

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657033

研究課題名（和文） Cell Competition の不具合に起因する癌発症機構の研究

研究課題名（英文） Research of tumor development due to failure in cell competition

研究代表者

中西 義信 (NAKANISHI YOSHINOBU)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：40172358

研究成果の概要（和文）：まず、アポトーシス細胞の貪食を担う受容体を欠損させたショウジョウバエを作成した。その動物では幼虫の期間が長くなり、アポトーシス細胞除去が動物個体の成長に必要とされることがわかった。続いて、貪食不全により残存する負け組細胞の性質を調べるため、貪食受容体欠損動物に Cell Competition をモザイク状に起こす変異を導入した。しかし、本研究の期間内にその個体の解析を完了させるに至らなかった。

研究成果の概要（英文）：We generated a *Drosophila* line that lacks receptors responsible for the phagocytic removal of apoptotic cells. These flies had prolonged larval stage, indicating the importance of apoptotic cell clearance in growth. To determine the characteristic of ‘loser cells’, which remain in animals due to a defect in phagocytosis, a mosaic mutation for artificial cell competition was introduced into a phagocytosis-deficient fly line. However, we could not complete the examination of these flies within the allocated research period.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,200,000	0	2,200,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：免疫生化学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞競合、発癌、ショウジョウバエ、発生、細胞貪食、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

Cell Competition（細胞競合）は、生物の発生過程で観察される現象を理論だてたものであり、「同じ場所にある 2 種類の細胞の増殖速度が異なるような変化が起きた時に、一方の細胞が他方の細胞を排除すること」を指す。

細胞競合は臓器の大きさの維持に必要とされることが知られ、また疾病との関係も予想されている。

排除されるべき細胞（負け組細胞）は、残る細胞（勝ち組細胞）の働きでアポトーシスを起こし、食細胞による貪食を受けて消失する。なんらかの原因でこの貪食が効率良く行

われなかった場合には、負け組細胞が残存することになる。研究代表者は、“除去されずに残った負け組細胞が癌細胞に変化する”という仮説をたてた。

この仮説を検証するためには、動物体内に残った負け組細胞が癌細胞の性質をもつようになるかどうかを調べればよい。そのためには、負け組細胞にアポトーシスを起こさせないか、あるいはアポトーシスを起こした負け組細胞が貪食されないようにすればよい。

研究代表者によるこれまでの解析で、ショウジョウバエにおけるアポトーシス細胞貪食を担うおもな受容体は *Draper* と *Integrin-βv* であることがわかっている。そこで、このふたつの受容体を欠損したショウジョウバエを作成し、それに人為的に細胞競合を起こさせて負け組細胞が除去されずに残ることを期待した。細胞競合は、特定の成虫原基の一部の細胞でのみ起こる（モザイク変異）ようにし、その成虫原基由来の臓器を調べることにした。

2. 研究の目的

細胞競合を阻害すると、臓器サイズの調整がうまくゆかなくなることがわかっている。しかし、“細胞競合は起こるが負け組細胞の除去が完全ではない”状態にした時に、動物個体にどのような影響が及ぶのかはまだよくわかっていない。研究代表者は、“除去されずに残った負け組細胞が癌になる”という仮説をたて、これを検証するための実験を行うことにした。そのために、遺伝学が駆使できるショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) をモデル動物として使い、遺伝子を変異させることにより“細胞競合が過剰に起こるが負け組細胞の貪食除去がうまく行われない”動物を作成する。そして、その動物において残存する負け組細胞の性質を調べ、癌細胞としての特徴を有するかどうかを知る。

得られた結果を総合的に解釈して、細胞競合での負け組細胞が残存すると癌が発症するかどうかを結論する。

3. 研究の方法

まず、アポトーシス細胞貪食の受容体である *Draper* と *Integrin-βv* の両方を欠損するショウジョウバエ株を作成する。続いて、成虫原基にモザイク状に過剰な細胞競合を起こす変異を導入したショウジョウバエ株を作成する。次に、それらの株を交配させて、“負け組細胞が残存する”ショウジョウバエ株を樹立する。

樹立したショウジョウバエ株について、幼虫時期に細胞競合を誘導する。発生した成虫

について、過剰な細胞競合を起こさせた成虫原基由来の臓器を観察し、負け組細胞の残存程度を調べる。同時に、それらの臓器の大きさ、形状、及び性質を調べ、正常なショウジョウバエのものと比較する。さらに、見いだされた負け組細胞を単離して、染色体の状態、増殖性、発癌マーカーのレベルなどを調べる。

4. 研究成果

まず、アポトーシス細胞の貪食がうまくゆかないショウジョウバエを作成した。そのために、2種類の貪食受容体 (*Draper* と *integrin*) のそれぞれを欠損したショウジョウバエ株を交配して、二重欠損体を樹立した。その動物の性状を調べると、成虫になるまでの時間が長くなっていることがわかった。そこで、発生の各段階について要する時間を調べたところ、胚と蛹の時間は変化せずに、幼虫の時期のみが長くなることがわかった。さらに、2度ある脱皮のうち、1度目の脱皮から2度目の脱皮までの間の時期、すなわち2令幼虫の期間が延長されることが判明した。

次に、受容体欠損ショウジョウバエを、異なる2点の温度、異なる2点の栄養状態で飼育して、幼虫期間の長さを測定した。その結果、飼育温度と栄養状態の違いにかかわらず幼虫期間の延長が認められた。したがって、受容体欠損ショウジョウバエで見られた発生遅延は、温度への応答や代謝レベルの変化によらないと考えられた。

以上より、アポトーシス細胞の貪食除去がうまくゆかない場合にショウジョウバエの発生が遅れることが見いだされた。これは、アポトーシス細胞の残存が個体の成長を阻害することを示唆する。

次に、特定の臓器内のある細胞群だけに細胞競合を過剰に起こすモザイク動物を作成した。そのために、熱ショックで遺伝子組換えを起こすような遺伝型を導入したショウジョウバエを樹立し、遺伝子組換えの程度を可視マーカーで判定できるようにした。このショウジョウバエ株を貪食受容体欠損株と交配して、“特定の成虫原基あるいは臓器でモザイク的に細胞競合を起こし、かつ、負け組細胞の貪食除去が不全となった”ショウジョウバエを作成した。あとは、この株に熱ショックをかけて発生させ、細胞競合が頻度高く起こる臓器を観察すればよいわけである。しかし、現時点では、上記のショウジョウバエ株の樹立までしか到達しておらず、当初に設定された研究期間内に結論を得ることができなかった。本研究は、平成24年度に持ち越して解析がなされる予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Okada, R., Nagaosa, K., Kuraishi, T., Nakayama, H., Yamamoto, N., Nakagawa, Y., Dohmae, N., Shiratsuchi, A., and Nakanishi, Y. Apoptosis-dependent externalization and involvement in apoptotic cell clearance of DmCaBP1, an endoplasmic reticulum protein of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 287 (2012), 3138-3146、査読有 DOI: 10.1074/jbc.M111.277921
- ② Nagaosa, K., Okada, R., Nonaka, S., Takeuchi, K., Fujita, Y., Miyasaka, T., Manaka, J., Ando, I., and Nakanishi, Y. Integrin β v-mediated phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila* embryos. *J. Biol. Chem.* 286 (2011), 25770-25777、査読有 DOI: 10.1074/jbc.M110.204503
- ③ 白土明子、永長一茂、中西義信 ショウジョウバエ胚におけるアポトーシス細胞貪食の検出 実験医学別冊:細胞死実験プロトコール (2011) 169-174、査読無 DOI:なし
- ④ 白土明子、中西義信 マウス肺組織における貪食の解析 実験医学別冊:細胞死実験プロトコール (2011) 162-168、査読無 DOI:なし
- ⑤ 白土明子、中西義信 アポトーシス細胞の in vitro 貪食反応 実験医学別冊:細胞死実験プロトコール (2011) 154-161、査読無 DOI:なし
- ⑥ Nakanishi, Y., Nagaosa, K., and Shiratsuchi, A. (review) Phagocytic removal of cells that have become unwanted: implications for animal development and tissue homeostasis. *Dev. Growth Differ.* 53 (2011), 149-160、査読有 DOI: 10.1111/j.1440-169X.2010.01224.x
- ⑦ 白土明子、中西義信 アポトーシス依存的な細胞貪食による生体恒常性の維持 実験医学増刊:細胞死研究総集編 (2010) 1055-1061、査読無 DOI:なし
- ⑧ Takizawa, T., and Nakanishi, Y. Role and pathological significance of apoptosis induced by influenza virus infections. (review) *Open Antimicrobial Agents Journal* 2 (2010), 22-25、査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0018918

[学会発表] (計 10 件)

- ① 岡田亮、永長一茂、倉石貴透、中山洋、中川祐紀子、上田晃一、堂前直、白土明子、中西義信、ショウジョウバエ小胞体タンパク質 CaBP1 のアポトーシス依存的な細胞外放出とアポトーシス細胞貪食反応への関与、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 24 日、京都国際会議場 (京都府)
- ② 永長一茂、野中さおり、岡田亮、宮坂知幸、中西義信、ショウジョウバエインテグリン α PS3 β v の貪食受容体としての働きの解析、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都国際会議場 (京都府)
- ③ 永長一茂、岡田亮、野中さおり、竹内一貴、藤田融、宮坂知幸、中西義信、ショウジョウバエにおける第二のアポトーシス細胞貪食受容体の探索、日本生化学会北陸支部第 29 回大会、2011 年 5 月 28 日、金沢大学総合教育棟 (石川県)
- ④ 岡田亮、永長一茂、倉石貴透、中川祐紀子、上田晃一、白土明子、中西義信、ショウジョウバエ貪食受容体に結合する分子 CaBP1 の機能解析、日本生化学会北陸支部第 29 回大会、2011 年 5 月 28 日、金沢大学総合教育棟 (石川県)
- ⑤ 森大樹、中西義信、永長一茂、アポトーシス細胞貪食へのホスファチジルセリンの関与を知るためのショウジョウバエの作成、日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日、石川県立音楽堂交流ホール (石川県)
- ⑥ 野中さおり、岡田亮、竹内一貴、中西義信、永長一茂、ショウジョウバエにおけるインテグリンを介したアポトーシス細胞の貪食、日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 25 日、石川県立音楽堂交流ホール (石川県)
- ⑦ 野中さおり、中西義信、永長一茂、ショウジョウバエにおける α PS3 インテグリンを介したアポトーシス細胞の貪食、第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)
- ⑧ 永長一茂、野中さおり、竹内一貴、宮坂知幸、岡田亮、中西義信、アポトーシス細胞貪食におけるショウジョウバエ β v インテ

グリンの働き方に関する研究、第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド (兵庫県)

- ⑨ 中西義信、ショウジョウバエにおける要除去細胞貪食の仕組み、第 50 回日本リンパ網内系学会総会、2010 年 6 月 18 日、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター (新潟県)
- ⑩ 野中さおり、中西義信、永長一茂、アポトーシス細胞の貪食に働くショウジョウバエ *integrin* サブユニットの特定、日本生化学会北陸支部第 28 回大会、2010 年 5 月 29 日、福井大学松岡キャンパス (福井県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 義信 (NAKANISHI YOSHINOBU)
金沢大学・薬学系・教授
研究者番号：40172358

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

永長 一茂 (NAGAOSA KAZUSHIGE)
金沢大学・薬学系・助教
研究者番号：70401891