

令和元年6月17日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2018

課題番号：26713011

研究課題名(和文)未解明の細胞死様式である細胞脱落の分子機構の解明

研究課題名(英文)The molecular mechanisms of cell extrusion

研究代表者

川根 公樹(KAWANE, Kohki)

京都産業大学・総合生命科学部・准教授

研究者番号：60362589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞は組織から脱落してその生涯を閉じる。私たちは、この細胞脱落の分子機構を明らかにする目的で、哺乳類培養細胞とショウジョウバエの生体上皮を用いて解析を行い、以下の2つの新規現象を見出した。1. 上皮組織のバリア機能を維持したまま組織から細胞を効率よく脱落させるため、秩序だった細胞接着の動態変化がおこること 2. 脱落する細胞は、脱落を実行しながらその細胞側面を断片化し、これを隣接細胞が貪食すること。これらの2つの現象は、いずれも脱落細胞と隣接細胞の相互作用によるもので、本研究の成果は細胞社会における細胞死の理解に貢献する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮細胞の細胞終焉である細胞脱落は、腸管や気道などの上皮組織において恒常性の維持に重要な役割を果たしており、この機構の破綻は炎症や癌などの様々な疾患に関連すると考えられる。本研究は、細胞脱落において細胞同士が接着する状態の変化がおこること及び、脱落する細胞がその実行過程で細胞の一部を断片化し、その断片を隣接する健康な細胞が貪食することの、二つの新規プロセスを見出した。これらは、いずれも脱落細胞と隣接細胞の相互協調作用によって担われる細胞脱落の本質的過程であり、本研究成果は、様々な上皮疾患の理解に新たな側面から道を拓くことが期待される。

研究成果の概要(英文)：The end of cellular life of epithelial cells is extrusion from epithelium. We aimed to reveal the molecular mechanism of cell extrusion and found two novel processes. 1. The dynamics of cell adhesion assures the efficient cell extrusion with keeping barrier function of epithelium. 2. The fragmentation of extruding cells occur and the neighboring cells engulf the fragments. As these two processes are carried out by the interaction between extruding cells and the neighboring cells the insights of this study contributes the understanding of cell death in cellular society.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞死 細胞脱落 上皮 腸管 細胞接着

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞の終焉である脱落は、細胞が互いに接着した組織から効率よく細胞を除去するための洗練された能動機構である。脱落する細胞は、隣接細胞が生み出す力によって生きたまま押し出されて組織から除かれ、いわばこれは“他殺”の要素を持つ(図1)。またこの時、脱落細胞が占めていたスペースは隣接細胞によってシールされ、上皮のバリア機能が損なわれるのを防ぐ。すなわち脱落は、隣接細胞との相互、協調作用によって行われる“細胞社会における細胞死”であり、主に研究が進んできた浮遊細胞の細胞自律的な死と異なって分子機構の解明は遅れている。図1で示す多くの未解明の命題が存在し(図1, Question)、脱落開始過程において隣接細胞が脱落すべき細胞を感知する仕組みなどは特に大きな謎である。脱落は発生過程、組織のターンオーバーなど広い局面で観察される接着細胞の普遍的現象であり、脱落の異常は癌や炎症など種々の疾患と関連することが予想されている。例えば培養細胞を用いた実験で、癌細胞が、隣接正常細胞の作用により脱落を誘導されて死滅させられる現象(Hogan et al. Nat Cell Biol 2009)が報告された。また細胞密度の増加が脱落を誘導する要因となりえる(Eisenhoffer et al. Nature 2012)など、脱落が組織の細胞数を一定に保つ役割を担うことが強く示唆されている。しかしいずれのケースでも分子機構の解析は不十分であることに加え、脱落に関する知見は主に不死化細胞株を用いた解析から得られており、実際に生体内でおこる脱落の機構及び生体内での脱落の生理的意義の解明が急務となっている。

私達は細胞死におけるDNA分解の分子機構と生理作用を世界に先駆けて明らかにしてきた(Nagata et al. Cell 2010)。この過程で研究代表者は、貪食細胞内で働くDNA分解酵素DNaseIIの欠損マウスは、関節リウマチの疾患モデル動物として有用である(Kawane et al. Nature 2006)(Kawane et al. PNAS 2010)ばかりでなく、マクロファージでのDNA蓄積を指標として細胞死がおこる時期及び場所を同定できることを見出した。この解析で(Nagasaka et al. Cell Death Differ. 2010, 及び未発表)、ターンオーバーに伴って盛んに細胞が失われる腸上皮においてDNAの蓄積が観察されなかったことより、血球細胞の終焉が貪食細胞による貪食であるのに対し、この上皮細胞は貪食されることなく管腔へ脱落して終焉を迎えることがわかった。脱落はこれまで研究が進んできたアポトーシスやネクローシスとは異なる細胞終焉様式である点、隣接細胞との相互作用によっておこる点に着眼し、細胞脱落の研究に着手した。

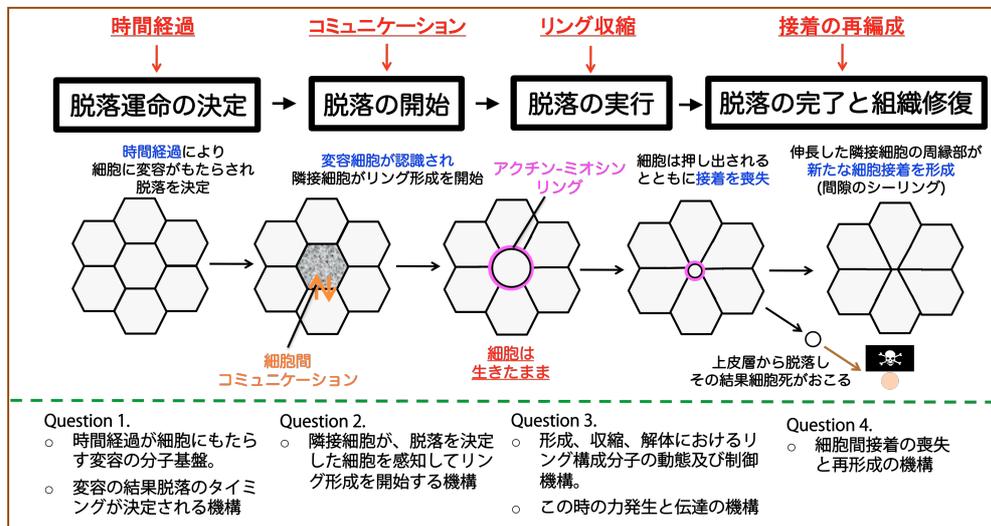


図1 細胞脱落

2. 研究の目的

これら背景を踏まえ、本研究ではショウジョウバエ及びマウスの生体内上皮または哺乳類培養細胞を用いて、生理的条件下のコンテキストのもと、種を超えて保存された細胞脱落の普遍的分子機構の解明を行う。得られた知見をもとに、種々の局面でおこる脱落の機構の多様性も理解に加えると共に、脱落の生理的意義及び疾患との関連を解明することを最終目標とする。

細胞脱落は一連の各過程によって起こる(図1)。本研究は、生理的な細胞脱落を対象に、各過程における未解決命題に着目して分子機構の解明を行う。(1) 時間経過が細胞にもたらす変容を明らかにすることで、寿命を迎えた細胞に何がおり、どのように脱落の運命(タイミング)が決定されるかを明らかにする(運命決定過程)。(2) 脱落運命の決定された細胞はどのように隣接細胞に感知され、続いて隣接細胞はどのようにリング形成を開始させるかを明らかにする(開始過程)。(3) リングがどのような動態変化をおこし力を発生して細胞を押し出すの

か、どのように新たな細胞接着が形成されて細胞脱落がもたらすギャップをシールするのかを明らかにする（実行、完了過程）。

### 3. 研究の方法

脱落の各過程を対象に三つの各戦略（手法）を用い、その分子機構を明らかにする。(1) 脱落の運命を決定する機構の解明では、オミクス解析を用いマウス腸上皮における若い細胞と脱落を迎える細胞との差異の分子実体を明らかにする。(2) 脱落の開始機構の解明では、RNAiスクリーニングをショウジョウバエ腸上皮で実施し、脱落を司る遺伝子を網羅的に同定する。(3) 脱落実行機構の解明では、哺乳類培養細胞やマウス腸オルガノイドを用い、実行過程に関わる可能性のある遺伝子のノックダウンの表現型やタンパク質の動態をライブイメージング解析する。一つの戦略で得られた知見をさらに他の手法を用いて解析を進めたり、他の戦略での解析対象遺伝子の選定に用いるなど三つの戦略を相補的かつフィードバック活用することで脱落の全容解明の効率化を狙う。

### 4. 研究成果

(1)哺乳類の小腸では細胞のターンオーバーが盛んに起こり、この時失われる古い細胞は絨毛の先端部から脱落する。そこでマウス小腸絨毛の基底、中間、頂端部からマイクロダイセクション法によってRNAを抽出し、マイクロレイ解析を行った。加えて私達は、細胞脱落が減少する培養細胞株を他の解析の過程で偶然樹立しており、これを用いてRNAseq解析を行った。これら遺伝子発現解析から、細胞脱落に関与する可能性のある遺伝子を各数十個抽出し、哺乳類培養細胞、ショウジョウバエの腸上皮、ショウジョウバエの蛹上皮などの様々な細胞脱落の解析系において、細胞脱落に関与するかの検証を開始したところである。

(2)ショウジョウバエ腸組織においてクローンを誘導する方法を用いる当初案のスクリーニング法にクローンの誘導率が低い問題点が見出されたため、代替法となる一次スクリーニング系を構築した。すなわち腸上皮細胞で誘導した各RNAiの効果数を細胞数や細胞の形態などの複数パラメーターで評価する方法で、期間内に1000遺伝子のスクリーニングを実施した。その結果、複数の細胞脱落に関与する遺伝子を同定したが、中でも細胞の貪食に関与する遺伝子が細胞脱落に重要であることがわかった。そこで細胞が脱落する際の膜動態に着目し、細胞膜を可視化したショウジョウバエ蛹上皮及び複数の哺乳類上皮培養細胞を用いてライブイメージング解析を行ったところ、隣接細胞において、小胞構造によって細胞膜が取り込まれることを見出した（図2）。細胞をそれぞれ異なる蛍光タンパク質で標識するモザイク実験により、

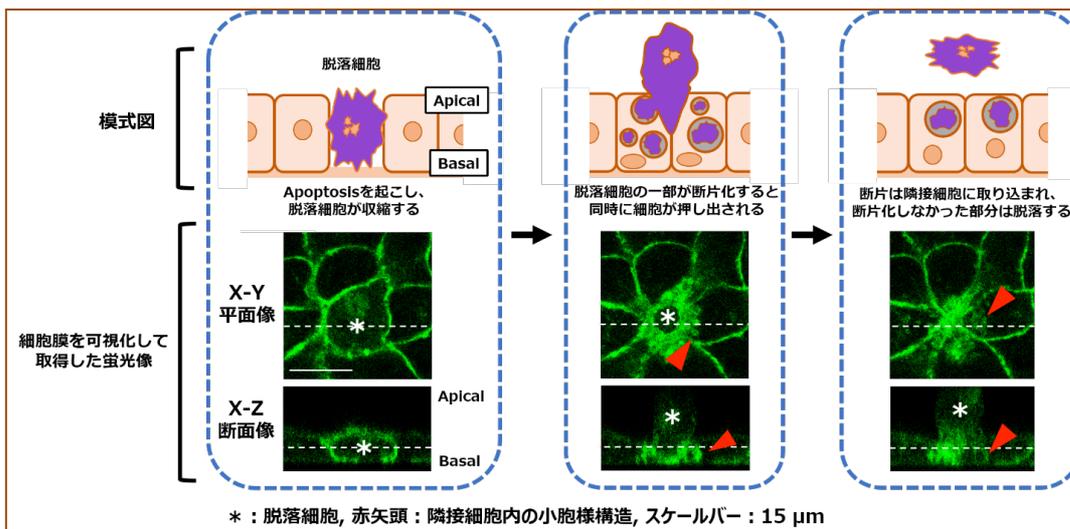


図2 細胞脱落における脱落細胞の断片化と隣接細胞による断片の貪食

この取り込みは単なるエンドサイトーシスではなく、隣接細胞の膜成分を小胞内に取り込んでいることが示された。よって、脱落細胞は脱落実行過程において、細胞の一部で断片化をおこし、その断片は隣接細胞に貪食されることがわかった。例えば、哺乳類小腸において絨毛先端から脱落する細胞は、管腔へ剥離して貪食されることはないと考えられていたが、細胞脱落においても貪食のステップが存在することが分かった。さらにこの断片化と貪食は、脱落細胞が組織から突出するタイミングと同時におこることから、脱落の実行

に重要な役割を果たしている可能性が考えられた。この知見は、報告されている、アクトミオシンなどの細胞骨格の再編成だけでなく、脱落細胞の断片化と食食が、脱落の実行を駆動している可能性を提示するものである。

(3) 私たちは上皮細胞の社会性を司る重要な要素である細胞接着に着目した。『細胞間接着を消失しなければ細胞は脱落できないが、接着の消失は上皮バリアを損なう恐れがある』という問題に着眼し、マウス上皮培養細胞に接着分子と蛍光タンパク質の融合タンパク質を発現させ、物理的接着を担うアドヘレンスジャンクション (AJ) と上皮のバリア機能を担うタイトジャンクション (TJ) の接着分子の動態のイメージング解析を行った (図3)。当初は培養組織オルガノイドを実験系に用いることを検討していたが、オルガノイドの立体構造及び組織の厚みがイメージングにおいて障壁となり、まずは上皮培養細胞を用いて解析する方針に転換した。その結果、まず脱落細胞と隣接細胞の間のAJが消失し、続いて脱落細胞の底面側に侵入した隣接細胞同士で新たなAJとTJが形成され、最後に脱落細胞と隣接細胞の間に存在していたTJが消失して脱落が完了することがわかった。この機構は、バリアを維持したまま細胞を組織から効率よく除くことを可能にしていると考えられる。またデスモソームについても解析を行ったところ、デスモソームはAJの消失よりも早い段階で消失することがわかった。各接着分子ごとに、消失の段階が異なることが明らかとなったことを踏まえ、続いて、接着分子の動態の制御機構について解析を進め、カベオリン依存のエンドサイトーシスが接着分子の取り込みに関与することを強く示唆する結果を得た。

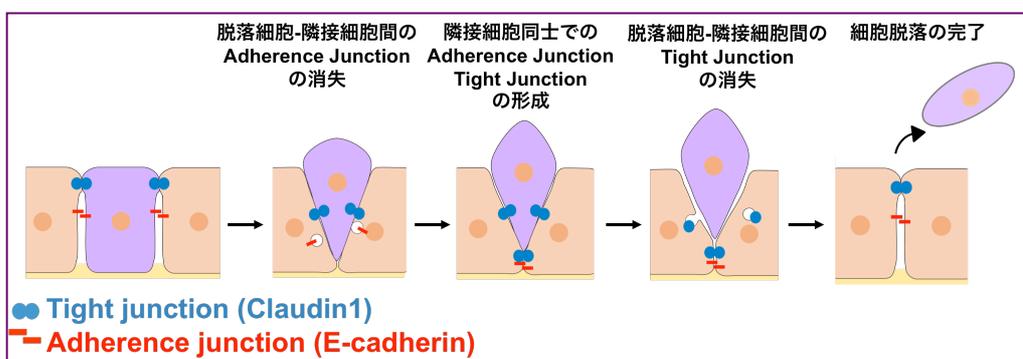


図3 細胞脱落における細胞接着の動態

(総括)

私たちは、本研究において、遺伝子発現解析、遺伝学スクリーニング、イメージング解析など複数の手法と複数の動物種に由来する細胞脱落の解析系を用いて解析を行い、上皮の恒常性を維持しつつ細胞を組織から効率よく除くことを可能にする細胞接着の動態及び、脱落する細胞は、脱落を実行しながらその細胞側面を断片化し、これを隣接細胞が食食する現象の、細胞脱落の実行における二つの重要な新規過程を見出した。これらの二つのプロセスは、いずれも脱落細胞と隣接細胞の相互作用によるものである。この脱落細胞と隣接細胞の相互協調作用は細胞脱落の本質と位置づけることができるため、今後も本研究を継続、推進し、これらを司る分子機構と意義を明らかにすることは、細胞脱落の本質的理解に直結する。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Horiguchi H, Endo M, Kawane K, Kadomatsu T, Terada K, Morinaga J, Araki K, Miyata K, Oike Y: ANGPTL2 expression in the intestinal stem cell niche controls epithelial regeneration and homeostasis. EMBO J. 36: 409-424, 2017 (査読有り)
2. Chan MP, Onji M, Fukui R, Kawane K, Shibata T, Saitoh S, Ohto U, Shimizu T, Barber GN, Miyake K: DNase II dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9 degradation. Nat Commun. 6: 5853, 2015 (査読有り)
3. Kawane K, Nagata S: DNA degradation and its defects. Cold Spring Harb Perspect Biol. 6: pii: a016394, 2014 (査読有り)

〔学会発表〕（計 6 件）

1. 服部和泉, 中井彩香, 山田信人, 梶田春奈, 村田真智子, 川根公樹: 「上皮細胞の細胞脱落における細胞接着分子の動態解析」 2018年度日本分子生物学会年会, 2018年
2. 川根公樹: 「細胞社会の中で上皮細胞はいかにして生涯を閉じるのか? -他者(他細胞)との相互協調作用によって実行される細胞死(細胞脱落)の研究-」 第9回ELBION技術研究会, 2017年
3. 中井彩香, 山田信人, 早矢仕健留, 川根公樹: 「細胞脱落時における上皮バリア維持機構の解析」 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 2017年
4. 中井彩香, 山田信人, 早矢仕健留, 川根公樹: 「細胞脱落時における上皮バリア機構の解析」 日本Cell Death学会, 2017年
5. 川根公樹: 「Cell Death in Cellular Society」 熊本大学リエゾンラボ研究会・HIGOプログラム最先端研究セミナー, 2015年
6. 川根公樹: 「細胞社会における細胞死. -細胞死に伴うDNA分解と上皮細胞の細胞終焉である細胞脱落-」 大阪大学微生物病研究所第23回ブリッジセミナー, 2015年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。