様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：６３８０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ１４３８６

研究課題名（和文）腫瘍形成の起点となる内在的組織構造の解析

研究課題名（英文）Analysis of tissue-intrinsic structure as the origin of tumorigenesis

研究代表者
鈴木　えみ子（Suzuki, Emiko）

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・准教授

研究者番号：２０１７３８９１

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）：　我々はこれまでに、ショウジョウバエ成虫原基をモデルとした研究から、上皮組織内の内在的な細胞構造の違いによって癌原生変異細胞が周囲の正常上皮から逸脱して増殖することのできる特定部位が存在し、腫瘍形成が必ずこの「腫瘍形成ホットスポット」から開始することを見出した。本研究ではホットスポットの形態学的特徴を流体力学モデルにより検出する方法を開発し、ホットスポット形成の遺伝子制御機構と腫瘍形成開始機構の解析を行った。その結果、ホットスポットの形成に関与すると考えられる遺伝子及びエンハンサーを複数同定した。また、がん原性変異細胞の上皮からの逸脱と増殖に関わるシグナル経路を見出した。

研究成果の概要（英文）：We previously found that neoplastic tumors in Drosophila imaginal discs always arise from the unique intrinsic structures "tumor hotspots" in the epithelial continuum. In the present study, we investigated the genetic mechanism underlying the cellular architecture of the tumor hotspots and the initiation of tumor formation, by the hydrodynamic modeling of epithelia we developed. We identified multiple candidate genes and enhancer elements potentially involved in the formation of hotspots. Furthermore, we found signaling pathways required for the delamination and proliferation of tumorigenic mutant epithelial cells at the hotspots.

研究分野：組織形態学

キーワード：がん微小環境　細胞競合　ショウジョウバエ

１．研究開始当初の背景

（１）過去数十年にわたるガン生物学研究の歴史の中で、悪性新生物の組織学的特徴は詳細に記述され、その原因となる遺伝学的バックグラウンド、特に癌遺伝子や癌抑制遺伝子ならびに関連するシグナル経路の変異に関しては膨大な知識が蓄積されてきた。これらの研究から、腫瘍形成は正常な上皮組織に出現した変異細胞に端を発するとの共通理解が得られているが、始めに出現した癌原性変異細胞がどのようにして上皮組織の協調的統合性維持の制御下から逃れて過増殖を開始するのかという、実際の生体内における腫瘍形成最初期の細胞学的事象は未だによく解っていない。近年、正常上皮組織に出現した癌原性変異細胞は細胞競合によって上皮層から押し出されてアポトーシスを起こす事により組織から除去される事がわかって来た[Tamori & Deng, *J Genet Genomics*, 2011]。代表的なものとして、進化的に保存されている新生癌抑制遺伝子（neoplastic tumor suppressor genes, nTSG）の変異細胞は、上皮層の基底側から押し出されて除去される事がショウジョウバエ成虫原基及び哺乳類表皮由来培養細胞で確認された[Tamori et al, *PLoS Biol*, 2010]。

（２）我々はショウジョウバエ成虫原基に出現した nTSG 変異細胞の挙動が部域によって異なる事を発見した。即ち、組織の大部分では正常細胞に囲まれた nTSG 変異細胞は基底側から押し出され細胞死を起こすが、同組織内の特定の部域(近位ヒンジ部の一部)では上皮層頂端側から抜け出して細胞死を起こすこと無く増殖を開始する。その結果、腫瘍形成は必ずこの特定の部域で始まる事から、この部域を「腫瘍形成ホットスポット」、その他の通常腫瘍形成に至らない部域を「コールドスポット」と定義し(図１)、両部域の違いを詳細に解析する事により腫瘍形成の最初期過程を明らかにできると考えた。

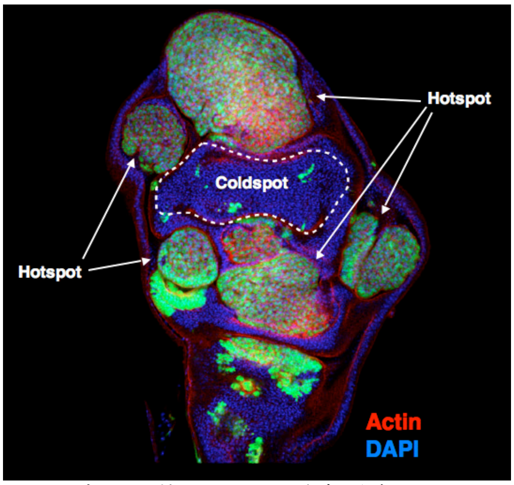

図１．成虫原基における腫瘍形成ホットスポットとコールドスポット

（３）これまでに、ホットスポットとコールドスポットの細胞構造の違いを電子顕微鏡と細胞骨格関連タンパク質等の抗体染色によって調べたところ、①コールドスポットでは微小管が頂端側に多く局在するのに対し、ホットスポットでは基底側に多く局在していること、②上皮細胞の形態が、コールドスポットでは頂底軸に沿った柱状であるのに対し、ホットスポットでは基底側で湾曲し複数の突起を伸ばすことにより複雑な細胞嵌合を形成していること、及び、③この構造の違いにより基底膜側から微小管のパターンを観察すると、コールドスポットでは点状に見えるのに対し、ホットスポットでは複雑な流体状のパターンを呈し、流れがぶつかってよどみを生じる地点にホットスポットがほぼ一致することを見出した（図２）。また、これらの構造の形成に関与する候補因子である RhoGEF2 をコールドスポットでノックダウンすると、nTSG 変異細胞の挙動がホットスポット型になり、頂端側から逸脱して腫瘍形成が誘導されることを見出した。

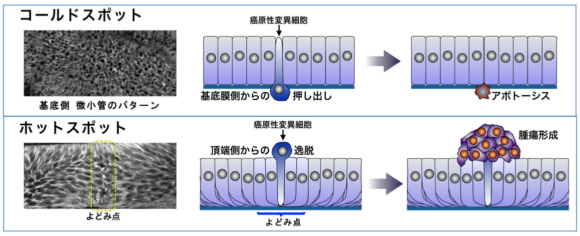

図２．腫瘍形成ホットスポットとコールドスポットの比較。左,上皮基底側から見た微小管配向パターン。コールドスポットでは点状に見えるのに対し、ホットスポットでは複雑な流体上のパターンを呈する。この流れがぶつかるよどみ点がホットスポットの中核と考えられる。中央と右,上皮層内に生じた nTSG 変異細胞の挙動。コールドスポットでは変異細胞は基底側に押し出されアポトーシスを起こす。これに対しホットスポットでは変異細胞は頂端側に逸脱し、増殖して腫瘍を形成する。

２．研究の目的

上記の背景に基づき、本研究では「上皮組織での腫瘍形成は流体力学的に不安定な部域（腫瘍形成ホットスポット）における癌原性変異細胞の上皮組織からの逸脱によって始まる」という仮説の証明を目指し、ホットスポットに特徴的な細胞構造の成立メカニズム、及びこれらの構造が癌原性変異細胞の挙動に与える影響を解析することにより、腫瘍形成開始の基盤となる細胞学的機構を明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

（１）流体力学的解析によるホットスポット検出法の開発（研究協力者・平邦彦博士との共同）：予備実験において、上皮層基底膜側から観察される微小管の部域特異的な流体状パターンとホットスポットを重ねると、流れのパターンがぶつかってよどみを生じる地点にホットスポットがほぼ一致するという観察結果が得られていた。本研究では、この流れとよどみ点（critical point）を流体学的解析によって検出するためのプログラムの開発を行った。

流体力学の解析方法の一つである Particle Image Velocimetry (PIV) 法を微小管のパターンの解析に応用することにより微小管の流れとよどみ点を解析することとした。まずショウジョウバエ成虫原基の可視化した微小管のパターンを、コンフォーカル顕微鏡によってＺ軸に沿って少しずつずらしてスキャンした z-stack イメージとして取り込み、各フォーカルプレーンの画像に対してハフ変換およびガウシアンフィルタによる平滑化を介して、各々の微小管の輪郭検出を行った。以上のプロセスによって抽出した各フォーカルプレーンのストリークフィールド（線としてのデータ）の各差から流れと流れのよどみ点を理論上の値として計算する。以上のプロセスをコンピューター上で簡便に処理できるプログラムを作成し、このプログラムによって検出されるよどみ点と、実際に腫瘍形成が起こる腫瘍形成ホットスポットとの相関関係を定量的に解析するシステムを構築した。

（２）腫瘍形成ホットスポット特異的に発現するエンハンサー融合 Gal4 系統のスクリーニング：腫瘍形成ホットスポットに特徴的な組織構造の形成やホットスポットの構造が腫瘍形成を誘導するメカニズムを遺伝学的手法で解析するため、ホットスポットに特異的に発現するエンハンサーエレメントを探索した。既存の、エンハンサー融合 Gal4 系統ライブラリーを用い、UAS-GFP レポーター系統を掛け合わせた F1３令幼虫の成虫翅原基でレポーターの発現部位がホットスポットに特異的かどうかを指標にスクリーニングを行った。合わせて、コールドスポットに特異的発現を示すものや、ホットスポット周辺に発現を示すものも単離した。ホットスポットに特異的発現を示す系統については、Gal4 Technique for Real-time and Clonal Expression (G-TRACE) 法を用いて、発現の経時的変化を解析した。

（３）腫瘍形成ホットスポットの構造形成機構の遺伝学的解析：方法（２）で単離した特異的な Gal4 系統を用いて、ホットスポット特異的、あるいはコールドスポット特異的に、細胞骨格系の制御遺伝子や異形成に関わる遺伝子のノックダウンまたは過剰発現実験を行い、方法（１）で開発した PIV 法により微小管のよどみ点の変化を解析した。

（４）腫瘍形成ホットスポットにおける腫瘍形成開始の遺伝子機構解析：（２）で同定した Gal4 系統を用いて、nTSG 変異細胞を誘導し、同時に細胞骨格制御シグナルや細胞増殖制御シグナル経路に関わる因子のノックダウンないしは強制発現を行い、腫瘍形成の有無を検証した。

４．研究成果

（１）流体力学的解析によるホットスポット検出法の開発：方法（１）によって成虫原基の上皮基底部における微小管パターンの PIV 法による解析プログラムをほぼ確立することができた。これにより、腫瘍形成ホットスポットを微小管パターンのよどみ点として検出することが可能になり、ホットスポット形成のメカニズムを定量的に解析するシステムを構築できた。

（２）腫瘍形成ホットスポット特異的に発現するエンハンサーエレメントと標的遺伝子の同定：方法（２）のスクリーニングにより、ホットスポット特異的なエンハンサーエレメントを複数同定することができた。なかには細胞数個の範囲で限定的な発現を示すものも見出された。下流の遺伝子についても候補を複数同定できた。今後、これらの遺伝子の働きをさらに解析する予定である。

（３）腫瘍形成ホットスポットの構造形成機構の遺伝学的解析：（２）で同定した Gal4 系統を用いて JAK/STAT シグナル経路や細胞接着装置の下流シグナル経路のノックダウン及び異所／過剰発現を行うと、PIV 法で検出されるよどみ点に異常が見られることがわかった。

（４）腫瘍形成ホットスポットにおける腫瘍形成開始の遺伝子機構：腫瘍形成ホットスポットにおいて、癌原性変異細胞が上皮の頂端部から逸脱するメカニズムには、RhGEF2 が関与していることがわかっていた。本研究ではさらに、逸脱した変異細胞が細胞死を起こすことなく増殖して腫瘍を形成するには JAK/STAT 経路の活性が必要であることを、ホットスポット及びコールドスポットで JAK/STAT 経路のノックダウン及び強制発現を行う実験により明らかにした。
また、（３）でよどみ点に異常が認められた条件で腫瘍形成が認められるか検証したが、形態形成全般にも異常があることが多く、実験結果の評価は困難であった。今後はよどみ

点と腫瘍形成開始との直接的な関係をさらに注意深く多面的に検討する必要がある。

＜引用文献＞
(1) Tamori, Y., Deng, W-M., Cell competition and its implication for development and cancer. J Genet Genomics, 38: 483-95, 2011.

(2) Tamori, Y. et. al., Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition. PLos Biol, e1000422, 2010.

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　1　件）
(1) Tamori Y, Suzuki E, Deng W. M. Epithelial tumors originate in tumor hotspots, a tissue-intrinsic microenvironment. PLos Biol, 14, e1002537, 2016, 査読有.
DOI: 10.1371/journal.pbio.1002537

〔学会発表〕（計　3　件）
(1) 田守　洋一郎、鈴木　えみ子、デン　ウーミン
腫瘍ホットスポット　異形成の起点となる組織内在性微小環境、第３９回日本分子生物学会年会、2016.11.30-12.2、横浜.

(2) TAMORI Yoichiro, SUZUKI Emiko, DENG Wu-Min, Tumor hotspot: endogenous micro-environments where tumorigenesis initiates. 7th International Meeting on Epithelial-Mesenchymal Transition by TEMTIA, 2015.11.11-14, Melbourne, Australia.

(3) TAMORI Yoichiro, SUZUKI Emiko, Deng Wu-Min, Tumor hotspot: endogenous micro-environments where tumorigenesis initiates. Barcelona Biomed conferences "Drosophila as a model in cancer", 2015.6.15-17, Barcelona, Spain.

〔その他〕
プレスリリース
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2016/09/research-highlights_ja/20160902.html

６．研究組織
(1)研究代表者
鈴木　えみ子（SUZUKI, Emiko）
国立遺伝学研究所･構造遺伝学研究センター・准教授
研究者番号：20173891

(2)連携研究者
田守　洋一郎（TAMORI, Yoichiro）
国立遺伝学研究所･構造遺伝学研究センター・助教
研究者番号：10717325

(3)研究協力者
平　邦彦（TAIRA, Kunihiko）
フロリダ州立大学・Dept. Mechanical Engineering・准教授