

高インスリン血症はがん抑制性細胞競合を破綻させ
腫瘍化を促す

佐奈喜 祐哉

目次

要旨	3
1. 序論.....	5
2. 材料及び実験手法.....	9
使用したショウジョウバエ系統.....	9
細胞競合誘導システムおよび組織特異的ノックダウンシステム	10
細胞競合に必要な遺伝子を探索する遺伝学的スクリーニング	13
ショウジョウバエ成虫原基の蛍光抗体染色およびコンフォーカル顕微鏡.....	14
<i>scrib</i> クローンサイズの定量, および排除速度と増殖速度の解析.....	15
GPH シグナルの定量.....	16
Dilp2-HF 循環量の定量.....	17
遺伝子発現量の定量.....	18
競合する細胞の単離.....	19
タンパク質合成能の評価	20
エサ組成および薬剤処理	21
統計解析.....	22
3. 結果.....	23
<i>chico</i> ヘテロ変異体は細胞競合を抑制する	23
<i>chico</i> はインスリン産生細胞で機能し複眼原基での細胞競合を遠隔的に制御する	27
インスリン産生細胞での <i>chico</i> の低下は高インスリン血症を引き起こす.....	32
過剰な循環 Dilp2 が <i>scrib</i> 変異細胞の腫瘍化を促す.....	35
高インスリン血症は <i>scrib</i> 変異細胞のインスリンシグナルを活性化させる.....	37
mTor-タンパク質合成経路の低い活性により <i>scrib</i> 変異細胞は排除されている	42
高栄養食によるインスリンレベルの上昇でも <i>scrib</i> 変異細胞の排除は抑制される	45
2型糖尿病薬であるメトホルミンにより細胞競合の破綻は回避できる.....	47
4. まとめと考察	50
5. 補遺 (使用したショウジョウバエの遺伝子型)	54
6. 謝辞.....	59
7. 参考文献.....	60

要旨

2型糖尿病や肥満などの代謝性疾患は、がんの罹患率を高めることが知られている。これまで、これらの疾患に併発する高インスリン血症が発がんリスクを高めると示唆されてきたが、その生物学的メカニズムはわかっていなかった。本研究はショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングから、高インスリン血症が「細胞競合」と呼ばれるがん抑制機構を破綻させ、発がんリスクを高めていることを明らかにした。

細胞競合は、正常細胞が異常細胞を認識し組織から排除する現象である。上皮組織から発生する腫瘍では、頂底極性の崩壊が頻繁に観察される。同様の極性崩壊が頂底極性を司る *scrib* 遺伝子のホモ変異細胞（以降、*scrib* 変異細胞）でも見られる。ショウジョウバエにおいても、*scrib* 変異細胞の頂底極性が崩壊すると無秩序な細胞増殖を引き起こし、腫瘍が形成される。しかし、周囲に正常細胞が存在する状態ではがん抑制性細胞競合が機能し、正常細胞が *scrib* 変異細胞を認識し細胞死を誘導することで腫瘍化を未然に防ぐ。

著者が所属する研究室では、がん抑制性細胞競合のメカニズム解析を目的として、ショウジョウバエの染色体欠損ライブラリーを用いたドミナントモディファイヤースクリーニングを実施し、インスリン受容体基質である *chico* 遺伝子のヘテロ変異体では、本来排除されるはずの *scrib* 変異細胞が腫瘍化することを明らかにした。著者が細胞競合における *chico* 遺伝子の役割を解析した結果、*chico* 遺伝子は野生型細胞と *scrib* 変異細胞との細胞間相互作用には寄与せず、脳に位置するインスリン産生細胞（以降、IPCs）から複眼原基での細胞競合を遠隔的に制御していることが明らかになった。IPCs で *chico* 遺伝子の発現量を減少させるとショウジョウバエインスリン様ペプチド2 (*Dilp2*) 遺伝子の発現が亢進し、ヘモリンフ（ショウジョウバエ血液）中の *Dilp2* 循環量が増加する高インスリン血症になることが分かった。この高インスリン血症は複眼原基中の *scrib* 変異細胞のインスリン-mTOR シグナル経路を異常に活性化し、その結果 *scrib* 変異細胞のタンパク質合成能が異常に亢進することで細胞競合が破綻することが分かった。

血中インスリン濃度は食餌によっても変動することが知られている。ショウジョウバエの食餌に含まれる乾燥酵母の量を増やし循環 *Dilp2* 量を増加させると、細胞競合が破綻し *scrib* 変異細胞の排除率が低下した。2型糖尿病治療の第一選択薬であるメトホルミンは、疫学的にがん罹患率の上昇を抑えることが知られている。本研究では、メトホルミンが *scrib* 変異細胞に作用することで高インスリン血症に起因する細胞競合の破綻を抑制することを示した。

本研究は、至近距離の細胞間相互作用でのみ制御されると考えられてきた細胞競合に、システミックな制御が存在することを新たに示した。さらに、疫学的に示されていたがんリスクに、細胞競合という概念を導入することでその生物学的メカニズムを明らかにした。

1. 序論

ヒトのがんのほとんどは、上皮細胞に由来することが知られている¹⁻⁴。正常な上皮細胞は、組織の表面を覆い組織の形態を維持することで組織内部と外部環境を隔てる役割を担う（図1a正常上皮）。このために、上皮細胞は明確な頂底極性を示すが、*scrib* 遺伝子に代表される極性遺伝子の変異細胞では組織の形態を無視した細胞増殖が起き、腫瘍を形成する^{1,5}（図1a良性腫瘍）。良性腫瘍は、さらに変異を蓄積し浸潤・転移能を獲得することで最終的には細胞社会の秩序を無視し、生命機能を破壊する悪性腫瘍になる⁶⁻⁸（図1a悪性腫瘍）。このように腫瘍悪性化は多段階的な変異蓄積プロセスを経ることが知られており^{7,8}、このがん化プロセスの初期段階においては、1細胞もしくは数細胞の変異細胞が上皮組織に出現すると考えられている⁹。頂底極性を司る *scrib* 遺伝子のホモ変異細胞(以降、*scrib* 変異細胞)では、頂底極性を失い良性腫瘍を形成する能力を獲得する^{1-3,10}。しかし、正常細胞に周囲を囲まれるように出現した *scrib* 変異細胞は、細胞死を起こし組織から排除され腫瘍化しない^{11,12}。この現象は「がん抑制性細胞競合」と呼ばれ、細胞間相互作用を介して正常細胞が *scrib* 変異細胞を認識/排除するがん抑制機構として機能する^{13,14}（図1b）。

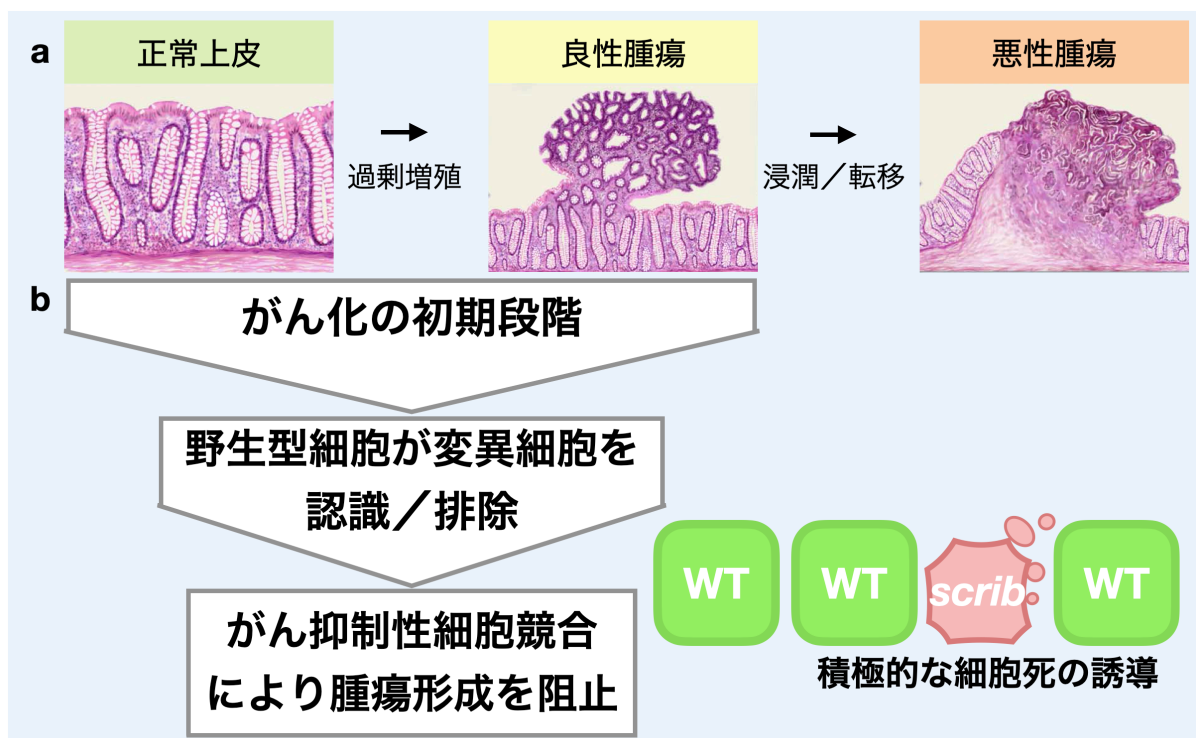


図1. がん化プロセスの初期段階における良性腫瘍細胞と野生型細胞の相互作用

a, 正常な大腸上皮では組織の表面を覆い外部環境との境界を作るが、がん遺伝子変異を獲得すると無秩序に増殖する腫瘍を形成する良性腫瘍となる。さらに変異を獲得することで、組織の境界を無視し浸潤/転移する悪性腫瘍となる。b, 腫瘍が悪性形質を獲得する以前の初期段階にお

いては、がん遺伝子変異細胞(図中 *scrib*)が正常細胞(図中 WT)に囲まれる。その結果、変異細胞と野生型細胞の間に相互作用が生じ、がん抑制性細胞競合が機能することで変異細胞は積極的に組織から排除されることで腫瘍形成は未然に防がれる。a は Vogelstein et al., *Science*, 2013 より引用・改変。

scrib 変異細胞では、腫瘍と同様の頂底極性の崩壊が起きることが報告されている¹⁵。 *scrib* タンパクは上皮細胞のバソラテラル側に局在し、Lethal giant larvae (Lgl)、Discs large (Dlg)とともに *scrib* 複合体を形成する。この *scrib* 複合体が細胞の頂端側を決定する aPKC タンパクを、バソラテラル側から排除することで、頂底極性を形成/維持している¹⁶。そのため、*scrib* 遺伝子変異は *scrib* 複合体形成を阻害し細胞の頂底極性を崩壊させる。頂底極性の崩壊は良性腫瘍の形成から、これに続く上皮間葉転換(EMT: Epithelial-Mesenchymal Transition)を伴う浸潤・転移まで腫瘍悪性化プロセスの全般に渡って寄与することが知られている^{1-3,10,17,18}。ショウジョウバエにおいても、上皮細胞の頂底極性が崩壊すると本来の組織形態を無視して活発に細胞増殖するため良性腫瘍を形成することが知られている^{17,19}。

scrib 変異細胞は腫瘍形成能を持つ一方で、周囲を野生型に囲まれる *scrib* 変異細胞は腫瘍化せず、むしろ組織から排除される^{11,20-24}。この現象は「がん抑制性細胞競合」と呼ばれ、腫瘍形成を未然に防ぐがん抑制機構の一つであると示唆されている^{13,14,25-28}。これまでに、前がん細胞を排除する細胞競合モデルとして *scrib* 変異細胞や Ras 活性化細胞などが発見され、ショウジョウバエ遺伝学や哺乳類細胞の混合培養系によってそのメカニズムが精力的に解析されている^{8-13, 12,29-31}。

著者が所属する研究室では、これまでにショウジョウバエ遺伝学的解析手法を用いて、*scrib* 変異細胞と野生型細胞の間に働く相互作用を解析し、JNK シグナルや、ELMO シグナル、アクソンガイダンス因子の Slit-ROBO システムや Sas-PTP10D システムが *scrib* 変異細胞の認識/排除を実行することを明らかにしてきた⁸⁻¹³。これらの認識/排除機構では、*scrib* 変異細胞の特徴である頂底極性の崩壊がストレスシグナルである JNK シグナルの活性化を引き起こし、これを起点として *scrib* 変異細胞が周囲の野生型細胞と特徴的な細胞間相互作用を行う。ELMO シグナルは細胞貪食シグナルとして知られ、*scrib* 変異細胞と接触する野生型細胞において活性化し、*scrib* 変異細胞を貪食し排除する^{11,21}。Slit-ROBO および Sas-PTP10D シグナルの両者はアクソンガイダンス因子として知られ、軸索誘導時にトランス相互作用によりリパルシブ(反発的)な反応を引き起こす^{32,33}。細胞競合でも同様の役割を果たし、野生型細胞と *scrib* 変異細胞の間でトランスインタラクションすることで *scrib* 変異細胞の排除に寄与している^{22,23}。さらに、近年では自然免疫経路である Toll シグナルが *scrib* 変異細胞の排除に寄与していることも明らかにしている²⁴。以上の知見か

ら、がん抑制性細胞競合には多様な細胞間相互作用が機能し、強固ながん抑制システムとして働いていることがわかる。これらのメカニズムを俯瞰してみると、野生型細胞と *scrib* 変異細胞との間には、接触性もしくは至近距離の細胞間相互作用が機能し *scrib* 変異細胞の認識／排除が行われることがわかる。

scrib 変異細胞と野生型細胞間の相互作用が明らかになる一方で、生体内のどのような環境が細胞競合に必要なのかはわかっていない。ヒトの疫学研究では、2型糖尿病などの代謝性疾患によりがんになるリスクが高まる事がよく知られている³⁴⁻³⁶。2型糖尿病では、血糖値を下げるホルモンであるインスリンの分泌に異常が生じ、本来ほぼ一定に保たれるはずの血糖値が生活する中で異常に増減する。インスリン抵抗性に起因する2型糖尿病では、血糖値が上昇してもインスリンの効果が弱いため、インスリンの過剰分泌が起き血中のインスリン循環レベルが異常に高くなる高インスリン血症を併発する³⁷。

インスリンは血糖値抑制と細胞成長作用に機能することから、高インスリン血症が腫瘍悪性化や腫瘍成長を促すことがこれまで研究されてきた²⁸⁻³⁰。しかしながらがん化プロセスの初期段階において、高インスリン血症が前がん細胞ともいえる変異細胞に対してどのような作用を持つのかは明らかでない。

ヒトではインスリンと Insulin-like Growth Factor(IGF)の2種類が存在するが、ショウジョウバエにはインスリンと IGF の明確な違いのない *Drosophila insulin-like peptide (Dilp)* が存在する³⁸⁻⁴⁰。また、ショウジョウバエにおいても哺乳類と同様に食事などによる血糖値の上昇で *Dilp* の発現および分泌が亢進する^{41,42}。このように、インスリンの生理作用や分泌制御において、哺乳類とショウジョウバエには多く共通点がある。インスリンと発がんの関係を明らかにする上で、遺伝学的解析に優れ自由自在に細胞競合の解析が可能なショウジョウバエは、他のモデル生物に対して大きなアドバンテージがあると言えるだろう。

本研究では、がん抑制性細胞競合と個体の生理状態の関連を調べるため、ショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを実施した。その結果、インスリン受容体基質 *chico* 遺伝子³⁸のヘテロ変異では複眼原基での細胞競合が破綻し、*scrib* 変異細胞が腫瘍化することを発見した。興味深いことに、インスリン産生細胞(IPCs: Insulin Producing Cells)で *chico* の発現量を低下させると *Dilp* の発現／分泌が亢進する高インスリン血症になることが分かった。その後の解析から、高インスリン血症はタンパク質合成のマスターレギュレータであるインスリン-mTor シグナル、およびタンパク質合成能に作用し細胞競合を遠隔的に制御することを突き止めた。

ヒトの疫学研究では、2型糖尿病によるがんリスクが示されている一方で、2型糖尿病用薬メトホルミンが2型糖尿病患者に見られるがんリスクを低減させることも示されている^{43,44}。メトホルミンは AMPK シグナルの活性化を介してタンパク質合

成能力を低下させることが示唆されていることから、高インスリン血症のショウジョウバエにメトホルミンを投与して細胞競合を評価した。その結果、*scrib* 変異細胞の腫瘍化が顕著に抑制されることを突き止めた。

これらのことから本研究では、高インスリン血症が細胞競合を破綻させ腫瘍形成を促す発がんメカニズムを明らかにした。ショウジョウバエを用いた研究ながら、食事や投薬などヒトの疫学研究と対応した結果を得ていることから、2型糖尿病で見られるがんリスクは細胞競合の破綻と関連している可能性を示唆するものである。

2. 材料及び実験手法

使用した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又は成虫の複眼における遺伝学的モザイク法のために用いたテスター系統は以下である。

CC (Cell Competition) Tester: *y,w, eyFLP1; FRT82B, Ubi-GFP, scrib¹/TM6B*

82B MARCM Tester: *y,w, eyFLP1; Act>y+>Gal4, UAS-GFP; FRT82B, Tub-Gal80*

scrib MARCM Tester: *y,w, eyFLP1; Act>y+>Gal4, UAS-GFP; FRT82B, Tub-Gal80, scrib¹*

IPCs-Gal4 Tester: *y,w, eyFLP1; dilp2-Gal4, UAS-GFP; FRT82B, UbiRFP*

このほか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

scrib¹ (D. Bilder)¹⁹, *chico²* and *UAS-chico/dilp2/dilp5* (E. Hafen)³⁸⁻⁴⁰, *gD2HF* (S. K. Kim)⁴².

Stock Center (Kyoto Stock Center: 日本, Bloomington: アメリカ, Vienna *Drosophila*

Resource Center: オーストリア)より分与されたもの

2番染色体 Df ライブラリー (Kyoto Stock Center), *chico¹* (Bloomington #10738), *Dilp2-Gal4* (Bloomington #37516), *chico-RNAi* (VDRC #v101329 and Bloomington #36788), *Dilp2¹* (Bloomington #30881), *tGPH* (Bloomington #8163), *UAS-InR^{DN}* (Bloomington #8252), *UAS-InR^{WT}* (Bloomington #8262), *UAS-S6K* (Bloomington #6910), *UAS-Tor RNAi* (Bloomington #34639), *UAS-NaChBac* (Bloomington #9466), *Ubi-GFP* (Bloomington #5188), *Ubi-RFP* (Bloomington #30555).

細胞競合誘導システムおよび組織特異的ノックダウンシステム

がん抑制性細胞競合を生体内で解析するために、ショウジョウバエ複眼原基に正常細胞と *scrib* 変異細胞をモザイク状に誘導する必要がある。この目的を達成するために、Xu と Rubin によって開発された Flp-FRT 組換え法を用いた遺伝的モザイク法を用いた⁴⁵。この技術は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) に由来する組換え酵素 Flp (Flippase) と、その認識配列である FRT (Flp Recognition Target) を用いることで、体細胞分裂時に染色体の部位特異的な相同組換えを誘導することができる。この部位特異的な相同組換えにより、目的とする遺伝子がホモ変異となる細胞が出現する (図2)。細胞分裂前の親細胞は FRT 配列、目的とする変異、および GFP などのマーカー遺伝子を乗せた染色体 (図2左, 星印付き) と、FRT 配列のみを乗せた染色体をヘテロ接合で持つ (図2左)。これらの染色体は体細胞分裂の相同組換え時に、組換え酵素である Flp が FRT 配列を認識し Flp-FRT 依存的な染色体腕の組換えが起こる (図2中)。その結果、GFP などの可視化マーカーで識別できる遺伝学的背景の異なる娘細胞が3種類出現する (図2右)。それぞれ、目的変異とマーカー遺伝子をホモ接合に持った細胞、ヘテロ接合に持った細胞、および目的変異もマーカー遺伝子も持たない野生型細胞になる。組織や時期特異的なプロモーターにより Flp の発現を制御することで、特定の組織や発生の特定の時期においてのみ、細胞競合を誘導することでその排除を定量的に解析できる。

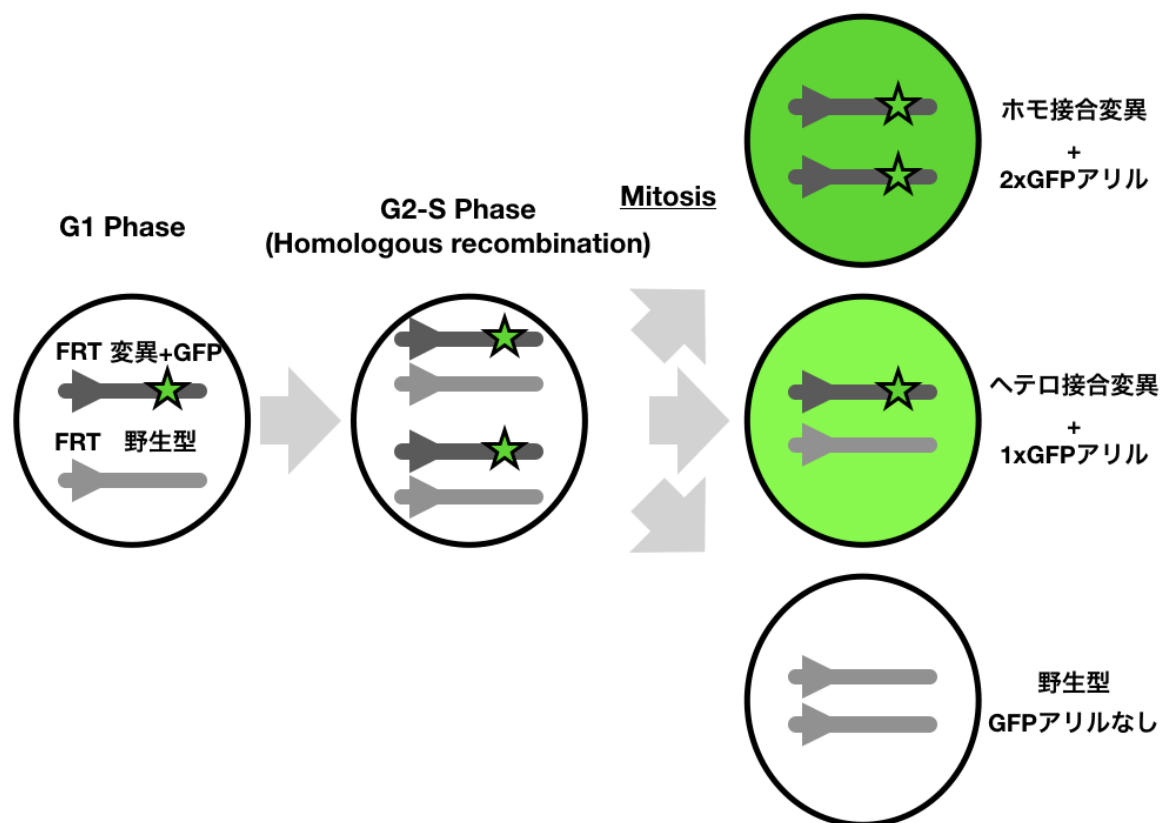


図2. Flp-FRT 組換え法を利用した遺伝的モザイク法

親細胞の体細胞分裂時組み換え酵素 Flp が FRT 配列を認識し染色体を組み換えることで、ホモ接合変異を持つ細胞のモザイク組織を作る。娘細胞は目的遺伝子の変異（緑星）をホモで持つ細胞とヘテロで持つ細胞、野生型アリルしか持たない細胞の3種類にランダムにわかれる。それぞれの細胞は GFP の濃淡によって判別することができる。

次に、上記 Flp-FRT 組み換え法を用いたモザイク誘導により誘導したホモ変異娘細胞にのみ Gal4-UAS システムを用いた遺伝学的操作を行う MARCM (Mosaic analysis with a repressible cell marker) 法⁴⁶の原理を示す(図3)。Gal4-UAS システムは出芽酵母に由来する遺伝子発現システムであり、ショウジョウバエの遺伝子発現システムと交差しないことから、人為的な遺伝子発現操作に用いられる。転写活性因子 Gal4 は UAS (Upstream Activating Sequence) 配列を認識し結合することで UAS の下流に人為的に組み込まれた遺伝子を発現させる。UAS の下流に GFP 遺伝子および遺伝学操作を行うための配列を組み込むことで、特異的な細胞の可視化および遺伝学的操作を可能にする。図3左の G1 phase にある親細胞では、ユビキタスな Tubulin プロモーターの下流に Gal4 の阻害タンパク質 Gal80 が組み込んであるため、全ての親細胞では Gal4-UAS システムが機能せず、GFP ラベルや遺伝学的操作は起こらない。この親細胞の体細胞分裂により上述の Flp-FRT 依存的な組換えが起こり、3種類の遺伝学的背景の異なる娘細胞が形成される。親細胞と同じヘテロ接合の細胞(中段)と Tub-Gal80 を2コピー持つホモ接合の細胞(下段)では Tub-Gal80 の働きによって Gal4-UAS は機能しない。図右上段の、目的とする遺伝子の変異がホモ接合となる細胞では Tub-Gal80 を持たないので Gal4-UAS が機能し細胞は GFP による標識や遺伝学的操作が可能になる。つまり、この MARCM 法は UAS の下流に野生型遺伝子配列や RNAi 配列を組み込むことで、ホモ変異細胞特異的に過剰発現や発現抑制といった遺伝学的操作が可能である。これらの利点から、本研究においては特に明記がない場合はこの MARCM 法を用いてクローンを誘導した。

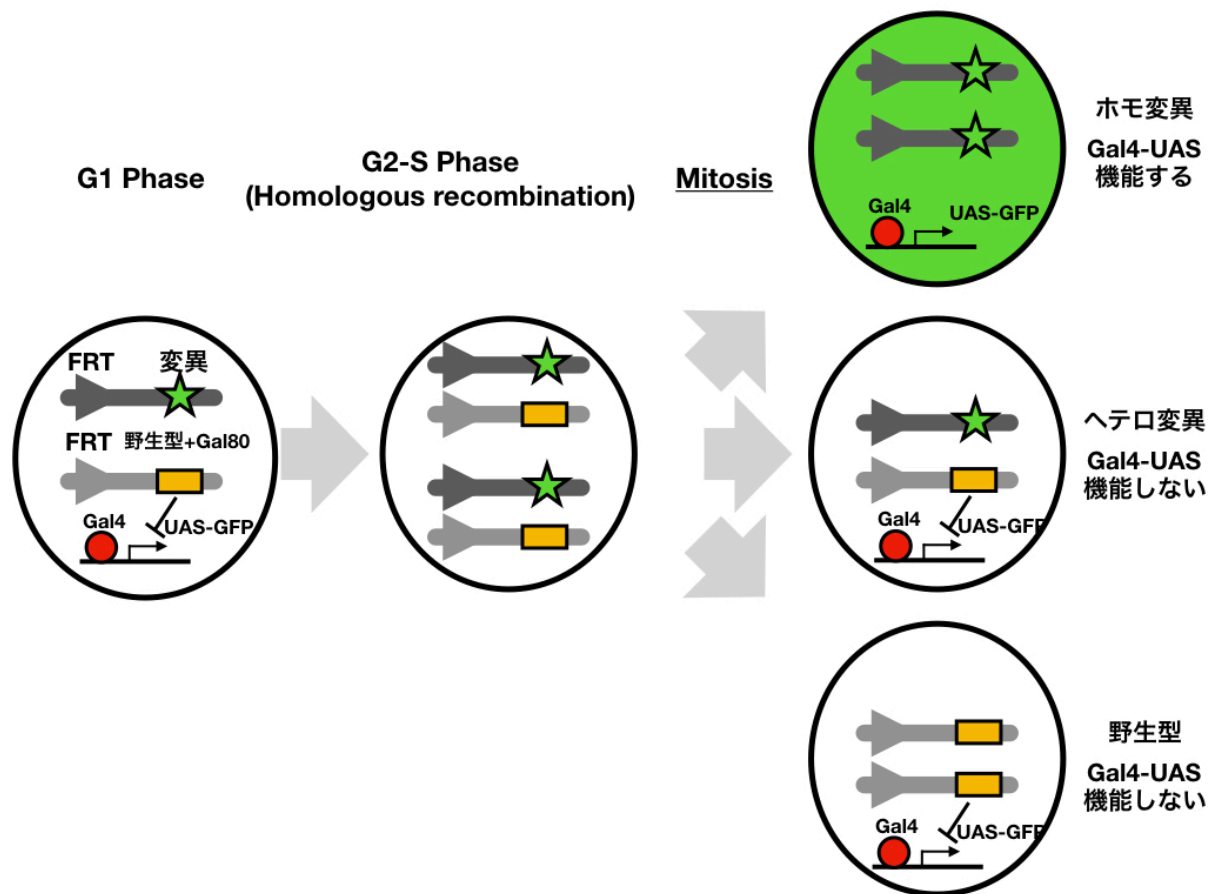


図3. MARCM (Mosaic analysis with a repressible cell marker)法

変異部位（緑星）を含む染色体とは異なる染色体に Gal4 と UAS-GFP を組み込み、目的変異部位と相同な染色体腕に Gal4 の抑制因子 Gal80 を組み込むことで、体細胞組換え後の娘細胞は、変異をホモ接合で持つ GFP(+)細胞とヘテロで持つ GFP(-)細胞、野生型アリルしか持たない GFP(-)細胞の3種類となり、変異を持った細胞でのみ Gal4-UAS を利用した GFP 標識や遺伝子発現操作ができる。

細胞競合に必要な遺伝子を探索する遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエストックセンターには膨大なショウジョウバエ変異系統が維持されており、研究リソースとして利用できる。その中に染色体欠損変異（以降 Df: Deficiency）と呼ばれる、染色体の特定部位を欠損したショウジョウバエストックがある。この Df 変異体ライブラリーを用いることで、細胞競合に必要な遺伝子をコードした染色体部位をスクリーニングすることができる。本スクリーニングは、Df 変異をヘテロ接合で導入し細胞競合を破綻させるドミナント変異を探索するため、ドミナントモディファイヤースクリーニングに分類される。Flp-FRT 特異的な組み換えによる *scrib* 変異細胞クローン誘導に X 染色体および三番染色体を使用するため、本スクリーニングでは 2 番染色体のみスクリーニングを実施できる。

ドミナントファイヤースクリーニングから細胞競合に必要な染色体部位がわかると、その欠損領域に含まれる遺伝子を候補遺伝子として限定できる。その中から責任遺伝子を特定するために、候補遺伝子特異的な変異をヘテロ接合に持つ遺伝背景で細胞競合の破綻を評価した。

ショウジョウバエ成虫原基の蛍光抗体染色およびコンフォーカル顕微鏡

本研究では、ショウジョウバエ3齢幼虫の複眼原基および成虫複眼を用いて細胞競合の評価を行なった。複眼原基におけるクローンサイズ定量および蛍光抗体染色法の基礎操作を以下に示す。複眼原基に GFP クローンの認められるショウジョウバエ3齢幼虫を、PBS 中でピンセットにて解剖した。解剖した幼虫は氷冷 PBS に集め、その後 4% Paraformaldehyde を含むリン酸緩衝液に置換し 20 分間室温で固定する。固定処理ののち、PBS で 20 分×2 回の洗浄を行いサンプルとする。免疫染色には、5% Normal Donkey Serum および 0.1% Triton X-100 を含む PBS をブロッキング溶液として用い、室温 20 分間ブロッキングののちに、ブロッキング溶液に 1:100 の割合で希釈した一次抗体溶液と置換し 4°C で一晩反応させた。一次抗体の洗浄は、PBS に置換して行い 20 分×2 回を室温で行なった。二次抗体反応は、ブロッキング溶液に 1:250 の割合で希釈した二次抗体溶液に置換して、2 時間室温で反応させた。その後、PBS に置換し室温で 20 分間×2 回洗浄したのちに、SlowFade Gold Antifade Mountant with DAPI もしくは without DAPI (Invitrogen) によってスライドガラスにマウントしプレパラートを作成した。作成したサンプルは共焦点顕微鏡 Sp5 もしくは Sp8 (ともに Leica Microsystems) によって蛍光像の取得を行った。断りのない限りスケールバーは 100 μ m を示す。

以下に本研究において使用した抗体と使用濃度及びその供給元を示す。

- rabbit anti-cleaved *Drosophila* DCP1 (Cell Signaling Technology, #9578)
- mouse anti-phospho-histone H3 (Cell Signaling Technology, #9706)
- rat anti-Dilp2⁴⁷
- rabbit anti-Dilp5⁴⁰
- rabbit pAkt Ser 473 (Cell Signaling Technology, #4060)
- rabbit anti-pS6⁴⁸
- Alexa Fluor 405- 488- or 546- or 647- conjugated secondary antibodies (Molecular Probes)

scrib クローンサイズの定量, および排除速度と増殖速度の解析

scrib クローンサイズの定量は, コンフォーカル画像の DAPI 蛍光および GFP 蛍光を用いて計算した. 複眼原基組織全体の大きさを定量するためには DAPI シグナルを, *scrib* クローンの大きさには GFP シグナルを FIJI (Fiji Is Just ImageJ, ImageJ ver. 2.0.0)を用いて, Auto Threshold 機能の Default で閾値を設定しそれぞれの面積を計算した. その値から, クローンサイズ/組織サイズ×100を計算し *scrib* クローンサイズ Total clone area/disc area (%)として用いた.

排除速度の評価には細胞死マーカーである anti-cleaved *Drosophila* DCP1 の蛍光抗体染色を行い, 増殖速度の評価には M 期マーカーである anti-phospho-histone H3 の蛍光抗体染色を用いた. 排除/増殖細胞のカウントには Imaris software (Bitplane)の Point 機能を用いた.

GPH シグナルの定量

インスリンシグナル活性の指標として GPH と呼ばれる GFP に PH ドメインを融合させた蛍光タンパク質プローブを用いた⁴⁹。この GPH プローブをチューブリンプロモーターと繋げ、全身の細胞に発現する tubulin-GPH (以降 tGPH) を 2 番染色体に挿入したショウジョウバエを用いた。GPH が持つ PH ドメインは、インスリン受容体が活性化した細胞に見られる PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) を認識し結合する。PIP3 は細胞膜に局在することから、インスリンシグナルが活性化している細胞では tGPH の蛍光強度が細胞膜上で高くなる。これを利用して、tGPH の蛍光強度を細胞膜部分と細胞質部分とで評価することで、細胞のインスリンシグナル活性を評価する。蛍光強度の計算には画像中の細胞をランダムに選び、FIJI での平均蛍光強度を取得した。測定する細胞をランダムに選ぶためには、画像座標に対応する 1-1024 までの数から R で乱数を生成した。tGPH の平均蛍光強度の取得には、FIJI で測定対象の細胞膜部分とその隣接する細胞質部分に $2 \times 6 \mu\text{m}$ の長方形の選択範囲を作りその範囲の FIJI の平均輝度測定機能で求めた。

Dilp2-HF 循環量の定量

Park らが開発したサンドイッチ ELISA 法を用いて、Dilp2 に HA タグおよび FLAG タグがフュージョンした Dilp2HF 量を評価した⁴²。ヘモリンフ中に循環する Dilp2HF 量を測定するために、幼虫を PBS で洗浄しペーパータオルで表面の PBS を除き、パラフィルム上でピンセットを用いて腹部の体表に傷つけ出血させる。3 から 10 匹の幼虫を出血させ合計 1 μ L のヘモリンフを回収し、55 μ L の PBS に希釈し遠心にて血球細胞を沈殿させ、上清 50 μ L をサンプルとした。このサンプルに 1 μ L の抗 HA-Peroxidase 抗体溶液 (PBS 中 1:500) を加え、抗 FLAG 抗体溶液(BupH Carbonate-Bicarbonate Buffer 中 2.5 μ g/mL)で 4 $^{\circ}$ C 一晩コーティングした Nunc MaxiSorp Flat-Bottom Plate に分注し 4 $^{\circ}$ C で一晩抗体反応させた。このプレートを下に示した洗浄バッファで 6 回洗浄ピンを用いて洗浄する。プレートをペーパータオルに叩きつけてウェルに残った洗浄バッファを除き、室温に戻した 100 μ L の 1-step-Ultra TMB-ELISA Substrate solution を加え、37 $^{\circ}$ C で 20 分反応させ、その後 2M 硫酸を 100 μ L 加えて呈色させ、マイクロプレートリーダー (Sunrise, Tecan) を用いて 450nm の吸光度を求めた。検量線は FLAG(GS)HA 合成ペプチドをスタンダードとして作成した。

使用した抗体およびプレートを以下に示す。

- Nunc MaxiSorp Flat-Bottom Plate (ThermoFisher Scientific, 1983746)
- BupH Carbonate-Bicarbonate Buff packs (as Coating buff, ThermoFisher Scientific, 28382)
- Anti-Flag M2 (Sigma, F1804, 1mg/mL)
- Anti-HA-Peroxidase High Affinity (Roche, 12013819001; 25 μ g/mL by adding 1mL DW)
- FLAG(GS)HA peptide (DYKDDDDKGGGGSY~~PD~~YDVPDYA, 2412Da, 90 μ g/mL, from Seung Kim lab)
- 1-step-Ultra TMB-ELISA Substrate solution (Thermo-Fisher Scientific 34028)
- PBStw (Wash Buffer, 500mL PBS + 1mL Tween20)
- Blocking buffer (PBStw + 2% BSA, filter-sterilized)
- 2M/4N Sulfuric acid (nacalai tesque, 95628-86)

遺伝子発現量の定量

遺伝子発現を定量するために qRT-PCR 法を用いた。NucleoSpin RNA XS (MACHEREY-NAGEL)を用いたカラム法にて total RNA を単離し、SuperScript IV Reverse transcriptase VILO (Thermo Fisher Scientific)を用いて逆転写反応を行い cDNA の合成を行なった。この cDNA をサンプルとして THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO) を用いて、StepOnePlus system (Thermo Fisher Scientific)にて qRT-PCR を行なった。結果の評価には StepOne software (Thermo Fisher Scientific)を用いて比較検量法にて発現量を求めた。発現のノーマライズには alpha-tubulin⁵⁰を採用した。

使用したプライマーを以下に示す。

- *tubulin*³⁷
Fw-TGTCGCGTGTGAAACACTTC
Rv-AGCAGGCGTTTCCAATCTG
- *InR*⁵¹
 - Fw-ACAAAAATGTAAACCTTGCAAATCC
Rv-GCAGGAAGCCCTCGATGA
- *Dilp2* (Primer3, <https://primer3plus.com>)
Fw-ACGAGGTGCTGAGTATGGTGTGCG
Rv-CACTTCGCAGCGGTTCCGATATCG
- *Dilp5* (Primer3, <https://primer3plus.com>)
Fw-TGTTCGCCAAACGAGGCACCTTGG
Rv-CACGATTTGCGGCAACAGGAGTCG

競合する細胞の単離

競合する細胞を単離するために蛍光活性化細胞選別を行なった。3 齢幼虫の複眼原基を解剖し、PBS で洗浄したのちに、TrypLE™ Select Enzyme 10x (Thermo Fisher Scientific)に置換し 37°C 10 分反応させて細胞を分散させた。その後、PBS での洗浄を 3 回繰り返し TrypLE™ Select Enzyme を除き、FBS を含まない Schneider's Drosophila medium (Thermo Fisher Scientific)に分注し FACS Aria II (BD Bioscience)にて GFP と RFP の蛍光で細胞を分取した。手法は Khan らの論文を参考にした⁵²。

タンパク質合成能の評価

競合する細胞のタンパク質合成能を評価するために、Click-iT™ Plus OPP Alexa Fluor™ 647 Protein Synthesis Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いた。3 齢幼虫を Schneider's medium (Thermo Fisher Scientific)内で解剖する。新鮮な Schneider's medium に 20 μ M となるよう O-propargyl-puromycin (OPP) を加え、解剖した幼虫を集め、室温で 10 分間 OPP を細胞に取り込ませた。その後、マニュアルの通り Click-iT 法を用いて OPP を Alexa Fluore647 で標識を行い、コンフォーカル顕微鏡で評価した。

エサ組成および薬剤処理

ショウジョウバエの交配には、テスター系統の処女バエ 10-15 匹とオスの変異体ハエ 5 匹をエサの含まれるプラスチックバイアル内で飼育した。飼育バイアルは 25°C で静置し、ショウジョウバエの交配および幼虫の成長を行った。餌の組成は、100mL 中に、コーンミール 4.0g (Oriental Yeast), 乾燥酵母 4.0g (Asahi Food), グルコース 1.6g (nacalai tesque), 寒天末 0.8g (nacalai tesque) を加え MilliQ 水で調製し、電子レンジで沸騰させてからプラスチックバイアルに 5 mL ずつ分注した。上記のレシピを普通食とし、高栄養食では乾燥酵母量の量をそれぞれ、2 x : 4.0g, 3 x: 8.0g, 4 x: 16.0g となるよう調製した。

メトホルミン (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) は水に溶解し、指定した濃度となるように 5mL の餌に加え、ピペットでよくかき混ぜた。

統計解析

グラフは R (ver. 3.4.1) および RStudio (Ver. 1.0.153)を用いて作図し，断りのない限り棒グラフで平均値を，赤点でそれぞれの生データをプロットした．統計検定は各図に示したものをを用いた．p 値が 0.05 以下の場合に*，0.01 以下の場合に**，0.001 以下の場合に***を記した．

3. 結果

chico ヘテロ変異体は細胞競合を抑制する

ショウジョウバエにおいて、極性形成遺伝子 *scrib* のホモ変異細胞は過剰な増殖を起こし腫瘍を形成する^{15-17,19,20}。一方で、*scrib* 変異細胞と野生型細胞がモザイク状に混在する組織では *scrib* 変異細胞は腫瘍化せず、むしろ細胞死を起こして組織から排除される^{11,21}。この時、*scrib* 変異細胞と野生型細胞の境界面において細胞間分子、sas-PTP10D システムや Slit-ROBO システムが機能し *scrib* 変異細胞が排除されることが知られている^{22,23}。これらの細胞間相互作用により、*scrib* 変異細胞は周囲の野生型細胞により認識され、積極的に組織から排除されている。この現象は細胞競合と呼ばれ、特に極性崩壊細胞など前がん細胞を排除するものを「がん抑制性細胞競合」と呼ぶ(図4)。

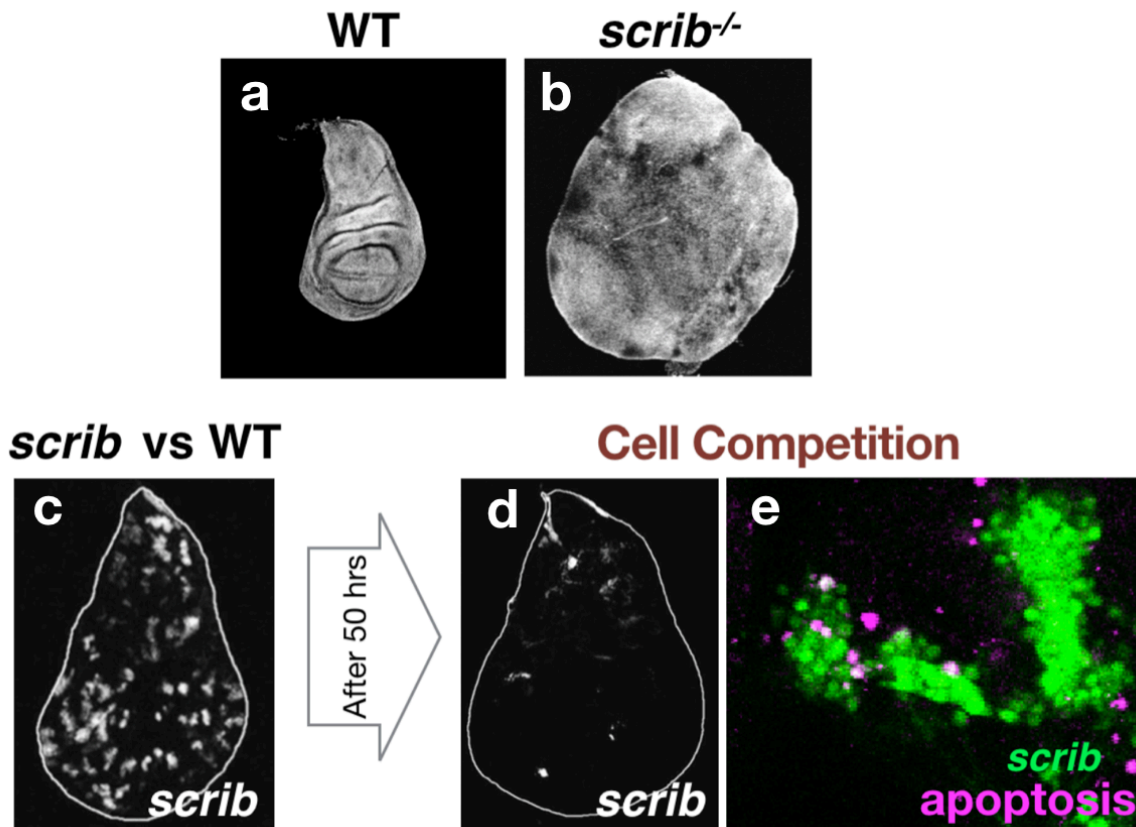


図4. *scrib* ホモ変異細胞は細胞競合により組織から排除される

a, 正常なショウジョウバエの成虫原基(翅原基)と比べて b, *scrib* ホモ変異細胞のみの成虫原基は本来のサイズや形態を失い腫瘍化する。c, 一方で *scrib* ホモ変異クローン(白)が周囲を野生型細胞に囲まれモザイク組織では, d, 時間とともに *scrib* ホモ変異細胞は組織から排除される。e, これは細胞競合と呼ばれる現象で, *scrib* 変異細胞 (緑) は周囲の野生型細胞から積極的に細胞死 (マゼンタ) が誘導されることが知られている。(本データ a-d は井垣達吏博士から提供を受けた)

このがん抑制性細胞競合のメカニズムや役割が明らかになる一方で、疫学的に示唆されるがんリスクと細胞競合の破綻に関連は見出されていなかった。そこで、よりがん抑制性細胞競合の理解を深めるために本研究室ではドミナントモディファイヤースクリーニングを行なった。ドミナントモディファイヤースクリーニングとは、個体の全身にヘテロ変異を導入してある現象に必要な遺伝子を探索する方法である。本研究の場合、ショウジョウバエ複眼原基に誘導された *scrib* 変異細胞競合に必要な遺伝子を探索するために、染色体欠損変異体ライブラリーを用いてスクリーニングした。染色体欠損ライブラリーを用いるメリットは染色体上の遺伝子をほぼ網羅して探索できることにある。細胞競合を引き起こすための遺伝学的操作に X 染色体と 3 番染色体が必要なため、本研究では 2 番染色体の染色体欠損変異体をヘテロ接合に持たせた状態で、複眼における *scrib* 変異細胞競合を評価した。このスクリーニングでは、CC テスターと呼ばれる系統を用い GFP および赤色色素で標識される *scrib* 変異クローンをショウジョウバエ成虫複眼で誘導した。野生型ショウジョウバエで細胞競合を誘導すると、既知の通り細胞競合が機能することで *scrib* クローンは組織から排除され腫瘍は見られなかった（図 5 a-no tumor）。スクリーニングでは、この実験系に染色体欠損をヘテロ変異体として導入し、*scrib* 変異細胞の腫瘍化を指標に行なった（図 5 a-small or massive tumors）。スクリーニングの結果、当研究室卒業生の木澤大輔氏が重複する範囲を持つ 3 つの染色体欠損変異体で *scrib* 変異細胞の腫瘍化を観察した（図 5 b）。これらの変異体に重複する欠損部位を探索したところ、2 番染色体のおおよそ 10240-10260kb の範囲にしばられ、この範囲には 7 つの遺伝子がコードされていることが分かった。

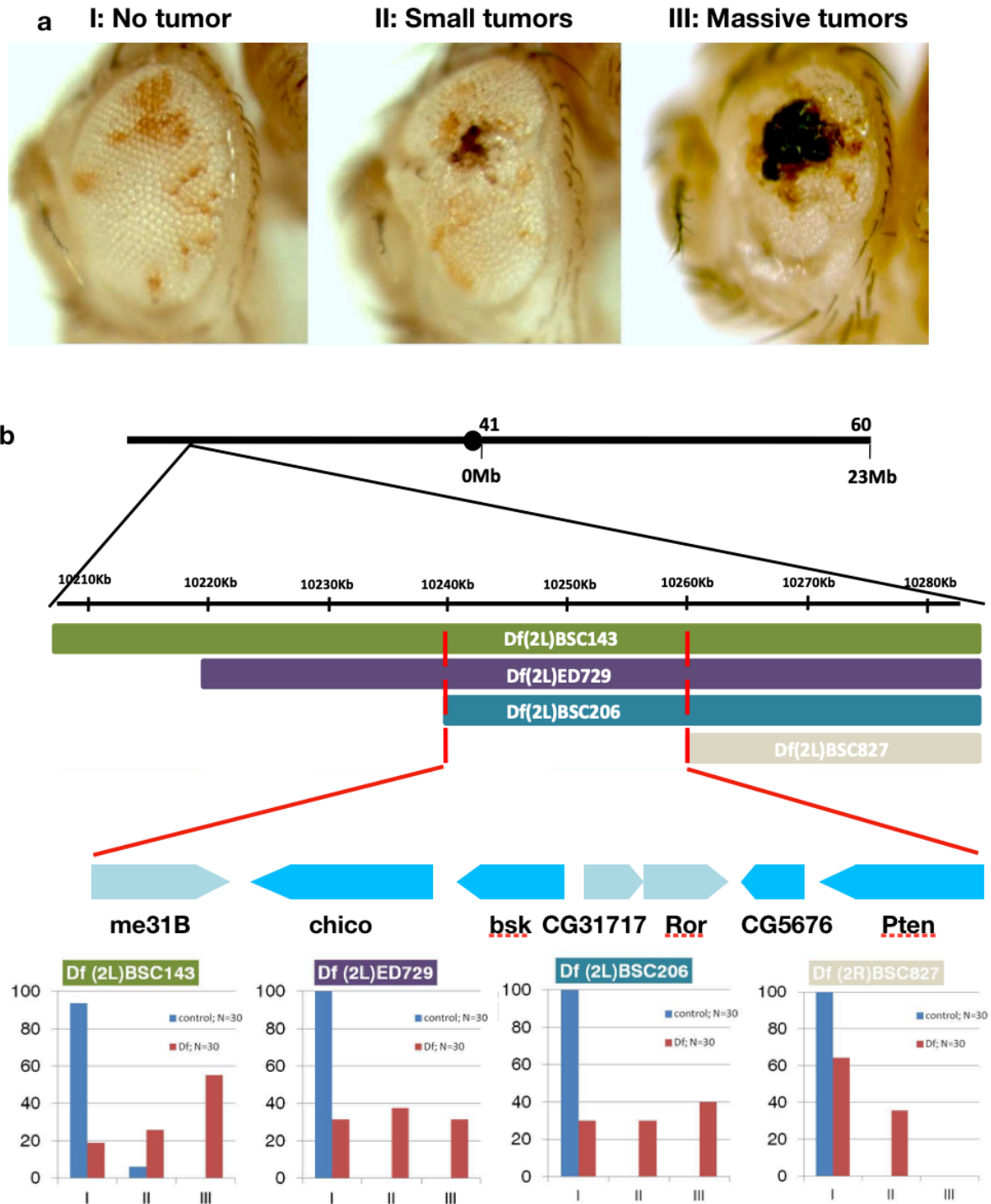


図5. *scrib* 変異細胞の排除を担うドミナントモディファイヤースクリーニング

a, スクリーニングに用いた基準, 正常に細胞競合が起これば *scrib* 変異細胞は排除され腫瘍化しないが, 染色体欠損部位が細胞競合に影響すればその程度により腫瘍化する. b, スクリーニングにより得られた3つの染色体欠損変異体がカバーするゲノム領域とコードされている遺伝子. (本データ b は木澤大輔氏から提供を受けた)

chico はインスリン産生細胞で機能し複眼原基での細胞競合を遠隔的に制御する

chico はインスリン受容体基質をコードしていることから、競合している細胞のいずれかでインスリンシグナルが重要であると考えられた。そこで、競合する *scrib* 変異細胞および野生型細胞で MARCM 法を用いた *chico* のノックダウンを行いその際の細胞競合を評価した。その結果、驚くべきことに *chico* を *scrib* 変異細胞でノックダウンした場合にも、野生型細胞でノックダウンした場合にも *scrib* 変異細胞は腫瘍化しないことが分かった (図 7)。この結果は、*chico* が細胞間相互作用とは異なる様式で細胞競合を制御している可能性を示す。

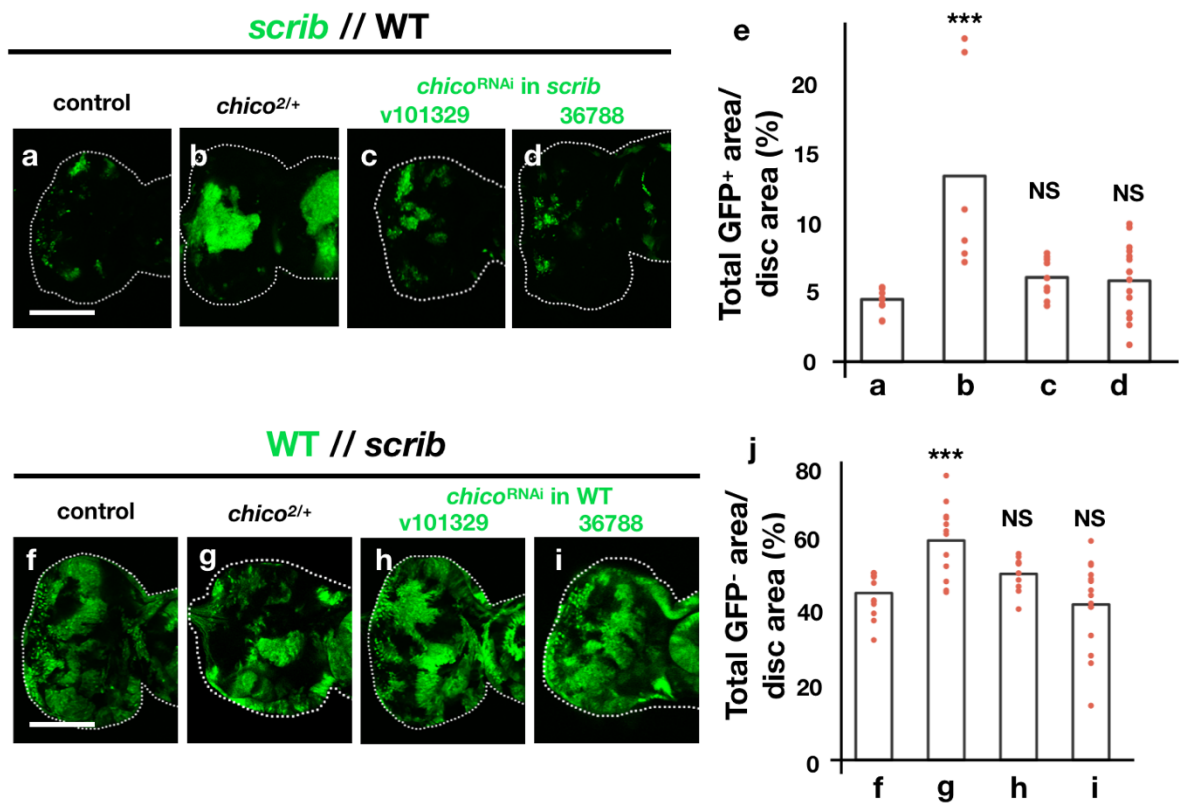


図 7. *chico* は *scrib* 変異細胞にも周囲の野生型細胞にも細胞競合に必要な

上段では *scrib* クローンで *chico* をノックダウン、下段では野生型クローンで *chico* をノックダウンした結果。(a, f)野生型個体での *scrib*^{-/-} vs 野生型、(b, g) *chico* ヘテロ変異体での *scrib*^{-/-} vs 野生型、上段 (c, d) *scrib*^{-/-} でのみ *chico* をノックダウンしたもの、下段(h, i)野生型クローンでのみ *chico* をノックダウンしたもの。e, j, クローンサイズの定量結果。n=10 (a), 10 (b), 11 (c), and 10 (d), 13 (f), 11 (g), 10 (h), and 12 (i)。**p<0.01 by Dunnett test.

ショウジョウバエは細胞競合が起きている複眼原基以外にも体内に各種の臓器を持ち、その中には複眼原基と臓器間相互作用しうるものがある。このことから、*chico* が臓器間相互作用を介して細胞競合を制御している可能性を考えた。これを検証するために、複眼原基に細胞競合を誘導し、同時に *chico* を臓器特異的にノックダウンする実験系を立ち上げた (図8)。

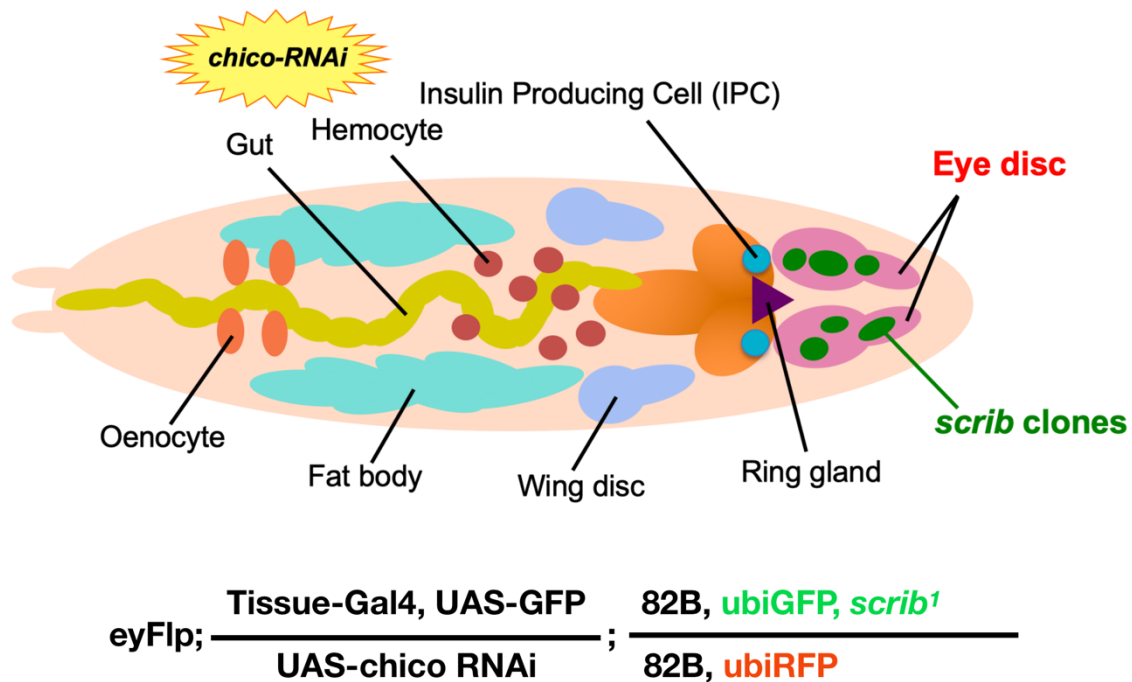


図8. *chico* の組織間相互作用を検証するための新規遺伝学的解析系

FRT82B を利用した組み換えにより複眼原基に *scrib* クローンを誘導する。同時に Gal4-UAS システムを利用して組織特異的に *chico* をノックダウンすることができる。使用した組織特異的 Gal4 ドライバーは、OK304-Gal4 and OK72-Gal4 (エノサイト), myo-Gal4 and esg-Gal4 (腸), cg-Gal4 and ppl-Gal4 (脂肪体), nub-Gal4 and 30A-Gal4 (翅原基), hml-Gal4 (ヘモサイト), dilp2-Gal4 (インスリン産生細胞), P0206-Gal4 (リンググランド), and ey-Gal4 (複眼原基)。

この実験系を用いて探索した結果、インスリン産生細胞（以降 IPCs: Insulin Producing Cells）で *chico* をノックダウンすると *scrib* 変異細胞が複眼原基で腫瘍化することが分かった（図 9 a, b, and e）. この腫瘍化が細胞競合の破綻によるものか評価するために、複眼原基で蛍光免疫染色の定量解析を行なった. その結果、*scrib* 変異細胞の細胞死が有意に減少し、細胞増殖には変化が認められなかったことから、*chico* は IPCs から遠隔的に細胞競合を制御していることが示唆された（図 9 c, d, and f-h）.

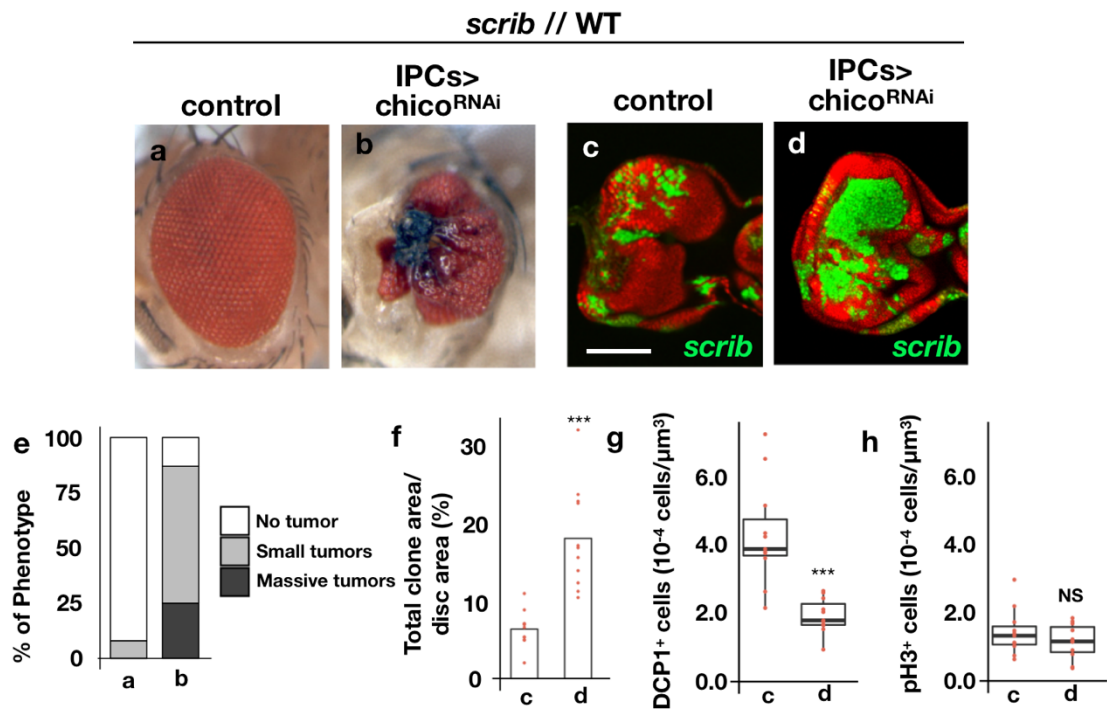


図 9. *chico* はインスリン産生細胞（IPCs）から遠隔的に細胞競合を制御する

(a, b) 組織特異的ノックダウンテスターを用いて複眼に誘導した細胞競合. 野生型個体では見られない腫瘍が *chico* をインスリン産生細胞 IPCs でノックダウンした個体では有意に現れる. (e) 成虫複眼における腫瘍化頻度の定量結果. n=140 (a) and 88 (b). p<0.001 by Pearson's Chi-squared test. (c, d) 複眼原基上の *scrib* 細胞(緑)および野生型細胞(赤)クローン. (f-h) *scrib* クローンサイズおよび細胞死, 細胞分裂の定量結果. n=17 (c) and 12 (d). ***p<0.001. 細胞死 (anti-cleaved-Dcp-1 antibody staining) および 細胞分裂 (anti-phospho-histone H3 antibody staining) .

さらに検証するために、*chico* ヘテロ変異体で見られた *scrib* 変異細胞の腫瘍化が、野生型 *chico* を IPCs で過剰発現する事でレスキューされるか試みた。その結果、IPCs 特異的な野生型 *chico* の過剰発現により *chico* ヘテロ変異体で見られた *scrib* 変異細胞の腫瘍化が有意に抑えられた (図 10)。すなわち、*chico* ヘテロ変異体での表現系は IPCs での *chico* 発現量低下によるものであることがわかった。

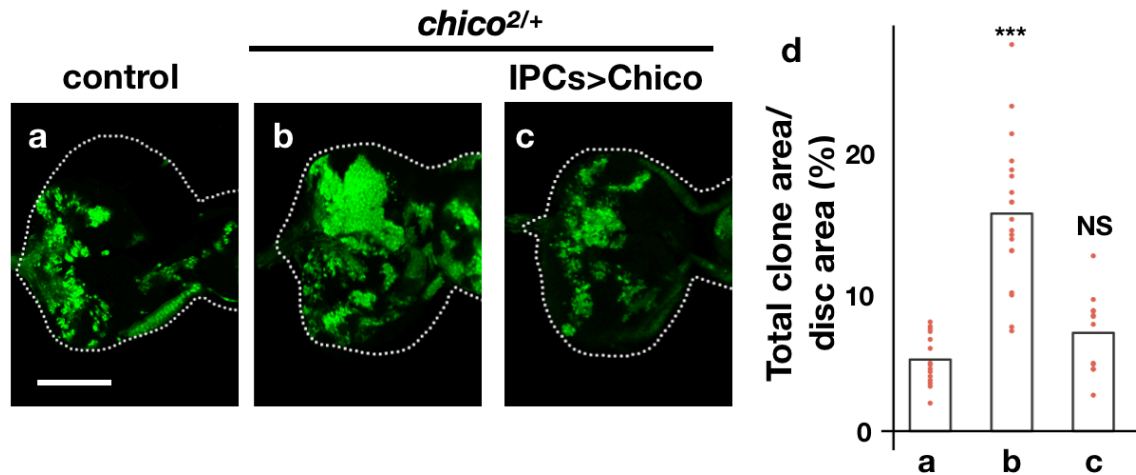


図 10 IPCs での野生型 *chico* 過剰発現は *chico* ヘテロ変異体の表現系をレスキューする (a-c) それぞれ、野生型個体での *scrib* vs 野生型, *chico* ヘテロ変異体での *scrib* vs 野生型, IPCs で野生型 *chico* を過剰発現した *chico* ヘテロ変異体での *scrib* vs 野生型. d はクローンサイズの定量結果. n=15 (a), 19 (b), and 12(c). ***p<0.001 by Dunnett test.

さらに *chico* はインスリン受容体基質であることから、IPCs では *chico* 以外のインスリンシグナル因子も重要であると予想される。そこで、インスリン受容体（以降 InR）のドミナントネガティブフォームおよびその下流の PI3K の RNAi を IPCs で発現させ *scrib* クローンのサイズを定量した。その結果、InR および PI3K を IPCs で低下させると *chico* を低下させた場合と同様の結果を得た（図 1 1）。以上のことから、*chico* は IPCs から遠隔的に細胞競合を制御していることが明らかになった。

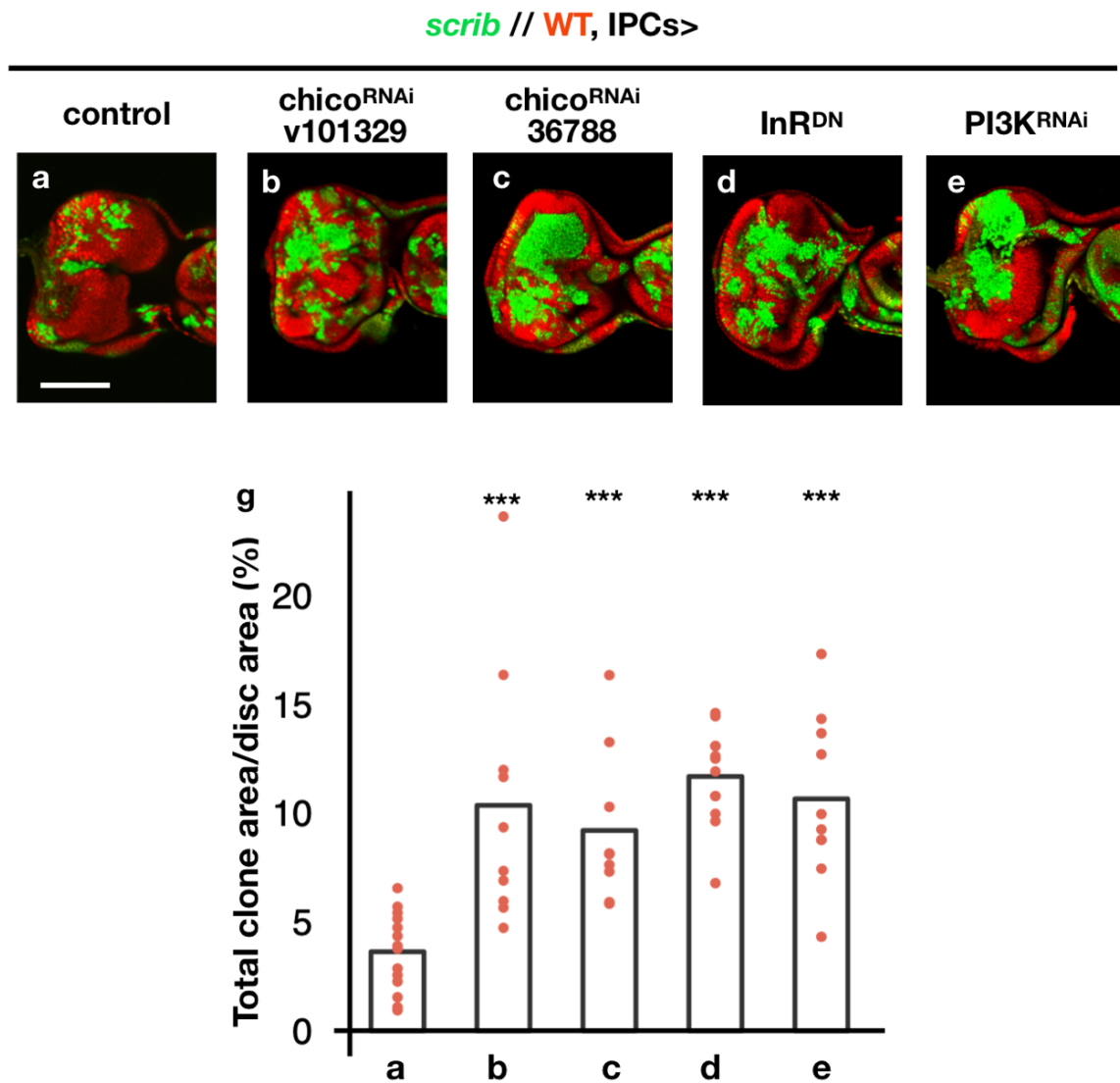


図 1 1. IPCs からの遠隔的な細胞競合の制御はインスリンシグナルが担う

(a) コントロール個体での *scrib* vs 野生型, (b-e) IPCs でインスリンシグナル因子をノックダウンした個体での *scrib* vs 野生型. 順に *chico* の RNAi 2 種類, InR ドミナントネガティブ型, PI3K RNAi を発現させた結果. g, クローンサイズの定量結果. n=14 (a), 10 (b), 9 (c), 12 (d), 9 (e). ***p<0.001 by Dunnett test.

インスリン産生細胞での *chico* の低下は高インスリン血症を引き起こす

次に、IPCs における *chico* の機能を解析した。ショウジョウバエの IPCs は脳に細胞クラスターをつくり、ヒトの膵臓ランゲルハンス島β細胞と相同した内分泌器官である。既知の通り、β細胞はインスリンを産出し、血中に放出することで血糖値を正常に保つ役割がある。ショウジョウバエの IPCs も同様の機能を持ち、ショウジョウバエインスリン様ペプチド(以降 *Drosophila insulin-like peptide*: Dilp)の Dilp 2, 3, および 5 をヘモリンフ中に分泌し血糖値の調節および個体成長の調節を行なっていることが知られている^{39-41,47,53,54}。そこで、*chico* が低下した IPCs における Dilp の発現を検証するために、Dilp2, 3, および 5 の遺伝子発現を qRT-PCR 法で定量した。RNA の回収にはショウジョウバエ 3 齢幼虫の脳を単離して行なった。その結果、Dilp2 と Dilp5 遺伝子の発現量がコントロールと比べて *chico* ヘテロ変異体では約 2 倍に増加していた (図 1 2 a)。IPCs 特異的な *chico* ノックダウンでの効果を検証すると、Dilp2 および Dilp5 の遺伝子発現量はコントロールと比較して約 7.5 倍にまで増えること分かった (図 1 2 b)。

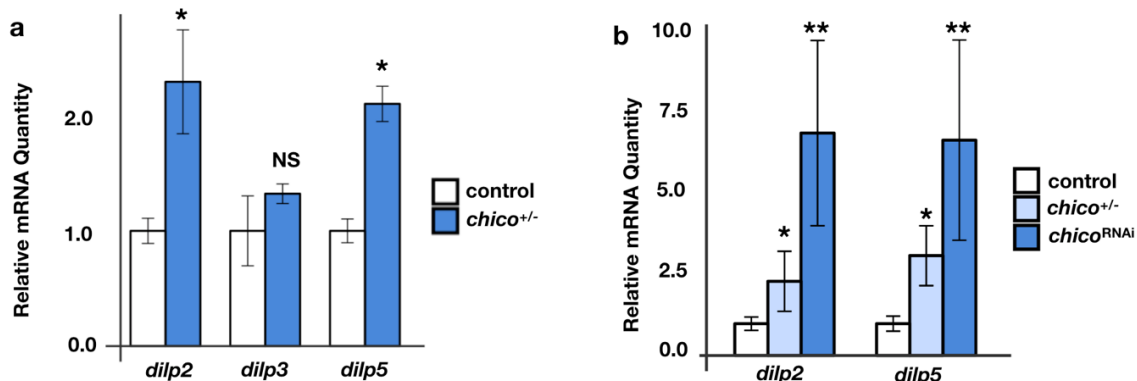


図 1 2. IPCs で *chico* が低下することにより *Dilp2* および *5* の遺伝子発現が上昇するリアルタイム qPCR 法で定量した Dilp 遺伝子発現量. a では野生型個体と *chico* ヘテロ変異体の比較. b は野生型個体, *chico* ヘテロ変異体および *chico* を IPCs 特異的にノックダウンした個体での発現量を定量した. n=3. Mean±SD. **p<0.01, ***p<0.001 by Dunnett test.

この発現量の上昇が Dilp の生合成に結びついているか検証するために、Dilp2 および Dilp5 特異的な抗体を用いて蛍光免疫染色を行なった。その結果、コントロールでは Dilp2 および Dilp5 ペプチドの染色像はほとんど見られなかった一方で、*chico* ヘテロ変異体および IPCs 特異的な *chico* ノックダウンでは顕著に Dilp2 および Dilp5 ペプチドの抗体染色像に変化が見られた (図 1 3 a)。これらの蛍光画像の定量解析から、IPCs 自体のサイズは *chico* ヘテロやノックダウンの影響は受けないことが分かり、Dilp2 および Dilp5 の染色像の輝度が有意に高くなることがわかった (図 1 3 b-d)。この結果は、Dilp2 および Dilp5 遺伝子発現の上昇がペプチド合成量を増加させていることを示唆している。

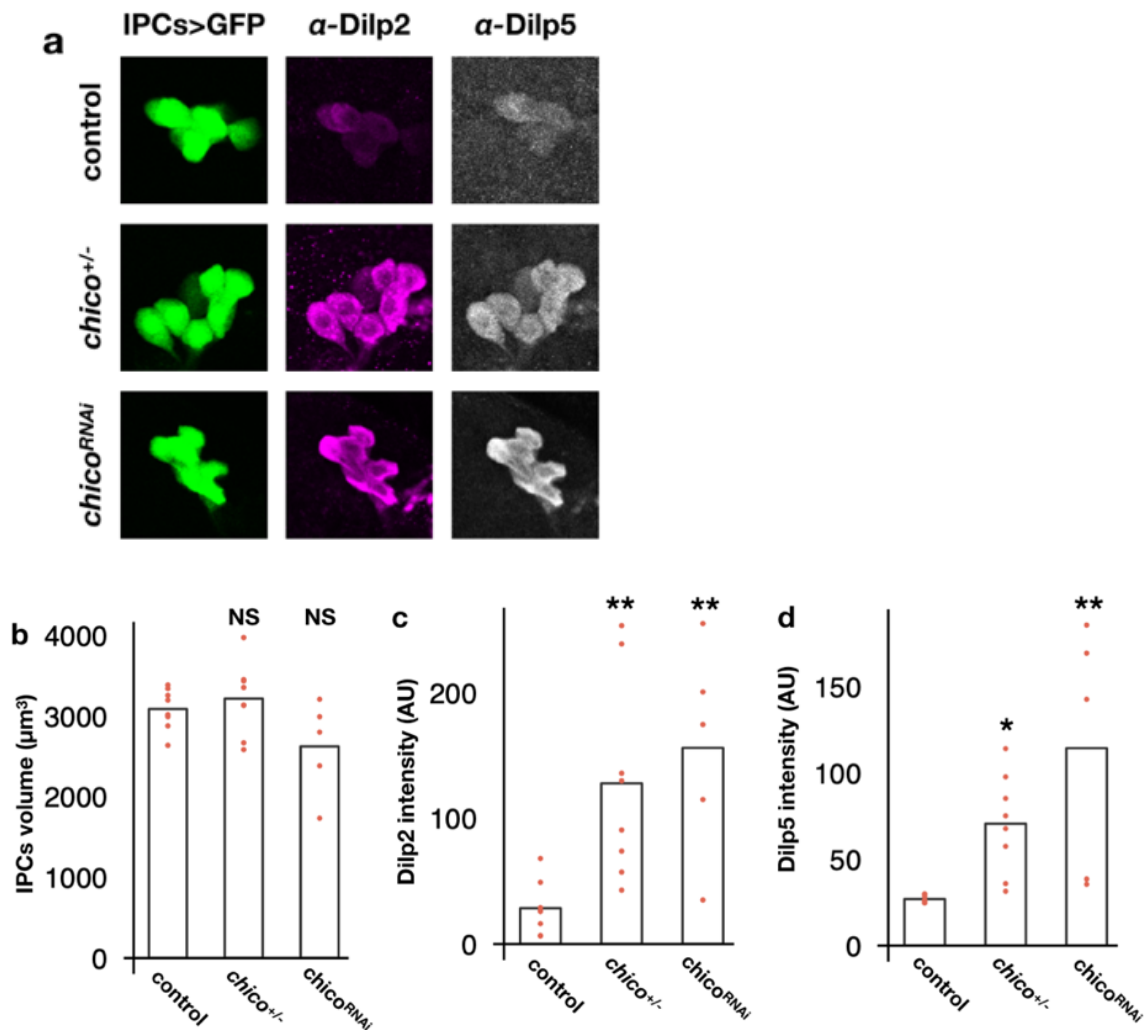


図13. IPCsでの *chico* の低下は Dilp2 および Dilp5 ペプチドの生合成を高める

(a) Dilp2 および 5 特異的な抗体を用いた免疫染色法で IPCs での Dilp 生合成を評価した。GFP での IPCs の標識 (緑), Dilp2 抗体染色 (マゼンタ), Dilp5 抗体染色 (白)。b, GFP 標識から求めた IPCs サイズの定量。c, d, それぞれ抗体染色の輝度を定量したもの。n=8 (control), 8 (*chico*^{+/-}), and 5 (IPC 特異的な *chico* ノックダウン)。*p<0.05, **p<0.01 by Dunnett test.

さらに、ヘモリンフ中の Dilp 循環量が上昇しているのか測定を試みた。内在性の Dilp 循環量を測定する手法は確立されていないため、Park らが 2014 年に発表した サンドイッチ ELISA 法を採用した⁴²。この手法では Dilp2 遺伝子の両端に HA タグと FLAG タグを融合させた組み換え遺伝子 (以降 Dilp2-HF) から発現するペプチドの循環量を定量する。尚、この Dilp2-HF の発現は内在性遺伝子と同様の発現制御を受けることがわかっている。この手法を用いて野生型および *chico* ヘテロ変異体の 3 齢幼虫からヘモリンフを採取し循環 Dilp2-HF 量を測定したところ、*chico* ヘテロ変異体では顕著に上昇することがわかった (図14a)。

また、この過剰に分泌されている Dilp が生理的活性を持つか評価するために、脂肪体（肝臓に相同した組織）でのインスリンシグナル活性を評価した。インスリンシグナル活性の評価には GPH と呼ばれる蛍光タンパクプローブを用いた。GFP に PH ドメインを融合させた組み換え蛍光タンパク質であり、この GPH プローブをチューブリンプロモーターと繋げ、全身の細胞に発現する tubulin-GPH（以降 tGPH）を用いた⁴⁹。細胞がインスリンシグナルを活性化すると、PI3K が細胞膜上の PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) を PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) へとリン酸化する。GPH を構成する PH ドメインは、PIP3 を認識し結合するので、インスリンシグナルが活性化している細胞では tGPH がより細胞膜に局在することになる。これを利用して、細胞膜部分と細胞質部分の tGPH 蛍光強度を比較することで、細胞のインスリンシグナル活性を評価する。野生型と *chico* ヘテロ変異体の脂肪体細胞の GPH 局在を評価したところ、*chico* ヘテロ変異体ではコントロールと比べて細胞膜での蛍光強度が約 1.5 倍高かった（図 1 4 b）。これは *chico* ヘテロ変異体の脂肪体ではインスリンシグナル活性が高くなっていることを意味する。また、*scrib* クローンの存在がインスリン分泌やインスリン感受性に影響がないことを検証するために、*scrib* クローンを複眼原基に誘導した個体でも GPH の測定を行なった。その結果、*scrib* クローン存在下でも野生型個体と比べて *chico* ヘテロ変異体では脂肪体のインスリンシグナルが高くなることがわかった（図 1 4 b）。以上の結果から、*chico* ヘテロ変異体ではインスリン産生が増え、循環インスリン量が増える高インスリン血症となることがわかった。

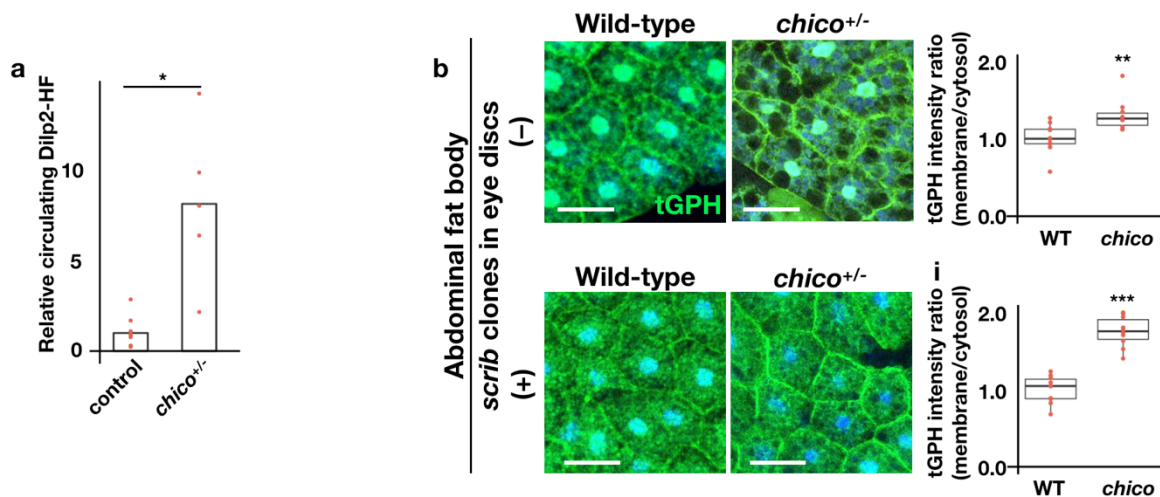


図 1 4. *chico* ヘテロ変異体では循環 Dilp2HF 量が上昇し末端組織のインスリンシグナルが活性化する

(a) ヘモリンフ中の循環 Dilp2-HF 量の ELISA 法での定量結果。n=8(control) and 5 (*chico*^{+/-})。*

*p<0.05 by Welch's t-test. (b) GPH の膜移行性を用いた脂肪体細胞でのインスリンシグナル活性の定量結果。n=10(各サンプル)。***p<0.001, **p<0.01 by Welch's t-test.

過剰な循環 Dilp2 が *scrib* 変異細胞の腫瘍化を促す

次に、高インスリン血症が細胞競合に影響を与えるのか評価した。バクテリアから単離された遺伝子 NaChBac は膜電位感受性ナトリウムチャンネルであり、この NaChBac を IPCs で強制発現させると人為的に分泌を誘導できる。この手法を用いて、IPCs の強制分泌により高インスリン血症を模倣した個体で *scrib* 変異細胞競合を評価した結果、NaChBac が誘導する高インスリンレベルでも *scrib* 変異細胞が腫瘍化することがわかった (図 15 a-c)。すなわち、*scrib* 変異細胞は *chico* 変異に関係なく高インスリン血症により腫瘍化することが示された。

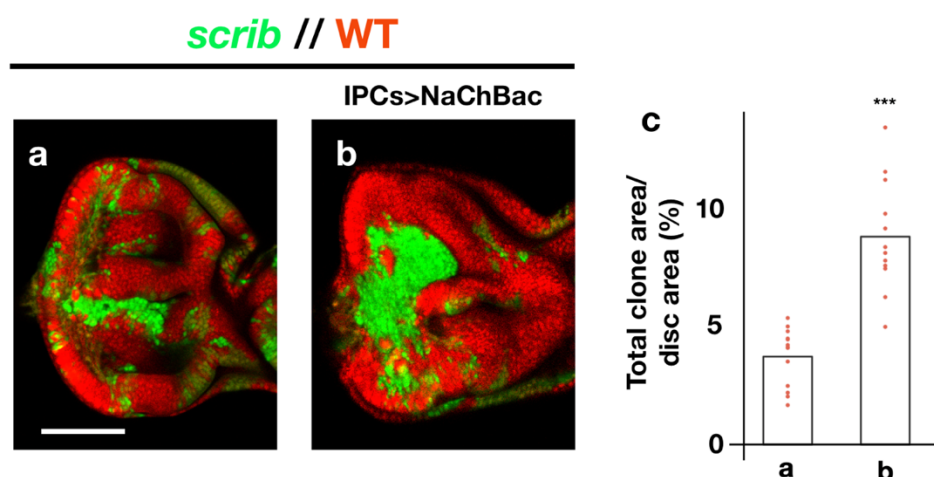


図 15. IPCs の強制分泌により *scrib* 変異細胞は腫瘍化する

(a)野生型個体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (緑) および野生型クローン(赤). (b)IPCs を強制分泌させた個体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (緑) および野生型クローン(赤). (c) *scrib* クローンサイズの定量結果. n=18 (a) and 10 (b). ***p<0.001 by Welch's t-test.

さらに、Dilp 遺伝子発現量の低下が *chico* ヘテロ変異体での *scrib* 変異細胞の腫瘍化を抑制できるか検証した。ショウジョウバエのゲノム上では Dilp 遺伝子群 2, 3, 4, 5 (以降 Dilp2-5)が一箇所にクラスターを形成している。染色体の Dilp2-5 部分を 1 コピー欠損させた変異体を *chico* ヘテロ変異体バックグラウンドに組み込み、細胞競合を誘導した。その結果、*chico* ヘテロ変異体で見られた *scrib* 変異細胞の腫瘍化が顕著に抑制されることがわかった (図 16 a, b, and c)。さらに、Dilp2 のみを 1 コピー欠損させた変異体でも Dilp2-5 欠損変異体と同様の腫瘍抑制効果を示したことから、Dilp 遺伝子群の中でも、Dilp2 遺伝子が *scrib* 変異細胞の腫瘍化に重要であることが示唆された (図 16 c and d)。さらに検証するために、野生型バックグラウンドで *scrib* 変異細胞競合を誘導し、さらに IPCs 特異的に Dilp2 および Dilp5 遺伝子を強制発現した。その結果、Dilp2 の強制発現特異的に *scrib* 変異細胞が腫瘍化するこ

とがわかった (図 1 6 e-h) . このことから, *scrib* 変異細胞を腫瘍化させるインスリンは Dilp2 であることがわかった.

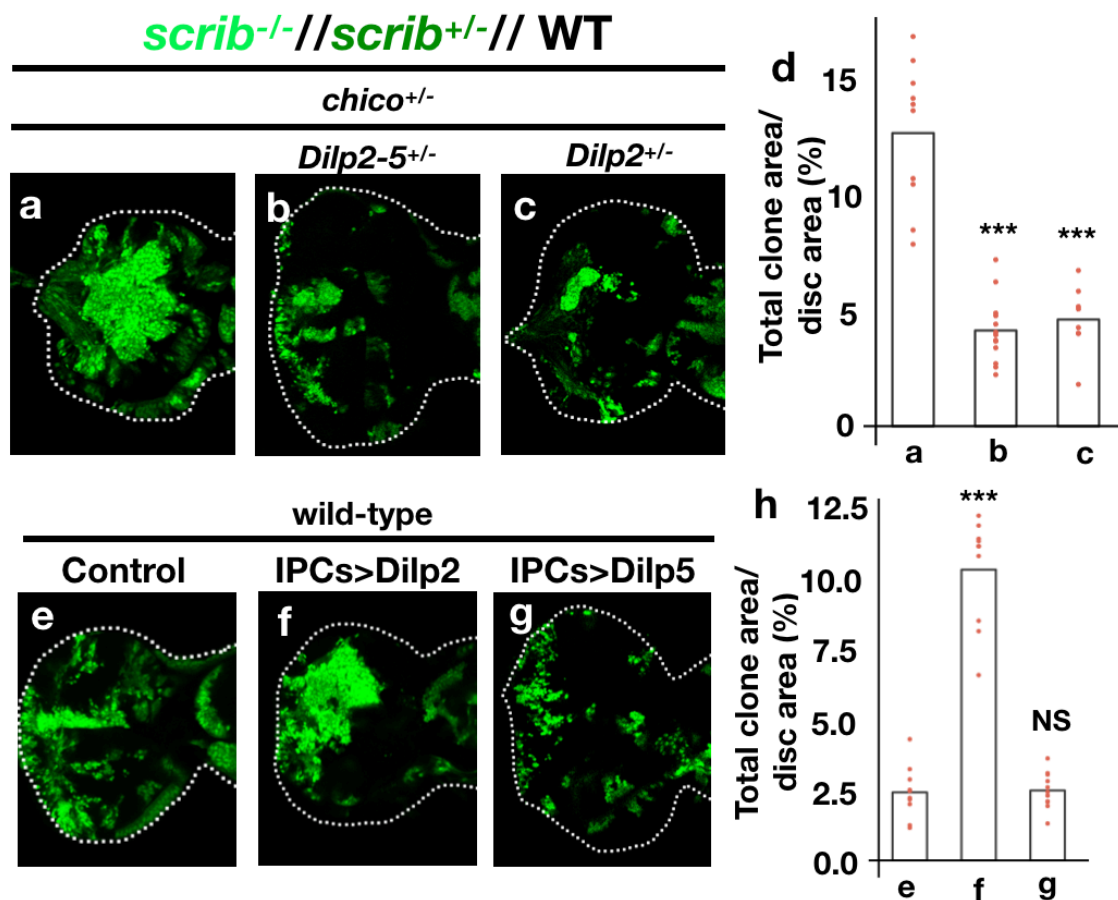


図 1 6. 過剰な Dilp2 が *scrib* 変異細胞の腫瘍化を駆動する

(a-c) コントロール個体, Dilp2-5 および Dilp2 のヘテロ変異体での *scrib* vs 野生型クローン. (d) *scrib* クローンサイズの定量結果. n=10 a, b, and c). ***p<0.001 by Dunnet test. (e-g) コントロール個体, IPCs で Dilp2 を強制発現させた個体, および Dilp5 を強制発現させた個体での *scrib* vs 野生型クローン. (h) *scrib* クローンサイズの定量結果.

n=10 (j), 9 (k), 10 (l), and 10 (m). ***p<0.001 by Dunnet test.

高インスリン血症は *scrib* 変異細胞のインスリンシグナルを活性化させる

過剰な Dilp2 はどのように細胞競合に作用するのだろうか. 前述の通り, 細胞競合は野生型細胞と *scrib* 変異細胞の細胞間相互作用によって引き起こされる. そこで, 競合する細胞間のインスリンシグナル活性を評価するために, 下流である Akt のリン酸化 (Ser473) を免疫染色法で評価した. その結果, 正常インスリンレベル下で競合する *scrib* 細胞と野生型細胞には顕著なインスリンシグナル活性の差は認められない(図 17 a). しかし, *chico* ヘテロ変異体で腫瘍化している *scrib* クローンでは顕著な Akt リン酸化を観察した(図 17 b).

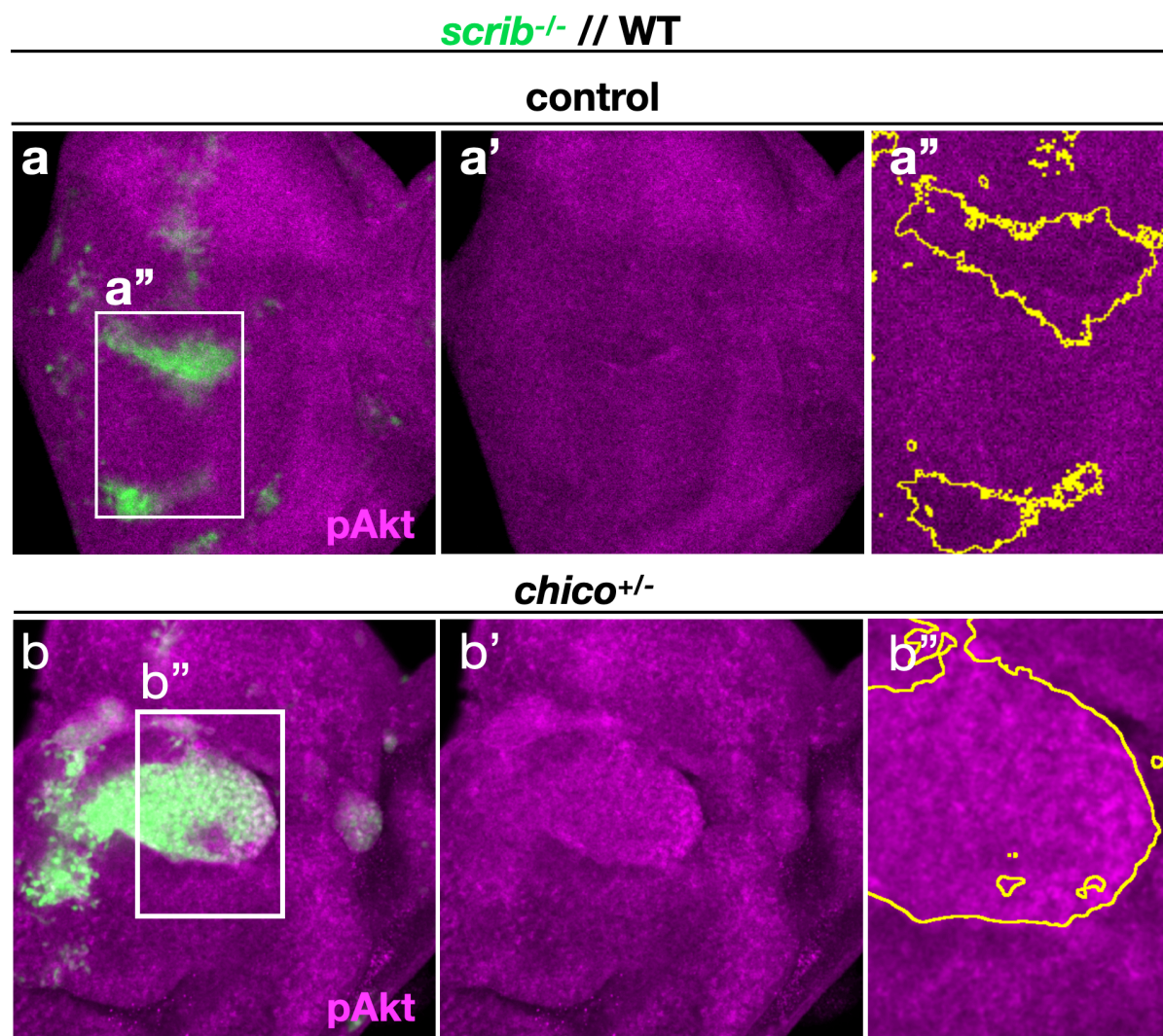


図 17. 高インスリン血症は *scrib* 変異細胞の Akt リン酸化 (ser473) を亢進させる

(a) 野生型個体で誘導した *scrib* vs 野生型細胞の pAkt 染色. *scrib* クローンは GFP で(a), pAkt はマゼンタで標識されている(a'). a''では *scrib* クローンを黄色で縁取りしている. (b) *chico* ヘテロ変異体で誘導した *scrib* vs 野生型細胞の pAkt 染色. *scrib* クローンは GFP で(b), pAkt はマゼンタで標識されている(b'). b''では *scrib* クローンを黄色で縁取りしている.

より詳細にインスリンシグナル活性を評価するために、GPH を用いて競合する細胞のインスリンシグナル活性を評価した。その結果、野生型バックグラウンドでの *scrib* 変異細胞は周囲の野生型細胞と比べて、わずかであるが有意にインスリンシグナル活性が低いことが分かった (図 1 8 a-c)。一方で、高インスリン血症のため腫瘍化している *scrib* 変異細胞は周囲の野生型よりもインスリンシグナル活性が高い (図 1 8 d-f)。これらの結果から、高インスリン血症が *scrib* 変異細胞のインスリンシグナル活性を低い状態から高い状態に遷移させることがわかった。

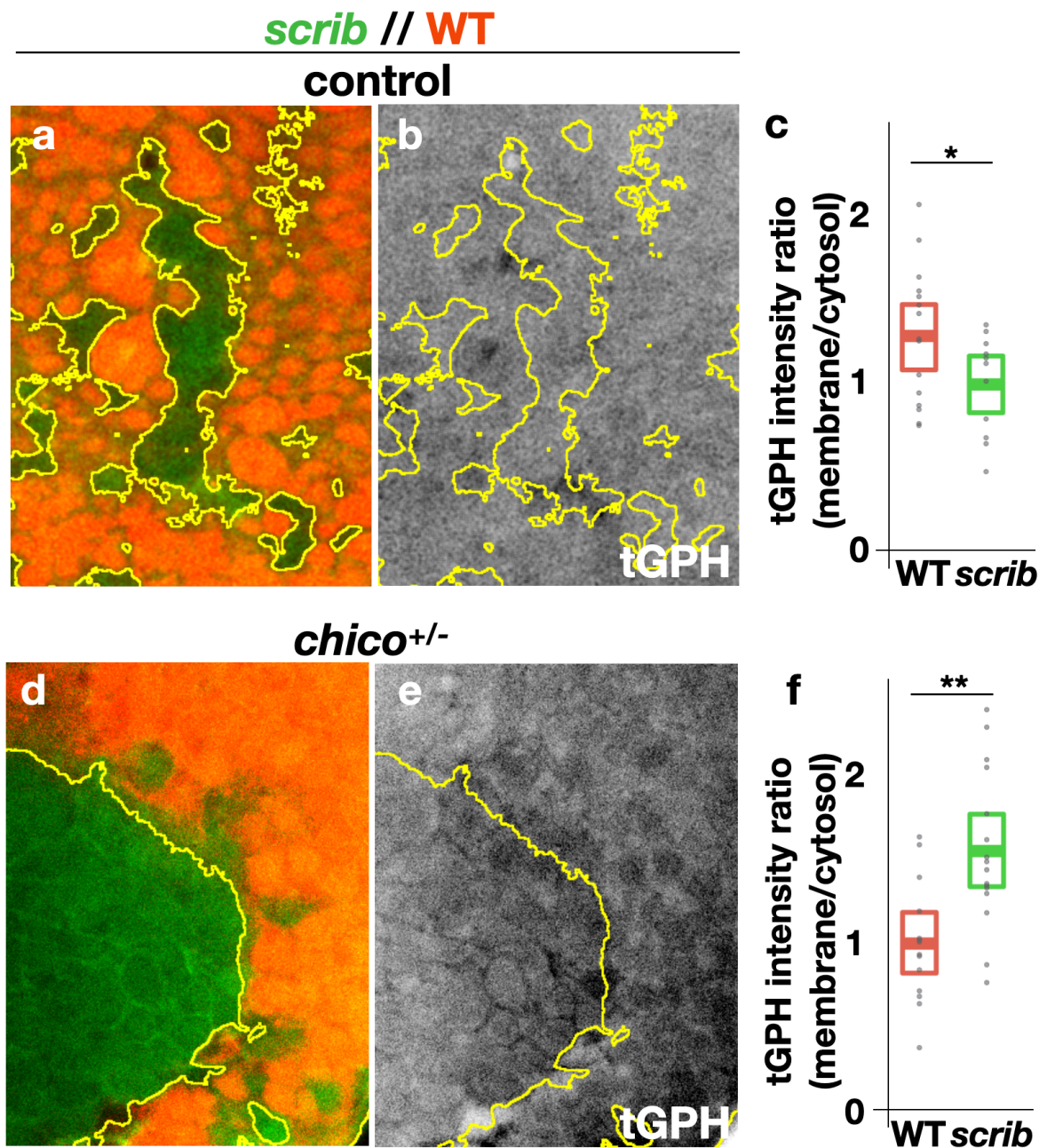


図 1 8. 高インスリン環境下では *scrib* 変異細胞のインスリンシグナル活性が遷移する
GPH を用いて競合している細胞のインスリンシグナル活性を評価した。(a, b) コントロール個体での野生型 vs *scrib* クローン。ヒートマップで GPH の蛍光を示している。(c) GPH 蛍光強度比か

ら求めたインスリンシグナル活性. (d, e) *chico* ヘテロ変異体での野生型 vs *scrib* クローン. ヒートマップで GPH の蛍光を示している. (f) GPH 蛍光強度比から求めたインスリンシグナル活性. スケールバーは 10 μ m. n=15 (a, b), 14 (d, e). *p<0.05, **p<0.01 by Welch's t-test.

次に、なぜ *scrib* 変異細胞は環境によってインスリンシグナル活性を変化させるのか解析した。このために、競合している野生型細胞と *scrib* 変異細胞を蛍光活性細胞選別(FACS)によって分取し、それぞれのインスリン受容体遺伝子（以降 *InR*）の遺伝子発現を定量した。その結果、野生型バックグラウンドで排除されている *scrib* 変異細胞は周囲の野生型細胞よりも *InR* の発現が低いことが分かった（図 19 a）。対して、高インスリン血症下では *scrib* 変異細胞の *InR* 遺伝子発現が顕著に高くなる（図 19 b）。この結果から、腫瘍化 *scrib* 変異細胞では野生型細胞よりも *InR* 発現が高くなることがわかった。

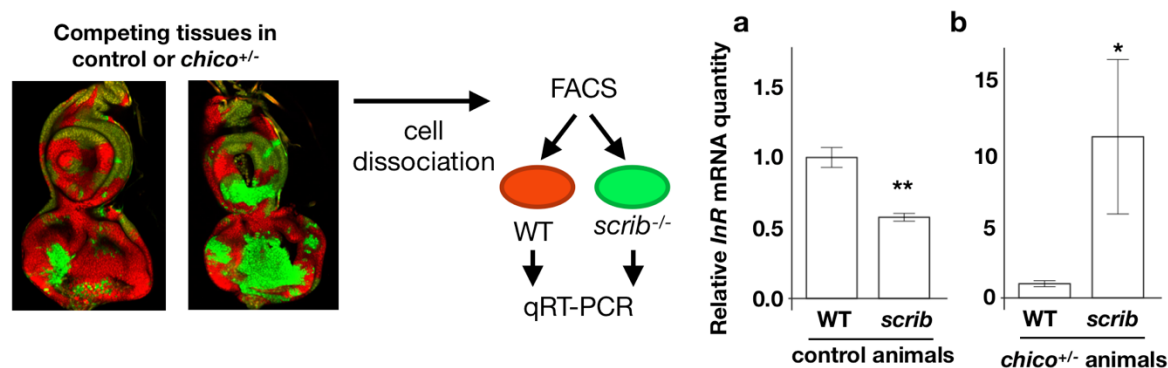


図 19. 高インスリン環境下では *scrib* 変異細胞の *InR* 遺伝子発現が上昇する
競合している野生型細胞と *scrib* 変異細胞を FACS 法で分取し、リアルタイム qPCR 法でインスリン受容体 *InR* 遺伝子発現量を比較した。(a) コントロール個体での *scrib* vs 野生型細胞での *InR* 発現量。(b) *chico* 変異体での *scrib* vs 野生型細胞での *InR* 発現量. n=3 (a) and 10 (b). Mean \pm SD *p<0.05 **p<0.01 by Welch's t-test.

この *InR* の発現量およびインスリンシグナル活性が *scrib* 変異細胞の排除を変化させるのか検証するために、MARCM 法を用いて *scrib* 変異細胞内で *InR* の過剰発現を行なった。その結果、*scrib* クローンサイズは有意に増加し腫瘍化することが分かった（図 20 a, b, and e）。なお、野生型 *InR* の過剰発現はクローン成長には影響ない（図 21）。すなわち、*scrib* 変異細胞内の *InR* 発現量が腫瘍化の鍵であることを示唆する。*chico* ヘテロ変異体で腫瘍化している *scrib* 変異細胞に *InR* ドミナントネガティブを強制発現すると、インスリン感受性が低下し *scrib* 変異細胞が腫瘍化できない（図 20 c-e）。この際、*scrib* 変異細胞の排除や増殖を解析したところ、高インスリン血症での結果と同様に *scrib* 変異細胞の排除が低下し、増殖に影響はなかった

(図20 f and g) . なお, 野生型バックグラウンドで *scrib* 変異細胞にドミナントネガティブ型 InR を強制発現しても, *scrib* クローンサイズに変化はない (図21) . 以上の結果から, *scrib* 変異細胞は野生型よりもインスリンシグナルが低下しているために細胞競合の排除を受け, 逆にインスリンシグナル活性が高まることで排除を回避し腫瘍化することが分かった.

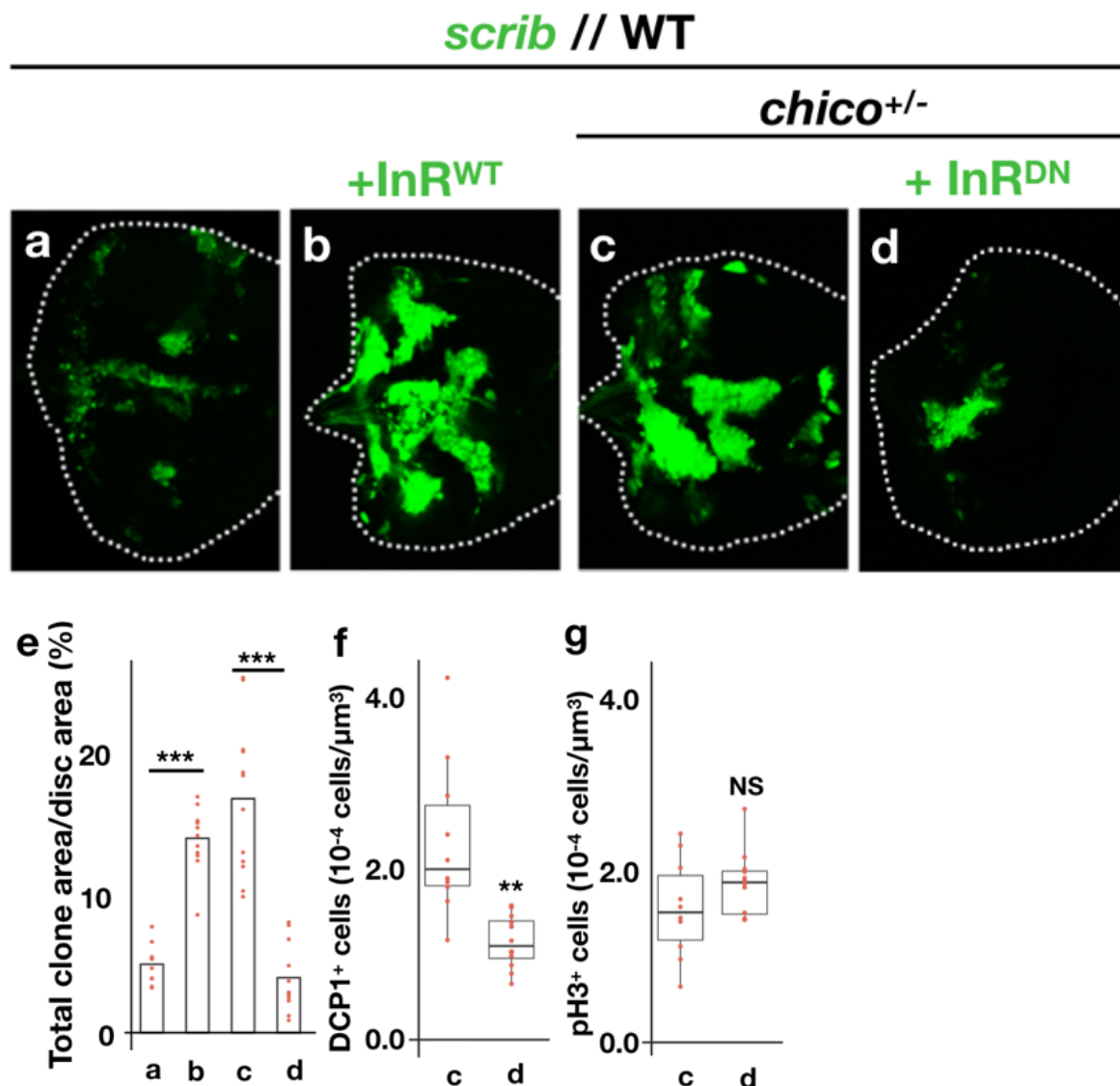


図20. インスリン受容体の遺伝学的操作により *scrib* 変異細胞の排除が操作できる (a-d) それぞれ, コントロール個体での *scrib* vs 野生型, *scrib* クローンにのみ野生型 InR を強制発現させた *scrib* vs 野生型, *chico* ヘテロ変異体での *scrib* vs 野生型, *scrib* クローンにのみ InR ドミナントネガティブ型を強制発現させた *scrib* vs 野生型. (e, f, G) *scrib* クローンサイズの定量および細胞死と細胞分裂の定量結果. n= 10 (a), 12 (b), 12 (c), and 10 (d). ***p<0.001 by Welch's t-test.

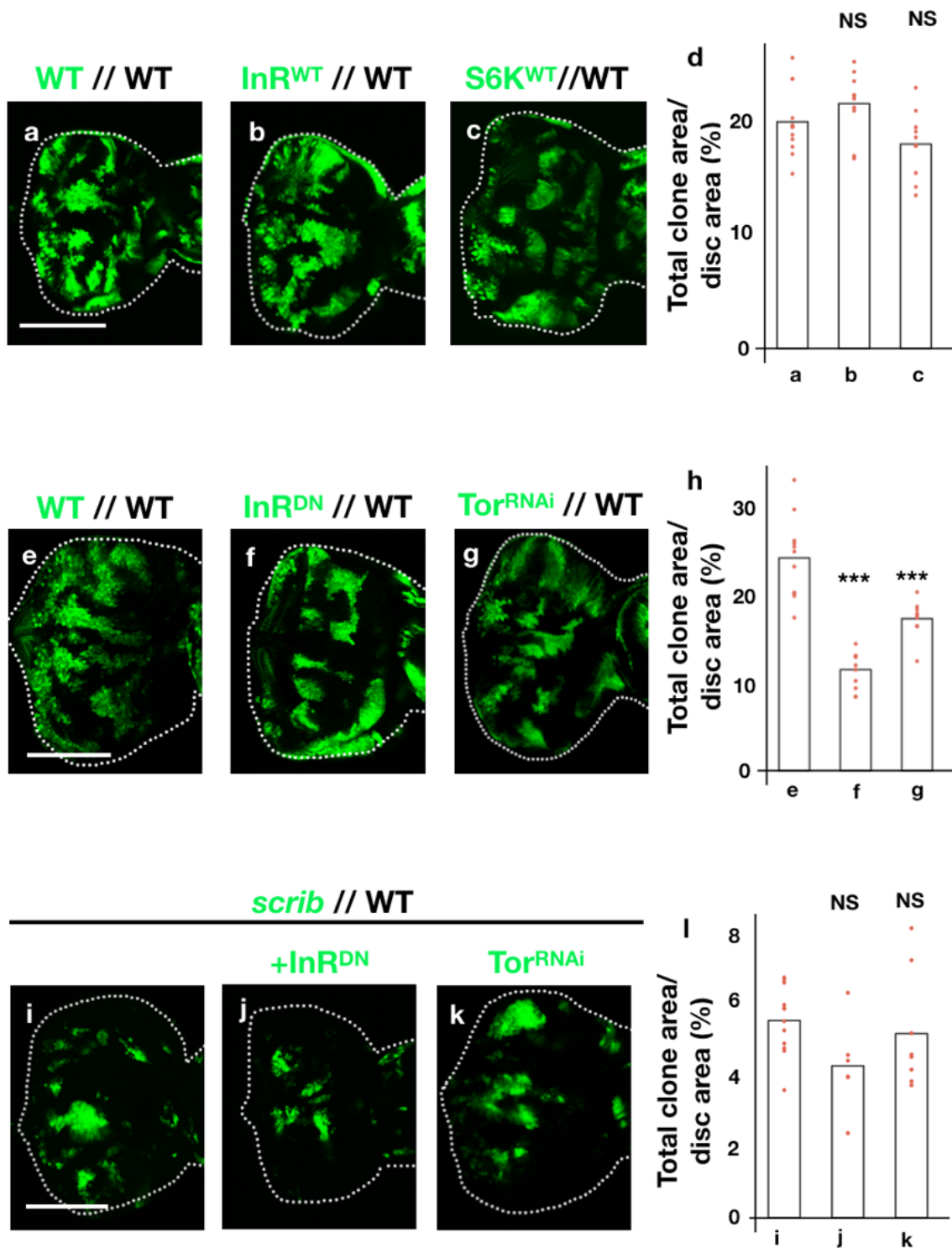


図2 1. インスリンシグナルの遺伝学的操作による野生型および *scrib* クローンサイズの評価 (a-c) 複眼原基に野生型クローンを誘導し、クローン内に野生型 InR および S6K を過剰発現させたモザイク組織。 (d) クローンサイズの定量結果。 n=11 (a), 10 (b) and 10 (c). Dunnett test. (e-g) 野生型クローンで InR および Tor を低下させたモザイク組織。 (h) クローンサイズの定量結果。 n=11 (e), 11 (f), 9 (g). ***p>0.001 by Dunnett test. (i-k) コントロール個体の複眼原基に誘導した *scrib* クローンで InR および Tor を低下させたモザイク組織。 (l) クローンサイズの定量結果。 n=11 (i), 8 (j), and 8 (k). Dunnett test.

mTor-タンパク質合成経路の低い活性により *scrib* 変異細胞は排除されている

次に *scrib* 変異細胞の腫瘍化に必要な下流シグナルを探索した。インスリン刺激は受容体から Ras シグナルと PI3K-mTor シグナルの二つに枝分かれする。まず, *chico* ヘテロ変異バックグラウンドでドミナントネガティブ型の Ras を *scrib* 変異細胞内に強制発現した。その結果, Ras を低下させても高インスリン血症で引き起こされている *scrib* 変異細胞の腫瘍化は抑制できないことが分かった (図 2 2)。

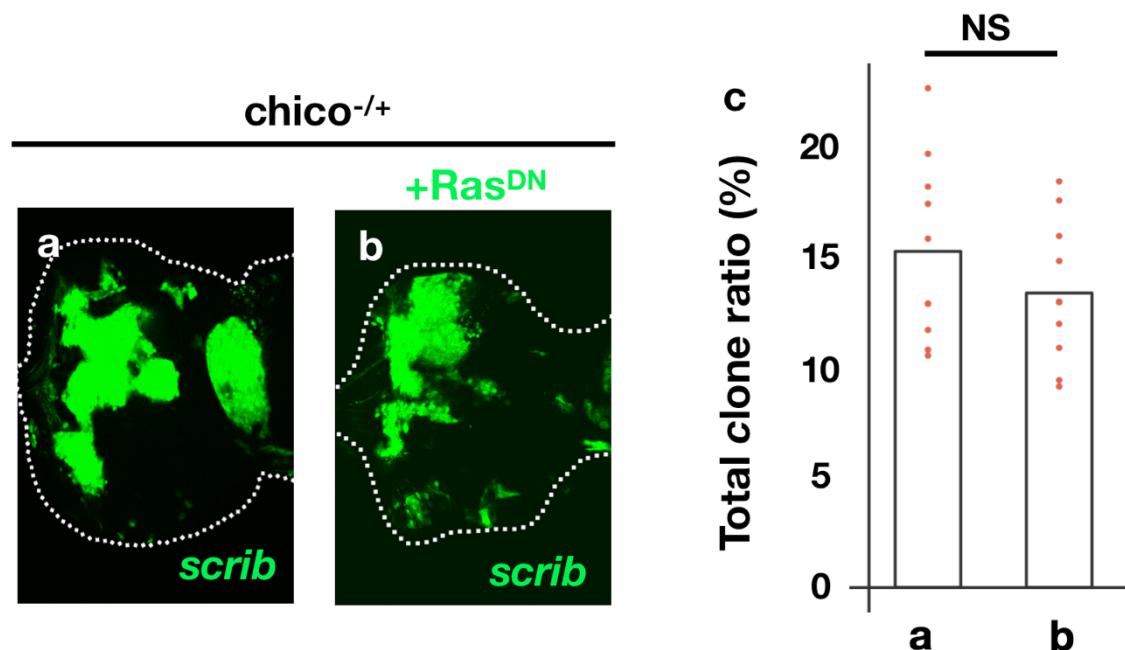


図 2 2. 高インスリン血症による *scrib* 変異細胞の腫瘍化に Ras シグナルは重要ではない (a)*chico* ヘテロ個体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (b) *chico* ヘテロ個体の複眼原基に誘導したドミナントネガティブ型 Ras を強制発現させた *scrib* クローン. (c) クローンサイズの定量結果. n=10 (a) and 10 (b). Welch's t-test.

次に PI3K-mTor シグナルの関与を検証した。mTor シグナル活性のリードアウトとして, S6 タンパク質のリン酸化および細胞のタンパク質合成能を評価した (図 2 3 a)。コントロールとして野生型バックグラウンドで野生型細胞クローンを誘導した複眼原基の pS6 免疫染色像を図 2 3 b に示す。既知の通り, 形態形成溝に内在性の pS6 活性が認められる以外に, GFP ポジティブの野生型細胞クローンと pS6 活性に関連は見られなかった (図 2 3 b, 矢印は形態形成溝をアスタリスクは内在性の活性を示す)⁴⁸。次に, 野生型バックグラウンドで *scrib* クローンを誘導した複眼原基を見てみると, コントロールで見られた pS6 活性パターンと顕著な差が認められず, 排除されている *scrib* 変異細胞の pS6 活性は周囲の野生型細胞と変化ない (図 2 3 c)。対して *chico* ヘテロ変異体バックグラウンドで腫瘍化している *scrib* クローンで

は特異的な pS6 活性が見られた (図 2 3 d) . これらの結果は, 高インスリン血症が *scrib* 変異細胞の mTor シグナルを活性化している可能性を示唆している.

さらにこの可能性を検証するために mTor シグナルが正に制御する細胞のタンパク質合成能を評価した. タンパク質合成能は Click-iT™ Plus OPP Alexa Fluor™ 647 Protein Synthesis Assay Kit を用いた. このキットは O-propargyl-puromycin (以降 OPP) と呼ばれるピューロマイシンのアナログを細胞に取り込ませ, OPP を Click-iT システムで蛍光標識するものである. OPP およびピューロマイシンは tRNA と相似した構造を持つため, タンパク質合成中のリボソームに取り込まれる. このリボソームに取り込まれた OPP を蛍光標識することで, 新生タンパク合成能を評価することができる⁵⁵. まず, この実験系を用いて野生型バックグラウンドで野生型クローンを誘導した複眼原基を観察した (図 2 3 e) . その結果, 既知の通り形態形成溝においてわずかに高いタンパク質合成が見られたがほぼ均一なパターンの蛍光像を示した (図 2 3 e)⁴⁸. 次に, 野生型バックグラウンドで *scrib* クローンを誘導した複眼原基を観察した. その結果, 排除されている *scrib* 変異細胞では周囲の野生型細胞と比べてタンパク質合成能が低いことが分かった (図 2 3 f) . 対して *chico* ヘテロ変異体バックグラウンドで誘導した *scrib* クローンでは周囲の野生型細胞と比べてタンパク質合成能が顕著に高くなることが分かった (図 2 3 g) . これらの結果は GPH で得られたインスリンシグナル活性と関連しており, mTor シグナルの活性によって *scrib* 変異細胞の排除が決定されることを示唆している.

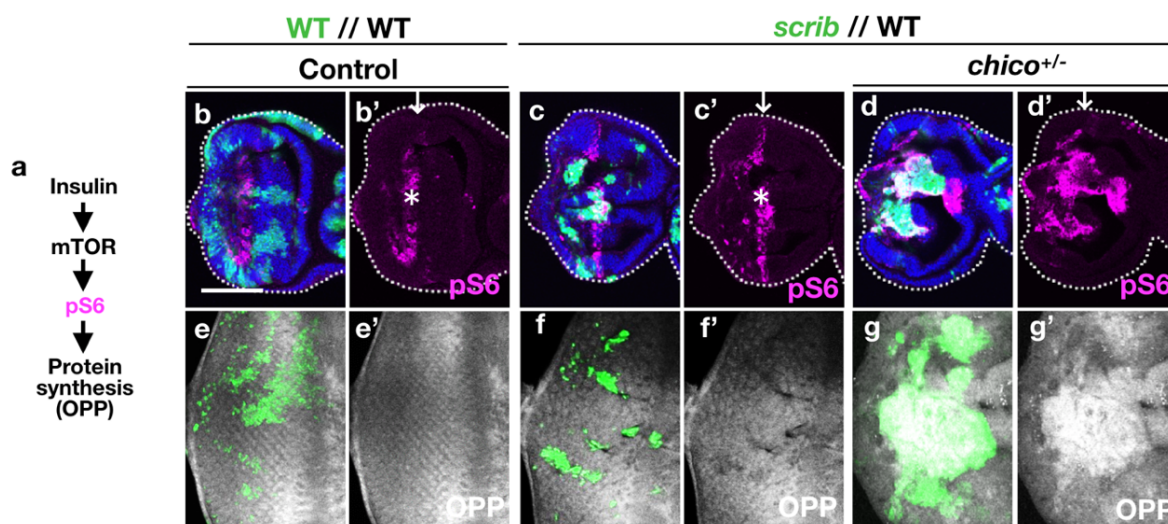


図 2 3. *scrib* 変異細胞の mTor-タンパク質合成経路活性は環境により変化する

(a) インスリン-mTor シグナル経路, mTor 経路の活性を S6 のリン酸化(マゼンタ, 免疫染色)とタンパク質合成能 (OPP) で評価する. (b-d) それぞれ, 野生型クローン, *scrib* クローン, および *chico* ヘテロ変異体で *scrib* クローンを誘導したモザイク組織の pS6 染色. (e-g) それぞれ, 野生型クローン, *scrib* クローン, および *chico* ヘテロ変異体で *scrib* クローンを誘導したモザイク組織の OPP 染色. (本データ f および f' は永田理奈氏から提供を受けた)

さらにこの可能性を検証するために、*chico* ヘテロ変異体バックグラウンドで *scrib* クローンを誘導し、タンパク質合成制御の中心である Tor 遺伝子のノックダウンを行なった。その結果、Tor ノックダウンにより *scrib* の腫瘍化が顕著に抑制された (図 2 4 a, b, and d)。この逆に、野生型バックグラウンドで誘導した *scrib* クローン内に mTor シグナルを活性化させる S6K 野生型を過剰発現し、mTor シグナルのおよびタンパク質合成能の人為的な活性化を行なった。その結果、*chico* ヘテロ変異体バックグラウンドと同様の *scrib* クローンの腫瘍化が観察された (図 2 4 c and d)。以上の結果から、*scrib* 変異細胞は高インスリン血症によりインスリン-mTor シグナル経路が活性化し、細胞競合による排除から回避できることが分かった。

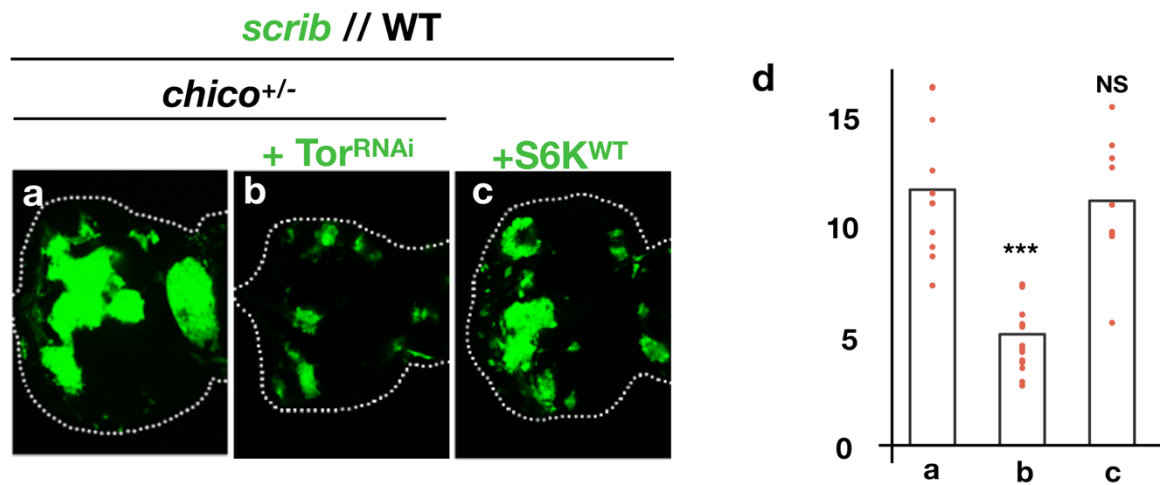


図 2 4. mTor-タンパク質合成経路の活性が低いことで *scrib* 変異細胞は排除されている (a)*chico* ヘテロ個体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン. (b) *chico* ヘテロ個体の複眼原基に誘導した Tor をノックダウンした *scrib* クローン. (c) 野生型個体の複眼原基に誘導した野生型 S6K を強制発現させた *scrib* クローン. n=11 (u), 20 (v), and 9 (w). ***p<0.001 by Dunnett test.

高栄養食によるインスリンレベルの上昇でも *scrib* 変異細胞の排除は抑制される

インスリンは血糖値を制御する重要なホルモンであることから、血中インスリン濃度は食事によって上昇することが知られている⁴¹。本研究でショウジョウバエに与えている餌は乾燥酵母とコーンミールを主原料にしており、乾燥酵母を餌中に増量することで Dilp 遺伝子発現量が増加する³⁴。そこで、ショウジョウバエの食餌内容で *scrib* クローンサイズがどのように変化するか検証するために、乾燥酵母の量を段階的に増量した餌でショウジョウバエを飼育し、複眼原基に *scrib* クローンを誘導した。その結果、餌中の乾燥酵母量と比例して *scrib* クローンサイズも大きくなることがわかった (図 2 5 a-e)。このクローンサイズの増加が、細胞競合の破綻によるものなのか検証するために、*scrib* クローン内の DCP1 および pH3 陽性細胞を定量した。その結果、餌中の乾燥酵母量が増加するに従って *scrib* クローンの DCP1 陽性細胞数、すなわち排除された *scrib* 変異細胞数が減少していることがわかった (図 2 5 f)。対して、細胞増殖の指標となる pH3 陽性細胞数には変化が見られなかった (図 2 5 g)。実際に Dilp2 循環量が高栄養食 (高酵母食) によって変化するか検証したところ、酵母 1 倍食と 4 倍食では循環 Dilp2-HF 量が約 3 倍増加することが認められた (図 2 5 h)。

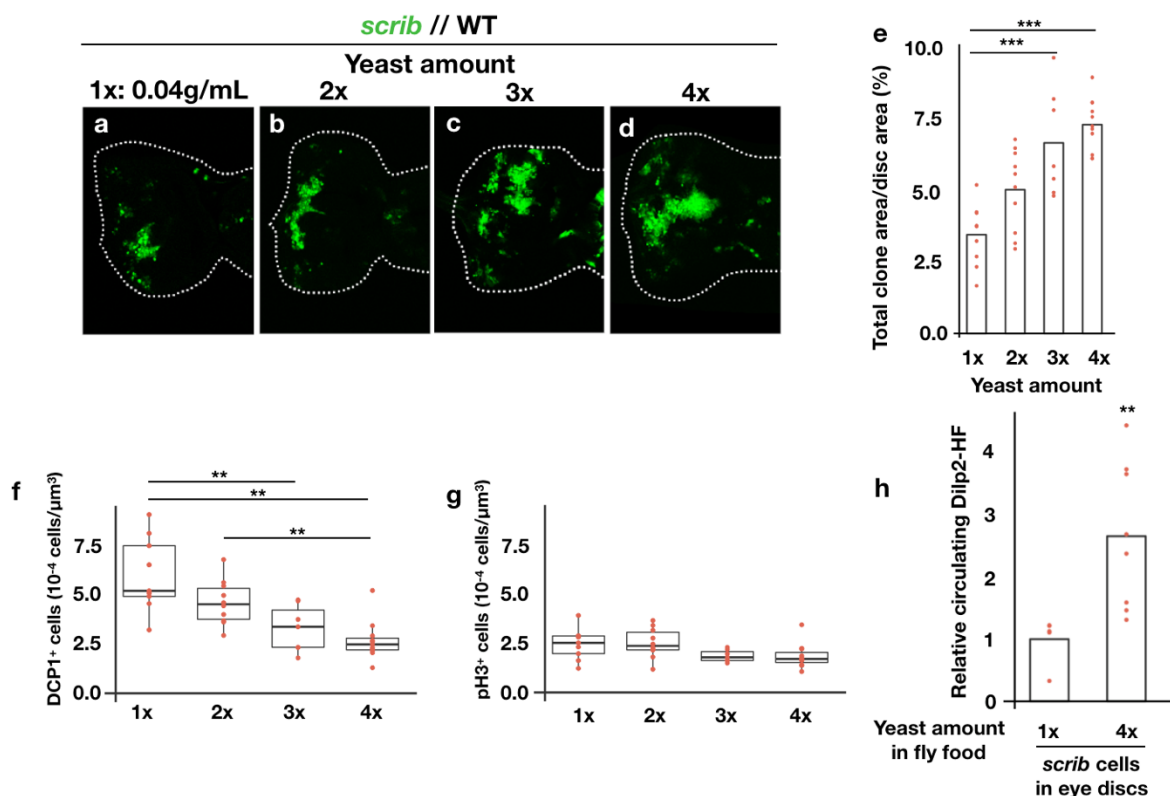


図 2 5. 高栄養食によって *scrib* 変異細胞の排除が抑制される

(a-d) 野生型個体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン。それぞれ餌に含まれるイースト量を等倍ずつ増加させている。(e) クローンサイズの定量結果。(f, g) *scrib* クローンの細胞死と細胞増殖速

度の定量結果. $n=9$ (a), 10 (b), 7 (c), and 11 (d). $**p<0.01$, by Steel-Dwass test. (h) 餌中イーストを増やした場合の循環 Dilp2HF 量の定量結果. $n=5$ (1x), 8 (4x). $**p<0.005$ by Welch's t-test.

さらに、高栄養食（4x 酵母食）で見られる *scrib* クローンサイズの増加は、*scrib* クローン内にドミナントネガティブ型の InR を強制発現させることで抑制されることから、食餌により上昇したインスリンが直接 *scrib* 変異細胞に作用していることが分かった（図 26 a-c）。以上の結果から、食餌内容によるインスリン循環量の変化においても、細胞競合が影響を受けることが分かった。

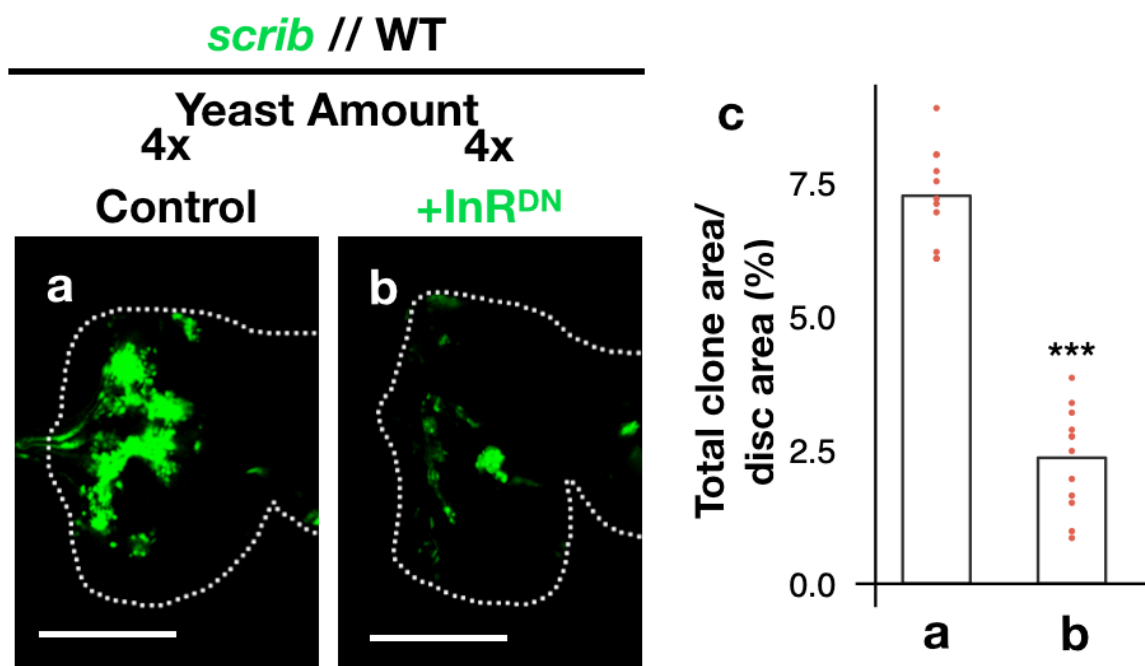


図 26. 高栄養食は *scrib* 変異細胞のインスリンシグナルを亢進し細胞競合を破綻させる
 (a) 高栄養食（4x イースト）で飼育したショウジョウバエの複眼原基に誘導した *scrib* クローン.
 (b) 4 高栄養食（4x イースト）で飼育したショウジョウバエの複眼原基に誘導したドミナントネガティブ型インスリン受容体を強制発現している *scrib* クローン. (c) クローンサイズの定量結果. $n=10$ (a) and 13 (b). $***p<0.001$ by Welch's t-test.

2 型糖尿病薬であるメトホルミンにより細胞競合の破綻は回避できる

2 型糖尿病などに併発する高インスリン血症はがんの罹患率を高めるが³⁴⁻³⁷、これと同時に 2 型糖尿病薬であるメトホルミンの服用がこのがんリスクを低下させることも疫学的に知られていた^{43,44}。メトホルミンは多様な薬理学的作用点があり全容はいまだに見えていないが、既知の作用点として肝細胞の AMPK を活性化させることで血糖の取り込みを促進し、血糖値を下げる事が知られている⁴⁴。AMPK の活性化は細胞の同化作用を抑制することが知られ、タンパク質合成経路を制御する mTor シグナルも負に制御することが知られている⁵⁶。さらに、メトホルミンには AMPK を介さず直接 mTor シグナルを抑制する報告もあることから⁵⁷、メトホルミンは mTor シグナルを抑制しタンパク質合成能を抑制することが予想できる。すなわち、高インスリン血症によって活性化していた *scrib* 変異細胞の mTor シグナルがメトホルミンの投与によって抑制できる可能性がある。言い換えれば、メトホルミンのがんリスクを低下させる作用は細胞競合の破綻を防ぐことに由来するかもしれない。これを検証するために、ショウジョウバエにメトホルミンを投与する実験系を立ち上げた。メトホルミンは水に溶けやすことから、メトホルミン水溶液をショウジョウバエ餌中に希釈することでショウジョウバエに薬剤を投与した。濃度検討の結果、餌中 5mM のメトホルミンを投与しても 3 齢幼虫の個体および複眼原基の成長や形態に変化が見られないことが分かった (図 2 7)。

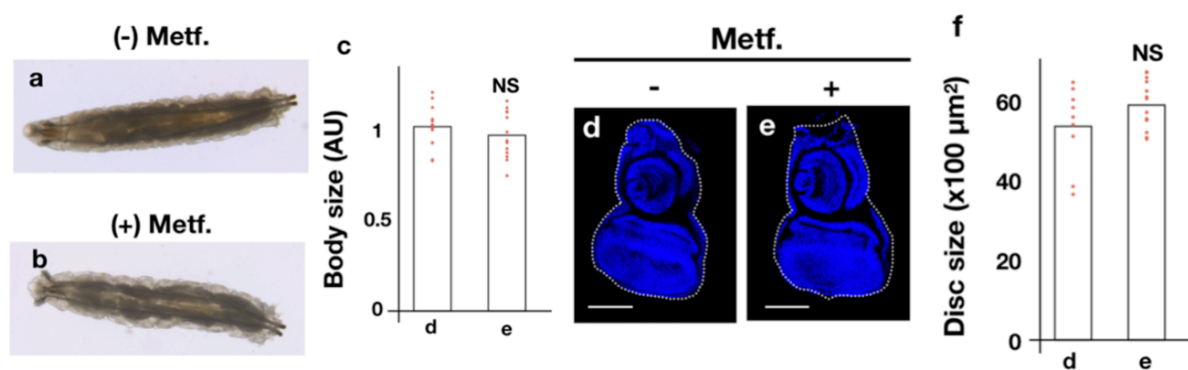


図 2 7. メトホルミンの投与はショウジョウバエ幼虫の成長に影響しない

(a, b) それぞれコントロール餌を与えたショウジョウバエ 3 齢幼虫, およびメトホルミンを 5 mM 添加した餌を与えたショウジョウバエ 3 齢幼虫. (c) 3 齢幼虫の体のサイズを定量した結果. 2 次元写真から表面積を算出した. $n=14$ (a) and 13 (b). Welch's t-test. (d, e) それぞれコントロール餌を与えたショウジョウバエ 3 齢幼虫の複眼原基, およびメトホルミンを 5 mM 添加した餌を与えたショウジョウバエ 3 齢幼虫の複眼原基. DAPI 染色. (f) 複眼原基サイズの定量結果. 2 次元コンフォーカル画像から表面積を算出した. $n=9$ (d) and 14 (e). Welch's t-test.

この条件で、*chico* ヘテロ変異体バックグラウンドの複眼原基に *scrib* クローンを誘導して、クローンサイズを定量した。その結果、コントロールと比べて *scrib* クローンが顕著に縮小することが分かった (図 2 8 a-c)。また mTor シグナル活性を評価したところ、腫瘍化した *scrib* 変異細胞で見られた pS6 活性およびタンパク質合成能の亢進がメトホルミンの投与によって抑制されることが分かった (図 2 8 d-e)。

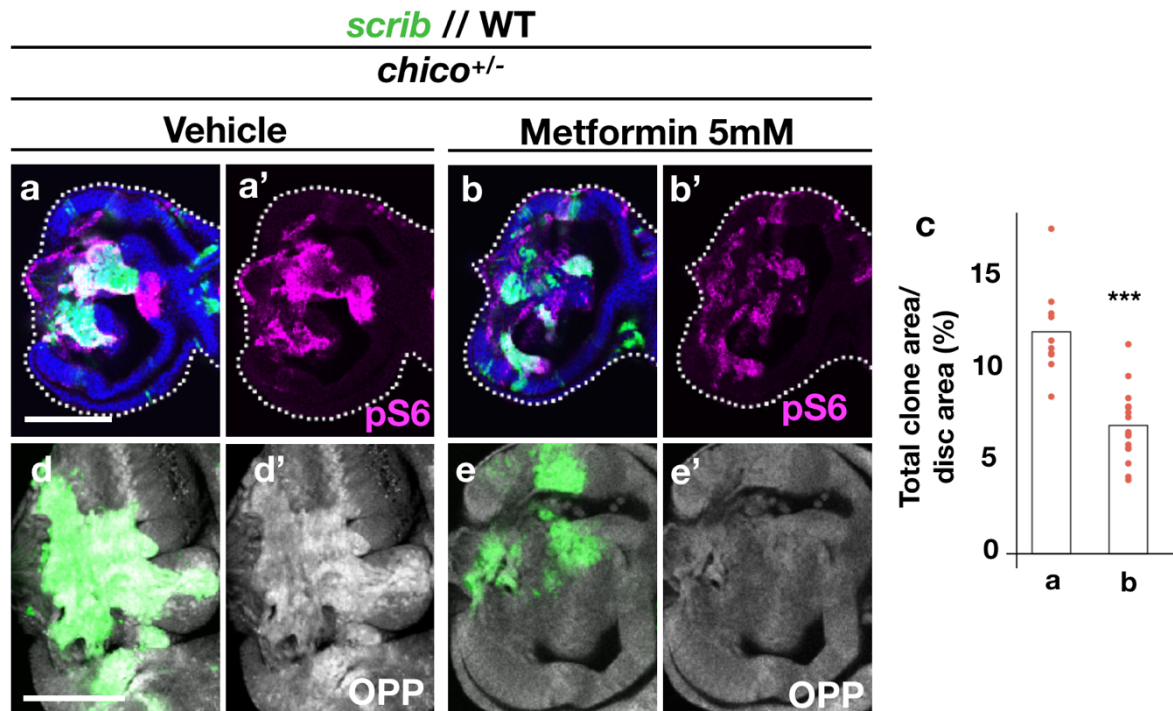


図 2 8. メトホルミンは高インスリン血症が引き起こす腫瘍形成を抑制する

(a) *chico* ヘテロ変異体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (緑) および pS6 抗体染色 (マゼンタ)。(b) メトホルミンを添加した餌で飼育した *chico* ヘテロ変異体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (緑) および pS6 抗体染色 (マゼンタ)。(c) クローンサイズの定量結果. n=10(a) and 17(b). ***p<0.001 by Welch's t-test. (d) *chico* ヘテロ変異体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (緑) および OPP 抗体染色 (グレー)。(e) メトホルミンを添加した餌で飼育した *chico* ヘテロ変異体の複眼原基に誘導した *scrib* クローン (緑) および OPP 抗体染色 (グレー)。

このメトホルミンの作用が *scrib* 変異細胞自律的であるか検証するために、野生型バックグラウンドで *scrib* クローンを誘導し、MARCM法を用いて野生型 InR を過剰発現させインスリン循環量にかかわらず *scrib* 変異細胞の腫瘍化を誘導した。この条件でメトホルミンが *scrib* 変異細胞の腫瘍化を抑制できるか検証したところ、有意に *scrib* クローンサイズを縮小させることが分かった (図 2 9 a-c)。また、*chico* ヘテロ変異体バックグラウンドで上昇する Dilp2-HF 循環量がメトホルミンの投与で変化するか測定した。その結果、有意な変化は認められなかったことから、メトホルミンの投与によって *chico* が低下した個体でのインスリン循環量に変化がないことが分かった (図 2 9 d)。以上の結果から、メトホルミンは *scrib* 変異細胞のタンパク質合成能を調節することで細胞競合の破綻を抑制することが分かった。

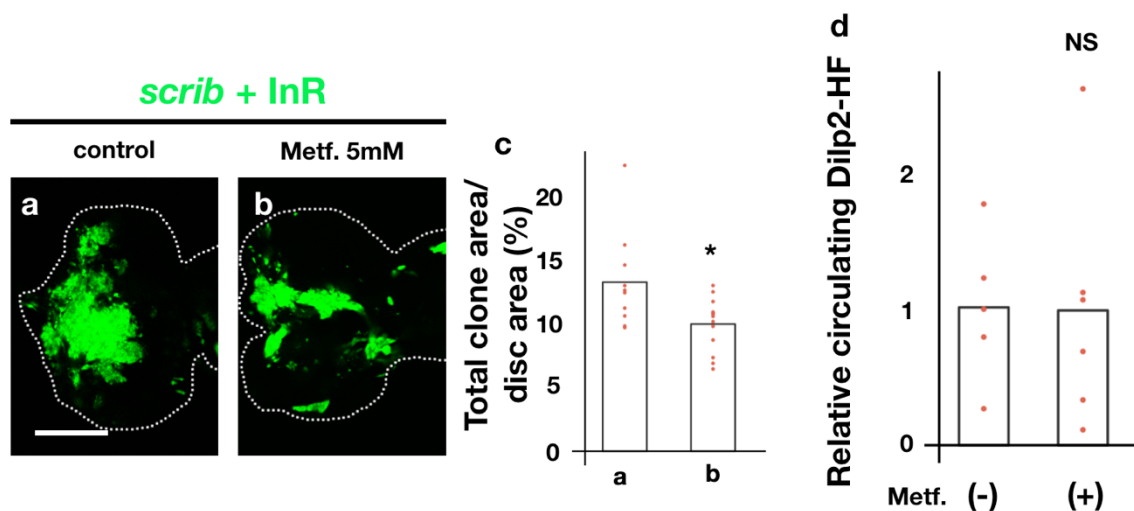


図 2 9. メトホルミンの腫瘍抑制作用は *scrib* 変異細胞自律的な作用である

(a) 野生型個体の複眼原基に誘導された野生型インスリン受容体の強制発現を伴う *scrib* クローン. (b) メトホルミンを添加した餌で飼育した野生型個体の複眼原基に誘導された野生型インスリン受容体の強制発現を伴う *scrib* クローン. (c) クローンサイズの定量結果. n=10 (a) and 13 (b). ***p<0.001 by Welch's t-test. (d) コントロール餌およびメトホルミンの添加餌で育てた循環 Dilp2HF 量の定量結果. n=5 (-), 6 (+). Welch's t-test.

4. まとめと考察

本研究で得られた結果をまとめると、*scrib* 変異細胞は高インスリン血症の影響により細胞競合による排除から免れ腫瘍を形成することが分かった（図30）。本研究により、細胞間相互作用によって制御されると考えられてきた細胞競合が、インスリン分泌異常によるシステミックな作用によっても影響を受けることが示された。この結論は、細胞競合の理解深めるだけでなく、高インスリン血症が発がんを促すメカニズムを示唆するものである。



図30. インスリンレベルによるがん抑制性細胞競合の制御モデル

個体の循環インスリンレベルはインスリン産生細胞（IPCs）で制御されている。インスリンシグナルの低下したIPCsではインスリンの生産／分泌が亢進し高インスリン血症となる。インスリンレベルは*scrib* 変異細胞のインスリンシグナルを活性化させ、タンパク質合成能を高める。これにより細胞競合が破綻し、腫瘍が発生する。

疫学研究で指摘されてきた、高インスリン血症とがんリスクをつなぐ生物学的メカニズムを考えるには、がんの「発生」と「成長」の2つに分けて考えることができるだろう。インスリンは成長因子としても機能することが知られており、実際にインスリンが腫瘍細胞の増殖能や悪性度を高めることは数多くの報告がなされている³⁷。近年でも、ショウジョウバエを用いた研究から、高糖質食によって上昇したインスリンにより腫瘍の増殖や転移が引き起こされることが示されている⁵¹。その一方で、インスリンが発がんを誘導する超初期メカニズムについてはほとんどわかっていなかった。発がんの過程では組織を構成する細胞のうち、ごく一部の細胞、数細胞ないしは1細胞レベルで細胞が変異を蓄積しがん原性を獲得していくと考えられている^{7,9,58}。細胞が一つ目の変異を獲得する超初期段階では、がん細胞が爆発的に増加する前であり、がん原性細胞は組織内に数細胞レベルで存在することになる。この状態では、がん原細胞は周囲を正常細胞に囲まれるため、がん抑制機構である細胞競合ががん原性細胞を排除すると予想される。一方で、なんらかの原因によって細胞競合が破綻した場合、がん原細胞は組織に残りさらなる変異を獲得して増殖および腫瘍化に至ることが考え得る。本研究が示した、高インスリンによって細胞競合が破綻するという現象は、個体の生理状態によってがん原性細胞の異常な増殖およびさらなる変異によって腫瘍の悪性化に向かうリスクを高めると考えられる。

本研究結果をさらに考察するためにインスリンの制御と *scrib* 変異細胞の排除の2つの観点から見ていく。

本研究から、*chico* およびインスリンシグナルが IPCs で低下するとインスリンの生産および分泌が高まることが示された。この結果は、インスリンの発現はインスリンそのもののオートクラインフィードバックによって制御されている可能性を示唆している。このフィードバックメカニズムは1960年代から提唱されており、*in vitro* および *ex vivo* でのβ細胞や膵臓を使った実験⁵⁹⁻⁶³、さらに個体を使った実験⁶³⁻⁶⁶によりその存在が指摘されてきた。本研究で示された結果は、この仮説を支持するもので、インスリンの発現、生合成、循環量および生理活性の全てで一貫したデータが得られた。一方で、本研究で使われたモデル生物は無脊椎動物であるキイロショウジョウバエである。キイロショウジョウバエにおけるインスリン産生/分泌の制御は、内分泌系や神経系を介した複雑なシステムであることが知られている^{41,42,47,53,54,67}。ヒトなど哺乳類におけるインスリン循環量の制御は、より非常に複雑であることが予想される。すなわち、本研究で示されたオートクラインによるインスリンの制御が哺乳類でも見られるのか、もし見られるとするとどの程度反映されるかは定かでないことから、今後の研究結果が待たれるだろう。

次に、*scrib* 変異細胞の排除について考える。著者が所属した研究室は、がん抑制性細胞競合の研究をリードするようにそのメカニズムを明らかにしてきた。まず、極性崩壊という現象はがん細胞に顕著に見られ、またショウジョウバエにおいて上皮細胞が極性を失うと腫瘍化することが知られていた^{15-17,19,20}。本研究室では、このような極性異常細胞が正常細胞に周囲を囲まれると排除されることに注目し、細胞競合の概念を取り込み「がん抑制性細胞競合」としての研究テーマが始まった¹¹。排除そのものに注目すると、極性を失った *scrib* 変異細胞はストレスシグナルである JNK 経路を活性化し細胞死に至ることを示し、また周囲の細胞に貪食を受けることによっても組織から排除されることを明らかにした^{11,21}。次にこの排除を引き起こす細胞間相互作用を突き止めるためにショウジョウバエを用いた遺伝学的スクリーニングを行い、軸索誘導因子として知られる Slit-ROBO システムや sas-PTP10D システムが *scrib* 変異細胞と野生型細胞の細胞間相互作用を担うことを明らかにした^{22,23}。また近年では、パラクラインによる自然免疫経路によっても *scrib* 変異細胞の細胞死が引き起こされていることを明らかにしてきた²⁴。これまでの研究から *scrib* 変異細胞は極性崩壊に起因する細胞の性質の変化により細胞競合の敗者となると考えられたが、本研究ではインスリン-mTor 経路およびタンパク質合成能によって *scrib* 変異細胞の排除が変化することを示した。この結果は、*scrib* 変異細胞モデルと他の細胞競合モデルの共通点を見出す上で大きな貢献になると考えられる。細胞競合の発見につながった *Minute* 細胞は、リボソームタンパク質のヘテロ変異細胞であるため、*Minute* 細胞のタンパク質合成能が低いことが検討されてきた⁶⁸。また、野生型細胞を排除するスーパーコンペティターとして知られている *myc* 過剰発現細胞は、細胞の同化経路が一斉に活性化していることが知られている^{69,70}。そのため、*myc* 過剰発現細胞は野生型細胞よりもタンパク質合成能が上昇すると予想される。また、マウスの発生過程で mTOR シグナルレベルにより細胞競合が誘導できることが示されていることから⁷¹、細胞競合とタンパク質合成能は深く関連しているものとして考えられる。事実、当研究グループでは、細胞競合で排除される細胞の特徴としてタンパク質合成能が低下していることを報告している(Nagata, Nakamura, Sanaki, et al., *Developmental Cell*, 2019)⁷²。本研究では、競合の敗者となっている *scrib* 変異細胞では周囲の野生型細胞と比べてタンパク質合成能が低く、一方で高インスリン血症などによって排除を免れる状態ではタンパク質合成能が上昇することを示している。すなわち、タンパク質合成能によって細胞競合の勝敗が決定するという点で他の細胞競合モデルとの共通点を見出したと言える。一方で、本研究では細胞競合の敗者となることは *scrib* 変異細胞の絶対的な性質ではなく、環境によっては排除を免れることもある可変的な性質であることを示した。以上のことをきっかけとして、今後

は生理学的な内分泌環境，およびその変化に伴う細胞自律的な状態変化と異常細胞の排除の関係について理解を深めていくことが望まれる。

InR 発現量の増加やインスリンシグナルの活性化は，ヒトがん細胞の特徴の一つであることから⁷³，インスリンシグナル活性化に起因する細胞競合の破綻が，一般的な発がんプロセスの一つであると予想することができる。本研究は個体の生理状態によって細胞競合が破綻し発がんに至るメカニズムの一端を明らかし，薬剤による介入が高インスリン血症での細胞競合の破綻を抑制することを示した。今後の研究の進展により，細胞競合をターゲットとした創薬から，がん罹患率をコントロールできる未来を実現することが期待できる。

5. 補遺 (使用したショウジョウバエの遺伝子型)

図 4

(a) *w*; +; +

(b) *w*; +; *scrib*¹

(c-e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*; *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

図 5

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; +/+; *FRT82B, ubi-GFP, scrib*¹ / *FRT82B* or *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Df/+*; *FRT82B, ubi-GFP, scrib*¹ / *FRT82B*

図 6

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; +/+; *FRT82B, ubi-GFP / FRT82B*

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; +/+; *FRT82B, ubi-GFP, scrib*¹ / *FRT82B*

(c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *chico*²/+; *FRT82B, ubi-GFP, scrib*¹ / *FRT82B*

(e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*; *FRT82B, TubGal80 / FRT82B*

(f) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*; *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

(g) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico*²; *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

図 7

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*; *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico*²; *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

(c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-chico-RNAi* (v101329); *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

(d) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-chico-RNAi* (36788); *FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib*¹

(f) *eyFLP5, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/+*; *FRT82B, Tub-Gal80, scrib*¹ / *FRT82B*

(g) *eyFLP5, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ chico*²; *FRT82B, Tub-Gal80, scrib*¹ / *FRT82B*

(h) *eyFLP5, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ UAS-chico-RNAi* (v101329); *FRT82B, Tub-Gal80, scrib*¹ / *FRT82B*

(i) *eyFLP5, Act>y+>Gal4, UAS-GFP/ UAS-chico-RNAi* (36788); *FRT82B, Tub-Gal80, scrib*¹ / *FRT82B*

図 9

(a and c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Dilp2-Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

(b and d) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-chico-RNAi; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

☒ 1 0

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, ubi-GFP / FRT82B*

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/chico²; FRT82B, ubi-GFP / FRT82B*

(c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-chico; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*

☒ 1 1

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-chico-RNAi (v101329); FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

(c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-chico-RNAi (36788); FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

(d) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-InR^{DN}; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

(e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-PI3K-RNAi; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

☒ 1 2

(a) *y,w; Dilp2-Gal4, UAS-GFP / + or chico² ; +/+*

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/ + or chico² or UAS-dilp2; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*

☒ 1 3

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/ + or chico² or UAS-dilp2; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*

☒ 1 4

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w+ or Y ; gDilp2-HF / + or chico²*

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w+ or Y ; tGPH / + or chico²; FRT 82B / FRT 82B or FTR 82B. scrib*

☒ 1 5

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*

(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-NaChBac; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*

☒ 1 6

- (a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; chico²/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*
 (b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; chico²/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ /Df(3L)dilp2-5 FRT82B*
 (c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; chico²/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ /Df(3L)dilp2 FRT82B*
 (e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/+; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*
 (f) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-dilp2; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*
 (g) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/UAS-dilp5; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B*

☒ 1 7

(a, b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; dilp2-Gal4, UAS-GFP/+ or chico²; FRT82B, ubi-GFP, scrib¹ / FRT82B, ubiRFP*

☒ 1 8

(a and b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; tGPH/+; FRT82B, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*
 (d and e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; tGPH/chico²; FRT82B, scrib¹ / FRT82B, ubi-RFP*

☒ 1 9

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
(b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP /chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 0

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
 (b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-InR^{WT}; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
 (c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
 (d) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico², UAS-InR^{DN}; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 1

(a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*
 (b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-InR; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*
 (c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP /UAS-S6K; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*
 (e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*
 (f) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-InR[DN]; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*

- (g) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Tor[RNAi]; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*
- (i) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (j) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-InR[DN]; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (k) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Tor[RNAi]; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 2

- (a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (b) *y,w, eyFLP1 / w, UAS-Ras^{N17} ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 3

- (b and e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B*
- (c and f) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (d and g) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 4

- (a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, UAS-Tor-RNAi, scrib¹*
- (c) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-S6K^{WT}; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 5

- (a-d) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (h) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; gDilp2-HF / + ; FRT 82B/ FRT 82B, scrib¹*

☒ 2 6

- (a) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*
- (b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-InR^{DN}; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 7

(a-e) *w or Y*; +; +

☒ 2 8

(a-e) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / chico²; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

☒ 2 9

(a and b) *y,w, eyFLP1 / y,w or Y*; *Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-InR^{WT}; FRT82B, TubGal80 / FRT82B, scrib¹*

(d) *w or Y; gDilp2-HF / chico²; + / +*

6. 謝辞

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。

Hyperinsulinemia Drives Epithelial Tumorigenesis by Abrogating Cell Competition.
Yuya Sanaki, Rina Nagata, Daisuke Kizawa, Pierre Léopold, Tatsushi Igaki
Developmental Cell, Volume 53, Issue 4, 18 May 2020, Pages 379-389.e5

本研究は、京都大学大学院生命科学研究科において井垣達吏教授の指導のもと、Pierre Léopold 博士との共同研究にて行われた。

研究試料は、H. Stocker 博士, E. Hafen 博士, J. Chung 博士, S. K. Kim 博士, S. Park 博士らから分与いただいた。また、Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC, Indiana, USA), the Vienna *Drosophila* Resource Center (VDRC, Vienna, Austria), および the *Drosophila* Genomics and Genetic Resources (DGGR, Kyoto Stock Center, Japan)からショウジョウバエのストックを分与いただいた。

ご指導およびご支援頂きました井垣達吏教授に感謝します。

研究をはじめ様々なことに相談に乗っていただき、有益なご助言を数多く頂きました榎本将人博士、John Vaughen 氏、山銅ゆかり氏を始め井垣研究室の皆様に感謝します。

本研究は、母からの支援がなくては完成し得ませんでした。感謝します。

7. 参考文献

1. Bissell, M. J. & Radisky, D. Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* (2001) doi:10.1038/35094059.
2. Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nature Reviews Cancer* (2012) doi:10.1038/nrc3169.
3. Royer, C. & Lu, X. Epithelial cell polarity: A major gatekeeper against cancer. *Cell Death and Differentiation* (2011) doi:10.1038/cdd.2011.60.
4. Jemal, A. *et al.* Cancer Statistics, 2008. *CA. Cancer J. Clin.* (2008) doi:10.3322/ca.2007.0010.
5. Epstein, F. H., Fish, E. M. & Molitoris, B. A. Alterations in epithelial polarity and the pathogenesis of disease states. *New England Journal of Medicine* (1994) doi:10.1056/NEJM199406023302207.
6. Luzzi, K. J. *et al.* Multistep Nature of Metastatic Inefficiency. *Am. J. Pathol.* (1998) doi:10.1016/s0002-9440(10)65628-3.
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* (2011) doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
8. Vogelstein, B. *et al.* Cancer genome landscapes. *Science* (2013) doi:10.1126/science.1235122.
9. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* (80-.). (1976) doi:10.1126/science.959840.
10. Khursheed, M. & Bashyam, M. D. Apico-basal polarity complex and cancer. *Journal of Biosciences* (2014) doi:10.1007/s12038-013-9410-z.
11. Igaki, T., Pastor-Pareja, J. C., Aonuma, H., Miura, M. & Xu, T. Intrinsic Tumor Suppression and Epithelial Maintenance by Endocytic Activation of Eiger/TNF Signaling in *Drosophila*. *Dev. Cell* (2009) doi:10.1016/j.devcel.2009.01.002.
12. Norman, M. *et al.* Loss of scribble causes cell competition in mammalian cells. *J. Cell Sci.* (2012) doi:10.1242/jcs.085803.
13. Morata, G. & Ballesteros-Arias, L. Cell competition, apoptosis and tumour development. *Int. J. Dev. Biol.* (2015) doi:10.1387/ijdb.150081gm.
14. Di Gregorio, A., Bowling, S. & Rodriguez, T. A. Cell Competition and Its Role in the Regulation of Cell Fitness from Development to Cancer. *Developmental Cell* (2016) doi:10.1016/j.devcel.2016.08.012.
15. Bilder, D. & Perrimon, N. Localization of apical epithelial determinants by the basolateral PDZ protein Scribble. *Nature* (2000) doi:10.1038/35001108.
16. Riga, A., Castiglioni, V. G. & Boxem, M. New insights into apical-basal polarization in epithelia. *Current Opinion in Cell Biology* (2020) doi:10.1016/j.ceb.2019.07.017.
17. Bilder, D. Epithelial polarity and proliferation control: Links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes and Development* (2004) doi:10.1101/gad.1211604.
18. Lee, M. & Vasioukhin, V. Cell polarity and cancer - Cell and tissue polarity as a non-canonical tumor suppressor. *J. Cell Sci.* (2008) doi:10.1242/jcs.016634.
19. Bilder, D., Li, M. & Perrimon, N. Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* (80-.). (2000) doi:10.1126/science.289.5476.113.
20. Brumby, A. M. & Richardson, H. E. scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J.* (2003) doi:10.1093/emboj/cdg548.
21. Ohsawa, S. *et al.* Elimination of Oncogenic Neighbors by JNK-Mediated Engulfment in *Drosophila*. *Dev. Cell* (2011) doi:10.1016/j.devcel.2011.02.007.

22. Vaughen, J. & Igaki, T. Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia. *Dev. Cell* (2016) doi:10.1016/j.devcel.2016.11.015.
23. Yamamoto, M., Ohsawa, S., Kunimasa, K. & Igaki, T. The ligand Sas and its receptor PTP10D drive tumour-suppressive cell competition. *Nature* (2017) doi:10.1038/nature21033.
24. Katsukawa, M., Ohsawa, S., Zhang, L., Yan, Y. & Igaki, T. Serpin Facilitates Tumor-Suppressive Cell Competition by Blocking Toll-Mediated Yki Activation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* (2018) doi:10.1016/j.cub.2018.04.022.
25. Clavería, C. & Torres, M. Cell Competition: Mechanisms and Physiological Roles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* (2016) doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125142.
26. Baker, N. E. Mechanisms of cell competition emerging from *Drosophila* studies. *Curr. Opin. Cell Biol.* (2017) doi:10.1016/j.ceb.2017.05.002.
27. Madan, E., Gogna, R. & Moreno, E. Cell competition in development: information from flies and vertebrates. *Current Opinion in Cell Biology* (2018) doi:10.1016/j.ceb.2018.08.002.
28. Nagata, R. & Igaki, T. Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors. *Development Growth and Differentiation* (2018) doi:10.1111/dgd.12575.
29. Kon, S. *et al.* Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.* (2017) doi:10.1038/ncb3509.
30. Madan, E. *et al.* Flower isoforms promote competitive growth in cancer. *Nature* (2019) doi:10.1038/s41586-019-1429-3.
31. Sasaki, A. *et al.* Obesity Suppresses Cell-Competition-Mediated Apical Elimination of RasV12-Transformed Cells from Epithelial Tissues. *Cell Rep.* (2018) doi:10.1016/j.celrep.2018.03.104.
32. Rothberg, J. M., Hartley, D. A., Walther, Z. & Artavanis-Tsakonas, S. slit: An EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell* (1988) doi:10.1016/0092-8674(88)90249-8.
33. Lee, H. K., Cording, A., Vielmetter, J. & Zinn, K. Interactions between a receptor tyrosine phosphatase and a cell surface ligand regulate axon guidance and glial-neuronal communication. *Neuron* (2013) doi:10.1016/j.neuron.2013.04.001.
34. Giovannucci, E. *et al.* Diabetes and Cancer: A consensus report. *Diabetes Care* **33**, 1674–1685 (2010).
35. Shi, Y. & Hu, F. B. The global implications of diabetes and cancer. *Lancet* **383**, 1947–1948 (2014).
36. Tsujimoto, T., Kajio, H. & Sugiyama, T. Association between hyperinsulinemia and increased risk of cancer death in nonobese and obese people: A population-based observational study. *Int. J. Cancer* **141**, 102–111 (2017).
37. Pollak, M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. *Nature Reviews Cancer* (2008) doi:10.1038/nrc2536.
38. Böhni, R. *et al.* Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**, 865–875 (1999).
39. Brogiolo, W. *et al.* An evolutionarily conserved function of the *drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr. Biol.* (2001) doi:10.1016/S0960-9822(01)00068-9.
40. Ikeya, T., Galic, M., Belawat, P., Nairz, K. & Hafen, E. Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr. Biol.* (2002) doi:10.1016/S0960-9822(02)01043-6.
41. Morris, S. N. S. *et al.* Development of diet-induced insulin resistance in adult *Drosophila melanogaster*. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1822**, 1230–1237

- (2012).
42. Park, S. *et al.* A Genetic Strategy to Measure Circulating Drosophila Insulin Reveals Genes Regulating Insulin Production and Secretion. *PLoS Genet.* (2014) doi:10.1371/journal.pgen.1004555.
 43. Evans, J. M. M., Donnelly, L. A., Emslie-Smith, A. M., Alessi, D. R. & Morris, A. D. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. *BMJ* **330**, 1304–1305 (2005).
 44. Pernicova, I. & Korbonits, M. Metformin—mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**, 143–156 (2014).
 45. Xu, T. & Rubin, G. M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult Drosophila tissues. *Development* (1993).
 46. Lee, T. & Luo, L. Mosaic analysis with a repressible neurotechnique cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* (1999) doi:10.1016/S0896-6273(00)80701-1.
 47. Géminard, C., Rulifson, E. J. & Léopold, P. Remote Control of Insulin Secretion by Fat Cells in Drosophila. *Cell Metab.* (2009) doi:10.1016/j.cmet.2009.08.002.
 48. Kim, W., Jang, Y. G., Yang, J. & Chung, J. Spatial Activation of TORC1 Is Regulated by Hedgehog and E2F1 Signaling in the Drosophila Eye. *Dev. Cell* (2017) doi:10.1016/j.devcel.2017.07.020.
 49. Almudi, I., Poernbacher, I., Hafen, E. & Stocker, H. The Lnk/SH2B adaptor provides a fail-safe mechanism to establish the Insulin receptor-Chico interaction. *Cell Commun. Signal.* (2013) doi:10.1186/1478-811X-11-26.
 50. Ponton, F., Chapuis, M. P., Pernice, M., Sword, G. A. & Simpson, S. J. Evaluation of potential reference genes for reverse transcription-qPCR studies of physiological responses in Drosophila melanogaster. *J. Insect Physiol.* (2011) doi:10.1016/j.jinsphys.2011.03.014.
 51. Hirabayashi, S., Baranski, T. J. & Cagan, R. L. XTransformed drosophila cells evade diet-mediated insulin resistance through wingless signaling. *Cell* (2013) doi:10.1016/j.cell.2013.06.030.
 52. Khan, S. J., Abidi, S. N. F., Tian, Y., Skinner, A. & Smith-Bolton, R. K. A rapid, gentle and scalable method for dissociation and fluorescent sorting of imaginal disc cells for mRNA sequencing. *Fly (Austin)*. (2016) doi:10.1080/19336934.2016.1173296.
 53. Agrawal, N. *et al.* The Drosophila TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metab.* (2016) doi:10.1016/j.cmet.2016.03.003.
 54. Meschi, E., Léopold, P. & Delanoue, R. An EGF-Responsive Neural Circuit Couples Insulin Secretion with Nutrition in Drosophila. *Dev. Cell* (2019) doi:10.1016/j.devcel.2018.11.029.
 55. Liu, J., Xu, Y., Stoleru, D. & Salic, A. Imaging protein synthesis in cells and tissues with an alkyne analog of puromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2012) doi:10.1073/pnas.1111561108.
 56. Tzatsos, A. & Kandrór, K. V. Nutrients Suppress Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Signaling via Raptor-Dependent mTOR-Mediated Insulin Receptor Substrate 1 Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* (2006) doi:10.1128/mcb.26.1.63-76.2006.
 57. Kalender, A. *et al.* Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell Metab.* (2010) doi:10.1016/j.cmet.2010.03.014.
 58. Fialkow, P. J. Clonal origin of human tumors. *BBA - Reviews on Cancer* (1976) doi:10.1016/0304-419X(76)90003-2.
 59. Ammon, H. P. T. & Verspohl, E. Pyridine nucleotides in pancreatic islets during

- inhibition of insulin release by exogenous insulin1, 2. *Endocrinology* (1976) doi:10.1210/endo-99-6-1469.
60. Draznin, B., Goodman, M., Leitner, J. W. & Sussman, K. E. Feedback inhibition of insulin on insulin secretion in isolated pancreatic islets. *Endocrinology* (1986) doi:10.1210/endo-118-3-1054.
 61. Loreti, L., Dunbar, J. C., Chen, S. & Foà, P. P. The autoregulation of insulin secretion in the isolated pancreatic islets of lean (obOb) and obese-hyperglycemic (obob) mice. *Diabetologia* (1974) doi:10.1007/BF02627732.
 62. Iversen, J. & Miles, D. W. Evidence for a feedback inhibition of insulin on insulin secretion in the isolated, perfused canine pancreas. *Diabetes* (1971) doi:10.2337/diab.20.1.1.
 63. Ammon, H. P. T., Reiber, C. & Verspohl, E. J. Indirect evidence for short-loop negative feedback of insulin secretion in the rat. *J. Endocrinol.* (1991) doi:10.1677/joe.0.1280027.
 64. Rappaport, A. M. *et al.* Effects on insulin output and on pancreatic blood flow of exogenous insulin infusion into an in situ isolated portion of the pancreas. *Endocrinology* (1972) doi:10.1210/endo-91-1-168.
 65. Liljenquist, J. E. *et al.* Inhibition of insulin secretion by exogenous insulin in normal man as demonstrated by C-peptide assay. *Diabetes* (1978) doi:10.2337/diab.27.5.563.
 66. Eigler, N., Sacca, L. & Sherwin, R. S. Synergistic interactions of physiologic increments of glucagon, epinephrine, and cortisol in the dog. A model for stress-induced hyperglycemia. *J. Clin. Invest.* (1979) doi:10.1172/JCI109264.
 67. Delanoue, R. *et al.* Drosophila insulin release is triggered by adipose Stunted ligand to brain Methuselah receptor. *Science* (80-.). (2016) doi:10.1126/science.aaf8430.
 68. Morata, G. & Ripoll, P. Minutes: Mutants of Drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* (1975) doi:10.1016/0012-1606(75)90330-9.
 69. De La Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. & Johnston, L. A. Drosophila myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* (2004) doi:10.1016/S0092-8674(04)00214-4.
 70. Clavería, C., Giovanazzo, G., Sierra, R. & Torres, M. Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* (2013) doi:10.1038/nature12389.
 71. Bowling, S. *et al.* P53 and mTOR signalling determine fitness selection through cell competition during early mouse embryonic development. *Nat. Commun.* (2018) doi:10.1038/s41467-018-04167-y.
 72. Nagata, R., Nakamura, M., Sanaki, Y. & Igaki, T. Cell Competition Is Driven by Autophagy. *Dev. Cell* **51**, 99-112.e4 (2019).
 73. Papa, V. *et al.* Elevated insulin receptor content in human breast cancer. *J. Clin. Invest.* (1990) doi:10.1172/JCI114868.