

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15102

研究課題名(和文) Hippo経路変異が誘発するスーパーコンペティションの分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis of supercompetition induced by Hippo pathway mutations

研究代表者

永田 理奈 (Nagata, Rina)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：80912493

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)：ショウジョウバエ上皮組織に生じたYki活性化細胞は、自身が増殖するだけでなく周囲の正常細胞に細胞死を誘導するスーパーコンペティションを引き起こす。これまでに、Yki活性化細胞ではそのターゲットであるmicroRNA bantamを介してTORシグナルが活性化しており、このシグナルが正常細胞の細胞死誘導に必要なことを見いだしていた。重要なことに、bantam過剰発現細胞はスーパーコンペティションを引き起こすのに十分であったが、TORシグナルを活性化させるだけでは不十分であった。そこで本研究では、bantamの下流で正常細胞の細胞死誘導に必要なシグナルを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スーパーコンペティションを引き起こす十分条件を明らかにできれば、これを人為的に制御することで新たながん治療戦略の基盤を構築できる可能性がある。さらには本研究を推進することで、組織中の適応度の高い細胞が低い細胞を排除するといった新たな組織恒常性維持の分子基盤を明らかにすることができる。

研究成果の概要(英文)：Yorkie(Yki)-activated cells stimulates cell proliferation and survival, as well as non-autonomous induction of cell death in surrounding cells in Drosophila epithelium, which is called 'super-competition'. Previously, we found that Yki-activated cells activate TOR signaling via microRNA bantam, which is required for cell death in surrounding wild-type cells. Importantly, bantam-overexpressing cells is sufficient to cause super-competition, while TOR activation is not sufficient. In this study, we dissected the mechanism by which bantam induces cell death in wild-type cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：スーパーコンペティション 細胞死 オートファジー ショウジョウバエ bantam

1. 研究開始当初の背景

がん抑制経路である Hippo 経路は、ショウジョウバエから哺乳類まで進化的に保存されたキナーゼ経路であり、転写共役因子 Yki/YAP を抑制する。そのため、Hippo 経路が不活化した細胞では Yki/YAP が活性化し、これにより細胞増殖や細胞死抑制にかかわる様々な遺伝子の転写が誘導されて腫瘍が形成される。一方、ショウジョウバエ上皮組織に生じた Yki 活性化細胞は周囲の正常細胞に細胞死を誘導するスーパーコンペティションを引き起こすことが知られている。スーパーコンペティションは細胞競合の一種であり、組織中の適応度の高い細胞（勝者）が適応度の低い細胞（敗者）に細胞死を引き起こして排除する現象である（Nagata and Igaki, *FEBS Lett.*, 2024）。スーパーコンペティションは、がん細胞が周囲の正常細胞を駆逐してがん化を促進するのに重要な役割を果たすことが示されているため、これを制御することで新たながん治療への応用が期待される。しかしながら、これまで Yki の活性化がスーパーコンペティションを引き起こす分子メカニズムやその腫瘍形成における役割はわかっていなかった。そこで、研究代表者らはこれらを明らかにするために、ショウジョウバエ Hippo 経路変異体を用いた遺伝学的スクリーニングを行い、Hippo 変異誘導性の腫瘍形成を抑制するサプレッサー系を探索した。その結果、Hippo 変異細胞の周りの正常細胞にオートファジー関連遺伝子の変異が誘導されると、Hippo 変異クローンの腫瘍形成が顕著に抑制された。実際に、Hippo 変異細胞に近接する正常細胞でオートファジーの活性が上昇しており、このオートファジーを阻害すると正常細胞の細胞死が抑制されることがわかった。さらなる解析により、Hippo 変異細胞では Yki のターゲットである microRNA (miRNA) *bantam* を介して TOR シグナルが活性化しており、この TOR シグナル依存的なタンパク質合成の上昇が周りの正常細胞の細胞死誘導に必要であることがわかった（図 1; Nagata *et al.*, *Curr Biol.*, 2022）。ここで重要なことに、*bantam* を過剰発現するだけで周囲の正常細胞に細胞死が引き起こされたため、*bantam* がスーパーコンペティションを引き起こすのに十分であることがわかった。一方で、TOR シグナルを活性化するだけではスーパーコンペティションは引き起こされなかった。したがって、*bantam* の下流で TOR シグナルに加えて何らかのシグナルが正常細胞の細胞死誘導に必要であることがわかった。

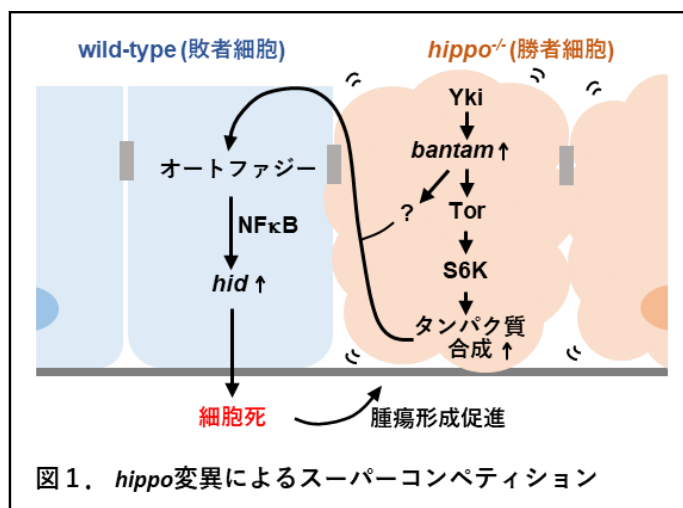


図 1. *hippo*変異によるスーパーコンペティション

2. 研究の目的

本研究では、ショウジョウバエ上皮をモデル系とし、*bantam* 過剰発現細胞が周囲の正常細胞に細胞死を引き起こす（つまり *bantam* がスーパーコンペティションを引き起こすのに十分である）という研究代表者らの予備的知見に基づき、これに着目した遺伝学的解析を行うことで正常細胞（敗者細胞）に細胞死が誘導される分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究の核心をなす問いは、「*bantam* の下流で TOR シグナルに加えて周りの正常細胞の細胞死誘導に必要なシグナル因子は何か」である。これを明らかにするために、*bantam* に着目した遺伝学的解析を行うことで、敗者細胞で細胞死が引き起こされる分子メカニズムを解析する。これにより、スーパーコンペティションを引き起こす十分条件を明らかにできれば、これを人為的に制御することで新たながん治療戦略の基盤を構築できる可能性がある。さらには本研究を推進することで、組織中の適応度の高い細胞が低い細胞を排除するといった新たな組織恒常性維持の分子基盤を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ上皮をモデル系として用い、スーパーコンペティション時に Hippo 変異細胞に近接した正常細胞で細胞死が誘導される分子メカニズムを明らかにするための2種類の遺伝学的スクリーニングを行った。一つ目のスクリーニングでは、*bantam* 過剰発現細胞の周囲の正常細胞の細胞死が抑制される系統を探索した。具体的には、まず一次スクリーニングでは *bantam* 過剰発現細胞内に約 1500 遺伝子の Crispr-Cas9 誘導性のホモ変異を一つ一つ導入していた際に、*bantam* の複眼の腫瘍形成が抑制されるサプレッサー変異を探索した。その後、二次スクリーニングでは一次スクリーニングで得られた変異について、*bantam* 過剰発現細胞内に変異を誘導した複眼原基の細胞死を観察し、正常細胞の細胞死が抑制される系統を探索した。以上の二段階のスクリーニングにより、*bantam* によるスーパーコンペティションに必要な遺伝子群を網羅的に探索した。

もう一つのスクリーニングでは、TORの活性化と*bantam*のターゲット遺伝子のノックダウンを同時に誘導し、この周囲の正常細胞に細胞死が引き起こされる遺伝子を探索した。具体的には、*Tsc1*のノックダウンによりTORを活性化した細胞で、データベースから見いだした143個の*bantam*のターゲット遺伝子の一つずつノックダウンして細胞死を観察し、周囲の正常細胞に細胞死が誘導される系統を探索した。これにより、スーパーコンペティションを引き起こす十分条件を探索した。

4. 研究成果

一つ目のスクリーニングにより、*bantam* 過剰発現細胞の周囲の正常細胞の細胞死が抑制される系統を探索した。その結果、3 遺伝子の強力なサプレッサー (*supercompetition-suppression; scs*) が得られた (図2)。このうち最も強い表現型を示した *scs-1* 変異を誘導した組織について TOR シグナルやタンパク質合成能の解析を進めた。その結果、*scs-1* 変異を誘導した際の *bantam* 過剰発現細胞の TOR シグナル活性やタンパク質合成能に変化

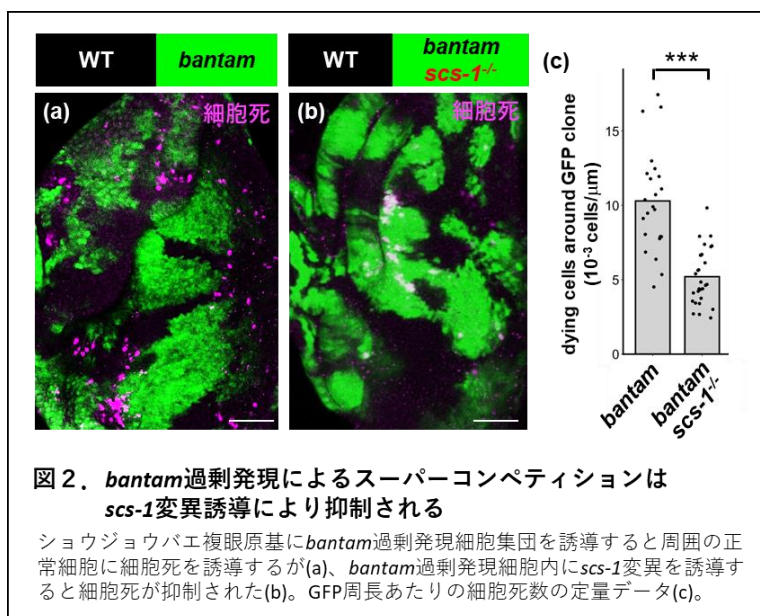


図2. *bantam*過剰発現によるスーパーコンペティションは *scs-1*変異誘導により抑制される

ショウジョウバエ複眼原基に*bantam*過剰発現細胞集団を誘導すると周囲の正常細胞に細胞死を誘導するが(a)、*bantam*過剰発現細胞内に*scs-1*変異を誘導すると細胞死が抑制された(b)。GFP周長あたりの細胞死数の定量データ(c)。

は無かった。つまり、*scs-1* 変異によって変化するシグナルは、本研究で解明を目指す「TOR シグナルに加えて必要な別のシグナル」そのものであると考えられた。ここで、*scs-1* はヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子をコードする遺伝子であることから、この変異によって変動する遺伝子群を解析することで、変化するシグナルを明らかにできる可能性が高い。そこで今後は、*bantam* 過剰発現細胞および *bantam* + *scs-1* 変異細胞を誘導した組織の RNA-seq 解析を行うことで、これら細胞間で発現変動する遺伝子群を探索する。変動した遺伝子について、ノックダウン系統や過剰発現系統を用いた遺伝学的解析を行うことで、*bantam* の下流でスーパーコンペティションに必要なシグナルを明らかにする。すでに RNA-seq 解析を行うための RNA 抽出が完了しており、すぐに解析を開始できる状態である。

二つ目のスクリーニングにより、TOR の活性化と *bantam* のターゲット遺伝子のノックダウンを同時に誘導し、周囲の正常細胞に細胞死が引き起こされる遺伝子を探索した。しかしながら、スーパーコンペティションを引き起こす遺伝子を見いだすことはできなかった。すなわち、*bantam* の標的遺伝子のうちスーパーコンペティションを引き起こすのに必要な遺伝子が2つ以上あると考えられた。そこで今後は、まず *bantam* の標的遺伝子の「大量ノックダウン」を行い、スーパーコンペティションが起きる条件を探索する。具体的には、*bantam* の複数の標的遺伝子の shRNA をタンデムに並べたベクターを作製してトランスジェニックフライ系統を樹立し、異

なる shRNA セットをもつトランスジェニックフライ同士の掛け合わせと部位特異的 DNA 組み換え技術を組み合わせることで、これら標的遺伝子の shRNA セットを次々とつなぎ合わせていく。これにより、*bantam* の標的候補遺伝子の同時大量ノックダウン（原理的には 143 遺伝子の同時ノックダウンが可能）を実現する（本手法は東京理科大学・近藤周 准教授が開発したもので、近藤氏との共同研究で本研究を推進中である）。スーパーコンペティションが引き起こされる条件を見いだしたのち、shRNA を一つ一つ除いていき、スーパーコンペティションが起こらなくなる遺伝子を探索する。このようにして、スーパーコンペティションを引き起こすのに十分な遺伝子を探索する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 永田理奈、井垣達吏	4. 巻 31
2. 論文標題 細胞競合による不良細胞除去のしくみ	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 炎症と免疫 3月号	6. 最初と最後の頁 14-17
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 Rina Nagata, Tatsushi Igaki	4. 巻 598
2. 論文標題 Cell competition: emerging signaling and unsolved questions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 379-389
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14822.	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10件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 永田理奈
2. 発表標題 細胞競合を駆動する細胞間の質の差
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagata R, Kido A, Zang L, Wang Y, Deng M, Akai N, Kondo S, Saito K, Matsuyama M, Kobayashi T, Ohsawa S, Yan Y, Igaki T
2. 発表標題 Mechanism of non-cell autonomous autophagy that governs cell competition
3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nagata R, Kido A, Zang L, Wang Y, Deng M, Kondo S, Saito K, Matsuyama M, Kobayashi T, Yan Y, Igaki T
2. 発表標題 細胞競合を駆動する細胞非自律的なオートファジー誘導メカニズム
3. 学会等名 第45回分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 永田理奈
2. 発表標題 細胞非自律的オートファジー誘導を介した腫瘍制御機構
3. 学会等名 第9回がん代謝研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田理奈
2. 発表標題 Genetic analysis of the mechanism of cell competition
3. 学会等名 第1回大津ショウジョウバエ研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田理奈、城戸 明日香、Lina Zang、Ying Wang、Mingxi Deng、近藤 周、齋藤 邦暁、松山 誠、小林 朋絵、Yan Yan、井垣 達史
2. 発表標題 細胞競合を駆動する細胞非自律的オートファジーの誘導メカニズム
3. 学会等名 学術変革領域(A)「競合的コミュニケーションから迫る 多細胞生命システムの自律性」 第3回領域班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rina Nagata, Asuka C Kido, Lina Zang, Ying Wang, Mingxi Deng, Shu Kondo, Kuniaki Saito, Makoto Matsuyama, Tomoe Kobayashi, Yan Yan, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Non-cell autonomous autophagy that drives cell competition
3. 学会等名 第3回研究交流サロン
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rina Nagata, Asuka C Kido, Nanami Akai, Shu Kondo, Kuniaki Saito, Makoto Matsuyama, Tomoe Kobayashi, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Non-cell autonomous autophagy that drives cell competition
3. 学会等名 27th European Drosophila Research Conference (EDRC2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田理奈、城戸 明日香、Lina Zang、Ying Wang、Mingxi Deng、近藤 周、齋藤 邦暁、松山 誠、小林 朋絵、Yan Yan、井垣 達史
2. 発表標題 細胞競合を駆動する細胞非自律的オートファジーの誘導メカニズム
3. 学会等名 第15回オートファジー研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田理奈、城戸 明日香、Lina Zang、Ying Wang、Mingxi Deng、近藤 周、齋藤 邦暁、松山 誠、小林 朋絵、Yan Yan、井垣 達史
2. 発表標題 Genetic analysis of non-cell autonomous autophagy that drives cell competition
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

井垣研hp
<https://igakilab.lif.kyoto-u.ac.jp/>

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