

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2011～2015

課題番号：23229002

研究課題名(和文)発生頑強性を規定する細胞死シグナルの解明

研究課題名(英文)Regulation of developmental robustness by cell death signaling

研究代表者

三浦 正幸 (Miura, Masayuki)

東京大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50202338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,200,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの神経発生では、細胞死による神経前駆体細胞(SOP)の選択が、SOPが生まれる最初期からおこっていた。SOP数の制御に関してカスパーゼ活性は非アポトーシス機能として関わっているが、カスパーゼ阻害によるSOP数増加の表現型には、ヒストンメチル化酵素eggless/SETDB1が関わっていた。成虫原基組織再生の安定性には、組織傷害に応答した脂肪体でのメチオニン代謝が関わるということが明らかになった。また、哺乳類頭部形成に重要な前脳前端的シグナルセンターではFGF8産生細胞の大きかな入れ替わりに細胞死が関わり、アポトーシスが脳のパターンニング制御の安定性に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Selection of sensory organ precursor (SOP) by cell death occurs in the early stage of neural development in *Drosophila*. SOP cell number is regulated by non-apoptotic caspase activity. We identified the histone methyltransferase eggless/SETDB1 that can synergistically regulate SOP cell number with caspase, suggesting epigenetic histone modification can regulate the robust control of SOP cell number collaborating with non-apoptotic caspase function. For robust tissue regeneration, we found that imaginal disc injury systemically control the methionine metabolism in fat body. Changes of methionine metabolism in fat body then remotely control the imaginal disc regeneration, suggesting that cell death controls tissue regeneration systemically. In mammalian neural development, we found that apoptosis precisely controlled the size and elimination of FGF8 signaling center, thereby actively regulating signal center activity for establishment of robust patterning of brain development.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：カスパーゼ 細胞死 エピジェネティクス 神経発生 代謝 頑強性

1. 研究開始当初の背景

発生過程は、全能性を有する細胞が時間軸に沿って細胞分裂とともに刻々と変化し、特殊化しつつ、あるパターンを作っていくというダイナミックなプロセスである。そして同時に、様々な環境におかれた場合においても正常に発生は進行する驚くべき頑強な生命現象である。体外で発生する受精卵は、直接外界と接することによって、温度変化をはじめとする環境変化を受けるにもかかわらず正常に発生する。子宮の中で発生するほ乳類は、胎児をとりまく環境ということでは体外で発生する動物よりも保護されているように見えるが、母体の状態（摂取する栄養やストレス）によってその胎児環境は変動する。それにもかかわらず正しく個体発生を完了する。このように発生は最終形態に向かって誤りもなく、また、環境の変化に対しても安定に進んでいく。発生の安定性を保持する本質とは、胚の内外で生じるストレス刺激へダイナミックに応答することにあるのではないかとの考えから本研究は提案された。

2. 研究の目的

発生の頑強性に関してはこれまで多くの研究者が注目してきたが、その分子的基盤を解明しようとする研究は途についたばかりである。我々これまでの一連の研究によってカスパーゼが胚に生じるストレスを感知して発生頑強性を制御しうる分子として注目してきた。今まで、細胞死は不要な細胞の除去という、どちらかというと裏方の役割を担っていると思われていたが、実験的には細胞競合、代償性増殖、形原不均衡の矯正といった積極的な役割が提示されてきており注目されるようになってきた。本研究では、ショウジョウバエとマウスを用い、遺伝学、生体イメージング、遺伝生化学を駆使して、発生の頑強性に関わる細胞死シグナルの生体機能と新たな分子を探索することを目的としている。この研究によって、発生が内的外的なストレス環境に対して頑強であることの分子機構を提示する。

3. 研究の方法

【ショウジョウバエ外感覚器前駆体細胞と上皮細胞運命のゆらぎ】

ショウジョウバエの外感覚器は、外部の物理的、化学的刺激を受容する末梢神経器官であり、規則正しい空間配置パターンをもって形成される。外感覚器の数と配置は Notch/Delta シグナルを介した側方抑制によって制御されることが知られている。側方抑制は、神経系系譜の細胞数を決めることによって発生頑強性を支える重要な発生プロセスである。そして側方抑制は神経細胞が一定の間隔をもって誕生し、組織全体として規則正しい空間パターンが形成されるための普遍的な発生原理である。我々は外感覚器前駆体(SOP)細胞が蛹期において上皮細胞層から出現し、細胞分裂、分化を経て外感覚器を形成する全過程をリアルタイムに検出する系を確立して研究を行った。中胸小楯板に位置する感覚剛毛を作る SOP 数の調節にはカスパーゼの非アポトーシス活性が必要である。カスパーゼと相互作用する因子を RNA 干渉法を用いた遺伝学的手法により同定した。

【ショウジョウバエ組織再生の安定性】

ショウジョウバエ幼虫に存在する成虫原基は傷害を受けても再生する能力を持つ。温度感受性ジフテリア毒素を翅成虫原基に発現させ、一過的に温度変化を加えることで翅成虫原基を傷害し、その後正常な翅に再生する実験系を構築した。

【マウス神経発生における細胞死シグナルの発生頑強性への関わり】

FRET (fluorescent resonance energy transfer) を用いてカスパーゼ活性を検出するプローブ SCAT (Sensor for activated caspases based on FRET) を発現するトランスジェニックマウスを作成し、神経管閉鎖時の発生プロセスにおける細胞死ダイナミクスを解析した。細胞死欠損胚での脳の構築を詳しく解析するために組織学的及び脳細胞を分離して細胞数の定量的解析を行った。カスパーゼ発現細胞では多くのタンパク質が分解されているため、その細胞の特徴を通常の免疫組織化学で解析することは難しい。そ

ここで FISH 法によってカスパーゼ活性化細胞でのモルフォゲンの発現を mRNA レベル検出した。

4. 研究成果

【ショウジョウバエ外感覚器前駆体細胞と上皮細胞運命のゆらぎ】

SOP細胞の誕生する場所、数、時期を時空間的に定量することが可能となった。生体イメージングによる研究によって遺伝学では予測出来ない細胞運命の揺らぎと細胞死の役割が明らかになった。「SOP細胞は、はじめから一定のスペースを維持し規則正しく配置されて誕生する」という側方抑制モデルに基づいた遺伝学的な研究から考えられた姿とは大きく異なっていて、生まれてくるおよそ20%のSOP細胞は神経と上皮の中間的な性質を示す分化エラーSOP細胞であった。これらの分化エラーSOP細胞は細胞死によって除去されることによって、成虫で観察される規則正しい空間配置が得られる。このように神経発生による細胞選択は、神経前駆体細胞が生まれる最初期からおこっていることが明らかになった。

蛹期中胸の生体イメージングの実験系を用いて中胸の発生をより広く観察すると分化エラーSOP細胞以外にも上皮細胞が細胞死で失われる姿がとらえられた。特に細胞密度が高いとされる正中線領域では大量の細胞死が観察され、この領域での細胞死は典型的なアポトーシスとは異なりカスパーゼが活性化しても細胞分断化がしばらくはおきない特徴的なパターンを示した。同じようなアポトーシス細胞はある種の細胞競合によって失われる細胞でも見られた。カスパーゼ活性を阻害すると正中線領域が拡大し外感覚器の配置に乱れが生じた。このように発生でのアポトーシスはSOP細胞で見たような分化エラーの解消と、組織の大きさを決める細胞密度制御において異なる様式で実行され、精緻な外感覚器の配置を可能にしていると考えられた。アポトーシス様式の使い分けの仕組み、生理機能の違いを明らかにすることで、

安定した組織構築を支える細胞死による制御が明らかになると期待される。

上記中胸背毛の SOP 運命の解析に加え、我々はこれまでの解析からカスパーゼ活性化が中胸小盾板における感覚剛毛 SOP 数の安定性に影響を与える事を明らかにしていた。この場合、カスパーゼ活性は非細胞死誘導機能として SOP の産生に関わっている。カスパーゼは様々な体内環境の変化をストレスとして感知して活性化し、その活性化程度に応じて細胞死、非細胞死の作用によって細胞運命に関与することが考えられた。カスパーゼ活性化変異体では SOP 数に揺らぎが生じるが、SOP 形成の揺らぎに影響を与えるエピジェネティクス制御因子に注目して RNAi スクリーニングをプロニューラルクラスターでおこなった。その結果、*eggless/SETDB1* のノックダウンにより、SOP 数に揺らぎがでる事が明らかとなった。*eggless/SETDB1* はヒストン H3K9 メチル化をになう酵素である。H3K9 メチル化は遺伝子発現における抑制性のヒストン修飾であるため、SOP 形成経路が抑制的なエピジェネティック制御を受けて SOP 数を厳密に制御する仕組みがあると考えられた。カスパーゼ阻害による SOP 数増加の表現型は、*eggless/SETDB1* のノックダウンによりさらに増強した。このことは胚の内外からのストレスが直接、間接にカスパーゼの機能に関わり細胞の運命決定制御を行っていることを示唆している。

【ショウジョウバエ組織再生の安定性】

組織再生で見られる安定した組織再編生に細胞死シグナルがどのように関わるのかを解析する実験系を構築した。カスパーゼによって細胞死が実行される局面で、細胞死シグナル経路が活性化された細胞は細胞死実行と同時に、周りに増殖シグナル (Wg や Dpp といったモルフォゲン) を発する。組織傷害によって再生は開始されるが、その際にも上記のような因子が傷害組織から放出され、再生組織自体にも周りの組織にも作用し、全身として頑強で安定した再生をサポートすることが考えられる。翅成虫原基において温度感受性ジフテリア毒素を翅成虫原基に発現

させ、一過的に温度変化を加えることで遺伝学的に細胞死を誘導し、その後に修復と再生とを可能にする実験系を構築した。傷害後の翅成虫原基の遺伝子発現プロファイルを見るとサイトカインや発生タイミングを制御する dILP8 のようなシグナル分子が誘導されていた。翅組織再生には組織傷害後におこる脂肪体での SAM 代謝の変動も関わることがわかり、翅の細胞死を起点にした体内メチル化能の変化と再生との関わりに興味を持たれた。

【マウス神経発生における細胞死シグナルの発生頑強性への関わり】

カスパーゼ活性化動態 FRET ライブイメージング解析から、神経管閉鎖時に見られるアポトーシス細胞の振る舞いには二種類あることが判明した。神経上皮での細胞死は典型的なアポトーシス像 (Classical (C)型) を示すが、神経隆起の部分ではカスパーゼが活性化しても長時間細胞は断片化しない (Dancing (D)型) 様式のアポトーシス細胞が見られた。D 型はショウジョウバエ蛹期中胸正中線で見られるアポトーシスタイプに似ていることから細胞死の役割も C 型とは異なる可能性があると考えられる。

カスパーゼの活性化がおきない *apaf-1* 変異体では神経管閉鎖異常及び外脳症が生じる。原因解明のため、神経管閉鎖過程におけるライブイメージング解析による神経管閉鎖の速度解析を行った結果、カスパーゼ活性化が抑制された状態では神経管閉鎖速度が低下することがわかった。我々は神経管閉鎖過程の頑強性と脆弱性を理解する為のモデル、「発生時間枠モデル」を提唱した。頭部神経管閉鎖完了と時期を同じくして生じる現象として、脳室の拡大が知られる。これは、神経上皮および表皮の活発な増殖と細胞再配置と、神経管閉鎖完了による脳脊髄液の貯留により生じると考えられている。脳室拡大は閉鎖運動とは方向性が逆になるため、神経管閉鎖運動に対しては拮抗的に働くはずである。従って、もし神経管閉鎖がこの脳室拡大の開始時期までに完了しないと、神経管閉鎖運動は阻害され、結果としてもはや閉鎖を

完了することができず、頭部神経管閉鎖障害を生じるとというのが発生時間枠モデルである。*apaf-1* 変異マウス胎児 (アポトーシス欠損胎児) の脳を詳細かつ定量的に調べ、これらの胎児で見られる外脳症の原因は細胞数の増加ではなく、神経管閉鎖の不全が原因であることを明らかにした。

この研究の過程で、脳初期発生で集中的にアポトーシスが観察される場所が、周りの細胞に指令を出すシグナリングセンターと呼ばれる、司令塔の細胞集団であることが判明した。司令塔の細胞集団は発生のさまざまな局面で見られ、そこから放出される体作りのための指令は、器官の形作りや、多種多様な細胞を正しい配置で生み出す「領域化」と呼ばれる現象を司ることが知られている。こうした体作りのための指令は刻々と変化し、指令の切り替えが発生の安定した進行には欠かせない。この切り替えに関して不要となった指令の除去がどのように行われているのか、詳細は分かっていなかった。我々は、胎児期の脳の最前端形成の司令としてはたらく FGF8 タンパク質を産生する司令塔の細胞集団の一部が、アポトーシスによって除去されることを明らかにした。FGF8 を産生する司令塔細胞のアポトーシスが阻害されると、司令塔細胞自身の増殖が止まった状態で過剰に残存し、司令塔の細胞集団が作り出す FGF8 タンパク質が本来存在しない部位にまで分布してしまい、脳の領域化の異常を生じさせた。

司令塔細胞は、FGF8 や Shh など指令となるシグナル分子を放出し、周りの細胞の増殖や分化に影響を与える。こうした体作りのための指令は時々刻々と変化していくが、アポトーシスは不要となった司令塔細胞数の調節とその消去を切れ味よく行なうことで、正確な時期に速やかにシグナルの変換を可能にしている。

このように、安定した発生進行に細胞死が積極的に機能していることがショウジョウバエとマウスを用いた研究によって明らかにされた。今までは捉えることが困難であったために、細胞死の生体機能があまり注目されてこなかったが、今回の研究によって細胞死

の発生を頑強に進める新たな生体機能が浮かび上がってきた。

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 19 件)

Shinoda N., Obata, F., Zhang, L., and Miura, M.: *Drosophila* SETDB1 and caspase cooperatively fine-tune cell fate determination of sensory organ precursor. *Genes to Cells* 21, 378-386, 2016, doi: 10.1111/gtc.12348

Kashio, S., Obata, F., Zhang, L., Katsuyama, T., Chihara, T., and Miura, M.: Tissue non-autonomous effects of fat body methionine metabolism on imaginal disc repair in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 113, 1835-1840, 2016, doi: 10.1073/pnas.1523681113

Obata, F., Tanaka, S., Kashio, S., Tsujimura, H., Sato, R., and Miura, M.: Induction of rapid and selective cell necrosis in *Drosophila* using *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and its silkworm receptor. *BMC Biol.* 13, 48, 2015, doi:10.1186/s12915-015-0160-2

Yamaguchi, Y., and Miura, M.: Programmed cell death and caspase functions during neural development. *Cur. Topics Dev. Biol.*, 114, 159-184, 2015, doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.016

Yamaguchi, Y., and Miura, M.: Programmed cell death in neurodevelopment. *Dev. Cell* 32, 478-490, 2015, doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.019

Chihara, T., Kitabayashi, A., Morimoto, M., Takeuchi, K., Masuyama, K., Tonoki, A., Davis, R.L., Wang, J.W., and Miura, M.: Caspase inhibition in select olfactory neurons restores innate attraction behavior in aged *Drosophila*. *PLOS Genetics* 10, e1004437, 2014, doi: 10.1371/journal.pgen.1004437

Obata, F., Kuranaga, E., Tomioka, K., Ming, M., Takeishi, A., Chen, C-H., Soga, T., and Miura, M.: Necrosis-driven systemic immune response alters SAM metabolism through the FOXO-GNMT axis. *Cell Rep.* 7, 821-833, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.046

Shiraki, N., Shiraki, Y., Tsuyama, T., Obata, F., Miura, M., Nagae, G., Aburatani, H., Kume, K., Endo, F., and Kume, S.: Methionine metabolism regulates maintenance and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Metab.* 19, 780-794, 2014, doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.017

Ming, M., Obata, F., Kuranaga, E., and Miura, M.: Persephone/Spätzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 289, 7558-7568, 2014, doi: 10.1074/jbc.M113.543884

Kashio, S., Obata, F., and Miura, M.: Interplay of cell proliferation and cell death in *Drosophila* tissue regeneration. *Dev. Growth Diff.* 56, 368-375, 2014, doi: 10.1111/dgd.12139.

Lee W-J., and Miura, M.: Mechanisms of systemic wound response in *Drosophila*. *Cur. Topics Dev. Biol.* 108, 153-183, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-391498-9.00001-2.

Yamaguchi, Y., Kuranaga, E., Nakajima, Y., Koto, A., Takemoto, K., and Miura, M.: In vivo monitoring of caspase activation using a fluorescence resonance energy transfer-based fluorescent probe. *Regulated Cell Death*. ed. Ashkenazi, A., Wells, J., Yuan, J. *Methods Enzymol.* 544, 299-325, 2014, doi: 10.1016/B978-0-12-417158-9.00012-1

Nonomura, K., Yamaguchi, Y., Hamachi, M., Koike, M., Uchiyama, Y., Nakazato, K., Mochizuki, A., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A., Yoshida, H., Kuida, K., and Miura, M.: Local apoptosis modulates early mammalian brain development through the elimination of morphogen producing cells. *Dev. Cell* 27, 621-634, 2013, doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.015

Takeishi, A., Kuranaga, E., Tonoki, A., Misaki, K., Yonemura, S., Kanuka, H., and Miura, M.: Homeostatic epithelial renewal in the gut is required to dampen a fatal systemic wound response in *Drosophila*. *Cell Rep.* 3, 919-930, 2013, doi: 10.1016/j.celrep.2013.02.022

Yamaguchi, Y., and Miura, M.: How to form and close the brain: insight into the mechanism of cranial neural tube closure in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 70, 3171-3186, 2013, doi: 10.1007/s00018-012-1227-7

Miura, M.: Apoptotic and nonapoptotic caspase functions in animal development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4, pii: a008664, 2012, doi: 10.1101/cshperspect.a008664

Koto, A., and Miura, M.: Who lives and who dies: role of apoptosis in quashing developmental errors. *Comm. Integ. Biol.* 4, 495-497, 2011 DOI: 10.1016/j.cub.2011.0

Miura, M.: Apoptotic and non-apoptotic caspase functions in neural development. *Neurochemical Res.* 36, 1253-1260, 2011, doi: 10.1007/s11064-010-0341-x

Miura, M.: Active participation of cell death in development and organismal homeostasis. *Dev. Growth. Diff.* 53, 125-136, 2011, doi: 10.1111/j.1440-169X.2010.01228.x

〔学会発表〕(計 18 件)

【招待講演】

Miura, M.: Tissue damage response through systemic regulation of S-adenosyl-methionine metabolism. International Symposium on Transcription and Metabolism, 2016.2.17, Tokyo, Japan

Miura, M.: Cell death signaling by caspase activation during neural development and inflammation. XXIV International Symposium on Morphological Sciences, 2015.9. 2-6, Istanbul, Turkey

Miura, M.: Cell death triggers systemic response for damaged tissue remodeling. 1st international symposium on cell competition. 2015.9.10, Kyoto, Japan

Miura, M.: Tissue interactive reactions mediated by cell death. European Cell Death Organization 23rd conference, 2015. 10.7-10, Geneva, Switzerland

Miura, M.: Dynamics and active roles of caspase-mediated cell death during development and inflammation. Symposium for Aging & Cell Death, Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology. 2014. 5. 14-16, COEX, Seoul, Korea

Miura, M.: Live imaging of caspase activation dynamics reveals active roles of cell death during development and inflammation. Symposium for “Photo-technology on the analysis of cell function” The 11th China-Japan Joint Seminar on Histochemistry and Cytochemistry. 2014.9.28-29, Matsumoto, Japan

Miura, M., and Yamaguchi, Y: Live FRET imaging of apoptotic and inflammatory caspase activation during cell death. 2013. 4.15-19, Cold Spring Harbor Asia, Suzhou, China.

Miura, M.: Active roles of apoptosis during development and tissue homeostasis. UK/Japan Collaborative Symposium, 2012. 2. 9, Cancer Research UK, Cambridge, UK

Miura, M.: Physiological function of cell death in development and tissue remodeling. 2012. 2. 22, EMBO Workshop, Ein-Gedi, Israel.

Miura, M.: Physiological function of caspases in organogenesis and tissue remodeling. 25th Annual French *Drosophila* Conference. 2011. 10.17-20, Lyon, France

【国際会議】

Miura, M.: Caspase-mediated gut cell renewal is

required for systemic wound response in *Drosophila*. Cold Spring Harbor Meeting “Cell Death”. 2013.10.8-12, Cold Spring Harbor, New York, USA.

【国内学会シンポジウム及びワークショップ】

三浦正幸: 組織形成における細胞死機構、第 121 回日本解剖学会シンポジウム、2016.3.29、郡山

三浦正幸: S-アデノシルメチオニン代謝による組織維持機構、第 38 回日本分子生物学会、ワークショップ「栄養・メタボライトと遺伝子発現調節～ニュートリゲノミクスの最前線」、2015.12.1、神戸

三浦正幸: 体から失われる細胞の機能を知る生体イメージング、第 23 回日本バイオイメージング学会学術集会特別講演、2014.9.4-6、大阪

三浦正幸: ショウジョウバエ組織傷害に対する全身性応答に関わる腸上皮の再生、第 46 回日本発生生物学会シンポジウム、2013.5.31、松江

Miura, M.: Physiological roles of cell death signaling in mouse neural development. 第 117 回日本解剖学会総会シンポジウム、2012. 3. 26、甲府

三浦正幸: ショウジョウバエにおけるカスパーゼによる全身性創傷応答制御、第 35 回日本分子生物学会ワークショップ、2012.12.11-14、福岡、日本

Miura, M. The replacement boundary coordinates epidermal remodeling in *Drosophila*. 第 63 回日本細胞生物学会シンポジウム 2011.6.27-29, 札幌、日本

〔図書〕(計 1 件)

宮沢英延、山口良文、三浦正幸: 脳発生における細胞死、脳の発生学—ニューロンの誕生・分化・回路形成、化学同人、pp170-185, 2013

〔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

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~genetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 正幸 (Miura Masayuki)

東京大学・薬学研究科 (研究院)・教授

研究者番号 : 50202338