

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03673

研究課題名(和文)細胞認識を起点としたSurveillanceシステムの遺伝的基盤

研究課題名(英文)genetic dissection of the intrinsic surveillance system in Drosophila epithelium

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物において、異常な細胞を認識して組織から排除するsurveillanceシステムが、組織の恒常性維持に重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、ショウジョウバエ上皮をモデルとした遺伝学的解析を行い、神経細胞の軸索ガイダンスに関わるリガンド-受容体システムSlit-Robo2システムが、創傷治癒の過程において、死にゆく細胞を組織から速やかに排除する上で重要な役割を果たすこと、および、それにより死にゆく細胞から分泌される細胞増殖因子の量を適正に制御して組織修復に貢献していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、創傷治癒の過程において、排除すべき死にゆく細胞を速やかに排除するシステムが機能すること、および、それにより死にゆく細胞から分泌される細胞増殖因子の量を適切に制御し、正確な創傷治癒を実現することが分かった。興味深いことに、創傷治癒とがん発生・進展は類似した機構により引き起こされている可能性が近年示唆されている。本研究成果は、細胞間相互作用を介した組織の恒常性維持機構の解明に貢献するとともに、がん発生・進展の分子機構の解明にも寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Multicellular organisms often exert tumor suppressive mechanism that eliminates abnormal cells from the tissue. In this study, we found in the Drosophila epithelium that Slit-Robo2 repulsive signaling contributes to epithelial wound repair by promoting extrusion of dying cells from the wounded tissue caused by physical injury, which facilitates transient and appropriate induction of growth factors for proper wound healing.

研究分野：細胞間相互作用を介した組織形成や恒常性維持機構の遺伝学的解析

キーワード：創傷治癒 Slit-Robo2 死細胞の排除 ショウジョウバエ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞コミュニティにおいて排除すべき細胞を認識してその排除を実行する機構が、器官形成や恒常性維持で重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら、そのような“自己-非自己”の認識を起点とした Surveillance システムが「いつ」「どこで」機能し、どのような役割を果たしているのか、生理機能や分子機構についてはいまだ不明な点が多い。その理由として、細胞同士が互いに認識して細胞排除を実行する現象を生体内で高感度に検出・解析する系が存在しない点が挙げられる。

申請者はこれまで、ショウジョウバエ上皮組織に人為的に誘導した極性崩壊細胞（上皮細胞の頂底軸方向の極性が崩壊した細胞）が組織から排除される現象に着目し、この排除現象が正常細胞と極性崩壊細胞との間の細胞間相互作用により引き起こされることを明らかにしてきた。またその過程で、神経細胞の軸索ガイダンスに関わるリガンド-受容体システム Sas-PTP10D が上皮に生じた極性崩壊細胞の認識する上で重要な役割を果たしていることを見いだした (Yamamoto, Ohsawa *et al.*, *Nature*, 2017)。さらに申請者が所属している研究室では、Sas-PTP10D と同様に神経細胞の軸索ガイダンスに関わる Slit-Robo2 が極性崩壊細胞を組織から排出 (extrusion) する上で機能することを見いだした (Vaughen & Igaki, *Dev. Cell*, 2016)。重要なことに、Sas-PTP10D システムあるいは Slit-Robo2 システムを破綻させると、極性崩壊細胞は排除を免れ、組織に腫瘍を形成する。すなわち、Sas-PTP10D/Slit-Robo2 システムの破綻は、「極性崩壊細胞の排除」を「腫瘍化」に変換する、「細胞認識を起点とした Surveillance システムの高感度検出系」になり得ると考えられた。そこで申請者らは、これらリガンド-受容体システムに着目し、「細胞認識を起点とした Surveillance」機構の生理的意義を解析する研究を開始した。

申請者らはまず、「細胞認識を起点とした Surveillance」機構が機能する組織・時期を探索するために、種々の Gal4 ドライバーを用いて Sas、PTP10D、Slit、あるいは Robo2 に対する RNAi を発現させ、Sas-PTP10D/Slit-Robo2 システムを時空間特異的に破綻させた。その過程で、Sas-PTP10D/Slit-Robo システムを破綻させた翅原基（翅のブレード領域を形成する幼虫期の組織）に対してタングステンニードルにより物理的損傷を与えた際に、その傷の修復（創傷治癒）に異常を来すことが分かった。このことは、創傷治癒の過程においても、Sas-PTP10D/Slit-Robo2 システムによる Surveillance 機構が機能していること示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では、Slit-Robo2 システムに着目した創傷治癒機構の解析を行い、またそれと並行して内在性がん抑制機構の分子機構の解析を行うことで、「細胞認識を起点とした Surveillance システム」の生理的意義と分子基盤に迫ることを目指した。

### 3. 研究の方法

ショウジョウバエ幼虫の翅成虫原基 pouch 領域に対し、タングステン針を用いて物理的な傷を導入すると、その傷は発生過程の間に修復され、最終的には正常な翅が形成される。本研究では、この創傷治癒の過程における Slit-Robo2 システムの役割を、遺伝学的手法および免疫組織化学により解析した。一方で、極性崩壊細胞が組織から排除される現象をモデルとし、「細胞認識を起点とした Surveillance システム」を司る遺伝子群を単離・同定する遺伝学的スクリーニングを実施した。

### 4. 研究成果

発生中の上皮組織は、物理的損傷を受けると、それ自身で修復する能力を有している。ショウジョウバエ幼虫において成虫原基が損傷を受けると、損傷部位付近において、c-Jun N-terminal kinase (JNK) が活性化して組織修復が行われる。活性化した JNK は、組織修復プロセスにおいて、アクチン細胞骨格の再編成や細胞死の誘導をはじめとした複数のステップに関与することが報告されているが、その詳細な役割についてはいまだ不明な点が多い。申請者らは、極性崩壊細胞が排除される現象において、JNK シグナルにより活性化される Slit-Robo2 システムに着目した。

*slit* や *Robo2* の遺伝子量を半分にする、あるいは、RNAi を用いて pouch 領域特異的に発現を抑制すると、翅の正常発生には影響をきたさない一方で、創傷治癒に異常をきたすことが分かった (図 1)。 *slit* の発現をそのレポーター *slit-lacZ* を用いて調べると、物理的な傷の周辺において JNK シグナルに依存的に *slit* の発現が上昇する様子が観察された。これらの結果から、物理的な傷が組織に導入されると、JNK シグナルに依存して Slit-Robo2 シグナルが活性化し、創傷治癒の過程で重要な役割を果たしていると考えられた。

では、Slit-Robo2 システムが創傷治癒において具体的にどのような役割を果たしているのか。上皮組織に生じた極性崩壊細胞を排除す

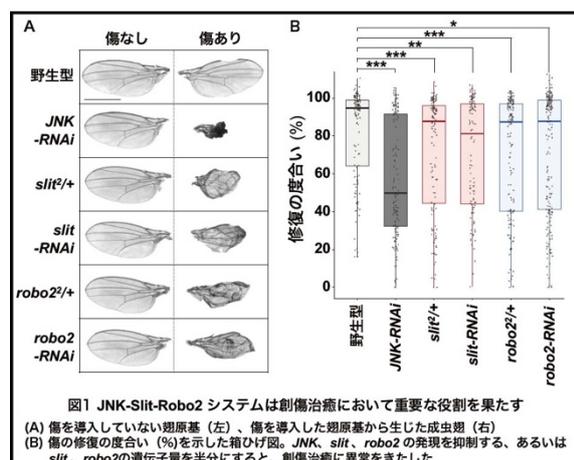


図1 JNK-Slit-Robo2 システムは創傷治癒において重要な役割を果たす

(A) 傷を導入していない翅原基 (左)、傷を導入した翅原基から生じた成虫翅 (右)  
(B) 傷の修復の割合 (%)を示した箱ひげ図。JNK、slit、robo2 の発現を抑制する、あるいは slit、robo2 の遺伝子量を半分にすると、創傷治癒に異常をきたした

る現象においては、Slit-Robo2 システムが極性崩壊細胞を組織から物理的に排出 (extrusion) する上で機能することから (Vaughen & Igaki, *Dev. Cell*, 2016)、組織修復においても同様に、ダメージによって生じた死にゆく細胞 (dying cells : 以降、死細胞とする) の物理的な排出を制御する可能性があると考えた。そこで、傷によって生じた死細胞の局在を免疫組織化学により解析した。その結果、野生型の翅原基では、時間経過とともに、基底側へと押し出された死細胞の割合が高くなっていった。一方で興味深いことに、Slit-Robo2 システムを抑制した翅原基では、基底側へと押し出された死細胞の割合の上昇が、野生型に比べて抑えられていること、逆に、Slit あるいは Robo2 を過剰発現させて slit-Robo2 システムの活性化を増強すると、野生型に比べて亢進することが分かった。これらの結果から、Slit-Robo2 システムは組織修復において、死にゆく細胞の排除を正に制御していることが分かった。

では、Slit-Robo2 システムを介して死細胞を速やかに排出することがなぜ必要なのか。組織再生の過程で、死にゆく細胞が JNK 依存的に細胞増殖因子 Wingless (Wnt ホモログ) や Dpp (BMP ホモログ) を産生・分泌して、周辺細胞の細胞増殖を誘導する“代償性増殖”現象が知られている (Perez-Garijo et al., *Development*, 2004; Perez-Garijo et al., *Development*, 2009; Ryoo et al., *Dev. Cell*, 2004; Smith-Bolton et al., *Dev. Cell*, 2009; Wells et al., *Curr. Biol.*, 2006)。実際に、傷をつけた野生型翅原基の死細胞を調べると、死にゆく細胞において Wg や Dpp の発現が上昇していることが確認された。ここで興味深いことに、Slit-Robo2 システムを抑制すると、死細胞における Wg や Dpp の発現が野生型に比べて過剰になっていることが分かった。そこで、このような Wg や Dpp の異所的な発現が組織修復異常の原因であるかどうかを調べるために、wg や dpp の遺伝子量を半分にするすることで、それらの発現を抑制した。その結果、Slit-Robo2 システムの抑制時に観察された組織修復破綻がレスキューされた。このことは、死細胞の排出不全により誘導される過剰な細胞増殖因子が組織修復に異常を誘発することを示唆している。

以上により、ショウジョウバエ上皮の組織修復のプロセスにおいて、JNK シグナルに依存して Slit-Robo2 システムが活性化すること、および、この活性化した Slit-Robo2 システムは死細胞を速やかに組織から排出させることで、死細胞から分泌される細胞増殖因子 Wg や Dpp の量が過剰にならないように調節し、これにより、組織修復プロセスを促進していることが分かった (Iida, *Ohsawa et al.*, *Sci. Rep.*, 2019) (図2)。すなわち、これまでに明らかになっていなかった死細胞排除の意義が、細胞増殖因子の発現量の調節であることが本研究により示唆された。ただし依然として、組織修復プロセスにおいて細胞増殖因子を過剰に発現した細胞が、どのようにして修復に異常を誘発するのかはいまだ不明である。今後解析を進めていくことで、死細胞を排出する生理的意義、さらには、組織修復に限定せず、組織に生じた異常細胞を排出する現象に共通した生理的意義の解明につながることを期待される。

一方で本研究では、「細胞認識を起点とした Surveillance システム」の全容解明を目指し、極性崩壊細胞が排除される現象をモデルとした遺伝学的スクリーニングを実施した。具体的には、極性崩壊細胞を取り囲む正常細胞群に対し、変異原化合物エチルメタンサルホン酸 (Ethyl Methane Sulfonate; EMS) を用いてランダムに突然変異を導入し、これにより、細胞排除が抑制される突然変異体を網羅的に単離した。その結果、セリンプロテアーゼインヒビター *Serpins* (*spn*) をその責任遺伝子として同定することに成功した。

*Spn5* は N 末端にシグナルペプチド配列を持つ分泌性セルピンであり、Toll リガンド Spätzle が前駆体から活性化型へと切断されるのを阻害することで、ショウジョウバエの自然免疫経路 Toll シグナルを負に制御することが知られている (Ahmad et al., *PNAS*, 2009)。遺伝学的解析を行なった結果、(1) 極性崩壊細胞が上皮組織に出現すると、通常は上皮細胞から分泌される *Spn5*

が極性崩壊細胞内で Toll シグナルが活性化することを抑制し、細胞排除を引き起こすこと、および、(2) この *Spn5* による Toll シグナルの抑制が解除されると、極性崩壊細胞は JNK シグナルとがん抑制経路 Hippo 経路の活性化を介して腫瘍を形成することが分かった (Katsukawa, *Ohsawa et al.*, *Curr. Biol.*, 2018) (図3)。すなわち、上皮から分泌される *Spn5* が内在性がん抑制機構としての機能を担っていることが明らかとなった。今後、*Spn5* に対して極性崩壊細胞が正常細胞に比べて感受性が高い仕組みを明らかにすることで、組織が内包する「細胞認識を起点とした Surveillance システム」の理解がより深まると考えられる。

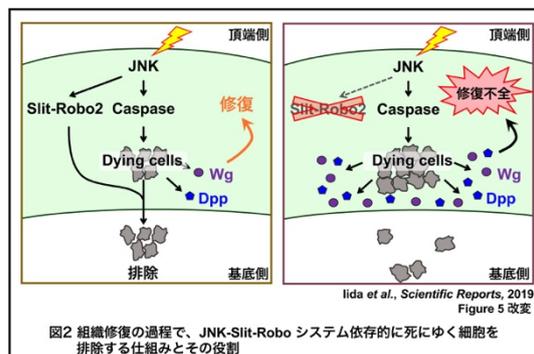


図2 組織修復の過程で、JNK-Slit-Robo システム依存的に死にゆく細胞を排除する仕組みとその役割

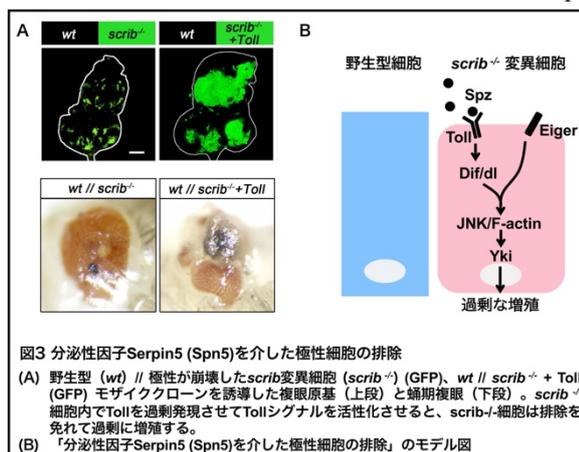


図3 分泌性因子 Serpin5 (Spn5) を介した極性細胞の排除

(A) 野生型 (wt) // 極性が崩壊した scrib 変異細胞 (*scrib*<sup>-/-</sup>) (GFP)、wt // *scrib*<sup>-/-</sup> + Toll (GFP) モザイククローンを誘導した複眼原基 (上段) と縮期複眼 (下段)。scrib<sup>-/-</sup> 細胞内で Toll を過剰発現させて Toll シグナルを活性化させると、scrib<sup>-/-</sup> 細胞は排除を免れて過剰に増殖する。  
(B) 「分泌性因子 Serpin5 (Spn5) を介した極性細胞の排除」のモデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuboi A, Ohsawa S, Umetsu D, Sando Y, Kuranaga E, Igaki T, Fujimoto K	4. 巻 28
2. 論文標題 Competition for Space Is Controlled by Apoptosis-Induced Change of Local Epithelial Topology	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2115-2128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2018.05.029.	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 Katsukawa M, Ohsawa S, Zhang L, Yan Y, Igaki T	4. 巻 28
2. 論文標題 Serpins Facilitates Tumor-Suppressive Cell Competition by Blocking Toll-Mediated Yki Activation in Drosophila	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1756-1767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2018.04.022.	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 該当する

1. 著者名 Cong B, Ohsawa S, Igaki T	4. 巻 37
2. 論文標題 JNK and Yorkie drive tumor progression by generating polyploid giant cells in Drosophila	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 3088-3097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0201-8.	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 Ohsawa S, Vaughen J, Igaki T	4. 巻 44
2. 論文標題 Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 284 ~ 296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2018.01.009	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 該当する

1. 著者名 Iida C, Ohsawa S, Taniguchi K, Yamamoto M, Morata G, Igaki T	4. 巻 9
2. 論文標題 JNK-mediated Slit-Robo signaling facilitates epithelial wound repair by extruding dying cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci., Rep.	6. 最初と最後の頁 19549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56137-z.	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 該当する

1. 著者名 Ohsawa S	4. 巻 61
2. 論文標題 Elimination of Oncogenic Cells That Regulate Epithelial Homeostasis in Drosophila	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev. Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 337-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12604	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20件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Ohsawa S
2. 発表標題 Epithelial cell-turnover ensures robust coordination of tissue growth in Drosophila
3. 学会等名 Key Forum 2018 “Stem Cell Traits and Developmental Systems” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Cong B, Ohsawa S, Igaki T
2. 発表標題 Tumor progression driven by polyploid giant cells in Drosophila
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会 (口頭発表)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wada Y, Ohsawa S, Igaki T
2. 発表標題 Hippo-mediated morphogenetic robustness during Drosophila wing development
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会・第51回日本発生生物学会合同大会（ポスター発表）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 片山 宰, 西川 星也, 大澤 志津江, 高松 敦子, 井垣 達吏
2. 発表標題 細胞競合の勝敗を規定する組織環境条件の遺伝学および数理的解析
3. 学会等名 第6回新学術領域「細胞競合」班会議（ポスター発表）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wada Y, Ohsawa S, Igaki T
2. 発表標題 Hippo-mediated morphogenetic robustness during Drosophila wing development
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akai N, Ohsawa S, Igaki T
2. 発表標題 Epithelial cell-turnover ensures robust tissue growth in Drosophila ribosomal protein mutants
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Iida C, Yamamoto M, Ohsawa S, Igaki T
2. 発表標題 Dissecting the role of cell competition in wound healing
3. 学会等名 The 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤 志津江
2. 発表標題 上皮の恒常性維持を司る細胞競合の分子基盤
3. 学会等名 第29回高遠・分子生物学シンポジウム(口頭発表)(招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Cong B, Ohsawa S, Takino K, Igaki T
2. 発表標題 JNK and Yorkie cooperate to drive tumor progression by generating polyploid giant cells in Drosophila
3. 学会等名 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference, APDRC4 (Poster) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iida C, Ohsawa S, Yamamoto M, Igaki T
2. 発表標題 Dissecting the role of cell competition in wound healing
3. 学会等名 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference, APDRC4 (Poster) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田 千晶、大澤 志津江、山本 真寿、井垣 達史
2. 発表標題 細胞競合と創傷治癒の共通原理の解明
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（口頭・ポスター発表）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Iida C, Ohsawa S, Yamamoto M, Igaki T
2. 発表標題 Dissecting the role of cell competition in wound healing
3. 学会等名 3rd International Symposium on Cell Competition; Cell Competition in Development and Cancer (Poster) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 叢 博杰、大澤 志津江、瀧野 恭子、井垣 達史
2. 発表標題 JNKとYorkieの協調的な活性化は細胞の多倍体肥大化を誘導して腫瘍悪性化を引き起こす
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（ポスター発表）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 飯田 千晶、大澤 志津江、山本 真寿、井垣 達史
2. 発表標題 創傷治癒における細胞競合機構の役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ポスター発表）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 叢 博杰、大澤 志津江、井垣 達史
2. 発表標題 JNKとYorkieの協調は多倍体肥大化細胞を誘導することで腫瘍悪性を促進する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会（ポスター発表）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 細胞ターンオーバーを介した発生ロバストネスの遺伝的基盤
3. 学会等名 第19回 日本タンパク質科学学会年会 第71回 日本細胞生物学会大会 合同大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 折り畳まれた上皮組織から3D形態へと変形を開始するメカニズム
3. 学会等名 第1回日本メカノバイオロジー研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 Elimination of oncogenic cells through tumor-suppressive cell competition in Drosophila
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大澤志津江
2. 発表標題 3D morphogenesis of adult appendages from the Folded Epithelial Sheets in Drosophila
3. 学会等名 The 2nd NIBB-Princeton Joint Symposium "Imaging and Quantitative Biology" (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野崎勝也、柳田晃佑、中山萌美、前川絵美、井垣達史、大澤志津江
2. 発表標題 ショウジョウバエ成虫原基から外部形態への変形を制御するメカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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