

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19257

研究課題名（和文）競合を介したがん微小環境制御とその遺伝的基盤の解明

研究課題名（英文）The genetic dissection of cell competition in tumor microenvironment

研究代表者

大澤 志津江（Ohsawa, Shizue）

名古屋大学・理学研究科・教授

研究者番号：80515065

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん原性細胞が周辺細胞を駆逐しながら競合的にその領地を拡大する“スーパーコンペティション”の分子機構を明らかにする、ショウジョウバエをモデルとした2種類の遺伝学的スクリーニングを実施した。第1の遺伝学的スクリーニングで単離された変異体の解析を進めた結果、がん原性細胞が隣接した周辺細胞に対してオートファジーを誘導し、細胞死遺伝子hidを介した細胞死を誘発する現象が、その領地を拡大する上で重要な役割を果たしていることが分かった。また、第2の遺伝学的スクリーニングでは、がん原性細胞の周囲の正常細胞で機能する責任遺伝子として、機能未知の遺伝子が同定され、その遺伝子の機能解析を現在進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん原性細胞が正常細胞を駆逐しながらその領地を拡大する“スーパーコンペティション”は、がん促進を担う重要なファクターとして近年大きく注目されているが、その分子実体はほとんど分かっていなかった。本研究において、ショウジョウバエをモデルとした網羅的な遺伝学的解析を実施することで、組織に生じたがん原性細胞が、周辺細胞に対してオートファジーを介した細胞死を誘導するという新規メカニズムが明らかとなった。今後、オートファジーが誘導されるメカニズムをさらに解析し、進化的保存性を検証していくことで、正常細胞をターゲットとしたがん治療の開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要（英文）： There are growing evidence showing that tumor growth and progression is achieved by “supercompetition”, a phenomenon in which oncogenic cells (“Winners”) competitively proliferate by eliminating neighboring cells (“Losers”) from the tissue. In this study, by using the powerful Drosophila model system, we conducted two types of genetic screens for identifying factors that are crucial for super competition. We found that mutations in autophagy-related genes in neighboring cells strongly suppressed supercompetition of oncogenic cells mutant for a Hippo pathway component fat. Genetic analyses revealed that fat mutant clones eliminate neighboring cells by non-autonomous Autophagy, which lead to induction of cell death. In addition, we identified a novel gene that are crucial for supercompetition. Subsequent genetic and live imaging analyses for elucidating the role of the identified novel gene would contribute to understand the mechanism of tumor development through supercompetition.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：細胞競合 スーパーコンペティション がん ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

がんの発生やその進展を制御するがん微小環境において、“細胞競合”が重要な細胞間相互作用として機能する可能性が近年大きく着目されている。細胞競合とは、組織中の隣り合う細胞間で組織への適応度を競合する現象で、この競合の“勝者”が“敗者”を細胞死により排除し、その場を占有する (Morata & Rippol, *Dev. Biol.*, 1975)。最近の研究により、細胞競合はがん細胞が周辺細胞を駆逐しながら組織内での領地を拡大していく“スーパーコンペティション”や、通常は組織から排除される前がん細胞が、組織の細胞集団環境や宿主の体内環境に応答して排除を免れ、腫瘍を形成する“スイッチング”現象に関わることが示唆され、がん制御を担う重要なシステムであると推察されている。また、細胞競合の制御因子の多くががんの制御因子でもあることも分かってきた。しかしながら、その分子実体はほとんど不明であった。

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とした生体レベルでの解析を展開し、細胞競合が「がん微小環境」の性質を規定・制御する分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、細胞競合ががん微小環境の性質を規定・制御する仕組みを明らかにするため、その根幹となる現象(1)スーパーコンペティションおよび(2)がん原性細胞の運命が「組織からの排除(敗者)」から「腫瘍形成(勝者)」へとスイッチする現象の解析を行った。

4. 研究成果

(1) スーパーコンペティション機構の解明

スーパーコンペティションの分子機構を明らかにするため、進化的に保存されたがん抑制性 Hippo 経路のシグナル強度差に依存して引き起こされる細胞競合をモデルとした 2 種類の遺伝学的スクリーニングを実施した。

(i) スーパーコンペティションを制御する遺伝子群を同定する“細胞非自律的”遺伝学的スクリーニング

Hippo 経路シグナルが不活化した「非典型的カドヘリン *fat* 変異細胞」群をショウジョウバエ上皮に誘導すると、これら *fat* 変異細胞が正常細胞を競合的に駆逐してその領地を拡大する“スーパーコンペティション”が引き起こされる。この系において、*fat* 変異細胞に隣接する野生型クローン(正常細胞群)に対し、CRISPR-Cas9 技術による突然変異をホモ接合になるように導入し、*fat* 変異細胞クローンの領地拡大が抑制あるいは促進される変異体を単離・同定する遺伝学的スクリーニング系を確立することに成功した(国立遺伝学研究所・斎藤 都暁博士、東京理科大学・近藤 周博士、および京都大学・井垣 達史博士との共同研究)。これまでに、CRISPR-Cas9 技術により変異を導入した約 850 遺伝子の突然変異系統についてスクリーニングを行い、*fat* 変異細胞によるスーパーコンペティションを抑制する系統を 9 系統、促進する系統を 2 系統単離することに成功した。興味深いことに、スーパーコンペティションを細胞非自律的に抑制した系統のうち、4 系統 (*Atg18b*<sup>#352</sup>, *Atg4a*<sup>#2086</sup>, *Vha68-3*<sup>#35</sup>, *Vha100-5*<sup>#725</sup>) の責任遺伝子がオートファジー制御遺伝子であることが分かった。これまでに、タンパク合成能が低下した細胞(敗者)が周囲の正常細胞(勝者)により引き起こされる細胞死において、オートファジーが重要な役割を果たすことが報告されており (Nagata *et al.*, *Dev. Cell*, 2019)、スーパーコンペティション現象においても同様に、オートファジーが関与される可能性が考えられた。遺伝学的解析を行なった結果、

*fat* 変異細胞において、転写共役因子 Yokie のターゲットである microRNA *bantam* が誘導され、TOR シグナルを介したタンパク合成能の上昇が引き起こされること、および、これが、隣接した正常細胞に対してオートファジーを誘導し、細胞死遺伝子 *hid* を介した細胞死を誘発することが明らかとなった (Nagata, Akai, Kondo, Saito, Ohsawa, Igaki, “Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via bantam microRNA in *Drosophila*”, *Curr. Biol.*, 2022) (図 1)。

並行して、スーパーコンペティションを抑制する残りの系統についても解析を行い、1 系統の責任遺伝子として、Adherens Junction の構成因子 A を同定することに成功した。興味深いこと

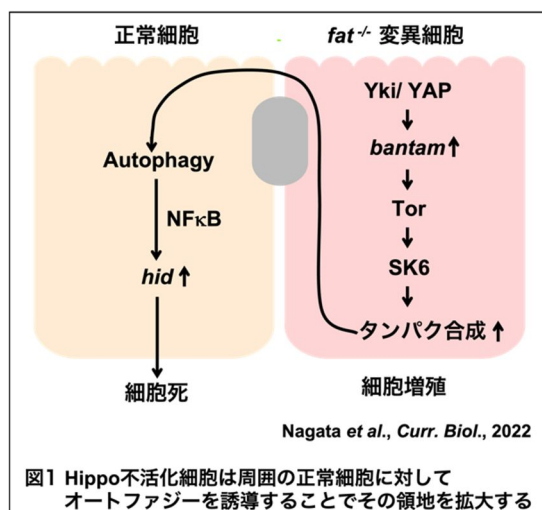


図1 Hippo不活化細胞は周囲の正常細胞に対してオートファジーを誘導することでその領地を拡大する

に、*fat* 変異細胞群に隣接した野生型細胞群において、遺伝子 *A* の発現を抑制すると、*fat* 変異細胞群が通常よりも過剰に増殖して、組織の過形成を引き起こすことが分かった。現在、遺伝学的解析および器官培養系を用いたライブイメージングを駆使し、遺伝子 *A* が *fat* 変異細胞によるスーパーコンペティションを細胞非自律的に制御する仕組みを「細胞間接着を介した細胞競合」という観点から解析しているところである。

(ii) スーパーコンペティションの“場”(がん微小環境)を成立させる因子の遺伝学的スクリーニング

本遺伝学的スクリーニングでは、ショウジョウバエ全ゲノムの 80% 以上をカバーする染色体欠失系統を用いて、細胞競合の“がん微小環境”に一連の染色体欠失変異を導入し、この競合を正や負に制御する因子を探索した。具体的には、*fat* 変異細胞クローン (GFP および *w+* で標識) を成虫原基にモザイク状に誘導した上で、成虫原基全体に染色体欠失変異をヘテロに導入し、細胞競合によるスーパーコンペティションに異常をきたす変異系統をスクリーニングした。

これまでに、ショウジョウバエ第 3 染色体の染色体欠失系統についてスクリーニングを行い、*fat* 変異細胞によるスーパーコンペティションを抑制する系統を 3 系統単離した。これら 3 系統についてそれぞれ、遺伝学的解析を進めていく過程で、1 系統において欠失している領域内にコードされる遺伝子 *B* が責任遺伝子であること、および、*fat* 変異細胞を取り囲む野生型細胞において重要な役割を果たしていることが遺伝子 *B* に対する RNAi あるいは本研究において作成した遺伝子 *B* の突然変異体

を用いた遺伝学的解析から明らかとなった (図 2)。遺伝子 *B* は機能未知の遺伝子である。今後、遺伝学的解析や生化学的解析を行うことで、スーパーコンペティションにおける遺伝子 *B* の機能とその分子基盤を明らかにしていく。さらに、進化的保存性やがん発生・進展における生理的役割を明らかにしていくことで、細胞競合を介して構築されるがん微小環境制御の理解に迫る。

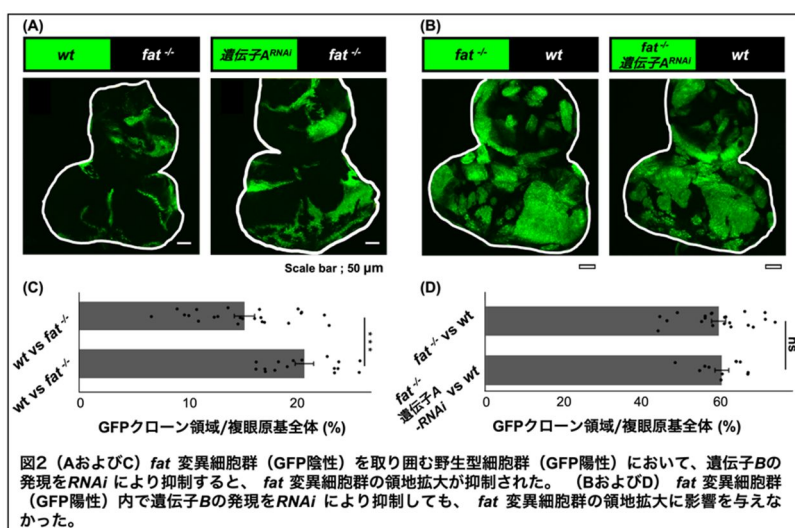


図2 (AおよびC) *fat* 変異細胞群 (GFP陰性) を取り囲む野生型細胞群 (GFP陽性) において、遺伝子 *B* の発現を RNAi により抑制すると、*fat* 変異細胞群の領地拡大が抑制された。(BおよびD) *fat* 変異細胞群 (GFP陽性) 内で遺伝子 *B* の発現を RNAi により抑制しても、*fat* 変異細胞群の領地拡大に影響を与えなかった。

## (2) 敗者から勝者へのスイッチング機構の解明

申請者らはこれまでに、応募者らはこれまでに、がん抑制遺伝子 *scribble* や *discs large* の変異により細胞極性が崩壊したがん原性細胞 (極性崩壊細胞) が細胞競合の敗者となってショウジョウバエ組織から排除される現象とその分子機構を明らかにしてきた。ここで興味深いことに最近、組織に誘導される極性崩壊細胞のクローンサイズが、ある閾値を超えて大きくなると、極性崩壊細胞が勝者にスイッチして領地拡大を強力に行って腫瘍を形成すること、および、この「敗者から勝者へのスイッチング」が進化的に保存されたがん抑制性の Hippo 経路に依存して引き起こされることを、定量的解析と数理モデルの構築により見いだした (投稿準備中)。そこで本研究では、がん原性の極性崩壊細胞群が“敗者”の運命に決定される仕組みをまず明らかにするために、極性崩壊細胞群で発現変動する遺伝子群を同定するトランスクリプトーム解析を行った。具体的には、ショウジョウバエ複眼成虫原基 (成虫複眼を形成する、幼虫期の上皮組織) に誘導した、GFP 標識の (i) 上皮組織に誘導した極性崩壊細胞群、(ii) 極性崩壊細胞群を取り囲む正常細胞群、および (iii) JNK シグナルを抑制し、細胞排除を抑制した極性崩壊細胞群を、GFP の発現を基にソーティングして、RNA-seq 解析を行った。微量の細胞群から total RNA を効率的に抽出する手法を確立した結果、極性崩壊細胞において活性化することが知られている JNK シグナルあるいは JAK/STAT シグナルのターゲット遺伝子群のほか、種々の遺伝子群の発現上昇が観察された。今後は、発現上昇をしている遺伝子群の機能解析を行うことで、敗者を規定する因子と、その仕組みの破綻により引き起こされる敗者から勝者へのスイッチング機構に迫る。また一方で、がん原性細胞の振る舞いに対して“敗者”“勝者”間スイッチングを引き起こす宿主内環境の探索を行い、興味深い現象を見いだした。今後、遺伝学的解析を進めていくことで、組織間相互作用を介して全身性に制御される細胞競合とそのアウトプット制御機構を明らかにしていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Nagata Rina, Akai Nanami, Kondo Shu, Saito Kuniaki, Ohsawa Shizue, Igaki Tatsushi	4. 巻 32
2. 論文標題 Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via bantam microRNA in Drosophila	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1064 ~ 1076.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2022.01.016	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 -

1. 著者名 Cong Bojie, Nakamura Mai, Sando Yukari, Kondo Takefumi, Ohsawa Shizue, Igaki Tatsushi	4. 巻 17
2. 論文標題 JNK and Yorkie drive tumor malignancy by inducing L-amino acid transporter 1 in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1009893 ~ 1009893
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009893	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大澤 志津江
2. 発表標題 ショウジョウバエが明かすがんのバイオロジー
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 相生 章仁、加藤 黎、井川 敬介、大澤 志津江
2. 発表標題 Genetic screen for genes that promote 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 廣岡 依里、大澤 志津江
2. 発表標題 Non-autonomous epithelial tumor growth by macrophages in Drosophila
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 廣岡 依里、大澤 志津江
2. 発表標題 Genetic dissection of epithelial tumor growth regulation by macrophages in Drosophila
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 廣岡 依里、井川 敬介、大澤 志津江
2. 発表標題 ショウジョウバエマクロファージによる腫瘍成長制御の遺伝学的解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
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
---------	---------