

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640077

研究課題名(和文)新規細胞競合モデルによる細胞競合の分子機構解明

研究課題名(英文)Dissecting the mechanism of cell competition by using novel model system

## 研究代表者

大澤 志津江(Ohsawa, Shizue)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：80515065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がんの発生・進展を正にも負にも制御する機構として、「細胞競合」が重要な役割を果たすことが示唆されつつあるが、その分子機構は不明な点が多い。その理由として、細胞競合を引き起こす分子群を網羅的に単離・同定するモデル系が存在しなかった点が挙げられる。本研究において研究代表者らは、細胞競合の分子機構を明らかにするために、ショウジョウバエ上皮をモデル系とし、Gal4/UASシステムにより細胞競合を継続的に引き起こす新規細胞競合モデル系の確立を行った。その結果、リボソームタンパク質の低下により引き起こされる細胞競合がWingless(ほ乳類Wnt)シグナルにより制御されていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：There are growing evidence showing that “Cell Competition”, a struggle for existence in multicellular communities, positively and negatively regulates cancer development and progression. However, the molecular mechanism of cell competition is still unclear. In this study, by using Gal4/UAS system in *Drosophila* imaginal epithelia, we established a novel model system for cell competition, in which cell competition occurs continuously, enabling us to detect cell competition more easily. We found by using this model system that Wingless signaling (a mammalian Wnt homolog) regulate cell competition triggered by differential expression level of ribosomal proteins.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：細胞競合 Wingless

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの発生・進展を制御する機構として、「細胞競合」と呼ばれる現象が重要な役割を果たすことが示されつつある。細胞競合とは、組織中の隣り合う細胞間で生体内環境への適応度を競合する現象で、競合の「勝者」が「敗者」を細胞死により排除してその場を占有する。たとえば、進化的に保存されたがん遺伝子 *myc* を過剰に発現した体細胞クローンをショウジョウバエ上皮に誘導すると、*myc* 発現細胞は周囲の正常細胞との競合の「勝者」となり、「敗者」となる正常細胞を駆逐しながら増殖することが知られている。これは、細胞競合ががん原性細胞集団の拡大に関与することを示唆している。一方で、がん遺伝子 *Ras* を活性化したラット胚線維芽細胞 (REF) がその周囲を正常な REF 細胞に取り囲まれると生存能が低下することや、*Ras* や *Src* を活性化したイヌ腎上皮細胞由来 MDCK 細胞がその周囲を正常 MDCK 細胞に囲まれると単層培養からはじき出されることが報告されている。さらに最近、申請者らを含む複数のグループは、ショウジョウバエにおいて、上皮の頂底極性 (apico-basal 極性) が崩壊した細胞がその周囲を正常な細胞に取り囲まれると細胞死によって組織から排除されることを明らかにした (Igaki *et al.*, *Dev. Cell*, 2009; Ohsawa *et al.*, *Dev. Cell*, 2011)。これらの結果は、正常な組織には細胞競合を介してがん細胞を除去する「内在性がん抑制」機構が備わっていることを示唆している。実際に、正常細胞と極性崩壊細胞間で起こる細胞競合機構を遺伝的に破綻させると、極性崩壊細胞は組織から排除されず、むしろ過剰に増殖して腫瘍を形成する (Ohsawa *et al.*, *Dev. Cell*, 2011)。以上のように、細胞競合はがんの発生やその進行を正にも負にも制御しうると考えられる。

このようにがん制御における細胞競合の重要性が認知され始めた一方で、細胞競合の分子機構はいまだほとんど不明である。また、組織の「内在性がん抑制」機構が破綻し、前がん細胞が細胞競合の「敗者」から「勝者」へとスイッチしてがん化する機構も分かっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、*in vivo* RNAi スクリーニングに適用可能な新規ショウジョウバエ細胞競合モデル系を構築し、細胞競合の分子機構の全容を明らかにすることで、細胞間コミュニケーションを介したがん制御の基本原理の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

細胞競合研究はここ数年で世界的に進展し始めたが、これまでの解析は遺伝的モザイク技術によりショウジョウバエ成虫原基に突然変異をもった体細胞クローンを誘導し、「敗者」となる細胞群が組織から排除される

過程を追跡するものであった。この系では、組織に誘導される変異細胞クローンの空間的位置はランダムであり、予測不可能である。また、組織に誘導された「敗者」細胞は隣接する「勝者」細胞と直ちに細胞競合を起こして消失してしまうため、その過程の追跡、特に、細胞競合を起こす前や細胞競合初期の細胞変化を捉えることは困難である。これらの理由から、これまで細胞競合に関わる因子の探索は、候補遺伝子の機能解析や遺伝子発現プロファイルの違いに着目した網羅的遺伝子解析に頼らざるを得なかった。そこで研究代表者らは、これらの問題を克服するために、細胞競合現象が組織の中で継続的に観察される新規細胞競合モデル系の確立を行ってきた。具体的には、Gal4/UAS 遺伝子発現システムを利用し、「野生型細胞がタンパク質の合成能が低い変異細胞 *Minute* (リボソームタンパク質をコードする遺伝子に変異の入った一連の変異の総称) を細胞競合により組織から排除する」現象を継続的に引き起こすモデル系を確立し、細胞競合制御因子の同定を行った。

### 4. 研究成果

研究代表者らは、細胞競合現象を組織中の特定の場所で継続的に引き起こすために、Gal4/UAS 遺伝子発現システムを利用した。まず、Gal4/UAS システムにより継続的に制御する領域が細胞競合の“敗者”になるように、ショウジョウバエ翅成虫原基のブレード領域 (wing pouch) に存在する一群の細胞においてリボソームタンパク質 *RpS3* に対する RNAi を発現させ、これらの細胞を細胞競合の“敗者”に運命づけることにした。ここで、wing pouch の内部に存在する細胞群は均一な *RpS3*-RNAi 発現細胞群となるため、これらの細胞同士では細胞競合は起こらないが、野生型細胞と接する wing pouch の境界上の細胞は細胞競合を起こすことになる。したがって、本システムにおいては wing pouch のエッジに存在する *RpS3*-RNAi 発現細胞群のみが継続的に細胞競合を起こす状態が成立し、周辺の正常組織 (翅の基部となる領域 (wing hinge)) に接する *RpS3*-RNAi 発現細胞群が継続的に細胞死を起こし、組織から排除されていくことになる (図 1A)。このような従来の実験系でのランダムな細胞競合敗者の組織からの消失による“敗者”細胞の追跡の困難さを回避した本実験系は、細胞競合現象を「境界上の細胞死」を指標として容易に識別することができる世界初の高感度細胞競合システムとなり得ることが分かった。そこで申請者らは、これまでに細胞競合に関わる可能性が示唆されていた種々の因子を検討した結果、Wingless (ほ乳類の Wnt) シグナルがリボソームタンパク質の低下によって引き起こされる細胞競合を制御していることを見いだした (Ohsawa, Akai, and Igaki; 未発表) (図 1B)。Wg は進化的に保存されたモルフォゲ

ンであり、局所的に発現して組織に濃度勾配を形成することで、形態形成を制御する。このことは、組織中に形成された Wg シグナルの強度差に依存した細胞競合が正常発生において起きている可能性を示唆している。実際に、幼虫期に成長遅延をきたしたショウジョウバエの翅原基では、Wg シグナルの強度差に依存した細胞競合が引き起こされていること、また、この細胞競合による細胞死と細胞増殖による細胞ターンオーバーが正常発生に必須であることを研究代表者らは最近発見している。この研究成果は、Wg シグナルの強度差に依存した細胞競合が個体の成長遅延という時間軸の歪みを調節して正常発生を実現する仕組みであることを示唆している。さらに申請者らは、この Wg シグナルの強度差に依存した細胞競合が「がん抑制経路 Hippo 経路による発現制御」と「発生遅延」との協調により強く誘発される可能性を見出し、現在その詳細なメカニズムの解析を進めているところである。

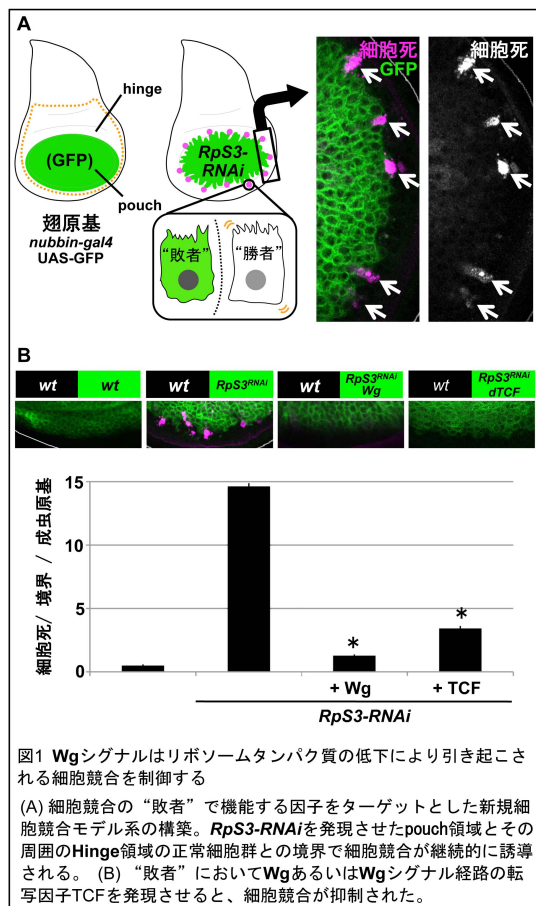


図1 Wgシグナルはリボソームタンパク質の低下により引き起こされる細胞競合を制御する  
(A) 細胞競合の“敗者”で機能する因子をターゲットとした新規細胞競合モデル系の構築。Rps3-RNAiを発現させたpouch領域とその周囲のHinge領域の正常細胞群との境界で細胞競合が継続的に誘発される。(B) “敗者”においてWgあるいはWgシグナル経路の転写因子TCFを発現させると、細胞競合が抑制された。

一方で研究代表者らは、Gal4/UAS システムによって制御する領域が細胞競合の“勝者”となる新規細胞競合アッセイシステムの樹立を試みた。すなわち、Rps3 の遺伝子量を半分にした (Rps3/+) 翅原基の一部の領域のみで Rps3 を発現させてレスキューすることで、レスキューされた Rps3 発現細胞 (勝者) とその周辺の Rps3/+細胞 (敗者) との間で細胞

競合が起こると考えた。そこで、勝者の Rps3 発現細胞が Rps3/+変異細胞を駆逐する様子を観察するのに最適なシステムを樹立するために、70 種類の gal4 発現ショウジョウバエ系統をスクリーニングした。その結果、Rps3/+翅原基の前後軸の境界上に存在する細胞でのみ Rps3 をレスキューすると、Rps3 を発現する勝者の細胞群が顕著に増大することが明らかとなった (図 2A)。この勝者の細胞群の増大は、Rps3 と同時に GFP を発現させて可視化することにより、容易に判別することが可能である。申請者はすでにこの系を用いて Minute による細胞競合の制御因子探索を開始している。まず、極性崩壊細胞 (敗者) と正常細胞 (勝者) との間で起こる細胞競合において機能する JNK-PVR 経路 (Ohsawa et al., Dev Cell, 2011) について本モデル系で検証したところ、Minute 変異による細胞競合においても JNK-PVR 経路が勝者において機能することが分かった。このことは、異なる細胞競合において共通の細胞排除メカニズムが存在することを示している (Akai, Ohsawa, Igaki; 投稿準備中)。さらに研究代表者らは、この新規細胞競合モデル系を用いた RNAi スクリーニングを開始した。Bloomington Fly Stock Center (米国インディアナ大学) より入手可能な約 8,700 の RNAi 系統のうち 360 系統をランダムに選び、“勝者”となる領域にそれぞれ発現させた結果、30 系統以上が細胞競合を抑制することが分かった (図 2B)。現在、単離・同定した遺伝子群の細胞競合における役割を、遺伝学的手法およびライブイメージングにて詳細に解析しているところである。

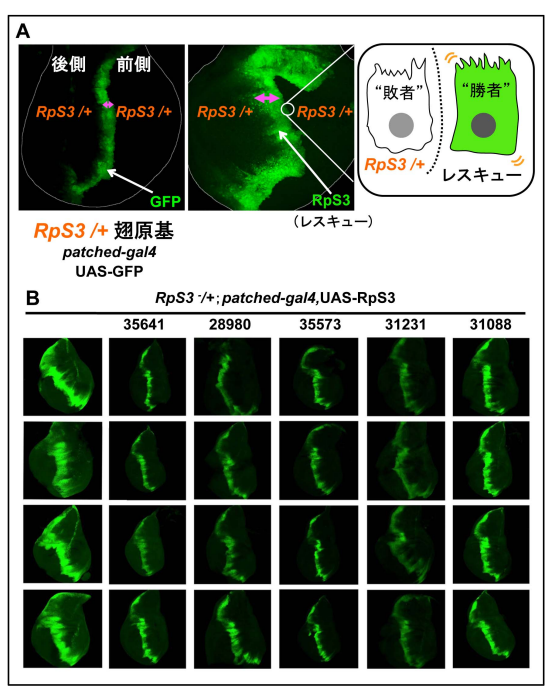


図2 Rps3/+翅原基とRNAiスクリーニングの結果

図2 細胞競合の“勝者”で機能する因子をターゲットとした新規細胞競合モデル系を用いたRNAiスクリーニング

(A) *Patched-gal4*系統を用い、*RpS3*ヘテロ変異体翅原基の前後軸の境界上に存在する細胞にのみ*RpS3*を戻してレスキューすると、これらの細胞群は細胞競合の“勝者”となり、周囲の細胞を駆逐してその領域を拡大する。(B) 360のショウジョウバエRNAi系統を用いて、RNAiをそれぞれ“勝者”の領域に発現させ、それにより細胞競合を抑制するものを同定するRNAiスクリーニングを行った。上記の写真は、細胞競合を抑制するRNAi系統として同定したものの一部の結果を示す。

## 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5件)

1. Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T: JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity. *Developmental Biology*, 査読有、403巻、2015年、162-171  
doi: 10.1016/j.ydbio.2015.05.001.

2. #Takino K, #Ohsawa S (# equal contribution), Igaki T: Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*. *Developmental Biology*, 査読有、395巻、2014年、19-28  
doi: 10.1016/j.ydbio.2014.09.003.

3. #Nakamura M, #Ohsawa S (# equal contribution), Igaki T: Mitochondrial defects trigger proliferation of neighboring cells via senescence-associated secretory phenotype in *Drosophila*. *Nature Communications*, 査読有、5巻、2014年、5264  
doi: 10.1038/ncomms6264.

4. Ohsawa S, Takemoto D, Igaki T: Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic cooperation. *J. Biochem.* (Review), 査読有、156巻、2014年、129-136  
doi: 10.1093/jb/mvu045.

5. Kunimasa K, Ohsawa S, Igaki T: Cell competition: the struggle for existence in multicellular communities, “*New Principles in Developmental Processes*” Springer, (Review), 査読無、2014年、27-40

[学会発表] (計25件)

1. Ohsawa S, Akai N, Igaki T: Ensuring robust control of organ size by "cell-turnover" in *Drosophila*, the CDB Symposium 2016 - Size in Development: Growth, Shape and Allometry - (ポスター発表)、2016年3月28日～3月30日、理研CDB (神戸)

2. 馬場 翔子、大澤 志津江、西川 星也、高松 敦子、井垣 達吏：遺伝学と理論的アプローチによる細胞競合機構の解析、細胞競合コロキウム (口頭発表)、2016年3月18日、北海道大学 (札幌)

3. 山本 真寿、大澤 志津江、國政 啓、井垣 達吏：細胞競合を駆動するリガンド受容体の同定とがん制御における役割、細胞競合コロキウム (口頭発表)、2016年3月18日、北海道大学 (札幌)

4. 飯田 千晶、大澤 志津江、山本 真寿、井垣 達吏：細胞競合と創傷治癒の共通原理の解明、細胞競合コロキウム (口頭発表)、2016年3月18日、北海道大学 (札幌)

5. 大澤 志津江：細胞間コミュニケーションを介した上皮の内在性がん抑制機構、平成27年度 文部科学省 新学術領域「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 (口頭発表；招待講演)、2016年2月8日、一橋講堂 学術総合センター (東京)

6. 乾 由希子、大澤 志津江、井垣 達吏：ロバストな発生現象を支える「細胞ターンオーバー」の遺伝学的解析、第88回日本生化学会 合同大会 (ポスター発表)、2015年12月3日、神戸ポートアイランド (神戸)

7. 大澤 志津江、赤井 菜々美、井垣 達吏：発生ロバストネスを支える細胞競合の分子機構、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会 合同大会 ワークショップ「細胞競合」 (口頭発表；招待講演)、2015年12月2日、神戸ポートアイランド (神戸)

8. 山本 真寿、大澤 志津江、國政 啓、井垣 達吏：細胞競合を介したがん抑制機構を駆動するリガンド受容体分子の同定、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会 合同大会 (口頭発表)、2015年12月2日、神戸ポートアイランド (神戸)

9. 飯田 千晶、大澤 志津江、山本 真寿、井垣 達吏：細胞競合と創傷治癒の共通原理の解明、第88回日本生化学会 合同大会 (ポスター発表)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド (神戸)

10. Baba S, Ohsawa S, Nishilawa S, Takamatsu A, Igaki T: Genetic and theoretical approaches for understanding cellular fitness in cell competition, 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会 合同大会 (ポスター発表)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド (神戸)

11. 叢 博杰、大澤 志津江、瀧野 恭子、井垣 達吏：エンドサイトーシス破綻が引き起こす細胞核の肥大化メカニズムとその腫瘍悪性化における役割、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会 合同大会 (ポスター発表)、2015年12月1日、神戸

ポートアイランド (神戸)

12. **大澤 志津江**: 上皮の恒常性維持を司る細胞競合の分子基盤、第 1006 回生物科学セミナー (招待講演)、2015 年 1 月 7 日、東京大学 (東京)

13. **Ohsawa S**, Akai N, Igaki T: Ensuring developmental robustness by “cell-turnover” in *Drosophila* epithelium, 48<sup>th</sup> Annual Meeting-Japan Society of Developmental Biologists (口頭発表)、2015 年 6 月 3 日、つくば国際会議場 (つくば)

14. 和田 弥生、**大澤 志津江**、井垣 達吏: Hippo 経路を介した発生ロバストネス制御機構の遺伝学的解析、48<sup>th</sup> Annual Meeting-Japan Society of Developmental Biologists (ポスター発表)、2015 年 6 月 2~5 日、つくば国際会議場 (つくば)

15. **Ohsawa S**, Kunimasa K, Yamamoto M, Igaki T: Cell competition that regulates epithelial homeostasis in *Drosophila*, MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics (招待講演)、2015 年 1 月 2 月 4 日、National University of Singapore (シンガポール)

16. Akai N, **Ohsawa S**, Igaki T: Tissue growth regulation by “cell turnover” in *Drosophila*, MBI-Japan Joint Symposium on Mechanobiology of Development and Multicellular Dynamics (口頭発表)、2015 年 1 月 2 月 4 日、National University of Singapore (シンガポール)

17. 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な腫瘍悪性化の遺伝学的解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 1 月 2 5 日、パシフィコ横浜 (横浜)

18. **大澤 志津江**: 細胞間コミュニケーションを介した上皮の恒常性維持 (招待講演)、南紀生物セミナー、2015 年 9 月 6 日、和歌山医科大学 (和歌山)

19. 中村 麻衣、**大澤 志津江**、井垣 達吏: 細胞老化による細胞死耐性獲得と細胞非自律的な腫瘍悪性化 (ポスター発表)、2014 年 7 月 1 8 日、東京医科歯科大学 (東京)

20. 瀧野 恭子、**大澤 志津江**、井垣 達吏: エンドサイトーシス制御破綻が引き起こすアポトーシス誘導性増殖の分子基盤 (ポスター発表)、2014 年 7 月 1 8 日、東京医科歯科大学 (東京)

21. **大澤 志津江**、國政 啓、井垣 達吏: 上皮

細胞競合を駆動する細胞認識機構の遺伝学的解析 (口頭発表)、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 1 2 日、奈良県新公会堂 (奈良)

22. 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な腫瘍悪性化の遺伝学的解析、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 1 2 日、奈良県新公会堂 (奈良)

23. 瀧野 恭子、**大澤 志津江**、井垣 達吏: エンドサイトーシス制御破綻が駆動する細胞非自律的な増殖制御機構、第 66 回日本細胞生物学会大会、2014 年 6 月 1 1 日、奈良県新公会堂 (奈良)

24. Takino K, **Ohsawa S**, Igaki T: Non-autonomous tissue growth by endocytic regulation of Eiger and Ras signaling, 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会 (口頭発表)、2015 年 6 月 4 日、金沢歌劇座 (石川)

25. Nakamura M, **Ohsawa S**, Igaki T: Non-cell autonomous tumor progression driven by cellular senescence, 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会 (口頭発表)、2015 年 6 月 6 日、金沢歌劇座 (石川)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

研究室ホームページ  
<https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
大澤 志津江 (OHSAWA, Shizue)  
京都大学・大学院生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 80515065

(2) 研究分担者  
該当なし

(3) 連携研究者  
該当なし