

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650596

研究課題名（和文） 細胞間コミュニケーションを介した非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular basis of non-genetic tumor progression through cell-cell communication

研究代表者

井垣 達吏 (IGAKI TATSUSHI)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号：00467648

研究成果の概要（和文）：ヒトのがんではミトコンドリアの機能障害が高頻度に認められるが、その意義はこれまでほとんど不明であった。今回、ショウジョウバエ上皮において、ミトコンドリアの機能障害ががん遺伝子 Ras の活性化と協調して周辺組織の腫瘍悪性化を引き起こすことを見いだした。そのメカニズムとして、ミトコンドリア機能障害と Ras の活性化が起こると活性酸素種（ROS）が大量に産生され、これが JNK シグナルの活性化を介してがん抑制経路 Hippo 経路を不活化し、分泌性増殖因子 Upd（IL-6 ホモログ分子）や Wingless（Wnt ホモログ分子）を産生・放出することで周辺の良性腫瘍が悪性化することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Mitochondrial respiratory function is frequently impaired in human cancers. However, the mechanisms by which mitochondrial dysfunction contributes to tumor progression remain elusive. We found in *Drosophila* imaginal epithelium that defects in mitochondrial function potently induce tumor progression of surrounding tissue in conjunction with oncogenic Ras. Ras activation and mitochondrial dysfunction cooperatively stimulate production of reactive oxygen species (ROS), which causes activation of JNK signaling. JNK cooperates with oncogenic Ras to inactivate the Hippo pathway, leading to upregulation of its targets Unpaired (Upd, an IL-6 homolog) and Wingless (Wg, a Wnt homolog). Mitochondrial dysfunction in Ras-activated cells further cooperates with Ras signaling in neighboring cells with normal mitochondrial function, causing benign tumors to exhibit metastatic behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：遺伝学、細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍生物学

キーワード：癌、シグナル伝達、細胞間相互作用、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

がんの悪性化は、単一またはごく少数の細胞が多段階的ながん原性突然変異（がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化）を蓄積することにより進行すると考えられてきた。このような単一のがん原性細胞を起源

としたクローナルな腫瘍進行が起きた場合、その腫瘍細胞集団は均一な遺伝的背景をもつことになる（細胞自律的ながん進行）。しかしながら、近年、ヒトのがん組織の多くはその遺伝的背景が必ずしも均一ではなく、ポリクローナルな起源をもつ細胞集団から構

成されていることが分かってきた。このことは、がんの発生過程において異なる細胞クローン間（がん原性細胞同士、あるいはがん原性細胞と正常細胞間）の相互作用がその進行に寄与していることを示唆している（細胞間相互作用を介したがん進行）。実際に、がんの発生過程においてその微小環境は重要な役割を果たしており、がんの大部分を占める上皮由来がんにおいては、がん原性上皮細胞が間質細胞や上皮細胞と相互作用することによってその悪性化が進行すると考えられている。また、組織中にごんの多発「母地」が形成される「field cancerization（広域発がん）」と呼ばれる現象が様々ながんにおいて認められており、その形成には細胞間相互作用を介した“非遺伝的”な要因が深く関与していると推察されている。このように、がんの発生・悪性化には突然変異による“遺伝的”ながん原性変化のみならず、細胞間の相互作用を介した“非遺伝的”な変化が重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、このような非遺伝性の腫瘍悪性化機序はこれまでほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、細胞間コミュニケーションを介した“非遺伝的”な腫瘍悪性化機構の分子基盤の解明に迫るものである。具体的には、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを用い、がん遺伝子 Ras の活性化が様々な突然変異と協調して引き起こす上皮の“非遺伝的”な腫瘍悪性化の分子機構を明らかにすることで、細胞間相互作用を介した組織レベルのがん悪性化の理解に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まず3段階の遺伝学的スクリーニングを大規模に展開し、ショウジョウバエ上皮に誘導した活性化型 Ras (RasV12) 誘導性の良性腫瘍細胞クローンが (1) “細胞非自律的”に周辺の正常上皮細胞の増殖を促進する突然変異、(2) この“細胞非自律的”な増殖促進を正や負に制御する突然変異、および (3) これらの変異の中で周辺の RasV12 誘導性の良性腫瘍を“非遺伝的”に悪性化し、浸潤・転移能を付与する突然変異を網羅的に単離する。これらの変異体の責任遺伝子を同定してその生理機能を明らかにするとともに、上皮の“非遺伝的”腫瘍悪性化における役割とその分子機構を遺伝学的に明らかにすることで、細胞間相互作用を介した組織レベルの腫瘍悪性化の基本原理の解明を目指す。

具体的には、まず、遺伝的モザイククローン法によりショウジョウバエ3齢幼虫の複眼原基の上皮組織に GFP で標識したがん原性

Ras (RasV12) 発現細胞クローンを誘導する。これら RasV12 発現クローンは過剰に増殖して腫瘍を形成するが、浸潤・転移能は示さないことから良性腫瘍とみなすことができる。この RasV12 良性腫瘍に第二の突然変異 (P 因子挿入により誘導) をホモ接合となるように導入し、これらの変異細胞がそれ自身ではなく周辺の正常細胞の増殖を強く促す突然変異体 (*nag* (*non-cell autonomous growth*) 変異体と呼ぶ) をスクリーニングする (スクリーニング1)。次に、これら一連の *nag* 変異体の中から注目すべき突然変異体をピックアップし、これらについて成虫複眼の肥大の表現型を指標としたドミナント・モディファイヤー・スクリーニングを行い、*nag* 表現型を正や負に制御する突然変異体を単離する (スクリーニング2)。このスクリーニング2では、全ゲノムの90%以上をカバーする一連の染色体欠失系統ライブラリーを用いる。続いて、スクリーニング1で同定された *nag* 変異をもつ RasV12 発現細胞クローンを RasV12 良性腫瘍に隣接するように誘導し、これにより RasV12 良性腫瘍が“非遺伝的”に悪性化 (複眼原基の基底膜を突き破り、隣接する中枢神経系 (VNC) や遠隔組織へ浸潤・転移する能力を指標に判定) を引き起こす個体をスクリーニングする (スクリーニング3)。

各スクリーニングで単離された変異体の責任遺伝子を同定した後、それらの腫瘍悪性化における役割とその分子機構を遺伝学、免疫組織化学、および生化学的手法により明らかにする。各スクリーニングにより得られたデータをつなぐ分子基盤を遺伝学的に明らかにすることで、組織レベルの腫瘍悪性化機構の包括的理解を目指す。

4. 研究成果

細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子機構を解析するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした遺伝学的スクリーニングを行った。ショウジョウバエ3齢幼虫の複眼原基の上皮組織に RasV12 発現クローンを誘導し、このクローンに一連の P 因子挿入変異を導入して表現型の変化をスクリーニングした。その結果、突然変異が導入された RasV12 発現細胞自身ではなく、その周辺の野生型細胞が非自律的に増殖を亢進する突然変異体 (*nag* 変異体) が多数単離された (図1A)。これら一連の *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成タンパク質、あるいはその合成に関わるミトコンドリアリボソームタンパク質をコードする遺伝子群に突然変異が集中していることが判明した。すなわち、Ras シグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害が同時に起こると、その周辺の正常細

胞が増殖能を亢進することが分かった。

ミトコンドリアの機能障害とRasシグナルの活性化を同時に起こした細胞 (Ras/*mito*^{-/-}細胞) が周辺細胞の増殖促進を引き起こすメカニズムを明らかにするため、この現象を起こすのに必要な遺伝子群の探索を行った。具体的には、一連のショウジョウバエ染色体欠失系統ライブラリーを用い、Ras/*mito*^{-/-}細胞クローンが誘導する細胞非自律的増殖を抑制 (サプレッサー)、あるいは亢進 (エンハンサー) する染色体欠失を探索した。このスクリーニングによって単離された強力なサプレッサー染色体欠失の中に、*stat92E*遺伝子が含まれていることが分かった。Stat92EはショウジョウバエJAK/STAT経路を構成する転写因子であり、そのリガンドとして炎症性サイトカインUpd (IL-6 ホモログ分子) が知られる。実際に、Ras/*mito*^{-/-}細胞ではUpdの発現が誘導され、これによってJAK/STAT経路の活性化を介して周辺細胞の増殖が促されることが分かった。

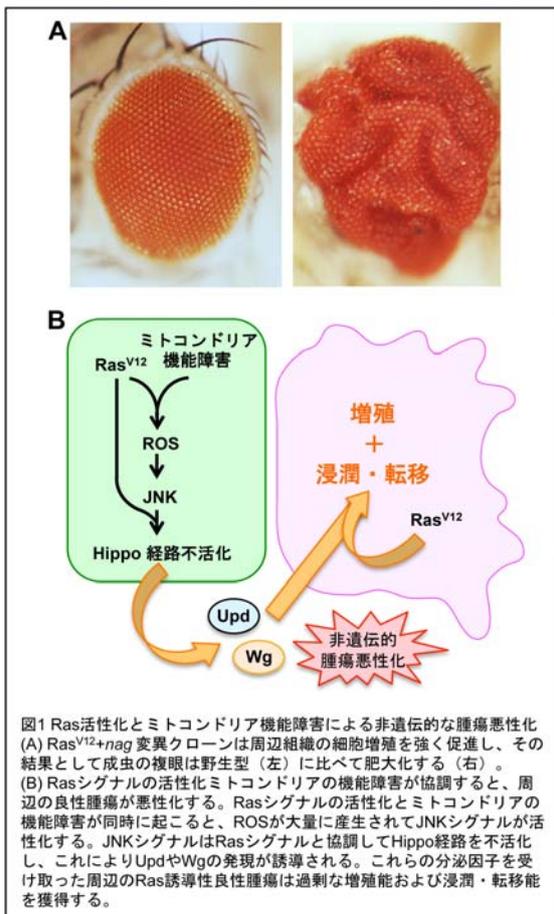
Ras/*mito*^{-/-}細胞においてJNKシグナルを抑制すると、Updの発現誘導が起こらなくなり、かつ非自律的な増殖も強く抑制されることが分かった。そこで組織内のJNK活性を解析した結果、ミトコンドリア機能障害のみ、あるいはRasシグナルの活性化のみを起こした細胞では低レベルのJNK活性しか認められなかったが、ミトコンドリアの機能障害とRasシグナルの活性化を同時起こした細胞では非常に強いJNKシグナルの活性化が検出された。以上の結果から、Ras/*mito*^{-/-}細胞ではJNKシグナルが活性化し、これによりUpdの発現が誘導されると考えられた。このJNK活性化を引き起こす上流メカニズムとして、Ras/*mito*^{-/-}細胞では大量にROSが産生されていることが分かった。すなわち、ミトコンドリアの機能障害とRasの活性化は協調的にROSの産生を誘導し、これがJNKシグナルを活性化してUpdの発現誘導を起こすと考えられた。

一方、JNKシグナルの活性化と同時にRasシグナルの活性化が起こることがUpdの発現誘導に必要十分であることが分かった。そのメカニズムとして、RasシグナルとJNKシグナルの活性化によりがん抑制経路Hippo経路が不活化し、これによりUpdの発現誘導が起こることが分かった。Hippo経路は進化的に保存されたがん抑制経路であり、転写コアクティベーターYokie (Yki) をリン酸化して抑制することで細胞増殖を負に制御する。JNKとRas

を同時に活性化した細胞では、Ykiの特異的な転写ターゲット遺伝子である *expanded* や *cyclin E*、*daip1* などの発現がいずれも強く誘導されていることが分かった。同様に、ミトコンドリアの機能障害とRasの活性化を同時に起こした細胞においても、これらのYkiターゲット遺伝子の発現が強く誘導されていた。さらに、これらのYkiターゲット遺伝子の発現は、Ykiを不活化することで強く抑制された。加えて、Ykiの別のターゲット遺伝子である分泌性増殖因子Wingless (Wg; Wntホモログ分子) の発現もRasシグナルとJNKシグナルの協調により誘導されること、また、Wgの発現誘導もRas/*mito*^{-/-}細胞による周辺細胞の増殖促進に貢献していることが明らかとなった。以上の結果から、Ras/*mito*^{-/-}細胞はHippo経路を不活化することでYkiの活性化を介して *upd* や *wg* の発現を誘導し、これらの分泌性増殖因子が周辺細胞の増殖を促進すると考えられた。

ヒトのがん組織では、ミトコンドリアの機能障害とRasシグナルの活性化を同時に起こした細胞の周辺には正常細胞のみならずRasを活性化した (正常なミトコンドリア機能をもつ) 良性腫瘍細胞が存在すると想定される。そこで、そのような状況をショウジョウバエ上皮において遺伝学的に再現し、その表現型を解析した。ショウジョウバエ複眼原基の組織全体でRasシグナルを活性化すると、細胞は過剰に増殖するものの、浸潤・転移能は示さない。興味深いことに、Rasシグナルを組織全体で活性化した複眼原基においてミトコンドリア機能障害を同時に起こした細胞群 (Ras/*mito*^{-/-}細胞群) をモザイク状に誘導すると、その周辺に存在するRas活性化細胞群は過剰に増殖するだけでなく、隣接する組織・器官へと浸潤・転移する能力を獲得することが分かった。すなわち、Rasシグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害を同時に起こした細胞は、その周辺の良性腫瘍を悪性化する能力をもつことが明らかとなった (図1B)。

ミトコンドリアの機能障害とがんの関係は古くから注目されてきた。今回ショウジョウバエで明らかとなったRasシグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害により誘発される非自律的な腫瘍悪性化機構は、ヒトのがん組織における細胞間コミュニケーションを介したがん進展に寄与している可能性が考えられる。



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. Enomoto M and Igaki T: Src controls tumorigenesis via JNK-dependent regulation of the Hippo pathway in *Drosophila*, **EMBO Reports**, 14 巻, 査読有, 2013 年, pp65-72. 10.1038/embor.2012.185.
2. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T: Mitochondrial defect drives non-autonomous tumor progression through Hippo signaling in *Drosophila*. **Nature**, 490 巻, 査読有, 2012 年, pp547-551. 10.1038/nature11452.
3. 大澤志津江, 井垣達吏: 細胞競合が駆動する上皮の内在性癌抑制、実験医学、査読無、29 巻、2011 年、pp1374-1380.
4. 井垣達吏: 概論「細胞競合—細胞社会を監視する新たなルール」、実験医学、査読無、29 巻、2011 年、pp1342-1349.

5. 大澤志津江, 井垣達吏: JNKを介した貪食機構による腫瘍原性をもつ細胞の排除、ライフサイエンス新着論文レビュー、査読無、2011 年。
6. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Igaki T: Imaging Cell Competition in *Drosophila* imaginal discs **Methods in Enzymology**, 査読無、506 巻、2011 年、pp407-413. 10.1016/B978-0-12-391856-7.00044-5
7. Kanda H, Igaki T, Okano H, Miura M: Conserved metabolic energy production pathway govern Eiger/TNF-induced nonapoptotic cell death, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 査読有、108 巻、2011 年、pp18977-18982. 10.1073/pnas.1103242108
8. Enomoto M, Igaki T: Deciphering tumor-suppressor signaling in flies: genetic link between Scribble/Dlg/Lgl and the Hippo pathway, **Journal of Genetics and Genomics**, 査読有、38 巻、2011 年、pp461-470. 10.1016/j.jgg.2011.09.005

[学会発表] (計 35 件)

1. 井垣達吏: 細胞競合によるがん制御、第 118 回日本解剖学会総会全国学術集会、2013 年 3 月 30 日、かがわ国際会議場
2. 井垣達吏: 細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の遺伝的基盤、平成 24 年度文部科学省新学術領域研究がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム、2013 年 1 月 30 日、学術総合センター一橋記念堂
3. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T: Non-autonomous tissue growth regulation by mitochondrial dysfunction in *Drosophila*, The 23rd CDB meeting: Building multicellular systems from Cellular Cross-Talk (国際シンポジウム)、2013 年 1 月 22 日、理研 CDB
4. Enomoto M and Igaki T: Src controls tumorigenesis through JNK-dependent Hippo pathway regulation in *Drosophila*, 第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

5. 中村 麻衣、大澤 志津江、井垣 達吏、細胞老化が駆動する非自律的腫瘍悪性化の遺伝学的解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡
6. 赤井 菜々美、大澤 志津江、井垣 達吏： RNAiを用いた新規細胞競合モデル系の構築と遺伝学的解析、第35回日本分子生物学会、2012年12月12日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
7. 井垣達吏： 細胞極性の崩壊が引き起こす細胞競合の遺伝学的解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
8. 瀧野 恭子、大澤志津江、井垣達吏： Non-autonomous tumor growth control by endocytic regulation of the Hippo pathway、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡
9. Igaki T： Non-autonomous tumor progression by oncogenic inflammation in *Drosophila*, International Exdotoxin & Innate Immunity Society (IEIIS) meeting 2012、2012年10月26日、学術総合センター
10. Nakamura M, Ohsawa S, Igaki T： Non-cell autonomous tumor progression by cellular senescence in *Drosophila*, 第10回日本ショウジョウバエ研究会、2012年10月13日～15日 慈恵医大
11. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T： Mitochondrial dysfunction drives non-autonomous tumor progression via the Hippo pathway、第10回日本ショウジョウバエ研究会、2012年10月13日、慈恵医大。
12. Enomoto M and Igaki T： Src controls tumorigenesis through JNK-dependent Hippo pathway regulation in *Drosophila*、第10回日本ショウジョウバエ研究会、2012年10月13日、慈恵医大。
13. Igaki T： Developmental elimination of unwanted neighbors by cell competition、Asia-Pacific Developmental Biology Conference、2012年10月6日、Taipei Innovation City Convention Center (台湾)
14. Akai N, Ohsawa S, Igaki T： Genetic analysis of cell competition using a novel model system in *Drosophila*, Asia-Pacific Developmental Biology Conference, 2012年10月5日、Taipei Innovation City Convention Center (台湾)
15. Enomoto M and Igaki T： Src controls tumorigenesis through JNK-dependent tissue growth regulation in *Drosophila*, The EMBO meeting 2012、2012年9月25日、アクロポリス (ニース, フランス)
16. 井垣達吏： Tumor growth regulation by cell competition、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日、ロイトン札幌
17. Ohsawa S, Akai N, Kunimasa K, Igaki T： Dissecting cell competition through “non-cell autonomous” genetic screen in *Drosophila*, Cold-blooded Cancer、2012年9月2日～4日、スコットランド (イギリス)
18. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya, A, Igaki T： Mitochondrial dysfunction drives non-autonomous tumor progression in *Drosophila*, 第45回日本発生生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会、2012年5月28日～31日、神戸ポートアイランド
19. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T： Non-autonomous tumor progression driven by mitochondrial dysfunction、The 53rd *Drosophila* Research Conference、2012年3月7日～3月11日、Sheraton Chicago Hotel & Towers (シカゴ・アメリカ合衆国)
20. 井垣達吏： 細胞競合による上皮の恒常性維持とがん制御、第8回宮崎サイエンスキャンプ、2012年2月17日～19日、宮崎シーガイア
21. Igaki T： Dissecting tumor suppression and metastasis by *Drosophila* genetics, The 21st Hot Spring Harbor Symposium jointly with 8th Global COE International Symposium “Cell Migration in Biology and Medicine”、2012年1月22日～23日、九州大学
22. 榎本将人、井垣達吏： Src, a novel super-competitor in *Drosophila*、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13日

～12月16日、パシフィコ横浜（横浜）

23. 佐藤好隆、大澤志津江、中村麻衣、別宮綾、井垣達吏: 細胞非自律的な腫瘍悪性化機構の遺伝学的解析、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日～5日、名古屋国際会議場
24. Enomoto M, Igaki T: Src activation triggers non-cell autonomous apoptosis through endocytic activation of TNF-JNK signaling Cellular Development: Biology at the interface”, 2011年9月29日～10月1日、理研 発生・再生総合研究センター
25. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T: Non-autonomous tumor progression driven by Ras activation and mitochondrial dysfunction “Cellular Development: Biology at the interface”, 2011年9月29日～10月1日、理研 発生・再生総合研究センター
26. 榎本将人、井垣達吏: がん遺伝子Srcが引き起こす細胞競合の分子機構、第23回高遠シンポジウム、2011年8月25日～26日、高遠さくらホテル
27. 大澤志津江、佐藤好隆、榎本将人、中村麻衣、別宮綾、井垣達吏: 細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の遺伝学的解析第23回高遠シンポジウム、2011年8月25日～26日、高遠さくらホテル
28. 井垣達吏: 細胞競合による上皮の異常細胞排除機構、第23回高遠シンポジウム、2011年8月25日～26日、高遠さくらホテル
29. 大澤志津江、佐藤好隆、中村麻衣、別宮綾、井垣達吏: 細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化機構の遺伝学的解析、第20回日本Cell Death学会学術集会、2011年7月29日～30日、東京大学
30. 井垣達吏、榎本将人: がん遺伝子Srcによる細胞間コミュニケーションを介した細胞死制御、第20回日本Cell Death学会学術集会、2011年7月29日～30日、東京大学
31. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T: Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated

engulfment in Drosophila、第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月27日～29日、北海道大学

32. Igaki T: Epithelial intrinsic tumor suppression driven by cell competition、第63回日本細胞生物学会大会、2011年6月27日～29日、北海道大学
33. Igaki T, Nakamura M, Sato Y, Betsumiya A, Ohsawa S: Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in Drosophila、1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference 2011年5月22日～25日、劍潭青年活動中心（台北・台湾）
34. Ohsawa S, Sugimura K, Takino K, Xu T, Miyawaki A, Igaki T: Elimination of oncogenic neighbors by TNF-JNK-mediated engulfment in Drosophila、13th International TNF Conference (TNF2011)、2011年5月15日～18日、淡路夢舞台
35. Igaki T: Epithelial intrinsic tumor suppression by Eiger/TNF signaling in Drosophila、13th International TNF Conference (TNF2011)、2011年5月15日～18日、淡路夢舞台

〔その他〕

ホームページ等

研究室 HP :

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井垣達吏 (IGAKI TATSUSHI)

神戸大学・大学院医学研究科・客員教授

研究者番号 : 00467648