GFP 陽性の肝細胞で Scrib が発現抑制されていることを確認した。以上から、正常肝細胞集団中の一部に GFP 陽性の Scrib 欠損細胞が誘導された細胞競合環境を確立することに成功した。

(2) 構築した系を用いて個体レベルで細胞競合が起こることの実証

続いて、構築した系において Scrib 欠損肝細胞が正常組織から排除されるか検討した。まず、ハイドロダイナミックインジェクション 6 日後においては、Control shRNA が発現するベクターを導入した場合と Scrib shRNA が発現するベクターを導入した場合で GFP 陽性の肝細胞数に大きな変化は観察されなかった。実際、ルシフェラーゼ活性を定量することで遺伝子導入された肝細胞を定量したところ、Control shRNA が発現するベクターと Scrib shRNA が発現するベクターを導入した場合で大きな差は観察されなかった。

一方で、ハイドロダイナミックインジェクション 12 日後においては、Control shRNA が発現するベクターを導入した場合と比較して、Scrib shRNA を発現するベクターを導入した場合には GFP 陽性の肝細胞数が大きく減少した。実際に、Control shRNA が発現するベクターを導入した場合と比較して、Scrib shRNA が発現するベクターを導入した場合にはルシフェラーゼ活性が顕著に減少しており、Scrib 欠損肝細胞が減少することが示された。したがって、正常肝細胞集団中に誘導された Scrib 欠損肝細胞が日数経過とともに細胞競合により排除される可能性が示唆された。

(3) 生体内の細胞競合における FGF21 の必要性の検証

これまで研究代表者が独自に解析してきた細胞競合制御因子 FGF21 が生体内においても Scrib 欠損細胞の排除に必要であるか検討した。培養細胞と同様に、Scrib 欠損細胞で FGF21 が発現上昇するか免疫組織化学染色により検討したところ、Control shRNA が発現するベクターを導入した場合と比較して Scrib shRNA が発現するベクターを導入した場合には、GFP 陽性の肝細胞で FGF21 が顕著に発現上昇していた。そこで、Scrib 欠損細胞で発現上昇する FGF21 が細胞競合による Scrib 欠損細胞の排除に必要であるか検討した。Scrib shRNA と FGF21 shRNA が同時に発現するベクターを新たに構築してハイドロダイナミックインジェクションを行った。その結果、FGF21 を発現抑制した Scrib 欠損細胞は、FGF21 を発現抑制していない Scrib 欠損細胞と比較してハイドロダイナミックインジェクション後の残存数が多いことが分かった。実際に、FGF21 を発現抑制した Scrib 欠損細胞を誘導した肝臓の lysate では、Scrib 欠損細胞を誘導した肝臓の lysate で確認されたルシフェラーゼ活性の減弱が抑制された。すなわち、Scrib 欠損肝細胞で発現上昇する FGF21 が、生体内の細胞競合における Scrib 欠損細胞の排除に必要であることが示された。

本研究により、正常マウスに簡便かつ迅速に細胞競合を誘導可能な新たな *in vivo* 細胞競合解析系を構築した。さらに、これまで研究代表者が培養細胞を用いて独自に解析してきた細胞競合制御因子 FGF21 が生体内においても細胞競合を誘導することを実証した。本研究で構築した *in*

*vivo*解析系は、生体内の細胞競合を活性化する創薬開発を目的とした *in vivo*創薬スクリーニングの新規プラットフォームになる可能性がある。また、**FGF21**による細胞競合を活性化することで競合的細胞間相互作用によるがん変異細胞の排除を促進する新規がん治療戦略を提示した。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Ito Shoko, Kuromiya Keisuke, Sekai Miho, Sako Hiroaki, Sai Kazuhito, Morikawa Riho, Mukai Yohei, Ida Yoko, Anzai Moe, Ishikawa Susumu, Kozawa Kei, Shirai Takanobu, Tanimura Nobuyuki, Sugie Kenta, Ikenouchi Junichi, Ogawa Motoyuki, Naguro Isao, Ichijo Hidenori, Fujita Yasuyuki	4. 巻 120
2. 論文標題 Accumulation of annexin A2 and S100A10 prevents apoptosis of apically delaminated, transformed epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2307118120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2307118120	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Motoyuki Ogawa, Mina Yano, Isao Naguro, Hidenori Ichijo
2. 発表標題 Elucidation of the molecular mechanism of a tumor-suppressive cell competition triggered by a “kick-me-out” signal, FGF21
3. 学会等名 第41回札幌国際がんシンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 “Kick-me-out” シグナル、FGF21の発現誘導を介したがん抑制型細胞競合の分子機構の解明
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行、矢野未菜、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 "Kick-me-out"シグナル、FGF21の発現誘導を介したがん抑制型細胞競合の分子機構の解明
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野未菜、小川基行、一條秀憲
2. 発表標題 ゲノムワイドsiRNAスクリーニングによる哺乳類細胞競合制御因子の網羅的探索
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行
2. 発表標題 FGF21を介したがん抑制型細胞競合の分子機構の解明
3. 学会等名 ムーンショット目標2 生体内ネットワークの理解による難治性がん克服に向けた挑戦 若手育成プログラムA 第2回 若手ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行、矢野未菜、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 S-ニトロシル化を介した細胞間の競合的コミュニケーション："kick-me-out"シグナル、FGF21誘導で駆動されるがん抑制型細胞競合
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行、矢野未菜、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 FGF21によるがん抑制型細胞競合の分子機構の解明
3. 学会等名 第8回日本メカノバイオロジー学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行、矢野未菜、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 “Kick-me-out” シグナル、FGF21を介したがん抑制型細胞競合の分子機構の解明
3. 学会等名 第11回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川基行、名黒功、一條秀憲
2. 発表標題 がん抑制型細胞競合における“kick-me-out” シグナル、FGF21の発現制御機構の解析
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motoyuki Ogawa, Isao Naguro, Hidenori Ichijo
2. 発表標題 S-nitrosylation of ASK1 induces FGF21 as a "kick-me-out" signal to cause a tumor-suppressive cell competition
3. 学会等名 Cell Symposia "Hallmarks of Cancer (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小川基行、一條秀憲
2. 発表標題 リン酸化による細胞競合の制御機構：FGF21誘導を介した"kick-me-out"シグナル
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Motoyuki Ogawa, Isao Naguro, Hidenori Ichijo
2. 発表標題 NOS3-mediated S-nitrosylation induces FGF21 as a "kick-me-out" signal to cause a tumor-suppressive cell competition
3. 学会等名 Gordon Research Conference "Directed cell migration" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 矢野未菜、小川基行、一條秀憲
2. 発表標題 哺乳類細胞競合における"kick-me-out"シグナル、FGF21の一般性の検証
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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