

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21501

研究課題名（和文）上皮の概日時計ネットワークによる組織恒常性の制御

研究課題名（英文）Elucidating the mechanisms of tissue homeostasis by epithelial clock machinery

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究において、ショウジョウバエ上皮に誘導したがん原性細胞集団の腫瘍形成を促す変異体スクリーニングを実施し概日時計因子を同定した。概日時計因子によるがん制御メカニズムを解析したところ、概日時計因子の突然変異によりAkt（細胞の増殖・生存に関わるプロテインキナーゼ）の活性化が亢進し、がん原性細胞集団が過剰に増殖し腫瘍を形成することが分かった。これらの結果は、個々の組織がもつ概日時計の異常ががんの初期発生を誘発する原因になる可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はショウジョウバエをモデルとして、概日時計を制御する遺伝子の異常ががんの発生を誘発する可能性を生体レベルで示したものである。このことは、生体内の個々の組織がもつ適切な概日時計リズムががん化の抑制に重要であることを示唆している。将来的に本現象を哺乳類において解析しその普遍性を明らかにすることで、体内時計の調節を基盤とした新たながん制御やがん治療法の確立が期待される。

研究成果の概要（英文）：Although cancers progress by accumulation of genetic alterations, the mechanism by which oncogenic cells collectively initiate tumorigenesis in vivo is still poorly understood. In this research, using *Drosophila* epithelium I conducted a genetic screen of mutants that cause tumor progression of oncogenic cell populations with Src activation. Through this genetic screen, I isolated mutants of circadian clock gene for promoting tumor overgrowth of Src-activated cell clones. From genetic analyses, mutation of circadian clock gene in Src-activated cell clones induces Akt signaling activation, which causes tumorigenesis of these oncogenic clones. These genetic findings show a genetic link between oncogenic alterations and circadian clock and suggest that dysregulation of epithelial clock machinery initiates tumor progression.

研究分野：細胞生物学、腫瘍生物学

キーワード：がん シグナル伝達 概日時計 上皮 ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において個々の細胞は、互いに協調・競合し合いながら組織の恒常性を維持している。このような細胞間コミュニケーションを介した組織の恒常性制御を理解するには、生体内外のストレスに対して個々の細胞が集団として働く仕組みを明らかにすることが重要である。例えば、大規模な組織傷害では損傷部位の周りの細胞が応答し増殖するが、組織が再生していくプロセスでは組織形態もダイナミックに変化するため損傷部位から離れた細胞も組織へのダメージに対して応答しその挙動を変化させると考えられる。また、がん原性変異をもつ細胞はその周囲を正常な細胞に囲まれると組織から排除される一方で、同じがん原性変異をもつ細胞であっても細胞同士が大きな集団を形成している状態では組織からの排除を免れるグループプロテクションという概念も存在する。しかしながら、組織を構成する個々の細胞はその環境や状態によってその挙動を動的に変化させているため、どのように組織中の多数の細胞が集団として応答しながら生体恒常性を維持しているのか、その仕組みはよく分かっていない。このような問いを解くためには、生体ストレスを与えた組織における細胞の集団的な振る舞い(細胞増殖、細胞死、分化、形態変化など)を捉えて、その挙動によって変化する生体応答を個体レベルで解析していく必要がある(図1)。

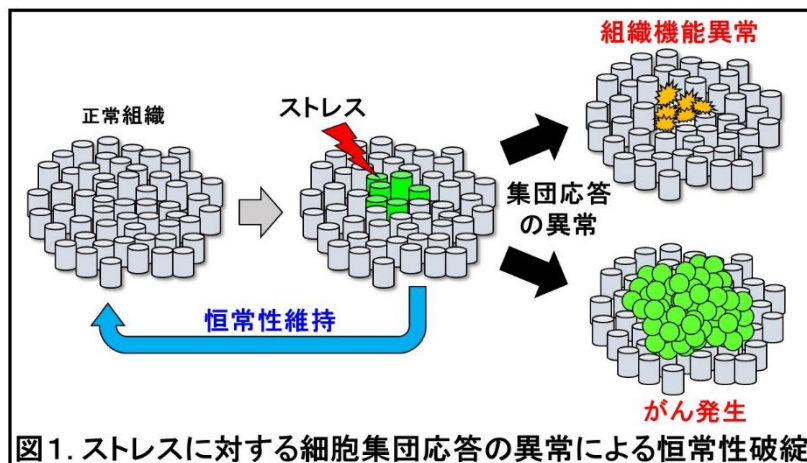


図1. ストレスに対する細胞集団応答の異常による恒常性破綻

2. 研究の目的

これまでの研究から、ショウジョウバエ上皮である成虫原基にがん原性細胞(がん遺伝子 Src を活性化した細胞)を正常細胞とモザイク状に誘導すると、Src 活性化細胞は増殖するどころかむしろ上皮組織から排除されることが分かっている。すなわち、がん原性変異が組織の一部に生じても上皮組織はがん原性細胞を排除し最終的に組織恒常性を保つ。この Src 活性化細胞に突然変異を導入し、腫瘍形成を引き起こす遺伝子変異を同定するパイロットスクリーニングを進めていたところ、概日時計の制御因子の変異によって Src 活性化細胞が腫瘍を形成することが見えてきた。このことは、“Src 活性化”というがん原性ストレスに対して上皮の概日時計を介した未知のがん抑制機構が働いていることを示唆している。そこで本研究では、ショウジョウバエ上皮をモデルとして概日時計によるがん制御メカニズムを解析することで、組織を構成する細胞集団の概日時計が構築する生体恒常性維持システムを解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ上皮である複眼原基にがん原性変異(がん遺伝子 Src の活性化)をもつ細胞を野生型細胞とモザイク状に誘導し、Src 活性化細胞にのみホモ接合の突然変異を導入する。この突然変異により Src 活性化細胞が腫瘍形成を引き起こす変異体をスクリーニングする(図2)。続いて2次スクリーニングとして、Src 活性化細胞の腫瘍形成を促進させた変異体の中から、変異細胞単独では細胞増殖、細胞死や細胞接着など腫瘍形成や浸潤転移といったがんの性質に影響を及ぼさない変異体を単離する。上記の遺伝学的スクリーニングから単離された変異体の責任因子が Src 活性化細胞の腫瘍形成にどのように関わっているか、免疫組織染色法やシグナル分子の各種レポーターなどを用いながら遺伝学的手法や細胞生物学的手法によりその分子メカニズムを解析する。

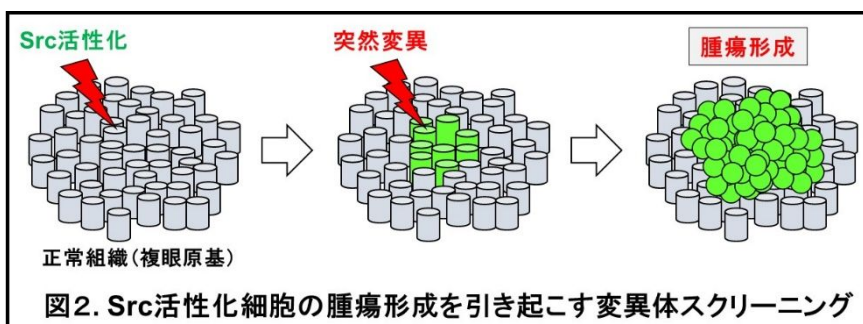


図2. Src活性化細胞の腫瘍形成を引き起こす変異体スクリーニング

4. 研究成果

ショウジョウバエ上皮である複眼原基に誘導した Src 活性化細胞に対して、約3,000系統の変異体ライブラリーを用いて突然変異を導入し、Src 活性化細胞の腫瘍形成を促進させる変異体のスク

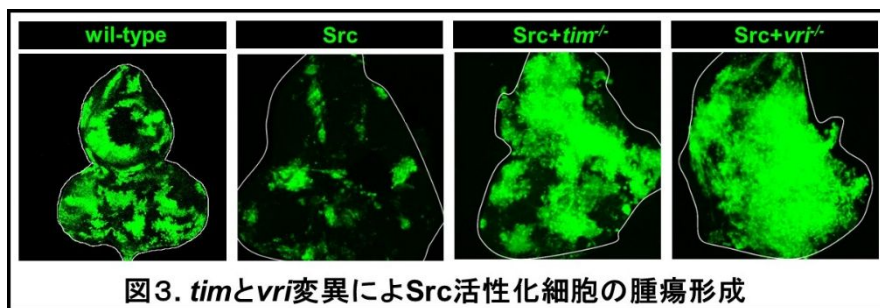


図3. *tim*と*vri*変異によSrc活性化細胞の腫瘍形成

リーニングを実施した。このスクリーニングの結果、Src 活性化細胞の腫瘍形成を促す複数の変異体が単離されたが、得られた変異体の中に *timeless* (*tim*) と *vrille* (*vri*) という概日時計を制御する因子に対する変異体が含まれていた (図3)。そこで概日時計に関わる他の遺伝子についても Src 活性化細胞の腫瘍形成に対する影響を遺伝学的に解析した。その結果、Tim 以外の概日時計のコア制御因子 (Period や Clock) の遺伝子発現を RNA 干渉法により Src 活性化細胞でのみサイレンシングすると、いずれの因子の発現抑制でも Src 活性化細胞の腫瘍形成が引き起こされることが分かった。これらの結果は、概日時計の制御因子の機能破綻ががん原性変異 (Src 活性化) をもつ細胞の腫瘍形成を促すことを示している。そこで次に、これらの概日時計の制御因子の突然変異がどのように Src 活性化細胞の腫瘍形成を促すのか、その分子メカニズムについてシグナル伝達経路に焦点をあてながら遺伝学的解析を実施した。その結果、*tim* の突然変異を挿入した Src 活性化細胞内において細胞の増殖・生存に関わるプロテインキナーゼ Akt の活性が亢進していることを見いだした。実際に、Akt 活性を遺伝学的に阻害すると、*tim* 変異による Src 活性化細胞の腫瘍形成は抑制された。このことから、概日時計の制御因子は Akt 活性を制御することで腫瘍形成を抑制している可能性が考えられた。一方で *tim* 変異を野生型細胞に導入した場合には、*tim* 変異細胞において Akt 活性に顕著な変化は認められなかった。この結果から、概日時計の制御因子はがん原性変異をもつ細胞特異的に Akt 活性を制御している可能性が出てきた。そこで、概日時計因子が他のタイプのがん原性細胞に対しても同様の腫瘍抑制作用を発揮するか確かめる遺伝学的解析を進めた。ショウジョウバエ上皮にがん遺伝子 Ras の活性化をもつ細胞を誘導すると、これらの細胞は良性腫瘍を形成する。そこで Ras の活性化変異 (RasV12) を導入した細胞集団をショウジョウバエ複眼原基に誘導し、*tim* 変異によって Ras 活性化細胞集団の増殖能が変化するか解析した。その結果、Ras 活性化によって誘導される腫瘍のサイズが *tim* 変異によって著しく増大することが分かった (図4)。このような Ras 誘導性の腫瘍形成の促進は、*tim* 変異だけでなく *vri* 変異によっても引き起こされることが分かった (図4)。

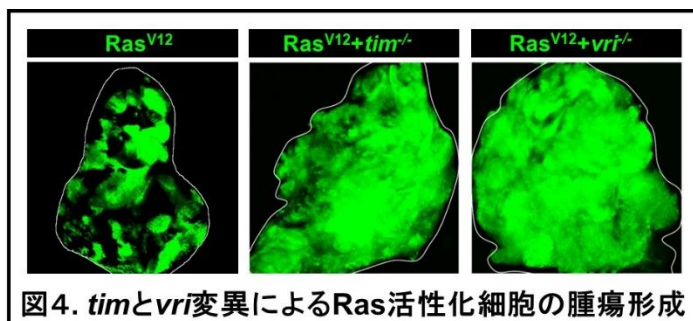


図4. *tim*と*vri*変異によるRas活性化細胞の腫瘍形成

以上の結果から、概日時計のコア制御因子の変異によってがん原性細胞は Akt の活性化を介して腫瘍形成を促進することが分かった。これらの知見は、上皮組織中の個々の細胞は概日時計を基盤としながら互いに集団として挙動することで組織恒常性を維持しており、このような概日時計制御の破綻ががんの初期発生を誘発する要因となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 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 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Masato Enomoto, Tatsushi Igaki | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Cell-cell interactions that drive tumorigenesis in Drosophila | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Fly | 6. 最初と最後の頁 367-381 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336934.2022.2148828 | 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19件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 JNKシグナルの細胞間伝播を介した上皮組織修復の時空間制御 |
| 3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 榎本将人、竹本大策、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 Interaction of distinct tumor cells causes interdependent tumor malignancy via Notch signaling |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 上皮組織損傷が誘発する多細胞間相互作用と生体応答 |
| 3. 学会等名 第95回日本生化学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 上皮 - 免疫連関による損傷組織の再構築と生体応答 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小川慶悟、永田理奈、近藤周、齋藤都暁、榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 スーパーコンペティションによる腫瘍形成を駆動する因子の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小川慶悟、榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 Genetic analysis of Src-induced tumor progression |
| 3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小川慶悟、永田理奈、榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 スーパーコンペティションによるがん促進機構の遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ogawa K, Enomoto M, Igaki T. |
| 2. 発表標題 Synergistic tumorigenesis by Src and Yki via inhibition of Socs36E and Hid |
| 3. 学会等名 64th Annual Drosophila Research Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 中西與範、榎本将人、井垣達吏 |
| 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74回日本細胞生物学会大会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中西與範、榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 Tumor-suppressive tissue microenvironment generated by a reduced sensitivity to Eiger-JNK signaling |
| 3. 学会等名 第15回日本ショウジョウバエ研究会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 中西與範、榎本将人、井垣達吏 |
| 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45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 榎本将人、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 上皮細胞とマクロファージの相互作用を介した組織修復の時空間制御 |
| 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 榎本将人、竹本大策、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 Interaction between Ras and Src clones causes interdependent tumor malignancy via Notch signaling |
| 3. 学会等名 第14回日本ショウジョウバエ研究集会 (JDRC14) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 榎本将人、竹本大策、井垣達吏 |
| 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44回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 中西與範、榎本将人、井垣達吏 |
| 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 榎本将人、井垣達吏 |
| 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、井垣達吏 |
| 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 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>細胞同士が影響し合い良性腫瘍ががん化する仕組みを解明 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-07-29 良性腫瘍同士、相互作用でがん化する仕組み解明 京大グループが発表 https://www.kyoto-np.co.jp/articles/-/607320 京大、良性腫瘍のがん化解明 細胞隣接で相互作用 https://www.nikkan.co.jp/articles/view/606830 Cancer progression via cell-cell communication https://sj.jst.go.jp/news/202110/n1018-01k.html</p> |
|--|

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 |
|---------|---------|