

## 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 27日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657150

研究課題名(和文) エネルギー代謝の網羅的定量化・可視化による競合する死細胞—生細胞  
間相互作用の解析研究課題名(英文) Comprehensive quantification and visualization of energy  
metabolism in cell competition between dying and living cells.

研究代表者

松田 七美 (SENNO-MATSUDA NANAMI)

早稲田大学・先端科学・健康医療融合研究機構・准教授

研究者番号：70360641

研究成果の概要(和文)：

細胞競合とは、多細胞生物の器官において、増殖が速く生存能の高い細胞群(勝ち組)が、増殖が遅く細胞死によって排除される細胞群(負け組)に競合し、細胞の増殖、細胞死、周期、分化などが統合的に制御されることにより、一定の大きさや機能をもつ器官・組織が形成される現象である。申請者は、ショウジョウバエの翅原基、及び培養細胞株を用いて独自の *in vivo*、及び *in vitro* モデルを確立し、がん遺伝子 *c-Myc* のショウジョウバエホモログ *dMyc* により細胞競合が制御されることを明らかにした (de la Cova *et al.*, *Cell* 117, 2004; 松田, *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2007)。これらのモデルを用いた予備的解析から、勝ち組、あるいは負け組となるそれぞれの細胞群の運命決定に、エネルギー代謝変化が関わることを見いだした。

そこで本研究課題では、細胞競合が生じる際の勝ち組細胞(生細胞)–負け組細胞(死にゆく細胞‘死細胞’)間の運命決定に関わる相互作用と代謝調節機構の詳細を明らかにすることを目的として、上記の細胞競合モデルにおいて、トランスクリプトーム解析、及びメタボローム解析の手法を用いて、エネルギー代謝ステータスを網羅的定量化することより解析を行った。

その結果、*dMyc* により制御される細胞競合モデルにおいて、勝ち組、あるいは負け組となる細胞群の運命決定に、*dMyc* と *p53* が協調的に制御するエネルギー代謝が関わることを見いだした。興味深いことに、*p53* を機能欠失させると、勝ち組と負け組の代謝ステータスが逆転し、それぞれの細胞運命が逆転する。このような競合条件下で勝ち組、あるいは負け組となる細胞が相互作用し互いを認識し、細胞非自立的に細胞特性を変化させる仕組みに、好氣的な糖代謝の亢進が関わることを明らかにした。

現在、さらに競合するそれぞれの細胞におけるエネルギー代謝ステータスを可視化する目的で、負け組細胞(死にゆく細胞‘死細胞’)の構築を進めている。

研究成果の概要(英文)：

When growing in mosaic tissues, cells with extra *Drosophila Myc* expression exhibit

“super-competitor” behavior that enables them to kill their wildtype neighbors and overtake the tissue. Here we have explored the basis for super-competitor status of dMyc-expressing cells during cell competition. We find that expression of dMyc, like c-myc, induces metabolic reprogramming resembling the Warburg effect, which is balanced by homeostatic metabolic functions of p53. However, in mosaics, confrontation between dMyc-expressing and wildtype cells heightens the metabolism of dMyc cells and leads p53-dependency for their clonal expansion, viability, and super-competitor status. We propose that confrontation with WT cells increases the fitness of dMyc cells and that p53 functions as a sensor of these fitness differences. Oncogenic activation can lead to metabolic changes that are physiologically important for tumor progression, and our data suggest that confrontation of incipient tumor cells and non-tumorigenic neighbors within a tissue may actually promote tumorigenesis.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 生物学

科研費の分科・細目： 生物科学・発生生物学 (細目表キーワード： 器官形成)

キーワード： 細胞競合、エネルギー代謝、Myc、p53、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究では、多細胞生物の発生、再生、発がんなどの過程に関わる普遍的な生命現象として注目される新しい概念である、細胞競合に着目する。細胞競合とは、器官において、増殖が速く生存能の高い細胞群(勝ち組)が、増殖が遅く細胞死によって排除される細胞群(負け組)に競合し、細胞の増殖、細胞死、周期、分化などが統合的に制御されることにより、一定の大きさや機能をもつ器官・組織が形成される現象である。これまでに細胞競合関連因子として、癌遺伝子 c-Myc のショウジョウバエホモログ dMyc が報告されているが、その分子機構は不明である (Johnston, *Science* 324, 2009)。

(2) 申請者らは、ショウジョウバエの翅原基、及び培養細胞株を用いて、dMyc により制御される細胞競合の *in vivo*、及び *in vitro* モデルを確立した (de la Cova *et al.*, *Cell* 117, 2004; 松田 & Johnston, *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 2007)。これらのモデルを用いた予備的解析から、勝ち組、あるいは負け組とな

るそれぞれの細胞群の運命決定に、エネルギー代謝変化が関わることを見いだした。

2. 研究の目的

本研究課題では、上記の細胞競合モデルにおいて、メタボローム解析、生化学的解析、及び ATP 可視化プローブ (ATeam) を用いたライブイメージング解析を行い、エネルギー代謝ステータスを網羅的定量化・可視化することより、細胞競合が生じる際の勝ち組細胞(生細胞)-負け組細胞(死にゆく細胞‘死細胞’)間の運命決定に関わる相互作用と代謝調節機構の詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 高 dMyc 細胞(メタロチオネインプロモーターの下流に dMyc を連結させたベクターの導入により、CuSO<sub>4</sub> 処理により dMyc を発現誘導できる安定発現細胞株; pMT-dMyc/S2 細

胞)と低 dMyc 細胞 (アクチンプロモーターベクターの導入により核移行シグナル付き GFP を恒常的に発現する野生型細胞株;

pAc5.1-GFP/S2 細胞) を共培養する技術を用い、3通りの dMyc により制御される *in vitro* 細胞競合モデル系 ([A] 直接共培養系、[B] 間接共培養系、及び[C] 単培養系における直接共培養上清アッセイ系) を構築した。

(2) (1)のショウジョウバエ培養細胞株 S2 を用いた *in vitro* 細胞競合モデル系において、メタボロミクス手法、及び生化学的手法を用いて、勝ち組細胞と負け組細胞におけるエネルギー代謝ステータスを網羅的定量化するための解析系を構築した。間接共培養系モデルにおいて細胞競合を誘導し、様々な時間経過を追って高 dMyc 細胞と低 dMyc 細胞それぞれの細胞サンプルを回収し、細胞内代謝中間体を網羅的に解析した。

(3) (2)の解析を裏付けるため、同モデル系において、糖代謝、ミトコンドリア代謝、TCA 代謝などに関わる一連の代謝酵素関連因子群の mRNA 発現量について、Real time PCR 法による定量解析を行った。

(4) (1)の高 dMyc 細胞と低 dMyc 細胞の改良型 ATeam 安定発現株、及び、改良型 ATeam 発現トランスジェニックショウジョウバエの確立を目指し、連携研究者の今村によって開発された蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 型 ATP プローブである ATeam に改良を加え、ショウジョウバエ培養細胞、あるいはショウジョウバエ個体において、ATP の動態を安定的に可視化できる条件検討を行った。

#### 4. 研究成果

(1) ショウジョウバエの翅原基、及び培養細胞株を用いて、dMyc により制御される細胞競合の *in vivo*、及び *in vitro* モデルを確立した。これらのモデルを用いた解析から、高 dMyc 細胞群は増殖能と生存能において優位を示し、低 dMyc 細胞群はカスパーゼ依存的な細胞死によって排除されることを明らかにした。また、勝ち組、あるいは負け組となる細胞群の運命決定に、何らかの液性因子が

関与し、2種類の細胞が相互作用することにより、それぞれの細胞特性を細胞非自律的に変化させることを見いだした。

(2) さらに、この勝ち組、あるいは負け組となる細胞群の運命決定に、dMyc と p53 が協調的に制御するエネルギー代謝が関わることを見いだした。とくに、dMyc により勝ち組の細胞特性を得るために要求される代謝変化が、がんの悪性化にも関わることから注目される好氣的解糖系の亢進に類似した変化であり、これが p53 と協調的に制御されるミトコンドリア代謝と糖代謝との恒常的なバランスにより獲得されることを明らかにした。

(3) 申請者は、連携研究者の京都大学・今村博臣博士との共同研究により、ショウジョウバエなど、体温が室温付近にあるモデル生物における ATP 動態解析のための低温作動性プローブとして、改良型変異 ATeam である AT1.03NL を選択し、細胞競合モデルにおける ATP 動態の可視化解析系の構築を目指し、プローブベクターを導入したトランスジェニックショウジョウバエの作出、ショウジョウバエ培養細胞株 S2 を用いた競合する勝ち組、負け組両細胞株の樹立を進めている。

#### 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 4 件)

(1) Daigo Ochiai, Nobuhito Goda, Takako Hishiki, Mai Kanai, Nanami Senoo-Matsuda, Tomoyoshi Soga, Randall S. Johnson, Yasunori Yoshimura, and Makoto Suematsu: Disruption of HIF-1 $\alpha$  in hepatocytes impairs glucose metabolism in diet-induced obesity mice. : *Biochem Biophys Res Commun* 415: 445-449, 2011  
doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.089

(2) Yasumasa Nishiyama, Nobuhito Goda, Mai Kanai, Daisuke Niwa, Kota Osanai, You Yamamoto, Nanami Senoo-Matsuda, Randall S. Johnson, Soichiro Miura, Yasuaki Kabe, and Makoto Suematsu: HIF-1 $\alpha$  induction suppresses excessive lipid accumulation in alcoholic fatty liver in mice. : *J. Hepatology* 56: 441-447, 2012  
doi: 10.1016/j.jhep.2011.07.024

(3) 松田七美 : 癌遺伝子 Myc により制御される細胞競合: 実験医学、29 (9) : 1358-1367、2011 年  
ISBN: 978-4-7581-0072-4

(4) 松田七美 : 細胞競合による勝ち組/負け組細胞の運命決定の制御: 細胞工学、31 (1) : 70-75、2012 年  
ISBN\_13: 978-4-7809-0126-9

[学会発表] (計 5 件)

(1) Nanami Senoo-Matsuda, Mai Kanai, Naoya Fukawa, and Nobuhito Goda: Analysis of competitive interactions during proliferation and cell death via dMyc-mediated regulation.: The 1st Asia-Pacific Drosophila Research Conference (APDRC), 2011 年 5 月, Taipei, Taiwan

(2) 松田七美: Mechanism of competitive cell-cell interactions during proliferation and cell death via dMyc-mediated regulation.: 第 34 回日本分子生物学会年会・ワークショップ「組織構築とがん化を制御する細胞競合の分子機構」, 2011 年 12 月, 横浜

(3) Mikako Hiramoto, Takahisa Ohno, Nobuhito Goda, and Nanami Senoo-Matsuda: Mechanism of in body size control via Sima/HIF-1 $\alpha$  signaling in Drosophila. : The 10th Japanese Drosophila Research Conference, 2012 年 10 月, 東京

(4) Takahisa Ohno, Nobuhito Goda, and Nanami Senoo-Matsuda: Functional analysis of Sima/HIF-1 $\alpha$  signaling in Drosophila neurodegenerative disease models.: The 10th Japanese Drosophila Research Conference, 2012 年 10 月, 東京

(5) 松田七美: エネルギー代謝制御を介した競合する細胞における細胞間相互作用と細胞運命決定の分子機構: 第 35 回日本分子生物学会・ワークショップ「細胞の競合による生体制御の分子基盤」, 2012 年 12 月, 福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.aoni.waseda.jp/nanami.s.matsuda/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 七美 (NANAMI SENOO-MATSUDA)  
早稲田大学 理工学術院・准教授  
研究者番号: 70360641

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

今村 博臣 (Hiromi Imamura)  
京都大学大学院・生命科学研究所・准教授  
研究者番号: 20422545