

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20626

研究課題名（和文）人工受容体synNotchを用いた細胞競合制御因子の探索

研究課題名（英文）Screening for identifying novel cell competition regulators using synNotch system

研究代表者

佐井 和人（Sai, Kazuhito）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：30962310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究期間において、申請者は正常上皮細胞がどのようにがん細胞の出現を感知し排除しているか、その機構を検討した。解析の結果、正常上皮細胞は生じたがん細胞に特有の機械的性質（大きさや細胞膜の張力）を感知することでがん細胞を認識していることが明らかとなった。さらに、この機構にかかわる多数の新規制御因子を同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、正常上皮細胞ががん細胞の出現を感知し、上皮組織から押し出す形で排除するという現象が知られている。このがん防御機構において、正常細胞はどのようにがん細胞の出現を感知しているのか、さらに、その結果正常細胞でどのような変化が起こりがん細胞の排除につながるのかという詳細な機構は不明瞭であった。本研究は、このがん細胞排除機構において、がん細胞特有の機械的性質が感知に重要であることを示すことで、この経路において重要な課題であったがん細胞認識機構の一端を示すことができた。今回得られた知見は新たながん細胞検知手法の開発などにもつながると期待される。

研究成果の概要（英文）：This research aimed to investigate how normal epithelial cells detect and eliminate newly emerging cancer cells. The analysis revealed that normal epithelial cells recognize cancer cells by sensing their distinct mechanical properties, such as size and plasma membrane tension. Besides, we could successfully identify novel factors that regulate this cancer defense system.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん 細胞競合 メカノトランスダクション

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞からなる組織において、適応度が変化した細胞は周囲の細胞と生存を競い合い、適応度の低い細胞は周囲の細胞の作用により積極的に排除される。この現象はショウジョウバエにおいて発見され、細胞競合と呼ばれている。申請者のグループでは、このような細胞競合が哺乳類細胞、特に正常上皮細胞とがん原性の変異細胞の間でも見られることを発見した。培養上皮細胞層の中にがん遺伝子である活性型 Ras や Src を発現する細胞が現れると、周囲の正常細胞はそれを認識し、変異細胞を管腔側へ押し出して排除する様子が観察される (図1A) [Hogan et al., Nat. Cell Biol. 2009; Kajita et al., J. Cell Sci. 2010]。また、がん抑制遺伝子 Mahjong や Scribble を欠損した細胞は、周囲の正常細胞の作用により細胞死を誘導されて排除される (図1B) [Tamori et al., PLoS Biol. 2010; Norman et al., J. Cell Sci. 2012]。さらに、活性型 Ras を上皮組織にモザイク状に誘導できるマウスを用いて、細胞競合による変異細胞の排除が生体内においても起こることが示されている [Kon et al., Nat. Cell Biol. 2017]。これらの知見は、正常上皮細胞が組織中に生じたがん原性の変異細胞を認識し排除する機能を持つことを示唆しており、申請者のグループはこの細胞競合を介した変異細胞排除機構を EDAC (Epithelial Defense Against Cancer) と命名した。これまでの研究から、変異細胞と隣接した正常細胞内において Filamin や Vimentin などの細胞骨格の再構成が起きることで変異細胞の管腔側への逸脱が促進されるという知見が得られている [Kajita et al., Nat. Commun. 2014]。しかし、種々の変異細胞排除における共通の分子機構は解明されていない。さらに、正常上皮細胞がどのような機構を介して隣接する変異細胞を認識しているのかはほとんど分かっておらず、EDAC の分子機序を解明する上で重要な課題となっている。

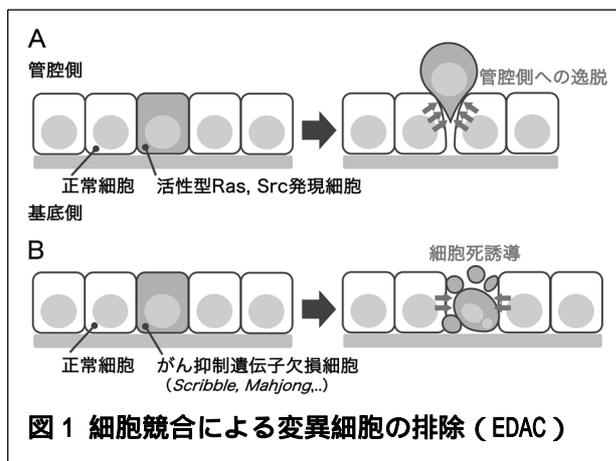


図1 細胞競合による変異細胞の排除 (EDAC)

また、がん抑制遺伝子 Mahjong や Scribble を欠損した細胞は、周囲の正常細胞の作用により細胞死を誘導されて排除される (図1B) [Tamori et al., PLoS Biol. 2010; Norman et al., J. Cell Sci. 2012]。さらに、活性型 Ras を上皮組織にモザイク状に誘導できるマウスを用いて、細胞競合による変異細胞の排除が生体内においても起こることが示されている [Kon et al., Nat. Cell Biol. 2017]。これらの知見は、正常上皮細胞が組織中に生じたがん原性の変異細胞を認識し排除する機能を持つことを示唆しており、申請者のグループはこの細胞競合を介した変異細胞排除機構を EDAC (Epithelial Defense Against Cancer) と命名した。これまでの研究から、変異細胞と隣接した正常細胞内において Filamin や Vimentin などの細胞骨格の再構成が起きることで変異細胞の管腔側への逸脱が促進されるという知見が得られている [Kajita et al., Nat. Commun. 2014]。しかし、種々の変異細胞排除における共通の分子機構は解明されていない。さらに、正常上皮細胞がどのような機構を介して隣接する変異細胞を認識しているのかはほとんど分かっておらず、EDAC の分子機序を解明する上で重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

- (1) 細胞競合によるがん細胞排除機構の新規制御因子を同定し、シグナル伝達経路を明らかにする。さらに、明らかになった細胞競合制御機構がさまざまな変異細胞に対して普遍的に機能するか検討する。
- (2) 正常上皮細胞ががん細胞を感知する機構を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 近年開発された人工受容体 synNotch を利用することで、変異細胞に接する正常細胞が標識される新規培養系を構築する (図2)。このシステムを利用し、正常・がん細胞共培養系において、変異細胞に隣接した正常細胞で特異的に発現が変動する遺伝子を RNAseq 解析を用いて調べる。研究には細胞競合が観察されるマウス乳腺上皮由来の Eph4 細胞を用いる。

(2) RNAseq スクリーニングで得られた因子が細胞競合の制御に関わっているか、ノックダウンや阻害剤を用いて検討する。

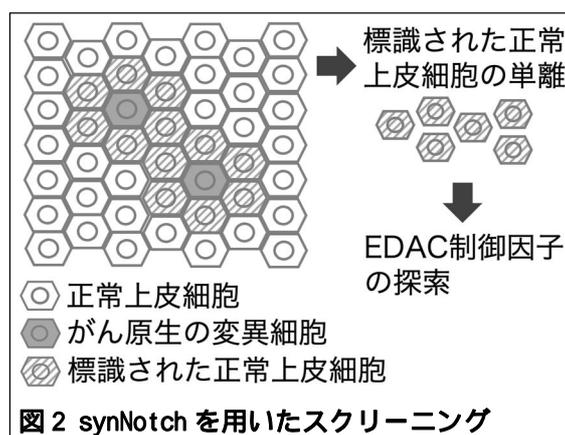


図2 synNotch を用いたスクリーニング

(3) 上記解析で得られた因子を細胞競合マーカーとし、どのような刺激が細胞競合シグナルを駆動するか検討することで、正常細胞によるがん細胞認識機構を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞競合によって排除されることがわかっている HRasV12 細胞をがん細胞のモデルとし、synNotch システムを用いてこの細胞と隣接する正常細胞内での遺伝子発現変化を調べたところ、さまざまな遺伝子の発現上昇が見られた。得られた発現変動遺伝子の細胞競合における機能解析を行ったところ、転写因子、リン酸化酵素、プロテアーゼを含む、多数の新規細胞競合制御因子の同定に成功した。今回同定された転写因子 X の阻害剤は、正常細胞による HRasV12 細胞の排除を優位に抑制した(図3)。また、正常細胞側でリン酸化酵素 Y をロックダウンすると、同様に HRasV12 細胞の排除が顕著に抑制された(図3)。これらの結果は、本研究によって同定された新規因子群が、実際に細胞競合に重要であることを示している。

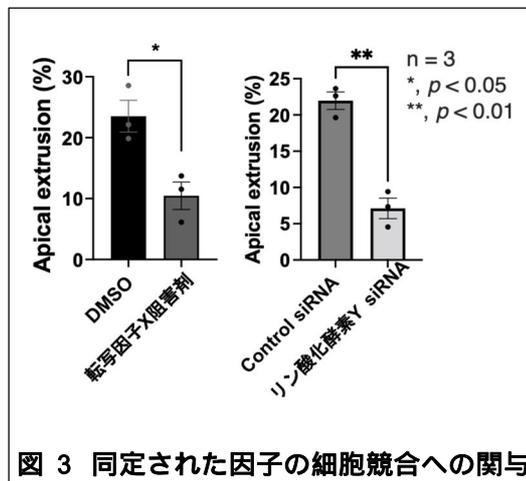


図3 同定された因子の細胞競合への関与

(2) 正常細胞と HRasV12 細胞間の細胞競合制御因子の多くは、Src 変異細胞と共培養した際にも正常細胞側で同様に発現上昇が見られた。このことは、今回同定された細胞競合制御機構がある程度普遍的に変異細胞の排除に関わっていることを示唆している。

(3) スクリーニングによって同定された新規細胞競合制御因子 X は、細胞競合において他の制御因子の転写を促進することで細胞競合に寄与していることが示された。

(4) 今回確立された細胞競合制御経路は、機械刺激にตอบสนองして活性化することが明らかとなった。野生型 EpH4 細胞に機械刺激(ストレッチアッセイ)をかけると、細胞競合の際に見られるものと同様のシグナルの活性化が観察された。我々の研究グループは、正常細胞と変異細胞細胞の競合において、境界面での細胞膜張力の上昇が観察されることを報告している。これらの知見から、正常細胞が変異細胞の物理的性質の変化を感知することで、細胞競合シグナルを駆動していると考えられる(図4)。興味深いことに、張力を介したシグナル伝達に重要な役割を持つ ERK 経路を阻害すると、細胞競合及びストレッチアッセイの両方においてこのシグナルが完全に抑制された。これらの結果は、細胞競合においてメカノトランスダクションが重要であることを強く示唆している。本研究の成果は、これまで不明瞭であった細胞競合におけるがん細胞の検知機構の一端を明らかにするものである。

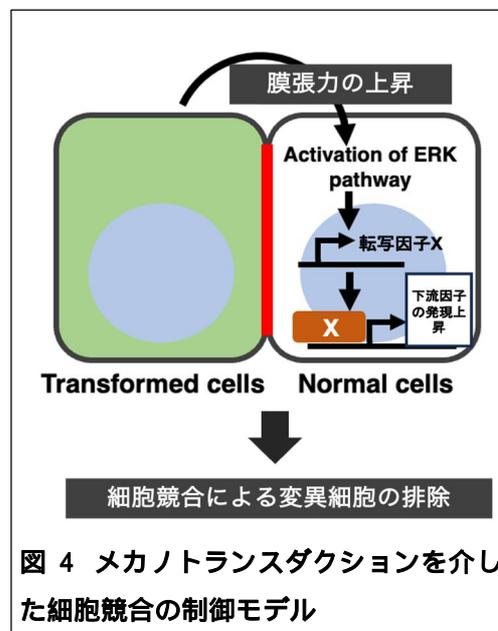


図4 メカノトランスダクションを介した細胞競合の制御モデル

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 0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 online
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐井和人
2. 発表標題 人工受容体synNotchを用いた細胞競合制御因子の探索
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2回 領域班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐井和人
2. 発表標題 人工受容体 synNotch を用いた細胞競合制御因子の探索
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10回 細胞競合コロキウム
4. 発表年 2023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
---------	---------