

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650084

研究課題名(和文)細胞競合に関わる代謝ステータスとその制御因子の網羅的同定

研究課題名(英文)Comprehensive identification of metabolic status and regulatory factors involving in cell competition

研究代表者

松田 七美 (SENOO-MATSUDA, NANAMI)

早稲田大学・ナノ理工学研究機構・准教授

研究者番号：70360641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞競合は、組織において増殖が速く生存能の高い細胞群(勝ち組)が、増殖が遅く細胞死によって排除される細胞群(負け組)に競合し、細胞の増殖、細胞死、分化などが統合的に制御されることより、一定の大きさと機能をもつ組織が形成される現象であり、多細胞生物における普遍的な新概念として注目される。

本研究では、独自に開発した細胞競合関連因子Mycにより誘導される細胞競合モデルを用いて解析を行った。その結果、Mycとp53により協調的に制御される好氣的糖代謝の亢進が、細胞競合が生じる際に細胞非自律的に決定づけられる勝ち組、及び負け組それぞれの細胞特性のトリガーとなることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our studies have revealed that developing wing cells in *Drosophila melanogaster* that differ in expression levels of *Drosophila* c-Myc (dMyc) can compete, leading to the apoptosis of the cells with less dMyc ("losers") and over-representation of cells with more dMyc ("winners") in the wing. This phenomenon, called cell competition, seems to play a crucial role in the control of organ size.

We find that expression of dMyc induces metabolic reprogramming resembling the Warburg effect, which is balanced by homeostatic metabolic functions of p53. However, in mosaics, confrontation between dMyc-expressing and wildtype cells heightens the metabolism of dMyc cells and leads p53-dependency for their clonal expansion, viability, and super-competitor status. We propose that confrontation with WT cells increases the fitness of dMyc cells and that p53 functions as a sensor of these fitness differences.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞競合 エネルギー代謝 Myc p53

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究では、多細胞生物の発生、再生、発がんなどの過程に関わる普遍的な生命現象として注目される新しい概念である、細胞競合に着目する。細胞競合とは、器官において、増殖が速く生存能の高い細胞群(勝ち組)が、増殖が遅く細胞死によって排除される細胞群(負け組)に競合し、細胞の増殖、細胞死、周期、分化などが統合的に制御されることにより、一定の大きさと機能をもつ器官・組織が形成される現象である。これまでに細胞競合関連因子として、がん遺伝子 c-Myc のショウジョウバエホモログ dMyc が報告されているが、その分子機構は不明である (Johnston, *Science* 324, 2009)。

(2) 申請者らは、ショウジョウバエの翅原基、及び培養細胞株を用いて、dMyc により制御される細胞競合の *in vivo*、及び *in vitro* モデルを確立した (de la Cova *et al.*, *Cell* 117, 2004; 松田 & Johnston, *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2007)。これらのモデルを用いた予備的解析から、勝ち組、あるいは負け組となるそれぞれの細胞群の運命決定に、エネルギー代謝変化が関わることを見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、エネルギー代謝制御に関わり、勝ち組と負け組が互いを感じ取る際の分子実体とその分子機構とは何か? という疑問を解決するため、上記のモデルを応用し、分子生物学的、生化学的、遺伝学的手法とメタボローム、プロテオームによる解析を組み合わせ、勝ち組と負け組の細胞運命を変化させる表現型を指標とした細胞競合制御因子の機能的スクリーニングと代謝ステータス解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) ショウジョウバエ培養細胞株 S2 を用いた *in vitro* 細胞競合モデル系

高 dMyc 細胞(勝ち組)と低 dMyc 細胞(負け組)の2種類の細胞株を共培養する技術を応用し、3通りの方法(1-1 直接共培養系、1-2 間接共培養系、1-3 単培養系における直接共培養上清アッセイ系)により、dMyc により制御される細胞競合のモデルを作製し、それぞれのモデルにおいて、細胞死の初期マーカーである活性型カスパーゼ3抗体による免疫染色、及び細胞増殖解析による細胞特性評価系を構築した。

### (2) ショウジョウバエ幼虫翅原基を用いた *in vivo* 細胞競合モデル系

体細胞組替えによるモザイク解析法を応用し、翅原基において競合する細胞の特性を生存能、増殖能、代謝変化などを指標に解析する独自の *in vivo* モデル系を構築した。

#### (2-1) 勝ち組クローン解析系

*Actin>Gal4* カセットを用いて、野生型細胞で構成される翅原基組織において、GFP でマークされる dMyc 高発現細胞群(勝ち組クローン)を作出すると、野生型細胞との細胞競合が生じることよりそのクローンサイズが大きくなる。

#### (2-2) 負け組クローン解析系

*Tub>dmyc>Gal4* カセットを用いて dMyc 高発現細胞で構成される翅原基組織において、GFP でマークされる野生型細胞 / dMyc 低発現細胞群(負け組クローン)を作出すると、周辺の dMyc 高発現細胞との間で細胞競合が生じ、そのサイズが小さくなる。

### (3) *in vivo* 系を用いたマイクロアレイ解析による細胞競合関連因子の探索

勝ち組クローン解析系(2-1)を用いて、幼虫の翅原基をコラゲナーゼ処理し、セルソーターにより競合する dMyc 高発現細胞(勝ち組)と野生型細胞(負け組)を分離し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現のプロファイリングを行った。対照群としては、非競合条件として、全ての細胞が野生型細胞、あるいは dMyc 高発現細胞で構成される翅原基組織を同様のモザイク解析実験により作製し、比較解析を行った。

### (4) *in vitro* 及び *in vivo* 細胞競合モデル系を用いた代謝変化の解析

3-(1)の間接共培養系(1-2)及び3-(2)の *in vivo* 系(2-1、及び2-2)を用いて、分子生物学的・生化学的手法、メタボロミクス・プロテオミクスの手法を用いて、勝ち組細胞と負け組細胞におけるエネルギー代謝変化解析系(代謝関連因子の発現・活性解析、代謝中間体の網羅的解析など)を構築した。

## 4. 研究成果

### (1) 非競合条件下における Myc 高発現細胞の代謝ステータス

非競合条件下(単培養系)において、Myc により誘導される代謝の変化について解析した結果、Myc 高発現細胞においては、Myc 低発現細胞(野生型細胞)と比較して、糖代謝に関連する酵素の遺伝子発現が上昇し、グルコースの取り込みの上昇、および解糖系酵素活性の亢進がみられた。興味深いことに、非競合条件下の Myc 高発現細胞では、ミトコ

ンドリア代謝に関連遺伝子であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の E1 の サブユニット、電子伝達系複合体 II の Ip サブユニット、電子伝達系複合体 III の SC02 サブユニットの発現が上昇し、電子伝達系複合体 II の酵素活性が有意に上昇したのに対し、電子伝達系複合体 IV の酵素活性、および ATP の量は低下することが示された。

## (2) 競合条件下における Myc 高発現細胞(勝ち組)の代謝ステータス

これまでに我々は、Myc により細胞競合が生じる際に、勝ち組および負け組となる細胞が互いを認知し細胞非自律的にそれぞれの細胞特性を変化させること、すなわち、勝ち組 (Myc 高発現細胞) では増殖能および生存能がより高くなり、負け組 (Myc 低発現細胞) では増殖能および生存能がより低くなることを報告してきた (松田 & Johnston, *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2007)。

競合条件下 (間接共培養系) において、勝ち組となる Myc 高発現細胞の代謝を非競合条件下における代謝と比較したところ、グルコーストランスポーターである GLUT1、および GLUT3 の遺伝子発現の顕著な上昇、グルコースの取り込みの顕著な上昇がみられた。また、非競合条件下と比較して電子伝達系複合体 III の SC02 サブユニットの発現が有意に上昇し、ミトコンドリア代謝は低下が認められたものの維持され、より顕著な好気的な糖代謝の亢進がみられることが明らかになった。

## (3) p53 は Myc により誘導される細胞競合のため必要である

細胞競合の *in vivo* 系を用いたマイクロアレイ解析により、勝ち組細胞においてマイルドに発現上昇する細胞競合制御因子の候補の一つとして p53 を見いだした。そこで、Myc により誘導される細胞競合における p53 の役割について解析した。

*in vivo*、および *in vitro* の細胞競合の解析系において p53 の機能抑制解析を行ったところ、勝ち組であった Myc 高発現細胞の増殖能および生存能は顕著に低下して負け組に転じ、一方、負け組であった Myc 低発現細胞は増殖能および生存能が相対的に高まり勝ち組に転じることが明らかとなった。すなわち、Myc 高発現細胞 (勝ち組) と Myc 低発現細胞 (負け組) それぞれの細胞特性が、p53 の機能抑制により逆転することが明らかになった。

p53 の機能抑制により勝ち組から負け組に転じた Myc 高発現細胞では、勝ち組の細胞特性として観察されていた GLUT1、GLUT3、SC02 の遺伝子発現の顕著な上昇、グルコースの取り込み上昇や乳酸/ピルビン酸比の上昇を指標とする糖代謝の亢進、マイルドに抑制されると共に維持されているミトコンドリア代謝の活性が、いずれも顕著に抑制されていた。これらの結果から、p53 は Myc と協調し

て、勝ち組においてミトコンドリア代謝を維持した糖代謝の亢進 (すなわち、好気的な解糖の亢進) を誘導するために重要な役割を果たしていることが示された。また、競合により勝ち組から負け組に転じた p53 欠損 Myc 高発現細胞では、異常な細胞死、およびゲノム不安定性の増大が細胞非自律的に観察されることが明らかとなった。

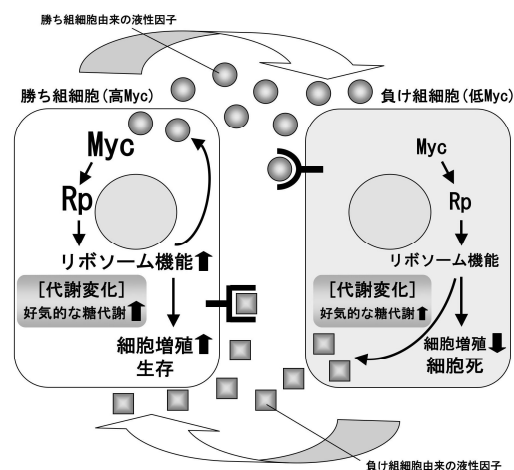


図 細胞競合とエネルギー代謝変化

## (4) 細胞競合の制御に関わる候補低分子因子の探索

細胞競合の *in vitro* モデル、間接共培養系 (1-2)、及び単培養系における直接共培養上清アッセイ系 (1-3) を応用し、メタボローム解析による細胞競合制御因子の機能的スクリーニングを行った。これらの解析から、競合する勝ち組、あるいは負け組細胞において、その特性決定に関わる候補低分子因子 (23 因子) を見いだした。

(5) 以上の結果より、競合して勝ち組となる Myc 高発現細胞では、Myc と p53 が協調して細胞非自律的に代謝ステータスの変化、すなわち、好気的な糖代謝の亢進を制御し、この変化により勝ち組細胞における生存能と増殖能の亢進、およびゲノム安定性の維持が制御されることが示された (図)。さらに、p53 は Myc 高発現細胞が勝ち組としての特性を得るために必要であるだけでなく、Myc 低発現細胞 (野生型細胞) が細胞死などを介し負け組としての特性を得るための制御にも関わっていることが示された (図)。

本研究課題において、競合細胞において見いだされた代謝変化、好気的な糖代謝亢進は、Warburg 効果とよく類似していた。多細胞組織におけるがん化あるいはがんの悪性化にかかわるエネルギー代謝の変化として、Myc をはじめとした多くのがん遺伝子産物により Warburg 効果として知られる代謝ステータスの変化をともなう細胞特性の変化、とくに好気的な解糖の亢進の生じることが知られている。しかしながら、がん細胞における代

謝ステータスの制御の詳細については、未だ不明な点が多く残されている。

このような代謝ステータスの変化が、それぞれの細胞群が互いを認識し競合するために重要であり、細胞競合制御因子の分泌に関与する可能性が考えられる。この分子機構を解明するために、現在、単培養系における直接共培養上清アッセイ系（1-3）を用いたプロテオーム/メタボローム解析により、競合する2種類の細胞群から培養上清中に分泌される細胞競合制御因子の単離と同定を進めている。

#### 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 2 件)

(1) \*Claire de la Cova, \*Nanami Senoo-Matsuda, Marcello Ziosi, Christine D-M. Wu, Paola Bellosta, Catarina M. Quinzii, and Laura A. Johnston: Super-competitor status of *Drosophila* Myc cells requires p53 to reprogram metabolism and promote viability.: *Cell Metab*, 19: pp470-483 (2014)

\* C. de la Cova and N. Senoo-Matsuda are equal first authors.

doi: 10.1016/j.cmet.2014.01.012.

(2) 松田七美: がん遺伝子 Myc による細胞競合は p53 を介した代謝リプログラミングにより協調的に制御される: 実験医学 32, pp2131-2135, 2014

ISBN: 978-4-7581-0130-1

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 松田七美: がん関連因子 Myc による細胞競合は p53 を介した代謝ステータスの変化により協調的に制御される: 第 37 回日本分子生物学会年会・ワークショップ「組織恒常性を維持する適者生存-細胞の競合と協調-」, 2014 年 11 月、横浜

(2) 松田七美: がん遺伝子 Myc によるエネルギー代謝制御を介する細胞競合の分子機構: 第 36 回日本分子生物学会年会・ワークショップ「細胞競合の分子基盤とその生理的意義」, 2013 年 12 月、神戸

〔その他〕

ホームページ等

(1) 研究者に関する HP :

<http://www.aoni.waseda.jp/nanami.s.matsuda/>

(2) ライフサイエンス 新着論文レビュー  
HP: [がん遺伝子産物 Myc による細胞競合は p53 を介した代謝ステータスの変化により協調的に制御される:](http://first.lifesciencedb.jp/archives/8556)

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/8556>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松田 七美 (NANAMI SENOO-MATSUDA)

早稲田大学 ナノ理工学研究機構・准教授

研究者番号: 70360641

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし