

多倍体肥大化細胞による腫瘍進展メカニズムの遺伝学的解析

叢 博杰 (Cong Bojie)

目次

要旨.....	2
1. 序論.....	3
2. 材料および実験手法.....	5
3. 結果.....	11
4. まとめと考察.....	37
5. 参考文献.....	39
6. 謝辞.....	43

要旨

上皮がん組織において、多倍体肥大化細胞が高頻度に観察される。近年の研究から、多倍体肥大化したがん細胞は正常サイズのがん細胞よりも高いがん原性を持つことが示唆されている。しかし、どのようにして多倍体肥大化細胞ががん組織中に生じるのか、またそのがん制御における役割はほとんど分かっていない。当研究室では以前に、ショウジョウバエを用いて細胞間相互作用を介したがん制御機構を解析する過程で、初期エンドソームの形成に関わる *rab5* 遺伝子に変異をもつ細胞の核が肥大化することを見いだした¹。本研究において私は、*rab5* 変異細胞のみならず、*rab5* と同様にショウジョウバエの“neoplastic tumor suppressor”であり、またエンドサイトーシスに関わる *vps25*、*erupted*、*avalanche* などの遺伝子に変異をもつ細胞も多倍体肥大化することを見いだした。そこで、*rab5* 変異細胞をモデルとしてこの多倍体肥大化のメカニズムを解析した結果、ストレスキナーゼ JNK シグナルおよびがん抑制 Hippo 経路の下流転写共役因子 Yorkie の活性化が協調することにより引き起こされることが分かった。また、Yorkie の活性化により発現誘導される Diap1 (*Drosophila inhibitor-of-apoptosis protein 1*) が、JNK シグナルと協調して Cyclin B の発現を抑制することで DNA の Endoreplication を引き起こすことが分かった。さらに、高い増殖能と浸潤・転移能を有するショウジョウバエ悪性腫瘍（がん遺伝子 Ras の活性化と細胞極性の崩壊を起こした細胞；*scrib*^{-/-} Ras^{V12} 細胞）について解析を行った結果、*scrib*^{-/-} Ras^{V12} 腫瘍組織にも多倍体肥大化細胞が含まれ、*rab5* 変異細胞と同様のメカニズムで DNA Endoreplication が引き起こされていることが分かった。さらにこの悪性腫瘍組織において、多倍体肥大化を引き起こすシグナルを阻害すると、腫瘍細胞の過剰な増殖および浸潤能が顕著に抑制されることが分かった。ヒトのがん組織においては、今回見いだした JNK と YAP (Yorkie のホモログ分子) の活性化が高頻度に観察される。このことは、本研究で発見した多倍体肥大化のメカニズムがヒトのがんにおいても保存され、がんの進展・悪性化に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

1. 序論

ヒトの進行がん組織において、染色体コピー数が増加した多倍体肥大化細胞が高頻度に観察されることが知られている^{2,3}。この多倍体肥大化は、染色体分裂異常や細胞融合、DNA Endoreplication（細胞質分裂を伴わずに核内 DNA が複製される現象）など様々なイベントにより引き起こされる⁴。近年の研究から、多倍体肥大化したがん細胞は正常サイズのがん細胞より発がん能力が高い可能性が示されている⁵。しかし、どのようにして多倍体肥大化細胞ががん組織中に生じるのか、またそのがん制御における役割はほとんど分かっていない。

ショウジョウバエ成虫原基の上皮組織において、“neoplastic tumor suppressor”（腫瘍性がん抑制因子）として機能するエンドサイトーシス関連因子 *rab5*、*vps25*、*erupted (ept)*、*avalanche (avl)* などが欠損すると、腫瘍性組織増殖が引き起こされることが知られている⁶。*Rab5* は初期エンドソームの形成に関わる GTPアーゼである⁷。当研究室ではこれまでに、*rab5* 変異細胞において、Eiger（腫瘍壊死因子のホモログ分子）-JNK（c-Jun N-terminal Kinase）シグナルと EGFR-Ras シグナルが協調し、がん抑制経路 Hippo 経路の転写共役因子 Yorkie（Yki, YAP ホモログ分子）の活性化を引き起こすことを明らかにしてきた¹。Yorkie の活性化は分泌性増殖因子である Unpaired（IL-6 ホモログ分子）の発現を誘導することで、周囲組織の非自律的増殖を誘導する¹。興味深いことに、*rab5* 変異細胞（*rab5*^{-/-}細胞）の核が肥大化することが分かった。しかし、この核の肥大化には JNK シグナルや Ras シグナルおよび Yki の活性化が関わることまでは明らかにされていたが、その詳細なメカニズムやがん制御におけるその役割については不明であった。

本研究において *rab5* 変異細胞を用いて解析を進めた結果、*rab5* 変異細胞が DNA Endoreplication を引き起こし、多倍体肥大化した細胞を形成することが明らかとなった。また、この DNA Endoreplication は、Eiger-JNK と Yki の標的遺伝子 *Diap1*（Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1）が協調して細胞周期の M 期の開始に必要な Cyclin B（CycB）の発現を抑制することで引き起こされる

ことが分かった。驚くべきことに、*rab5* 変異細胞以外の腫瘍性がん抑制因子として機能するエンドサイトーシス関連因子および細胞極性崩壊した腫瘍細胞 (*scrib*^{-/-}+Ras^{V12}) においても同様なメカニズムで DNA Endoreplication が引き起こされることが分かった。さらに、腫瘍組織において多倍体肥大化した腫瘍細胞が形成されることが、腫瘍の過剰な増殖および転移に重要であることを見いだした。

2. 材料および実験手法

2-1. ショウジョウバエ系統

ショウジョウバエ幼虫の複眼原基において、遺伝的モザイク法により体細胞クローンを誘導するために用いたテスター系統は以下の通りである。

eyFLP1; TubGal80, FRT40A; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP (40A tester) ;

eyFLP1; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP; FRT82B, TubGal80 (82B tester) ;

UAS-p35; eyFLP5, Act> y+ >Gal4, UAS-GFP; FRT82B, TubGal80 (p35 tester) ;

eyFLP1; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP, egr^l; FRT82B, TubGal80 (82B egr^l tester) ;

eyFLP1; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP; TubGal80 FRT80B (80B tester) ;

eyFLP1; FRT43D, TubGal80/Cyo; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP (43D tester) ;

UbxFLP1; FRT40A, Tub-Gal80; Act>y+>Gal4, UAS-GFP (Ubx tester) ;

その他に本研究において用いた系統は以下の通りである。

個別の研究者より分与されたもの

egr^l (Masayuki Miura), *UAS-Bsk^{DN}* (Takashi Adachi-Yamada), *UAS-CycB* (Dr. Leonie Quinn)⁸, *scrib^l* (D.Bilder)⁹, *avl^l* (D. Bilder)¹⁰

Bloomington Drosophila Stock Center (BDRC, USA)より分与されたもの

CycB², *UAS-Rab5^{DN}*, *UAS-Hep^{CA}*, *UAS-Yki*, *UAS-p35*, *UAS-Ras^{V12}*, *UAS-Diap1*, *UAS-Rpr*, *UAS-Hid*, *vps25^{K08904}*, *ex-lacZ (ex⁶⁹⁷)*, *diap1-lacZ (th^{i5C8})*

国立遺伝学研究所 (NIG, 日本) より分与されたもの

UAS-Yki-RNAi^{4005R-2}

Kyoto Stock Center, Kyoto Institute of Technology (DGGR, Kyoto)

rab5^{LL00467}

2-2. MARCM 法¹¹を用いた遺伝的モザイククローンの作製

多倍体肥大化細胞の形成メカニズムおよびその機能を解析するためには、同一組織内に異なる遺伝的背景を持つ体細胞クローンをモザイク状に誘導する必要がある。Mosaic analysis with a repressive cell marker (MARCM) 法は遺伝的モザイク法と Gal4/UAS システムを組み合わせた方法である。ショウジョウバエ遺伝的モザイク法は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 由来の組換え酵素 Flippase (FLP) とその認識配列 FLP recombination target (FRT) による体細胞組換えの原理を利用して、異なる遺伝的背景を持つ体細胞クローンを組織にモザイク状に誘導する方法である^{12,13}。Gal4/UAS システムは、出芽酵母由来の転写活性化因子 Gal4 とそのターゲット配列 upstream activating sequence (UAS) を用いて、UAS に接続した遺伝子の発現を誘導する方法である^{14,15}。ここでは X 変異細胞に Rab5^{DN} を発現させるクローンを作製する例を図 1 に示す。まず、変異 X と Tub-Gal80 (tubulin プロモーターの制御下で、Gal4/UAS 遺伝子発現システムを阻害するタンパク質 Gal80 が発現するトランスジーン) とをヘテロに持ち、同時に Act (Actin) >y+Gal4 カセット (FLP/FRT の組み換えが誘導されると Gal4 タンパク質がアクチンプロモーターの制御下で発現する遺伝子カセットである。>は FRT、y+はショウジョウバエの体色を変化させる yellow+遺伝子である)、UAS-Rab5^{DN}、および UAS-GFP トランスジーンを持つショウジョウバエ個体を作製する。この個体の幼虫期において、複眼原基特異的な eyeless プロモーターを用いて FLP を発現させ (eyFLP)、FRT 間の組み換えを誘導する (対立遺伝子間および Act>y+Gal4 カセット内の 2 種類の組み換えが同時に起こる)。細胞分裂前に対立遺伝子間で都合よく組み換えが起こった細胞は、変異 X ホモおよび野生型細胞という 2 つの異なった遺伝子型の娘細胞を生じる。変異 X ホモ接合の細胞は Tub-Gal80 を持たないために Gal4/UAS システムが ON となり、Rab5^{DN} および GFP を恒常に発現するようになる。このようにして、変異 X ホモ接合かつ Rab5^{DN} を発現する細胞クローンのみが GFP によってラベルされる (図 1)。同様に、変異 X を UAS-Gene-X 系統や UAS-RNAi 系統に置換することで、GFP ラベルした Rab5^{DN} を発現する細

胞クローンに、標的遺伝子の過剰発現や発現抑制を操作することが可能である。

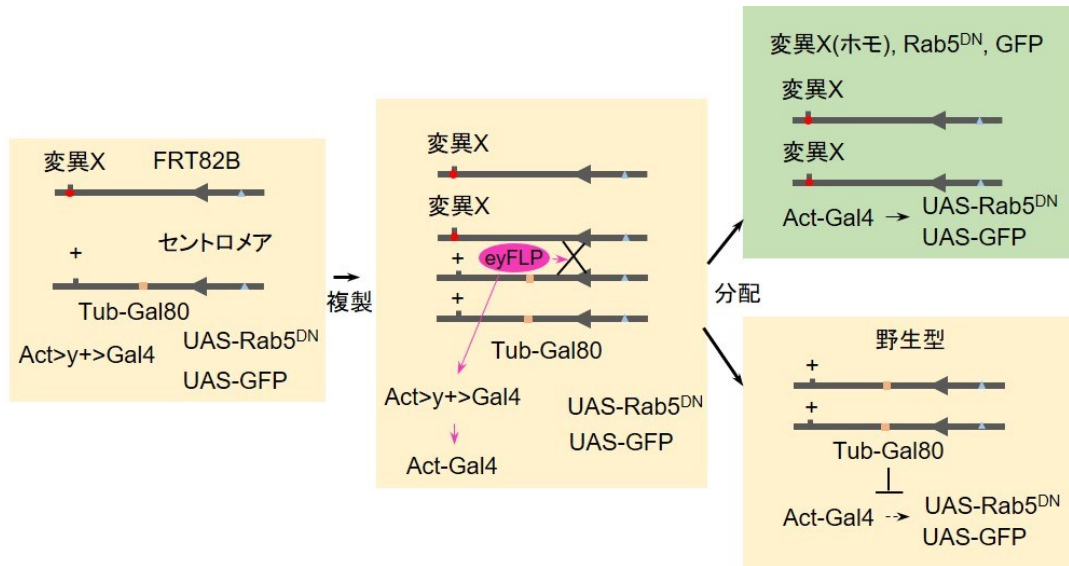


図 1： MARCM 法を用いた遺伝的モザイククローンの作製

(井垣 達吏、「癌の浸潤・転移機構への遺伝学的アプローチ」、細胞工学、2008 より一部
 改変・転載)

2-3. 免疫染色

ショウジョウバエ 3 齢幼虫を PBS 内で解剖し、4 % Paraformaldehyde (PFA) で 5 分間氷上に静置し、その後、室温で遮光して 20 分間の固定処理を行った。PFA 溶液を除去し、1 ml の 0.1% Triton X-100 in PBS (PBST) を加えて室温で遮光して 20 分間 3 回洗浄を行った。続いて 5% Normal Donkey Serum を含む PBST (PBSTn) を加え、室温で遮光して 30 分間反応させた。一次抗体反応は 50 μ l PBSTn を用いて一次抗体を希釈し、4°Cで一晩反応させた。その後、1 ml PBST を加えてフラッシュウォッシュしてから、室温で遮光して 30 分間 4 回洗浄を 1 ml PBST で行った。二次抗体反応は 300 μ l PBSTn を用いて二次抗体を希釈し、室温で遮光して 2 時間反応させた（蛍光標識ファロイジンにより F-actin を染色する場合は二次抗体液に 1/30 の濃度で加えた）。反応後、1 ml PBST を加えて室温で遮光して 30 分間 4 回洗浄を行った。最後に、SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) によって封入した。サンプルは共焦点顕微鏡 Sp5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) によって観察した。

抗体や蛍光試薬の希釈率は以下の通りである。

rabbit anti-Phospho-Histone H3 (Ser10) (1:100; Cell Signaling #9701)、 mouse anti-cyclin B (1:10; DSHB F2F4)。 mouse Mmp1 monoclonal antibody (1:100 from 1:1:1 cocktail of 3A6B4, 3B8D12, and 5H7B11; DSHB)。 F-actin (1:30; Alexa Fluor 546 or 647-tagged Phalloidin)。 chicken anti-GFP antibody (1:200, AVES)。 chicken anti- β -galactosidase antibody (abcam, #ab9361)。 Alexa 488- or 546- or 647-conjugated secondary antibodies (1:250, Molecular Probes)。

2-4. EdU を用いた細胞周期の解析

ショウジョウバエ複眼原基における細胞周期の解析には、Click-iT® EdU Imaging Kits (Thermo Fisher Scientific, C10340) を使用した。EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) はチミジンのヌクレオシド類似体で、DNA 合成 (細胞周期 S 期) を活発に行うときに、DNA に選択的に取り込まれる。取り込まれた EdU のアルキンと Alexa Fluor 蛍光色素に含まれるアジド間で銅を触媒とした共有結合が形成されることで可視化できる。具体的には、5%の Fetal Bovine Serum (FBS) を含む Schneider's Drosophila medium (SDM) に解剖した 3 齢幼虫の複眼原基 (解剖時間は 15 分以内) を 500 μ l SDM へと回収した。ここに 2.5 μ l の 10 mM EdU を加えた 500 μ l SDM を加えて全量を 1 ml とし、10 分間室温で振とうした。すぐに培地を除去し、4% PFA で室温 20 分間固定し、3% BSA を含む PBS で 3 分間 2 回洗浄を行った。続いて PBST に浸し、室温で 20 分間膜透過処理を行った後、アジド化蛍光色素と硫酸銅を含む 250 μ l Click-iT reaction cocktail (1X Click-iT reaction buffer を 215 μ l、CuSO₄(Component H)を 10 μ l、Alexa Fluor azide を 0.6 μ l、Reaction buffer additive を 25 μ l この順に加えたもの) に浸し、室温で遮光して 30 分間反応させた。その後、反応液は 3% BSA を含む PBS で 5 分間 1 回、PBS で 10 分間 3 回洗浄した。続いてブロッキング溶液に浸して室温で遮光して 30 分間反応させ、chicken anti-GFP antibody (1:200; AVES) と Alexa Fluor 488 (1:250) を用いて免疫染色を行った。

2-5. 蛍光活性化セルソーティング (FACS) の解析

PBS (Ca²⁺ free) に 3 齢幼虫を解剖し、複眼原基のみを PBS (Ca²⁺ free) へと回収した。PBS を除去し、200 μ l の 10x TrypLE™ Select (Life Technologies) を加えて 37°C で 20 分間培養した。5% の Fetal Bovine Serum (FBS) を含む Schneider's Drosophila medium を加え、1000 μ l ピペットマンを用いて 2~3 回ピペッティングを行った。続いて、培地を除去し、4% PFA を加えて 20 分間固定を行い、RNase を含む PBS (Ca²⁺ free) 37°C で 30 分間培養した。その後、PI (propidium iodide solid) を含む PBS に浸し、室温で 30 分間反応させて、40 μ m フィルターを濾過して BD FACS AriaII を用いて FACS 解析を行った。

2-6. 統計解析

クローンサイズは ImageJ ソフトウェアを使って定量した。細胞の体積は ImageJ ソフトウェアの Volumest を用いて定量化を行った。グラフは R ソフトウェアを用いて解析した。2 サンプル間の有意差検定は Student's t 検定を行い、p 値が 0.0001 以下の場合に「***」を記し、統計的に有意とした。

3. 結果

3-1. エンドサイトーシスに関連する腫瘍性がん抑制因子を欠損した細胞は Eiger-JNK 依存的に多倍体肥大化を引き起こす

ショウジョウバエの複眼原基において *rab5* 変異細胞 ($Rab5^{DN}$ または $rab5^{-/-}$) の核は正常細胞より大きいことが、当研究室の先行研究により明らかとなった¹。そこで、Phalloidon を用いて F-actin を染色したところ、細胞の核だけではなく細胞のサイズも肥大化することが分かった (図 2c, 2d)。以後このような細胞を「多倍体肥大化細胞」と呼ぶ。まず、FACS 解析を用いて *rab5* 変異細胞の DNA 量を測定した。*rab5* 変異細胞の体細胞クローンは非常に小さく、定量が困難なため、細胞死を抑制するタンパク質 p35 を *rab5* 変異細胞に強制的に発現させた ($Rab5^{DN}+p35$ 変異細胞と記す)。ショウジョウバエ正常の複眼原基に誘導した GFP で標識した野生型細胞群と GFP で標識されていない野生型細胞群においては多倍体肥大化した細胞が少量しか存在しないのに対し (図 2a)、GFP で標識したほとんどの $Rab5^{DN}+p35$ 変異細胞が多倍体肥大化していることが分かった (図 2b)。DNA Endoreplication とは、細胞質分裂を伴わずに核内 DNA が複製される現象であり、細胞が肥大化されることが知られている⁴。そこで $rab5^{-/-}$ 細胞の細胞周期について、5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU、S 期のマーカー)、およびリン酸化 Histone H3 タンパク質 (PH3、M 期のマーカー) に対する抗体を用いて調べた。その結果、DNA の複製は行われるが分裂しない DNA Endoreplication が *rab5* 変異細胞においてまさに引き起こされていることが分かった (図 2e, 2f, 2h)。では、この *rab5* 変異細胞における DNA Endoreplication はどのようなメカニズムにより引き起こされるのか? Bsk (ショウジョウバエ JNK ホモログ) のドミナントネガティブ型 (Bsk^{DN}) を *rab5* 変異細胞内で強制的に発現させることによって JNK シグナルを抑制すると、この M 期進行の停止および多倍体肥大化の表現型が完全にレスキューされることが分かった (図 2g, 2h, 2i)。また、JNK シグナルを活性化し得る *eiger* (ショウジョウバエ腫瘍壊死因子ホモログ; *egr*)¹⁶ に変異を組織全体に導入すると、*rab5* 変異細胞の多倍体肥大化の表現型が完全にレスキューされることが分かった (図 2j, 2d)。

以上の結果から、*rab5* 変異細胞の多倍体肥大化は Eiger-JNK 依存的に引き起こされることが分かった。

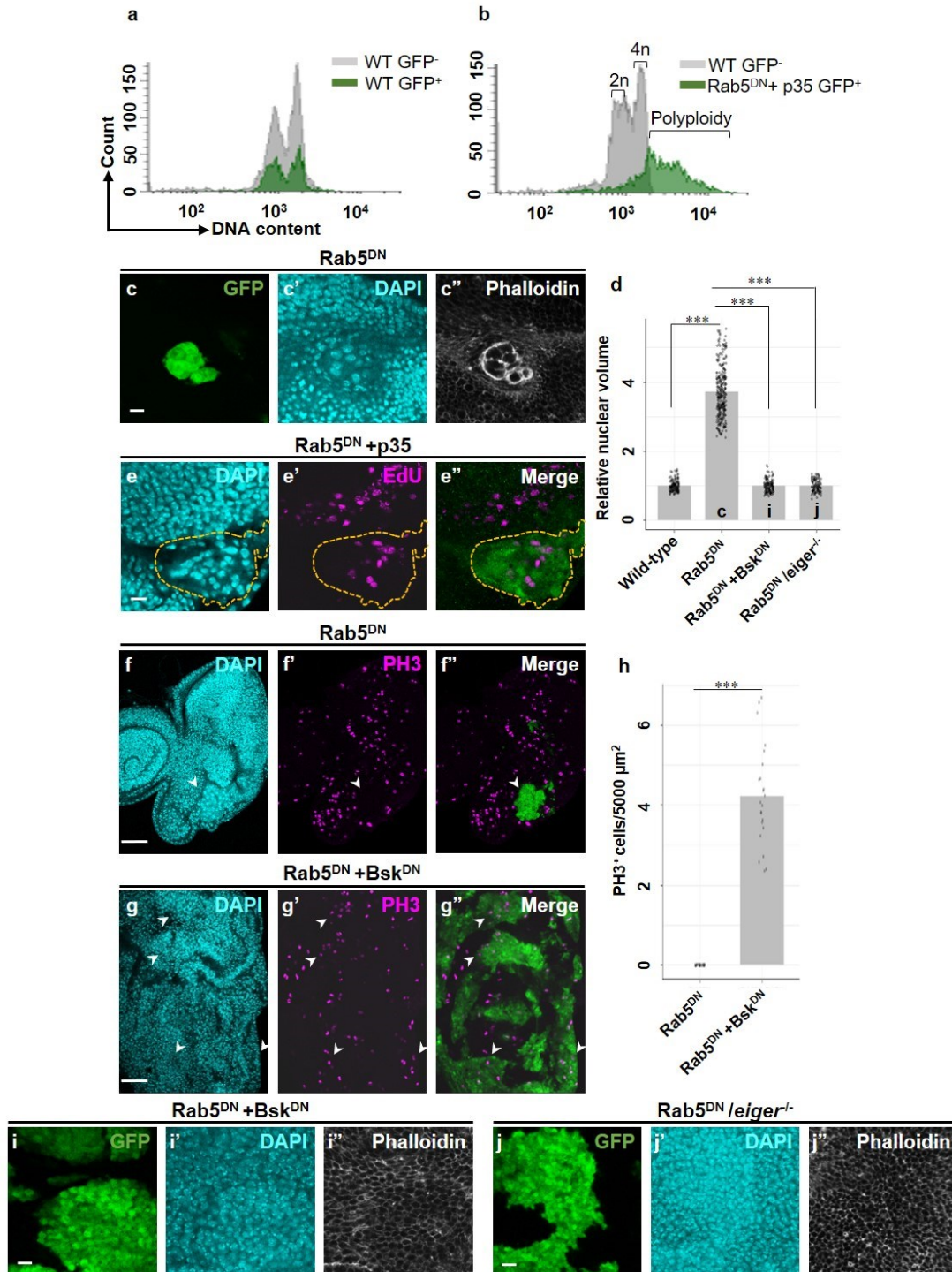


図 2 : *rab5* 変異細胞の多倍体肥大化は Eiger-JNK 依存的に引き起こされる

(a, b) FACS 解析を用いて DNA 量を測定した。(a) GFP⁺ 野生型細胞、(b) GFP⁺ Rab5^{DN}+p35 変異細胞。(c, e, f, g, i, j) MARCM 法により、(c, f) GFP で標識した Rab5^{DN}、(e) GFP で標識した Rab5^{DN}+p35、(g, i) GFP で標識した Rab5^{DN}+Bsk^{DN}、(j) GFP で標識した Rab5^{DN}/*eiger*^{-/-} のモザイククローンを複眼原基に誘導し、(c, i, j) Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(e) GFP で標識した Rab5^{DN}+p35 を複眼原基に誘導し、EdU 解析を行った。(f, g) GFP で標識した Rab5^{DN} (f)、Rab5^{DN}+Bsk^{DN} (g) を複眼原基に誘導し、抗 PH3 抗体で免疫染色を行った。(d) 野生型 (n=136)、Rab5^{DN} (n=293)、Rab5^{DN}+Bsk^{DN} (n=124)、Rab5^{DN}/*eiger*^{-/-} (n=110) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。(h) GFP で標識した Rab5^{DN} (n=26)、Rab5^{DN}+Bsk^{DN} (n=23) のクローン 5000 μm² あたりの PH3⁺ 細胞数の統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型：*eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/FRT82B* (a), *UAS-p35/+ or Y; eyFLP5, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (b and e), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (c and f), *UAS-Bsk^{DN}/+ or Y; eyFLP5 Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (g and i), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP, egr¹/egr¹; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (j).

次に、*rab5* 変異細胞の多倍体肥大化が複眼原基特異的に引き起こされるかどうかを調べるために、*rab5* 変異細胞を翅原基に誘導した。その結果、GFP で標識した野生型細胞に対し、GFP で標識した *rab5* 変異細胞は多倍体肥大化することが分かった (図 3a, 3b, 3c)。すなわち、*rab5* 変異細胞の多倍体肥大化は、複眼原基に限らず、上皮組織において誘導されることが分かった。

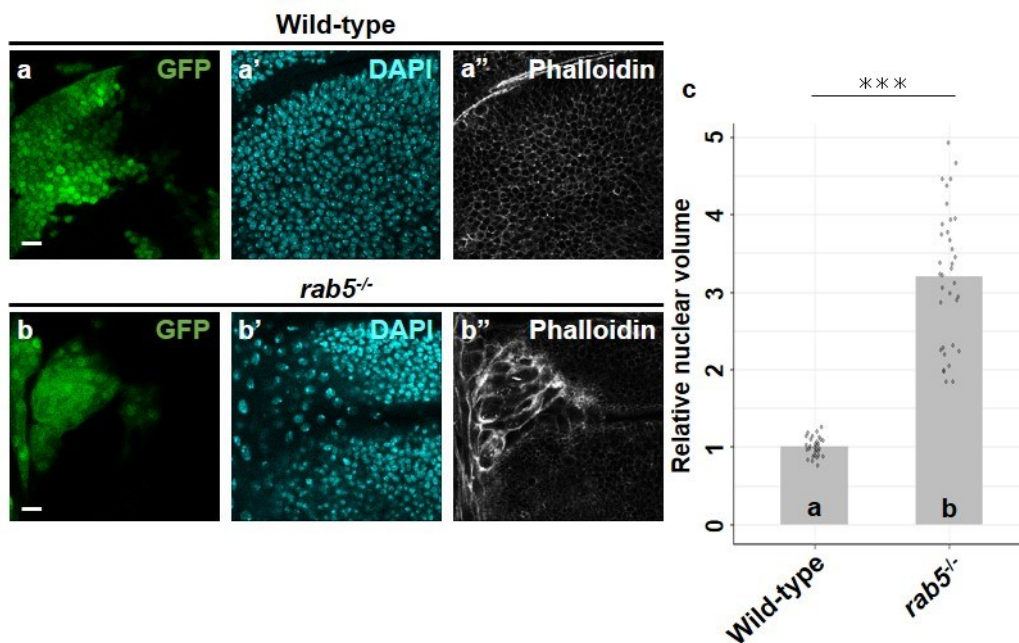


図 3 : 翅原基において、*rab5* 変異細胞は多倍体肥大化を引き起こす

(a, b) MARCM 法により、(a) GFP で標識した野生型細胞、(b) GFP で標識した *rab5*^{-/-} のモザイククローンを翅原基に誘導し、Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(c) 野生型 (n=30)、*rab5*^{-/-} (n=35) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *UbxFLP1/+ or Y; FRT40A, Tub-Gal80/FRT40A*;
Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+ (a), *UbxFLP1/+ or Y; FRT40A, Tub-Gal80/FRT40A rab5^{LL00467}*;
Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+ (b).

ショウジョウバエの上皮組織において、*rab5* を始めとしたエンドサイトーシス関連遺伝子 *vps25*、*ept*、*avl* を欠損させると、過剰な増殖が引き起こされるため、これらの遺伝子は“腫瘍性がん抑制因子”とよばれている⁶。そこで、*rab5* 以外の“腫瘍性がん抑制因子”も *rab5* と同様に多倍体肥大化を引き起こすかどうかを調べた。その結果、これらの遺伝子も *rab5* と同様に多倍体肥大化を引き起こすことが分かった。以下は *vps25* と *avl* を例として示す。GFP で標識した *vps25* 変異細胞と *avl* 変異細胞は多倍体肥大化することが観察された (図 4a, 4d, 4e, 4h)。これまでに、これらの変異細胞においても *rab5* 変異細胞と同様に JNK シグナルが活性化することが報告されている^{17,18}。JNK シグナルの標的遺伝子である MMP1 (Matrix metalloprotease 1)¹⁹ に対する抗体を用いて免疫染色したところ、確かに JNK シグナルが活性化していることが分かった (図 4b, 4f)。そして、*vps25* 変異細胞と *avl* 変異細胞において JNK シグナルを抑制すると、細胞の多倍体肥大化の表現型が完全にレスキューされた (図 4c, 4d, 4g, 4h)。

以上の結果から、エンドサイトーシスに関連する“腫瘍性がん抑制因子”遺伝子を欠損した細胞は Eiger-JNK 依存的に多倍体肥大化を引き起こすことが分かった。

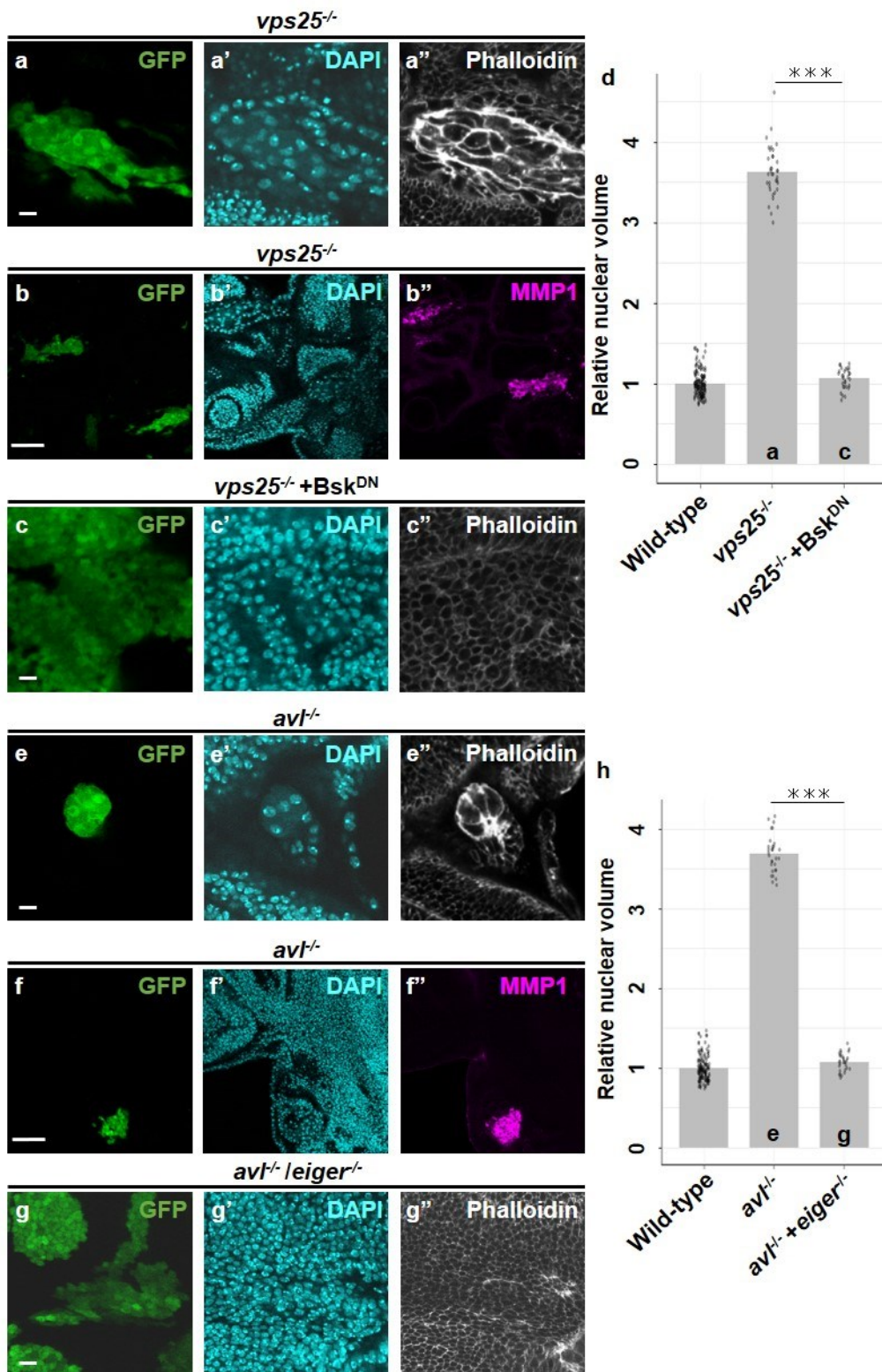


図 4 : *vps25* 変異細胞と *avl* 変異細胞は Eiger-JNK 依存的に多倍体肥大化を引き起こす
 (a, b, c, e, f, g) MARCM 法により、(a, b) GFP で標識した *vps25*^{-/-}、(c) GFP で標識した *vps25*^{-/-}+Bsk^{DN}、(e, f) GFP で標識した *avl*^{-/-}、(g) GFP で標識した *avl*^{-/-}/*leiger*^{-/-} のモザイク

クローンを複眼原基に誘導し、(a, c, e, g) Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(b, f) GFP で標識した *vps25^{-/-}* (b)、*avl^{-/-}* (f) を複眼原基に誘導し、抗 MMP1 抗体で免疫染色を行った。(d) 野生型 (n=136)、*vps25^{-/-}* (n=36)、*vps25^{-/-}+Bsk^{DN}* (n=30) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。(h) 野生型 (n=136)、*avl^{-/-}* (n=30)、*avl^{-/-}/eiger^{-/-}* (n=30) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1/+ or Y; FRT43D, TubGal80/ FRT43D, vps25^{K08904}*;
Act> y+ >Gal4, UAS-GFP/+ (a and b), *UAS-Bsk^{DN}/+ or Y; eyFLP5, FRT43D, TubGal80/ FRT43D, vps25^{K08904}*;
Act> y+ >Gal4, UAS-GFP/+ (c), *eyFLP1/+ or Y; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP/+*;
FRT80B, TubGal80/FRT80B, avl^l (e and f), *eyFLP1/+ or Y; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP, egr^l/ egr^l*;
FRT80B, TubGal80/ avl^l (g).

3-2 JNK シグナルと Yki の活性化が協調し、DNA Endoreplication を引き起こす

これまでに、*rab5* 変異細胞の多倍体肥大化は JNK シグナルに依存することを明らかにしてきた。しかし、JNK キナーゼである Hep (Hemipterous)²⁰ の活性化型 (Hep^{CA}) を細胞に発現させ、JNK シグナルを活性化するだけでは細胞の多倍体肥大化が引き起こされないことが分かった (図 5a, 5e)。興味深いことに、Yki を活性化した細胞は多倍体肥大化が引き起こされなかったが、JNK と Yki の活性化を同時に誘導した細胞においては多倍体肥大化が引き起こされた (図 5b, 5c, 5e)。さらに *rab5* 変異細胞において、Yki の発現を *RNAi* により抑制すると、細胞の多倍体肥大化が顕著に抑制された (図 5d, 5e)。また、UAS 制御下で発現させることが多倍体肥大化の表現型に影響する可能性を排除するために、UAS-*white-RNAi* と UAS-*mtd-Tomato* をネガティブコントロールとして使用し、*white-RNAi* と *mtd-Tomato* を *rab5* 変異細胞において強制的に発現させた。その結果、これらネガティブコントロールにおいては *rab5* 変異細胞の多倍体肥大に影響しないことが分かった (図 6)。以上の結果から、*rab5* 変異細胞の多倍体肥大化は JNK シグナルと Yki により引き起こされることが分かった。

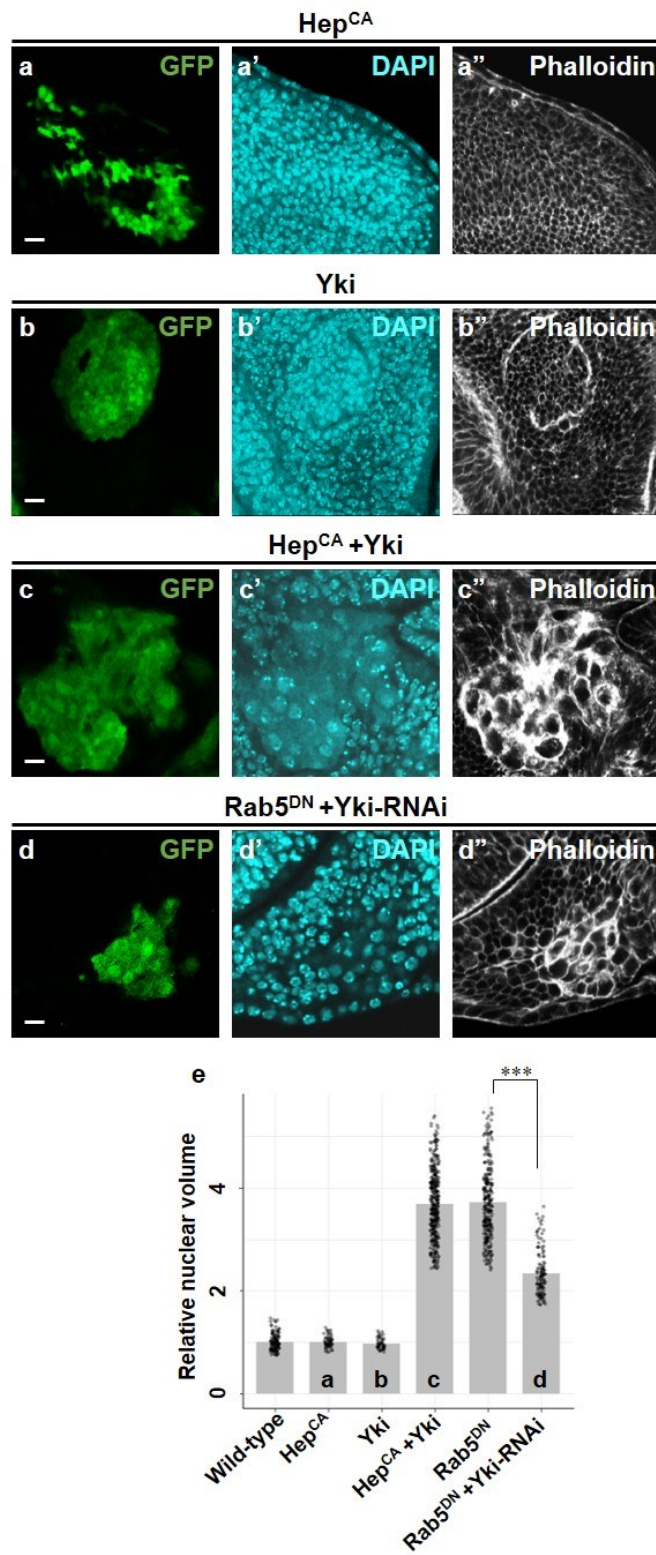


図 5 : JNK シグナルと Yki の活性化が同時に起こると細胞の多倍体肥大化を引き起こす

(a, b, c, d) MARCM 法により、(a) GFP で標識した Hep^{CA}、(b) GFP で標識した Yki、(c) GFP で標識した Hep^{CA}+Yki、(d) GFP で標識した Rab5^{DN}+Yki-RNAi のモザイククローンを複眼原基に誘導し、(a, b, c, d) Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(e) 野生型 (n=136)、Hep^{CA} (n=60)、Yki (n=53)、Hep^{CA}+Yki (n=381)、Rab5^{DN} (n=293)、Rab5^{DN}+Yki-RNAi (n=130) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/FRT82B, UAS-Hep^{CA}* (a), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/FRT82B, UAS-Yki* (b), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/FRT82B, UAS-Hep^{CA}, UAS-Yki* (c), and *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/Yki-RNAi; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (d).

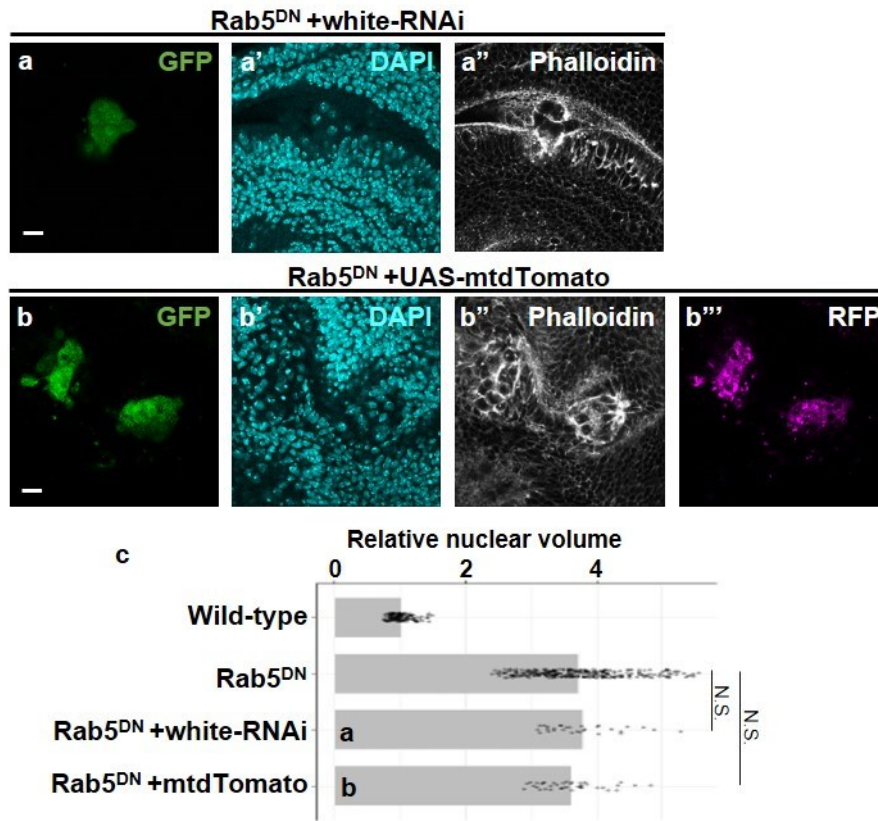


図 6 : UAS を用いた遺伝子発現そのものは細胞の多倍体肥大化に影響しない

(a, b) MARCM 法により、(a) GFP で標識した Rab5^{DN}+white-RNAi、(b) GFP で標識した Rab5^{DN}+UAS-mtdTomato のモザイククローンを複眼原基に誘導し、Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(c) 野生型 (n=136)、Rab5^{DN} (n=293)、Rab5^{DN}+white-RNAi (n=30)、Rab5^{DN}+mtdTomato (n=40) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-white-RNAi; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (a), and *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-mtdTomato; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (b).

3-3 JNK 依存的に CycB を減少させることが、DNA Endoreplication の誘導に必須である

次に、JNK シグナルの下流で DNA Endoreplication の誘導に関連する遺伝子群を調べた。マウス胚線維芽細胞において JNK シグナルは細胞周期の G2 期から M 期への移行 (G2/M 移行) を制御することが報告されている²¹。Cyclin タンパク質 Cyclin B (CycB) は G2/M 移行前に上昇し、M 期の開始に重要な役割を果たすことが知られている²²。興味深いことに、*rab5* 変異細胞において CycB の発現が減少していることが観察された (図 7a)。そして、この CycB の減少は JNK シグナルを抑制することで完全にキャンセルされることが分かった (図 7b)。次に、この CycB 発現の減少が DNA Endoreplication の誘導に関与するかどうかを調べた。*rab5* 変異細胞において CycB を強制的に発現させると、DNA Endoreplication は顕著に抑制された (図 7c, 7g)。一方で、CycB を過剰発現させただけでは、細胞核および細胞サイズに影響しなかった (図 7d)。また、CycB を欠損した細胞では細胞核およびサイズの変化はないが、Yki を過剰発現させた細胞において CycB を欠損させると、多倍体肥大化が引き起こされた (図 7e, 7f, 7g)。これらの結果から、CycB は JNK シグナルの下流で多倍体肥大化を制御することが分かった。

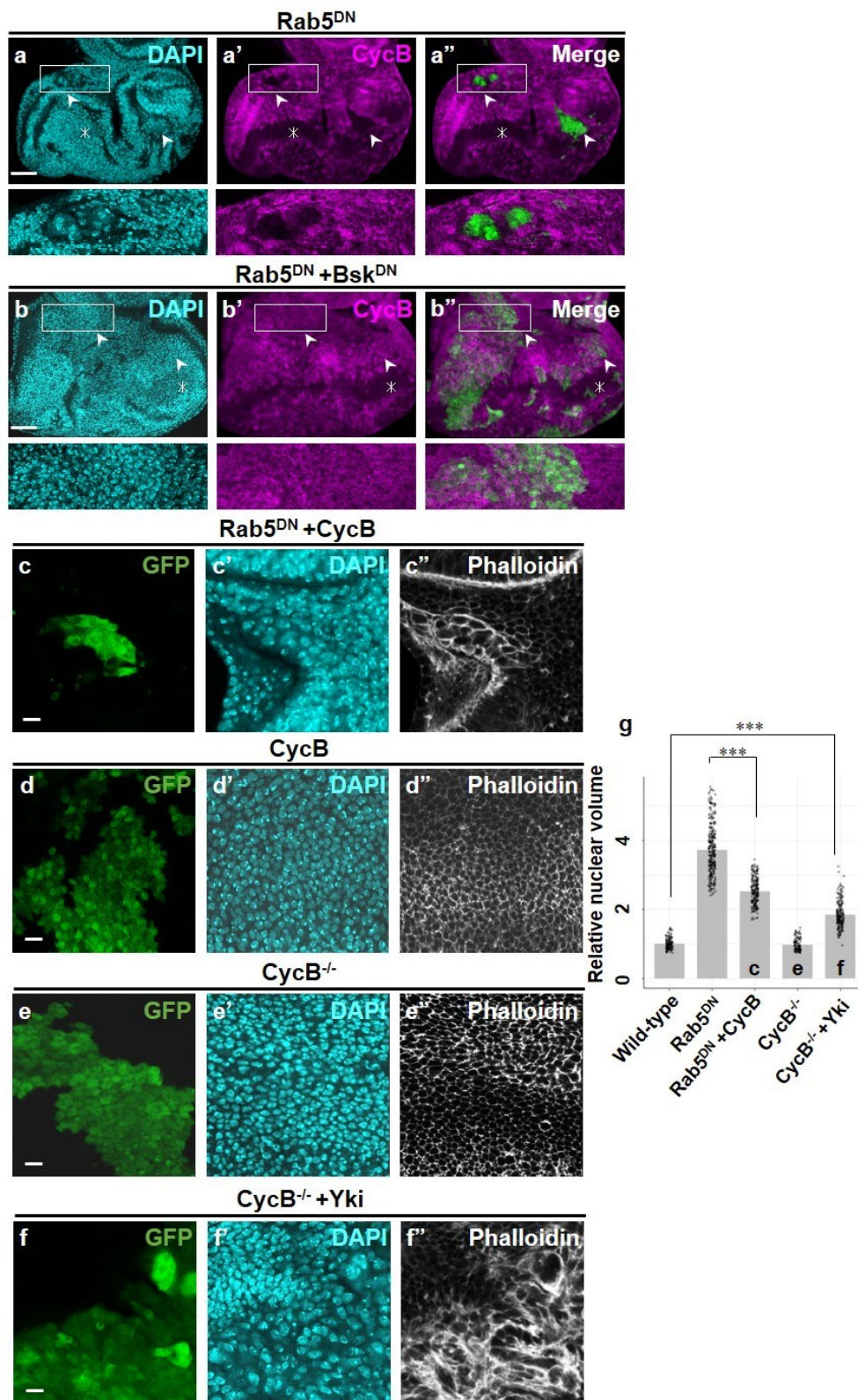


図 7 : JNK 依存的に CycB の発現を減少させることが、DNA Endoreplication の誘導に必須である

(a, b, c, d, e, f) MARCM 法により、(a) GFP で標識した Rab5^{DN}、(b) GFP で標識した Rab5^{DN}+Bsk^{DN}、(c) GFP で標識した Rab5^{DN}+CycB、(d) GFP で標識した CycB、(e) GFP で標識した CycB^{-/-}、(f) GFP で標識した CycB^{-/-}+Yki のモザイククローンを複眼原基に誘導し、(c, d, e, f) Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(a, b) GFP で標識した Rab5^{DN} (a)、GFP で標識した Rab5^{DN}+Bsk^{DN} (b)、抗 CycB 抗体で免疫染色を行った。(g) 野生型 (n=136)、Rab5^{DN} (n=293)、Rab5^{DN}+CycB (n=218)、CycB^{-/-} (n=110)、CycB^{-/-}+Yki (n=200) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (a), *UAS-Bsk^{DN}/+ or Y; eyFLP5, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (b), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-CycB; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B* (c), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-CycB; FRT82B, Tub-Gal80/ FRT82B* (d), *eyFLP1/+ or Y; FRT43D, Tub-Gal80/FRT43D, CycB²; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+* (e), and *eyFLP1/+ or Y; FRT43D, Tub-Gal80/FRT43D, CycB²; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-Yki* (f).

3-4 Diap1 は Yki の下流で DNA Endoreplication を制御する

Diap1 (Drosophila inhibitor-of-apoptosis protein 1) は Yki の標的遺伝子であり、細胞死遺伝子カスパーゼの活性を阻害する進化的に保存されたタンパク質である²³。興味深いことに、Diap1 の過剰発現は細胞の核およびサイズに影響を与えないが、Diap1 を過剰に発現させた細胞において JNK シグナルを活性化させると、多倍体肥大化が引き起こされることが分かった (図 8a, 8b, 8e)。細胞死誘導遺伝子である *reaper* (*rpr*) や *hid* は Diap1 のユビキチン化を促進して分解を誘導することで、Diap1 の機能を抑制することが知られている²⁴。Rpr または Hid を *rab5* 変異細胞に過剰発現させると細胞死を起こし、組織には Rab5^{DN}+Rpr あるいは Rab5^{DN}+Hid 変異細胞がほとんど存在しなかった。そこで、多倍体肥大化した Hep^{CA}+YKi 細胞において Rpr あるいは Hid を過剰発現させ、Diap1 を抑制した結果、DNA Endoreplication が顕著に抑制されることが分かった (図 8c, 8d, 8e)。

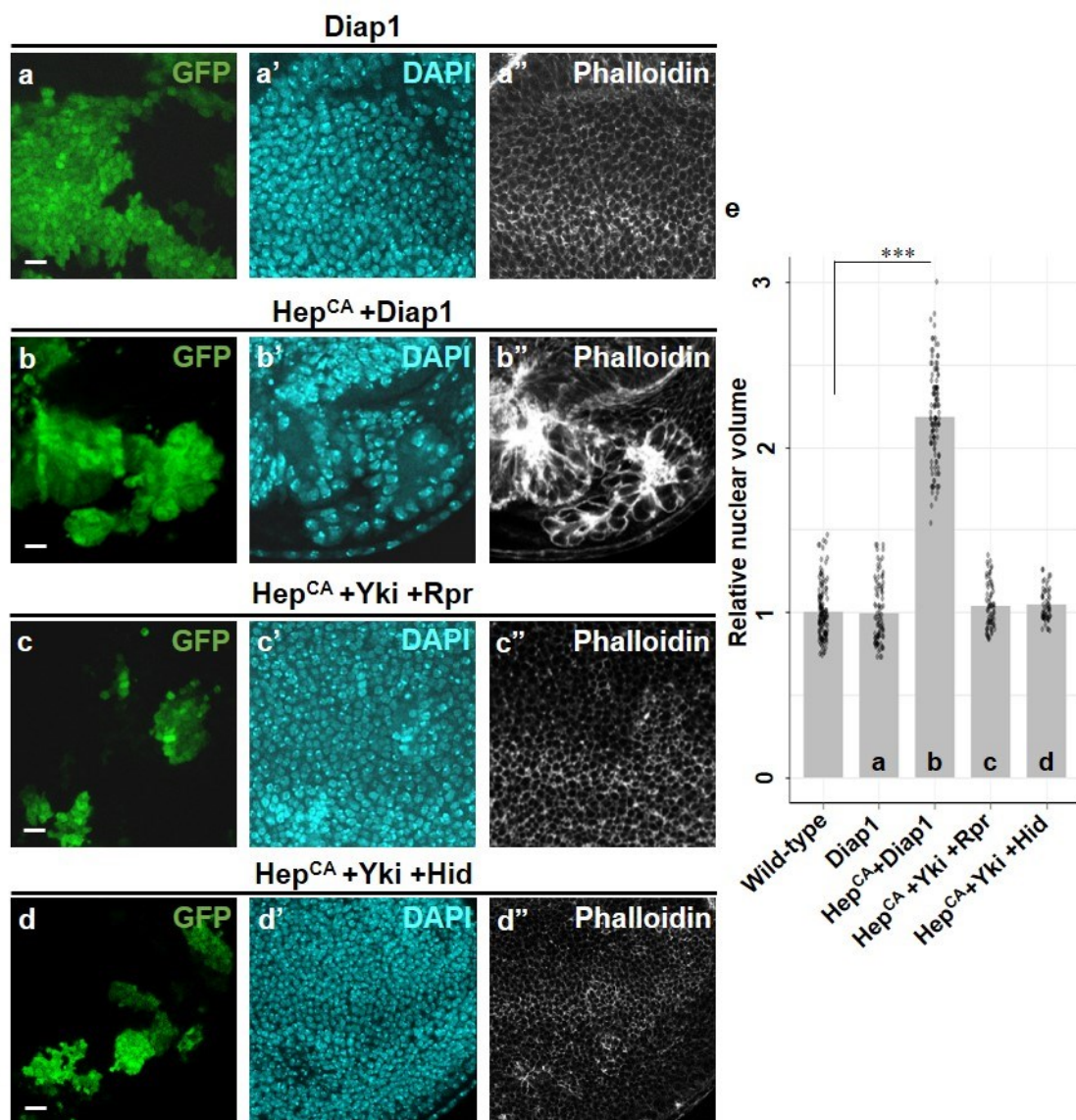


図 8 : Diap1 は Yki の下流で DNA Endoreplication を制御する

(a, b, c, d) MARCM 法により、(a) GFP で標識した Diap1、(b) GFP で標識した Hep^{CA}+Diap1、(c) GFP で表現型 Hep^{CA}+Yki+Rpr、(d) GFP で標識した Hep^{CA}+Yki+Hid のモザイククローンを複眼原基に誘導し、(a, b, c, d) Phalloidin を用いて F-actin を標識した。(e) 野生型 (n=136)、Diap1 (n=90)、Hep^{CA}+Diap1 (n=117)、Hep^{CA}+Yki+Rpr (n=70)、Hep^{CA}+Yki+Hid (n=58) それぞれの細胞核の、野生型細胞核に対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *UAS-Diap1/eyFLP1; TubGal80, FRT40A/FRT40A; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP/+* (a), *UAS-Diap1/eyFLP1; TubGal80, FRT40A/FRT40A; Act> y+ >Gal4, UAS-GFP/UAS-Hep^{CA}* (b), *eyFLP1; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-Rpr; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Hep^{CA}, UAS-Yki, FRT82B* (c), *UAS-Hid/eyFLP1; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Hep^{CA}, UAS-Yki, FRT82B* (d).

一方で、*Diap1-RNAi* を用いて発現を抑制し、*Diap1* が DNA Endoreplication に関連するかどうかを検討した。多倍体肥大化した *Rab5^{DN}* 細胞あるいは *Hep^{CA}+Yki* 細胞において *Diap1* の発現を抑制すると、DNA Endoreplication が強く抑制されることが分かった (図 9a, 9b, 9c, 9d, 9e, 9f)。

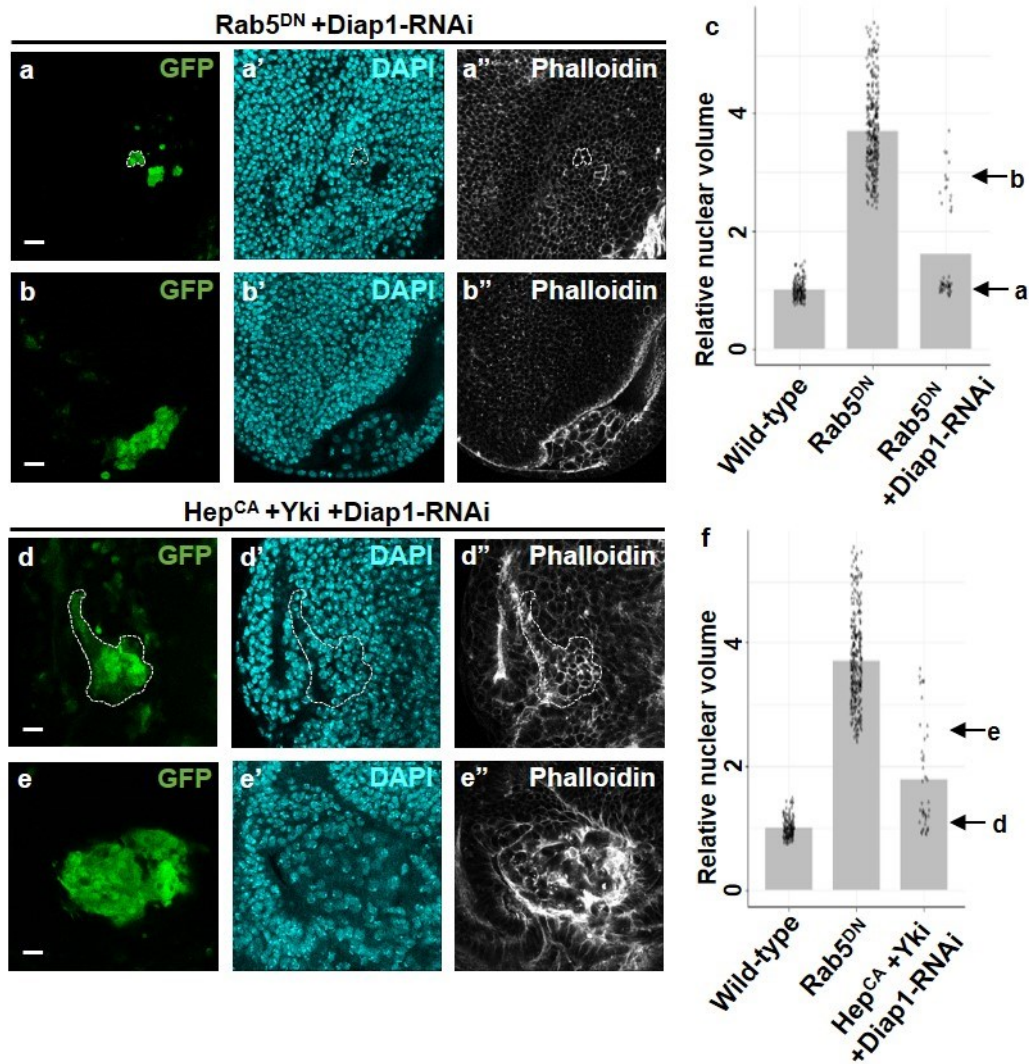


図9：Diap1はJNKとYkiの活性化により誘導されるDNA Endoreplicationに必須である

(a, b, d, e) MARCM法により、(a, b) GFPで標識したRab5^{DN}+Diap1-RNAi、(c, d) GFPで標識したHep^{CA}+Yki+Diap1-RNAiのモザイククローンを複眼原基に誘導し、Phalloidinを用いてF-actinを標識した。(c) 野生型 (n=136)、Rab5^{DN} (n=293)、Rab5^{DN}+Diap1-RNAi (n=50)、(f) 野生型 (n=136)、Rab5^{DN} (n=293)、Hep^{CA}+Yki+Diap1-RNAi (n=44) それぞれの細胞核の、野生型細胞核対する相対的な大きさの統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-Diap1-RNAi; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B (a and b), eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/UAS-Diap1-RNAi; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Hep^{CA}, UAS-Yki, FRT82B (c and d).*

さらに、JNK を活性化した細胞 (Hep^{CA}) または、Diap1 を過剰発現させた細胞では CycB の発現減少が観察されなかったが、Hep^{CA} と Diap1 を同時に発現させた細胞では CycB の発現減少が観察された (図 10a, 10b, 10c)。さらに、*rab5* 変異細胞において Yki の発現を抑制し、それにより Diap1 の発現を抑制すると、CycB の発現が減少する表現型が顕著にレスキューされた (図 10d)。これらの結果から、Diap1 は Yki の下流で機能し、JNK シグナルと協調して CycB の発現を抑制することが分かった。

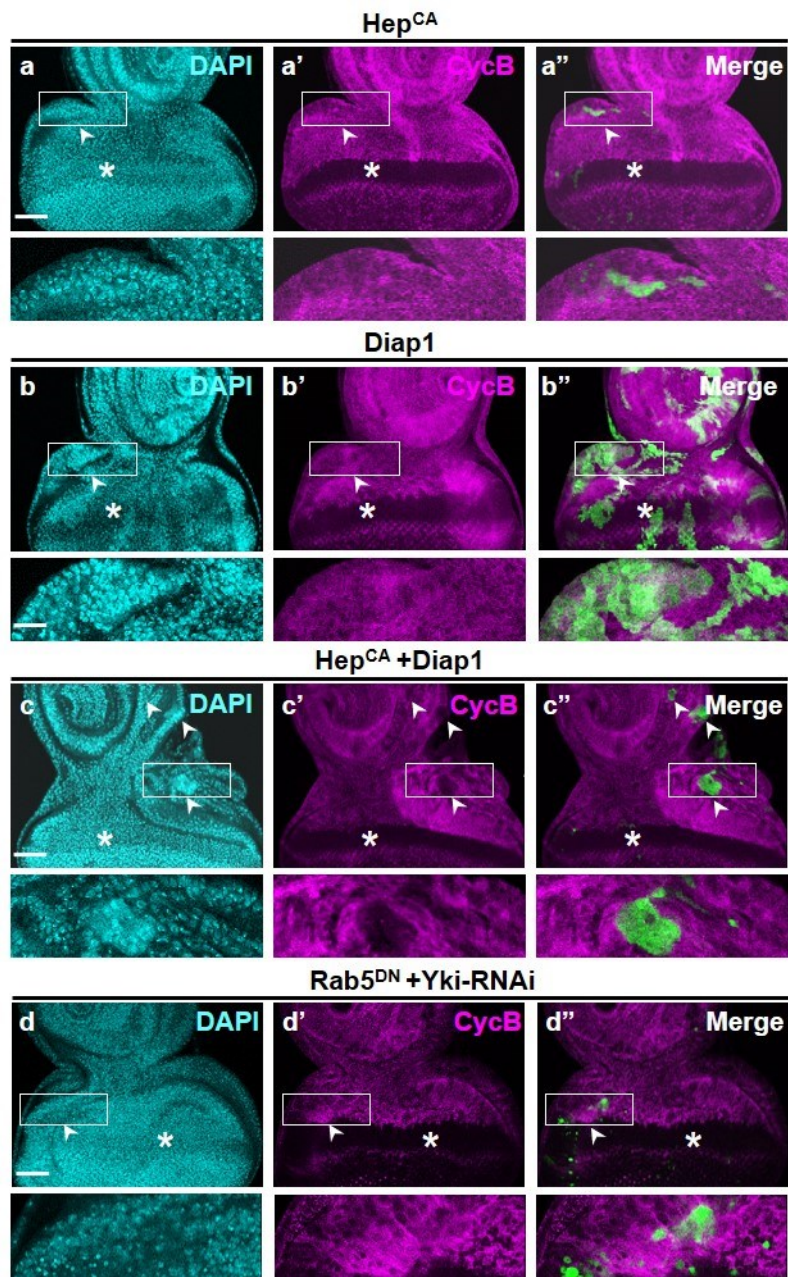


図 10 : JNK シグナルは Diap1 と協調して CycB の発現を抑制する

(a, b, c, d) MARCM 法により、(a) GFP で標識した Hep^{CA}、(b) GFP で標識した Diap1、(c) GFP で標識したの Hep^{CA}+Diap1、(d) GFP で標識した Rab5^{DN}+Yki-RNAi のモザイククローンを複眼原基に誘導し、抗 CycB 抗体で免疫染色を行った。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Hep^{CA}, FRT82B* (a), *UAS-Diap1/ eyFLP1; TubGal80, FRT40A/FRT40A; Act> y+*

>Gal4, UAS-GFP/+ (b), UAS-Diap1/eyFLP1; TubGal80, FRT40A/FRT40A; Act>y+ >Gal4, UAS-GFP/UAS-Hep^{CA} (c), eyFLP1/+ or Y; Act>y+ >Gal4, UAS-GFP/UAS-Yki-RNAi; FRT82B, TubGal80/UAS-Rab5^{DN}, FRT82B (d).

3-5 多倍体肥大化細胞は腫瘍の進展・悪性化に重要な役割を果たしている

上述の通り、私は *rab5* 変異細胞をモデルとし、エンドサイトーシスに関わる“腫瘍性がん抑制因子”の遺伝子群が欠損することにより引き起こされる多倍体肥大化の分子機構を明らかにした。次に、この多倍体肥大化した細胞が腫瘍の進展・悪性化に関与するのかどうかを調べた。ショウジョウバエの上皮組織において、上皮細胞の頂底軸方向の細胞極性を制御する遺伝子 *scribble* (*scrib*) または *discs large* (*dlg*) などが欠損した極性崩壊細胞は、Ras シグナルを活性化すると、過剰に増殖して浸潤・転移能を示すことが知られている (*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} あるいは *dlg*^{-/-}+Ras^{V12} 細胞)^{25,26}。興味深いことに、JNK シグナルと Yki はこれらの腫瘍において活性化し、腫瘍の進展・悪性化に重要な役割を果たすことが知られている (図 11a, 11b, 11c)^{27,28}。そこで私は、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} の腫瘍細胞をモデルとして、腫瘍の進展・悪性化における多倍体肥大化細胞の役割を調べた。まず、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍組織において多倍体肥大化した細胞が存在するかどうかを FACS で解析した。その結果、野生型細胞群に比べると、腫瘍細胞群には多倍体肥大化した細胞の割合が極めて高いことが分かった (図 11d)。また、細胞周期 M 期のマーカー-PH3 を用いて腫瘍細胞が M 期に入っているかどうかを検討したところ、野生型細胞群に比べて、腫瘍細胞群では M 期の細胞が顕著に少ないことが分かった (図 11e, 11f)。つまり、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍組織において多倍体肥大化した細胞が存在することが分かった。

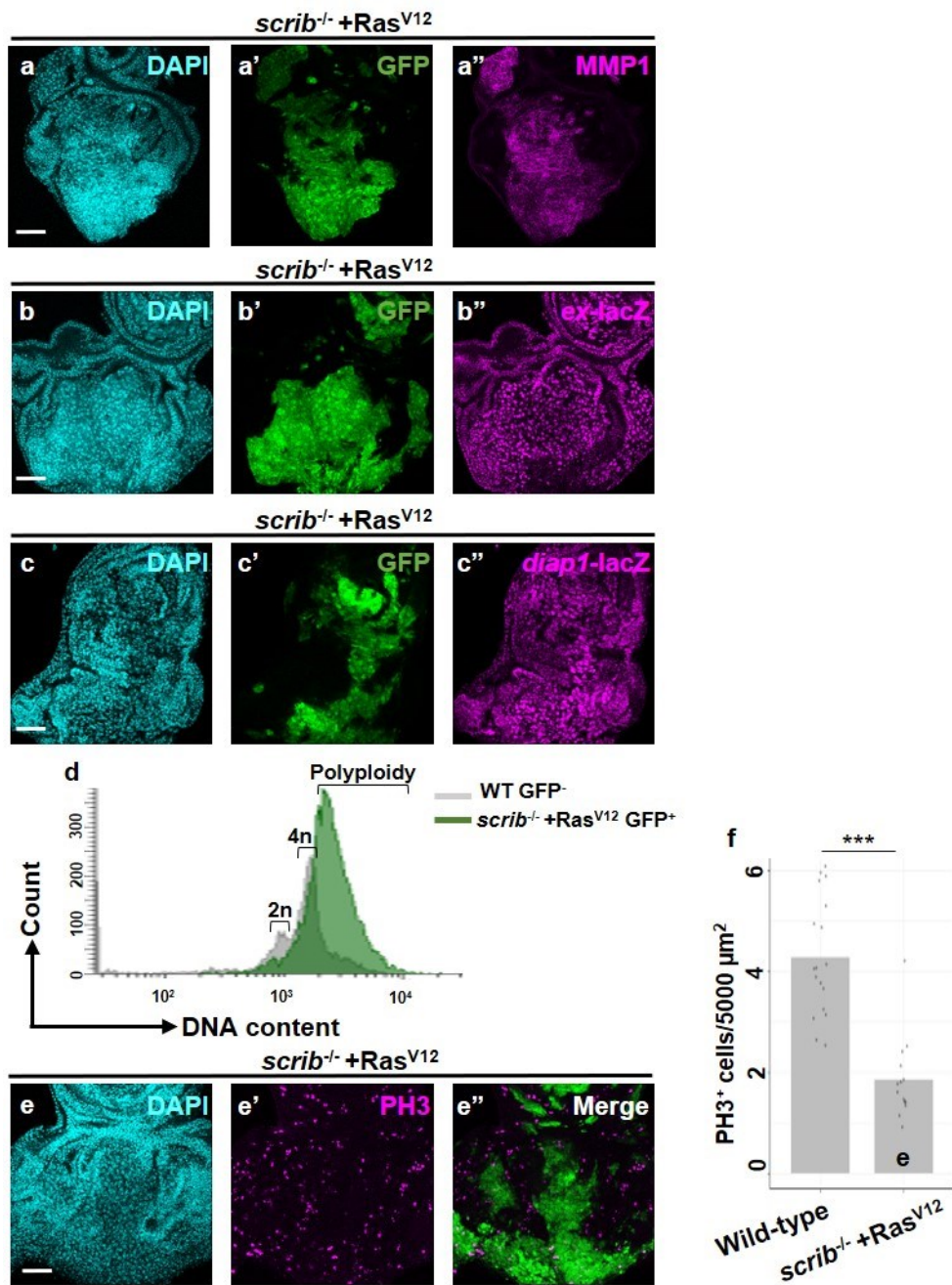


図 11 : *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12} 腫瘍組織において多倍体肥大化細胞が存在する

(a, b, c, e) MARCM 法により、(a, e) *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12}、(b) *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12}+*ex-LacZ*、(c) *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12}+*diap1-LacZ* のモザイククローンを複眼原基に誘導した。(a) *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12} のモザイククローンを複眼原基に誘導し、抗 MMP1 抗体で免疫染色を行った。(b, c) *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12}+*ex-LacZ* (b)、*scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12}+*diap1-LacZ* (c) のモザイククローンを複眼原基に誘導し、抗 beta Galactosidase 抗体で免疫染色を行った。(e) *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12} のモザイククロー

ンを複眼原基に誘導し、抗 PH3 抗体を用いて免疫染色を行った。(d) FACS 解析を用いて DNA 量を測定した。GFP⁻ 野生型細胞、GFP⁺ *scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 細胞。(f) GFP で標識した Wild-type (n=18)、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} (n=14) のクローン 5000 μm²あたりの PH3⁺ 細胞数の統計データである。

ショウジョウバエの遺伝子型：*eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l* (a and e), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ex-LacZ; FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l* (b), *eyFLP1/+ or Y; Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+; Diap1-LacZ, FRT82B, Tub-Gal80/UAS-Ras^{V12}, FRT82B, scrib^l* (c),

次に、腫瘍組織において多倍体肥大化細胞が *rab5* 変異細胞と同様のメカニズムで誘導されるかどうかを調べた。腫瘍細胞群の FACS 解析の結果と一致し、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍細胞核の体積は正常細胞より、肥大化していることが分かった (図 12a, 12d)。興味深いことに、BsK^{DN} を発現させて JNK シグナルを抑制する、あるいは CycB を過剰発現させると、腫瘍細胞の多倍体肥大化が顕著に抑制されることが分かった (図 12b, 12c, 12d)。実際に、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍細胞においては *rab5* 変異細胞と同様に CycB の発現が抑制されていた (図 12e)。つまり、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍細胞の多倍体肥大化メカニズムは *rab5* 変異細胞と共通であることが分かった。最後に、この多倍体肥大化が腫瘍の進展・悪性化に寄与するのかどうかを調べた。GFP で標識した *scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍細胞を複眼原基に誘導すると、過剰に増殖し、極めて大きい細胞クローンが形成されるのに対し (図 12f, 12g, 12j)。興味深いことに、JNK シグナルを抑制する、あるいは、CycB を過剰発現させるによって腫瘍細胞の多倍体肥大化を抑制すると、腫瘍細胞の過剰な増殖が顕著に抑制された (図 12h, 12i, 12j)。また、*scrib*^{-/-}+Ras^{V12} 腫瘍細胞が高い浸潤・転移能を示すのに対し (図 12k)、CycB の過剰発現により多倍体肥大化を抑制すると、それら腫瘍細胞の浸潤・転移能が完全に抑制さ

れた (図 12)。これらの結果から、腫瘍組織に存在する多倍体肥大化した細胞は腫瘍の進展・悪性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

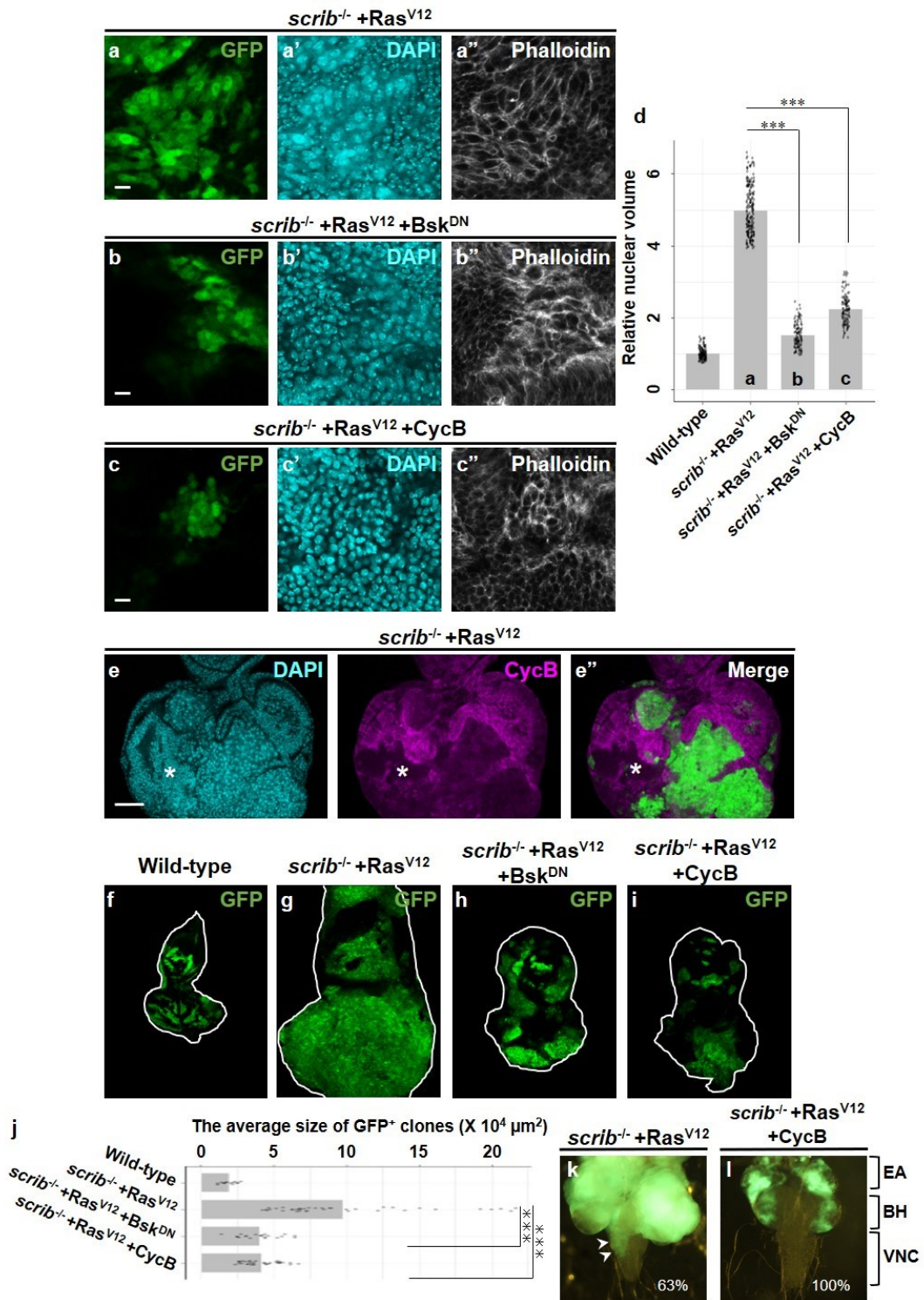


図 12 : 多倍体肥大化細胞は腫瘍の進展・悪性化に重要な役割を果たす

(a, b, c, e, f, g, h, i, k, l) MARCM 法により、(a, e, g, k) GFP で標識した *scrib*^{-/+}Ras^{V12}、(b, h) GFP で標識した *scrib*^{-/+}Ras^{V12}Bsk^{DN} (c, i, l) *scrib*^{-/+}Ras^{V12}+CycB、(f) 野生型のモザイククローンを複眼原基に誘導し、(a, b, c) Phalloidin を用いて F-actin を標識した。

(e) GFP で標識した *scrib*^{-/+}Ras^{V12} のモザイククローンを複眼原基に誘導し、抗 CycB 抗体で免疫染色を行った。(d) 野生型 (n=136)、*scrib*^{-/+}Ras^{V12} (n=220)、*scrib*^{-/+}+Ras^{V12}+Bsk^{DN} (n=120)、*scrib*^{-/+}Ras^{V12}+CycB (n=120) それぞれの細胞核の、野生型細胞核に対する相対的な大きさの統計データである。(j) 野生型 (n=14)、*scrib*^{-/+}Ras^{V12} (n=39)、*scrib*^{-/+}Ras^{V12}+Bsk^{DN} (n=21)、*scrib*^{-/+}Ras^{V12}+CycB (n=36) クローンサイズの統計データである。(k, l) 複眼原基 (EA)、脳 (BH)、腹部神経索 (VNC) を含む頭部複合体を示す。(k) GFP で標識した *scrib*^{-/+}Ras^{V12} 腫瘍細胞は 7 日以降複眼原基から腹部神経索に転移する表現型が観察される (矢印をしめすところ)。9 日以降高頻度に観察される (63%, n=16)。(l) GFP で標識した *scrib*^{-/+}Ras^{V12}+CycB の幼虫は 9 日までに全て蛹となり、腫瘍細胞の転移現象が観察されなかった (100%, n=42)。

ショウジョウバエの遺伝子型 : *eyFLP1*; *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP/+*; *FRT82B*, *Tub-Gal80/UAS-Ras^{V12}*, *FRT82B*, *scrib^l* (a, e, g and k), *UAS-Bsk^{DN}/+* or *Y*; *eyFLP5*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP/+*; *FRT82B*, *Tub-Gal80/UAS-Ras^{V12}*, *FRT82B*, *scrib^l* (b and h), *eyFLP1/+* or *Y*; *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP/UAS-CycB*; *FRT82B*, *Tub-Gal80/UAS-Ras^{V12}*, *FRT82B*, *scrib^l* (c, i and l), and *eyFLP1/+* or *Y*; *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP/+*; *FRT82B*, *Tub-Gal80/ FRT82B* (f).

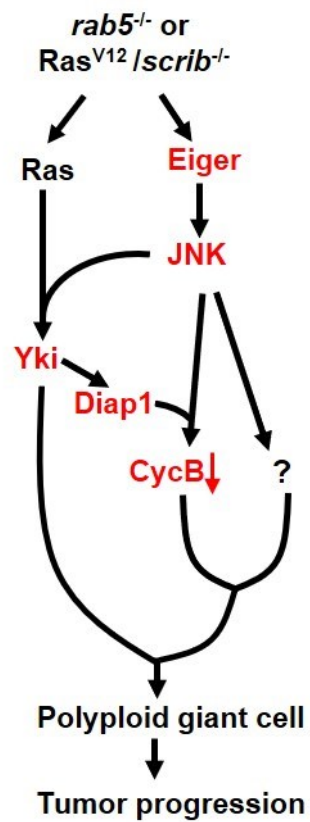


図 13 : 多倍体肥大化細胞は腫瘍の進展・悪性化に重要な役割を果たしている

rab5 変異細胞または *scrib*^{-/-}/Ras^{V12} 細胞では、JNK シグナルと Ras シグナルが協調し、Yki を活性化する。Yki の活性化は下流遺伝子である Diap1 の発現を誘導し、この Diap1 が JNK シグナルと協調することで CycB の発現が抑制され、多倍体肥大化が誘導される。形成された多倍体肥大化細胞は腫瘍の進展・悪性化に重要な役割を果たす。

4. まとめと考察

本研究は多倍体肥大化のメカニズムと腫瘍形成におけるその役割を明らかにした。具体的には、*rab5* 変異細胞または *scrib*^{-/-}/*Ras*^{V12} 細胞においては、JNK シグナルと Ras シグナルが協調し、Yki を活性する。そして、Yki の活性化は下流遺伝子である Diap1 を発現させ、JNK シグナルと協調し、G2/M 移行に必要な CycB の発現を抑制することにより DNA Endoreplication を誘導する。さらに本研究では、形成された多倍体肥大化細胞は腫瘍の進展・悪性化に重要であることを明らかにした (図 13)。ここで、CycB^{-/-}+Yki 細胞は DNA Endoreplication が引き起こされるが、核の体積は *rab5* 変異細胞あるいは *scrib*^{-/-}+*Ras*^{V12} 細胞の核の体積より小さいため、JNK の下流で細胞の多倍体肥大化を制御する因子が CycB 以外にほかの因子も存在すると考えられた (図 13)。

ショウジョウバエ及び哺乳類実験系を用いた複数の先行研究により、JNK シグナルが細胞周期の停止を誘導することが示唆されている^{21,29,30,31,32}。しかしながら、その詳細なメカニズムはいまだ不明であった。本研究の結果から、JNK シグナルは、細胞周期の M 期の開始に必要な CycB の発現を抑制することで細胞周期の停止を誘導することが分かった。また、JNK シグナル依存的細胞周期の停止には Yki の標的遺伝子である Diap1 が必要であることが分かった。哺乳類実験系を用いた研究により、RING ドメインを持つ E3 リガーゼであるがん抑制遺伝子 BRCA1 が CycB タンパク質を分解し、M 期の開始を阻害することが分かっている³³。興味深いことに、Diap1 も同様に RING ドメインを持ち、E3 リガーゼとして機能することが知られている³⁴。そして、CycB は BRCA1、APC (anaphase promoting complex) または PSC (posterior sex combs) により、ユビキチン化されて分解することが分かっている^{33,35,36}。これらの事実から、JNK シグナルはある基質をリン酸化して、Diap1 が直接的あるいは間接的 CycB をユビキチン化して分解していく可能性が考えられる。

一方で本研究の結果から、エンドサイトーシスに関連する *rab5*、*vps25*、*erupted*、*avalanche* など“腫瘍性がん抑制因子”遺伝子の変異細胞において、腫瘍細胞 (*scrib*^{-/-}/*Ras*^{V12}) と同じメカニズムで DNA Endoreplication が起こり、多

倍体肥大化することが明らかとなった。また、*scrib*^{-/-}/*Ras*^{V12}腫瘍組織の FACS 解析結果から、この腫瘍組織には異数体細胞が存在すると考えられる。“腫瘍性がん抑制因子” 遺伝子の変異細胞は Unpaired (Upd, IL-6 のホモログ) を分泌し、周囲の細胞を増殖させることがこれまでに報告されている^{1,17,37,38}。また、JNK シグナルと Ras シグナルが協調して Upd を誘導することも報告されている³⁰。*scrib*^{-/-}/*Ras*^{V12}腫瘍細胞において JNK シグナルと Ras が活性化していることを考えると²⁷、多倍体肥大化細胞が高率的に Upd を分泌して周囲の細胞の増殖を促進するという、細胞非自律的な腫瘍の進展・悪性化に貢献している可能性がある。興味深いことに、ヒトの乳がん組織には異数体細胞が存在することが報告されている³⁹。また、JNK シグナルと YAP (Yki, ショウジョウバエのホモログ) が活性化していること^{40,41}。さらにはマウスを用いた解析により、YAP シグナルは肝細胞の多倍体細胞分裂及び発がんを促進し、ヒトの肝細胞がんの進展に関連するという報告がなされている⁴²。このことは、本研究で発見した JNK/YAP 依存的な多倍体肥大化のメカニズムがヒトのがんにおいても保存され、がんの進展・悪性化に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

5. 参考文献

1. Takino, K., Ohsawa, S. & Igaki, T. Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*. *Dev. Biol.* **395**, 19–28 (2014).
2. Davoli, T. & de Lange, T. The Causes and Consequences of Polyploidy in Normal Development and Cancer. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **27**, 585–610 (2011).
3. Fox, D. T. & Duronio, R. J. Endoreplication and polyploidy: insights into development and disease. *Development* **140**, 3–12 (2013).
4. Øvrebø, J. I. & Edgar, B. A. Polyploidy in tissue homeostasis and regeneration. *Dev.* **145**, (2018).
5. Zhang, S. *et al.* Generation of cancer stem-like cells through the formation of polyploid giant cancer cells. *Oncogene* **33**, 116–128 (2014).
6. Hariharan, I. K. & Bilder, D. Regulation of Imaginal Disc Growth by Tumor-Suppressor Genes in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 335–361 (2006).
7. Zerial, M. & McBride, H. Rab proteins as membrane organizers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 107–117 (2001).
8. Mitchell, N. C. *et al.* The Ecdysone receptor constrains wingless expression to pattern cell cycle across the *Drosophila* wing margin in a cyclin B-dependent manner. *BMC Dev. Biol.* **13**, 1 (2013).
9. Bilder, D., Li, M. & Perrimon, N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science (80-.)*. **289**, 113–116 (2000).
10. Menut, L. *et al.* A mosaic genetic screen for *Drosophila* neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation. *Genetics* **177**, 1667–1677 (2007).
11. Lee, T. & Luo, L. Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451–461 (1999).
12. Golic, K. G. & Lindquist, S. The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *drosophila* genome. *Cell* **59**, 499–509 (1989).

13. Xu, T. & Rubin, G. M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223–1237 (1993).
14. Brand, A. H. & Perrimon, N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415 (1993).
15. Duffy, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: A fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1–15 (2002).
16. Igaki, T. *et al.* Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* **21**, 3009–3018 (2002).
17. Herz, H.-M. Vps25 Mosaics Display Non-Autonomous Cell Survival and Overgrowth, and Autonomous Apoptosis. *Development* **133**, 1871–1880 (2006).
18. Robinson, B. S. & Moberg, K. H. *Drosophila* endocytic neoplastic tumor suppressor genes regulate Sav/Wts/Hpo signaling and the c-Jun N-terminal kinase pathway. *Cell Cycle* **10**, 4110–4118 (2011).
19. Uhlirova, M. & Bohmann, D. JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *EMBO J.* **25**, 5294–5304 (2006).
20. Glise, B., Bourbon, H. & Noselli, S. hemipterous encodes a novel *drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* **83**, 451–461 (1995).
21. Gutierrez, G. J. *et al.* JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G₂/M DNA damage checkpoint. *J. Biol. Chem.* **285**, 14217–14228 (2010).
22. Lindqvist, A. Cyclin B–Cdk1 activates its own pump to get into the nucleus. *J. Cell Biol.* **189**, 197–9 (2010).
23. Huang, J., Wu, S., Barrera, J., Matthews, K. & Pan, D. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP. *Cell* **122**, 421–434 (2005).
24. Goyal, L., McCall, K., Agapite, J., Hartwig, E. & Steller, H. Induction of apoptosis by *Drosophila* reaper, hid and grim through inhibition of IAP function. *EMBO J.* **19**, 589–597 (2000).

25. Brumby, A. M. & Richardson, H. E. scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J.* **22**, 5769–5779 (2003).
26. Pagliarini, R. A. & Xu, T. A Genetic Screen in *Drosophila* for Metastatic Behavior. *Science (80-.)*. **302**, 1227–1231 (2003).
27. Igaki, T., Pagliarini, R. A. & Xu, T. Loss of Cell Polarity Drives Tumor Growth and Invasion through JNK Activation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **16**, 1139–1146 (2006).
28. Doggett, K., Grusche, F. A., Richardson, H. E. & Brumby, A. M. Loss of the *Drosophila* cell polarity regulator Scribbled promotes epithelial tissue overgrowth and cooperation with oncogenic Ras-Raf through impaired Hippo pathway signaling. *BMC Dev. Biol.* **11**, (2011).
29. Sabapathy, K. *et al.* Distinct roles for JNK1 and JNK2 in regulating JNK activity and c-Jun-dependent cell proliferation. *Mol. Cell* **15**, 713–725 (2004).
30. Ohsawa, S. *et al.* Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression through Hippo signalling in *Drosophila*. *Nature* **490**, 547–551 (2012).
31. Gong, F. R. *et al.* PP2A inhibitors arrest G2/M transition through JNK/Sp1-dependent down-regulation of CDK1 and autophagy-dependent up-regulation of p21. *Oncotarget* **6**, 18469–18483 (2015).
32. Wang, H. *et al.* Erianin induces G2/M-phase arrest, apoptosis, and autophagy via the ROS/JNK signaling pathway in human osteosarcoma cells in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **7**, (2016).
33. Shabbeer, S. *et al.* BRCA1 targets G2/M cell cycle proteins for ubiquitination and proteasomal degradation. **32**, 5005–5016 (2013).
34. Xu, D. *et al.* Genetic control of programmed cell death (apoptosis) in *Drosophila*. **3**, 78–90 (2009).
35. Hershko, A. Mechanisms and regulation of cyclin degradation. *FASEB J.* **11**, 1571–1576 (1997).
36. Mohd-Sarip, A. *et al.* Transcription-independent function of polycomb group protein PSC in cell cycle control. *Science (80-.)*. **336**, 744–747 (2012).

37. Moberg, K. H., Schelble, S., Burdick, S. K. & Hariharan, I. K. Mutations in erupted, the *Drosophila* ortholog of mammalian tumor susceptibility gene 101, elicit non-cell-autonomous overgrowth. *Dev. Cell* **9**, 699–710 (2005).
38. Giebel, B. & Wodarz, A. Tumor Suppressors: Control of Signaling by Endocytosis. *Curr. Biol.* **16**, R91–R92 (2006).
39. Frierson, H. F. Ploidy analysis and S-phase fraction determination by flow cytometry of invasive adenocarcinomas of the breast. *American Journal of Surgical Pathology* **15**, 358–367 (1991).
40. Davidson, B. *et al.* The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma. *Gynecol. Oncol.* **102**, 453–461 (2006).
41. Maugeri-Saccà, M. *et al.* The Hippo transducers TAZ and YAP in breast cancer: Oncogenic activities and clinical implications. *Expert Rev. Mol. Med.* **17**, 1–10 (2015).
42. Zhang, S. *et al.* Hippo Signaling Suppresses Cell Ploidy and Tumorigenesis through Skp2. *Cancer Cell* **31**, 669-684.e7 (2017).

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、京都大学生命科学研究科高次生命科学専攻システム機能学分野の井垣達吏先生および大澤志津江先生、生体制御学分野の松田道行先生、細胞周期学分野の石川冬木先生、細胞増殖統御学分野の豊島文子先生に心より感謝申し上げます。実験手技や研究全般につきまして親切にご指導頂きました榎本将人先生、山銅ゆかり氏、佐奈喜祐哉氏、日々ご助言いただいた研究室の皆様にも深く感謝申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Bojie Cong, Shizue Ohsawa & Tatsushi Igaki

JNK and Yorkie drive tumor progression by generating polyploid giant cells in *Drosophila*. *Oncogene*, 37, pages3088–3097 (2018)

<https://www.nature.com/articles/s41388-018-0201-8>