

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16117

研究課題名(和文) 組織の恒常性維持・再生を支える、モルフォゲン勾配を基盤とした細胞品質管理の解明

研究課題名(英文) Study of Cell-Quality-Control based on morphogen gradient supporting tissue homeostasis and regeneration

研究代表者

榎枝 佑紀 (Akieda, Yuki)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：20770514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞競合は、細胞社会において観察される細胞の適者生存システムである。我々は、体の前後軸を形成するモルフォゲンであるWntシグナル勾配の乱れとなる不良細胞が、細胞競合を介して排除されることを発見した。さらに細胞競合が、正確な胚発生の実行を支えていることも証明し、細胞競合の生理的意義の一つを解明した。さらに、細胞競合の“構築後の組織における”生理的意義についても解析を進めた。その解析に必要なライブイメージング解析系を改善・最適化し確立した。さらに、構築後組織では加齢とともに細胞品質管理が脆弱になりWntシグナル勾配が破綻することを示唆する成果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

構築後の組織において細胞競合が細胞品質管理を担い、不良な細胞を除去しており、加齢とともに脆弱化して組織の恒常性が維持できなくなることが示唆された。このことは細胞競合の破綻が、臓器の機能不全やがんなどの様々な疾患発症との関連を推察させる。このメカニズムが分かれば、組織・臓器を健康に保持する方法や新たな疾患の予防法などを見出すことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cell competition is the survival of the fittest system of cells observed in the cellular community. We have found that defective cells that disrupt the Wnt signaling gradient, the morphogen that forms the anterior-posterior axis of the body, are eliminated through cell competition. Furthermore, we qualified that cell competition supports accurate embryogenesis, and elucidated the physiological significances of cell competition. Furthermore, we proceeded with the analysis of the physiological significance of cell competition "developed tissues/organs". The live imaging analysis system was improved, optimized, and established. Furthermore, we obtained results suggesting that cell quality control becomes fragile and the Wnt signaling gradient collapses over time in developed tissues.

研究分野：細胞生物学

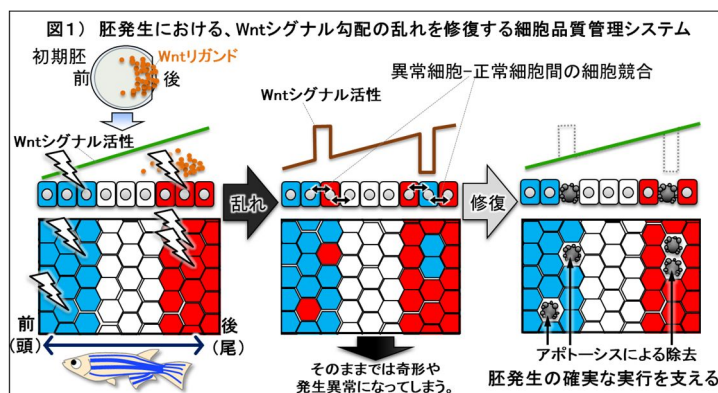
キーワード：モルフォゲン Wntシグナル ゼブラフィッシュ イメージング 細胞競合

1. 研究開始当初の背景

細胞競合は、動物組織内において適応度の高い細胞と低い細胞が共存した際、これらの細胞が相互作用し、その結果として適応度の高い細胞が勝者として生き残り、適応度の低い細胞が敗者となって組織から排除される現象である (Merino et al, Trends Cell Biol, 2016)。細胞競合は、当初ショウジョウバエにおいて発見されたが (Morata and Ripoll, Dev Biol, 1975)、哺乳類においても保存されていることが示されている (Di-Gregorio et al, Dev Cell, 2016)。発見から長らく、細胞競合のメカニズムや生理学的意義は不明であったが、遺伝学的解析技術、とくにモザイク解析技術が確立されたショウジョウバエや、培養細胞を用いた細胞生物学・生化学的解析により、それらが急速に明らかになりつつある。例えば、ショウジョウバエの成虫原基 (将来 翅や眼などになる組織) を用いた解析により、がん抑制遺伝子である scribble の変異細胞と野生型細胞の間で細胞競合がおこり、野生型細胞によって変異細胞が細胞死により排除されることが示された。また、この細胞競合において TNF-JNK 経路が必須の役割を果たすことが示されており、この経路を遮断した成虫原基では、変異細胞が排除されることなく過剰増殖した (Brumby and Richarson, Embo J, 2003; Igaki et al, Dev Cell, 2009)。このことから、細胞競合は、組織に生じた変異細胞を除去し、がんの発生を未然に防ぐ一種のメカニズムと考えられた。さらに、イヌ腎臓上皮細胞株を用いた解析により、がん遺伝子である Ras 変異を誘導した変異細胞は正常細胞との間で細胞競合が起こり、野生型細胞によって変異細胞が上皮層から押し出されるように排除されることが示された (Hogan et al, Nat Cell Biol, 2009)。この培養細胞を用いる実験系の確立により、様々なアプローチが容易になり、多数の細胞競合制御分子が同定されつつある (Kajita et al, Nat Commun, 2015 など)。さらに、この Ras 変異細胞の細胞競合による排除は、マウス腸管上皮においても同様の現象が観察された (Kon et al, Nat Cell Biol, 2017)。一方で最近、発生過程における、細胞競合の“細胞品質”管理システムとしての生理的意義が明らかになりつつある。例えば、細胞競合が、マウス発生初期の胚盤葉上層における優良細胞の選別 (Claveria et al, Nature, 2013; Sancho et al, Dev Cell, 2013)、多能性の維持促進 (Díaz-Díaz et al, Dev Cell, 2017)、ショウジョウバエ発生過程の網膜における視神経細胞の選別 (Merino et al, Curr Biol, 2013) にも関与していることが報告された。また、我々も、ゼブラフィッシュ初期胚において、モルフォゲンである Wnt シグナル勾配の乱れが細胞競合によって修復されることを発見した。Wnt シグナル勾配は、どこに何を作ればよいのかを決める位置情報となる。この位置情報によって適切な遺伝子発現制御がなされ、前後軸 (頭尾軸) を決める。そのため、シグナル勾配の乱れは、奇形となり危険である。このような勾配の乱れとなる不良細胞は、細胞競合を介して細胞死により排除され、正確な勾配へと修復されることを見出した。このように細胞競合が、勾配の乱れを修復し、胚発生の確実な実行を支えている、という生理的意義を明らかにしつつあった (図 1)。このように細胞競合を介した“細胞品質管理”としての動物発生における重要性が徐々に明らかになりつつある。こうした発生過程における細胞競合の知見から、細胞競合が構築後の組織においても“細胞品質管理”を担うのではないかと提唱されているが仮説に過ぎず、“構築後組織における”細胞競合を介した“細胞品質管理”の生理的意義や実体は、あまり分かっていない。加えて、実は構築後の組織においても Wnt シグナル活性勾配は形成されている。例えば、肝臓において、Wnt シグナル勾配は、組織の位置に応じて細胞に異なる代謝能を誘導し、組織の機能を制御している (Benhamouche et al, Dev Cell, 2006)。また肝臓や腸管などの組織では、幹細胞の維持や細胞のターンオーバーを制御し組織の恒常性維持を担っている (Wang et al, Nature, 2015; Clevers et al, Science, 2014)。これらの組織において、複製ミスによる変異やストレス、老化などにより、不良細胞が出現し、残存してしまうと、組織の機能を損ねたり、がん発生の起源となったりしてしまい危険である。我々が見出した、Wnt シグナル勾配の乱れを修復する、細胞競合を介した細胞品質管理システムが、“構築後組織において”も働くのか、またその生理的意義を明らかにすることは細胞生物学において重要な問いといえる。

2. 研究の目的

本研究では、“構築後組織における”細胞競合を介した細胞品質管理システムの生理的意義を明らかにする。具体的には、我々が見出した Wnt シグナル勾配の



乱れを修復する細胞競合を介した細胞品質管理システムを起点として、Wnt シグナル勾配が形成されている構築後組織において、細胞品質管理システムが備わっていることの確認と、生理的意義を明らかにする。また、この細胞品質管理システムが破綻した場合の組織への影響を明らかにする。これにより、構築後組織における細胞競合の生理的意義を明らかにする（図2）。

3. 研究の方法

本研究では、構築後組織における Wnt シグナル勾配修復を基盤とした細胞品質管理システムの生理的意義を、ゼブラフィッシュを用いて組織内の細胞動態を長期間生体内イメージングすることで明らかにする。

構築後組織の細胞挙動と Wnt シグナル活性の“長期間生体内イメージング”系の確立

正常細胞とシグナル異常細胞との相互作用を解析するために、構築後の組織に異常細胞を“モザイク状”に且つコンディショナルに誘導する必要がある。そのために、トランスジェニックゼブラフィッシュを作製する。あるいは、*in vivo* エレクトロポレーション法により異常細胞を誘導する系を確立する。このようにして組織において、可視化した Wnt シグナル異常細胞を長期間にわたる生体内イメージングによって細胞の挙動を解析する。さらに、より高感度な Wnt シグナルレポーターゼブラフィッシュを作製する。従来のルシフェラーゼでは発光強度が弱く、Wnt シグナル活性の検出には、長い露光時間(5-10分)が必要であった。そこで、高輝度の化学発光タンパク質(Nano-lanternや Akaluc)に変えることで、可視化解析を行う。この長期間生体内イメージングでは、数日や数週間という期間にわたり、細胞動態を解析する。そのため、断続的に数回に分けて生きた状態で同じ細胞を追跡する必要がある。ゼブラフィッシュは、体のサイズが小さいゆえに、組織を“まるごと”観察可能で、同じ部位の同じ細胞を観察日が変わってもイメージングできる利点を活用する。

細胞品質管理システムが破綻した場合の組織への影響の解析

Wnt シグナル異常細胞の排除が、破綻した場合に、組織への影響や、Wnt シグナル勾配の形成への影響を解析する。そのために、誘導した Wnt シグナル異常細胞の細胞死を強制的に抑制し、異常細胞の排除が破綻した状況を再現した際に、組織の機能や恒常性維持、個体への影響、または Wnt シグナル勾配形成への影響(乱れの増強など)を解析する。E-カドヘリンや TGF-β/Smad シグナル経路などの異常細胞の排除に関わるこれらの因子の阻害によっても、細胞品質管理システムが破綻した場合の組織への影響を解析する。

4. 研究成果

本研究の着想に至る基盤となった構築中の組織における細胞競合を介した細胞品質管理システムについての成果を Nature Communications 誌において発表した。また、この成果を含め組織発生における細胞競合について日本語総説としてまとめた。

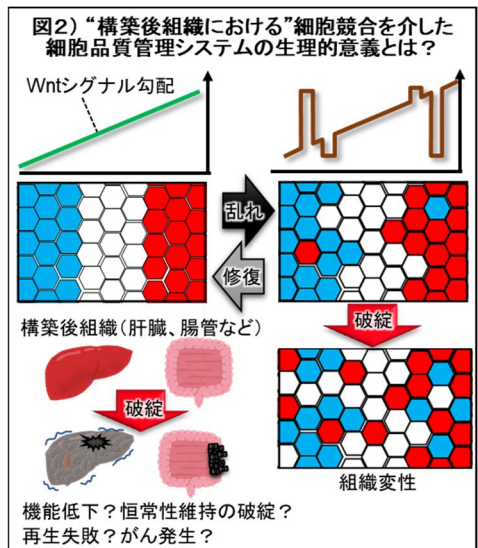
構築後組織の細胞挙動と Wnt シグナル活性の“長期間生体内イメージング”系の確立

構築後の組織における細胞競合の解析を行うために、ライブイメージング解析系の構築を行った。従来の Wnt シグナルレポーターをより高感度で時空間分解能が高いレポーターの検討、最適化することで、新規のレポーターシステムを樹立した。具体的には、蛍光タンパク質をより明るく翻訳されてから蛍光を放つまでの時間が短いものを用いた。発光タンパク質もより明るいものを使用した。さらに、核局在シグナルを付加して細胞動態をより解析しやすくした。また、蛍光・発光タンパク質は、ゼブラフィッシュのコードンに最適化させた。これらを用いてシグナルレポーターをゼブラフィッシュに遺伝子組み換えにより挿入したものを樹立した。本研究で作製したレポーターシステムを用いて長期間生体内イメージングが可能となった。

細胞品質管理システムが破綻した場合の組織への影響の解析

構築後の組織においても細胞競合を介した細胞品質管理が実行されているのかを確認するために、加齢した Wnt シグナルレポーターゼブラフィッシュの肝臓などの組織の勾配をイメージングしたところ、加齢すると Wnt シグナル勾配に乱れが生じ、シグナル異常な不良細胞が増加することがわかった。このことは、構築後の組織においても細胞競合を介した不良細胞除去による細胞品質管理が実行されていることを期待させる。さらにこの細胞競合をブロックした場合には、健康でない個体の割合が時間経過とともに増加することがわかった。つまり、細胞競合を介した細胞品質管理は胚発生過程のみならず構築後の組織において持続的に組織恒常性維持を担っていることが明らかになった。

今後、細胞競合を介した細胞品質管理システムの破綻と様々な疾患発症との関連を明らかにできる可能性が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akieda Yuki, Ogamino Shohei, Furuie Hironobu, Ishitani Shizuka, Akiyoshi Ryutaro, Nogami Jumpei, Masuda Takamasa, Shimizu Nobuyuki, Ohkawa Yasuyuki, Ishitani Tohru	4. 巻 10
2. 論文標題 Cell competition corrects noisy Wnt morphogen gradients to achieve robust patterning in the zebrafish embryo	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4710
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-12609-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Haraoka Yukinari, Akieda Yuki, Ishitani Tohru	4. 巻 139
2. 論文標題 Live-imaging Analyses Using Small Fish Models Reveal New Mechanisms That Regulate Primary Tumorigenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 733 ~ 741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/yakushi.18-00185-1	査読の有無 無
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 Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R, Vitiello E, Shirai T, Tanimura N, Kuromiya K, Ishikawa S, Kajita M, Tada M, Haraoka Y, Akieda Y, Ishitani T, Fujioka Y, Ohba Y, Yamada S, Hosokawa Y, Toyama Y, Matsui T, Fujita Y	4. 巻 30
2. 論文標題 Calcium Wave Promotes Cell Extrusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 670 ~ 681.e6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2019.11.089	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 穂枝 佑紀
2. 発表標題 ゼブラフィッシュイメーシングで見えてきた細胞競合の新たな機能と制御
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 穠枝 佑紀
2. 発表標題 Cell-cell communication-mediated error correcting mechanism of Wnt morphogen gradient
3. 学会等名 Wnt研究会2021
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 穠枝 佑紀、石谷 太	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 551
3. 書名 組織発生における細胞競合、医学のあゆみ 細胞競合による生体制御とがん	

〔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
研究協力者	永井 優里 (Nagai Yuri)		

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
---------	---------