

細胞競合による代謝を介した組織恒常性と癌の制御機構

早稲田大学院 先進理工学研究科 生命医科学専攻
分子生化学研究室
松田 七美

1. 背景と目的

本研究では、多細胞生物における組織の動的恒常性に関わる細胞間相互作用として、発生、再生、発がんなどの過程に深く関与すると考えられる普遍的な生命現象である、細胞競合に着目する。細胞競合とは、多細胞生物の器官・組織において、増殖が速く生存能の高い細胞群（勝ち組）と、増殖が遅く細胞死によって排除される細胞群（負け組）とが細胞非自律的に相互作用することで競合し、細胞の増殖、細胞死、周期、分化が統合的に制御されることで、その恒常性（大きさ、機能など）が維持される現象である。これまでに細胞競合制御因子として、がん遺伝子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)。

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、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が互いを認識し、細胞非自律的に細胞特性を決定する仕組みに、1)それぞれの細胞群から分泌される液性因子、2)それぞれの細胞群におけるエネルギー代謝変化が関わることを見いだした。

本研究課題では、エネルギー代謝制御に関わり、勝ち組と負け組が互いを感知する際の分子実体とその分子機構とは何か？という疑問を解決するため、上記のモデルを応用し、遺伝学的手法とメタボローム、プロテオームによる解析を組み合わせ、勝ち組と負け組の細胞運命を変化させる表現型を指標とした細胞競合制御因子の機能的スクリーニングを行う。

2. 方法

[I] 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

高dMyc細胞（勝ち組）と低dMyc細胞（負け組）の2種類の細胞株を共培養する技術を応用し、3通りの方法（I-1 直接共培養系、I-2 間接共培養系、I-3 単培養系における直接共培養上清アッセイ系）により、dMycにより制御される細胞競合のモデルを作製し、それぞれのモデルにおいて、細胞死の初期マーカーである活性型カスパーゼ3抗体による免疫染色、及び細胞増殖解析による細胞特性評価系を構築した。

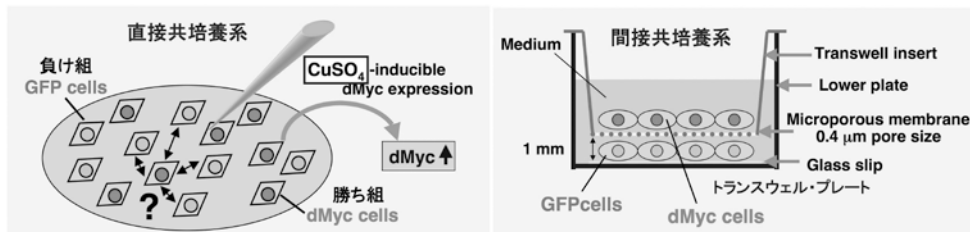


図1 直接、及び間接共培養系を用いた細胞競合モデル系

[II] ショウジョウバエ幼虫翅原基を用いた*in vivo*細胞競合モデル系

体細胞組替えによるモザイク解析法を応用し、翅原基において競合する細胞の特性を生存能、増殖能、代謝変化などを指標に解析する独自の*in vivo*モデル系を構築した。

(II-1) 勝ち組クローン解析系

*Actin>Gal4*カセットを用いて、野生型細胞で構成される翅原基組織において、GFPでマ

ークされるdMyc高発現細胞群（勝ち組クローン）を作出すると、野生型細胞との細胞競合が生じることよりそのクローンサイズが大きくなる。

(II-2) 負け組クローン解析系

*Tub>dmyc>Gal4*カセットを用いてdMyc高発現細胞で構成される翅原基組織において、GFPでマークされる野生型細胞／dMyc低発現細胞群（負け組クローン）を作出すると、周辺のdMyc高発現細胞との間で細胞競合が生じ、そのサイズが小さくなる。

[III] *in vivo*系を用いたマイクロアレイ解析による細胞競合関連因子の探索

勝ち組クローン解析系（II-1）を用いて、幼虫の翅原基をコラゲナーゼ処理し、セルソーターにより競合するdMyc高発現細胞（勝ち組）と野生型細胞（負け組）を分離し、マイクロアレイ解析を行い、遺伝子発現のプロファイリングを行った。対照群としては、非競合条件として、全ての細胞が野生型細胞、あるいはdMyc高発現細胞で構成される翅原基組織を同様のモザイク解析実験により作製し、比較解析を行った。

[IV] *in vitro*、及び*in vivo*細胞競合モデル系を用いた代謝変化の解析

[I]の間接共培養系（I-2）、及び [II]の*in vivo*系（II-1、及びII-2）を用いて、分子生物学的・生化学的手法、メタボロミクス・プロテオミクスの手法を用いて、勝ち組細胞と負け組細胞におけるエネルギー代謝変化解析系（代謝関連因子の発現・活性解析、代謝中間体の網羅的解析など）を構築した。

3. 結果

[I] 非競合条件下におけるMyc高発現細胞の代謝ステータス

非競合条件下（単培養系）において、Mycにより誘導される代謝の変化について解析した結果、Myc高発現細胞においては、Myc低発現細胞（野生型細胞）と比較して、糖代謝に関連する酵素の遺伝子発現が上昇し、グルコースの取り込みの上昇、および解糖系酵素活性の亢進がみられた。興味深いことに、非競合条件下のMyc高発現細胞では、ミトコンドリア代謝に関連遺伝子であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体のE1の α サブユニット、電子伝達系複合体IIのIpサブユニット、電子伝達系複合体IIIのSC02サブユニットの発現が上昇し、電子伝達系複合体IIの酵素活性が有意に上昇したのに対し、電子伝達系複合体IVの酵素活性、およびATPの量は低下することが示された。

[II] 競合条件下におけるMyc高発現細胞（勝ち組）の代謝ステータス

これまでに我々は、Mycにより細胞競合が生じる際に、勝ち組および負け組となる細胞が互いを認知し細胞非自律的にそれぞれの細胞特性を変化させること、すなわち、勝ち組（Myc高発現細胞）では増殖能および生存能がより高くなり、負け組（Myc低発現細胞）では増殖能および生存能がより低くなることを報告してきた¹⁾。

競合条件下（間接共培養系）において、勝ち組となるMyc高発現細胞の代謝を非競合条件下における代謝と比較したところ、グルコーストランスポーターであるGLUT1、およびGLUT3の遺伝子発現の顕著な上昇、グルコースの取り込みの顕著な上昇がみられた。また、非競合条件下と比較して電子伝達系複合体IIIのSC02サブユニットの発現が有意に上昇し、ミトコンドリア代謝は低下が認められたものの維持され、より顕著な好氣的な糖代謝の亢進がみられることが明らかになった。

[III] p53はMycにより誘導される細胞競合のため必要である

細胞競合の*in vivo*系を用いたマイクロアレイ解析により、勝ち組細胞においてマイルドに発現上昇する細胞競合制御因子の候補の一つとしてp53を見いだした。そこで、Mycにより誘導される細胞競合におけるp53の役割について解析した。

in vivo、および*in vitro*の細胞競合の解析系においてp53の機能抑制解析を行ったところ、勝ち組であったMyc高発現細胞の増殖能および生存能は顕著に低下して負け組に転じ、一方、負け組であったMyc低発現細胞は増殖能および生存能が相対的に高まり勝ち組に転じることが明らかとなった。すなわち、Myc高発現細胞（勝ち組）とMyc低発現細胞（負

け組)それぞれの細胞特性が、p53の機能抑制により逆転することが明らかになった。

p53の機能抑制により勝ち組から負け組に転じたMyc高発現細胞では、勝ち組の細胞特性として観察されていた GLUT1、GLUT3、SC02の遺伝子発現の顕著な上昇、グルコースの取り込み上昇や乳酸/ピルビン酸比の上昇を指標とする糖代謝の亢進、マイルドに抑制されると共に維持されているミトコンドリア代謝の活性が、いずれも顕著に抑制されていた。これらの結果から、p53はMycと協調して、勝ち組においてミトコンドリア代謝を維持した糖代謝の亢進(すなわち、好氣的な解糖の亢進)を誘導するために重要な役割を果たしていることが示された。また、競合により勝ち組から負け組に転じたp53欠損Myc高発現細胞では、異常な細胞死、およびゲノム不安定性の増大が細胞非自律的に観察されることが明らかとなった。

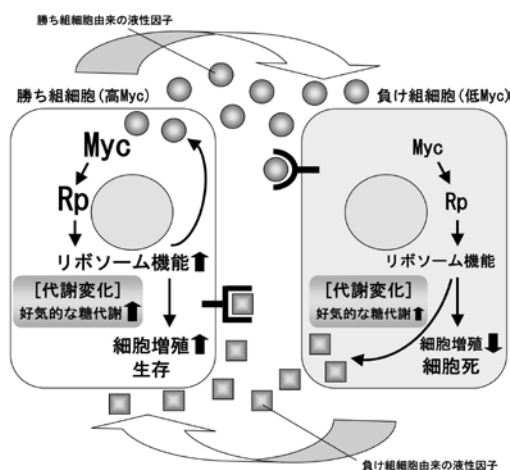


図2 細胞競合とエネルギー代謝変化

4. まとめ

以上の結果より、競合して勝ち組となるMyc高発現細胞では、Mycとp53が協調して細胞非自律的に代謝ステータスの変化、すなわち、好氣的な糖代謝の亢進を制御し、この変化により勝ち組細胞における生存能と増殖能の亢進、およびゲノム不安定性の維持が制御されることが示された(図2)。さらに、p53はMyc高発現細胞が勝ち組としての特性を得るために必要であるだけでなく、Myc低発現細胞(野生型細胞)が細胞死などを介し負け組としての特性を得るための制御にも関わっていることが示された(図2)。

本研究課題において、競合細胞において見いだされた代謝変化、好氣的な糖代謝亢進は、Warburg効果とよく類似していた。多細胞組織におけるがん化あるいはがんの悪性化にかかわるエネルギー代謝の変化として、Mycをはじめとした多くのがん遺伝子産物によりWarburg効果として知られる代謝ステータスの変化をとまなう細胞特性の変化、とくに好氣的な解糖の亢進の生じることが知られている。しかしながら、がん細胞における代謝ステータスの制御の詳細については、未だ不明な点が多く残されている。

このような代謝ステータスの変化が、それぞれの細胞群が互いを認識し競合するために重要であり、細胞競合制御因子の分泌に関与する可能性が考えられる。この分子機構を解明するために、現在、単培養系における直接共培養上清アッセイ系(I-iii)を用いたプロテオーム/メタボローム解析により、競合する2種類の細胞群から培養上清中に分泌される細胞競合制御因子の単離と同定を進めている。

5. 参考文献

1) *de la Cova C., *Senoo-Matsuda N., Ziosi M, Wu C., Bellosta P., Quinzii C.M., and Johnston L.A.: *Cell Metab*, 19: 470-483 (2014)

* C. de la Cova and N. Senoo-Matsuda are equal first authors.

2) Senoo-Matsuda N., Johnston L.A.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 104: 18543-18548 (2007)