論文の内容の要旨

論文題目　組織リモデリングに必要な細胞非自律的アポトーシス制御機構

氏名　中嶋　悠一朗

【序】

組織リモデリングは個々の細胞の多様な振る舞いや細胞集団の移動や浸潤、入れ替わりを伴うダイナミックなプロセスであり、発生や病態において観察される。細胞増殖とアポトーシスは組織サイズの制御や、組織の恒常性維持に寄与することが知られており、組織の修復や再生、がんの進行といった組織リモデリングの過程においても見られる。細胞増殖とアポトーシスは、「増やす」と「減らす」という、相反する細胞のふるまいであることから、互いに協調しあうことで組織リモデリングに関与することが示唆されるが、それらが生体内においてどのように互いに協調しあっているのか、その多くは不明である。本研究では、生体内におけるアポトーシスの時空間的パターンの解明と、死にゆく細胞が周りの細胞とどのような相互作用を行っているのかを明らかにすることを目的とした。アポトーシスの時空間的パターンを解明するために、細胞死実行因子 caspase の活性化を FRET の測定によって定量的にモニタリングできる蛍光タンパク質インディケーター・SCAT3（Sensor for activated caspase based on FRET）を用いたライブイメージングを行った。さらに、周辺の細胞との相互作用の影響を評価するために *in vivo* で caspase 活性をモニタリングしながら細胞増殖を操作できる系を構築した。本研究で得られた結果は、増殖する細胞との相互作用によってアポトーシスが誘導されるという、細胞間協調による組織リモデリングの仕組みを提示するものであり、細胞非自律的なアポトーシスの制御メカニズムについて新たな知見を示唆するものである。

【方法と結果】

1.　caspase 活性化インディケーターSCAT3 を用いたショウジョウバエ腹部表皮再構築過程におけるアポトーシスの時空間的パターンの解析

私は本学修士課程において、ショウジョウバエ蛹期における腹部表皮再構築過程を「生体内でアポトーシスを可視化する系」として確立した。ショウジョウバエの腹部表皮は蛹期に幼虫表皮細胞がアポトーシスにより除去され、ヒストブラストという成虫表皮前駆細胞が増殖しながら移動・浸潤して入れ替わることが知られている(図1A)。SCAT3 を用い、さらに細胞核を赤色蛍光タンパク質でラベルして単一細胞レベルの解像度で、各幼虫表皮細胞の caspase 活性化ダイナミクスを、*in vivo*で定量的に測定することを可能にした。SCAT3 を用いたライブイメージングの結果から、除去される幼虫表皮細胞は全てcaspase の活性化を伴うことが明らかとなった。caspase 活性化の時空間的パターンを詳細に調べるためにヒストブラストとの位置関係に注目して、caspase が活性化した幼虫表皮細胞を、(1) ヒストブラストと隣接している細胞（境界細胞）、(2) ヒストブラストと隣接していない細胞（非境界細胞）に分類した（図 1B)。その結果、caspase の活性化は境界細胞で頻繁に観察されることが明らかとなり、80%以上の幼虫表皮細胞においてアポトーシスは、ヒストブラストの隣（境界細胞）で誘導されることが示唆された(図1C)。また、個々の境界細胞のcaspase の活性化は急な FRET の減少を伴う点が共通していた。一方、非境界細胞では caspase の活性化が観察され始めてから FRET の急な減少が見られないといった不規則な時間変化が見られた。境界細胞における caspase の活性化は幼虫表皮除去のパターンを作り出すとともに、細胞の入れ替わりを隙間なく達成するのに貢献する仕組みであると考えられる。

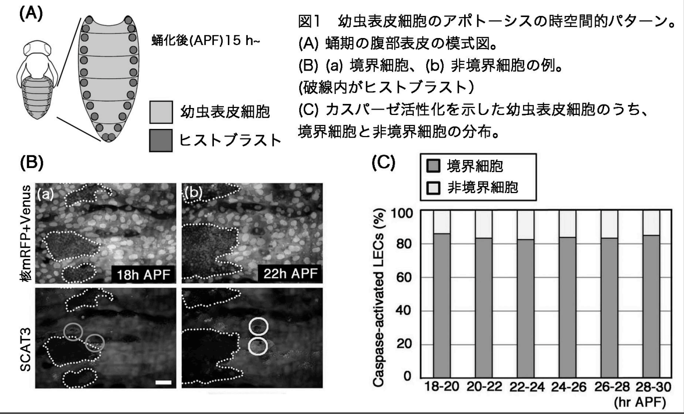

図1　幼虫表皮細胞のアポトーシスの時空間的パターン。
(A) 蛹期の腹部表皮の模式図。
(B) (a) 境界細胞、(b) 非境界細胞の例。
(破線内がヒストブラスト)
(C) カスパーゼ活性化を示した幼虫表皮細胞のうち、境界細胞と非境界細胞の分布。

2.　ヒストブラスト細胞集団の拡大が境界細胞の caspase 活性化を調節する

境界細胞の caspase 活性化がどのように制御されているのかを明らかにするためにヒストブラストとの相互作用に注目した。ヒストブラストの増殖を遺伝学的に阻害すると幼虫表皮細胞の除去が遅れることが示唆されている。そこで、ヒストブラストの増殖と境界細胞の caspase 活性化が相関するかどうかを検討するために、ヒストブラスト特異的に遺伝学的に細胞増殖を阻害した状態で幼虫表皮細胞での caspase 活性化をモニタリングできる系を導入した。Ecdyson シグナルの阻害(EcR-RNAi)、あるい

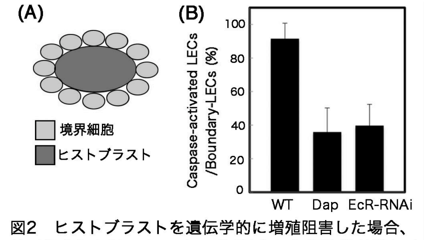

図2　ヒストブラストを遺伝学的に増殖阻害した場合、境界細胞におけるカスパーゼ活性化した細胞数は著しく減少する。

はCdkキナーゼinhibitorであるDacapo(Dap)をヒストブラストにおいて強制発現すると増殖が阻害されることが知られている。そこで、EcR-RNAi および Dap 発現下で境界細胞の caspase 活性化の頻度を定量したところ、caspase 活性化した細胞の割合が著しく減少した(図 2)。またこのとき、ヒストブラスト細胞集団の拡大が阻害された。以上より、ヒストブラストの増殖が阻害されることで境界細胞の caspase 活性化に影響し、幼虫表皮細胞の除去の遅れという結果につながることが示唆された。

3. 増殖するヒストブラストとの局所的な相互作用が境界細胞の caspase 活性化をトリガーする

前述の実験では、ヒストブラストの増殖を阻害することによって、ヒストブラスト細胞集団の拡大自体が阻害され、ヒストブラストに特徴的な移動も見られない。そこで、境界細胞のアポトーシスを誘導するのにヒストブラスト細胞集団の拡大による物理的な刺激が重要なのか、あるいは局所的な相互作用が寄与するのかを区別するために、ヒストブラストの一部の細胞増殖のみを阻害する手法を導入した。UVA (320-400nm)を照射することでほ乳類細胞の増殖が G2/M 期で阻害されることを参考に、共焦点顕微鏡下で UVA に近い 405nm のレーザーを短時間照射して条件検討したところ、ヒストブラストの増殖を一定時間(〜12h)止めておくことに成功した。この手法を用いて、領域特異的にヒストブラストにレーザー照射し、境界細胞の caspase 活性化に注目した(図 3A)。その結果、境界細胞と接する側のヒストブラストが UV 照射されると(図 3A-c)、境界細胞で caspase 活性化を示す細胞数が大きく減少するのに対して(図 3C)、接しない側のヒストブラストに同様の条件で操作すると(図 3A-d)、コントロールと比べて大きな変化が見られなかった(図 3C)。さらにこのときヒストブラスト細胞集団の広がり方は境界細胞側を操作した場合と逆側を操作した場合とで有意差は見られなかった (図 3B)。よって、ヒストブラスト全体の移動や物理的な刺激よりも、増殖するヒストブラストとの局所的な相互作用が、境界細胞のアポトーシスを誘導していると考えられる。

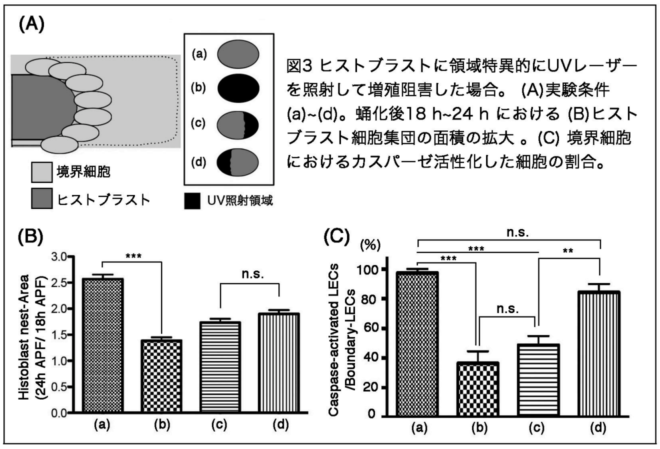

図3 ヒストブラストに領域特異的にUVレーザーを照射して増殖阻害した場合。 (A)実験条件(a)~(d)。蛹化後18 h~24 h における (B)ヒストブラスト細胞集団の面積の拡大 。(C) 境界細胞におけるカスパーゼ活性化した細胞の割合。

4. ヒストブラストにおけるS/G2期からの細胞周期進行が境界細胞に細胞非自律的なアポトーシスを誘導するのに必要である

境界細胞はヒストブラストの状態を認識してアポトーシスのプログラムを作動させていると考えられる。そこで、発生ステージに沿ってヒストブラストが特徴的な細胞周期を示

すことに注目し、ヒストブラストの細胞周期と境界細胞のアポトーシスが相関するという可能性を考えた。細胞集団内の各々の細胞の時空間的な細胞周期パターンを知るために、S/G2/M 期をモニターすることを可能とする蛍光タンパク質を用いたプローブ S/G2/M-Green を用いた。このプローブは蛍光タンパク質のシグナルが、S/G2 期には核に集積し、そして M 期には細胞質に分布し、G1 期には分解されて消失するという特徴を備えている(図 4A)。腹部表皮が入れ替わる時期におけるヒストブラストの細胞周期を調べたところ、入れ替わる前は S/G2 期で停止していた(図４B)。観察の結果、入れ替わり始めとともに細胞集団内のヒストブラストの細胞周期がダイナミックに変化していく様子が境界細胞周辺でも見られた(図４B)。S/G2 期からの細胞周期進行が境界細胞のアポトーシスに必要かどうかを検討するために一部のヒストブラストの細胞周期を UV レーザー照射により停止させた。ヒストブラストは核にシグナルを集積させ S/G2 期で停止したままであり、これらのヒストブラストに隣接する境界細胞はアポトーシスせずに表皮組織に残ったままであった (図４C)。以上の結果、ヒストブラストが S/G2 期から M、G1 期へと移行することが、隣接する境界細胞にアポトーシスを誘導するのに必要であることが示唆された。

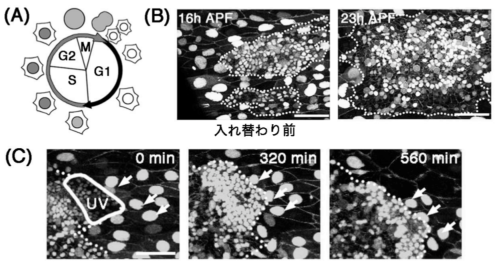

図4　S/G2期で細胞周期が停止したヒストブラストは境界細胞にアポトーシスを誘導できない。(A) S/G2/M-Greenの模式図。(B) 正常発生時のS/G2/M-Greenの動態。(C) ヒストブラストにUV照射した場合。矢印はアポトーシスせず残っている境界細胞。

【まとめと考察】

本研究で私は、ショウジョウバエ腹部表皮再構築過程において caspase 活性化の時空間的なパターンを見出し、細胞増殖を遺伝学的または人為的に操作することで、入れ替わる細胞間での局所的な相互作用が細胞非自律的な幼虫表皮細胞のアポトーシスを制御していることを示した。さらに、細胞周期をモニタリングすることで、ヒストブラスト側では S/G2 期からの細胞周期進行が周辺の境界細胞にアポトーシスを誘導するのに必要であることが明らかとなった。こうした細胞間相互作用を介した細胞非自律的にアポトーシスを誘導する仕組みは「細胞競合」という、異なる増殖速度をもつ細胞間の相互作用として提唱された概念と細胞レベルの振る舞いが類似している。細胞競合はがん細胞が周辺組織を駆逐するプロセス、幹細胞と分化した細胞の間の相互作用にも寄与すると考えられており、本モデル系から示唆される相互作用と共通した仕組みの存在が考えられる。また、細胞周期依存的なシグナルの応答・制御や細胞周期調節因子の細胞運命決定への寄与が近年示唆されており、組織リモデリングにおける細胞間協調の仕組みにおいても今回の研究結果は示唆的であると考えられる。