

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03419

研究課題名(和文)細胞死の時空間伝播による生体損傷チェックポイントの分子基盤

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of tissue repair by the spatio-temporal regulation of cell death

研究代表者

榎本 将人(Enomoto, Masato)

京都大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：00596174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物の上皮組織は損傷を修復し再生することができる。このような組織修復には、細胞同士の相互作用だけでなく組織同士のコミュニケーションも重要であるものの、その時空間制御メカニズムにはいまだ不明な点が多い。本研究は、ショウジョウバエ上皮である翅原基をモデルとして組織傷害に対する生体内の細胞間・組織間の相互作用による組織修復メカニズムの理解を目指したものである。その結果、組織傷害によって生じた細胞死が周囲の細胞や空間的に離れた組織にも伝播し、この細胞死の時空間伝播により組織修復が円滑に進行し、時間軸に沿った上皮形態の再形成が達成されることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、組織傷害により生じた細胞死が細胞・組織間を伝播し、この死細胞の時空間動態が組織の修復と再生の達成に重要であることを明らかにしたものである。本成果は、細胞死による生体の損傷チェックポイントという新しい概念を提唱するものである。また、このような死細胞を介した細胞・組織間コミュニケーションによる組織修復の仕組みの理解は、再生医学・医療工学に新しい視点を提供すると共に、組織再生を人為的に制御する手法やマテリアル開発の基盤になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Epithelial tissue repair is achieved by cell-cell interactions of various cells. However, the mechanism by which tissue repair is spatiotemporally controlled in vivo remains elusive. In this study, I elucidated the mechanism of spatiotemporal regulation of tissue repair using *Drosophila* imaginal epithelium. I found in *Drosophila* wing imaginal discs that physical injury causes cell death, which is broadly generated within damaged tissues. Cell death in damaged tissues systemically propagates to other organs at the distance. Furthermore, genetic inhibition of inter-organ propagation of cell death between damaged tissue and normal tissue caused impaired tissue repair. These findings suggest that dying cells generated in normal tissues spatiotemporally control tissue repair by driving inter-organ communication with damaged tissues.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞死 細胞間相互作用 組織間相互作用 組織修復 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

多細胞生物において生体内の様々なストレスにより傷害を受けた上皮組織は、最終的に損傷を修復し再び元通りの機能・形態を回復することができる。このような組織のリモデリングは、炎症・細胞増殖・細胞死・細胞運動など多様な生体応答が時間軸に沿って引き起こされることで達成される複雑な生体制御システムである (Eming *et al.*, *Sci Transl Med*, 2014; Schechter and Schwartz, *Trend Mol Med*, 2012)。この複雑な生命現象を支えているのは、損傷組織の微小環境を形成している上皮細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞や免疫細胞といった多様な細胞同士の時空間的な相互作用である。一方で、生体内では個々の組織は独自に機能しているわけではなく、互いに連動し合いながら生体恒常性を維持している (Droujinine *et al.*, *Annu. Rev. Genet.*, 2016)。例えば、血糖値の上昇に反応して膵臓のベータ細胞で分泌されたインスリンは、全身性に作用することで各組織の糖代謝を制御し生体内の血糖値を下げる (Wilcox, *Clin. Biochem. Rev.*, 2005)。インスリン同様に、ホルモンの1種であるレプチンは脂肪組織で分泌された後、脳内の視床下部に作用することで摂食を抑制し糖代謝を調整する (Stern *et al.*, *Cell Metab.*, 2016)。これらは生体内の栄養状態に応じて組織同士が連携し代謝エネルギー経路を制御していることを示す代表的な例である。また最近、神経と免疫システムの連関によって生体の恒常性が維持されることが示されつつある。このように、個々の組織・臓器は互いに連携し合いながら生体内の環境/ストレスに適応・応答し個体の恒常性を維持している。このことは、生体組織の修復と再生には損傷組織内の細胞同士のコミュニケーションだけでなく、生体内の組織間コミュニケーションも重要であることが示唆している (図1)。しかしながら、生体損傷を受けた個体において細胞・組織同士がどのように相互作用し合いながら組織の修復と再生を動的に制御しているか、その分子実体や制御メカニズムにはいまだ不明な点が多い。このような組織損傷を受けた生体内で引き起こされる細胞・組織同士の時空間相互作用のメカニズムを明らかにするためには、損傷に反応して変化する個々の細胞挙動や組織応答を生体レベルで可視化し、その相互作用による個体応答を解析することが重要である。

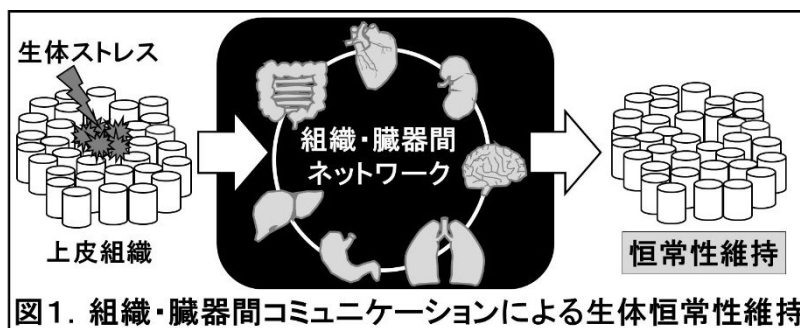


図1. 組織・臓器間コミュニケーションによる生体恒常性維持

2. 研究の目的

本研究では、細胞・組織同士の時空間相互作用による生体恒常性維持の仕組みを理解するために、ショウジョウバエ上皮である翅原基に物理的傷害を誘導し生体損傷によって動的に変化する細胞間・組織間コミュニケーションの分子実体とその制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 損傷組織の修復再生の解析：生体損傷に対する細胞・組織同士の相互作用やその表現型を解析するために、ショウジョウバエ上皮である翅原基をモデルとした。具体的には、ショウジョウバエの翅原基に特異的な遺伝子プロモーター (nub-gal4 など) を利用して蛍光タンパク質 (GFP や RFP) のような可視化マーカーで翅原基を標識しておく。これらのショウジョウバエを用いて、実体顕微鏡下で個体内に2つ存在する翅原基の片方 (右側の翅原基) にのみニードルを用いて物理的な傷害を *in situ* で誘導し、損傷組織の修復・再生を成虫の翅のサイズ・形態で評価する実験系を用いた (傷害を誘導していない左側の翅をコントロールとした) (図2)。

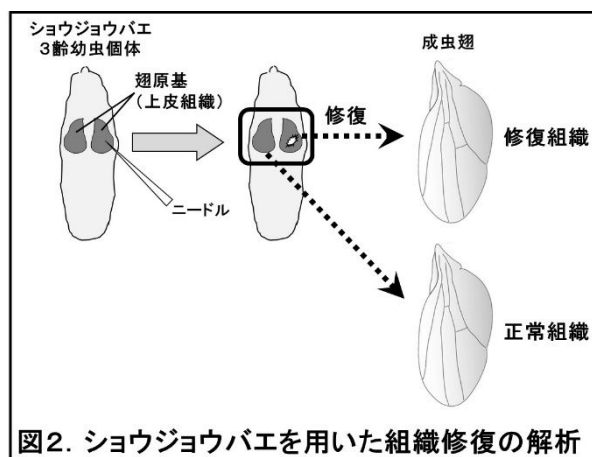


図2. ショウジョウバエを用いた組織修復の解析

(2) 損傷組織や正常組織の応答解析：損傷によって変化する細胞応答や組織応答を解析するため、上記(1)の方法で損傷を誘導したショウジョウバエ3齢幼虫個体を解剖し、損傷組織 (傷害を誘導した翅原基) や各種正常組織内の細胞応答や分子活性について各種抗体を用いた免疫組織染色や蛍光レポーターにより解析した。また、2種類の遺伝子発現制御システム (酵母由来 Gal4/UAS システム・赤パンカビ由来 QF/QUAS システム) を同時に適用させることで生体内の異

なる組織同士の相互作用を独立した遺伝子発現操作により解析した。

(3) マクロファージ特異的な遺伝子発現制御： 生体損傷を受けた個体内のマクロファージ動態を解析するため、マクロファージ特異的なプロモーター(Hml-gal4 や Hml-RFP)を利用してマクロファージを可視化すると共に、Gal4/UAS システムを駆使してマクロファージでのみ遺伝子発現操作することでマクロファージによる生体応答を解析した。

4. 研究成果

ショウジョウバエ3齢幼虫の翅原基に物理的傷害を誘発し数時間後に損傷組織を観察したところ、損傷組織内に傷害によって多数の死細胞が発生することを見出した。このとき、損傷組織における細胞死は、損傷部位の周囲のみならず損傷組織の広範囲に誘導されていた(図3:ローカル細胞死)。そこで、このような損傷組織で引き起こされる細胞死を遺伝学的手法により抑制すると(細胞死実行因子カスパーゼの阻害因子 p35 や細胞死促進因子 Reaper/Hid/Grim に対する microRNA を翅原基特異的に発現) 組織修復の異常が引き起こされることが分かった。このことは、損傷組織に生じた細胞死が組織修復に重要な現象であることを示唆している。さらに、組織損傷を受けたショウジョウバエ個体内の正常組織の挙動を解析したところ、興味深いことに損傷上皮に生じた細胞死は傷害を受けた組織のみならず生体内において損傷組織とは空間的に離れた正常組織(非損傷組織)でも亢進していた(図3:システミック細胞死)。驚くべきことに、この正常組織における細胞死の亢進は、損傷組織の細胞死を阻害すると抑制された。このことは、組織傷害によって誘発された細胞死が損傷組織内のみならず他の組織にも時空間的に伝播することを示唆している。そこで、研究の方法(2)に記載した2種類の遺伝子発現制御システム(Gal4/UAS システムと QF/QUAS システム)を同時に駆使することで遠隔組織に生じた細胞死のみを遺伝学的に抑制した。その結果、成虫の翅は形態異常を示していたことから、損傷組織の修復が破綻することが分かった(図4)。このことは、損傷部位を起点とした細胞死が細胞間・組織間を伝播し、これにより発生する死細胞が生体損傷に対する個体の適応応答を促していることを示唆している。

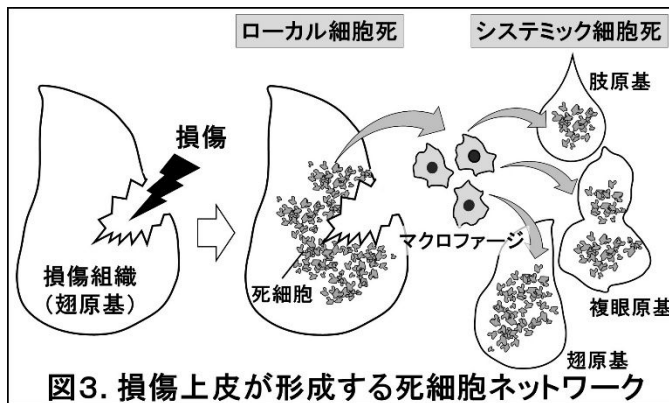


図3. 損傷上皮が形成する死細胞ネットワーク

上述の結果を受けて、続いて生体内の正常組織に生じるシステミックな細胞死がどのように誘導されるのか、その分子メカニズムを解析した。まずシステミックな細胞死が損傷組織の死細胞の発生に反応して生じることから、損傷組織の死細胞の時空間動態を解析した。その結果、損傷組織に生じた死細胞の周囲には損傷に反応して誘引してきたマクロファージ(ショウジョウバエ plasmatocyte)が集積しており、これらのマクロファージによって損傷組織の死細胞は貪食されていることが分かった。このマクロファージによる死細胞の貪食メカニズムを解析するため、研究方法(3)で示した手法を用いることで任意の遺伝子の発現をマクロファージ特異的にサイレンシングする RNAi スクリーニングを実施し、死細胞の貪食に関わるマクロファージ内の因子の探索・同定を試みた。その結果、マクロファージは細胞表面受容体タンパク質である Draper を介して死細胞を貪食していることが分かった。実際に、マクロファージ特異的に Draper の発現を抑制すると、マクロファージ内部に取り込まれる死細胞の数は顕著に減少しており損傷組織は最終的に修復異常を引き起こした。これらの結果から、マクロファージによる死細胞の貪食プロセスが組織修復に必須のイベントであることが分かった。このような現象は、マクロファージによる組織修復過程における抗炎症作用の1つであると考えられるが、このとき興味深いことに、マクロファージ特異的に Draper タンパク質の発現を抑制した個体では、組織傷害に反応して正常組織で生じる細胞死の発生が抑制されていることを見出した。このことは、マクロファージが死細胞の貪食を介して引き起こす生体応答が正常組織の細胞死の亢進を誘発している可能性を示唆しているといえる。

以上の一連のデータから、死細胞の貪食に反応してマクロファージは未知の機構を介して正常組織に細胞死を引き起こし、これにより損傷組織と正常組織同士が互いの成長・環境を調和さ

誘導されるのか、その分子メカニズムを解析した。まずシステミックな細胞死が損傷組織の死細胞の発生に反応して生じることから、損傷組織の死細胞の時空間動態を解析した。その結果、損傷組織に生じた死細胞の周囲には損傷に反応して誘引してきたマクロファージ(ショウジョウバエ plasmatocyte)が集積しており、これらのマクロファージによって損傷組織の死細胞は貪食されていることが分かった。このマクロファージによる死細胞の貪食メカニズムを解析するため、研究方法(3)で示した手法を用いることで任意の遺伝子の発現をマクロファージ特異的にサイレンシングする RNAi スクリーニングを実施し、死細胞の貪食に関わるマクロファージ内の因子の探索・同定を試みた。その結果、マクロファ

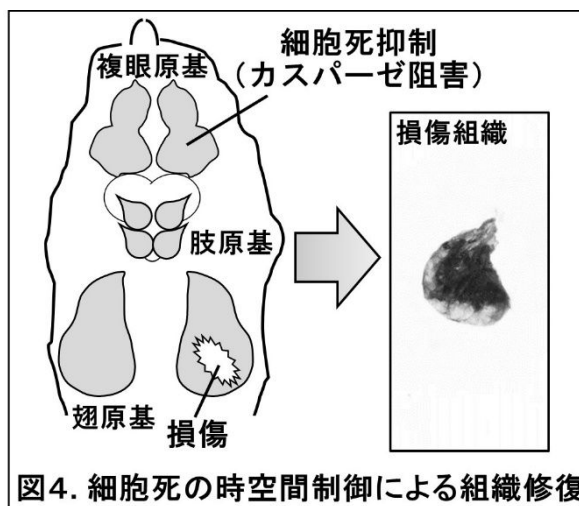


図4. 細胞死の時空間制御による組織修復

は細胞表面受容体タンパク質である Draper を介して死細胞を貪食していることが分かった。実際に、マクロファージ特異的に Draper の発現を抑制すると、マクロファージ内部に取り込まれる死細胞の数は顕著に減少しており損傷組織は最終的に修復異常を引き起こした。これらの結果から、マクロファージによる死細胞の貪食プロセスが組織修復に必須のイベントであることが分かった。このような現象は、マクロファージによる組織修復過程における抗炎症作用の1つであると考えられるが、このとき興味深いことに、マクロファージ特異的に Draper タンパク質の発現を抑制した個体では、組織傷害に反応して正常組織で生じる細胞死の発生が抑制されていることを見出した。このことは、マクロファージが死細胞の貪食を介して引き起こす生体応答が正常組織の細胞死の亢進を誘発している可能性を示唆しているといえる。

以上の一連のデータから、死細胞の貪食に反応してマクロファージは未知の機構を介して正常組織に細胞死を引き起こし、これにより損傷組織と正常組織同士が互いの成長・環境を調和さ

せながら組織修復を時間軸に沿って達成している可能性が示唆された。

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 Masato Enomoto, Daisaku Takemoto, Tatsushi Igaki	4. 巻 56
2. 論文標題 Interaction between Ras and Src clones causes interdependent tumor malignancy via Notch signaling in Drosophila	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 2223 ~ 2236.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.devcel.2021.07.002	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15件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 榎本 将人、井垣 達史
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションを介した組織修復の時空間制御
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 榎本 将人、井垣 達史
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションを介した組織修復の時空間制御
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎本 将人、小川 慶吾、井垣 達史
2. 発表標題 腫瘍細胞とマクロファージの相互作用によるがん制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本 将人、竹本 大策、井垣 達史
2. 発表標題 腫瘍内不均一性はNotchシグナルを介した相互依存的な悪性化腫瘍を発生させる
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本 将人、竹本 大策、井垣 達史
2. 発表標題 Interaction between Ras and Src clones causes interdependent tumor malignancy via Notch signaling
3. 学会等名 JDRC14 (14th Japan Drosophila Research Conference)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 榎本 将人、井垣 達史
2. 発表標題 Genetic dissection of epithelial tissue remodeling via cell-cell communications
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 キム スルギ、榎本 将人、新井 聡太、井垣 達史
2. 発表標題 腫瘍内不均一性によるがん進展制御の遺伝学的スクリーニング
3. 学会等名 第71回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 慶悟、榎本 将人、Kim Seulki、近藤 周、齋藤 都暎、井垣 達吏
2. 発表標題 Src誘導性のがん進展を駆動する因子の遺伝学的スクリーニング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川 慶悟、榎本 将人、Kim Seulki、近藤 周、齋藤 都暎、井垣 達吏
2. 発表標題 Genetic screen for the mutations that drive Src-induced tumor progression
3. 学会等名 The 5th Asia Pacific Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小川 慶悟、榎本 将人、Kim Seulki、近藤 周、齋藤 都暎、井垣 達吏
2. 発表標題 Src誘導性のがん進展を駆動する因子の遺伝学的スクリーニング
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kim Seulki、榎本 将人、小川 慶悟、近藤 周、齋藤 都暎、井垣 達吏
2. 発表標題 Srcによるがん進展制御の遺伝学的解析
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kim Seulki、榎本 将人、井垣 達史
2. 発表標題 A genetic screen in Drosophila for tumor progression via cell-cell cooperation
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中西 與範、榎本 将人、井垣 達史
2. 発表標題 がんを抑制する組織微小環境の遺伝学的解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口 喜一郎、福本 果歩、榎本 将人、中村 麻衣、大澤 志津江、井垣 達史
2. 発表標題 統合的ストレス応答は Ras 誘導性腫瘍に細胞非自律的な増殖促進作用を惹起する
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口 喜一郎、榎本 将人、福本 果歩、中村 麻衣、近藤 周、斎藤 都暁、大澤 志津江、井垣 達史
2. 発表標題 Integrated stress response creates the tumor microenvironment in Ras-activated tumors
3. 学会等名 JDRC14 (14th Japan Drosophila Research Conference)
4. 発表年 2021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
---------	---------