

# ショウジョウバエモデルを用いた非遺伝的腫瘍悪性化機構の解析

神戸大学大学院 医学研究科 細胞生物学 G-COE

井垣 達吏

## 1. 目的および方法

本研究は、ショウジョウバエ腫瘍悪性化モデルと遺伝的モザイククローン解析技術を駆使することにより、これまで不明な点が多かった「non-genetic(非遺伝的)」な腫瘍悪性化機構の解明に迫るものである。

腫瘍の悪性化は、単一あるいはごく少数の細胞が多段階的にがん原性変異（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る（“遺伝的”な腫瘍悪性化）。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促進様式をとる場合、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。しかしながら、様々な癌組織ではその遺伝的背景は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（がん原性細胞クローン同士、あるいはがん原性細胞クローンと周囲の正常細胞群との間）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。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では、上皮細胞と間質細胞との間の相互作用がその進行に大きく寄与していると考えられている。また、組織中のがんの多発“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癌において知られており、その形成には細胞間相互作用を介した非遺伝的要因が深く関与していると考えられている。すなわち、細胞間相互作用を介した非遺伝的かつ細胞非自律的な腫瘍悪性化機構は、癌発生初期における選択圧の克服やその後の悪性化に重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、その分子機構はこれまでほとんど不明である。その理由として、このような細胞間相互作用を介した腫瘍悪性化機構を個体レベルでシステマティックに解析するモデル系が存在しなかったことが挙げられる。我々はこれまでに、これらの問題点を克服しうる新規ショウジョウバエ腫瘍悪性化モデルを構築してきた(Xu, Pagliarini, and [Igaki](#); 国際特許(2005)および米国特許(2006))。このモデル系では、がん遺伝子 Ras の活性化 (RasV12) により上皮組織に良性腫瘍細胞クローンを誘導し、この良性腫瘍にさらなる突然変異を導入することで浸潤・転移能を誘発してその悪性化機構を解析することを実現する ([Igaki et al., Curr. Biol., 2006](#))。さらに、遺伝的モザイク法により腫瘍細胞クローンを取り巻く正常上皮細胞に対して様々な遺伝的操作を加えることで、腫瘍悪性化における細胞間相互作用の役割とその分子機構を解析することを可能にする ([Igaki et al., Dev Cell, 2009](#))。このショウジョウバエ腫瘍悪性化モデルを用い、RasV12 誘導性の良性腫瘍にさらなる突然変異を無作為に導入するパイロットスクリーニングを行った結果、興味深いことに、突然変異の導入により Ras 活性化細胞自身ではなくその周辺の正常細胞に対して強く増殖促進を引き起こす変異体が一定の割合で出現することを見出した。これは、第2の突然変異が Ras シグナルと協調することで“細胞非自律的”な細胞増殖促進能という新たな形質を生み出した結果であり、

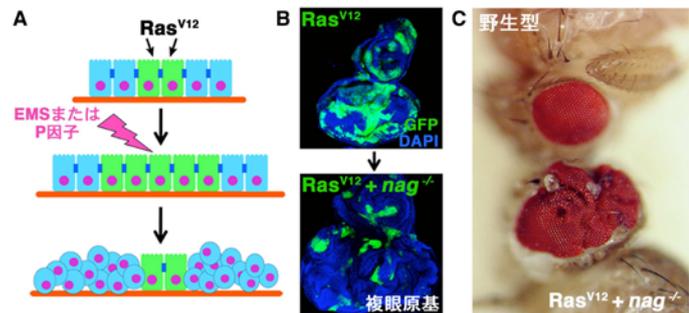
上皮の細胞間相互作用を介した“非遺伝的”ながん原性変化を再現したものであると考えられた。そこで本研究では、この新規遺伝学スクリーニングを大規模に展開し、“非遺伝的”ながん原性因子を誘発する因子の同定し、さらにモザイククローン解析により非遺伝的な腫瘍悪性化機構の解明を目指した。

## 2. 研究成果

本研究では、まず遺伝的モザイクスクリーニングを行い、ショウジョウバエ上皮組織に誘導した Ras 誘導性の良性腫瘍が細胞非自律的に周囲の正常細胞の増殖を促進するようになる突然変異体を単離した (図 1)。スクリーニングは以下の要領で行った。まず、体細胞組換えの原理を利用した遺伝的モザイククローン法を用いて、ショウジョウバエ 3 齢幼虫の複眼原基の上皮組織に GFP で標識した活性化型 Ras (RasV12) 発現細胞クローンを誘導した。RasV12 発現クローンは過剰に増殖して組織に腫瘍を形成するが、これらの腫瘍細胞は浸潤・転移能を示さない (RasV12 良性腫瘍)。また、周囲の正常細胞の増殖に対しても影響を及ぼさない。これらの RasV12 発現細胞に第二の突然変異 (EMS 処理または P 因子挿入により誘導) をホモ接合となるように導入し、RasV12 クローン自身ではなくその周囲の細胞に対して増殖促進効果を示す変異体 (*nag* (*non-cell autonomous growth*) 変異体と呼ぶ) をスクリーニングした。パイロットスクリーニングとの合計で、2077 系統の EMS 処理変異系統の中から 44

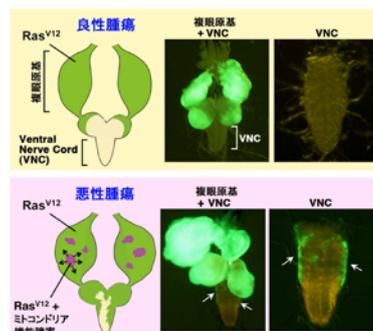
系統の *nag* 変異体、および 983 系統の P 因子挿入変異系統の中から 47 系統の *nag* 変異体を単離した。これらの *nag* 変異体の責任遺伝子の同定を試みた結果、興味深いことに、P 因子挿入変異をもつ 47 系統の *nag* 変異体のうち 10 系統がミトコンドリア機能に必須の役割をもつ遺伝子群に変異をもつことが明らかとなった。このことは、Ras シグナルとミトコンドリア機能障害とが協調することで周辺の上皮細胞のがん原性変化を誘発する可能性を示唆するものであった。そこで、これらのがん原性変化をヒトのがん組織の状況を模倣した系において解析した。すなわち、Ras 活性化変異を持つ細胞クローンの中の一部の細胞群がミトコンドリアの機能障害を引き起こした状況を遺伝的モザイククローン法により再現することで、腫瘍悪性化過程

図1 “細胞非自律的”な増殖促進を引き起こす突然変異のスクリーニング



(A)スクリーニングの概要。RasV12発現クローンにEMSあるいはP因子挿入より突然変異を導入し、それらクローン自身ではなく周辺細胞の増殖を強く促す変異体 (*nag* 変異体) をスクリーニングする。(B)GFPで標識したRasV12クローン (上段) およびこれに*nag*変異を導入したクローン (下段) を複眼原基に誘導した。*nag*変異をもつRasV12発現クローンは周辺の正常上皮細胞の増殖を強く促進する。(C)RasV12+*nag*<sup>-/-</sup>クローンをもった成虫の複眼は肥大し、表面が波打った上皮の過剰増殖の典型的な表現型を示す。

図2 Rasシグナルとミトコンドリア機能障害の協調による“非遺伝的”腫瘍悪性化



RasV12を組織全体に発現させた複眼原基は過剰に増殖するが、隣接する中枢神経系 (Ventral Nerve Cord; VNC) や遠隔器官には浸潤・転移しない (上段)。この組織にRasV12+ミトコンドリア機能障害を持つ細胞クローンをパッチ状に誘発すると、周辺のRasV12発現細胞が浸潤・転移能を獲得する“非遺伝的”腫瘍悪性化が引き起こされた (下段)。

におけるミトコンドリア機能障害の意義を検討した。その結果、ミトコンドリア機能障害をもつ Ras 活性化細胞は、その周辺の Ras 活性化細胞の増殖を促すだけでなく、それらの良性腫瘍を“非遺伝的”に悪性化（基底膜の破壊とそれに伴う他器官への浸潤・転移）することが分かった。

### 3. 考察

本研究により、Ras シグナルとミトコンドリアの機能障害とが協調することでその周辺細胞のがん原性変化が誘発される可能性が示唆された。興味深いことに、ヒトのがんにおいてミトコンドリア DNA（全ての遺伝子が呼吸鎖複合体コンポーネント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）の体細胞突然変異が高頻度に認められることが知られている（He *et al.*, *Nature*, 2010; Ishikawa *et al.*, *Science*, 2008; Dliiss *et al.*, *Science*, 2000 など）。また、多数のミトコンドリア DNA 変異が認められている膵臓がんは、その 90%が Ras 遺伝子の変異を持つことが分かっている。すなわち、このようながんでは Ras シグナルの活性化とミトコンドリア機能障害が同時に起こっていると考えられる。しかしながら、腫瘍悪性化におけるミトコンドリア DNA の変異の意義はいまだ不明な点が多い。本研究において単離されたミトコンドリア機能障害をもたらす *nag* 変異による“非遺伝的”腫瘍悪性化は、まさにヒトのがんの進行を模倣するものであるといえる。今後は、いかにしてミトコンドリア機能障害が Ras と協調して周辺細胞の増殖や浸潤・転移を促すのか、その詳細な分子機構を解析していきたい。

### 4. 発表論文

**Igaki T**, Kanda H, Okano H, Xu T, Miura M

“Eiger and Wengen: The *Drosophila* Orthologs of TNF/TNFR”

*Adv. Exp. Med. Biol.* 691, 45-50 (2011)

Ohsawa S, Hamada S, Kuida K, Yoshida H, **Igaki T**, Miura M

“Maturation of the olfactory sensory neurons by Apaf-1/caspase-9-mediated caspase activity”

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 13366-13371 (2010)

井垣達吏

「TNF-JNK 経路による上皮の内在性がん抑制システム」

生化学 82 (9) 837-341 (2010) (社) 日本生化学会

大澤志津江、井垣達吏

「状況依存的細胞死シグナル制御による上皮のがん抑制」

実験医学増刊 28 129-134 (2010) 羊土社