

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14697

研究課題名（和文）血球細胞を介したNotchシグナル伝達の遠隔制御メカニズムに関する研究

研究課題名（英文）The mechanism remotely controlling Notch signaling through hemocytes

研究代表者

山川 智子（Yamakawa, Tomoko）

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：20645402

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）：Notchシグナル伝達は多細胞生物における様々な細胞の分化を制御しており、ヒトにおけるNotchシグナルの異常はがんや神経変性など重篤な疾患を引き起こすことが知られている。Notchシグナルの細胞内制御メカニズムについてはよく理解されているものの、細胞外から受ける制御についてはほとんど理解されていなかった。

研究代表者は、ショウジョウバエpecanex (pcx)遺伝子が血球細胞特異的に小胞体の形態形成に必須であることを発見した。また、血球細胞でpcxの突然変異が生じると、血球細胞はNotchシグナル抑制因子を分泌する能力を新たに獲得することを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんや乳がんといった一部のがん組織では、Notchシグナルの異常な亢進が認められており、Notchシグナルを抑制することでがん細胞の増殖を抑えられることが報告されている。したがって、Notchシグナルの抑制は、がんに対する新たな治療薬の開発という観点からも重要な課題である。本研究では、pecanex遺伝子の突然変異によって、血球細胞がNotchシグナル抑制因子を分泌する能力を獲得するという、新たな細胞シグナル破綻メカニズムを確立した。このNotchシグナル抑制因子はがんに対する新たな治療戦略としての可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Notch signaling regulates various cell differentiation in multi-cellular organisms and its defects cause serious diseases such as cancer or neurodegeneration. Whereas the intracellular mechanisms controlling Notch signaling has well-established, little was understood about the controls received from outside the cell.

We discovered that *Drosophila pecanex (pcx)* was specifically essential for the ER morphogenesis within hemocytes. We also found that when *pcx* mutations occur in hemocytes, they newly acquire an ability to secrete Notch signaling inhibitors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Notchシグナル 血球細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Notch 受容体 (Notch) を介するシグナル伝達系 (Notch シグナル伝達系) は、細胞間の直接的な接触を介した細胞間相互作用で機能し、多様な細胞運命の決定を制御している。Notch シグナル伝達は、進化的に広く保存されており、ヒトでは、Notch シグナル伝達の異常が、白血病やガンといった、様々な疾患を引き起こすことが知られている。Notch シグナル伝達の細胞内制御メカニズムについてはよく理解されている一方、細胞外から受ける制御についてはほとんど明らかになっていない。

ショウジョウバエ胚の予定神経上皮域において、神経細胞の運命を選択し始めた神経幹細胞は、周りの細胞内における Notch シグナル伝達を活性化し、神経細胞への分化を抑制する (側方抑制)。したがって、Notch シグナル伝達が失われると、側方抑制が働かず、すべての予定神経上皮細胞が神経細胞へと分化する。*pcx* 胚は神経過形成を示すことから (Perrimon et al., 1984)、*pcx* は Notch シグナル伝達の構成遺伝子であると考えられてきた。Pcx は、3,413 のアミノ酸から成る 16 回膜貫通タンパク質であり、ほ乳類においても保存されている。しかしながら、Pcx の分子機能は、いかなる動物においてもわかっていなかった。研究代表者は、Pcx が小胞体に局在し、Notch シグナル伝達の活性化に機能していることを明らかにした。さらに、*pcx* 胚の小胞体が肥大することを発見した。ところが、このような小胞体の肥大は、Notch シグナル伝達が欠損する他の突然変異体胚では観察されなかった (Yamakawa et al., 2012)。このことから、小胞体の肥大が、*pcx* 胚における Notch シグナル伝達の異常の原因であることが示唆された。最近の研究から、研究代表者は、*pcx* 胚における小胞体の肥大が、血球細胞でのみ起こっていることを発見した (未発表)。そこで、*pcx* 胚において、血球細胞特異的に *pcx* を発現させたところ、神経過形成や小胞体の肥大が救済された。これらの結果は、血球細胞における *pcx* の機能が、予定神経上皮域における Notch シグナル伝達の活性化に十分であることが示唆されている。

## 2. 研究の目的

これまでの研究成果から、血球細胞が Pcx の機能を介して、離れた場所の Notch シグナル伝達を制御するメカニズムが存在する可能性が示された。そこで本研究の目的は、細胞生物学的なアプローチにより、本メカニズムを証明し、シグナル伝達を遠隔制御する血球細胞の分泌性因子を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

前項で掲げた目的を達成するため、以下の実験を行った。

### 実験 血球細胞の除去実験

： 野生型胚と *pcx* 胚から血球細胞を除去し、神経過形成が抑制されるかを調べる。血球細胞の分化に機能する *serpent (srp)* の突然変異体胚では、すべての血球細胞が失われると報告されている (Stramer et al., 2005)。そこで、*pcx* と *srp* の二重突然変異体胚を作成した。さらに、血球細胞特異的にリントキシンを発現させ、細胞死を誘発した。それらの胚に対して神経細胞を調べた。

### 実験 血球細胞の移植実験

血球細胞が予定神経上皮域の Notch シグナル伝達を調節することを証明するため、野生型胚と *pcx* 胚の血球細胞を互いに移植して交換し、神経過形成への影響を調べた。まず、野生型胚と *pcx* 胚それぞれの血球細胞特異的に mCherry を発現させ、胚を解剖して血球細胞を取り出す。その後、mCherry を発現する血球細胞をセルソーターで分離して集める。分取した野生型胚の血球細胞を *pcx* 胚へ、*pcx* 胚の血球細胞を野生型胚へ互いに移植し、Notch シグナル伝達に影響を与えるかを調べた。

### 実験 Notch シグナル活性に対するレポーターアッセイ

*pcx* 突然変異血球細胞が Notch シグナルに対する抑制因子を分泌しているかを検証するため、野生型血球細胞と *pcx* 突然変異血球細胞の培養上清を Notch シグナル活性に対するレポーターアッセイ系へ添加する。

## 4. 研究成果

### 実験 血球細胞の除去実験

： *srp* と *pcx* 二重突然変異体を作成した結果、血球細胞が除去され、神経過形成が救済された。ところが、単独の *srp* 突然変異体では血球細胞は除去されたものの神経系に異常は見られなかった。この結果をさらに検証するため、別の方法で血球細胞の除去を行った。血球細胞でリントキシンを発現させて細胞死を誘導した結果、野生型胚では神経系に影響はまったくみられなかったが、*pcx* 胚では神経過形成が救済された。これらの結果から、血球細胞は本来 Notch シグナル伝達に関与しないが、*pcx* 遺伝子が欠失すると、血球細胞は Notch シグナルを抑制する能力を新たに獲得することが予想された。

#### 実験 血球細胞の移植実験

野生型胚から回収した血球細胞を、血球細胞を除去した野生型胚へ移植した結果、神経系に大きな変化は見られなかった。ところが、*pcx* 突然変異胚から回収した血球細胞を、血球細胞を除去した野生型胚へ移植したところ、約 50%の胚が神経過形成を誘発された。この結果から、*pcx* 突然変異血球細胞は Notch シグナルを抑制する因子を分泌している可能性が示唆された。

#### 実験 Notch シグナル活性に対するレポーターアッセイ

*pcx* 突然変異血球細胞から Notch シグナル抑制因子が分泌されているかを検証するため、野生型と *pcx* 突然変異血球細胞の培養上清を Notch シグナル活性に対するレポーターアッセイ系へ添加しようと試みた。ところが、胚性血球細胞を十分に回収することが難しかった。そこで、胚性血球細胞由来の培養細胞である S2 細胞を用いることにした。S2 細胞へ CRISPR/ Cas9 法によって *pcx* 突然変異を導入し、*pcx* 突然変異 S2 細胞を樹立した。*pcx* 突然変異 S2 細胞の小胞体を観察したところ、*pcx* 突然変異胚と同様に小胞体の肥大が見られたことから、*pcx* 突然変異血球細胞を代替できるものと考えた。そこで、野生型 S2 細胞と *pcx* 突然変異 S2 細胞の培養上清を回収し、レポーターアッセイ系へ添加したところ、*pcx* 突然変異 S2 細胞由来の培養上清は Notch シグナル活性を抑制できることが判明した。

以上の実験結果から、*pcx* 遺伝子における突然変異は、血球細胞において Notch シグナル抑制因子を分泌できる機能の獲得を誘発し、Notch シグナル抑制因子は離れた場所における Notch シグナルを抑制することが明らかとなった。残念ながら、Notch シグナル抑制因子の同定には至らず、今後の課題であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamakawa T, Atsumi Y, Kubo S, Yamagishi A, Morita I, Matsuno K.	4. 巻 209
2. 論文標題 Insight into Notch Signaling Steps That Involve pecanex from Dominant-Modifier Screens in <i>Drosophila</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genetics.	6. 最初と最後の頁 1099-1119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1534/genetics.118.300935	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 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomoko Yamakawa
2. 発表標題 A neomorphic inhibitor secreted from pecanex mutant phagocytes remotely suppresses Notch signaling
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Yamakawa
2. 発表標題 The cell-type specific functions of an ER modulating factor, Pecanex in Notch and Wnt signaling pathways
3. 学会等名 Wnt研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomoko Yamakawa
2. 発表標題 A neomorphic inhibitor secreted from pecanex mutant phagocytes remotely suppresses Notch signaling
3. 学会等名 53rd JSDB/APDBN Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoko Yamakawa
2. 発表標題 A neomorphic inhibitor secreted from pecanex mutant phagocytes remotely suppresses Notch signaling
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山川 智子
2. 発表標題 血球細胞を介したNotchシグナル伝達の遠隔制御メカニズム
3. 学会等名 日本発生物学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2018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