

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20654

研究課題名（和文）細胞競合の上流メカニズムを司るオートファジー誘導機構の解析

研究課題名（英文）Dissecting the upstream mechanism of autophagy that governs cell competition

研究代表者

永田 理奈（Nagata, Rina）

京都大学・生命科学研究科・特定研究員

研究者番号：80912493

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：生体内で隣接する2つの細胞間にわずかな性質の差が生じた際、細胞間相互作用を介して一方の細胞に細胞死が誘導される現象が存在する。この現象は「細胞競合」と呼ばれ、組織に残って生存する細胞を「勝者」、細胞死によって排除される細胞を「敗者」と呼ぶ。これまでに、勝者細胞に近接する敗者細胞ではオートファジー依存的に細胞死が引き起こされることを見いだしていたが、その上流メカニズムは不明であった。そこで本研究では、細胞競合時に活性上昇するオートファジーの誘導メカニズムを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回見いだした細胞非自律的オートファジーによるメカニズムは、種々のトリガーによって引き起こされる細胞競合を共通して制御することがわかり、細胞競合を介した腫瘍制御にも重要な役割を果たすこともわかった。今後、このオートファジー誘導機構を完全解明することで細胞競合の全貌が明らかになり、細胞間コミュニケーションの新たなコンセプトが確立されるとともに、これを人為的に制御することで新たながん治療やアンチエイジングに貢献できる可能性がある。

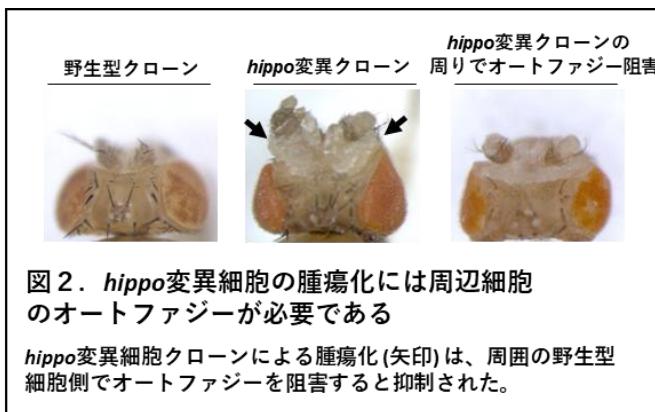
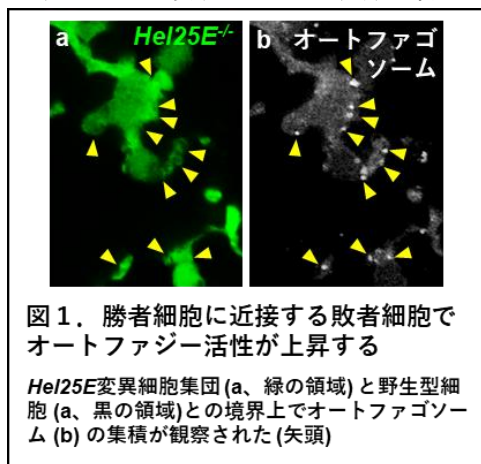
研究成果の概要（英文）：Cell competition is a novel type of cell-cell interaction that selectively eliminates ‘unfit’ cells from the tissue. For instance, unfit mutant cells are viable by themselves but are eliminated by cell competition when surrounded by wild-type cells. Previously, we found that autophagy-dependent cell death is induced in unfit “loser” cells nearby wild-type “winner” cells, while the upstream mechanism of autophagy is unclear. In this study, we dissected the mechanism by which autophagy is upregulated during cell competition.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞死 オートファジー 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞競合とは、細胞間相互作用を介した細胞の排除現象である。例えば、組織中に生じた変異細胞や異常細胞は、単独では生存可能であっても周囲を野生型細胞に囲まれると細胞死を起こして組織から排除される場合がある。このとき、排除される変異／異常細胞を細胞競合の「敗者」、野生型細胞を細胞競合の「勝者」と呼ぶ (Nagata and Igaki, *Dev Growth Differ*, 2018)。細胞競合は、がん原性細胞の排除や優良幹細胞の選別などに寄与していると考えられているが、敗者細胞にどのようにして細胞死が引き起こされるかという細胞競合の上流メカニズムは不明であった。そこで研究代表者は、細胞競合の分子メカニズムを解明するため、ホモ接合変異を利用した遺伝学的スクリーニングに適用可能な新たな細胞競合モデル系を構築した。具体的には、遺伝的モザイク法を用いるための「ホモ接合で生存可能であるが正常細胞に近接すると細胞競合を引き起こす (敗者として排除される) 遺伝子変異」を探索した結果、RNA ヘリカーゼ遺伝子 *Hel25E* のホモ接合変異細胞がこの現象を引き起こすことがわかった。この新規細胞競合モデル系を用いてショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを行い、細胞競合に関わる因子を網羅的に探索した結果、細胞競合時の細胞排除にオートファジーが中心的な役割を果たすことを発見した。すなわち、*Hel25E* 変異細胞が正常細胞に近接するとオートファジーを活性化し (図1)、これが NFκB を介して細胞死遺伝子 *hid* を発現誘導する。さらに、この *hid* が変異細胞内で活性化している JNK と協調することで細胞死が引き起こされることを明らかにした (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019)。興味深いことに、細胞競合の勝者として正常細胞を駆逐することが知られているがん抑制経路 Hippo 経路の変異細胞も、隣接する正常細胞 (敗者) にオートファジーを誘導して細胞死を起こすことで増殖し腫瘍化することもわかった (図2)。したがって、研究代表者らが見出した細胞競合時に引き起こされる「細胞非自律的オートファジー」は異なるトリガーによって引き起こされる細胞競合の共通メカニズムであると考えられた。



2. 研究の目的

本研究では、勝者細胞に近接した敗者細胞で起こる細胞非自律的なオートファジー誘導機構を明らかにすることで、長らく不明であった細胞競合の上流メカニズムを解明することを目指した。これにより、勝者・敗者細胞が隣り合ったときに細胞内シグナルが非自律的に制御されるという細胞競合の本質を理解できると考えられた。これまでに、細胞競合の敗者となる種々の変異細胞では共通して正常細胞に比べてタンパク質合成能が低下していることがわかってきた。また、細胞競合の勝者となる Hippo 経路の変異細胞では正常細胞に比べてタンパク質合成能が上昇していることもわかってきた。したがって、細胞間のタンパク質合成能の相対的な差が勝者細胞に近接する敗者細胞のオートファジーを誘導するのではないかと考えた。実際に、*Hel25E* 変異細胞の周囲の正常細胞側でタンパク質合成能の低下を引き起こす変異を誘導すると、変異細胞のオートファジーが抑制された。また、Hippo 変異細胞内では TOR シグナルが活性化しており、TOR シグナルを抑制することで周囲の正常細胞のオートファジーが抑制された。以上の予備的知見を基に遺伝学的解析を進めることで、細胞非自律的オートファジーの誘導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

ショウジョウバエ上皮をモデル系として用い、細胞競合時に勝者細胞に近接する敗者細胞でオートファジーが誘導される分子メカニズムを明らかにすることを旨とした。これまでに、Hippo 変異細胞の周囲の正常細胞でオートファジー依存的に細胞死が引き起こされることを見いだしていた。そこで、Hippo 変異による細胞競合モデルを用い、正常細胞（敗者）で活性上昇するオートファジー誘導機構を明らかにしようと考えた。Hippo 変異細胞では、転写共役因子 Yki/YAP を活性化することで細胞死抑制や腫瘍形成にかかわる様々な遺伝子の転写が促進される。そこで、Hippo 変異細胞の周囲の正常細胞で引き起こされるオートファジー誘導に必要な Yki のターゲット遺伝子をスクリーニングした。具体的には、ショウジョウバエ成虫原基に、Hippo 変異細胞集団と正常細胞集団をモザイク状に誘導した際に、変異細胞内で Yki のターゲット遺伝子を一つ一つノックダウンして勝者-敗者境界面のオートファジー活性が抑制される系統を探索した。

また、これまでに細胞競合を誘発したショウジョウバエ複眼原基を用いて single-cell RNA-seq 解析を行い、すでにデータを得ていた。具体的には、敗者細胞では細胞死遺伝子 hid の発現が上昇することから、4 種類の異なる敗者細胞で共通して hid とともに発現上昇する遺伝子群を探索した。そこで、得られた RNA-seq データをもとに敗者細胞で特異的に発現上昇する遺伝子群を同定し、敗者細胞でこれら遺伝子を一つ一つノックダウンして細胞競合やオートファジーに及ぼす影響を解析した。遺伝学的スクリーニングとトランスクリプトームとの解析から得られるデータを相互にフィードバックしながら遺伝学的解析を進め、敗者細胞における細胞非自律的なオートファジー誘導メカニズムを明らかにした。オートファジーによる細胞競合制御メカニズムは異なるトリガーにより引き起こされる細胞競合を共通に制御することから、以上の解析により細胞競合の本質的なメカニズムを明らかにできる可能性が高いと考えた。

4. 研究成果

まず、Hippo 変異細胞内で Yki のターゲット遺伝子を一つ一つノックダウンしてオートファジー活性を解析する遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、変異細胞内で micro RNA *bantam* の機能を阻害した際に周囲の正常細胞のオートファジーが抑制されることがわかった。さらに遺伝学的解析を進めた結果、変異細胞では *bantam* が発現上昇しており、*bantam* の機能を阻害すると TOR シグナル活性が抑制された。また、TOR シグナルの下流分子を解析したところ、リボソームタンパク質キナーゼである S6K をノックダウンすることで周囲の正常細胞のオートファジーが抑制されたことから、Hippo 変異細胞内のタンパク質合成能の上昇が正常細胞のオートファジー誘導に必要であることがわかった。以上の解析の結果から、Hippo 変異細胞では *bantam* を介して TOR シグナルが活性化しており、これによりタンパク質合成が上昇することが周囲の正常細胞のオートファジー誘導に必要であることがわかった (図 3) (Nagata *et al.*, *Curr Biol.*, 2022)。

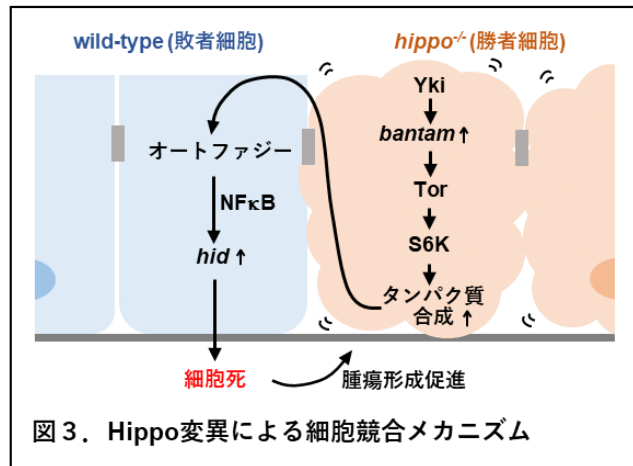


図 3. Hippo 変異による細胞競合メカニズム

次に、細胞競合を誘導した組織の single-cell RNA-seq 解析により敗者細胞で発現上昇する遺伝子群を探索した結果、4 種類の敗者細胞に共通してギャップ結合のコンポーネントが発現上昇することがわかった。実際に、敗者細胞内でこの分子をノックダウンするとオートファジーが抑制された。重要なことに、勝者細胞側でこの分子をノックダウンした際にも敗者細胞のオートファジーが抑制されたことから、勝者-敗者細胞間のギャップ結合の機能が敗者細胞のオートファジー誘導に必要であることがわかった。上述した通り、勝者-敗者細胞間のタンパク質合成能の差がオートファジーを誘導することから、タンパク質合成の差がギャップ結合を通る何らかの分子 X の濃度差に変換され、これによる分子 X のギャップ結合を介した移動がオートファジー誘導を引き起こす可能性が考えられた。現在、勝者-敗者細胞間のギャップ結合を介してどのような小分子が通りオートファジーが活性化するかの詳細なメカニズムを解析している。本メカニズムが完全に明らかになれば、細胞競合における細胞非自律的なオートファジー誘導メカニズムを解明できると考えられる。

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 Nagata R, Akai N, Kondo S, Saito K, Ohsawa S and Igaki T. | 4. 巻 32 |
| 2. 論文標題 Yorkie drives supercompetition by non-autonomous induction of autophagy via bantam microRNA in Drosophila | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Current Biology | 6. 最初と最後の頁 1064-1076 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.01.016 | 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 Ochi N, Nakamura M, Nagata R, Wakasa N, Nakano R and Igaki T. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 Cell competition is driven by Xrp1-mediated phosphorylation of eukaryotic initiation factor 2 | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Genetics | 6. 最初と最後の頁 e1009958 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009958 | 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 永田理奈、井垣達史 | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 細胞競合による不良細胞除去のしくみ | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 炎症と免疫 | 6. 最初と最後の頁 14-17 |
| 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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 永田理奈、赤井菜々美、近藤周、斎藤都暁、大澤志津江、井垣達史 |
| 2. 発表標題 細胞非自律的オートファジー誘導を介したスーパーコンペティションによる腫瘍形成機構 |
| 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 永田理奈、越智直孝、中村麻衣、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 細胞競合の敗者を決定づける分子メカニズム |
| 3. 学会等名 日本Cell death学会 第29回学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Rina Nagata, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki |
| 2. 発表標題 Epithelial tumorigenesis by super-competition via non-autonomous induction of autophagy |
| 3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 永田理奈、赤井菜々美、近藤周、斎藤都暁、大澤志津江、井垣達吏 |
| 2. 発表標題 Hippo経路変異が引き起こすスーパーコンペティションの分子機構 |
| 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 永田理奈 |
| 2. 発表標題 細胞競合を駆動する細胞間の質の差 |
| 3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nagata R, Kido A, Zang L, Wang Y, Deng M, Akai N, Kondo S, Saito K, Matsuyama M, Kobayashi T, Ohsawa S, Yan Y, Igaki T |
| 2. 発表標題 Mechanism of non-cell autonomous autophagy that governs 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 Nagata R, Kido A, Zang L, Wang Y, Deng M, Kondo S, Saito K, Matsuyama M, Kobayashi T, Yan Y, Igaki T |
| 2. 発表標題 細胞競合を駆動する細胞非自律的なオートファジー誘導メカニズム |
| 3. 学会等名 第45回分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| 井垣研hp https://igakilab.lif.kyoto-u.ac.jp/ |
|--|

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