

令和 5 年 6 月 7 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：20K21544

研究課題名(和文)がん細胞社会の構築と流動化を駆動する分子基盤の解明

研究課題名(英文)A genetic approach for the mechanism of tumor malignancy in Drosophila.

研究代表者

菅田 浩司(Kanda, Hiroshi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：60508597

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)：ショウジョウバエの複眼原基にapico-basal極性を制御する遺伝子である scribble (scrib) の null 変異を有する細胞クローンを誘導すると細胞競合によって排除される。しかし、scrib 変異細胞内でがん遺伝子 Ras の活性化 (RasV12) を誘導すると細胞 (Ras/scrib細胞) は排除に抵抗性を示すようになり、逆に過剰な増殖を伴って浸潤・転移する悪性腫瘍を形成する。腫瘍内では非対称分裂のマーカー及び神経前駆細胞のマーカーを発現する細胞が出現することを見出した。また、これらの細胞はJNKシグナルに依存的に腫瘍悪性を制御している可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝学的に誘導した「均一な」変異細胞クローン中に、時間経過とともに他とは性質が異なるがん幹細胞様細胞が一定の割合で出現する現象はこれまでにほとんど報告されていない。また、申請者らはショウジョウバエの強力な遺伝学を応用することで制御機構を in vivo で解析することに成功している。以上の点から、本研究から得られる成果が関連研究分野及び社会にもたらす波及効果は極めて高い。

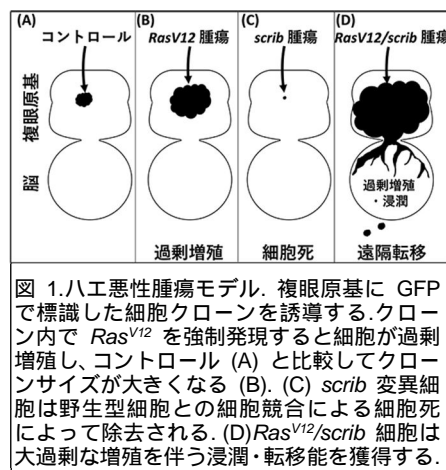
研究成果の概要(英文)：When homozygous mutation for regulators of apico-basal polarity was introduced in Drosophila eye imaginal disc, these cells are eliminated by 'cell competition'. Intriguingly, when Ras signal was activated in these cells, they overcome cell competition, and show malignant behavior such as massive growth and invasion/metastasis. We found the appearance of asymmetric cell division marker-positive cells as well as neuroblast marker-positive cells in these malignant cells. We also found that these cells acquire malignancy with JNK-dependent manner.

研究分野：遺伝学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：ショウジョウバエ がん悪性化 遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

さまざまなヒトのがん組織ががん幹細胞やがん細胞の脱分化で生じる細胞を含み、それらは多様ながん細胞を生み出すことがわかってきた (Plaks *et al. Cell Stem Cell* 2015)。しかしがん幹細胞や脱分化した細胞が生み出される分子機構、さらにこれらが多様な細胞集団を生み出しがんが悪性化する分子機構の詳細はいまだに明らかでない。その一因として、これまで生体レベルでシステマティックな解析を遂行できる実験系が存在しなかった点が挙げられる。優れたモデル生物であるショウジョウバエの複眼原基において、がん遺伝子 *Ras* の活性化 (*Ras<sup>V12</sup>*) を誘導する細胞クローンにがん抑制遺伝子 *scribble* (*scrib*) の null 変異を導入すると、全個体で *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞の過剰増殖を伴う浸潤と転移が誘導される (Pagliarini *et al. Science* 2003) (図 1)。この現象は、ハエの遺伝学を応用することでがん悪性化機構を生体レベルでシステマティックに解析できることを意味する。しかし、これまでにその詳細な分子機構はほとんど明らかにされていない。



## 2. 研究の目的

本研究では、優れたモデル生物であるショウジョウバエの強力な遺伝学と生化学的な解析を融合した研究を展開することで、がん幹細胞様細胞の成因や、がん幹細胞様細胞が多様な細胞集団を生み出す分子機構、さらに生み出された細胞が駆動するがん悪性化機構を生体レベルで明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞の characterization を行う。この目的のために、複眼原基における未分化細胞のマーカーを含めた各種細胞マーカーの発現量、発現開始時期、発現細胞数などに関して解析を行う。

(2) *Ras<sup>V12</sup>/scrib* の過剰な増殖を制御する遺伝子を遺伝学的な手法および生化学的な手法を用いて探索する。

(3) 上記で得られる結果を相補的に解析していくことでがんの悪性化を制御する分子機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

ショウジョウバエ複眼原基に誘導した *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞の体細胞クローンにおいて、ショウジョウバエ神経幹細胞 (neuroblast; NB) の自己複製に必要な転写因子や非対称分裂を行う NB で発現が認められる分子を発現する細胞が、複眼原基 1 個あたり 10-50 個程度の割合

で全ての個体で時間経過とともに出現することを見出した。この頻度は複眼原基を構成する細胞数の約 0.1-0.5% に相当し、ヒトサンプルを用いた解析におけるがん幹細胞の存在比率 (0.1-0.0001%) と同程度である (Quintana *et al. Nature* 2008)。さらに、これらの分子は浸潤しつつある腫瘍辺縁部に局在すること、及びこれらの分子はストレスキナーゼである JNK の活性に依存的に誘導されることを見出した。

また、研究過程において *Ras<sup>V12</sup>/scrib* モデルを用いて悪性腫瘍の解析を行う上で解決すべき課題も明らかとなった。すなわち *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞は極めて高い増殖活性を有するため、*eyeless* プロモーターや *Ubx* プロモーターの制御下で FLP リコンビナーゼを異所発現させて成虫原基で恒常的に *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞クローンを誘導する通常の体細胞クローンの誘導法では、一般的な解析ステージである三齢幼虫後期においては成虫原基を構成する細胞がほぼ全て *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞となり、野生型細胞を見出すことが困難であるため、野生型細胞における各種マーカータンパク質や増殖関連タンパク質などの発現解析が困難であった。そこで、上記の方法に替えて、熱ストレス応答性に一過的に FLP を誘導することで「小さいサイズ」の *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞クローンを誘導する方法を試みた。熱ストレスを負荷するタイミングとストレス負荷の長さについて条件検討を行った結果、目的サイズのクローンを誘導する実験条件の樹立に成功した。この実験系を用いて解析を行った結果、驚くべきことに、「小さいサイズ」の *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞クローンでは、野生型細胞との境界領域においてアポトーシスのマーカーである cleaved DCP1 陽性細胞が多数検出されることから、*Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞が細胞競合における「敗者」の形質を有することを見出した。この結果は、*Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞が敗者である可能性を示唆する過去の報告と一致する (Menendez *et al. PNAS* 2010)。さらにこの実験系を用いた解析から、*Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞はそのクローンを構成する細胞数によって大きく異なる増殖活性を示すことを見出し、さらにその性質の変化に必要な複数の因子の同定に成功した。現在までの解析においては、細胞数が増加してもクローン境界領域の cleaved DCP1 陽性細胞は減少しないことから、*Ras<sup>V12</sup>/scrib* 細胞の増殖活性に関する性質の変化は細胞競合における敗者から勝者への転換ではなく、細胞競合による排除を上回る増殖活性の獲得であると考えている。今後は、今回の研究で見出した NB の自己複製に必要な転写因子や非対称分裂を行う NB で発現が認められる分子と増殖活性の変化に必要な分子の相互作用に関する解析を進める。

今後の課題・展望としては、申請者が見出したがん幹細胞様細胞が *Ras<sup>V12</sup>/scrib* 悪性腫瘍の増殖においてどのような働きをしているかを明らかにしていく必要がある。また、*Ras<sup>V12</sup>/scrib* 悪性腫瘍モデルのみならず、*hippo* 変異細胞、*Myc* 過剰発現細胞、*Src* 過剰発現細胞を用いたモデルを解析することで、同様の細胞の有無やその増殖制御機構を解析していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Kanda H, Igaki T.	4. 巻 111
2. 論文標題 Mechanism of tumor-suppressive cell competition in flies.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3409-3415
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14575	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 菅田浩司、井垣達史	4. 巻 283
2. 論文標題 細胞競合を制御する分子機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 403-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計18件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hiroshi Kanda, Ayumu Okumura, Aya Kawasaki, Mai Nakamura, Ryosuke Nakano, Naoki Wakasa, and Tatsushi Igaki
2. 発表標題 A genetic screen in Drosophila for the molecular basis of cell competition
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 Ryo Matsumoto, Xinyue Huang, Hiroshi Kanda, Aya Kawasaki, Ayumu Okumura, Mai Nakamura, Naotaka Ochi, Rina Nagata, Yoji Noguchi, Naoki Wakasa, Ryosuke Nakano, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Surveying the cell competition landscape by a Drosophila genetic screen
3. 学会等名 62th Annual Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄新月、松本涼、川崎あや、奥村歩、中村麻衣、越智直孝、野口耀司、菅田浩司、井垣達史
2. 発表標題 多様なトリガーにより引き起こされる細胞競合の共通メカニズムの解析
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 菅田浩司
2. 発表標題 A genetic approach for the molecular basis of cell competition
3. 学会等名 第23回生命科学科シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎あや、菅田浩司、井垣達史
2. 発表標題 細胞競合を駆動する分子機構の遺伝学的解析
3. 学会等名 第9回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅田浩司、川崎あや、井垣達史
2. 発表標題 細胞競合を駆動する分子基盤の遺伝学的解析
3. 学会等名 第9回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅田浩司、川崎あや、奥村歩、井垣達史
2. 発表標題 細胞競合を誘導する細胞内変化を司る分子機構の遺伝学的解析
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 松本涼、菅田浩司、川崎あや、中村麻衣、永田理奈、越智直孝、黄新月、奥村歩、若狭直樹、野口耀司、中野史洋助、井垣達史
2. 発表標題 細胞競合の共通メカニズムと生理的トリガーの遺伝学的探索
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 川崎あや、菅田浩司、井垣達史
2. 発表標題 細胞競合を駆動する分子機構の遺伝学的解析
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 Hiroshi Kanda, Aya Kawasaki, Shu Kondo, Kuniaki Saito, Tomoe Kobayashi, Makoto Matsuyama, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Regulation of cell competition by the ribosome
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 Aya Kawasaki, Hiroshi Kanda, Tomoe Kobayashi, Makoto Matsuyama, Tatsushi Igaki
2. 発表標題 Genetic analysis of ER stress-induced cell competition.
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 川崎あや、菅田浩司、小林朋絵、松山誠、井垣達史
2. 発表標題 小胞体ストレスが誘導する細胞競合の遺伝学的解析
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 菅田浩司、川崎あや、近藤周、齋藤都暁、小林朋絵、松山誠、井垣達史
2. 発表標題 リボソームタンパク質による細胞競合制御の遺伝学的解析
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 西山 真生、菅田 浩司、井垣 達史
2. 発表標題 Ras/scrib細胞は細胞競合のloserとしてふるまう
3. 学会等名 第2回多細胞生命自律性班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅田浩司、川崎あや、近藤周、齋藤都暁、小林朋絵、松山誠、井垣達史
2. 発表標題 リボソームタンパク質による細胞競合制御の遺伝学的解析
3. 学会等名 第2回多細胞生命自律性班会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Kanda, Ryo Matsumoto, Aya Kawasaki, Mai Nakamura, Rina Nagata, Xinyue Huang, Ayumu Okumura, Naotaka Ochi, Yoji Noguchi, Naoki Wakasa, Ryosuke Nakano, and Tatsushi Igaki
2. 発表標題 A genetic screen and characterization of triggers of cell competition.
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 西山真生、菅田浩司、井垣達史
2. 発表標題 細胞数依存的なRas/scr ib腫瘍の運命制御機構
3. 学会等名 第10回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 菅田浩司、川崎あや、近藤周、齋藤都暁、小林朋絵、松山誠、井垣達史
2. 発表標題 リボソームタンパク質による細胞競合制御の遺伝学的解析
3. 学会等名 第10回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2023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
---------	---------