

審査の結果の要旨

平成20年度進学 中嶋 悠一朗
指導教員 三浦 正幸

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、発生や病態の様々な場面において観察される。細胞の振る舞いの中で、とりわけ遺伝的に制御された細胞の「増殖」と「アポトーシス」は組織の成長やサイズの規定をする上で最も基本的な振る舞いであり、それぞれ細胞を「増やす」と「減らす」という相反する振る舞いであることから、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考えられる。しかしながら、生体内、特に組織リモデリングにおいて細胞増殖と細胞死が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。現状では、生理的条件下でアポトーシスと細胞増殖をつなぐメカニズムに焦点をあわせた研究がほとんどないため、生体内での両者の協調における細胞レベルの振る舞いや分子メカニズムに関して多くが未だ明らかでない。

本研究では、組織リモデリングに必要な細胞増殖とアポトーシスが協調するメカニズムを理解するために、生体内で起こるアポトーシスの時空間的パターンを解明し、死にゆく細胞と周辺細胞の相互作用を明らかにすることを試みた。アポトーシスの時空間的パターンを解明するために、細胞死実行因子カスパーゼの活性化を FRET 型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により定量的に観測した。さらに、周辺の増殖細胞との相互作用の影響を評価するために *in vivo* でカスパーゼ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。

そこで、まず、ショウジョウバエ蛹期の腹部表皮再構築過程に注目した。腹部表皮再構築は生体内での細胞増殖とアポトーシスのダイナミクスを細胞レベルの振る舞いから詳細に解析するのに適した系である。蛹期において腹部の表皮は成虫での表皮前駆細胞であるヒストブラストと幼虫表皮細胞から構成され、リモデリングの過程でヒストブラストは細胞集団を拡大させ、移動し、腹部表皮を覆うが、幼虫表皮細胞はアポトーシスして除去されることが知られている。次に、SCAT3 発現ショウジョウバエ系統を用いて、幼虫表皮細胞のカスパーゼ活性化パターンを、*in vivo* で単一細胞レベルの解像度で定量的に測定した。その結果、カスパー

ーゼが活性化した幼虫表皮細胞を、ヒストブラストと隣接している細胞（境界細胞）、隣接していない細胞（非境界細胞）として位置により分類すると、カスパーゼの活性化は 80%以上の幼虫表皮細胞において境界細胞で頻繁に観察されることが明らかとなった。個々の境界細胞のカスパーゼ活性化パターンは急な FRET の減少を伴う点が共通しており、境界細胞におけるカスパーゼの活性化が幼虫表皮除去の空間的なパターンを作り出し、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ことが示唆された。

次に、境界細胞のカスパーゼ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の境界細胞のカスパーゼ活性化への影響を検討するため、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カスパーゼ活性化をモニタリングできる系を導入した。ヒストブラストにおいてエクジソンシグナルの阻害、あるいは Cdk キナーゼ阻害因子である Dacapo を強制発現下、境界細胞のカスパーゼ活性化の頻度を定量したところ、カスパーゼ活性化した細胞の割合が著しく減少した。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ことから、ヒストブラストの増殖が阻害されることで細胞集団の拡大が阻害され、境界細胞のカスパーゼ活性化誘導に影響することが示唆された。

ここで、ヒストブラスト細胞増殖の境界細胞アポトーシスへの効果が細胞集団の拡大による全体的な振る舞いによるのか、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。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、境界細胞のカスパーゼ活性化に注目した。その結果、境界細胞と隣接するヒストブラストが UV 照射されると、境界細胞でカスパーゼ活性化を示す細胞数が大きく減少するのに対して、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、コントロールと比べて大きな変化が見られなかった。さらにこのときヒストブラスト細胞集団の拡大は両者で有意差は見られなかったことから、ヒストブラスト全体の移動や拡大という振る舞いよりも、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するのに重要であることが示唆された。また、UV レーザー照射実験から導かれた局所的な相互作用の重要性は、遺伝学的手法によりヒストブラスト細胞集団内に細胞

増殖を阻害したクローンを作製した実験においても確認できた。

さらに、ヒストブラストの細胞周期進行と境界細胞のアポトーシスが相関する可能性を検討した。細胞集団内の各々の細胞の時空間的な細胞周期ダイナミクスを知るために、S/G2/M 期をモニターすることが可能な蛍光タンパク質プローブ S/G2/M-Green を用いた。このプローブのシグナルが S/G2 期に核に集積し、そして M 期には細胞質に分布、G1 期には分解されて消失するという特徴がヒストブラストにおいて反映されていることを免疫組織染色法により確認した。腹部表皮が入れ替わる時期のヒストブラスト細胞周期を調べたところ、入れ替わる前の G2 期停止が、入れ替わり始めとともに細胞集団内でダイナミックに変化していく様子が境界細胞周辺において一定頻度で見られた。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ことから、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。

本研究によって、腹部表皮再構築過程において「入れ替わる」側の細胞であるヒストブラストの細胞周期進行が、「入れ替えられる」側の幼虫表皮細胞の細胞非自律的なアポトーシスの誘導に必要であることが示され、細胞増殖とアポトーシスを結びつける精巧な仕組みが両細胞集団の境界で働いていることが明らかとなった。組織がうまく入れ替わるためには古い組織が除去されねばならないが、こうした細胞増殖とアポトーシスをつなぐ「入れ替わり境界」の形成は、発生、再生および恒常性を保つプロセスにおいて共通した細胞の入れ替わりの戦略である可能性がある。ヒストブラストは未分化な細胞、幼虫表皮細胞は分化し終えた細胞と見なせるため、将来的に幹細胞による組織再構築の新たなモデル系になる可能性を秘めており、両者の相互作用の詳細な分子機構の解明は、普遍的な組織入れ替わりの仕組みに貢献することが期待される。加えて、細胞周期進行や細胞周期の調節因子自体が細胞の運命決定に関わること、さらに細胞周期に応じて様々なシグナルに対する応答・制御が異なることが近年示唆されていることから、本研究は組織リモデリングにおける細胞間協調の仕組みに新たなコンセプトを提示したと考えられる。以上より、本研究は博士（薬学）の学位に値すると判定した。