

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640064

研究課題名(和文) がん遺伝子活性の遺伝的不均質による腫瘍悪性化の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular basis for tumor progression triggered by genetic heterogeneity of oncogenic activities.

研究代表者

井垣 達史 (Igaki, Tatsushi)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00467648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんの進展過程において、遺伝的背景が異なる複数の変異細胞のサブクローン(遺伝的不均質)が生成され、これらが細胞間相互作用を介して細胞増殖能や浸潤・転移能を促進しうると考えられている。本研究では、ショウジョウバエ上皮をモデル系として用い、複数の変異細胞サブクローンによる遺伝的不均質性がいかにしてがんの進展を促すのかを解析した。その結果、がん遺伝子Srcを活性化した細胞集団とがん遺伝子Rasを活性化した細胞集団が上皮組織中で混在した際、それぞれの細胞クローンが互いの浸潤・転移能を誘発し合うことを見だし、Notch-Deltaシグナルを介したそのメカニズムの大枠を明らかにした。

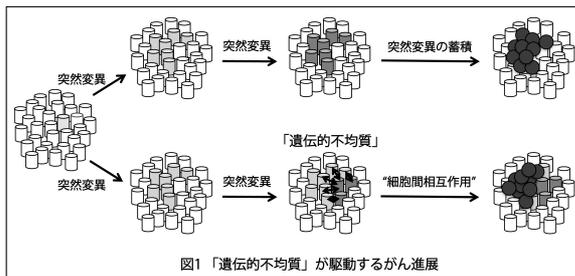
研究成果の概要(英文)：During cancer progression, clones of cells with different oncogenic mutations can interact with each other, leading to the promotion of cell proliferation and metastatic ability. To understand the molecular mechanisms of cancer progression triggered by the heterogeneity of cells with different oncogenic activities, we used a new Drosophila genetic mosaic technique called 'coupled-MARCM' technique. Through a genetic screen and subsequent genetic analyses, we found that a heterogeneity of cell clones with elevated Ras or Src oncoprotein activity triggers tumor progression in Drosophila imaginal epithelium. Furthermore, we elucidated the Notch-Delta-based mechanism of this tumor progression triggered by the interaction between Ras- and Src-activated cell clones.

研究分野：発生遺伝学、腫瘍学

キーワード：がん 細胞間相互作用 遺伝的不均質性 ショウジョウバエ Ras Src

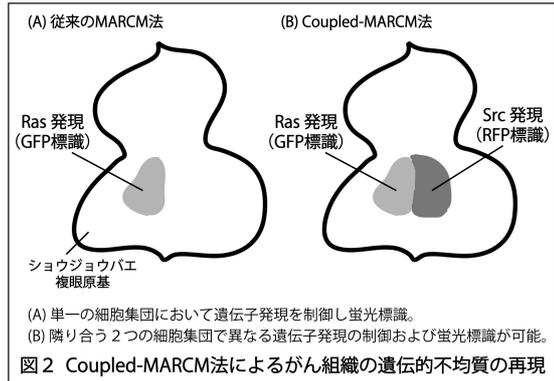
1. 研究開始当初の背景

近年、ヒトのがん組織の多くはその遺伝的背景が均一でなく、ポリクローナルな起源をもつ細胞集団から構成されていることが分かってきた。例えば、ある一つの腫瘍組織において、異なるがん遺伝子を活性化した複数のサブクローンが存在することが報告されている (Marusyk *et al. Nat. Rev. Cancer*, 2012; Snuderl *et al. Cancer Cell*, 2011)。この事実は、がんの発生・進展過程において、異なる変異細胞クローン間の相互作用が存在することを示している。実際に、がんの発生・進展過程においてがんを取り巻く微小環境が重要な役割を果たしていることが分かってきており、また、がんの大部分を占める上皮由来がんにおいては、前がん上皮細胞がそれを取り巻く種々の細胞と相互作用することによって悪性化が進行すると考えられている。これらのことは、がんの発生・悪性化には単一の細胞クローンにおける突然変異の蓄積のみならず、異なる変異をもつ複数の細胞クローン間の相互作用 (遺伝的不均質性) が重要な役割を果たしている可能性を強く示唆している (図1)。



研究代表者らはこれまでに、ショウジョウバエ腫瘍悪性化モデルを世界に先駆けて樹立し (2005年国際特許、2006年米国特許を取得)、遺伝学とライブイメージング技術を融合した独自のアプローチによって、細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子機構の解明を行ってきた (Igaki *et al., Curr Biol*, 2006; Igaki *et al., Dev Cell*, 2009; Ohsawa *et al., Dev Cell*, 2011; Ohsawa *et al., Nature*, 2012; Enomoto and Igaki, *EMBO Rep*, 2013)。しかし、これまでのショウジョウバエ遺伝学技術では、複数の遺伝子発現を独立に制御することができなかつたため、異なるがん遺伝子を活性化した複数の細胞群の相互作用を生み出すような「遺伝的不均質」を生体内で再現することは不可能であった。2010年、Luoらによって確立された「Coupled-MARCM法」は、従来のショウジョウバエ遺伝的モザイク法「MARCM法」を改良し、Gal4/UASシステムおよびQF/QUASシステムという2種類の遺伝子発現制御システムを同時に適用しつつ組織内に遺伝的背景の異なる細胞集団をモザイク状に誘導することを可能にし

た (Potter *et al., Cell*, 2010)。このCoupled-MARCM法を応用することにより、臨床において認められる、腫瘍組織内に異なるがん遺伝子を活性化した細胞集団が混在する状態 (Snuderl *et al. Cancer Cell*, 2011; Szerlip *et al., PNAS*, 2012 など) をショウジョウバエ個体内に再現することが可能となると考えた。そこで申請者らは、ショウジョウバエ複眼原基において異なるがん遺伝子 (例えば Ras と Src) を活性化する2種類の変異細胞サブクローンの相互作用の解析系の構築を進め、これに成功した (図2; Takemoto and Igaki, 未発表)。



一方、研究代表者らは最近、がん遺伝子 Src を活性化した細胞が隣接する細胞のがん抑制経路「Hippo 経路」を抑制し、これにより周辺細胞の増殖を促進することを明らかにした (Enomoto and Igaki, *EMBO Rep*, 2013)。この事実は、Src 活性化細胞クローンが周辺の前がん細胞に重大な影響を及ぼす可能性を示唆していた。そこで、Coupled-MARCM法を用いて、Ras 活性化細胞クローン* (*良性腫瘍を形成する) と Src 活性化細胞クローン*** (***)単独では腫瘍を形成しない) を組織内で隣接するように誘導したところ、Ras 活性化細胞クローンは大過剰に増殖するだけでなく、浸潤能を獲得して隣接組織へと転移することが分かった。以上の予備的知見は、Ras あるいは Src を活性化した細胞群は単独では悪性腫瘍を形成しないが、これらの細胞群が相互作用することによって悪性度の高いがんが形成されうるという新たながん進展メカニズムの存在を提示している。

2. 研究の目的

本研究では、がん遺伝子活性の遺伝的不均質によって駆動される腫瘍悪性化の分子基盤を明らかにするため、2種類の異なる遺伝子発現制御システム (酵母由来 Gal4/UAS システムおよびアカパンカビ由来 QF/QUAS システム) を同時に適用して同一組織内に過剰発現系の遺伝的モザイクを作り出す「ショウジョウバエ Coupled-

MARCM 法」を利用し、異なるがん遺伝子を活性化した変異細胞サブクローン間の相互作用の遺伝学的解析を行う。具体的には、申請者らの予備的研究により明らかとなった Ras 活性化細胞クローンと Src 活性化細胞クローンの相互作用による協調的な腫瘍悪性化促進機構を手がかりとして、生体内で異なるがん遺伝子を活性化した変異細胞サブクローン同士の相互作用の分子基盤を遺伝学的に解明する。

3. 研究の方法

Src 活性化細胞クローンと Ras 活性化細胞クローンの相互作用による腫瘍悪性化機構を遺伝学的に解析するため、Coupled-MARCM 法を用いて、ショウジョウバエ 3 齢幼虫の複眼原基の上皮組織に GFP で標識した活性化型 Ras (RasV12) 発現細胞クローンと RFP で標識した Src 発現細胞クローンを隣接するようにモザイク状に誘導する。RasV12 発現細胞クローンは単独で過剰に増殖して腫瘍を形成するが、浸潤・転移能は示さないことから良性腫瘍と見なすことができる。一方、Src 発現細胞クローンは周辺細胞の増殖を促進するが、自身は細胞死を起こすことが研究代表者らのこれまでの研究により分かっている (Enomoto and Igaki, *EMBO Rep*, 2013)。興味深いことに、これらのクローンが互いに隣接すると、Ras 発現細胞クローンの増殖能がさらに亢進するだけでなく、浸潤能を獲得し、隣接組織へと転移することが分かった。この細胞クローン間相互作用を介した腫瘍悪性化の分子機構を、遺伝学的に解析していく。研究代表者らの以前の解析により、Src 活性化細胞は Hippo 経路の下流転写コアクティベーター Yki の活性を隣接細胞へと伝播することで、周辺細胞の増殖を「細胞非自律的」に促進することが分かっている (Enomoto and Igaki, *EMBO Rep*, 2013)。そこで、この Yki 活性の伝播機構、および Yki 活性と Ras 活性の協調による浸潤・転移能の獲得機構に焦点を絞って解析を進めることで、この現象の分子機構の遺伝学的解明を目指した。

4. 研究成果

ショウジョウバエ 3 齢幼虫の複眼成虫原基において、Coupled-MARCM 法により RasV12 発現細胞クローンと Src 発現細胞クローンをモザイク状に誘導すると、互いのクローンに浸潤・転移能が誘発される。このがん遺伝子活性の遺伝的不均質によって誘発される腫瘍悪性化機構を遺伝学的に解析した結果、まず、Src 活性化細胞クローンにおいて Notch の発現が上昇していること、および Ras 活性化細胞クローンにおい

て Notch のリガンドである Delta の発現が上昇していることがわかった。また、実際に両クローンの境界上の Src 活性化細胞内で Notch シグナルが活性化していることも明らかとなった。そこで、Src 活性化細胞内の Notch シグナルを阻害したところ、Src 活性化細胞の浸潤・転移能が抑制された。さらに、Src と Notch の両シグナルを同時に活性化させた細胞クローンを複眼原基に誘導すると、単独クローンで浸潤・転移能をもつ腫瘍が誘発された。以上の結果から、Src 活性化細胞は近接する Ras 活性化細胞によって活性化される Notch シグナルにより浸潤・転移能が誘発されることが明らかとなった (図 3 ; 投稿準備中)。

一方、興味深いことに、Src 活性化細胞内の Notch シグナルを阻害した際、近接する Ras 活性化細胞の浸潤・転移能も抑制されることがわかった。このことは、Src 活性化細胞において Notch シグナルの下流で機能する因子が、近接する Ras 活性化細胞の浸潤・転移能を誘発することを示唆している (図 3)。現在、この下流因子の探索を行っており、これを明らかにすることで、Ras/Src 遺伝的不均質による腫瘍悪性化の分子機構の全容を理解できると期待される。

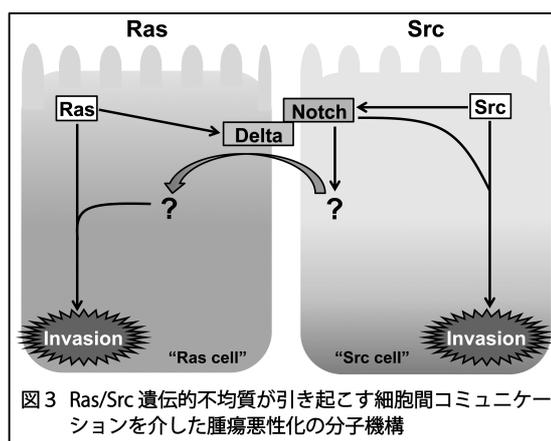


図3 Ras/Src 遺伝的不均質が引き起こす細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子機構

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 7 件)

1. Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T: JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity, *Developmental Biology*, 査読有、2015 年、in press. 10.1016/j.ydbio.2015.05.001.
2. Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T: Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*, *Nature Communications*, 5 巻、査読有、2014 年、5264. 10.1038/ncomms6264.

3. Ohsawa S, Takemoto D, Igaki T: Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic cooperation, *Journal of Biochemistry*, 156 巻、査読有、2014 年、pp129-36. 10.1093/jb/mvu045.
 4. Takino K, Ohsawa S, Igaki T: Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*, *Developmental Biology*, 395 巻、査読有、2014 年、pp19-28. 10.1016/j.ydbio.2014.09.003.
 5. 榎本将人、井垣達吏: 細胞の協調と競合における Hippo 経路の役割、医学のあゆみ、査読無、251 巻、2014 年、pp389-396
 6. 榎本将人、井垣達吏: がんの発生・進展を促すニッチ細胞、実験医学、査読無、32 巻、2014 年、pp2574-2581
 7. 大澤志津江、井垣達吏: 細胞競合-状況依存的な細胞死と代償性増殖、医学のあゆみ、査読無、246 巻、2013 年、pp426-431
- [学会発表] (計 19 件)
1. 榎本将人、井垣達吏: がん遺伝子活性の不均一性による腫瘍悪性・悪性化、生命動態システム科学四拠点・CREST・PRESTO 合同シンポジウム「生命動態の分子メカニズムと数理」、2015 年 3 月 16~17 日、京都
 2. Enomoto M, Takemoto D, Igaki T: Tumor progression by a genetic heterogeneity of cell clones with distinct oncogenic activities, 56th *Drosophila* Research Conference, 2015 年 3 月 4 日~8 日、シカゴ (イリノイ、アメリカ)
 3. Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T: Non-cell autonomous tumor progression driven by cellular senescence, 56th *Drosophila* Research Conference, 2015 年 3 月 6 日~8 日、シカゴ (イリノイ、アメリカ)
 4. Akai N, Ohsawa S, Igaki T: Tissue growth regulation by “cell turnover” in *Drosophila*, MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics, 2014 年 12 月 4 日、シンガポール
 5. 中村麻衣、大澤志津江、井垣達吏: 細胞老化が駆動する非自律的腫瘍悪性化の遺伝学的解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、横浜 (神奈川)
 6. 瀧野恭子、大澤志津江、井垣達吏: エンドサイトーシス制御破綻が引き起こす、アポトーシス誘導性増殖の分子基盤、第 23 回 Cell Death 学会学術集会、2014 年 7 月 18~19 日、東京
 7. 中村麻衣、大澤志津江、井垣達吏: 細胞老化による細胞死耐性獲得と細胞非自律的な腫瘍悪性化、第 23 回 Cell Death 学会学術集会、2014 年 7 月 18~19 日、東京
 8. 瀧野恭子、大澤志津江、井垣達吏: Deregulated endocytosis trigger non-autonomous tissue growth via cooperation between JNK and Ras signaling, 第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11~13 日、奈良
 9. 中村麻衣、大澤志津江、井垣達吏: 細胞老化が駆動する非自律的な腫瘍悪性化の遺伝学的解析、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 11~13 日、奈良
 10. Enomoto M, Kizawa D, Igaki T: Tumor growth regulation by JNK-dependent switching of the Hippo pathway activity, 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会、2014 年 6 月 4~6 日、金沢 (石川)
 11. Takino K, Ohsawa S, Igaki T: Non-autonomous tissue growth by endocytic regulation of Eiger and Ras signaling, 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会、2014 年 6 月 4~6 日、金沢 (石川)
 12. Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T: Non-cell autonomous tumor progression driven by cellular senescence, 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会、2014 年 6 月 4~6 日、金沢 (石川)
 13. 井垣達吏: 細胞競合と協調によるがん制御、福井大学テニュアトラック制度シンポジウム、2014 年 3 月 10 日、福井
 14. 井垣達吏: ミトコンドリア機能障害が駆動する腫瘍悪性化の遺伝的基盤、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 12~13 日、横浜
 15. 井垣達吏: 細胞の競合と協調によるがん制御、第 10 回日本病理学会カンファレンス、2013 年 8 月 2 日、神戸大学
 16. 井垣達吏: 細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の遺伝的基盤、第 60 回日本生化学会近畿支部例会、2013 年 5 月 18 日、大阪

17. 井垣達吏：細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の遺伝的基盤、平成 24 年度文部科学省新学術領域研究がん研究分野の特性を踏まえた支援活動公開シンポジウム、2013 年 1 月 30 日、学術総合センター一橋記念堂（東京）

18. Tatsushi Igaki: Non-autonomous tumor progression by oncogenic inflammation in *Drosophila*、International Exdotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting 2012、2012 年 10 月 26 日、学術総合センター（東京）

19. Tatsushi Igaki: Dissecting cell competition through “non-cell autonomous” genetic screen in *Drosophila*、Cold-blooded Cancer、2012 年 9 月 2 日～4 日、スコットランド（グラスゴー）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP：

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井垣達吏 (IGAKI TATSUSHI)

研究者番号：00467648