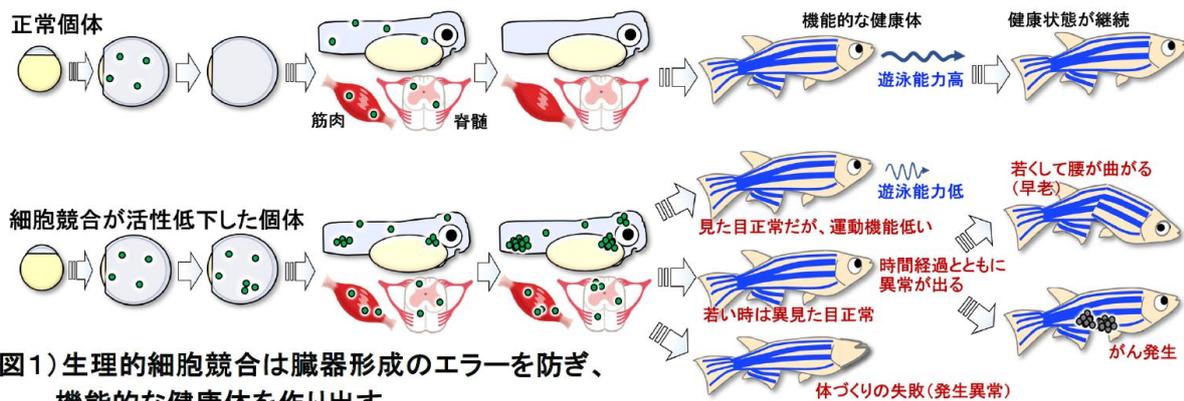


細胞競合を介した組織の恒常性維持機構の解明

大阪大学 微生物病研究所 生体統御分野
穂枝 佑紀（あきえだ ゆうき）

研究成果のグラフィカルアブストラクト



研究背景

動物のからだづくりのプロセスはエラーが起こる：

ヒトを含む動物のからだは、たった一つの受精卵が分裂増殖することで作り上げられた細胞が、特定の機能を獲得（分化）し、特定の位置に配置されることで作り上げられる。こうした細胞の増殖・分化・配置は、ゲノム・エピゲノムにプログラムされた設計図に基づいて作り上げられる。近年の研究により、からだづくりの過程で、設計図通りに動作できない不良細胞や細胞機能に異常が生じた病的細胞がしばしば生じることが明らかになりつつある。例えば、我々は、ゼブラフィッシュ胚において Wnt シグナル（特定の細胞の数と配置を規定する信号）を正常に動作できない細胞が頻繁に生じることを報告した（Akieda et al., Nature Commun 2019）。また、マウス胚において多能性（からだを構成する多様な細胞を作り出す能力）が低い細胞やミトコンドリアに異常が生じた細胞が出現すること（Hashimoto & Sasaki Dev Cell 2019; Lima et al. Nature Metabolism 2021）が報告された。さらに、ヒト着床前胚の 73%、野生型マウス着床前胚の 25%において異数性細胞（染色体数が異常な細胞）が生じているという報告もある（van Echten-Arends et al. HumReprod Update 2011; Lightfoot et al., Dev Biol 2006）。この事実は、動物のからだづくりの正確性が意外にも高くなく、エラーが起きることを意味する。ところが、興味深いことに、動物胚はこのようなエラーを繰り返すにも関わらず、最終的に健康で機能的なからだを作り上げることができる。しかしながら、どのようにしてこのようなエラーを乗り越えるのかは、よくわかっていなかった。

細胞競合が胚のエラーを取り除く：

細胞競合は、「同種の細胞集団内に生じた“異質な細胞”が隣接細胞との相互作用を介して選択的に排除される現象」である。この現象は、ショウジョウバエの上皮組織に人為的に誘導したリボソーム遺伝子異常細胞が正常細胞とのコミュニケーションを経て排除される現象として、約 50 年前に発見された（Morata & Ripoll, Dev Biol 1975）。その後、哺乳類においても同様の現象が起こることがわかり、ショウジョウバエや哺乳類培養細胞を用いたメカニズム解明が進められてきた。また、発がんシグナル（がんの発生を誘導する信号）が活性化した細胞が細胞競合によって排除されることもわかり、細胞競合は新たながん抑制機構ではないか、と、期待されるようになった。

しかしながら、細胞競合が脊椎動物のからだの中でどんな役割（生理的機能）を果たしているのかは、全く不明なままであった。そのため、

「細胞競合はあくまで人為的に異常な細胞を細胞集団に導入したときに見られる人工的な生命現象であり、実際の動物のからだの中では生理的な機能を持たないのではないか」、「生き物の中で自然に起こる細胞競合をとらえなければ意味がない」という批判的な意見もあった。

そのような中、我々は5年前に、ライブイメージングに適したモデル脊椎動物であるゼブラフィッシュをモデルとした解析により、胚において自然発生した不良細胞が「細胞競合」を介して排除されることを世界に先駆けて発見した。具体的には、ゼブラフィッシュ胚においてプログラムから外れた異常な Wnt シグナル活性を持つ不良細胞が生じると、不良細胞の Wnt シグナル異常が細胞膜上のカドヘリンタンパク質の量的異常に変換されることで隣接正常細胞が不良細胞の出現を感知し、細胞死を誘導することを明らかにしました（図2； Akieda et al, Nature Commun 2019; Aoki et al, Science Adv 2024）。

また、同時期に本研究成果の共同研究者でもある大阪大学の佐々木 洋教授らによって、マウス胚に生じた多能性が低い細胞も隣接細胞との細胞競合によって胚から排除されることが報告され（Hashimoto & Sasaki Dev Cell, 2019）、さらにイギリスの研究チームによって、マウス胚に生じたミトコンドリア異常細胞も正常細胞との細胞競合によって排除されることが示されました（Lima et al. Nature Metabolism 2021）。つまり、これらの発見により、動物胚がエラーを克服する仕組みの一端が明らかになっただけでなく、細胞競合の生理的機能も初めて明らかになった。

研究の目的：しかし、臓器の構築などの動物のからだづくりの後期プロセスにおいても細胞競合がエラー修復を担っているのかは全く不明である。例えば、運動能力を持った動物個体を作り上げるためには、正しい位置に一定数の筋肉細胞を作り、さらにそれらを制御する運動神経細胞やそれとネットワークを作る介在神経細胞も適切な位置に配置する必要がある。こうした臓器構築における精緻な細胞数の制御、細胞配置の実現に細胞競合が貢献しているかは不明である。また、細胞競合は生体内で突発的かつ不規則に生じる不良細胞と隣接細胞のコミュニケーションであり、このことが生理的な細胞競合の理解を阻んできた。今後、生体内における細胞競合の機能を理解していくためには、脊椎動物体内で起こる生理的細胞競合を捕捉するためのマーカー分子が有効なツールになるのは間違いないが、そのようなマーカー分子はこれまでに見つかっていなかった。とはいえ、細胞競合は多様な異常性（Wnt シグナル異常、多能性低下、ミトコンドリア機能異常、リボソーム遺伝子異常、発がんシグナル活性化など）によって起動されるため、それを感知・排除するメカニズムも多様であり、全ての細胞競合を捕捉できるような分子を見つけることは不可能に近い、とも考えられてきた。本研究では、これらの課題に取り組み、生体内における細胞競合の解明を目指す。

研究の目的：

本研究の内容と成果
発見 1) 細胞競合は運動機能の発達に必須である：
我々は、5年前に報告した研究では、胚において特定の細胞の数と配置を規定する Wnt シグナルに注目し、その活動にエラーが生じた細胞が細胞競合により排除されることを示した（図2； Akieda et

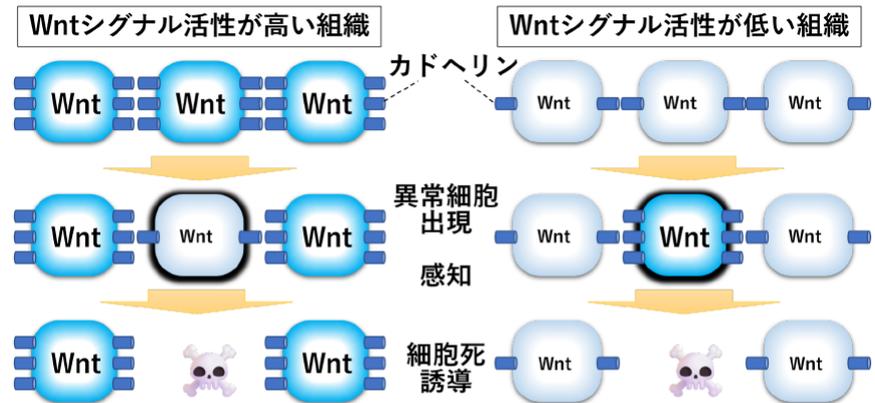


図2) Wnt シグナル以上細胞の細胞競合を介した感知・排除

Wnt シグナル活性が高い細胞は細胞膜上のカドヘリン量が多く、活性が低い細胞ではカドヘリン量が少ない。突発的に生じた Wnt シグナル異常細胞では膜カドヘリン量が変化し、結果、隣接正常細胞群に感知され細胞死が誘導される

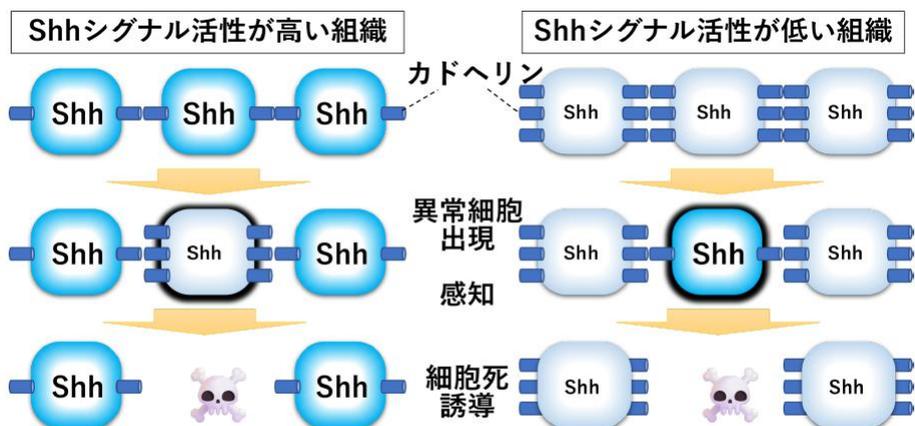


図3) Shh シグナル異常細胞の細胞競合を介した感知・削除

al., Nature Commun 2019)。そこで、今回の研究では、筋肉と脊髄の形成過程において細胞の数と配置を規定する Shh シグナルに注目した。Shh シグナルは、形成過程の脊髄においては、その入力強度に応じて異なるタイプの運動神経細胞と介在神経細胞を作り出す。また、魚類の筋肉においては、強い Shh シグナルが入力されると遅筋細胞が形成され、Shh シグナルの入力が弱いと速筋細胞が誘導される。つまり、適切な位置で適切な強度で Shh シグナルが活動することにより機能的な脊髄と筋肉が形成される。まず、Shh シグナルの活動をゼブラフィッシュにおいて可視化した。その結果、筋肉と脊髄の形成過程において本来 Shh シグナルの活性が低く抑えられるべき領域で Shh シグナルが異常に活性化した細胞が生じたり、逆に Shh シグナルが強く活性化される領域で Shh シグナルが活性化しない細胞が生じてしまうこと（筋肉と脊髄を作る細胞集団がしょっちゅうしくじりをしでかすこと）がわかってきた。（図3中段また、メカニズム解析の結果、Wnt シグナル異常細胞のケースと似ているが、少し異なる機構によって Shh シグナル異常細胞が排除されることがわかってきた。まず、Shh シグナルがその強度に応じて細胞膜のカドヘリン量を減らすため（Wnt シグナルはカドヘリン量を増やす）、結果として、Shh シグナル活性が高い領域では細胞膜上のカドヘリン量が少なく、活性が低い領域ではカドヘリン量が多くなることがわかった（図3上段）。その結果、突発的に生じた Shh シグナル異常細胞ではカドヘリン量に変化し（図3中段）、この変化を隣接正常細胞が感知し、異常細胞を殺す（図3下段）ことを発見した。また、筋肉や脊髄が形成される時期に細胞競合を強制的に抑制すると、脊髄内において運動神経細胞や介在神経細胞が間違った場所に配置され、筋肉においても速筋・遅筋細胞の配置が乱れ、その後、成長した稚魚における遊泳能力が低下した（図1）。すなわち、**生理的な細胞競合が速筋・遅筋細胞や脊髄内の神経細胞の正確な配置、運動機能の発達に必須である**ことが明らかになった（図1）。

発見2) Foxo3 は細胞競合の共通制御因子である：

続いて、Wnt シグナル異常細胞と Shh シグナル異常細胞の排除メカニズムの共通機構を探った。共通機構がわかれば、マーカーの発見につながると期待したためである。その結果、いずれの異常細胞の排除においても、カドヘリン量変化の下流で異常細胞内の転写因子 Smad と転写因子 Foxo3 が活性化し、Smad と Foxo3 が協調して更なる Foxo3 遺伝子の発現増加を促し、その結果として活性酸素 ROS の誘導と細胞死抑制因子 Bcl2 の減少が起こることで異常細胞がアポトーシスを起こすことがわかってきた。また、**Foxo3 の活性化は異常細胞の排除に必須**であり、Foxo3 を機能阻害したゼブラフィッシュでは、胚や筋肉・脊髄において自然発生して生じた Wnt シグナル異常細胞や Shh シグナル異常細胞が蓄積し、細胞配置が乱れた。こうした胚と臓器における細胞配置異常の結果として、稚魚に成長後、一部の Foxo3 抑制個体は発生異常（目が欠損したり尻尾が曲がったり体長が短かったり）を示し、また別の Foxo3 抑制個体は、見た目正常にも関わらず遊泳能力が低かったり、時間の経過とともに腰が曲がったり腫瘍ができたりなど早老様の異常を示した（図1）。これは、体内に生じた不良細胞・病的細胞が時間の経過とともに増加したり病的効果を発揮したりしたことによって生じたと考えられる。

発見3) Foxo3 は細胞競合の共通マーカーである：

Foxo3 は、自然発生した Wnt シグナル異常細胞ならびに Shh シグナル異常細胞において強く発現していました。この発見を受け、Foxo3 が細胞競合の共通マーカーになる可能性を期待し、その可能性を検討した。その結果、ゼブラフィッシュに生じた Wnt/Shh シグナル異常細胞のみならず、リボソーム遺伝子異常細胞や発がんシグナル活性化細胞など細胞競合において排除される不良細胞・病的細胞においてそれらが排除される前に Foxo3 が発現誘導されることを見出した。また、大阪大学の佐々木教授との共同研究により、マウス胚においても、細胞競合で排除される多能性低下細胞やミトコンドリア機能異常細胞で Foxo3 の発現上昇が確認された。これらの事実は、**Foxo3 が哺乳類や魚類を含む脊椎動物において共通して使える細胞競合マーカーであることを示唆する**。そこで、Foxo3 の発現を高感度に検出できる組換えゼブラフィッシュを作製し、発生プロセスにおける Foxo3 の発現動態を観察したところ、胚や筋肉・脊髄においてランダムに Foxo3 発現細胞が出現し、アポトーシスを起こして消えていく様子を捉えることができた。この事実は、今まで、いつどこで起こるかさっぱりわからなかった細胞競合の活動を Foxo3 の発現を指標に捕捉できる可能性を示している。

本研究の意義と発展性

細胞競合を生理的なエラー修復機構として再定義：

上述のように、つい最近まで、細胞競合は人工的にしか観察できておらず、細胞競合が生理的環境で機能する生命現象なのかさえも不明でした。そのような中、世界に先駆けて脊椎動物胚における生理的細胞競合（自然発生した Wnt シグナル異常細胞の排除）の捕捉に成功したが（Akieda et al, Nature Commun 2019）、胚以外でも生理的細胞競合が起こるのかや、その競合がどのような生理的意味をもつのかは理解がほとんど進んでいなかった。今回の研究により、形成過程の脊髄や筋肉で生じるエラーの修復に生理的細胞競合が起こることを示した。また、生理的細胞競合が運動器形成や運動機能発達、病気になりにくいからだの構築に必須であることが明らかになったことで、**細胞競合が生理的に機能するエラー修復機構であることを明確に定義**できた。生理的に重要な生命現象であることが明確になったことで、今後、多くの研究者が細胞競合に興

味を持ち、この分野が一層盛り上がる事が期待される。

不良細胞発生と細胞競合の動態把握、細胞競合の未知機能探索が可能に：

不良細胞は不規則に生じるため、結果として、それが生体内のどこにいつ生じるのか、そしてそれが駆動する細胞競合がいつどこで起こるのかは、これまでは捕捉困難でした。しかし、今回の研究で細胞競合の共通マーカー（細胞競合によって排除される不良細胞・病的細胞で共通して発現する因子）として Foxo3 を発見したことにより、脊椎動物における生理的細胞競合の研究が一気に前に進める道が拓けた。マーカーを利用することで、動物の発生、成長、恒常性維持、老化の一生涯のプロセスにおいて、いつ、どこで細胞競合が起こるのかを探ることができる。また、どのような異常が細胞競合を起動するのか、細胞競合がどのような異常を排除することで正常な個体構築や維持、病気の抑制を支えているのかも調べることができる。Foxo3 は魚とマウス双方の細胞競合を捕捉できるため、おそらくヒトを含むその他の動物でもマーカーとして使用できる可能性が高いと考えている。加えて、本研究では、Foxo3 以外にも細胞競合マーカー候補を複数見つけており、これらを同時に利用することでより正確に細胞競合の動態を探ることができる。

近年、アルツハイマー病や、てんかん、自閉症、糖尿病などの多様な疾患が、胚発生期に生じた変異細胞が生存・増殖して体細胞モザイクを形成することで引き起こされることが明らかになりつつあります (Beck et al., HumMol Genet 2004; Bonnefond et al., Nature Genet 2013; Wei et al., Genet Med 2019 など)。この事実は、これらの変異細胞が細胞競合によって排除されずに生存・増殖した可能性を示す。しかし、細胞競合の破綻の結果として変異細胞が生じたのか、あるいは変異細胞が細胞競合に耐性を持っているのかは不明である。今後、胚発生時に生じた変異細胞に起因する多様な疾患の発症と細胞競合の関連を、マーカーを利用して調べることで、疾患発症の新しい原理が理解できるようになると期待できる。

また、今回の研究により、細胞競合の活性が個体差に関連する可能性も見えてきた。不良細胞は、不規則に生じるため、細胞競合を抑制した個体は、個体ごとに異なる時期から異なる部位に異なるタイプの不良細胞が蓄積し、それを内包しつつ成長する。結果として、細胞競合抑制個体は、個体ごとに異なったバリエーション豊かな異常、機能低下の表現型を示す。例えば、体長が短い個体、運動能力が低い個体、若齢の時は外見正常なのに加齢に伴って形態に異常が生じる個体など、個体ごとに多種多様な表現型を示す。関連し、Foxo3 遺伝子がヒトの多様な個人差に関連する可能性が示唆されている。具体的には、Foxo3 の遺伝子配列の違い（遺伝子多型）が、身長差 (Yengo et al., Nature 2022)、知能の差 (Sniekers et al., Nature Genet 2017)、寿命の長さ (Deelen et al., Nature Commun 2019) など多様な個体差と関連することがわかってきた。動物の一生涯における細胞競合の機能を調べていくことで、こうした個体差が生じるメカニズムの理解にも繋げていけるかもしれない。

がんの抑制メカニズムとして：

ヒトの成体において生じた Shh シグナル異常活性化細胞は、基底細胞癌や髄芽腫、膠芽腫など、様々ながんの原因となることがよく知られている (Villavicencio et al., AJHG 2000 など)。今回の研究により、動物組織が Shh シグナルに異常を持つ細胞を免疫細胞に頼らずに細胞競合により排除できることが明らかになった。したがって、同様のメカニズムがヒト成体でも機能し、がんの発生を未然に防いでいる可能性が期待できる。興味深いことに、Shh シグナル異常細胞の排除に関わる Smad (Smad2/3/4) と Foxo3 はいずれも「がん抑制遺伝子（機能低下するとがん発症が促される遺伝子）」として知られている。Smad と Foxo3 の機能低下は Shh シグナル異常細胞の生存を促すことから、細胞競合による Shh 異常細胞（前がん細胞）排除が Smad と Foxo3 のがん抑制機能の一つと考えることもできる。このように、今回発見した現象を起点に、新たながん抑制メカニズムの理解にも繋げていける可能性が大いにある。

成果論文

1. Kanako Matsumoto*, Yuki Akieda*, Yukinari Haraoka, Naoki Hirono, Hiroshi Sasaki, Tohru Ishitani[§]. Foxo3-mediated physiological cell competition ensures robust tissue patterning throughout vertebrate development. *Nature Communications*, 15, 10662 (2024) (* equally contribution, § corresponding author)
2. Kana Aoki, Taiki Higuchi, Yuki Akieda, Kotone Matsubara, Yasuyuki Ohkawa, Tohru Ishitani[§]. Mechano-gradients drive morphogen-noise correction to ensure robust patterning. *Science Advances*, 10, eadp2357 (2024).