

細胞競合の分子機構の遺伝学的解析

永田 理奈

目次

要旨	4
略語表	6

第1部 オートファジーを介した敗者細胞の細胞死誘導機構の解明

第1章 序論	8
1-1 細胞競合とは	8
1-2 細胞競合の分類とそのメカニズム	9
1-2-1 腫瘍抑制型細胞競合	11
1-2-2 腫瘍促進型細胞競合	12
1-2-3 組織最適化型細胞競合	13
1-3 細胞競合の生理的意義	15
1-4 課題と本研究の目的	15
第2章 材料と方法	16
2-1 ショウジョウバエの餌と系統	16
2-1-1 ショウジョウバエの餌	16
2-1-2 ショウジョウバエ系統	16
2-2 クローンの誘導方法	17
2-2-1 FLP-FRT を用いたクローン誘導方法	17
2-2-2 MARCM 法	18
2-2-3 hs-Flp-out システム	19
2-3 遺伝子改変ショウジョウバエの作成	20
2-4 全ゲノムシーケンス	20
2-5 遺伝学的スクリーニング	21
2-6 組織学	22
2-6-1 免疫染色	22
2-6-2 OPP による新生タンパク質合成レベルの解析	22
2-6-3 LysoTracker シグナルの検出	23
2-7 統計解析	23
2-8 各実験で用いたショウジョウバエ系統の遺伝子型	23
第3章 結果	29
3-1 新規細胞競合誘導因子の同定	29

3-1-1 当研究室で行われた遺伝学的スクリーニングの背景	29
3-1-2 野生型細胞に近接する <i>ccp-8</i> 変異細胞は細胞死により排除される	30
3-1-3 <i>ccp-8/ccp-9</i> の責任遺伝子は <i>Hel25E</i> である	31
3-1-4 <i>Hel25E</i> 変異細胞ではタンパク質合成レベルが低下する	33
3-2 細胞競合制御因子の探索	34
3-2-1 <i>Hel25E</i> 変異による細胞競合は <i>Vha</i> 変異によって抑制される	34
3-2-2 野生型細胞に近接する <i>Hel25E</i> 変異細胞でオートファジー活性が 上昇する	37
3-2-3 <i>Hel25E</i> 変異による細胞競合はオートファジーによって 引き起こされる	39
3-3 細胞競合の分子メカニズムの解析	42
3-3-1 <i>Hel25E</i> 変異クローン内の全細胞で JNK が活性化する	42
3-3-2 オートファジーと JNK の協調により細胞死が引き起こされる	44
3-3-3 オートファジーの下流で細胞死遺伝子 <i>hid</i> の発現が誘導される	46
3-3-4 オートファジーの下流で NFκB の活性を介して <i>hid</i> の発現が 誘導される	48
3-4 他の細胞競合モデルにおいても同様のメカニズムが働いている	50
第4章 考察	54
4-1 これまでの細胞競合に関する知見と本研究成果の関連性	54
4-2 残された重要課題	55
4-2-1 敗者細胞におけるオートファジーの誘導メカニズム	55
4-2-2 オートファジー依存的な細胞死誘導メカニズム	57
4-3 今後の展望	58
文献	59

第2部 細胞非自律的なオートファジー誘導による腫瘍制御機構の解明

第1章 序論	65
第2章 材料と方法	67
2-1 ショウジョウバエ系統	67
2-2 クローンの誘導方法	67
2-3 遺伝学的スクリーニング	68
2-4 免疫染色	68

2-5 統計解析	68
2-6 各実験で用いたショウジョウバエ系統の遺伝子型	69
第3章 結果	72
3-1 腫瘍促進型細胞競合の制御因子の探索	72
3-1-1 <i>fat</i> 変異による細胞競合はオートファジーや NF κ B によって 制御される	72
3-1-2 <i>fat</i> 変異細胞に近接する野生型細胞はオートファジーの活性化を 介して排除される	75
3-1-3 オートファジーの下流で I κ B の発現低下を介して <i>hid</i> の発現が 誘導される	77
3-2 細胞非自律的なオートファジー誘導機構の解析	80
3-2-1 <i>fat</i> 変異細胞における TOR 経路を介したタンパク質合成レベルの 上昇が周囲の野生型細胞のオートファジーを誘導する	80
3-2-2 <i>fat</i> 変異細胞内の <i>bantam</i> -TOR 経路の活性が周囲の野生型細胞の オートファジーを誘導する	83
3-2-3 <i>bantam</i> の発現レベルが細胞競合の勝者・敗者を決定する	86
第4章 考察	89
4-1 スーパーコンペティションは細胞非自律的なオートファジー誘導 によって駆動される	89
4-2 敗者細胞の細胞死誘導が腫瘍形成を促進するメカニズム	90
4-3 スーパーコンペティションの進化的保存性	91
文献	92
謝辞	95

要旨

細胞競合とは、組織中で近接する細胞同士の細胞間コミュニケーションによって一方の細胞に細胞死が引き起こされる現象である。このとき、細胞死によって組織から排除される細胞を細胞競合の「敗者」、組織に残って生存する細胞を「勝者」と呼ぶ。細胞競合は、組織からのがん原性細胞の排除や優良幹細胞の選択に寄与することが示されつつあり、細胞集団のクオリティを最適化する新たな恒常性維持機構として注目されている。これまでに、細胞競合を引き起こす遺伝子変異や細胞変化がいくつか報告されてきたが、異なるトリガーによって引き起こされる細胞競合に共通のメカニズムが存在するのにはよくわかっていなかった。また、勝者細胞に近接する敗者細胞で特異的に起こる細胞変化やシグナル伝達の変化についてもほとんど不明であった。本研究では、まずこれらを明らかにするために、新規細胞競合誘発ショウジョウバエモデル (RNA ヘリカーゼ *Hel25E* 遺伝子変異による細胞競合モデル) を確立し、これを用いた遺伝学的スクリーニングを行った。その結果、細胞競合を抑制する遺伝子変異としてリソソームに存在するプロトンポンプ V-ATPase のコンポーネントの機能欠失変異が多数同定された。V-ATPase はリソソームの酸性化を担っており、その活性はオートファジーに必須である。興味深いことに、正常細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞 (敗者細胞) において特異的にオートファジー活性が上昇しており、このオートファジーを抑制すると変異細胞の排除が強く抑制された。さらなる解析により、オートファジーの活性上昇は NF κ B を介して細胞死誘導遺伝子 *hid* の発現を誘導することがわかった。一方、*Hel25E* 変異細胞集団では一様にストレスシグナルである JNK 経路が活性化していることもわかった。正常細胞に近接する変異細胞では、この JNK 活性上昇に加えてオートファジー依存的な *hid* の発現誘導が起こるため、*hid* と JNK の協調によって細胞死が引き起こされることがわかった。重要なことに、このオートファジーを介した細胞死誘導機構は、リボソームタンパク質遺伝子変異や *mahjong/VprBP* 遺伝子変異細胞が正常細胞に近接した際に敗者となって排除される細胞競合においても共通に機能していることがわかった。また、これら一連の敗者細胞の共通点として、いずれも正常細胞に比べて細胞内タンパク質合成量が顕著に低下していることもわかった。

一方、がん原性の変異細胞が近接する正常細胞を駆逐する細胞競合現象 (スーパーコンペティション) が存在し、例えばがん抑制経路 Hippo 経路の変異細胞 (転写共役因子 Yki/YAP の活性化を介して過剰増殖・腫瘍化する) は近接する正常細胞に細胞死を誘導して組織から排除する。しかし、Hippo 経路変異細胞が周囲の正常細胞にどのようにして細胞死を誘導するのか、またこの細胞死が腫瘍形成にどのような役割を果たすのにはわかっていなかった。これらを明らかにするため、ショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを行った結果、Hippo 経路変異細胞 (勝者細胞) に近接する正常細胞 (敗者細胞) でオートファジー依存的に *hid* が発現誘導されるという、*Hel25E*

変異細胞やリボソームタンパク質遺伝子変異細胞が排除されるのと同様の細胞死誘導シグナルが正常細胞において活性化していることがわかった。また、この正常細胞の細胞死が、Hippo 経路変異細胞の増殖・腫瘍化に必要であることもわかった。さらなる解析により、Hippo 経路変異細胞内では Yki の活性化により発現誘導される microRNA *bantam* を介して TOR シグナルが活性化することでタンパク質合成量が上昇し、これにより近接細胞に細胞非自律的にオートファジーが誘導されることがわかった。細胞は種々のストレスに応答してタンパク質合成レベルを低下させ、またある種の変異細胞やがん細胞はタンパク質合成量が上昇していることが知られている。したがって、組織中でストレスを受けた細胞が排除されることで細胞集団のクオリティが維持されたり、がん原性の変異細胞が周囲の正常細胞を駆逐し腫瘍化したりするプロセスにおいて、本研究で見いだした細胞非自律的オートファジーを介した細胞死誘導機構が重要な役割を果たしている可能性がある。

略語表

Atg: Autophagy-related
Brk: brinker
CycE: cyclin E
Dl: dorsal
Dlg: discs large
Diap1: Drosophila inhibitor of apoptosis 1
Dif: Dorsal-related immunity factor
Dpp: decapentaplegic
Dronc: Death regulator Nedd2-like caspase
EGFR: Epidermal growth factor receptor
EMS: ethyl methane sulfonate
Fwe: Flower
Hel25E: Helicase at 25E
Hep: hemipterous
Hid: head involution defective
InR: Insulin receptor
JNK: c-Jun terminal kinase
Mahj: mahjong
Mats: Mob-as-tumor-suppressor
ModSP: Modular serine protease
OPP: O-propargyl-puromycin
PS: Phosphatidyl Serine
Puc: puckered
Rpr: reaper
Sav: Salvador
Scrib: scribble
Sd: Scalloped
SPE: Spätzle-processing enzyme
Spz: spätzle
S6K: Ribosomal protein S6 kinase
Tor: Target of rapamycin
TRRs: Toll-related receptors
Upd1: unpaired 1
V-ATPase: Vacuolar H⁺ ATPase
Wg: Wingless
Wts: Warts
Yki: Yorkie

第1部

オートファジーを介した敗者細胞の細胞死誘導機構の解明

第1章 序論

1-1 細胞競合とは

生態系では「適者生存」の原理に基づき、生物個体間で生息域や食料を争う生存競争がみられる。このような生存競争が、多細胞生物を構成する細胞間においてもみられることが1975年にショウジョウバエで報告され¹、Cell competition (細胞競合)として知られるようになった。細胞競合とは、組織中で「適応度」の高い細胞と低い細胞が共存すると、適応度の低い細胞が細胞死を起こして組織から排除される現象であり、がん原性細胞の排除や優良幹細胞の選択などの重要な役割を担っていることが示されつつある。

細胞競合現象は、ショウジョウバエのリボソームタンパク質遺伝子変異体を用いた解析によって最初に報告された¹。リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異個体は成虫の毛が細くなる表現型を示すことから、*Minute* と呼ばれている。*Minute* 変異個体 (*M/+*) は、毛の太さや幼虫期の延長 (発生速度の遅延) のような軽微な異常を除き、ほぼ野生型の表現型を示す。しかしながら、*Minute* 変異細胞集団 (クローン) と野生型細胞クローンのモザイクを発生中のショウジョウバエ翅原基 (上皮組織) に誘導すると、*Minute* 変異細胞は時間経過とともに排除され、最終的には野生型細胞のみからなる翅が形成されることがわかった¹。つまり、*Minute* 変異細胞は野生型細胞との共存下でのみ排除されることから、状況依存的に排除されていると考えられた。さらに2002年に、野生型細胞に近接する *Minute* 変異細胞で細胞死が引き起こされていることが示され²、野生型細胞と変異細胞の細胞間相互作用を介した細胞死誘導により細胞競合が引き起こされることが示された。このように細胞競合は、例えば変異細胞や異常細胞単独では排除されないが、より適応度の高い細胞 (正常細胞など) に囲まれると細胞死を引き起こして排除される現象である (図1)³。このとき、細胞死によって組織から排除される細胞を細胞競合の「敗者」、組織に残って生存する細胞を「勝者」と呼ぶ (図1)。細胞競合はショウジョウバエで発見されたが、哺乳類においても同様の現象が確認されつつある^{4,5}。これまでに、apico-basal 極性遺伝子 *scribble (scrib)* や *discs large (dlg)* などの遺伝子変異^{6,7}、エンドサイトーシス経路にかかわる *rab5* や *Syntaxin 7* などの遺伝子変異⁸⁻¹²、Lgl 結合タンパク質である *mahjong (mahj)* / *VprBP* の遺伝子変異¹³、がん遺伝子 *Myc* の高発現^{14,15}、がん遺伝子 *Src* の活性化^{16,17}、がん抑制経路 Hippo 経路の変異¹⁸、モルフォゲン *Wingless (Wg)* / *Wnt*¹⁹、JAK-STAT シグナル²⁰ の活性化など、様々なトリガーによって細胞競合が引き起こされることが報告されており、その分子メカニズムの解析が進められてきた。しかしながら、異なるトリガーによって引き起こされる細胞競合に共通メカニズムが存在するのか、また細胞競合の生理的意義はほとんど明らかにされていなかった。

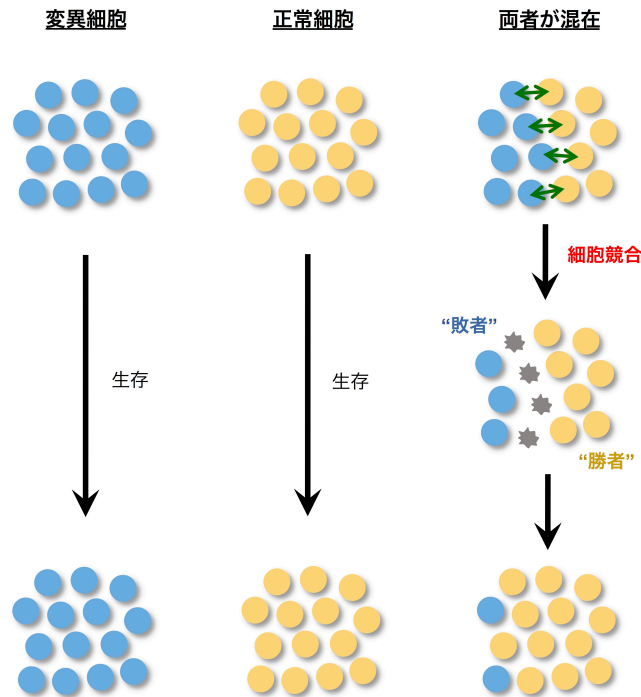


図1 細胞競合

変異細胞（青色）は単独では生存できるが、正常細胞（黄色）と混在すると正常細胞との境界面の細胞で細胞死が引き起こされて組織から排除される。(Nagata and Igaki, *Dev Growth Differ*, 2018 より改変)

1-2 細胞競合の分類とそのメカニズム

細胞競合は、その役割と排除される細胞の挙動から3つのグループに大別できると考える(図2)。1つ目は、腫瘍抑制型細胞競合である。*scrib* や *dlg* などの極性遺伝子はがん抑制遺伝子として機能しており、これを欠損した細胞は細胞極性が崩壊して過剰に増殖する。しかしながら、このような極性崩壊細胞は野生型細胞に囲まれると排除される^{6,7}。すなわち、腫瘍抑制型細胞競合は内在性のがん抑制機構として機能していると考えられる。2つ目は、腫瘍促進型細胞競合である。がん抑制経路である Hippo 経路の構成因子の変異(結果的に転写共役因子 Yorkie (Yki) /YAP を活性化する変異)細胞や *Myc* の高発現細胞に近接する野生型細胞は細胞死を起こして組織から排除される^{14,15,18}。このように腫瘍促進型細胞競合では、正常細胞が駆逐されてがん原性細胞の領域が拡大していくことから、がんを促進する現象であると考えられる。3つ目は、組織最適化型細胞競合である。*Minute (M/+)* や *mahj* 変異細胞は単独では生存できるが、野生型細胞に囲まれると排除される^{1,13}。*Minute* 変異細胞ではタンパク質合成能が低下していることから^{21,22}、このような細胞機能の低下した細胞を排除することで組織(細胞集団)のクオリティを最適化する役割をもつと考えられる。*mahj* 変異が引き起こす細胞変化の詳細はわかっていないが、この競合現象は *c-Jun terminal kinase (JNK)* や *JAK-STAT* など *Minute* 変異による細胞競合と同様のシグナルメカニズムによって制御されることが示唆されている^{2,23,24}。

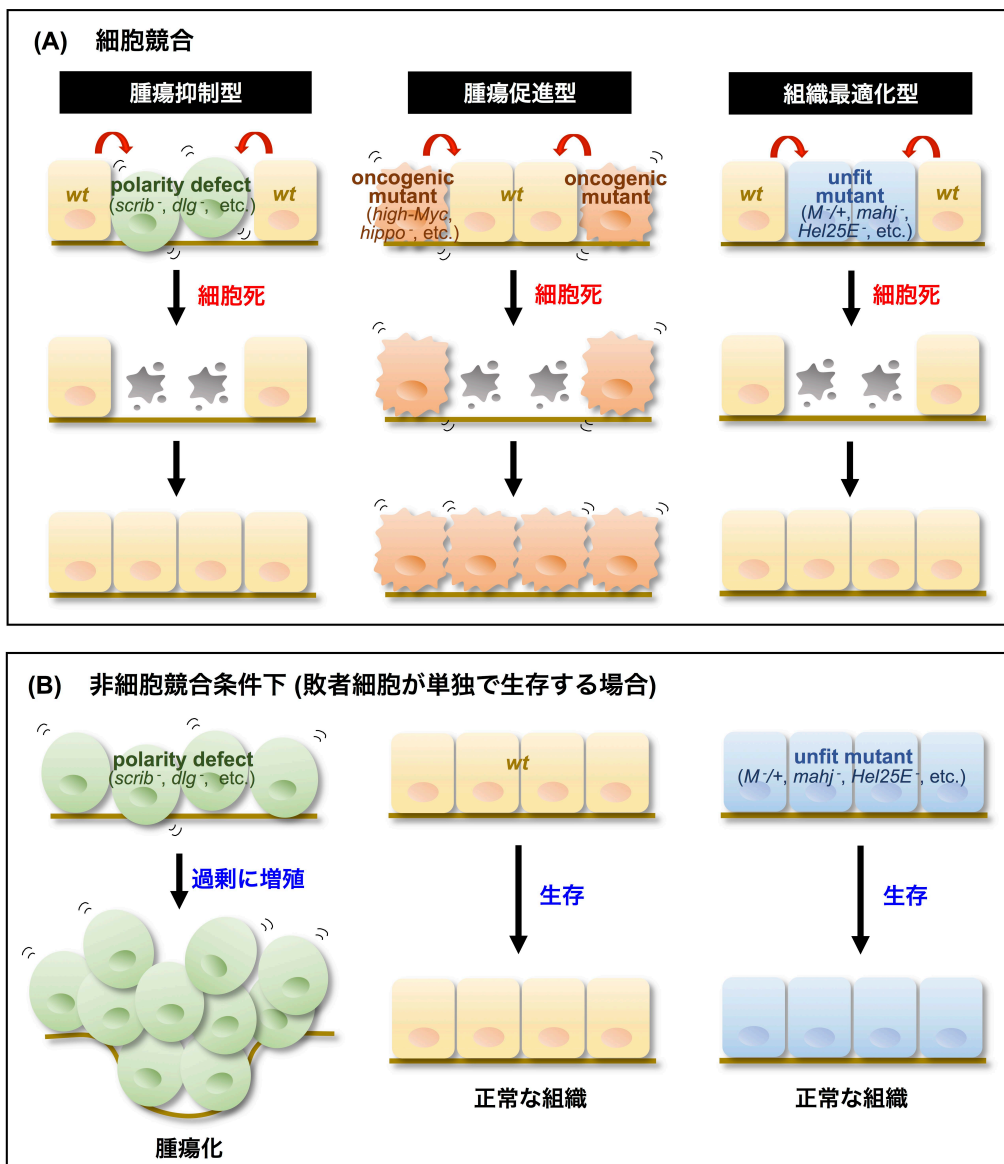


図2 細胞競合の分類

細胞競合は3つのタイプに大別できると考える。細胞競合 (A) と非細胞競合条件下 (B) の細胞の挙動を模式的に示す。腫瘍抑制型細胞競合 (左) : 極性崩壊細胞は単独では過剰に増殖するが (B)、周りを野生型細胞に囲まれると排除される (A)。腫瘍促進型細胞競合 (中央) : 野生型細胞が周りをがん原性細胞に囲まれると排除される (A)。組織最適化型細胞競合 (右) : 適応度の低い細胞は単独ではほぼ正常な組織を形成するが (B)、周りを野生型細胞に囲まれると排除される (A)。

これまでに、腫瘍抑制型細胞競合の分子メカニズムについては、著者が所属する井垣研究室が中心となり明らかにしてきた。一方、腫瘍促進型及び組織最適化型細胞競合の分子メカニズムは、主に *Myc* や *Minute* のモデル系を用いて欧米の研究室を中心に解析されてきたが、そのメカニズムは未だ不明な点が多い。以下に、これまでにシヨウジョウバエを用いて明らかにされてきた細胞競合の分子メカニズムを概説する。

1-2-1 腫瘍抑制型細胞競合

上皮細胞の極性が崩壊すると、増殖能の亢進を引き起こして腫瘍化することが知られている²⁵。ショウジョウバエにおいても、極性遺伝子 *scrib* を欠損した上皮細胞は過剰に増殖して腫瘍を形成する。しかしながら、正常組織中に *scrib* 変異細胞をモザイク状に誘導すると、細胞競合により組織から排除される。このとき、*scrib* 変異細胞ではショウジョウバエ TNF ホモログである *Eiger* を介してストレスキナーゼ JNK が活性化し、細胞死が引き起こされる^{6,7}。著者が所属する研究室では、*scrib* 変異による細胞競合は *Eiger*-JNK シグナルを中心とした以下の①～⑤のメカニズムにより制御されることを見出してきた。

- ① 2011 年、*scrib* 変異細胞は周囲の野生型細胞により貪食・排除されることがわかった。*scrib* 変異クローンをショウジョウバエ成虫原基に誘導すると、変異細胞だけでなく周囲の野生型細胞でも JNK が活性化し、この JNK の下流で貪食シグナルが活性化することで野生型細胞が変異細胞を貪食・排除する²⁶。
- ② 2016 年、野生型細胞に近接する *scrib* 変異細胞は *Slit-Robo2* シグナルを介した物理的な押し出しにより排除されることがわかった。*Slit* 及び *Robo2* は神経の軸索誘導に必要な遺伝子である²⁷。興味深いことに、*scrib* 変異細胞内では JNK の下流で *Slit-Robo2* シグナルが活性化しており、これにより細胞間接着因子 E-カドヘリンの発現レベルが低下することで変異細胞の排除が促進される²⁸。
- ③ 2017 年、*scrib* 変異細胞は *Sas-Ptp10D* シグナルによる *Epidermal growth factor receptor (EGFR)* シグナルの抑制によってその排除が促進されることがわかった。*Sas* 及び *Ptp10D* は通常細胞のアピカル面に局在する膜タンパク質だが、*scrib* 変異細胞と野生型細胞との境界面ではそれぞれ局在が変化する。具体的には、野生型細胞側では *Sas* が、*scrib* 変異細胞側では *Ptp10D* がラテラル面に局在する。これにより、*scrib* 変異細胞内では *Sas-Ptp10D* シグナルにより EGFR 活性が抑制されることで排除が促進される²⁹。
- ④ 2018 年、*scrib* 変異細胞は自然免疫シグナルの活性によって制御されることがわかった。自然免疫シグナルが活性化した状態では、*scrib* 変異細胞内で *Hippo* 経路の標的因子である *Yki* が活性化することで細胞競合が破綻して腫瘍化する。通常はこれを抑制するために、*Toll* シグナルのリガンドである *spätzle (spz)* を活性化するプロテアーゼの阻害因子 *Serpin* が組織内に分泌され（つまり *Toll* シグナルが抑制され）、細胞競合が起こる環境が作り出されていることがわかった³⁰。
- ⑤ 2020 年、ショウジョウバエ個体内のインスリン濃度が *scrib* 変異による細胞競合を制御することがわかった。生体内のインスリン濃度が高い状況下では *scrib* 変異細胞内で *Insulin receptor (InR)* - (mammalian Target of rapamycin) *mTOR* シグナルが活性化し、これにより *scrib* 変異細胞内でタンパク質合成レベルが上昇することで細胞競合が破綻し腫瘍化する。このことから、細胞間の直接的な相互作用のみならず、システミックな因子も細胞競合を制御していることがわかった³¹。

以上のように、*scrib* 変異細胞の細胞競合による排除は細胞間の相互作用、分泌因子、そしてシステミックな因子により制御されることがわかってきた。このような腫瘍抑制型細胞競合の制御メカニズムは、腫瘍促進型及び組織最適化型細胞競合とは基本的には異なると考えられている³²。

1-2-2 腫瘍促進型細胞競合

2004年、JohnstonらとMorenoらはショウジョウバエ翅原基においてがん遺伝子Mycの高発現細胞に囲まれた野生型細胞が細胞死を引き起こして排除されることを報告した^{14,15}。この現象は、がん原性細胞が野生型細胞を競合的に駆逐するものであることから、「スーパーコンペティション」とよばれるようになった。2007年にはがん抑制経路であるHippo経路の変異細胞が野生型細胞を駆逐するスーパーコンペティターとなることが報告された¹⁸。いずれの現象も、がん原性細胞クローンがその領域を拡大していくものであることから、「腫瘍抑制型細胞競合」と捉えることができる。これまで、腫瘍促進型細胞競合は主にMycによるスーパーコンペティションをモデルとして研究されてきた。Morenoらは、Myc高発現細胞のトランスクリプトーム解析により、*flower*, *SPARC*, *azot*という遺伝子群がスーパーコンペティションに関わると報告した³³⁻³⁵。FlowerはCa²⁺チャネルとして機能する膜タンパク質であり、Fwe^{Ubi}、Fwe^{LoseA}、Fwe^{LoseB}という3つのアイソフォームのmRNAが存在する。興味深いことに、正常細胞はFwe^{Ubi}が発現しているが、Myc高発現細胞に囲まれた野生型細胞（敗者細胞）ではFwe^{Lose}が発現していた³³。このようなFweアイソフォームの発現の差異が勝者・敗者を決定づけるという仮説が提唱されたが、敗者細胞で特異的にFwe^{Lose}が発現誘導されるメカニズムは明らかではない。SPARCは細胞外マトリックスタンパク質であり、敗者細胞で発現誘導されて細胞死を抑制する（細胞競合を負に制御する）役割を担うことがわかった³⁴。また、AzotはEF-handタンパク質であり、勝者細胞に近接する敗者細胞で発現誘導されることが示された³⁵。重要なことに、AzotはFwe^{Lose}の下流で発現誘導され、細胞死遺伝子*head involution defective (hid)*を誘導する。さらに、SPARCはAzotの発現を抑制することで細胞死を抑制する細胞競合の負の制御因子であることも示された。しかしながら、SPARCによる細胞競合制御メカニズムには疑義も呈されている³⁶。

一方、JohnstonらはToll-related receptors (TRRs)とそのリガンドであるspzを介した自然免疫シグナルが敗者細胞の排除に必要であることを報告した³⁷。具体的には、Mycによるスーパーコンペティションは敗者細胞で活性化されるIMD経路（グラム陰性細菌により活性化される自然免疫経路）によって制御されることを示した。具体的には、Myc高発現細胞に囲まれた野生型細胞ではToll2, 3, 8, 9の下流でTIRドメインタンパク質Ect4/dSarm, カスパーゼ8ホモログDredd, NFκBホモログRelishを介して細胞死遺伝子*hid*の発現が誘導されることで細胞死が引き起こされる³⁷。さらに、Myc高発現細胞からはSpätzle-processing enzyme (SPE)やModular serine protease

(ModSP) などのセリンプロテアーゼが分泌され、これが spz を活性化して敗者細胞の細胞死を誘導することが示された³⁸。

1-2-3 組織最適化型細胞競合

Minute (M/+) 変異細胞はタンパク質合成レベルが低下しているものの^{21,22}、変異細胞のみから成る組織は見かけ上正常である。しかしながら、*Minute* 変異細胞は野生型細胞に囲まれると細胞競合により排除される¹。したがってこの現象は、不良な細胞を積極的に排除することで組織（細胞集団）のクオリティを最適化する役割をもつと考えられる。一方、*mahj* 変異細胞は2011年にショウジョウバエ及び培養細胞を用いた実験により細胞競合の敗者となることが示されたが²³、*Mahj* タンパク質の機能自体はよくわかっていない。*mahj* 変異細胞も野生型細胞に囲まれたときにのみ細胞死を起こして排除されることから、*Minute* 変異による細胞競合との類似性が示唆される。このような組織最適化型細胞競合の分子メカニズムは、主に *Minute* 変異による細胞競合をモデルとして研究されてきた。しかしながら、複数のグループから異なるメカニズムが提唱され、さらにはそれらに疑義を呈する報告も出ており、メカニズム研究は未だ混沌としている。2002年、Morata らは *Minute* 変異による細胞競合はショウジョウバエ TGFβ/BMP ホモログである Decapentaplegic (Dpp) シグナルによって制御されることを報告した。*Minute* 変異細胞内では、周囲の正常細胞に比べて Dpp シグナルが低下しており、これにより転写因子 *brinker (brk)* の発現上昇を介した JNK の活性化が引き起こされて細胞死が起こるとされた²。しかしながら Baker らは、細胞競合は必ずしも Dpp シグナルに依存しないことを報告している¹⁸。のちに Baker らは、*Minute* 変異細胞は野生型細胞による貪食によって制御されることを報告した³⁹。具体的には、正常細胞が Phosphatidyl Serine (PS) のレセプターである Draper や PSR を介して *Minute* 変異細胞を貪食する。しかしながら、Moreno らはこの貪食は変異細胞に隣接する正常細胞によるものではなく、主にヘモサイト（ショウジョウバエのマクロファージ様細胞）によるものであると報告している^{18,40}。

一方 Moreno らは、Fwe-Azot シグナルは Myc によるスーパーコンペティションと同様に *Minute* 変異による細胞競合をも制御することを報告した^{33,35}。また Johnston らは、TRR-spz を介した免疫シグナルは Myc と同様に *Minute* 変異による細胞競合をも制御することを報告した³⁷。しかしながら、Myc 高発現細胞に囲まれた野生型細胞とは異なり、野生型細胞に囲まれた *Minute* 変異細胞は Toll シグナル（グラム陽性菌により活性化する自然免疫シグナル）を介して排除される。具体的には、*Minute* 変異細胞では Toll3, 9 の下流で IκB ホモログの Cactus、NFκB ホモログの Dorsal-related immunity factor (Dif) 及び Dorsal (Dl) を介して細胞死遺伝子 *reaper (rpr)* が発現誘導されることで細胞死が引き起こされる³⁷ (図 3A)。このとき、TRR-NFκB シグナルが活性化するメカニズムは明らかになっていない。

2018年、Baker らの遺伝学的スクリーニングにより bZip ドメインを持つ転写因子

Xrp1 が *Minute* 変異による細胞競合に重要であることが報告された⁴¹。Xrp1 は *Minute* 変異クローン内の全細胞で発現上昇しており、*Minute* 変異細胞のタンパク質合成レベルの低下や JNK の活性化は Xrp1 に依存していることが示された²²(図 3B)。さらに Baker らは、別の遺伝学的スクリーニングにおいて、リボソームタンパク質遺伝子の 1 つである RpS12 が細胞競合の誘導に必要であることも見出し⁴²、Xrp1 は RpS12 の下流で制御されることを報告した²²(図 3B)。しかしながら、RpS12 がどのようにして Xrp1 を発現誘導するかは明らかにされていない。一方 Basler らは、Xrp1 過剰発現細胞の遺伝子発現プロファイル解析を行った結果、細胞死遺伝子 *hid*、*rpr* だけでなくこれまでに細胞競合制御因子として報告されてきた *flower*、*puckered (puc* ; JNK の標的遺伝子)、*cactus* や *Dif* (Toll シグナルのコンポーネント) も発現上昇することを見出し、細胞競合の実行における Xrp1 の重要性が示された⁴³。しかしながら、変異細胞クローン内の全細胞で発現誘導される Xrp1 がどのようにして野生型細胞に近接する変異細胞にのみ細胞死を引き起こすのかについては明らかにされていない。

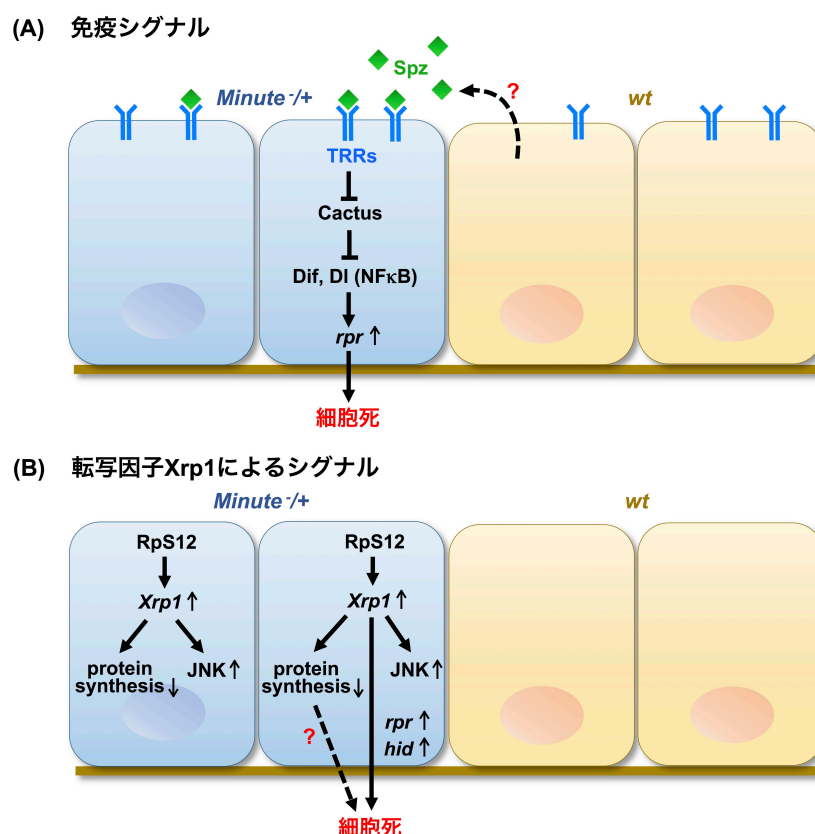


図 3 組織最適化型細胞競合の分子メカニズム

(A) *Minute* 変異細胞で TRR-spz を介した Toll シグナルが活性化することで、細胞死遺伝子 *rpr* の発現が誘導され、細胞死が引き起こされる。

(B) *Minute* 変異細胞で RpS12 の下流で Xrp1 の発現が誘導される。これにより、タンパク質合成の低下や JNK の活性化が引き起こされる。また、Xrp1 により細胞死遺伝子 *rpr* や *hid* が誘導される。

1-3 細胞競合の生理的意義

細胞競合の生理的意義として考えられている代表的なものは「がん抑制」である。ショウジョウバエを用いた解析だけでなく、哺乳類培養細胞やマウスを用いた解析でも、がん遺伝子 Ras や Src を活性化した細胞や *scrib* ノックダウン細胞が周りを野生型細胞に囲まれると排除される現象が知られており、その排除メカニズムも明らかになりつつある⁵。一方で、細胞競合にはがん抑制以外の生理的意義も見えつつある。まず、幹細胞間の競合による優良幹細胞の選択に寄与している可能性がある。マウスの着床後胚エピブラストを用いた解析により、Myc 高発現細胞が周囲の野生型細胞に細胞死を起こして排除することで適応度の高い細胞が残ることがわかった^{44,45}。また、マウスの着床前胚エピブラストにおいては YAP 活性の低い細胞が選択的に排除されることが示された⁴⁶。YAP 活性の高い細胞は多能性が高いことが示されたことから、この幹細胞における細胞競合は幹細胞集団の中でよりクオリティの高い細胞が維持されるメカニズムとして機能していると考えられた⁴⁶。マウスの表皮幹細胞では老化に伴って出現してくるコラーゲンタンパク質 COL17A1 の発現量が低い細胞が細胞競合によって幹細胞集団から排除されることで、皮膚の恒常性が維持されていることが示された⁴⁷。さらに、細胞競合は個体寿命の延伸にも重要であることが報告された。すなわち、細胞競合を正に制御する *azot* を欠損したショウジョウバエ変異体は個体寿命が短縮し、さらに *azot* 遺伝子のコピー数が多い個体の寿命は延伸した³⁵。このように、組織中で相対的に適応度の低い細胞が細胞競合によって排除され、組織中の細胞集団のクオリティが最適化されることで優良な幹細胞が選択・維持されたり寿命の延伸に繋がったりする可能性が考えられる。しかし、細胞競合を引き起こすトリガーやメカニズムはこれまでの想像以上に多様であることが見え始めており、その生理的意義は未解明な部分が多いといえる。

1-4 細胞競合研究の重要課題と本研究の目的

これまでに、様々な細胞競合制御因子が同定されてきた。しかしながら、異なるトリガーによって引き起こされる細胞競合に共通メカニズムが存在するかどうかはわかっていない。細胞競合の共通メカニズムが明らかになれば、勝者・敗者の境界面で特異的に活性変化する分子をマーカー分子として用いることで、生体内で細胞競合がいつ・どこで起こっているかを時空間的に解析できるようになる。生体内の細胞競合が解析可能になれば、細胞競合の生理的意義を明らかにできる可能性が高い。そこで、本研究では細胞競合の共通メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず遺伝学的スクリーニングにより細胞競合のトリガーを網羅的に同定し、その中から解析に最適なモデル系を確立して、遺伝学的スクリーニングにより細胞競合の制御因子を網羅的に同定することでそのメカニズムの解明を目指した。

第2章 材料・方法

2-1 ショウジョウバエの飼育と系統

2-1-1 ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエ系統は実験用標準餌（組成は以下に記載）の入ったプラスチックバイアル内で、25°Cで飼育した。実験用標準餌の組成は、水 18L あたり寒天末 (nacalai tesque #01028-85) 144g、コーンミール（オリエンタル酵母工業）1200g、乾燥酵母（アサヒグループ食品）600g、小麦胚芽（日本製粉）480g、D-(+)-グルコース（nacalai tesque #16805-64）1500g、10% p-安息香酸ブチル（nacalai tesque #06327-15、70%EtOHに溶解）60mL、プロピオン酸（nacalai tesque #29018-55）60mLである。餌（水 18Lの場合）の作り方を以下に示す。

まず水 15L、コーンミール、乾燥酵母、小麦胚芽を鍋に入れ、ダマがなくなるまでかき混ぜる。約 7 分間強火で加熱後、中火にしてさらに約 23 分間混ぜる。相転移を確認後、火を消してグルコースを添加して混ぜる。その後、オートクレーブにかけておいた寒天末+水 3L を添加して混ぜる。餌の温度が 70°C以下になったら、安息香酸ブチルとプロピオン酸を添加して混ぜる。完成した餌は、分注器を用いてバイアル（チヨダサイエンス）に約 4mL ずつ分注し、数時間乾燥させた後にスポンジ栓（チヨダサイエンス）で閉めて保存した。

ショウジョウバエ幼虫のクロロキン処理については、Chloroquine diphosphate salt (Sigma-Aldrich #C6628) を水に溶かし、終濃度 2.0 μ g/ μ L になるように実験用標準餌に添加して混ぜた。クロロキン含有エサの入ったバイアル内でショウジョウバエ成虫を交配させ、次世代の幼虫を解析した。

2-1-1 ショウジョウバエの系統

野生型ショウジョウバエとしては、Canton-S 及び w^{118} 変異体（成虫複眼が白色の表現型を示す）を用いた。3 齢幼虫の成虫原基の解析においては、X 染色体に目的の遺伝子が挿入されている場合を除き、雌雄は区別しなかった。

・ 遺伝学的スクリーニングに用いたテスター系統:

eyFLP1; Ubi-GFP, FRT40A/CyO (40A Ubi-GFP tester), *GMR-hid, FRT40A, l(2)CL-L'/CyO; eyGal4 UAS-FLP* (40A CL tester), *eyFLP1; Ubi-GFP, Hel25E^{cep-8}, FRT40A/CyO* (40A *Hel25E* tester)

・ ショウジョウバエ成虫原基へのクローン誘導に用いたテスター系統:

Tub-Gal80, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP (40A tester), *eyFLP1, UAS-Dicer2; Tub-Gal80, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP* (40A *Dicer2* tester), *Tub-Gal80, FRT40A; UAS-His2AmRFP, eyFLP6, Act>y+>Gal4* (40A RFP tester), *FRT42D, Tub-Gal80; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP* (42D tester)

・ *Minute* の細胞競合解析のためのクローン誘導に用いたテスター系統:

hs-FLP, UAS-GFP; ; *M^{RpL14}, salE>gRpL14>Gal4/TM6B* (L. A. Johnston 博士より分与).

交配 48 時間後に 37°C で 1 時間のヒートショックをかけクローンを誘導した。親ハエは交配 16 時間後に取り出した。幼虫はクローン誘導 72 時間後に解剖した。

・ その他のショウジョウバエ系統:

3xmCherry-Atg8a (G. Juhasz 博士より分与), *mmp1-GFP* (D. Bohmann 博士より分与), *mahj¹* (Y. Tamori 博士より分与), *UAS-Puc* (E. Martin-Blanco 博士より分与), *UAS-Eiger^w* (M. Miura 博士より分与), *Vha55[j2E9]*¹²¹²⁸, *Vha26[okg-696]*⁶³¹⁰⁷, *Vha100-2[0585-G4]*⁶³⁴²⁶, *Vha13[cnj-356]*⁶³¹⁰⁶, *VhaPPA1-1[EP3504]*¹⁷¹³⁵, *TRE-red*⁵⁹⁰¹¹, *hid-lacZ*⁵⁰⁷⁴⁹, *UAS-Atg8a-mCherry*³⁷⁷⁴⁹, *UAS-Atg1*⁵⁶¹⁵⁵, *UAS-Atg1*⁶⁰⁷⁴³, *UAS-Dicer2*²⁴⁶⁵⁰, *UAS-S6k.STDE*⁶⁹¹³, *UAS-hep.Act*⁹³⁰⁶, *UAS-Atg1-RNAi*²⁶⁷³¹, *UAS-Atg1-RNAi*³⁵¹⁷⁷, *UAS-Vha26-RNAi*³⁸⁹⁹⁶, *UAS-Vha44-RNAi*³³⁸⁸⁴, *UAS-Vha68-2-RNAi*³⁴⁵⁸², *UAS-Atg5-RNAi*²⁷⁵⁵¹, *UAS-Atg8b-RNAi*²⁷⁵⁵⁴, *UAS-light-RNAi*³⁴⁸⁷¹, *UAS-car-RNAi*³⁴⁰⁰⁷, *UAS-Snap29-RNAi*²⁵⁸⁶² and *UAS-Syx17-RNAi*²⁵⁸⁹⁶, *UAS-flower-RNAi*²⁷³²³, *UAS-Relish-RNAi*²⁸⁹⁴³ and *UAS-dl-RNAi*³²⁹³⁴ (Bloomington Stock Center), *UAS-Vha55-RNAi*⁴⁶⁵⁵³, *Vha13-RNAi*²⁷⁹⁵⁵, *UAS-hid-RNAi*⁸²⁶⁹ (Vienna *Drosophila* Resource Center), *UAS-Vha100-2-RNAi*^{7679R-3}, *UAS-azot-RNAi*^{11165R-1}, *UAS-Toll9-RNAi*^{HMS00171}, *UAS-spatzle-RNAi*^{HMS01178}, *UAS-spatzle-RNAi*^{HMJ22258}, *UAS-Dredd-RNAi*^{7486R-1}, *UAS-Dif-RNAi*^{6794R-1} (National Institute of Genetics), *UAS-RpL14*⁰⁰¹³⁰⁸

3 番染色体の染色体欠失系統ライブラリーは Bloomington *Drosophila* Stock Center 及び Kyoto Stock Center から入手した。

2-2 クローンの誘導方法

2-2-1 FLP-FRT を用いたクローン誘導方法

EMS スクリーニング及びモディファイヤースクリーニングでは、ショウジョウバエ上皮組織に FLP-FRT システム⁴⁸ を用いた遺伝的モザイククローンを誘導することで細胞競合を解析した。この方法では、ショウジョウバエ細胞の分裂期に出芽酵母由来の組換え酵素 flippase (FLP) とその認識配列 FLP recombination target (FRT) による相同染色体間での組換えを起こし、異なる遺伝的背景を持つ細胞クローンをモザイク状に誘導することができる。EMS スクリーニングにおけるモザイク誘導の例を図 4 に示す。

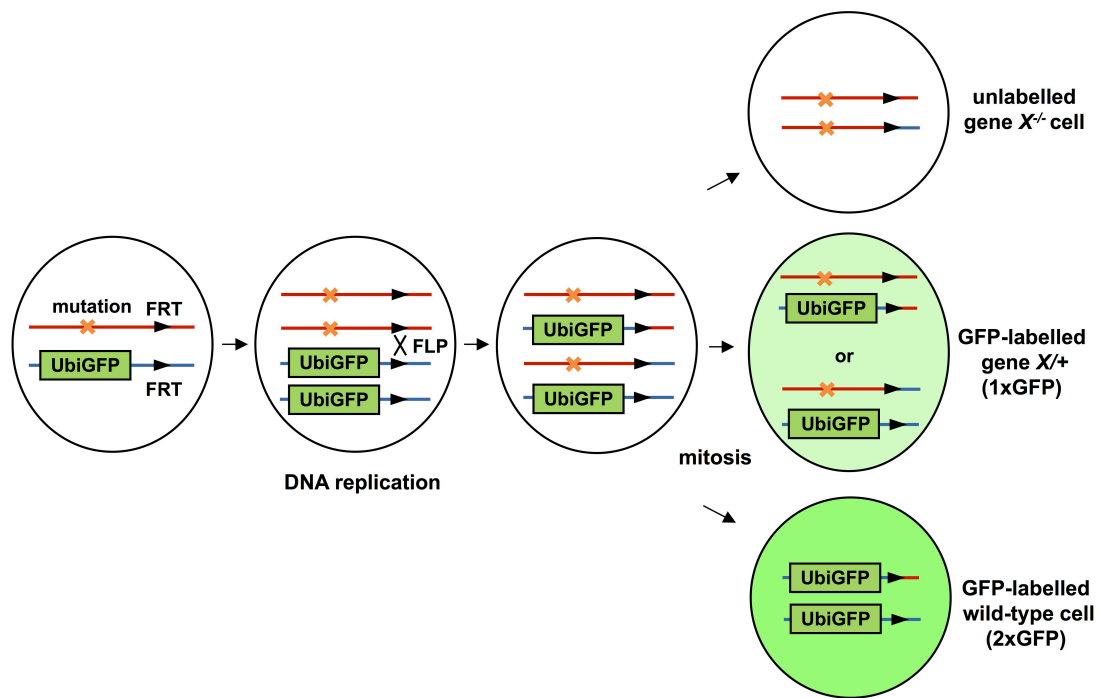


図4 FLP-FRT を用いたクローン誘導方法

複眼特異的プロモーターを用いて flippase (FLP) を発現させることで、GFP ネガティブなホモ変異クローンと GFP ポジティブな野生型クローンをモザイク状に誘導することができる。

2-2-2 MARCM 法

Hel25E 変異及び *mahjong* 変異はホモ接合変異により細胞競合を引き起こすため、Mosaic Analysis with a repressible Cell Marker (MARCM) 法⁴⁹を用いて体細胞クローンを誘導した。MARCM 法では Gal4/UAS システムとこれを抑制する Gal80 タンパク質を用いてホモ変異クローンを誘導して蛍光標識するとともに様々な遺伝子を同時にノックダウンあるいは過剰発現することができる。具体的には、出芽酵母に由来する転写活性因子 Gal4 が UAS 配列に結合すると UAS の下流遺伝子の転写が誘導されるが⁵⁰、Gal4 リプレッサータンパク質である Gal80 をもつ細胞では Gal4/UAS システムが阻害される。細胞分裂期に誘導される FLP-FRT を介した組み換えによって生じるホモ接合変異細胞内では、Gal80 のアレルが消失することで Gal4/UAS システムが働くため、GFP や RFP などのマーカーと様々な RNAi やトランスジーンを同時に発現させることができる（一方で変異をもたない細胞では Gal80 によりこれらの遺伝子発現は抑制される）。MARCM 法によるホモ変異クローン誘導の例を図5に示す。

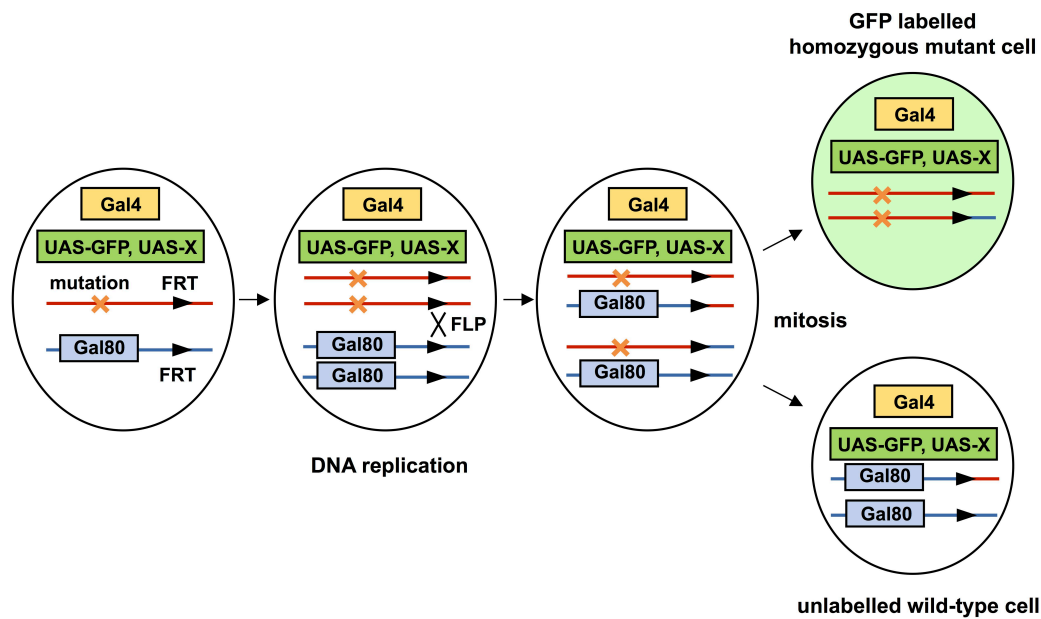


図5 MARCM法を用いたクローン誘導方法

複眼特異的プロモーターを用いて flippase (FLP) を発現させると、Gal80 を持たないホモ変異細胞では Gal4/UAS システムにより GFP が発現誘導される。一方、Gal80 を持つ細胞では Gal4/UAS システムが阻害されるため、GFP は発現しないため、GFP で標識されたホモ変異クローンのモザイクが誘導される。

2-2-3 hs-Flp-out システム

Minute ヘテロ接合変異細胞のクローン誘導には heat shock (hs)-FLP の系を用いた。具体的には、翅原基の pouch 領域特異的なエンハンサーである *salE* で *RpL14*+クローンを誘導した³⁷。*RpL14* のヘテロ変異バックグラウンドの個体において、ヒートショックをかけると FLP の発現が一過性に誘導され、これにより FRT 配列間で組換えが起こる。このとき *gRpL14* (*RpL14* 遺伝子のゲノム領域断片) がフリップアウトするため、GFP ネガティブなクローンに *RpL14* のゲノムがレスキューされ (つまり *RpL14* 遺伝子に関しては野生型となり)、GFP ポジティブな *RpL14*+クローンが誘導される (図6)。

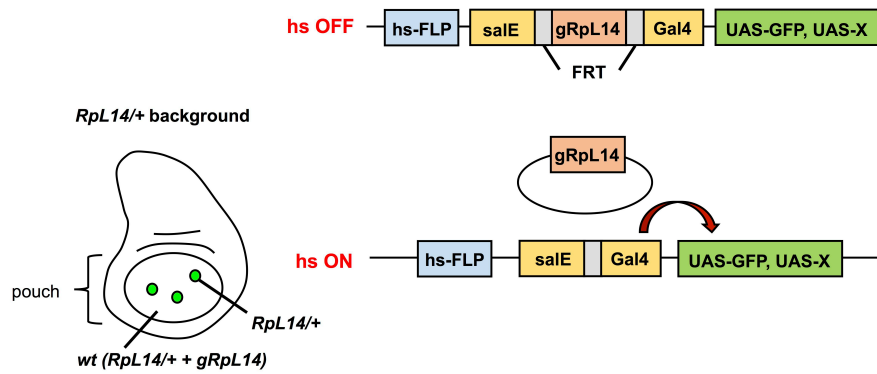


図6 hs-Flp-out システムを用いた *RpL14*/+ クローンの誘導方法

ヒートショックにより翅原基の pouch 特異的に FLP を発現させると、*gRpL14* がフリップアウトする。このとき、*RpL14*/+ バックグラウンドで Gal4/UAS システムにより GFP が発現するため、GFP ポジティブな *RpL14*/+ クローンが誘導される。一方、GFP ネガティブな組織では *RpL14* がゲノムレスキューされるため、野生型細胞クローンが誘導される。

2-3 遺伝子改変ショウジョウバエの作成

TRIzol reagent (Invitrogen) を用いて野生型ショウジョウバエから RNA を抽出したのち、RT-PCR により Hel25E の cDNA を増幅した。PCR に用いたプライマーは以下の通りである。

Forward 5'-GGGGTACCCAAAATGGCCGACAATGACGATC-3'

Reverse 5'-GCTCTAGACTAGCGTCCCTCAATGTATGTAG-3'

最終的に 1.3kb の Hel25E の cDNA (KpnI/XbaI 付加) を pUASTattB ベクターにクローニングした。BestGene Institute (Chino Hills, CA, USA) に委託し、第3染色体左腕 68E1 に目的の UAS ベクターが挿入された遺伝子改変ショウジョウバエを作製した。

2-4 全ゲノムシーケンス

ccp-8 及び *ccp-9* のトランスヘテロ接合体のショウジョウバエの成虫 25-40 匹からゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA の抽出は、Vienna Drosophila Resource Center のプロトコル (http://stockcenter.vdrc.at/control/library_rnai) を参考にした標準的なフェノールクロロホルム法を用いて行った。全ゲノムシーケンスは Beijing Genomics Institute (Shenzhen, China) に委託し、Illumina Hi-Seq 4000 (Illumina, San Diego, CA) によるシーケンス (150bp ペアエンドリード、30x カバレッジ) を行った。シーケンス後のデータ解析は、MacOS のターミナルを用いて行った。まず FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) により fastq ファイルを作製し、クオリティを確認した。得られたリード配列の解析は、UCSC Genome Browser (University of California, Santa Cruz) が提供するショウジョウバエ全塩基配列

(Drosophila melanogaster reference genome version dm6) (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenPath/>) を参照配列として Burrows-Wheeler Aligner Tool の BWA-MEM algorithm⁵¹ (<https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/files/>) を用いてマッピングし、SAM ファイルを作製した。その後、Samtools (<http://www.htslib.org/>) を用いて SAM ファイルを BAM ファイルに変換し、染色体順に並べ替え (Sort)、重複配列を除去し (De-dupping)、第 2 染色体の配列のみ抽出した。その後、Genome Analysis Toolkit (GATK) Best Practices⁵² に基づいてキャリブレーションを行い、GATK HaplotypeCaller⁵³ (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>) を用いてリファレンスゲノムと異なる塩基 (SNP) を検出した。変異のアノテーションは、ショウジョウバエ参照遺伝子セット (Drosophila melanogaster BDGP6.85 reference) (<http://www.fruitfly.org/>) に基づき SnpEff software⁵⁴ (<http://snpeff.sourceforge.net/>) を用いて行った。アノテーションが完了した vcf ファイルをターミナル上で開き、HIGH (stop コドンやフレームシフトなどの遺伝子の機能が失われると予想される変異) および MODERATE (アミノ酸の変化によるミスセンス変異) のみ抽出した。mutator (親株) についても同様の解析を行ったのち、クオリティ値が 20 未満の変異、リファレンスゲノムに存在する変異、mutator に存在する変異を除去し、変異をリストアップした。また、得られた解析結果を Integrative Genomics Viewer (IGV) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>) を用いて表示し、変異を確認した。全ゲノムシーケンスで同定された遺伝子変異については cDNA をシーケンスすることでも確認した。

2-5 遺伝学的スクリーニング

細胞競合を引き起こす *cell competition-induction (ccp)* 変異を探索するためのスクリーニングでは、第 2 染色体左腕に *FRT40A* をもつ遺伝的に均一な遺伝子変異導入系統 ($w/Y; FRT40A$) の雄に 25mM の EMS を与えたのち、雌 ($w; Kr/CyO$) と交配させた。得られた F₁ の雄 ($w/Y; FRT40A^*/CyO$) を 4-5 匹の雌の *eyFLP1; Ubi-GFP, FRT40A/CyO* (40A Ubi-GFP tester) と交配し、F₂ の成虫複眼を観察した。一次スクリーニングでは、non-CyO の F₂ に関し白い細胞 (EMS 変異細胞) の領域と赤い細胞 (野生型細胞) の領域を比較した。二次スクリーニングでは、*GMR-hid, FRT40A, l(2) cell lethal (CL)-L'/CyO; ey-Gal4 UAS-FLP* (40A CL tester) と交配することで、変異細胞の周りの野生型細胞を除去した。

Hel25E 変異による細胞競合を制御する因子を探索するためのモディファイヤースクリーニングでは、第 2 染色体左腕に *FRT40A* をもつ第 3 染色体の染色体欠失系統 ($w/Y; FRT40A/CyO; Df(3)/TM6B$) を作製し、*eyFLP1; Ubi-GFP, Hel25E^{ccp-8}, FRT40A/CyO* (40A *Hel25E* tester) と交配した F₂ の成虫複眼を観察した。Non-CyO かつ non-TM6B の F₂ に関し赤い細胞 (*Hel25E* 変異細胞) の領域と白い細胞 (野生型細胞) の領域を比較した。

2-6 組織学

2-6-1 免疫染色

PBS (phosphate-buffered saline) 内でショウジョウバエの 3 齢幼虫を解剖し、4% Paraformaldehyde (PFA) で氷上にて 5 分反応させたのち室温で 20 分反応させ、固定した。その後、PBT (PBS + 0.1% TritonX100) で 10 分 x 3 回洗浄し、PBTn (PBT + 5% Donkey Serum) で 30 分ブロッキング後、一次抗体を一晩反応させた。一次抗体反応後は、PBT で 30 分 x 3 回洗浄した後に PBTn で 30 分ブロッキングし、二次抗体を 2 時間反応させた。その後、PBT で 30 分 x 3 回洗浄し、マウント剤 (SlowFade™ Gold Antifade Reagent With DAPI ; ThermoFisher Scientific) に浸して翌日に共焦点顕微鏡 Leica SP8 または Zeiss LSM880 で観察した。用いた抗体の種類と希釈倍率は以下の通りである。

・一次抗体 :

rabbit anti-Hel25E (1:100, P. Lasko 博士より分与), rabbit anti-cleaved *Drosophila* Dcp-1 (Asp216) (1:100, Cell Signaling Technology #95785), rabbit anti-ACTIVE JNK pAb (1:100, Promega #V7931), chicken anti- β -galactosidase (1:1000, abcam #ab9361), rat anti-GFP (1:1000, ncalai tesque #04404-26)

・二次抗体 :

Goat anti-rabbit Alexa 546 (1:250, Invitrogen #A11035), Goat anti-rabbit Alexa 647 (1:250, Invitrogen #21246), Goat anti-chicken Alexa 647 (1:250, Invitrogen, #A21449), Goat anti-Rat, Alexa Fluor 488 (1:250, Invitrogen #A11006)

2-6-2 OPP による新生タンパク質合成レベルの解析

Click-iT™ Plus OPP Alexa Fluor™ 647 Protein Synthesis Assay Kit (Thermo Fisher Scientific #C10458) を用いて器官培養中の成虫原基における新生タンパク質合成レベルを検出した。OPP (O-propargyl-puromycin) は puromycin のアナログであり、アミノアシル tRNA の 3' 末端に類似しているため、翻訳中のリボソーム内に取り込まれることで翻訳を停止させる。OPP にはアジド基が結合しており、検出試薬の alexa647 にはアルキン基が結合しているため、これらの Click 反応 (銅触媒を用いたアジドとアルキンとの環化付加反応) を利用し、647nm の蛍光波長を検出することで OPP のシグナルを検出した。実際には、まず 5% Fetal Bovine Serum (FBS) を含む Schneider's *Drosophila* Medium 中で 3 齢幼虫を解剖後、培地に OPP (終濃度 20 μ M) を添加し、10 分間室温で反応させた。反応後、PBS で一回洗浄し、4% PFA で 20 分間固定した。固定後は PBT で 20 分間洗浄、さらに PBS で 20 分洗浄した後、Click-reaction cocktail に 30 分室温で反応させた。その後、Rinse Buffer で 20 分間洗浄後、さらに PBS で 20 分間洗浄し、マウント剤に浸して翌日に顕微鏡観察した。

2-6-3 LysoTracker シグナルの検出

LysoTracker Red DND-99 (Thermo Fisher Scientific #L7528) は酸性オルガネラを検出するため、リソソーム活性を検出することができる。5% Fetal Bovine Serum (FBS) を含む Schneider's *Drosophila* Medium 中で3齢幼虫を解剖後、LysoTracker Red DND-99 (終濃度 4 μ M) を添加し、40 分間反応させた。その後、PBS で5分 x 3回洗浄し、4% PFA で20分間固定した。固定後、PBS で20分 x 2回洗浄し、マウント剤に浸して翌日に顕微鏡観察した。

2-7 統計解析

クローンサイズの定量 (GFP クローンの面積/disc 全体の面積 (%)) には ImageJ Fiji (National Institutes of Health) の Analyze Particles を用い、GFP 及び DAPI の面積をそれぞれ測定した。クローン境界上の Dcp-1、Atg8a 及び *hid-lacZ* ポジティブ細胞を ImageJ Fiji の Analyze Particles 及び ROI Manager 用いてカウントし、クローン周長あたりのシグナル数を算出した。各遺伝子型について、少なくとも 10 枚以上の成虫原基から算出した。統計解析には Excel (Microsoft) 及び EZR⁵⁵ (自治医科大学) を用い、 $p < 0.05$ を有意水準として検定した。パラメトリックな 2 群間の比較には Welch's t-test を、3 群以上のデータ比較では一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) と多重比較検定 (Dunnett's あるいは Tukey's post-hoc test) を行った。ノンパラメトリックな 2 群間の比較には Mann-Whitney's U-test を、3 群以上のデータ比較では Kruskal-Wallis 検定及び多重比較検定 (Steel-Dwass' post hoc test) を行った。全てのグラフのエラーバーは標準偏差を示している。

2-8 各実験で用いたショウジョウバエ系統の遺伝子型

図 7

- (B) *eyFLP1 / + or Y; Ubi-GFP, FRT40A / FRT40A*
- (C) *eyFLP1 / + or Y; Ubi-GFP, Hel25E^{ccp-8}, FRT40A/FRT40A*
- (D) *eyFLP1 / + or Y; Ubi-GFP, Hel25E^{ccp-9}, FRT40A/FRT40A*
- (E) *GMR-hid, FRT40A, l (2) CL-L' / FRT40A; ey-Gal4, UAS-FLP*
- (F) *GMR-hid, FRT40A, l (2) CL-L' / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; ey-Gal4, UAS-FLP*
- (G) *GMR-hid, FRT40A, l (2) CL-L' / Hel25E^{ccp-9}, FRT40A; ey-Gal4, UAS-FLP*

図 8

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*
- (B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*
- (C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-p35*

图 9

- (D, F) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(E) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(G) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Hel25E*
(H) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Hel25E*
(J) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-9}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*
(K) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-9}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Hel25E*

图 1 0

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(B) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-S6K.STDE^{BDSC 6913}*
(C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

图 1 1

- (B) *eyFLP1 / + or Y; Ubi-GFP, Hel25E^{ccp-8}, FRT40A / FRT40A*
(C) *eyFLP1 / + or Y; Ubi-GFP, Hel25E^{ccp-8}, FRT40A / FRT40A; Df (3R) Exel7317 / +*

图 1 2

- (A, D) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / Df (3R) Exel7317*
(C, E) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / Vha55^{i2E9}*

图 1 3

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / Vha26^{okg-696}*
(C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / 100-2^{0585-G4}*
(D) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / Vha13^{cnj-356}*
(E) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / VahPPA1-J^{EP3504}*
(F) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Vha55-RNAi^{VDRC 46553}*
(G) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Vha26-RNAi^{TRiP 38996}*
(H) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Vha100-2-RNAi^{NIG 7679R-3}*
(I) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Vha44-RNAi^{TRiP 33884}*
(J) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Vha68-2-RNAi^{TRiP 34582}*

图 1 4

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / Vha13^{enj-356}*
- (E) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A, UAS-GFP-mCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (F, G) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A, UAS-GFP-mCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

图 1 5

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (B) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1-RNAi^{TRiP 26731}*
- (C) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg5-RNAi^{TRiP 27551}*
- (D) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg8b-RNAi^{TRiP 27554}*
- (E) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg13-RNAi^{VDRC 27955}*
- (F) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-light-RNAi^{TRiP 34871}*
- (G) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-car-RNAi^{TRiP 34007}*
- (H) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Snap29-RNAi^{TRiP 25862}*
- (I) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Syx17-RNAi^{TRiP 25896}*

图 1 6

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (C) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1-RNAi^{TRiP 26731}*
- (D) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1-RNAi^{TRiP 26731}*
- (F) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / 3xmCherry-Atg8a*
- (G) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / 3xmCherry-Atg8a*
- (I) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A, UAS-GFP-mCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-*

GFP /+

(J) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A, UAS-GFP-mCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-p35*

图 1 7

(A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

(B) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1^{BDSC 60743}*

(C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

图 1 8

(A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

(B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

(C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Puckered*

(E) *mmp1-GFP / + ; Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; UAS-His2AmRFP, eyFLP6, Act>y+>Gal4 /+*

(F) *mmp1-GFP / + ; Tub-Gal80, FRT40A / UAS-hep.Act⁹³⁰⁶, FRT40A; UAS-His2AmRFP, eyFLP6, Act>y+>Gal4 /+*

(G) *mmp1-GFP / + ; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; UAS-His2AmRFP, eyFLP6, Act>y+>Gal4 /+*

图 1 9

(A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1^{BDSC 60743}*

(B) *Tub-Gal80, FRT40A / UAS-Eiger^w, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

(C) *Tub-Gal80, FRT40A / UAS-Eiger^w, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1^{BDSC 60743}*

(G) *GMR-Gal4 / +; UAS-Atg1^{BDSC 60743} / +*

(H) *UAS-Eiger^w / GMR-Gal4; + / +*

(I) *GMR-Gal4 / UAS-Eiger^w; UAS-Atg1^{BDSC 60743} / +*

图 2 0

(A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A, hid-lacZ; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*

(B) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A, hid-lacZ; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / +*

(C) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A, hid-lacZ; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Puckered*

(D) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A, hid-lacZ; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Atg1-RNAi^{TRiP 26731}*

(G) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

(H) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-hid-RNAi^{VDRC 8269}*

图 2 1

- (A) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; + / +
- (B) *UAS-Eiger^w / hid-lacZ*; *GMR-Gal4* / +
- (C) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155}* / +
- (F) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155} / UAS-Atg13-RNAi^{VDRC 27955}*
- (G) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155} / UAS-Atg5-RNAi^{TRiP 27551}*
- (H) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155} / UAS-Atg8b-RNAi^{TRiP 27554}*

图 2 2

- (A) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155}* / +
- (B) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155} / UAS-dl-RNAi^{TRiP 32934}*
- (C) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155} / UAS-Dif-RNAi^{NIG 6794R-1}*
- (D) *GMR-Gal4 / hid-lacZ*; *UAS-Atg1^{BDSC 56155} / UAS-Relish-RNAi^{TRiP 28943}*
- (F) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP* / +
- (G) *Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-dl-RNAi^{TRiP 32934}*
- (H) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Dif-RNAi^{NIG 6794R-1}*
- (I) *eyFLP1, UAS-Dicer2 / + or Y; Tub-Gal80, FRT40A / Hel25E^{ccp-8}, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Relish-RNAi^{TRiP 28943}*

图 2 3

- (A) *UAS-dl^{BDSC 9319} / hid-lacZ*; *GMR-Gal4* / +
- (B) *UAS-Relish^{BDSC 55778} / hid-lacZ*; *GMR-Gal4* / +
- (D) *UAS-dl^{BDSC 9319} / +*; *GMR-Gal4* / +
- (E) *UAS-dl^{BDSC 9319} / UAS-Eiger^w*; *GMR-Gal4* / +
- (F) *UAS-dl^{BDSC 9319} / UAS-Eiger^w*; *GMR-Gal4 / UAS-hid-RNAi^{VDRC 8269}*
- (G) *UAS-Relish^{BDSC 55778} / +*; *GMR-Gal4* / +
- (H) *UAS-Relish^{BDSC 55778} / UAS-Eiger^w*; *GMR-Gal4* / +
- (I) *UAS-Relish^{BDSC 55778} / UAS-Eiger^w*; *GMR-Gal4 / UAS-hid-RNAi^{VDRC 8269}*

图 2 4

- (B) *UAS-Eiger^w / GMR-Gal4*; + / +
- (C) *GMR-hid* / +; *GMR-Gal4* / +
- (D) *GMR-hid / UAS-Eiger^w*; *GMR-Gal4* / +

图 2 5

- (A) *hsFLP* / + or *Y*; *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP::CD8* / +; *3xmCherry-Atg8a* / +
(B) *hs-FLP*, *UAS-GFP::CD8* / + or *Y*; ; *M^{RpL14/+}*, *salE>gRpL14>Gal4* / *3xmCherry-Atg8a*
(D, G) *hs-FLP*, *UAS-GFP::CD8* / + or *Y*; ; *M^{RpL14/+}*, *salE>gRpL14>Gal4* / +
(E) *tub>Myc>Gal4*, *hs-FLP* / + or *Y*; ; *UAS-GFP* / *UAS-Dicer2*; *UAS-Atg1-RNAi^{TRiP 26731}* / +

图 2 6

- (A) *FRT42D*, *Tub-Gal80* / *FRT42D*, *mahj¹*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *3xmCherry-Atg8a*
(C, F) *FRT42D*, *Tub-Gal80* / *FRT42D*, *mahj¹*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +
(D) *FRT42D*, *Tub-Gal80* / *FRT42D*, *mahj¹*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *UAS-Atg1-RNAi^{TRiP 26731}*

第3章 結果

3-1 新規細胞競合誘導因子の同定

3-1-1 当研究室で行われた遺伝学的スクリーニングの背景

これまでの細胞競合研究で多く用いられてきた *Minute* 変異による細胞競合モデルは、*Minute* ヘテロ接合変異細胞が細胞競合の敗者となるモデルであることから、体細胞クローン解析技術（通常、着目する遺伝子座のホモ接合細胞を組織中にモザイク状に作製する技術）を用いた解析がきわめて困難であった。そこで、著者が所属する井垣研究室では、ホモ接合変異により細胞競合の敗者となる変異を同定し、MARCM 法⁴⁹(2-2-2 参照)を用いたクローン解析技術による遺伝学的解析を強力に進めることで、細胞競合の分子メカニズム研究に大きなブレイクスルーをもたらすことができると考えた。

まず、ホモ変異により細胞競合の敗者となる遺伝子変異を同定するため、ショウジョウバエを用いた大規模な遺伝学的スクリーニングが実施された。具体的には、一次スクリーニングとして、ショウジョウバエ複眼原基（将来複眼を形成する幼虫期の一層の上皮組織）に変異原化合物 Ethyl Methane Sulfonate (EMS) によりホモ接合変異を誘導した変異細胞クローンをモザイク状に誘導し、発生過程で変異細胞クローンが排除される表現型を指標にしたスクリーニングを行った（図 7A）。次に、一次スクリーニングで得られた変異をホモ接合にもつ細胞クローンの周囲の野生型細胞に細胞死を誘導して除去し、変異細胞のみからなる複眼原基からは正常な眼が形成されることを指標にした二次スクリーニングを行った。これにより、野生型細胞とのモザイク状態でのみ排除される「細胞競合誘導変異 (*cell competition-induction*; *ccp* 変異)」を単離した（図 7A）。当研究室の中村麻衣博士、若狭直樹氏、中野吏洋助氏、越智直孝氏、野口耀司氏によって行われた 9,486 系統の EMS 誘導変異体のスクリーニングの結果、127 系統の細胞競合誘導変異体を得られた。著者は、このうち最も顕著な細胞競合表現型が観察された complementation group である *ccp-8* 及び *ccp-9* 変異体に着目して解析を進めた。*ccp-8* 及び *ccp-9* ホモ変異クローンを複眼原基に誘導すると、成虫複眼では変異クローン（白色組織）のサイズ小さくなり、組織から排除されることが確認された（図 7B-D）。一方、周囲の野生型細胞に細胞死を誘導して除去し、変異細胞のみからなる複眼原基を誘導した際にはほぼ正常な複眼が形成された（図 7E-G）。これらのことから、*ccp-8* 及び *ccp-9* 変異細胞は野生型細胞に囲まれた場合にのみ組織から排除されることがわかった。

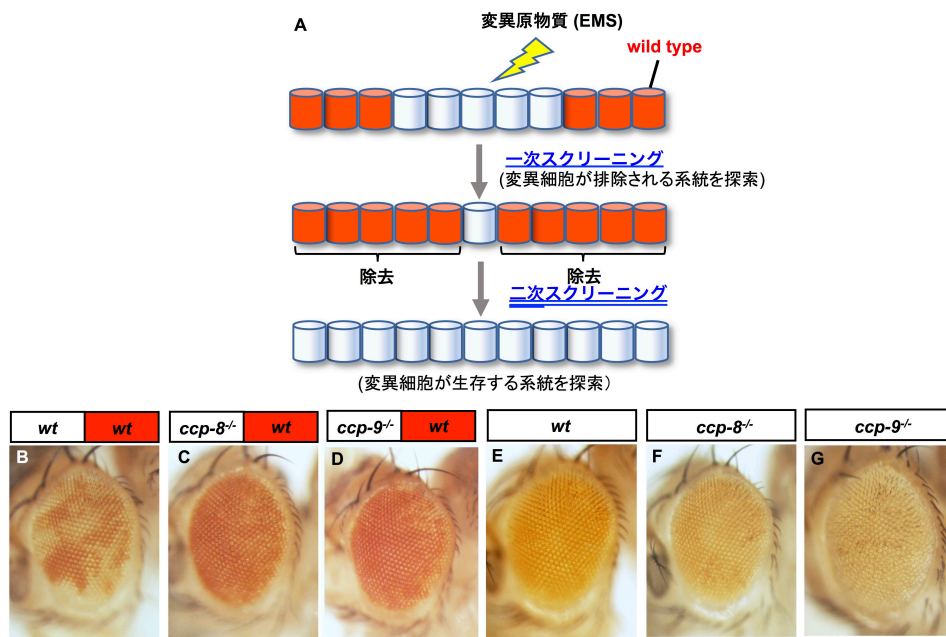


図7 細胞競合の敗者となる変異を探索するための遺伝学的スクリーニング

(A) 一次スクリーニングでは EMS により変異を誘導した変異細胞クローン (白色) と野生型細胞クローン (赤色) をショウジョウバエ複眼に誘導した際に、変異細胞が排除される系統を探索した。二次スクリーニングでは野生型細胞に細胞死を誘導して除去した際に変異細胞単独で正常な眼を形成する系統を探索した。

(B-D) *ccp-8* 及び *ccp-9* の一次スクリーニング結果を示す。遺伝的モザイク法を用いてショウジョウバエ複眼に *wild-type* (B)、*ccp-8^{-/-}* (C)、及び *ccp-9^{-/-}* (D) クローンを誘導した。

(E-G) *ccp-8* 及び *ccp-9* の二次スクリーニング結果を示す。*GMR-hid* 及び *cell-lethal* 変異により周囲の野生型細胞を除去し、*wild-type* (E)、*ccp-8^{-/-}* (F)、及び *ccp-9^{-/-}* (G) クローンを誘導した。

※B-G のデータは中村博士より提供 (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-1-2 野生型細胞に近接する *ccp-8* 変異細胞は細胞死により排除される

次に、複眼原基において *ccp-8* 変異細胞クローンを誘導した際に抗 cleaved Dcp-1 (ショウジョウバエのエフェクターカスパーゼ) 抗体を用いてカスパーゼ活性を検出したところ、野生型細胞に近接する *ccp-8* 変異細胞で細胞死が観察された (図 8A-B', 図 8D, E にて定量)。また、変異細胞内でカスパーゼ阻害タンパク質 p35 を過剰発現させると変異細胞の排除が抑制された (図 8C, 図 8F にて定量)。これらのことから、*ccp-8* 変異細胞は野生型細胞との細胞間相互作用を介して細胞死を引き起こすことで排除されると考えられた。また、図 7 及び図 8 のデータから、*ccp-8* 変異細胞は細胞競合 (細胞間相互作用を介した状況依存的な細胞死誘導) により組織から排除されることがわかった。

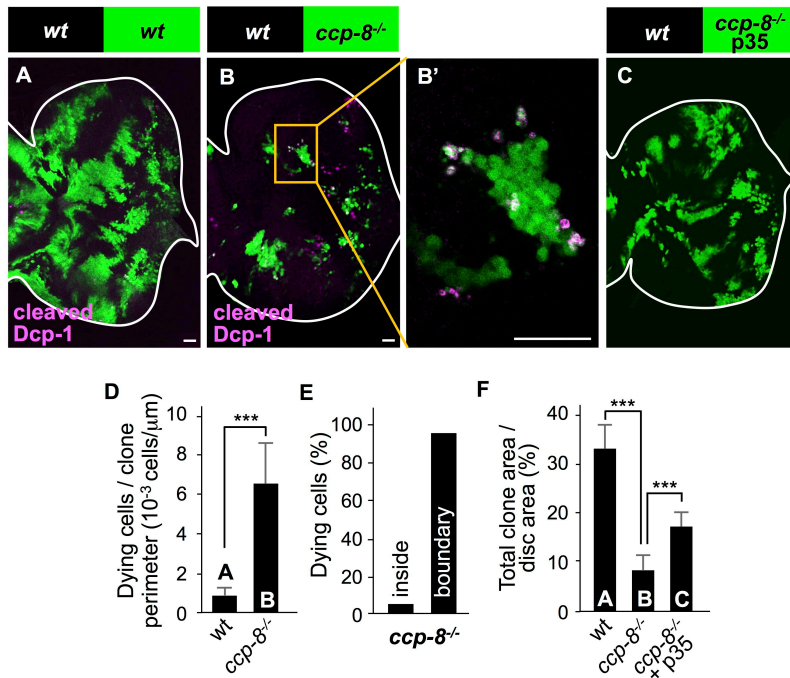


図8 *ccp-8* 変異細胞は細胞競合によって排除される

(A, B) MARCM法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A) 及び *ccp-8*^{-/-} (B) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。B'は B の拡大図を示す。

(C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *ccp-8*^{-/-} + UAS-p35 (C) クローンを誘導した。

(D) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=12、disc の枚数) 及び *ccp-8*^{-/-} (n=20) について定量し、Welch's t-test により検定した。

(E) *ccp-8* 変異クローンの内側 (5.9%) と野生型細胞との境界面 (94.1%) の細胞死の割合について定量した (n=20、disc の枚数)。

(F) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *wild-type* (n=30、disc の枚数)、*ccp-8*^{-/-} (n=62)、及び *ccp-8*^{-/-} + UAS-p35 (n=18) について定量し、Turkey's test により検定した。

***は p<0.001 を示す。Scale bar=50μm (Nagata et al., Dev Cell, 2019 より改変)

3-1-2 *ccp-8/ccp-9* の責任遺伝子は *Hel25E* である

そこで次に、*ccp-8* 及び *ccp-9* の責任遺伝子を同定するために次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を行った。その結果、いずれの変異アリルにおいても *Helicase at 25E (Hel25E)* 遺伝子にミスセンス変異が誘導されていることがわかった。具体的には、*ccp-8* は 255 番目のアミノ酸残基が Thr→Met に、*ccp-9* は 9 番目のアミノ酸残基が Asp→Val に変化していた (図 9A-C)。また、複眼原基において *ccp-8* 変異クローンを誘導した際に抗 *Hel25E* 抗体を用いて免疫染色を行うと、変異細胞内で *Hel25E* タンパク質の発現量が低下していた (図 9D)。このことから、このミスセンス変異は loss of function 変異であると考えられた。実際に、*ccp-8* あるいは *ccp-9* 変異クローン内で野生型 *Hel25E* タンパク質を過剰発現させたところ、変異クローンの排除が顕著

に抑制された (図 9E-H, J, K、図 9I, L にて定量)。以上の結果から、*ccp-8/ccp-9* 変異の責任遺伝子は *Hel25E* であるといえた。(以降、*ccp-8* 変異細胞を用いてすべての解析を行い、これを *Hel25E* 変異細胞と表記した。また、本論文内では比較を簡易化するため、コントロールのデータについては複数回に渡って同一の写真を使用することがある。)

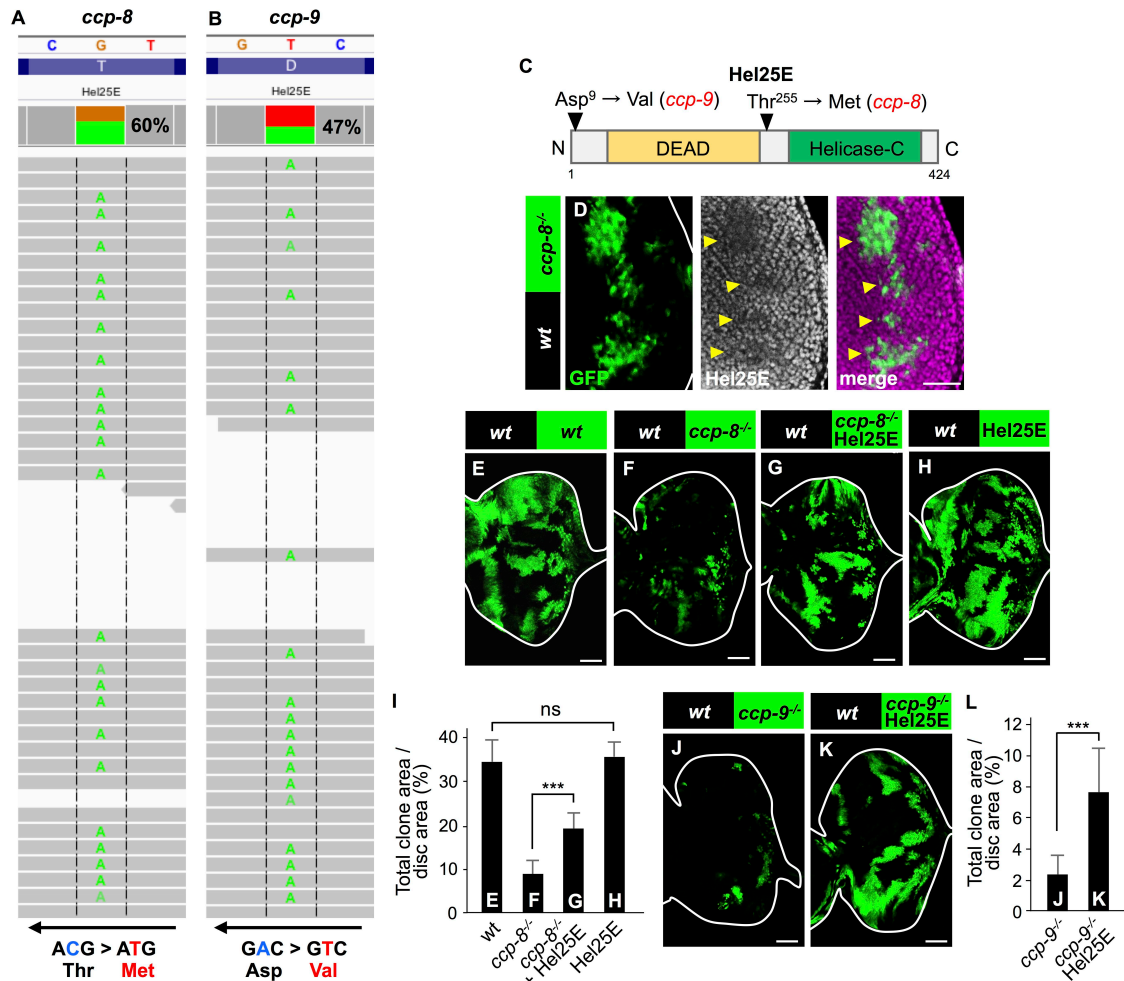


図 9 *ccp-8/ccp-9* 変異の責任遺伝子は *Hel25E* である

(A-C) トランスヘテロ接合体 (*ccp-8*^{+/+}及び *ccp-9*^{+/+}) の全ゲノムシーケンスの結果、*Hel25E* 遺伝子の *ccp-8* は 255 番目のアミノ酸コドンが AC G→AT G (Thr→Met) (A) に、*ccp-9* は 9 番目のアミノ酸コドンが GAC→GTC (Asp→Val) (B) に変化していた (IGV (2-4 参照) のデータ)。Hel25E タンパク質は DEAD-box ドメインと Helicase-C ドメインを持つ。*ccp-8* 及び *ccp-9* の変異箇所を示す (C)。

(D) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *ccp-8*^{-/-} クローンを誘導し、抗 Hel25E 抗体で染色した。

(E-H) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (E)、*ccp-8*^{-/-} (F)、*ccp-8*^{-/-} + UAS-Hel25E (G) 及び UAS-Hel25E (H) クローンを誘導した。

(I) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *wild-type* (n=30、disc の枚数)、*ccp-8*^{-/-} (n=62)、*ccp-8*^{-/-} + UAS-Hel25E (n=18) 及び UAS-Hel25E (n=12) について定量し、Turkey's test により検定した。

(J, K) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *ccp-9*^{-/-} (J) 及び *ccp-9*^{-/-} + UAS-Hel25E (K) クローンを誘導した。

(L) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *ccp-9^{-/-}* (n=18、disc の枚数) 及び *ccp-9^{-/-}* + UAS-*Hel25E* (n=20) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

***は $p < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μ m (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-1-3 *Hel25E* 変異細胞ではタンパク質合成レベルが低下する

Hel25E 遺伝子は、mRNA を核内から細胞質へ移行するのに必要な DEAD-box RNA ヘリカーゼをコードする。実際に、ショウジョウバエ S2 細胞において *Hel25E* をノックダウンするとタンパク質合成がグローバルに抑制されることが示されている⁵⁶。そこで、*Hel25E* 遺伝子変異が複眼原基においても同様の現象を引き起こすかどうかを O-propargyl-puromycin (OPP; puromycin アナログ) を用いて新生タンパク質合成を解析することで調べた。その結果、*Hel25E* 変異細胞クローンでは周囲の野生型細胞クローンに比べてタンパク質合成レベルが顕著に低下していることがわかった (図 10A-C)。このことから、*Hel25E* 変異による細胞競合は、タンパク質合成量の低下によって引き起こされる *Minute* 細胞競合と類似の現象である可能性が高いと考えられた。

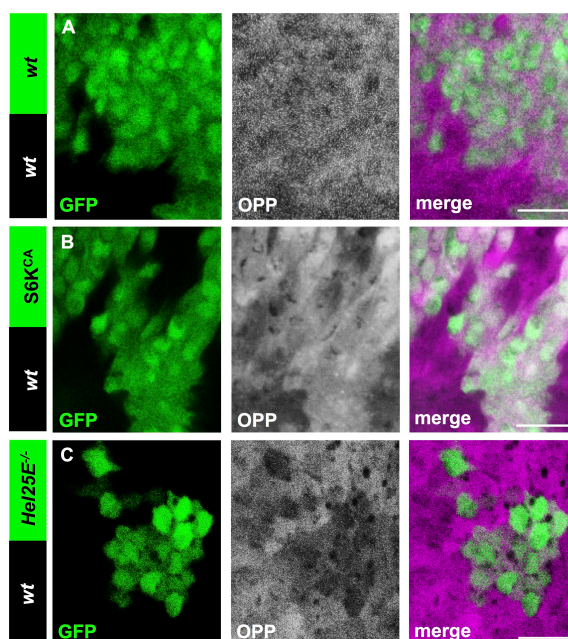


図 10 *Hel25E* 変異細胞ではタンパク質合成能が低下する

(A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、UAS-S6K^{CA} (B) 及び *Hel25E^{-/-}* (C) クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。S6K (ribosomal protein S6 kinase) はリボソームタンパク質 S6 をリン酸化することで翻訳を促進する。そのため、UAS-S6K^{CA} (恒常活性化型 S6 kinase) はタンパク質合成が上昇するポジティブコントロールとして用いた。Scale bar=10 μ m (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-2 細胞競合制御因子の探索

3-2-1 *Hel25E* 変異による細胞競合は *Vha* 変異によって抑制される

以上の解析から、新規細胞競合誘導変異 *Hel25E* を見出すことに成功し、これを用いたクローン解析を遺伝学的スクリーニングに適用することで、細胞競合の制御因子を網羅的に探索することが可能となった。具体的には、ショウジョウバエ複眼に *Hel25E* 変異細胞（赤色）と野生型細胞（白色）のモザイクを誘導した際に、第3染色体のほぼ全領域をカバーする一連の部分染色体欠失系統（染色体の一部が欠失しているショウジョウバエ系統ライブラリー）を用いて欠失変異をヘテロに誘導し、細胞競合が抑制される系統（suppressor）を探索した（図 11A）。約 250 系統の欠失変異系統をスクリーニングした結果、7 系統の suppressor を得た。次に、これらの染色体欠失系統における細胞競合の抑制表現型の責任遺伝子を同定するため、部分的にオーバーラップする複数の染色体欠失系統を用いてさらなるスクリーニングを行うことで責任領域を狭めていった。具体的には、*Df(3R)Exel7317* をヘテロに誘導すると *Hel25E* 変異細胞の排除が強く抑制され（図 11B, C）、この *Df(3R)Exel7317* と欠失領域を部分的に共有する *Df(3R)BSC486* 及び *Df(3R)ED5619* を誘導した際にも同様に抑制されたが、*Df(3R)BSC847* では抑制されなかった（図 11D）。つまり、*Df(3R)Exel7317* の責任遺伝子は図 11D'（拡大部分）の領域にあると考えられた。この領域には3つの遺伝子と2つの non-coding RNA のみが存在しており、これらのうち *Vha55* 遺伝子が細胞競合のサプレッサー変異の責任遺伝子であることがわかった（後述）。

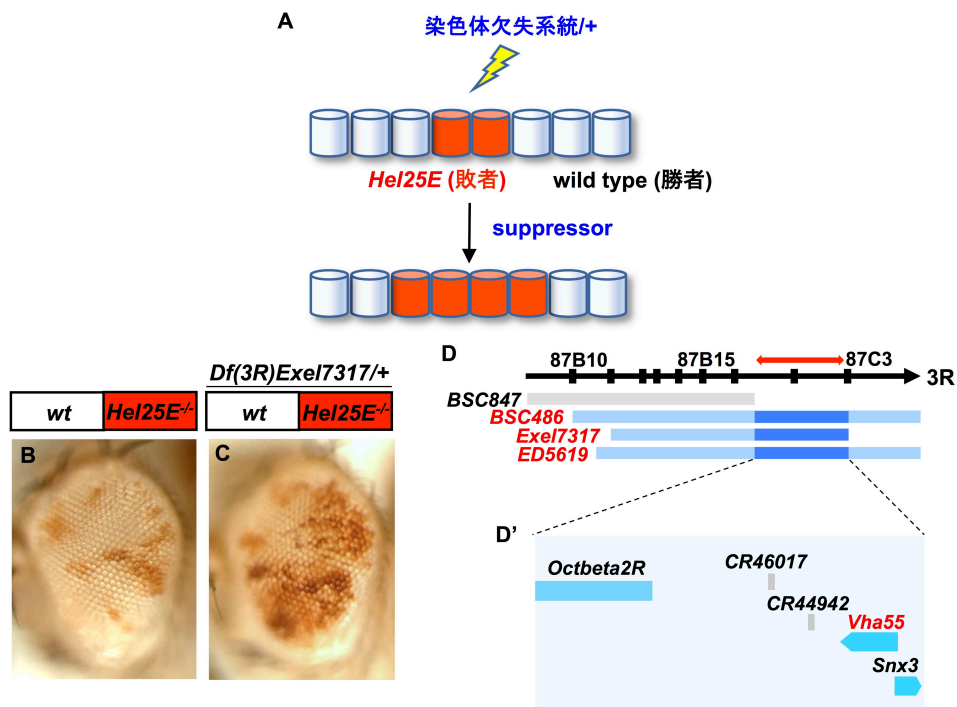


図 1 1 *Hel25E* 変異細胞の排除は *Df(3R)Exel7317/+*により抑制される

(A) ショウジョウバエ複眼に *Hel25E* 変異細胞 (赤色) と野生型細胞 (白色) のクローンを誘導した際に、組織全体に染色体欠失系統をヘテロに誘導する。この時、変異細胞が排除されなくなる suppressor を探索した。

(B, C) 遺伝的モザイク法を用いてショウジョウバエ複眼に *Hel25E*^{-/-} (B)、及び *Hel25E*^{-/-} + *Df(3R)Exel7317/+* (C) クローンを誘導した。

(D) *Df(3R)BSC486*, *Df(3R)Exel7317* 及び *Df(3R)ED5619* の責任遺伝子を同定するためのマッピング図を示した。*Df(3R)BSC487* (灰色部分) では細胞競合は抑制されなかったことから、責任遺伝子は 87C1-87C3 の領域に絞られた。(Nagata et al., *Dev Cell*, 2019 より改変)

Hel25E 変異クローンをモザイクにもつ複眼原基全体に *Vha55* 変異をヘテロに誘導すると *Hel25E* 変異クローンの排除が強く抑制され (図 12A-C、図 12D にて定量)、さらにクローン境界上の細胞死が顕著に抑制された (図 12D, E、図 12F にて定量)。ここで *Vha* は、Vacuolar H⁺ ATPase (V-ATPase)⁵⁷ と呼ばれるリソソーム膜に存在するプロトンポンプのコンポーネントの一つである (図 13L)。興味深いことに、本スクリーニングにより第3染色体に存在する全ての *Vha* 変異が *Hel25E* 変異による細胞競合を抑制することがわかった (図 13A-E、図 13K にて定量)。すなわち、V-ATPase 活性が細胞競合に必要であると考えられた。さらに、*Hel25E* 変異クローン内で *Vha* をノックダウンすると細胞競合が抑制されたことから (図 13F-J、図 13K にて定量)、変異細胞が細胞死を起こすために V-ATPase 活性が必要であると考えられた。

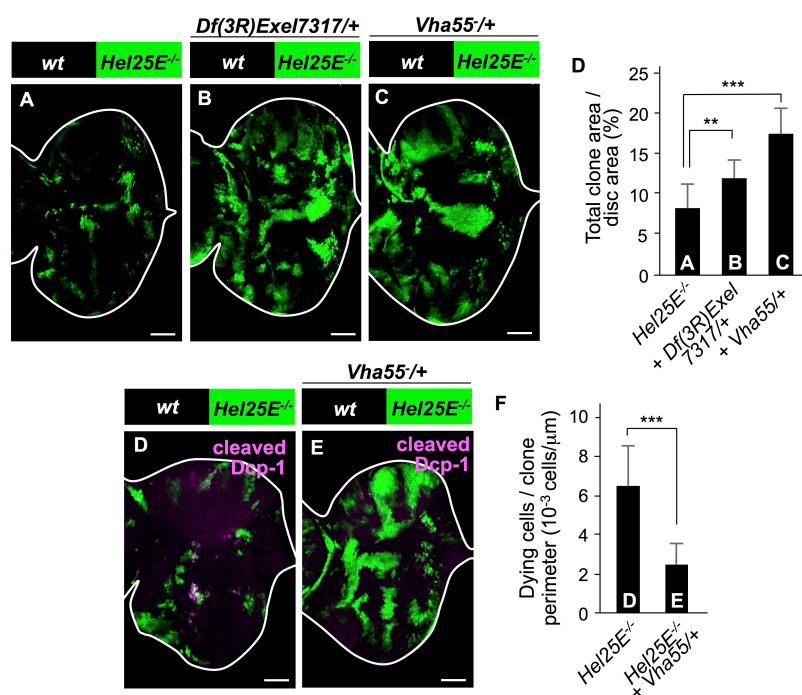


図 1 2 *Hel25E* 変異細胞の排除は *Vha55* 変異により抑制される

(A-C) MARCM法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Hel25E*^{-/-} (A)、*Hel25E*^{-/-} + *Df(3R)Exel7317/+* (B) 及び *Hel25E*^{-/-} + *Vha55/+* (C) クローンを誘導した。

(D) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *Hel25E^{-/-}* (n=62, disc の枚数)、*Hel25E^{-/-} + Df(3R)Exel7317/+* (n=16) 及び *Hel25E^{-/-} + Vha55/+* (n=22) について定量し、Dunnett's test により検定した。

(D, E) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Hel25E^{-/-}* (D) 及び *Hel25E^{-/-} + Vha55/+* (E) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。

(F) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10^{-3} cells/ μm) を *Hel25E^{-/-}* (n=20, disc の枚数) 及び *Hel25E^{-/-} + Vha55/+* (n=16) について定量し、Welch's t-test により検定した。

***は $p < 0.001$ 、**は $p < 0.01$ を示す。Scale bar=50 μm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

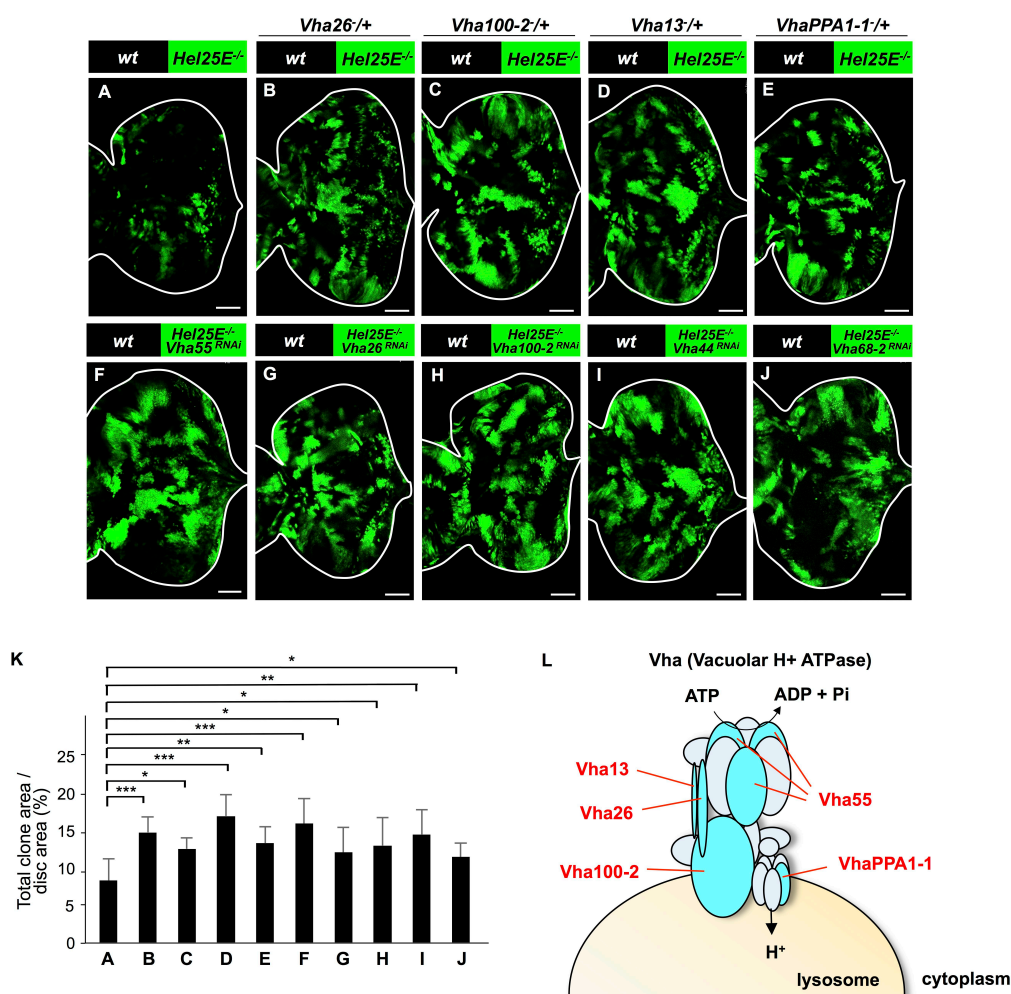


図 1 3 細胞競合には V-ATPase 活性が必要である

(A-J) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Hel25E^{-/-}* (A)、*Hel25E^{-/-} + Vha26/+* (B)、*Hel25E^{-/-} + Vha100-2/+* (C)、*Hel25E^{-/-} + Vha13/+* (D)、*Hel25E^{-/-} + VhaPPA1-1/+* (E)、*Hel25E^{-/-} + Vha55-RNAi* (F)、*Hel25E^{-/-} + Vha26-RNAi* (G)、*Hel25E^{-/-} + Vha100-2-RNAi* (H)、*Hel25E^{-/-} + Vha44-RNAi* (I) 及び *Hel25E^{-/-} + Vha68-2-RNAi* (J) クローンを誘導した。

(K) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *Hel25E^{-/-}* (n=62, disc の枚数)、*Hel25E^{-/-} + Vha26/+* (n=12)、*Hel25E^{-/-} + Vha100-2/+* (n=9)、*Hel25E^{-/-} + Vha13/+* (n=24)、*Hel25E^{-/-} + VhaPPA1-1/+* (n=10)、*Hel25E^{-/-} + Vha55-RNAi* (n=12)、*Hel25E^{-/-} + Vha26-RNAi* (n=9)、*Hel25E^{-/-} + Vha100-2-RNAi* (n=10)、*Hel25E^{-/-} + Vha44-RNAi* (n=10) 及び *Hel25E^{-/-} + Vha68-2-RNAi* (n=9) について定量

し、Dunnett's test により検定した。

***は $p < 0.001$ 、**は $p < 0.01$ 、*は $p < 0.05$ を示す。Scale bar=50 μ m

(L) V-ATPase の構造を示す。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-2-2 野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞でオートファジー活性が上昇する

3-2-1 より、V-ATPase 活性が *Hel25E* 変異により誘導される細胞競合に必要なことがわかった。ここで、V-ATPase はリソソームの酸性化に必要なことから、まず LysoTracker を用いてリソソームの活性を調べた。その結果、野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞で LysoTracker シグナルが検出されたため、実際に細胞競合の敗者細胞でリソソーム活性が上昇していることがわかった (図 14A-B', 図 14D にて定量)。また、このリソソーム活性上昇は *Vha* 変異を誘導することにより抑制されることも確認された (図 14C、図 14D にて定量)。そこで、リソソーム活性が重要な役割を果たすことがよく知られている生命現象として、オートファジーに着目した。オートファジーの過程では、まず細胞質内に隔離膜が出現し、これが細胞内のタンパク質やオルガネラを取り込んでオートファゴソームを形成したのち、リソソームと融合してオートリソソームを形成することで分解される⁵⁸。興味深いことに、オートファゴソームマーカーである Autophagy-related 8a (Atg8a) -mCherry⁵⁹ を用いて複眼原基中のオートファジーを解析したところ、野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞ではオートファゴソームの数が顕著に増加していることがわかった (図 14E, F の斑点状のシグナル、図 14H, I にて定量)。この Atg8a シグナルの増加は①オートファジーの活性化、②リソソームの機能不全のいずれの可能性も考えられる。そこで、オートファゴソームインヒビターであるクロロキンで幼虫を処理することでオートリソソームの形成を阻害した際の Atg8a シグナルを解析した。つまり、この時 Atg8a シグナルがさらに増加すればオートファジー活性の上昇を意味し、変化がなければリソソームの機能不全を意味する。クロロキン処理の結果、Atg8a シグナルが有意に増加したことから (図 14G、図 14H にて定量)、野生型細胞との境界面にある *Hel25E* 変異細胞ではオートファジー活性が上昇していることがわかった。

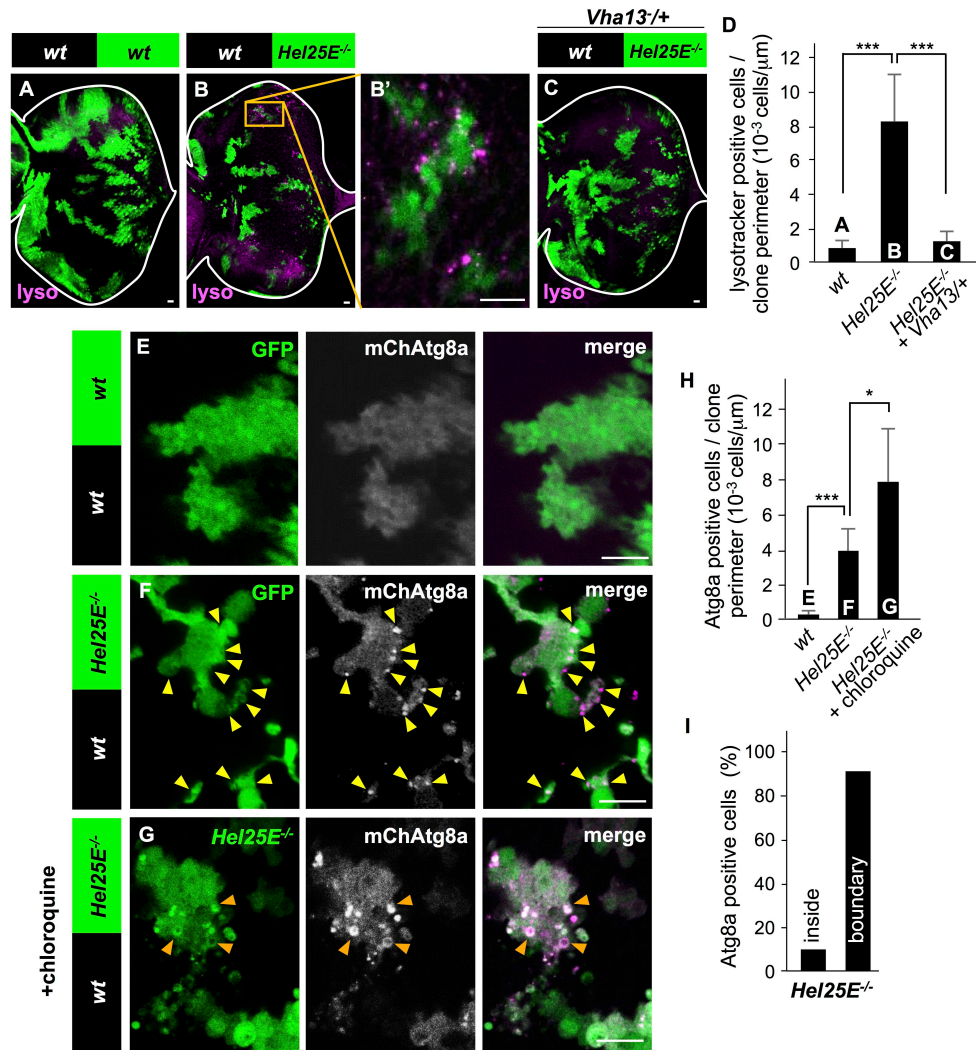


図 1 4 野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞ではオートファジー活性が上昇する (A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、*Hel25E^{-/-}* (B) 及び *Hel25E^{-/-}* + *Vha13^{+/+}* (C) クローンを誘導し、LysoTracker 染色を行なった。B'は B の拡大図を示す。Scale bar=10μm (D) GFP クローンの周囲の長さあたりの LysoTracker ポジティブ細胞数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=12, discs の枚数)、*Hel25E^{-/-}* (n=15) 及び *Hel25E^{-/-}* + *Vha13^{+/+}* (n=12) について定量し、Tukey's test により検定した。

(E-G) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した UAS-Atg8a-mCherry (E)、*Hel25E^{-/-}* + UAS-Atg8a-mCherry (F) 及び *Hel25E^{-/-}* + UAS-Atg8a-mCherry (クロロキン処理) (G) クローンを誘導した。黄色の矢頭は Atg8a puncta を示す。オレンジ色の矢頭はクロロキン処理により拡大した Atg8a puncta を示す。Scale bar=5μm

(H) GFP クローンの周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10⁻³ cells/μm) を UAS-Atg8a-mCherry (n=12, disc の枚数)、*Hel25E^{-/-}* + UAS-Atg8a-mCherry (n=16) 及び *Hel25E^{-/-}* + UAS-Atg8a-mCherry (クロロキン処理) (n=10) について定量し、Tukey's test により検定した。

(I) *Hel25E* 変異クローンの内側 (9.5%) と野生型細胞との境界面 (90.5%) の Atg8a puncta の割合について定量した (n=16, disc の枚数)。***は p<0.001、*は p<0.05 を示す。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-2-3 *Hel25E* 変異による細胞競合はオートファジーによって引き起こされる

3-2-2 より、排除される *Hel25E* 変異細胞でオートファジー活性が上昇していたことから、オートファジーの活性化が敗者細胞の排除に寄与している可能性が考えられた。そこで、*Hel25E* 変異クローン内で *Atg1*、*Atg5*、*Atg8b* などのオートファジー関連遺伝子⁶⁰ や *light (Vps41)*、*carnation (Vps33)*、*Snap29*、*Syx17* などのオートファゴソーム形成に必要な遺伝子⁶¹ をノックダウンすることでオートファジーを阻害したところ、いずれも *Hel25E* 変異細胞の排除が顕著に抑制されることがわかった (図 15A-I、図 15J にて定量)。さらに、この時の細胞死を解析したところ、野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異でみられていた細胞死が抑制されていた (図 16A-D、図 16E にて定量)。また、オートファジー活性を示す *Atg8a* シグナルと細胞死を示す抗 *cleaved Dcp-1* 抗体染色のシグナルが共局在していた (図 16F, G、図 16H にて定量)。さらに、*Hel25E* 変異細胞内で p35 を過剰発現させることにより細胞死を抑制すると、*Atg8a* シグナルが有意に増加した (図 16I, J、図 16K にて定量)。これらの結果から、*Hel25E* 変異細胞ではオートファジーによって細胞死が引き起こされることがわかった。

そこで、*Atg1* を過剰発現⁶² させることでオートファジーを活性化したクローンを複眼原基に誘導したところ、これらのクローンでは *Hel25E* 変異クローンのような強い排除は起こらなかった (図 17A-C、図 17D にて定量)。つまり、*Hel25E* 変異による細胞競合には、オートファジーの活性化に加えて細胞死を引き起こすための別の因子が必要であると考えられた。

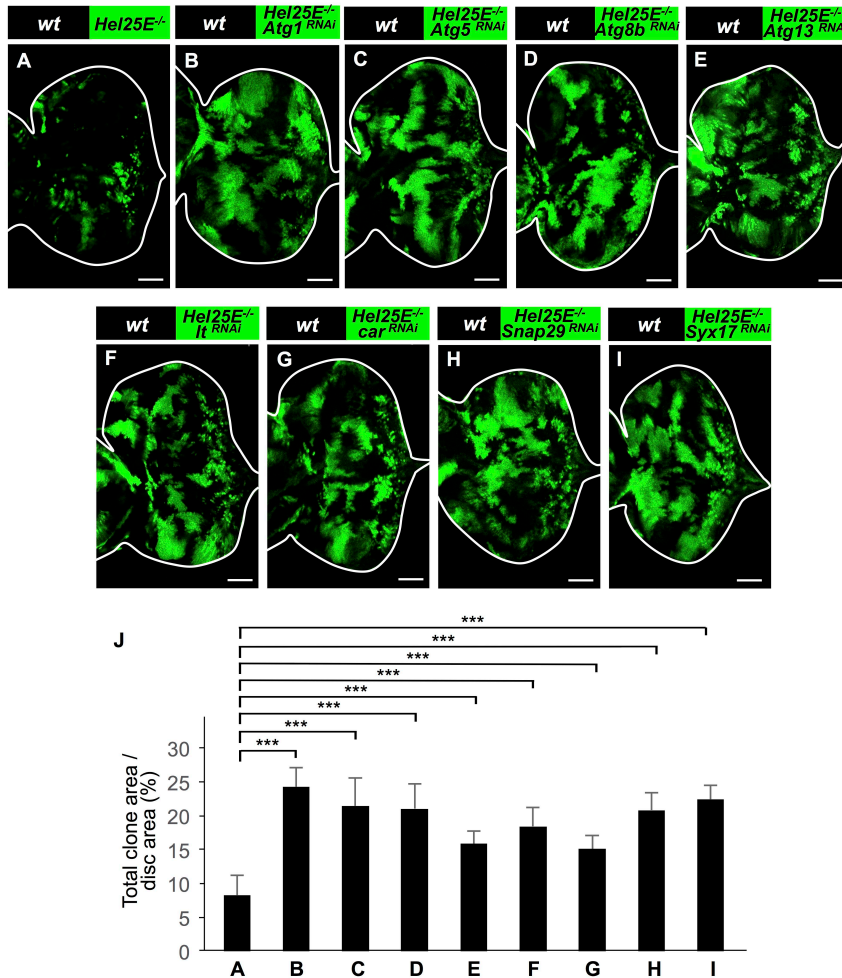


図 15 *Hel25E* 変異による細胞競合はオートファジーによって引き起こされる

(A-I) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Hel25E^{-/-}* (A)、*Hel25E^{-/-} + Atg1-RNAi* (B)、*Hel25E^{-/-} + Atg5-RNAi* (C)、*Hel25E^{-/-} + Atg8b-RNAi* (D)、*Hel25E^{-/-} + Atg13-RNAi* (E)、*Hel25E^{-/-} + lt-RNAi* (F)、*Hel25E^{-/-} + car-RNAi* (G)、*Hel25E^{-/-} + Snap29-RNAi* (H) 及び *Hel25E^{-/-} + Syx17-RNAi* (I) クローンを誘導した。

(J) disc あたりの GFP クロンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *Hel25E^{-/-}* (n=62、disc の枚数)、*Hel25E^{-/-} + Atg1-RNAi* (n=12)、*Hel25E^{-/-} + Atg5-RNAi* (n=12)、*Hel25E^{-/-} + Atg8b-RNAi* (n=10)、*Hel25E^{-/-} + Atg13-RNAi* (n=14)、*Hel25E^{-/-} + lt-RNAi* (n=10)、*Hel25E^{-/-} + car-RNAi* (n=9)、*Hel25E^{-/-} + Snap29-RNAi* (n=12) 及び *Hel25E^{-/-} + Syx17-RNAi* (n=12) について定量し、Dunnett's test により検定した。***は p<0.001 を示す。Scale bar=50µm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

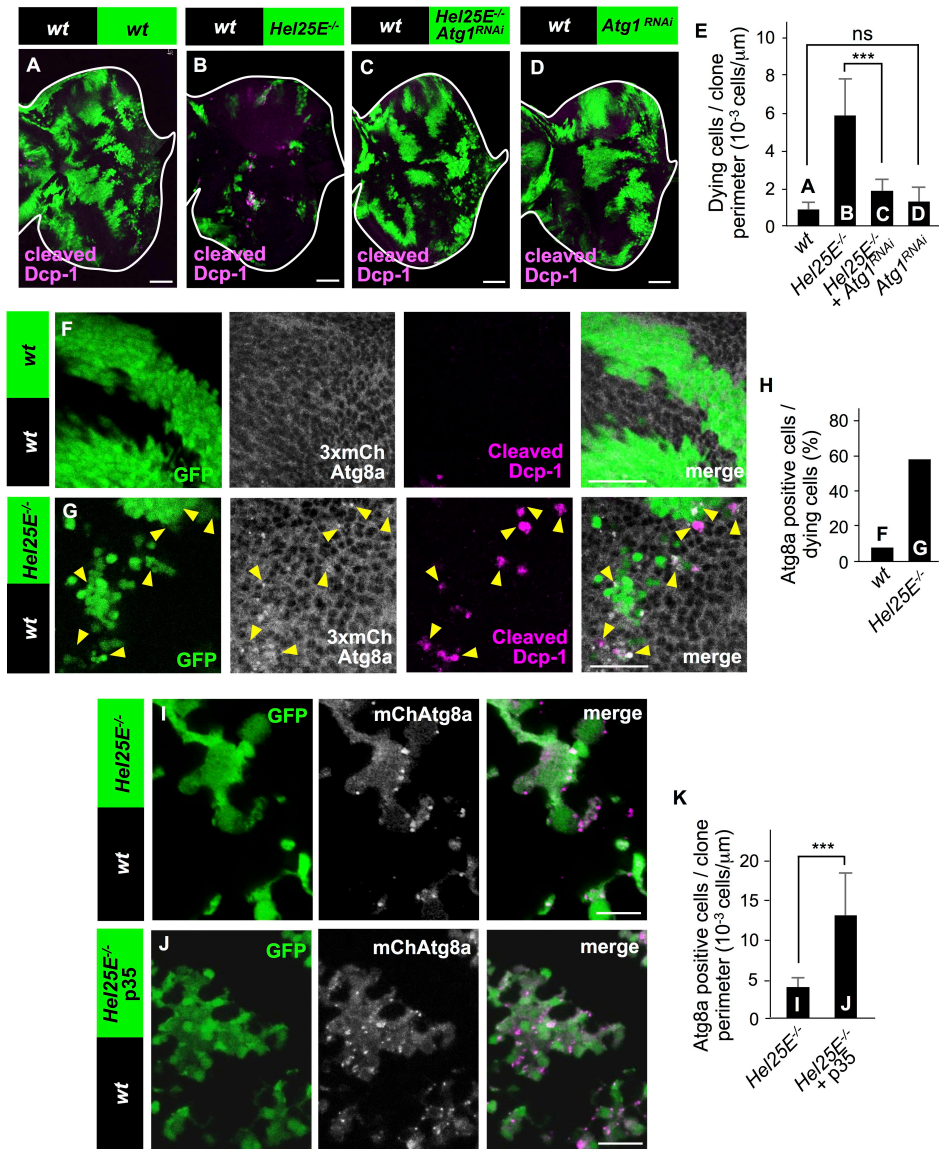


図 1 6 *Hel25E* 変異細胞ではオートファジーの下流で細胞死が引き起こされる

(A-D) MARCM法を用いて複眼原基にGFPで標識した *wild-type* (A)、*Hel25E^{-/-}* (B)、*Hel25E^{-/-} + Atg1-RNAi* (C) 及び *Atg1-RNAi* (D) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。Scale bar=50μm

(E) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=12、disc の枚数)、*Hel25E^{-/-}* (n=20)、*Hel25E^{-/-} + Atg1-RNAi* (n=12) 及び *Atg1-RNAi* (n=12) について定量し、Tukey's test により検定した。

(F, G) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した 3xmCherry-Atg8a/+ (F) 及び *Hel25E^{-/-} + 3xmCherry-Atg8a/+* (G) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。Scale bar=20μm

(H) Dcp-1 ポジティブ細胞あたりの Atg8a puncta ポジティブ細胞の割合 (%) を *wild-type* (n=12、disc の枚数) 及び *Hel25E^{-/-}* (n=14) について定量した。

(I, J) MARCM法を用いて複眼原基にGFPで標識した *Hel25E^{-/-} + UAS-Atg8a-mCherry* (I) 及び *Hel25E^{-/-} + UAS-Atg8a-mCherry + UAS-p35* (J) クローンを誘導した。Scale bar=5μm

(K) GFP クローン周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10^{-3} cells/ μm) を *Hel25E^{-/-}* + UAS-Atg8a-mCherry (n=16, disc の枚数) 及び *Hel25E^{-/-}* + UAS-Atg8a-mCherry + UAS-p35 (n=12) について定量し、Welch's test により検定した。***は $p < 0.001$ を示す。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

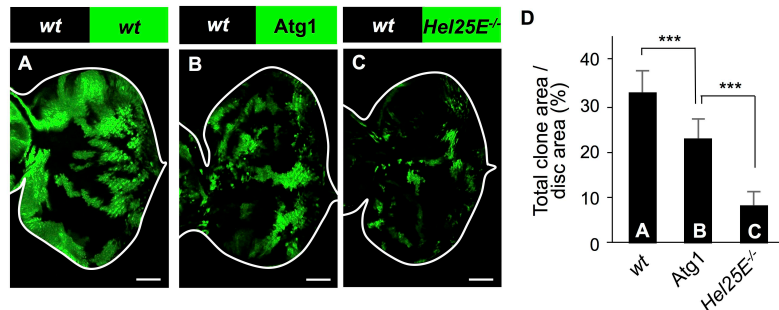


図 17 オートファジーの活性化だけでは *Hel25E* 変異のような強い排除は起こらない

(A-C) MARCM法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、UAS-Atg1 (B) 及び *Hel25E^{-/-}* (C) クローンを誘導した。

(D) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area * 100) を *wild-type* (n=30, disc の枚数)、UAS-Atg1 (n=14) 及び *Hel25E^{-/-}* (n=62) について定量し、Turkey's test により検定した。

***は $p < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-3 細胞競合の分子メカニズムの解析

3-3-1 *Hel25E* 変異クローン内の全細胞で JNK が活性化する

Minute 変異や *mahj* 変異によって引き起こされる組織最適化型細胞競合の制御因子の一つとして、JNK が報告されている^{2,23}。そこで、抗リン酸化 JNK 抗体や mmp1-GFP⁶³ (JNK の標的遺伝子である *mmp1* の発現を検出できるレポーターで、JNK の活性を評価できる)を用いて *Hel25E* 変異クローンを誘導した際の JNK の活性化を検出した。その結果、*Hel25E* 変異クローン全体 (クローン内の全細胞) で JNK が活性化していることがわかった (図 18A-G', 図 18D にて定量)。しかしながら、抗リン酸化 JNK 抗体、mmp1-GFP、*puc-lacZ* (JNK の標的遺伝子で JNK の活性を評価できるレポーター) などの複数のマーカーを用いて JNK 活性を解析したところ、*Hel25E* 変異細胞内の JNK 活性化レベルは種々の細胞内ストレスによって引き起こされる通常の JNK 活性化レベルに比べてきわめて弱いことがわかった (データ未掲載)。つまり、*Hel25E* 変異細胞内で活性化する JNK シグナルは細胞死を引き起こすほどの強い活性化ではないと考えられた。一方で、*Hel25E* 変異細胞内で JNK の脱リン酸化酵素 *puc* を過剰発現⁶⁴させることにより JNK 活性を阻害したところ、細胞競合が顕著に抑制された (図 18B, C, 図 18H にて定量)。これらのことから、*Hel25E* 変異細胞の排除にはオートファジーだけでなく JNK の活性化が必要であることがわかった。

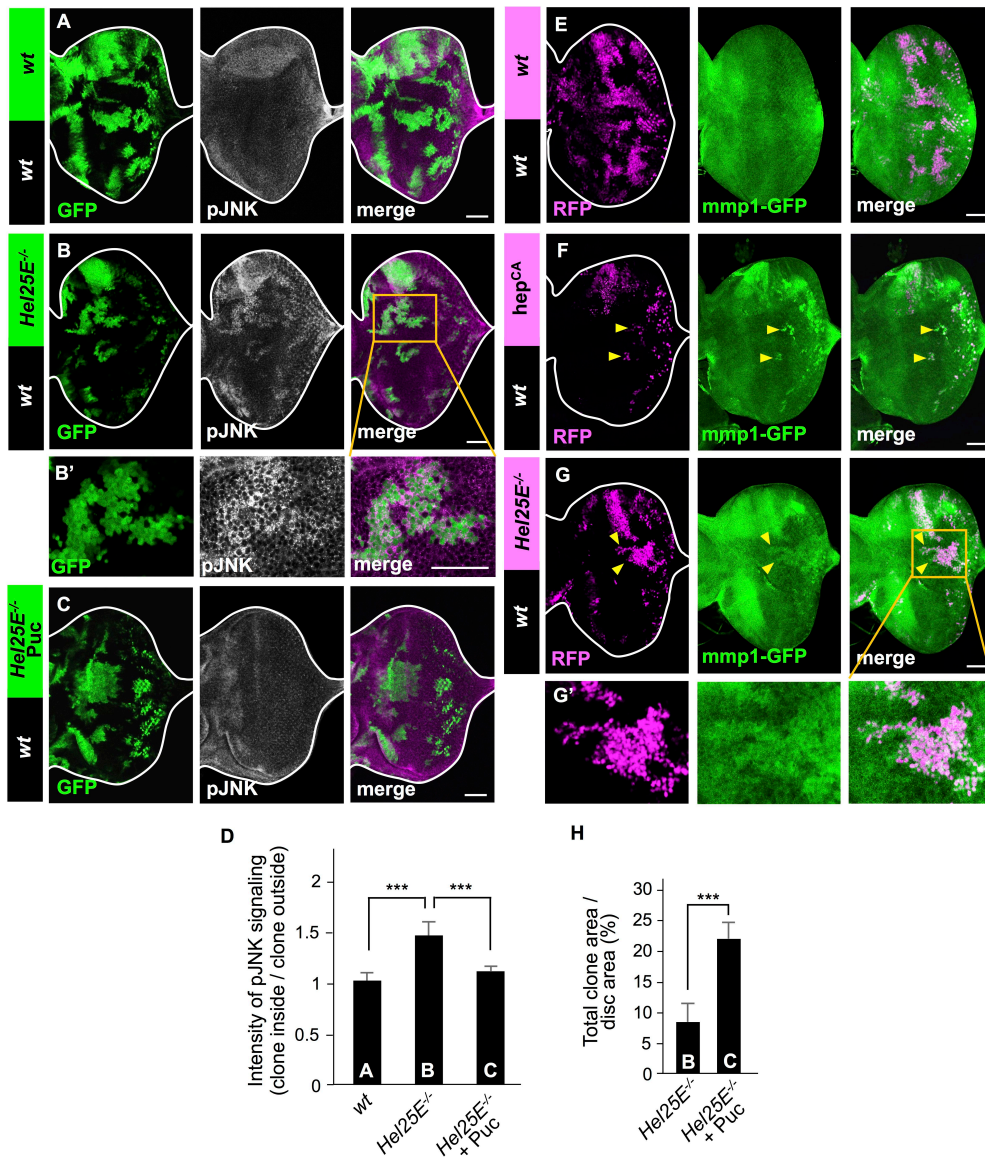


図 18 Hel25E 変異クローン全体で JNK が活性化する

(A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、*Hel25E^{-/-}* (B) 及び *Hel25E^{-/-}* + UAS-Puc (C) クロンを誘導し、抗リン酸化 JNK 抗体を用いて JNK の活性化を検出した。B'は B の拡大図を示す。

(D) 抗リン酸化 JNK 抗体のシグナル強度の比率 (クローンの内側/外側) を *wild-type* (n=11、disc の枚数)、*Hel25E^{-/-}* (n=15) 及び *Hel25E^{-/-}* + UAS-Puc (n=10) について定量し、Turkey's test により検定した。(E-G') MARCM 法を用いて複眼原基に RFP で標識した *mmp1-GFP/+* (E)、UAS-Hep^{CA} + *mmp1-GFP/+* (F) 及び *Hel25E^{-/-}* + *mmp1-GFP/+* (G) クロンを誘導し、抗 GFP 抗体で染色した。G'は G の拡大図を示す。黄色の矢頭は *mmp1-GFP* のシグナルを示す。hemipterous (*hep*) は JNK のキナーゼである。そのため、UAS- *hep^{CA}* (恒常活性化型 *hep*) はポジティブコントロールとして用いた。

(H) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *Hel25E^{-/-}* (n=62、disc の枚数) 及び *Hel25E^{-/-}* UAS-Puc (n=22) について定量し、Welch's test により検定した。

***は p<0.001 を示す。Scale bar=50µm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-3-2 オートファジーと JNK の協調により細胞死が引き起こされる

3-2-3 及び 3-3-1 より、*Hel25E* 変異細胞の排除にはオートファジーと JNK の活性化の両方が必要であることが分かった。そこで、これらを同時に活性化させたときの細胞の挙動を解析した。具体的には、*Atg1* の過剰発現によりオートファジーを活性化させると同時に、ショウジョウバエ TNF ホモログである *Eiger*⁶⁵ を過剰発現させることで JNK を活性化させた(ただし、低レベルの *Eiger* 過剰発現を誘導する *UAS-Eiger*^{weak} アリル⁷を用いることで弱い JNK 活性化を引き起こした)。これらの過剰発現系を用いて解析した結果、オートファジーあるいは JNK を単独で活性化させた場合に比べ、その両方を活性化させた細胞クローンは大量の細胞死を起こして強く排除されることがわかった(図 19A-C、図 19D, E にて定量)。また、複眼原基の posterior 側で異所的に遺伝子発現を誘導することができる *GMR-Gal4* ドライバーを用いた解析において、オートファジー及び JNK のそれぞれ単独の活性化では複眼の大きさにほとんど影響を及ぼさなかったが、これら両方を活性化させると複眼が非常に小さくなる表現型(*no-eye* 表現型)を呈した(図 19F-I、図 19J にて定量)。このような *no-eye* 表現型は大量の細胞死誘導により起こることが知られている。以上のことから、*Hel25E* 変異細胞ではオートファジー活性上昇と JNK 活性化が協調することで細胞死が引き起こされることが示唆された(図 19K)。

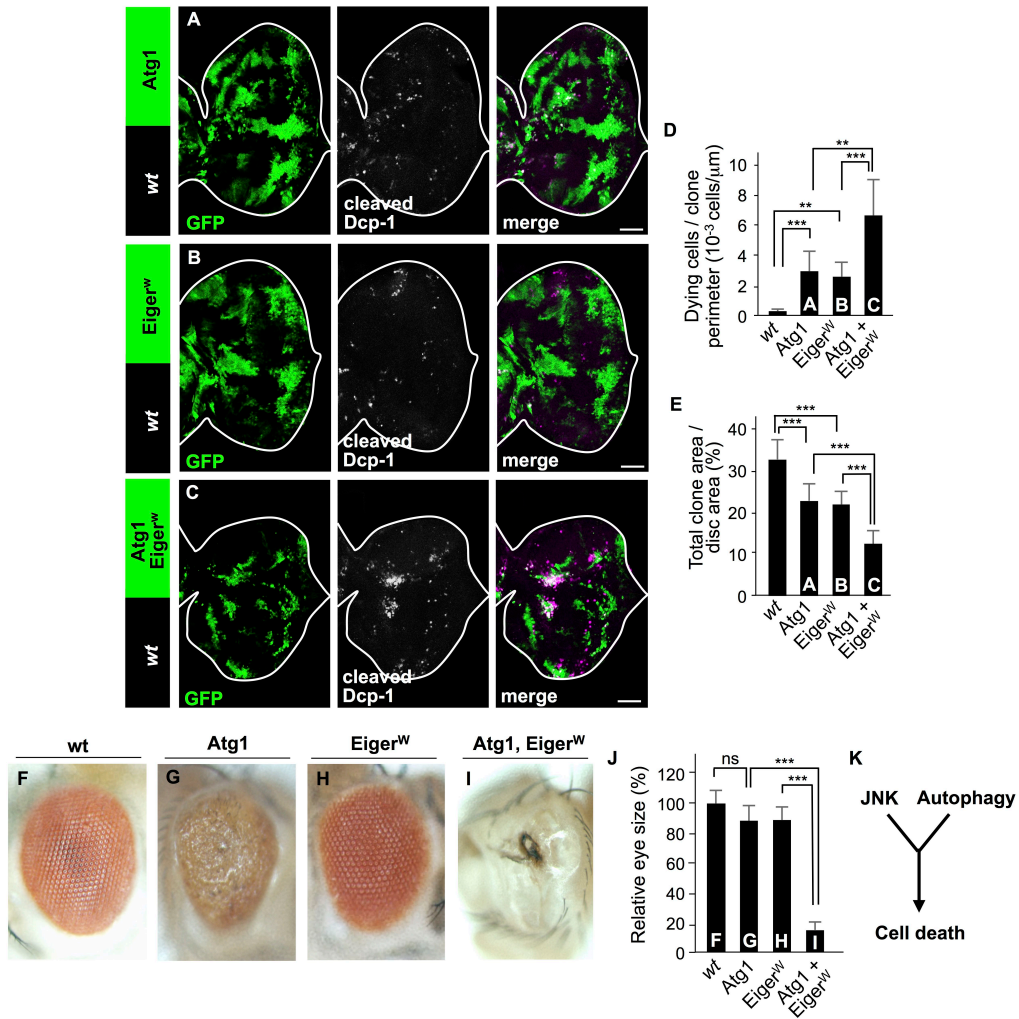


図 19 オートファジーと JNK の協調により細胞死が引き起こされる

(A-D) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した UAS-Atg1 (A)、UAS-Eiger^W (B) 及び UAS-Atg1 + UAS-Eiger^W (C) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。Scale bar=50μm (D) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=12、disc の枚数)、UAS-Atg1 (n=22)、UAS-Eiger^W (n=18) 及び UAS-Atg1 + UAS-Eiger^W (n=26) について定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(E) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *wild-type* (n=30、disc の枚数)、UAS-Atg1 (n=14)、UAS-Eiger^W (n=18) 及び UAS-Atg1 + UAS-Eiger^W (n=22) について定量し、Turkey's test により検定した。

(F-I) *wild-type* (F)、GMR-Gal4 + UAS-Atg1 (G)、GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W (H) 及び GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + UAS-Eiger^W (I) の成虫複眼を示した。

(J) *wild-type* (n=10、disc の枚数)、GMR-Gal4 + UAS-Atg1 (n=15)、GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W (n=12) 及び GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + UAS-Eiger^W (n=10) の成虫複眼のサイズを定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(K) JNK とオートファジーの細胞死誘導における関係性を示した。

***は p<0.001 を示す。Scale bar=50μm (Nagata et al., Dev Cell, 2019 より改変)

3-3-3 オートファジーの下流で細胞死遺伝子 *hid* の発現が誘導される

次に、オートファジーと JNK の協調によってどのようにして細胞死が引き起こされるかを探索した。これまでに、敗者細胞では細胞死遺伝子 *hid* が誘導されることが報告されているため^{35,37}、まず *hid-lacZ* レポーターを用いて *hid* の発現を解析した。その結果、野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞で *hid* の発現が上昇していることがわかった (図 20A-B', 図 20E にて定量)。さらに、変異細胞内で *hid* をノックダウンすると、クローン境界上の細胞死及び変異細胞クローンの排除が抑制された (図 20G, H, 図 20I, J にて定量)。興味深いことに、この *hid* の発現上昇は JNK を阻害しても抑制されなかったが、オートファジーを阻害することで顕著に抑制された (図 20C, D, 図 20E にて定量)。さらに、GMR-Gal4 ドライバーを用いて複眼の posterior 領域で JNK やオートファジーを活性化させた際の *hid* の発現を *hid-lacZ* レポーターで検出すると、Atg1 の過剰発現により非常に強く *hid* が発現誘導されることがわかった (図 21A-C, 図 21D にて定量)。この Atg1 過剰発現による *hid* の発現上昇は、Atg13、Atg5 あるいは Atg8b のノックダウンによりキャンセルされたことから (図 21E-G, 図 21H にて定量)、オートファジーの活性化により *hid* の発現が誘導されることがわかった。

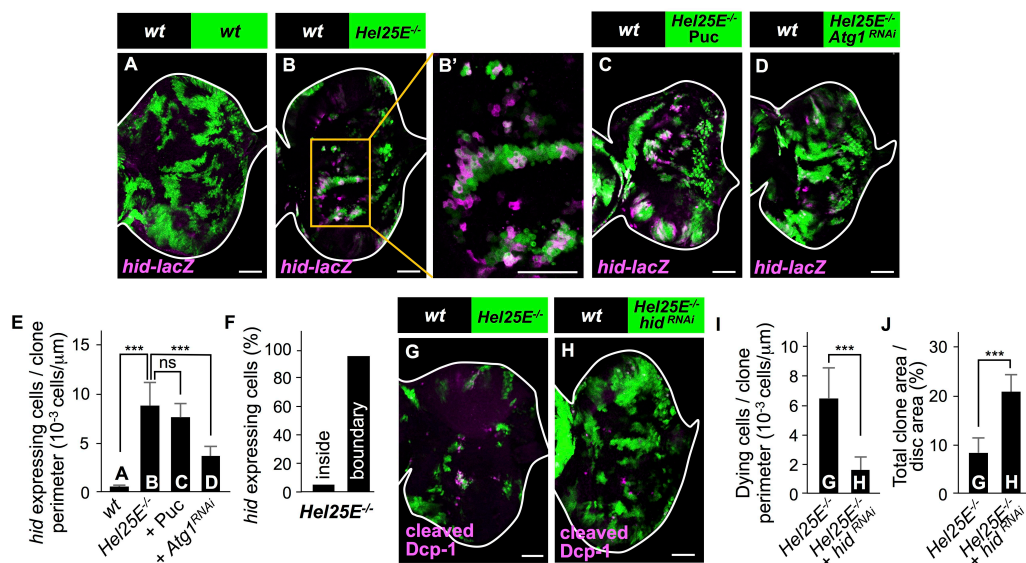


図 20 *Hel25E* 変異細胞ではオートファジー依存的に *hid* が誘導される

(A-D) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *hid-lacZ/+* (A)、*hid-lacZ/+ + Hel25E^{-/-}* (B)、*hid-lacZ/+ + Hel25E^{-/-} + UAS-Puc* (C) 及び *hid-lacZ/+ + Hel25E^{-/-} + Atg1-RNAi* (D) クローンを誘導し、抗 β -galactosidase 抗体で染色した。

(E) GFP クローンの周囲の長さあたりの *hid* 発現細胞数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=13, disc の枚数)、*Hel25E^{-/-}* (n=14)、*Hel25E^{-/-} + UAS-Puc* (n=12) 及び *Hel25E^{-/-} + Atg1-RNAi* (n=14) について定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(F) *Hel25E* 変異クローンの内側 (5.1%) と野生型細胞との境界面 (94.9%) の *hid-lacZ* シグナルの割合について定量した (n=14, disc の枚数)。

(G, H) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Hel25E^{-/-}* (G) 及び *Hel25E^{-/-} + hid-RNAi* (H) クロオンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体で染色した。

(I) GFP クロンの周囲の長さあたりの *hid* 発現細胞数 (10^{-3} cells/ μm) を *Hel25E^{-/-}* (n=20、disc の枚数) 及び *Hel25E^{-/-} + hid-RNAi* (n=12) について定量し、Welch's test により検定した。

(J) disc あたりの GFP クロンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *Hel25E^{-/-}* (n=62、disc の枚数) 及び *Hel25E^{-/-} + hid-RNAi* (n=20) について定量し、Welch's test により検定した。

***は $p < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

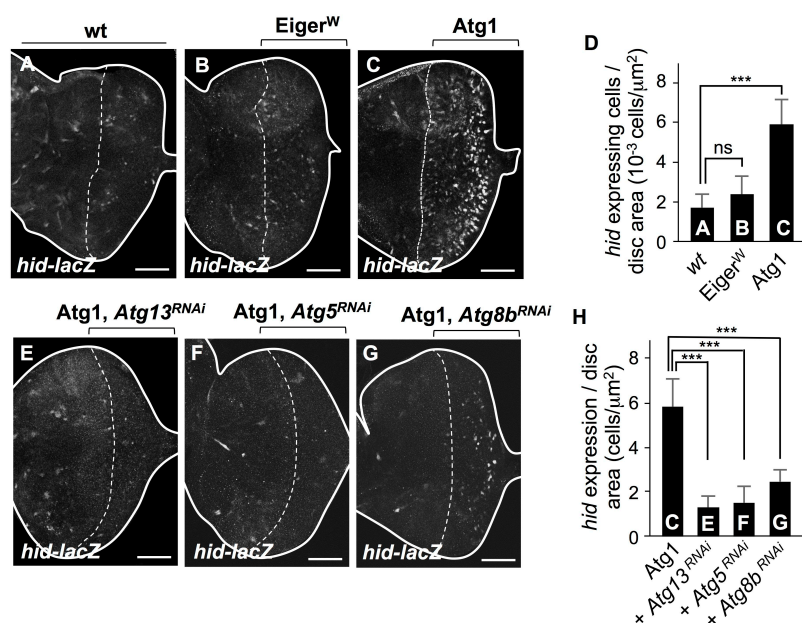


図 2 1 オートファジーの活性化により *hid* の発現が誘導される

(A-C) 複眼原基に *hid-lacZ/+ + GMR-Gal4* (A)、*hid-lacZ/+ + GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W* (B) 及び *hid-lacZ/+ + GMR-Gal4 + UAS-Atg1* (C) を誘導し、抗 β -galactosidase 抗体で染色した。

(D) GMR 発現領域あたりの *hid* 発現細胞数 (10^{-3} cells/ μm^2) を *wild-type* (n=13、disc の枚数)、*UAS-Eiger^W* (n=12) 及び *UAS-Atg1* (n=12) について定量し、Dunnett's test により検定した。

(E-G) 複眼原基に *hid-lacZ/+ + GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + Atg13-RNAi* (E)、*hid-lacZ/+ + GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + Atg5-RNAi* (F) 及び *hid-lacZ/+ + GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + Atg8b-RNAi* (G) を誘導し、抗 β -galactosidase 抗体で染色した。

(H) GMR 発現領域あたりの *hid* 発現細胞数 (10^{-3} cells/ μm^2) を *UAS-Atg1* (n=12、disc の枚数)、*UAS-Atg1 + Atg13-RNAi* (n=11)、*UAS-Atg1 + Atg5-RNAi* (n=12) 及び *UAS-Atg1 + Atg8b-RNAi* (n=10) について定量し、Dunnett's test により検定した。

***は $p < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-3-4 オートファジーの下流で NFκB の活性を介して *hid* の発現が誘導される

以前の研究により、*Minute* 変異によって引き起こされる細胞競合では NFκB の活性を介して *hid* の発現が誘導されることが報告されていた³⁷。そこで、オートファジーを活性化させた際に同時に NFκB をノックダウンし、*hid* の発現を解析した。その結果、オートファジー依存的な *hid* の発現はショウジョウバエ NFκB である *Dif*、*dl* あるいは *Relish* のノックダウンにより抑制されることがわかった (図 22A-D、図 22E にて定量)。すなわち、オートファジーの下流で NFκB の活性を介して *hid* の発現が誘導されることがわかった。また、*Hel25E* 変異細胞クローン内で NFκB をノックダウンするとその排除が抑制されたことから (図 22F-I、図 22J にて定量)、NFκB の活性が変異細胞の排除に必要であることもわかった。

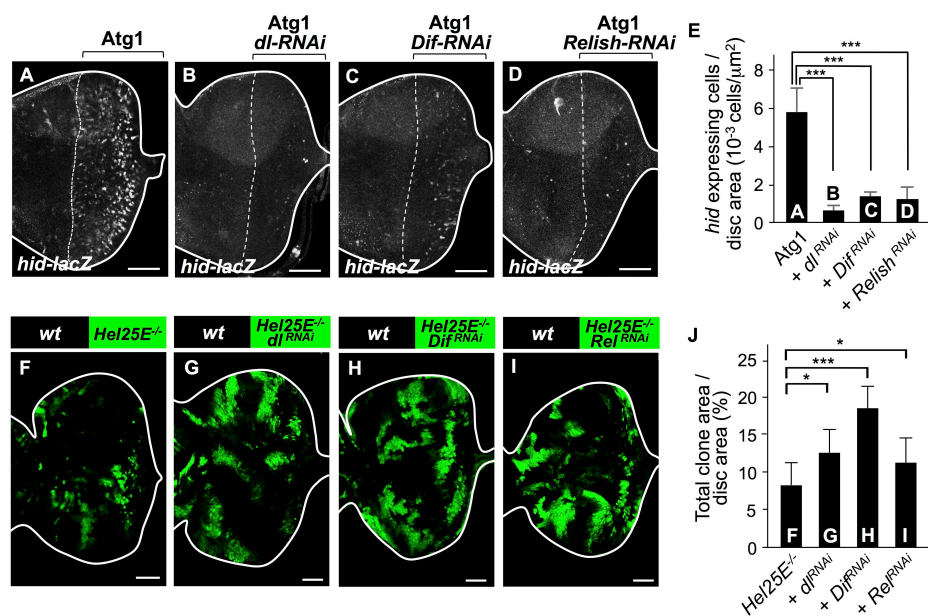


図 22 オートファジーの下流で NFκB を介して *hid* の発現が誘導される

(A-C) 複眼原基に *hid-lacZ/+ GMR-Gal4 + UAS-Atg1* (A)、*hid-lacZ/+ GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + dl-RNAi* (B)、*hid-lacZ/+ GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + Dif-RNAi* (C) 及び *hid-lacZ/+ GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + Relish-RNAi* (D) を誘導し、抗 β -galactosidase 抗体で染色した。

(E) GMR 発現領域あたりの *hid* 発現細胞数 (10^{-3} cells/ μm^2) を *UAS-Atg1* (n=12, disc の枚数)、*UAS-Atg1 + dl-RNAi* (n=12)、*UAS-Atg1 + Dif-RNAi* (n=10) 及び *UAS-Atg1 + Relish-RNAi* (n=10) について定量し、Dunnett's test により検定した。

(F-I) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Hel25E^{-/-}* (F)、*Hel25E^{-/-} + dl-RNAi* (G)、*Hel25E^{-/-} + Dif-RNAi* (H) 及び *Hel25E^{-/-} + Relish-RNAi* (I) クローンを誘導した。

(J) disc あたりの GFP クロンの割合 (GFP clone area / disc area * 100) を *Hel25E^{-/-}* (n=62, disc の枚数)、*Hel25E^{-/-} + dl-RNAi* (n=12)、*Hel25E^{-/-} + Dif-RNAi* (n=11) 及び *Hel25E^{-/-} + Relish-RNAi* (n=10) について定量し、Turkey's test により検定した。

***は $p < 0.001$ 、*は $p < 0.05$ 、を示す。Scale bar=50 μm (Nagata et al., *Dev Cell*, 2019 より改変)

一方、GMR-Gal4 ドライバーを用いて NFκB を過剰発現させると *hid* の発現が誘導されることもわかった (図 23A, B、図 23C にて定量)。このとき、同時に JNK を活性化させると複眼が非常に小さくなる no-eye 表現型が誘発された (図 23D, E, G, H)。また、この no-eye 表現型は *hid* のノックダウンによりレスキューされた (図 23F, I)。さらに、*hid* 過剰発現により引き起こされる small-eye 表現型が、*Eiger*^w 過剰発現により JNK シグナルを弱く活性化させることにより強く促進され no-eye 表現型が誘発された (図 24A-D、図 24E にて定量)。つまり、JNK と *hid* が協調することで強く細胞死が引き起こされると考えられた。

以上の結果から、野生型細胞に近接する *Hel25E* 変異細胞ではオートファジー活性が上昇し、その下流で NFκB の活性を介して *hid* が発現誘導されることがわかった。一方で、*Hel25E* 変異クローン内の全細胞で JNK が活性化しているため、野生型細胞に近接する変異細胞では JNK 活性化と *hid* 発現が協調し、強く細胞死が引き起こされると考えられた (図 24F)。

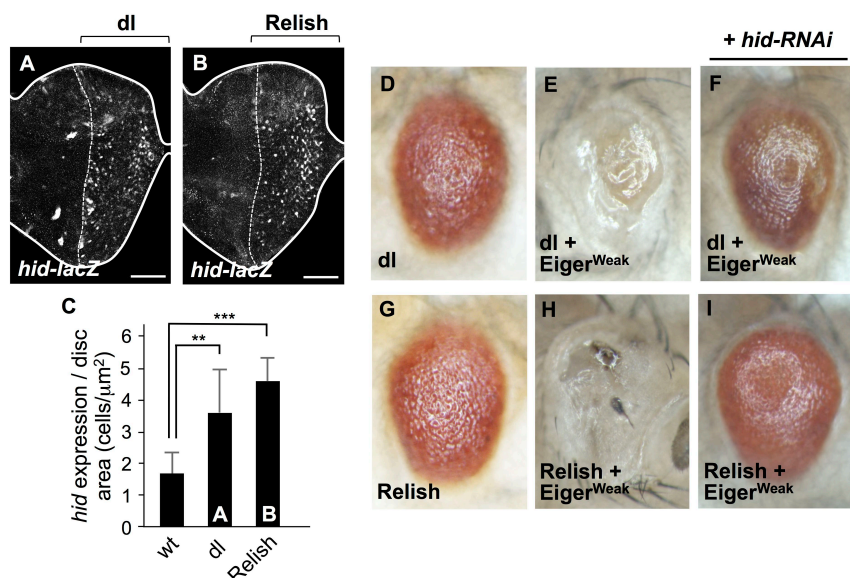


図 23 NFκB と JNK の協調により細胞死が引き起こされる

(A, B) 複眼原基に *hid-lacZ*/+ GMR-Gal4 + UAS-dl (A) 及び *hid-lacZ*/+ GMR-Gal4 + UAS-Relish (B) を誘導し、抗 β-galactosidase 抗体で染色した。

(C) GMR 発現領域あたりの *hid* 発現細胞数 (10^{-3} cells/μm²) を wild-type (n=13、disc の枚数)、UAS-dl (n=10) 及び UAS-Relish (n=12) について定量し、Dunnett's test により検定した。

(D-I) GMR-Gal4 + UAS-dl (D)、GMR-Gal4 + UAS-dl + UAS-Eiger^w (E)、GMR-Gal4 + UAS-dl + UAS-Eiger^w + *hid-RNAi* (F)、GMR-Gal4 + UAS-Relish (G)、GMR-Gal4 + UAS-Relish + UAS-Eiger^w (H) 及び GMR-Gal4 + UAS-Relish + UAS-Eiger^w + *hid-RNAi* (I) の成虫複眼を示した。

***は p<0.001、**は p<0.01 を示す。Scale bar=50μm (Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

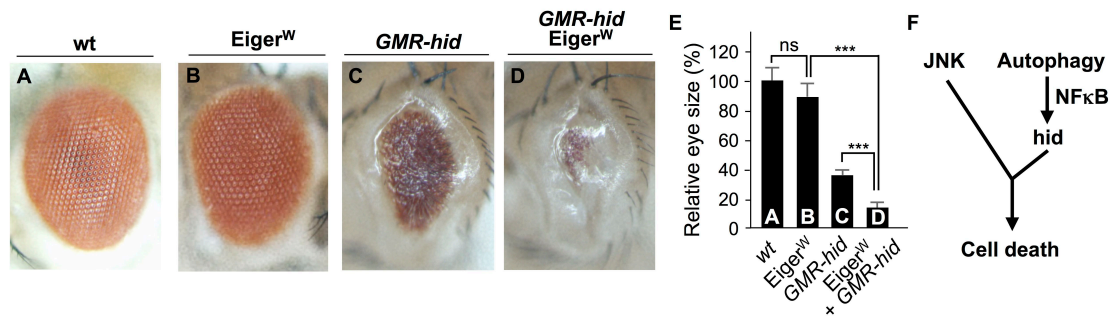


図 2 4 JNK と *hid* の協調により細胞死が引き起こされる

(A-D) wild-type (A)、GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W (B)、GMR-Gal4 + GMR-*hid* (C) 及び GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W + GMR-*hid* (D) の成虫複眼を示した。

(E) *wild-type* (n=10、disc の枚数)、GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W (n=12)、GMR-Gal4 + GMR-*hid* (n=12) 及び GMR-Gal4 + UAS-Eiger^W + GMR-*hid* (n=12)の成虫複眼のサイズを定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(F) JNK、オートファジー、NFκB、*hid* の細胞死誘導における関係性を示した。

***は p<0.001 を示す。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

3-4 他の細胞競合モデルにおいても同様のメカニズムが働いている

最後に、本研究で明らかにしたメカニズムが他の組織最適化型細胞競合モデルである *Minute* 変異や *mahj* 変異による細胞競合をも制御するかどうかを解析した。*Minute* 変異による細胞競合の解析には、ヒートショック法により *Minute* 変異細胞 (リボソームタンパク質 *RpL14* 遺伝子のヘテロ変異細胞) の Flp-out クローンを翅原基に誘導する方法³⁷を用いた。その結果、野生型細胞に近接する *RpL14* 変異細胞でオートファジーが活性化しており (図 25A, B、図 25C にて定量)、変異細胞内でオートファジーを阻害すると *RpL14* 変異クローンの排除が顕著に抑制されることがわかった (図 25 C, D、図 25F にて定量)。また、*RpL14* 変異クローンを誘導した際にタンパク質合成レベルを OPP アッセイにより検出すると、変異細胞内でタンパク質合成量が低下していることが確認された (図 25G)。

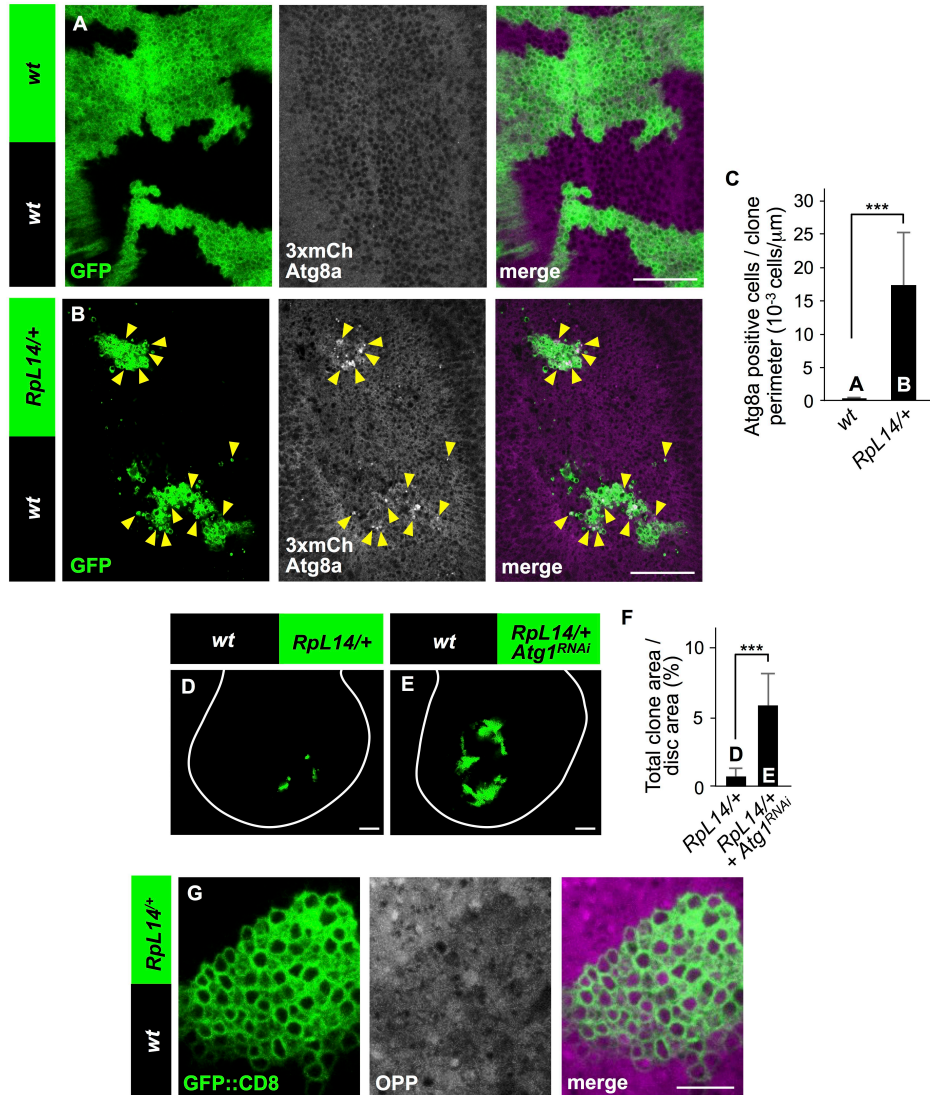


図 2 5 *Minute* による細胞競合はオートファジーによって引き起こされる

(A, B) hsFLP により翅原基に GFP で標識した 3xmCherry-Atg8a/+ + Act>y+ >Gal4 (A) 及び 3xmCherry-Atg8a/+ + *RpL14*+/+, salE>GFP (B) クローンを誘導した。Scale bar=50 μm

(C) GFP クローンの周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10^{-3} cells/ μm) を *wild-type* (n=12、disc の枚数) 及び *RpL14*+/+ (n=10) について定量し、Welch's test により検定した。

(D, E) hsFLP により翅原基に GFP で標識した *RpL14*+/+, salE>GFP (D) 及び *RpL14*+/+, salE>GFP + *Atg1-RNAi* (E) クローンを誘導した。Scale bar=50 μm

(F) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を *RpL14*+/+ (n=25、disc の枚数) 及び *RpL14*+/+ + *Atg1-RNAi* (n=30) について定量し、Mann-Whitney's U test により検定した。

(G) hsFLP により翅原基に GFP で標識した *RpL14*+/+, salE>GFP クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。Scale bar=10 μm

***は $p < 0.001$ を示す。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

一方、*mahj* 変異はホモ接合変異クローンが細胞競合の敗者となることから²³、MARCM 法を用いて解析した。その結果、この場合も同様に野生型細胞に近接する *mahj* 変異細胞でオートファジーが活性化しており (図 26A、図 26B にて定量)、変異細胞内でオートファジーを阻害すると *mahj* 変異クローンの排除が抑制されることがわかった (図 26C, D、図 26E にて定量)。また、*mahj* 変異クローンを誘導した際のタンパク質合成量を OPP アッセイにより検出したところ、変異細胞内でタンパク質合成レベルが低下していることがわかった (図 26F)。つまり、組織最適化型細胞競合で敗者となる細胞では、共通してタンパク質合成レベルが低下していると考えられた。以上の結果から、タンパク質合成の低下によって引き起こされる組織最適化型細胞競合は、勝者細胞に近接する敗者細胞のオートファジー誘導とそれにより引き起こされる細胞死によって駆動されると考えられた (図 27)。

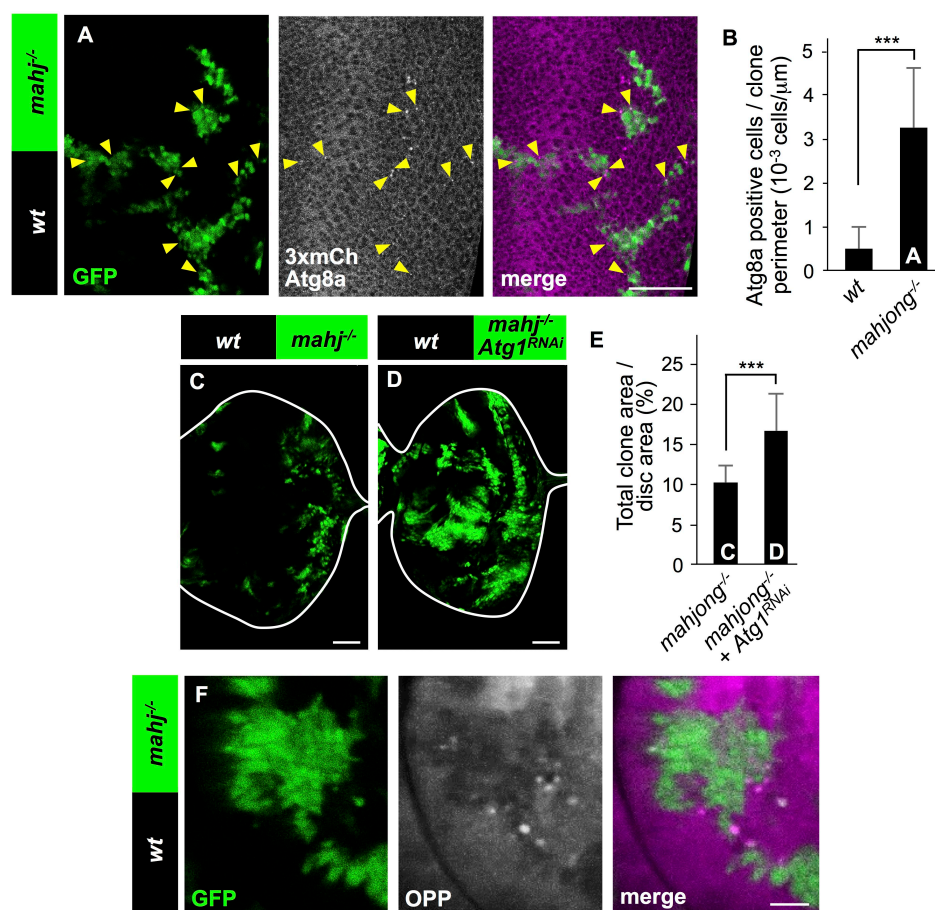


図 26 *mahj* 変異による細胞競合はオートファジーによって引き起こされる

(A) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *mahj*^{-/-} + 3xmCherry-Atg8a/+クローンを誘導した。Scale bar=50μm

(B) GFP クローンの周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=12, disc の枚数) 及び *mahj*^{-/-} (n=12) について定量し、Welch's test により検定した。

(C, D) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *mahj*^{-/-} (C) 及び *mahj*^{-/-} + *Atg1-RNAi* (D)クローンを誘導した。Scale bar=50μm

(E) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area*100) を $mahj^{-/-}$ (n=30、disc の枚数) 及び $mahj^{-/-} + Atg1-RNAi$ (n=14) について定量し、Welch's U test により検定した。

(F) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した $mahj^{-/-}$ クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。Scale bar=10 μ m ***は p<0.001 を示す。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

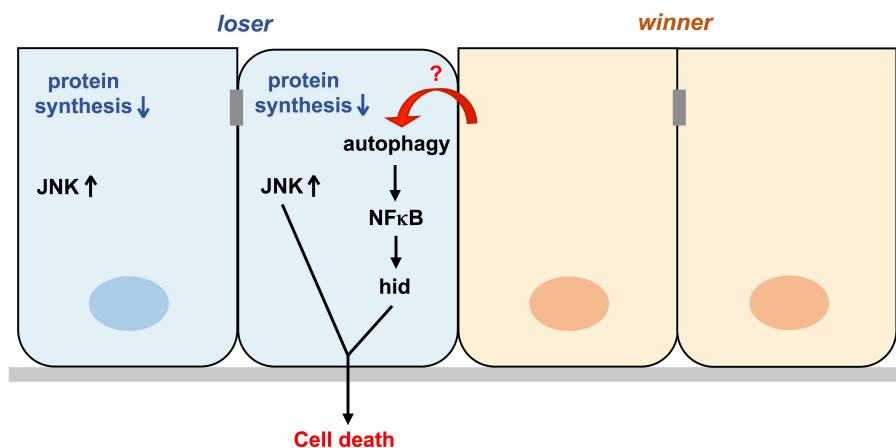


図 2 7 オートファジーによる細胞競合の誘導

勝者に近接する敗者細胞ではオートファジーが活性化し、その下流で NF κ B の活性を介して細胞死遺伝子 *hid* が誘導される。変異細胞クローン全体では JNK が活性化しており、JNK と *hid* が協調することで細胞死が引き起こされる。(Nagata *et al.*, *Dev Cell*, 2019 より改変)

第4章 考察

細胞競合は、その役割と排除される細胞の挙動から「腫瘍抑制型」「腫瘍促進型」「組織最適化型」の3つのタイプに大別できると考えられる。これらの細胞競合は、それぞれ異なる遺伝子変異によって誘導されると考えられてきた。腫瘍抑制型細胞競合の分子メカニズムについては理解が進んできた一方で、腫瘍促進型細胞競合と組織最適化型細胞競合の分子メカニズムはこれまで不明な点が多かった。また、異なる細胞競合を共通して制御する分子メカニズムが存在するかどうか不明であった。本研究ではこれらを明らかにするために、まず細胞競合のトリガーを網羅的に探索し、これにより得られた組織最適化型細胞競合を引き起こす *Hel25E* 変異による細胞競合のモデル系を構築した。このモデル系を用いて、遺伝学的スクリーニングにより細胞競合の制御因子を探索した結果、変異細胞のオートファジーの活性上昇が細胞死に必要であることを見出した。さらなる解析により、組織最適化型細胞競合では正常細胞に近接する変異細胞でオートファジー依存的に細胞死遺伝子 *hid* の発現が上昇し、これが変異細胞集団全体で活性上昇している JNK シグナルと協調することで効率よく細胞死（敗者細胞の排除）が引き起こされることがわかった。

4-1 これまでの細胞競合に関する知見と本研究成果の関連性

これまでに、組織最適化型細胞競合は自然免疫 Toll シグナル、膜タンパク質 Fwe 及び EF-hand タンパク質 Azot を介するシグナル (Fwe-Azot シグナル)、転写因子 Xrp1 によって制御されることが報告されていた。Johnston らは、*Minute* 変異による細胞競合を用いた解析により、Toll シグナルの下流で NFκB (Dif 及び dl) を介して細胞死遺伝子 *rpr* の発現が誘導されると報告していた³⁷。実際に、著者の手によっても *Minute* 変異による細胞競合は *rpr* のノックダウンにより顕著に抑制されたが、*hid* のノックダウンではほとんど抑制されなかった (データ未掲載)。また著者は、複眼特異的プロモーター GMR-Gal4 ドライバーを用いて JNK と dl を過剰発現させたときにみられる no-eye 表現型が、*hid* だけでなく *rpr* のノックダウンによってもレスキューされることを確認している (データ未掲載)。これらの結果は、NFκB の下流で *rpr* の発現が誘導されるという Johnston らの報告と一致する。しかしながら、本研究では *Hel25E* 変異の細胞競合は *hid* をノックダウンすることで顕著に抑制されたが、*rpr* をノックダウンしてもほとんど抑制されなかった (データ未掲載)。一方、*Minute* 変異クローンを誘導した際の *hid* の発現を解析したところ、正常細胞に近接する変異細胞で *hid* の発現が上昇していた (データ未掲載)。この *hid* の発現上昇パターンは *Hel25E* 変異による細胞競合の場合と類似している。以上のことから、*Minute* 変異と *Hel25E* 変異は同じシグナルによって制御されるものの、中心的に働く細胞死実行因子 (*hid* または *rpr*) が異なる可能性が考えられる。また著者は、*Hel25E* 変異による細胞競合は Azot のノックダウンにより部分的に抑制されることを確認した (データ未掲載)。さ

らに、Atg1、Azot、spz (Toll シグナルのリガンド) を *Hel25E* 変異細胞内で同時にロックダウンした際に、細胞競合の抑制には additive な効果が見られなかったため (データ未掲載)、これらの分子は1つの経路に収束する可能性がある。

Minute 変異による細胞競合の実行に必須である転写因子 Xrp1 を過剰発現すると、様々な細胞競合関連因子の発現が上昇することが報告されている⁴³。興味深いことに、*Hel25E* 変異による細胞競合は Xrp1 ロックダウンにより抑制され、このとき変異細胞でのオートファジー活性の上昇も起こらなくなった (データ未掲載)。つまり、オートファジーは Xrp1 の下流で引き起こされると考えられた。しかしながら、変異細胞で細胞自律的に発現誘導される (クローン内のすべての変異細胞で発現上昇する) Xrp1 がどのようにして正常細胞に近接する変異細胞でのみオートファジーを引き起こすのかはわかっていない。また、Xrp1 の発現がどのようにして誘導されるかも明らかではないため、今後はこれらを詳細に解析していく必要がある。

一方、*Minute* 変異細胞では Xrp1 依存的にタンパク質合成レベルが低下していることが報告されている²²。しかしながら、タンパク質合成の低下が細胞競合に必要なかどうかはわかっていなかった。本研究では、*mahj* 変異細胞及び *Hel25E* 変異細胞においてタンパク質合成が低下していることが確認されたことから、組織最適化型細胞競合を引き起こす (少なくとも異なる3種類の) 変異で共通してタンパク質合成が低下していることがわかった。また興味深いことに、*Hel25E* 変異細胞のタンパク質合成の低下も Xrp1 依存的であることがわかった (データ未掲載)。以上のことから、Xrp1 依存的なタンパク質合成量の低下がオートファジーを誘導している可能性が高いと考えられる。

4-2 残された重要課題

4-2-1 敗者細胞におけるオートファジーの誘導メカニズム

本研究では、正常細胞に近接する変異細胞でオートファジー活性が上昇することを見出した。これは、勝者に近接する敗者でのみ引き起こされる細胞内変化を細胞死シグナル以外に初めて見出したものであるといえる。また、組織最適化型細胞競合を引き起こす *Minute*、*mahj*、*Hel25E* 変異細胞ではいずれもタンパク質合成が低下していたことから、勝者・敗者のタンパク質合成能の差がオートファジーを誘導している可能性が考えられる。そして、この「勝者-敗者境界面のオートファジーがどのようにして誘導されるか」は、最も重要な未解決の課題である。オートファジーの活性上昇は勝者細胞に近接する敗者細胞でのみ起こることから、勝者・敗者細胞間で何らかのやり取りがあり、これがオートファジーを誘導していると推測する。ここで、細胞間のやりとりを介して細胞内シグナルが変化するメカニズムとして、主に以下に挙げた5つの可能性が考えられる。①細胞膜タンパク質同士の相互作用；*scrib* 変異による細胞競合では、リガンド Sas とそのレセプター Ptp10D の局在が変化することで変異細胞内の EGFR シグナル活性が低下する²⁹。Sas-Ptp10D システムは組織最適化型細胞

競合を制御しないが、このような膜タンパク質によるシグナル制御メカニズムが存在するかもしれない。②細胞膜成分の変化；勝者-敗者細胞間の細胞膜を構成するリン脂質のモディフィケーション等の変化が起こり、これが隣接細胞の細胞内シグナルを変化させる可能性が考えられる。③分泌タンパクを介した相互作用；敗者細胞の細胞死は、通常勝者細胞に接する敗者細胞で多く観察されるが、少し離れた位置に見られることもある。このため、勝者細胞から分泌される何らかの分子が受容体に結合あるいは直接マクロピノサイトーシスやエンドサイトーシスによって取り込まれることで細胞内シグナルの変化を引き起こす可能性が考えられる。実際に、Myc 高発現細胞による細胞競合（スーパーコンペティション）では、Myc 高発現細胞から spz プロセシング酵素が分泌され、これが野生型細胞の自然免疫シグナルを活性化することが報告されている³⁸。④細胞間の小分子のやり取り；細胞間のギャップジャンクションを介して小分子が通過することで、隣接細胞の細胞内シグナルを変化させる可能性が考えられる。通常ギャップジャンクションは濃度勾配依存的に小分子を通過させることから、接している勝者-敗者間の細胞内タンパク質合成レベルの差が何らかの分子の濃度差を生み出しているかもしれない。

一方、オートファジーをトリガーするメカニズムとしては、栄養飢餓（アミノ酸やインスリンシグナルの低下など）、ATP レベルの低下、小胞体ストレス、低酸素、感染などの様々な要因が考えられる⁵⁸。上述した細胞間のやり取りを介してオートファジーを活性化するメカニズムを考え、候補アプローチをしていくことでオートファジーの誘導機構を明らかにできるかもしれない。例えば、勝者・敗者間でインスリンレセプターの活性化能が異なり、これにより勝者細胞に近接する敗者細胞でインスリンシグナルが低下しやすいことから境界面でオートファジーが活性化する可能性が考えられる。また、細胞間を通過できるとされている分子には、Ca²⁺などのイオンや ATP、AMP、IP₃などが挙げられるが、このうち Ca²⁺の活性化や ATP レベルの低下が AMPK の活性を介してオートファジーを誘導することが知られている⁶⁶。また、変異細胞でアミノ酸トランスポーターの発現あるいは活性が低下しており、これによりアミノ酸の取り込みが低下している可能性が考えられる。さらには、正常細胞と変異細胞ではタンパク質合成能が異なることから、エキソサイトーシスやエクソソームによって細胞外に分泌するタンパク質量も異なると考えられる。このとき、正常細胞に近接する変異細胞は近接していない変異細胞に比べてより多くの細胞外タンパク質をマクロピノサイトーシスなどによって取り込み、その結果オートファジーが活性化する可能性が考えられる。上述したように、敗者細胞は勝者細胞に比べてタンパク質合成能が相対的に低く、この細胞間のタンパク質合成能の差は隣り合っている勝者・敗者間のみで生じる。つまり、タンパク質合成能の差が何らかの質的／量的な差を生み出すことで敗者細胞のオートファジーを誘導していると推測される。しかしながら、PI3K の活性化（TOR シグナルの活性化によりタンパク質合成が上昇する）だけでは細胞競合は誘導されないことも報告されているため¹⁴、タンパク質合成の差に加えて何らかの因子が加わることにより細胞競合が引き起こされる可能性が考えられる。

著者は、細胞非自律的オートファジー誘導メカニズムを明らかにするために、現在上述のような候補アプローチを行っており、オートファジーを活性化しうるメカニズムについて遺伝学的手法を用いた解析を進めている。一方、このような解析に加えて以下の2つの網羅的アプローチを考えている。1つ目は、遺伝学的スクリーニングである。具体的には、ショウジョウバエ上皮組織に細胞競合を誘導した際に、変異細胞の周りの野生型細胞にのみ遺伝子変異を誘導する。このとき細胞競合が抑制され、かつ勝者-敗者境界面で活性上昇するオートファジーが抑制されるシステムを探索することで、野生型細胞のどのような遺伝子変異が変異細胞のオートファジーを誘導するのかを明らかにする。2つ目は、single-cell RNA-seq 解析である。具体的には、ショウジョウバエ上皮組織に細胞競合を誘導し、勝者細胞・敗者細胞それぞれをソートして single-cell RNA-seq 解析を行う（既に香港科技大学の YanYan 博士との共同で解析を進めている）。この解析において、勝者細胞に近接する敗者細胞で発現誘導される *hid* と相関して発現上昇する遺伝子群を探索することで、勝者細胞に近接する敗者細胞のみ特異的に発現が変化する遺伝子を同定できる。さらに、ショウジョウバエ上皮組織に細胞競合を誘導し、細胞をソートして bulk RNA-seq 解析を並行して行うことで、勝者・敗者細胞それぞれの遺伝子発現量を高解像度で解析することができる。以上の3つの異なるアプローチにより得られた結果を相互にフィードバックしながら解析を進めることで、細胞競合におけるオートファジー誘導メカニズムを明らかにしていきたいと考える。

4-2-2 オートファジー依存的な細胞死誘導メカニズム

オートファジーは、細胞の飢餓に応答してタンパク質や細胞内小器官を分解する現象であり、生命の維持に必要な現象と考えられてきた⁶⁷。しかしその一方で、オートファジーは細胞の死にも大きく関与することが明らかにされてきた^{68,69}。ショウジョウバエでは蛹期の唾腺においてオートファジー依存的な細胞死が起こり、このオートファジー細胞死が正常発生に必要であることが示されている⁷⁰。また、ショウジョウバエ midgut においても類似の現象が起こる⁷¹。さらに、成虫原基や脂肪体では過剰なオートファジー活性上昇が細胞死を引き起こすことが示されている^{62,72}。このように、オートファジーは細胞の生と死の両方をつかさどるイベントであるといえる。さらに哺乳類での解析でも、過剰なオートファジー誘導が細胞死を引き起こすことが報告されており、JNK とオートファジーが協調して Autophagic cell death が引き起こされることも報告されている^{73,74}。したがって、本研究で明らかになったメカニズムが哺乳類における細胞競合も制御する可能性がある。

本研究により、オートファジーの下流で NFκB が活性化し、これにより *hid* の発現が誘導されることが示唆された。しかしながら、オートファジーの下流でどのようにして NFκB が活性化するのかはまだわかっていない。NFκB は、通常そのインヒビターである IκB によって活性が抑制されている。IκB が IκB kinase (IKK) によりリン

酸化されユビキチン化されることでプロテアソーム系で分解され、これにより NFκB が活性化する⁷⁵。著者は、NFκB の活性化メカニズムを明らかにするために、まずシヨウジョウバエの IκB ホモログである Cactus の発現を調べた。その結果、オートファジーの活性化により Cactus の発現が低下することを見出した (第2部参照)。これまでに、IMD 経路により活性化する NFκB である Relish については、上流の IKK がオートファジーによる選択的分解を受けることでその活性が抑制されると報告されている⁷⁶。また、マウス線維芽細胞において飢餓誘導やラパマイシン処理によりオートファジーを活性化させると、IκB が分解されて NFκB が活性化することが報告されているが⁷⁷、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。今後はオートファジーによって IκB が選択的な分解を受ける可能性も含めて詳細に解析していきたい。

4-3 今後の展望

多細胞生命システムの成り立ちを理解するためには、細胞間コミュニケーションの仕組みを理解する必要がある。細胞競合は、均一な細胞集団の中で細胞間にわずかな性質や状態の違いが生まれた際、細胞間コミュニケーションを介してどちらか一方に細胞死が誘導される現象である。つまり、細胞競合によって組織中の適応度の低い細胞が排除されることで、多細胞生命体を構成する細胞集団全体を最適化し、そのホメオスタシスを維持していると考えられる。しかしながら、細胞競合の生理的役割は、がん原性細胞の排除や優良幹細胞の選択・維持というコンセプトを除きほとんどわかっていない。今後は、細胞同士が状況依存的にどういった違いを比べ合っているかを分子レベルで理解していくことが重要である。そのためには、まず組織最適化型細胞競合のメカニズムを完全に理解し、腫瘍促進型及び腫瘍抑制型細胞競合メカニズムに共通項があるかどうかを解析していく必要がある。興味深いことに、腫瘍抑制型細胞競合により敗者となる *scrib* 変異細胞においてもタンパク質合成レベルが低下しており³¹、腫瘍促進型細胞競合の勝者となる *Myc* 高発現細胞ではタンパク質合成レベルが上昇していることが知られている⁷⁸。さらに、いずれのタイプの細胞競合も JNK シグナルによって制御されることが報告されている^{2,7,13}。つまり、本メカニズムは組織最適化型細胞競合だけでなく、腫瘍抑制型や腫瘍促進型をも制御する可能性がある。

細胞競合は、これまで様々な分野で研究されてきた細胞間協調の機構とは全く異なる細胞間相互作用であるため、その全貌を理解することで新たな生命原理や生物学的コンセプトの発見につながる可能性がある。今後、細胞非自律的なオートファジー誘導メカニズムが明らかになれば、細胞競合の特異的マーカー分子が得られるかもしれない。細胞競合の特異的マーカー分子を同定できれば、個体発生や老化の過程で細胞競合がいつ・どこで起こっているかを時空間的解析に理解することが可能となる。これにより、細胞競合現象の全貌を解明するとともに、それを人為的に制御する方法論を確立していくことで、多細胞生命システムを新たな次元で理解できるようになると考える。

文献

- 1 Morata, G. & Ripoll, P. Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.* **42**, 211-221 (1975).
- 2 Moreno, E., Basler, K. & Morata, G. Cells compete for decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in Drosophila wing development. *Nature* **416**, 755-759, doi:10.1038/416755a (2002).
- 3 Nagata, R. & Igaki, T. Cell competition: Emerging mechanisms to eliminate neighbors. *Dev. Growth Differ.*, doi:10.1111/dgd.12575 (2018).
- 4 Claveria, C. & Torres, M. Cell Competition: Mechanisms and Physiological Roles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **32**, 411-439, doi:10.1146/annurev-cellbio-111315-125142 (2016).
- 5 Tanimura, N. & Fujita, Y. Epithelial defense against cancer (EDAC). *Semin. Cancer Biol.* **63**, 44-48, doi:10.1016/j.semcancer.2019.05.011 (2020).
- 6 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, doi:10.1093/emboj/cdg548 (2003).
- 7 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* **16**, 458-465, doi:10.1016/j.devcel.2009.01.002 (2009).
- 8 Vaccari, T. & Bilder, D. The Drosophila tumor suppressor vps25 prevents nonautonomous overproliferation by regulating notch trafficking. *Dev. Cell* **9**, 687-698, doi:10.1016/j.devcel.2005.09.019 (2005).
- 9 Thompson, B. J. *et al.* Tumor suppressor properties of the ESCRT-II complex component Vps25 in Drosophila. *Dev. Cell* **9**, 711-720, doi:10.1016/j.devcel.2005.09.020 (2005).
- 10 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, doi:10.1016/j.devcel.2005.09.018 (2005).
- 11 Menut, L. *et al.* A mosaic genetic screen for Drosophila neoplastic tumor suppressor genes based on defective pupation. *Genetics* **177**, 1667-1677, doi:10.1534/genetics.107.078360 (2007).
- 12 Ballesteros-Arias, L., Saavedra, V. & Morata, G. Cell competition may function either as tumour-suppressing or as tumour-stimulating factor in Drosophila. *Oncogene* **33**, 4377-4384, doi:10.1038/onc.2013.407 (2014).
- 13 Tamori, Y. & Deng, W. M. Cell competition and its implications for development and cancer. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao* **38**, 483-495, doi:10.1016/j.jgg.2011.09.006 (2011).
- 14 de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. & Johnston, L. A. Drosophila myc regulates

- organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-116 (2004).
- 15 Moreno, E. & Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-129 (2004).
- 16 Vidal, M., Larson, D. E. & Cagan, R. L. Csk-deficient boundary cells are eliminated from normal *Drosophila* epithelia by exclusion, migration, and apoptosis. *Dev. Cell* **10**, 33-44, doi:10.1016/j.devcel.2005.11.007 (2006).
- 17 Enomoto, M. & Igaki, T. Src controls tumorigenesis via JNK-dependent regulation of the Hippo pathway in *Drosophila*. *EMBO reports* **14**, 65-72, doi:10.1038/embor.2012.185 (2013).
- 18 Tyler, D. M., Li, W., Zhuo, N., Pellock, B. & Baker, N. E. Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* **175**, 643-657, doi:10.1534/genetics.106.061929 (2007).
- 19 Vincent, J. P., Kolahgar, G., Gagliardi, M. & Piddini, E. Steep differences in wingless signaling trigger Myc-independent competitive cell interactions. *Dev. Cell* **21**, 366-374, doi:10.1016/j.devcel.2011.06.021 (2011).
- 20 Rodrigues, A. B. *et al.* Activated STAT regulates growth and induces competitive interactions independently of Myc, Yorkie, Wingless and ribosome biogenesis. *Development* **139**, 4051-4061, doi:10.1242/dev.076760 (2012).
- 21 Lambertsson, A. The minute genes in *Drosophila* and their molecular functions. *Adv. Genet.* **38**, 69-134 (1998).
- 22 Lee, C. H. *et al.* A Regulatory Response to Ribosomal Protein Mutations Controls Translation, Growth, and Cell Competition. *Dev. Cell*, doi:10.1016/j.devcel.2018.07.003 (2018).
- 23 Tamori, Y. *et al.* Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition. *PLoS Biol.* **8**, e1000422, doi:10.1371/journal.pbio.1000422 (2010).
- 24 Kucinski, I., Dinan, M., Kolahgar, G. & Piddini, E. Chronic activation of JNK JAK/STAT and oxidative stress signalling causes the loser cell status. *Nature communications* **8**, 136, doi:10.1038/s41467-017-00145-y (2017).
- 25 Martin-Belmonte, F. & Perez-Moreno, M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 23-38, doi:10.1038/nrc3169 (2011).
- 26 Ohsawa, S. *et al.* Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in *Drosophila*. *Dev. Cell* **20**, 315-328, doi:10.1016/j.devcel.2011.02.007 (2011).
- 27 Araújo, S. J. & Tear, G. Axon guidance mechanisms and molecules: lessons from invertebrates. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 910-922, doi:10.1038/nrn1243 (2003).
- 28 Vaughen, J. & Igaki, T. Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia. *Dev. Cell* **39**, 683-695, doi:10.1016/j.devcel.2016.11.015 (2016).
- 29 Yamamoto, M., Ohsawa, S., Kunimasa, K. & Igaki, T. The ligand Sas and its receptor PTP10D drive tumour-suppressive cell competition. *Nature* **542**, 246-250, doi:10.1038/nature21033 (2017).
- 30 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.* **28**, 1756-1767.e1756, doi:10.1016/j.cub.2018.04.022 (2018).
- 31 Sanaki, Y., Nagata, R., Kizawa, D., Léopold, P. & Igaki, T. Hyperinsulinemia Drives Epithelial Tumorigenesis by Abrogating Cell Competition. *Dev. Cell* **53**, 379-389.e375, doi:10.1016/j.devcel.2020.04.008 (2020).
- 32 Kanda, H. & Igaki, T. Mechanism of tumor-suppressive cell competition in flies. *Cancer Sci.*, doi:10.1111/cas.14575 (2020).
- 33 Rhiner, C. *et al.* Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in Drosophila. *Dev. Cell* **18**, 985-998, doi:10.1016/j.devcel.2010.05.010 (2010).
- 34 Portela, M. *et al.* Drosophila SPARC is a self-protective signal expressed by loser cells during cell competition. *Dev. Cell* **19**, 562-573, doi:10.1016/j.devcel.2010.09.004 (2010).
- 35 Merino, M. M. *et al.* Elimination of unfit cells maintains tissue health and prolongs lifespan. *Cell* **160**, 461-476, doi:10.1016/j.cell.2014.12.017 (2015).
- 36 Amoyel, M. & Bach, E. A. Cell competition: how to eliminate your neighbours. *Development* **141**, 988-1000, doi:10.1242/dev.079129 (2014).
- 37 Meyer, S. N. *et al.* An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition. *Science* **346**, 1258236, doi:10.1126/science.1258236 (2014).
- 38 Alpar, L., Bergantinos, C. & Johnston, L. A. Spatially Restricted Regulation of Spatzle/Toll Signaling during Cell Competition. *Dev. Cell* **46**, 706-719.e705, doi:10.1016/j.devcel.2018.08.001 (2018).
- 39 Li, W. & Baker, N. E. Engulfment is required for cell competition. *Cell* **129**, 1215-1225, doi:10.1016/j.cell.2007.03.054 (2007).
- 40 Lolo, F. N., Casas-Tinto, S. & Moreno, E. Cell competition time line: winners kill losers, which are extruded and engulfed by hemocytes. *Cell Rep* **2**, 526-539, doi:10.1016/j.celrep.2012.08.012 (2012).
- 41 Lee, C. H., Rimesso, G., Reynolds, D. M., Cai, J. & Baker, N. E. Whole-Genome Sequencing and iPLEX MassARRAY Genotyping Map an EMS-Induced Mutation Affecting Cell Competition in Drosophila melanogaster. *G3 (Bethesda, Md.)* **6**, 3207-3217, doi:10.1534/g3.116.029421 (2016).
- 42 Kale, A. *et al.* Ribosomal Protein S12e Has a Distinct Function in Cell Competition. *Dev. Cell* **44**, 42-55.e44, doi:10.1016/j.devcel.2017.12.007 (2018).
- 43 Baillon, L., Germani, F., Rockel, C., Hilchenbach, J. & Basler, K. Xrp1 is a transcription factor required for cell competition-driven elimination of loser cells. *Sci. Rep.* **8**, 17712, doi:10.1038/s41598-018-36277-4 (2018).
- 44 Claveria, C., Giovinazzo, G., Sierra, R. & Torres, M. Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature* **500**, 39-44, doi:10.1038/nature12389 (2013).
- 45 Sancho, M. *et al.* Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation. *Dev. Cell* **26**, 19-30, doi:10.1016/j.devcel.2013.06.012 (2013).

- 46 Hashimoto, M. & Sasaki, H. Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells. *Dev. Cell* **50**, 139-154.e135, doi:10.1016/j.devcel.2019.05.024 (2019).
- 47 Liu, N. *et al.* Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. *Nature* **568**, 344-350, doi:10.1038/s41586-019-1085-7 (2019).
- 48 Xu, T. & Rubin, G. M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**, 1223-1237 (1993).
- 49 Lee, T. & Luo, L. Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**, 451-461, doi:10.1016/s0896-6273(00)80701-1 (1999).
- 50 Duffy, J. B. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34**, 1-15, doi:10.1002/gene.10150 (2002).
- 51 Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**, 1754-1760, doi:10.1093/bioinformatics/btp324 (2009).
- 52 Van der Auwera, G. A. *et al.* From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline. *Current protocols in bioinformatics* **43**, 11.10.11-11.10.33, doi:10.1002/0471250953.bi1110s43 (2013).
- 53 McKenna, A. *et al.* The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297-1303, doi:10.1101/gr.107524.110 (2010).
- 54 Cingolani, P. *et al.* A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w¹¹¹⁸; iso-2; iso-3. *Fly* **6**, 80-92, doi:10.4161/fly.19695 (2012).
- 55 Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 452-458, doi:10.1038/bmt.2012.244 (2013).
- 56 Gatfield, D. *et al.* The DExH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **11**, 1716-1721 (2001).
- 57 Dow, J. A. The multifunctional *Drosophila melanogaster* V-ATPase is encoded by a multigene family. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 75-83 (1999).
- 58 Morishita, H. & Mizushima, N. Diverse Cellular Roles of Autophagy. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 453-475, doi:10.1146/annurev-cellbio-100818-125300 (2019).
- 59 Mauvezin, C., Ayala, C., Braden, C. R., Kim, J. & Neufeld, T. P. Assays to monitor autophagy in *Drosophila*. *Methods* **68**, 134-139, doi:10.1016/j.ymeth.2014.03.014 (2014).
- 60 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811-1836, doi:10.15252/embj.201796697 (2017).
- 61 Takats, S. *et al.* Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1338-1354, doi:10.1091/mbc.E13-08-0449 (2014).

- 62 Scott, R. C., Juhasz, G. & Neufeld, T. P. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* **17**, 1-11, doi:10.1016/j.cub.2006.10.053 (2007).
- 63 Wang, Q., Uhlirova, M. & Bohmann, D. Spatial restriction of FGF signaling by a matrix metalloprotease controls branching morphogenesis. *Dev. Cell* **18**, 157-164, doi:10.1016/j.devcel.2009.11.004 (2010).
- 64 Martin-Blanco, E. *et al.* puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes Dev.* **12**, 557-570 (1998).
- 65 Igaki, T. *et al.* Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* **21**, 3009-3018, doi:10.1093/emboj/cdf306 (2002).
- 66 Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1016-1023, doi:10.1038/ncb2329 (2011).
- 67 Mizushima, N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* **20**, 521-527, doi:10.1038/s41556-018-0092-5 (2018).
- 68 Doherty, J. & Baehrecke, E. H. Life, death and autophagy. *Nat. Cell Biol.* **20**, 1110-1117, doi:10.1038/s41556-018-0201-5 (2018).
- 69 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811-1836, doi:10.15252/emboj.201796697 (2017).
- 70 Berry, D. L. & Baehrecke, E. H. Growth arrest and autophagy are required for salivary gland cell degradation in *Drosophila*. *Cell* **131**, 1137-1148, doi:10.1016/j.cell.2007.10.048 (2007).
- 71 Denton, D. *et al.* Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **19**, 1741-1746, doi:10.1016/j.cub.2009.08.042 (2009).
- 72 Mohseni, N., McMillan, S. C., Chaudhary, R., Mok, J. & Reed, B. H. Autophagy promotes caspase-dependent cell death during *Drosophila* development. *Autophagy* **5**, 329-338 (2009).
- 73 Shimizu, S. *et al.* Involvement of JNK in the regulation of autophagic cell death. *Oncogene* **29**, 2070-2082, doi:10.1038/onc.2009.487 (2010).
- 74 Shimizu, S., Yoshida, T., Tsujioka, M. & Arakawa, S. Autophagic cell death and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 3145-3153, doi:10.3390/ijms15023145 (2014).
- 75 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362, doi:10.1016/j.cell.2008.01.020 (2008).
- 76 Tusco, R. *et al.* Kenny mediates selective autophagic degradation of the IKK complex to control innate immune responses. *Nature communications* **8**, 1264, doi:10.1038/s41467-017-01287-9 (2017).
- 77 Criollo, A. *et al.* Autophagy is required for the activation of NFκB. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **11**, 194-199, doi:10.4161/cc.11.1.18669 (2012).
- 78 Iritani, B. M. & Eisenman, R. N. c-Myc enhances protein synthesis and cell size during B lymphocyte development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 13180-13185 (1999).

第2部

細胞非自律的なオートファジー誘導による腫瘍制御機構の解明

第1章 序論

細胞競合とは、細胞間相互作用を介した細胞排除現象である。例えば、単独では生存可能なある種の変異細胞が、正常細胞に近接すると細胞死を起こして排除されることがある。また、ある種のがん原性の変異細胞が周囲の正常細胞に細胞死を誘導して排除することもある。このような細胞競合現象は、その役割と排除される細胞の挙動から「腫瘍抑制型」「腫瘍促進型」「組織最適化型」の3つのタイプに分けられると考えられる（第1部参照）。「腫瘍抑制型細胞競合」は、例えば極性が崩壊したようながん原性細胞は単独では過剰に増殖するが、正常細胞に囲まれると排除される現象である。「腫瘍促進型細胞競合」は、がん原性の変異細胞が周囲の正常細胞を駆逐して変異クローン領域を拡大していく現象である。「組織最適化型細胞競合」は、変異細胞のみから成る組織はほぼ正常であるが、変異細胞と正常細胞とが組織中で共存すると変異細胞のみが選択的に排除される現象である。これまでに著者は、組織最適化型細胞競合に分類されると考えられる *Helicase at 25E (Hel25E)* 遺伝子変異、リボソームタンパク質遺伝子変異、及び *mahj* 遺伝子変異による細胞競合が共通して変異細胞のタンパク質合成レベルの低下を伴い、正常細胞に近接した変異細胞がオートファジー依存的な細胞死誘導によって排除されることを見出した（第1部参照）¹。このような組織最適化型細胞競合は、組織中の適応度の低い細胞（機能低下を起こした細胞）を選択的に排除することで細胞集団や組織のクオリティを最適化する機能をもつと考えられる。一方で、腫瘍促進型細胞競合に分類されると考えられるがん遺伝子 *Myc* の高発現や *Hippo* 経路変異によって引き起こされる細胞競合は、周りの正常細胞が細胞死を起こして排除されることから、スーパーコンペティションと呼ばれている^{2,4}。

Hippo 経路は、*Hippo (Hpo)*, *Salvador (Sav)*, *Warts (Wts)*, 及び *Mob-as-tumor-suppressor (Mats)* をコアコンポーネントとするキナーゼカスケードで⁵⁻⁸、転写共役因子 *Yorkie (Yki)* ; ショウジョウバエ *YAP* ホモログ) を抑制するシグナル経路である⁹ (図1)。*Yki* は細胞死抑制遺伝子や細胞増殖促進遺伝子である *Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1 (diap1)*、*cyclin E (cycE)*、*unpaired 1 (upd1)*、*wingless (wg)*、microRNA *bantam* などを発現誘導し¹⁰、組織成長・腫瘍形成を促進する。すなわち、*Hippo* 経路は *Yki* の活性を抑制するがん抑制経路であり、ショウジョウバエから哺乳類まで進化的に保存されている¹¹。*Hippo* 経路を制御する上流コンポーネントとして、細胞膜タンパク質である *Fat* が知られており (図1)、*fat* の機能欠失変異により *Hippo* 経路が抑制され、*Yki* が活性化することが知られている^{12,13}。興味深いことに、ショウジョウバエ成虫原基において *Hippo* 経路の変異細胞すなわち *Yki* を活性化した細胞集団は周りの野生型細胞に細胞死を誘導して細胞競合の勝者となることが示されている⁴。*Hippo* 経路変異細胞が引き起こす「腫瘍促進型細胞競合」は、正常細胞に近接する変異細胞

が細胞死を引き起こす「組織最適化型細胞競合」とは異なり、正常細胞が細胞死を起こす。このことから、Hippo 経路変異による細胞競合（スーパーコンペティション）は、勝者-敗者細胞間の何らかの細胞内シグナル強度の相対的な差によって引き起こされていると考えられる。そのため、本メカニズムを明らかにすることで、細胞間相互作用を介した腫瘍制御の基本メカニズムを明らかにできる可能性が高い。しかしながら、Hippo 経路変異細胞の周りの正常細胞がどのようなメカニズムで細胞死を誘導するのかはこれまで全く不明であった。また、この細胞死が変異細胞の増殖・腫瘍化にどのような役割をもつかもわかっていなかった。そこで本研究では、Hippo 経路変異によるスーパーコンペティションにおける正常細胞の細胞死誘導メカニズムを明らかにすることを目的とした。

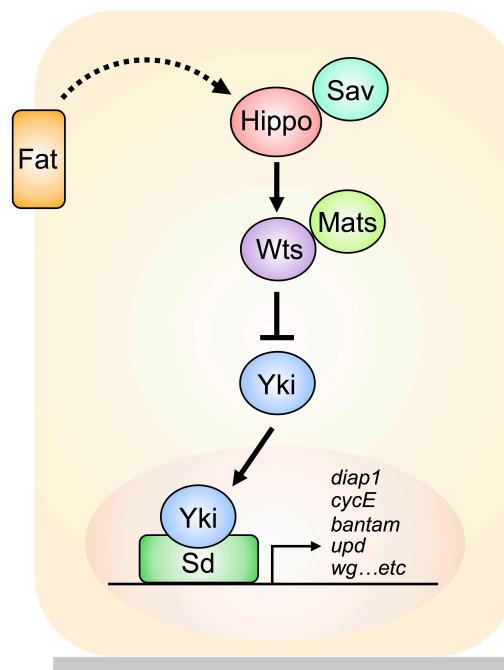


図 1 Hippo 経路

Hippo 経路は Hippo, Salvador (Sav), Warts (Wts), 及び Mob-as-tumor-suppressor (Mats) をコアコンポーネントとするキナーゼ経路で転写共役因子 Yorkie (Yki) を抑制する。細胞膜タンパク質である Fat は hippo 経路を活性化することが知られている。Yki が活性化すると核移行し、転写因子 TEAD のショウジョウバエホモログである Scalloped (Sd) に結合すると、細胞死抑制遺伝子や細胞増殖促進遺伝子 (*diap1*、*cycE*、microRNA *bantam*、*upd*、*wg* など) を発現誘導する。

第2章 材料と方法

2-1 ショウジョウバエ系統

ショウジョウバエ系統は実験用標準餌（組成と作り方は第1部「材料と方法」を参照）の入ったプラスチックバイアル内で25°Cで飼育した。3齢幼虫の成虫原基の解析においては、X染色体に目的の遺伝子が挿入されている場合を除き、雌雄は区別しなかった。野生型ショウジョウバエとしては、*w*¹¹¹⁸変異体（成虫複眼が白色の表現型を示す）を用いた。クロロキン処理の方法は第1部と同じである（第1部「材料と方法」参照）。

- ・ 遺伝学的スクリーニングに用いたテスター系統:

eyFLP1; Ubi-GFP, FRT40A/CyO (40A Ubi-GFP tester), *eyFLP1; fat*^{k07918}, *FRT40A/CyO* (40A *fat* tester)

- ・ ショウジョウバエ成虫原基へのクローン誘導に用いたテスター系統:

Tub-Gal80, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP (40A tester), *eyFLP1, UAS-Dicer2; Tub-Gal80, FRT40A; Act>y+>Gal4, UAS-GFP* (40A Dicer2 tester), *Tub-Gal80, fat*^{k07918}, *FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP* (*fat* MARCM tester)

- ・ その他のショウジョウバエ系統:

3xmCherry-Atg8a (G. Juhasz 博士より分与), *UAS-RHG.miRNA* (G. Morata 博士より分与), *Atg18b*^{#352}, *Atg4a*^{#2086}, *Vha68-3*^{#35}, *Vha100-5*^{#725}, *Dif*^{#395}, *dl*^{#2537} (S. Kondo), *UAS-dsRed-bantam-sponge* (S. Cohen 博士より分与), *hid-lacZ.20-10* (A. Bergmann 博士より分与), *fat[k07918]*¹¹¹²³⁰ (Kyoto Stock Center), *UAS-Atg1*^{BDSC 56155}, *UAS-Atg5-RNAi*²⁷⁵⁵¹, *UAS-Atg8b-RNAi*²⁷⁵⁵⁴, *hid-lacZ*⁵⁰⁷⁴⁹, *UAS-Tor-RNAi*³³⁶²⁷, *UAS-EGFP-bantam.C*⁶⁰⁶⁷², *bantam-lacZ*¹⁰¹⁵⁴ (Bloomington Stock Center), *UAS-Tsc1-RNAi*^{6147R-1} (National Institute of Genetics), *UAS-Cactus-HA*^{F000967} (FlyORF)

第2染色体左腕の Crispr-Cas9 変異系統ライブラリーは、国立遺伝学研究所の近藤周助教及び斎藤都暁教授より分与頂いた。

2-2 クローンの誘導方法

FLP-FRT を用いたクローン誘導方法及び MARCM 法は第1部と同じである（第1部「材料と方法」参照）。

2-3 遺伝学的スクリーニング

fat 変異による細胞競合を制御する因子を探索するためのモディファイヤースクリーニングでは、第2染色体左腕の Crispr-Cas9 変異系統 (*FRT40A*, *Crispr-Cas9 mutation**)と *eyFLP1; fat^{k07918}, FRT40A /CyO* (40A *fat* tester) とを交配した F₁ の成虫頭部を観察した。このとき、Non-CyO の F₁ の頭部（触覚）の腫瘍の大きさをコントロール (*FRT40A* のみ) と比較した。

2-4 免疫染色

免疫染色の方法は第1部と同じである。ただし、anti-phospho-S6 染色のみ固定時に4% Paraformaldehyde (PFA) + 10% EtOH を用いた。用いた抗体の種類と希釈倍率は以下の通りである。

・一次抗体：

rabbit anti-phospho-S6 (1:400, J. Chung 博士より分与), rabbit anti-cleaved *Drosophila* Dcp-1 (Asp216) (1:100, Cell Signaling Technology #95785), anti-b-galactosidase (1:1000, abcam #ab9361), mouse anti-cactus 3H12 (1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank)

・二次抗体：

Goat anti-rabbit Alexa 546 (1:250, Invitrogen #A11035), Goat anti-rabbit Alexa 647 (1:250, Invitrogen #21246), Goat anti-chicken Alexa 647 (1:250, Invitrogen, #A21449), Goat anti-mouse Alexa 546 (1:250, Invitrogen #A11030)

・OPP 染色の方法は第1部と同じである。

2-5 統計解析

クローンサイズの定量 (GFP クローンの面積/disc 全体の面積 (%)) には ImageJ Fiji (National Institutes of Health) の Analyze Particles を用い、GFP 及び DAPI の面積をそれぞれ測定した。クローン境界上の Dcp-1、Atg8a 及び *hid-lacZ* ポジティブ細胞を ImageJ Fiji の Analyze Particles 及び ROI Manager 用いてカウントし、クローン周長あたりのシグナル数を算出した。各遺伝子型について、少なくとも10枚以上の成虫原基から算出した。成虫頭部の腫瘍の面積は ImageJ Fiji を用いて測定した。各遺伝子型について少なくとも10匹以上の個体から算出した。統計解析には Excel (Microsoft) 及び EZR¹⁴ (自治医科大学) を用い、 $p < 0.05$ を有意水準として検定した。パラメトリックな2群間の比較には Welch's t-test を、3群以上のデータ比較では一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) と多重比較検定 (Dunnett's あるいは Tukey's post-hoc test) を行った。ノンパラメトリックな2群間の比較には Mann-Whitney's U-test を、3群以上のデータ比較では Kruskal-Wallis 検定及び多重比較検定 (Steel-Dwass' post hoc test) を行った。グラフは R ソフトウェアを用いて作製した。

2-6 各実験で用いたショウジョウバエ系統の遺伝子型

図 2

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(B) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*

図 3

- (A, F) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(B, G) *Tub-Gal80, fat^{k07918}, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(C, H) *Tub-Gal80, fat^{k07918}, FRT40A / FRT40A, UAS-RHG.miRNA; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /*
+

図 4

- (B) *eyFLP1 / + or Y; Ubi-GFP, FRT40A / FRT40A*
(C) *eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / FRT40A*
(D) 左から順に
eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / Atg18b^{#352}, FRT40A
eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / Atg4a^{#2086}, FRT40A
eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / Vha68-3^{#35}, FRT40A
eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / Vha100-5^{#725}, FRT40A
(E) 左から順に
eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / Dif^{#395}, FRT40A
eyFLP1 / + or Y; fat^{k07918}, FRT40A / dl^{#2537}, FRT40A

図 5

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / 3xmCherry-Atg8a*
(B, C) *Tub-Gal80, fat^{k07918}, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / 3xmCherry-Atg8a*

図 6

- (A, F) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(B, G) *Tub-Gal80, fat^{k07918}, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(C, H) *Tub-Gal80, fat^{k07918}, FRT40A / Atg18b^{#352}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
(J) *Tub-Gal80, fat^{k07918}, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / 3xmCherry-Atg8a*

图 7

- (A) *GMR-Gal4* / + ; + / +
- (B) *GMR-Gal4* / + ; *UAS-Atg1*^{BDSC 56155} / +
- (C) *GMR-Gal4* / + ; *UAS-Atg1*^{BDSC 56155} / *UAS-Atg8b-RNAi*^{TRiP 27554}
- (D) *GMR-Gal4* / + ; *UAS-Atg1*^{BDSC 56155} / *UAS-Atg5-RNAi*^{TRiP 27551}
- (F) *GMR-Gal4* / *hid-lacZ*; + / +
- (G) *GMR-Gal4* / *hid-lacZ*; *UAS-Atg1*^{BDSC 56155} / +
- (H) *GMR-Gal4* / *hid-lacZ*; *UAS-Atg1*^{BDSC 56155} / *UAS-Cactus-HA*^{F000967}
- (J) *Tub-Gal80*, *fat*^{k07918}, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +
- (K) *Tub-Gal80*, *fat*^{k07918}, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *UAS-Cactus-HA*^{F000967}

图 8

- (A) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *hid-lacZ.20-10*
- (B) *Tub-Gal80*, *fat*^{k07918}, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *hid-lacZ.20-10*
- (C) *Tub-Gal80*, *fat*^{k07918}, *FRT40A* / *Atg18b*^{#352}, *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *hid-lacZ.20-10*

图 9

- (A, D) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +
- (B, E) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +
- (C, F) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *UAS-Tor-RNAi*³³⁶²⁷

图 10

- (A) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*, *3xmCherry-Atg8a*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +
- (B) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*, *3xmCherry-Atg8a*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *UAS-Tor-RNAi*³³⁶²⁷
- (D, H) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +
- (E, I) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *UAS-Tor-RNAi*³³⁶²⁷

图 11

- (A) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *bantam-lacZ*¹⁰¹⁵⁴
- (B) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *fat*^{k07918}, *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / *bantam-lacZ*¹⁰¹⁵⁴

图 12

- (A) *Tub-Gal80*, *FRT40A* / *FRT40A*; *eyFLP6*, *Act>y+>Gal4*, *UAS-GFP* / +

- (B) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (C) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-dsRed-bantam-sponge*
- (D) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-EGFP-bantam.C⁶⁰⁶⁷²*

☒ 1 3

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A, 3xmCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (B) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A, 3xmCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-dsRed-bantam-sponge*
- (D, H) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (E, I) *Tub-Gal80, FRT40A / fat^{k07918}, FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-dsRed-bantam-sponge*

☒ 1 4

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A, 3xmCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-Tsc1-RNAi^{6147R-1}*
- (B) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A, 3xmCherry-Atg8a; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-EGFP-bantam.C⁶⁰⁶⁷²*
- (D) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-EGFP-bantam.C⁶⁰⁶⁷²*

☒ 1 5

- (A) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP /+*
- (B, E) *Tub-Gal80, FRT40A / FRT40A; eyFLP6, Act>y+>Gal4, UAS-GFP / UAS-dsRed-bantam-sponge*

第3章 結果

3-1 腫瘍促進型細胞競合の制御因子の探索

3-1-1 *fat* 変異による細胞競合(スーパーコンペティション)はオートファジーや NFκB によって制御される

ショウジョウバエ成虫原基において、Hippo 経路のコンポーネントである *fat* の機能欠失変異をもつ細胞クローンは細胞競合の勝者となることが報告されている⁴。実際に、MARCM 法を用いて *fat* 変異細胞クローンをショウジョウバエ 3 齢幼虫の eye-antennal disc (複眼-触覚原基) に誘導すると、周囲の野生型細胞に細胞死を誘導することが確認された (図 2A-B'、GFP 陽性細胞クローンが *fat* 変異クローン、図 1C にて定量)。また、*fat* 変異クローンを複眼-触覚原基にモザイク状に有する幼虫が成虫になると、触覚に腫瘍が形成された (図 3 F, G、矢印; 図 3I にて定量)。ここで、*fat* 変異細胞クローンの周りで miRHG (細胞死遺伝子 *rpr*, *hid*, *grim* を抑制する microRNA (miRNA) を連結したコンストラクト) を発現させることで細胞死を抑制すると、*fat* 変異クローンによる触覚での腫瘍形成が抑制された (図 3 A-C, F-H、GFP 陰性細胞クローンが *fat* 変異クローン、図 3D, E, I にて定量)。これらの結果から、*fat* 変異細胞の周りの野生型細胞の細胞死が腫瘍形成に必要であることがわかった。

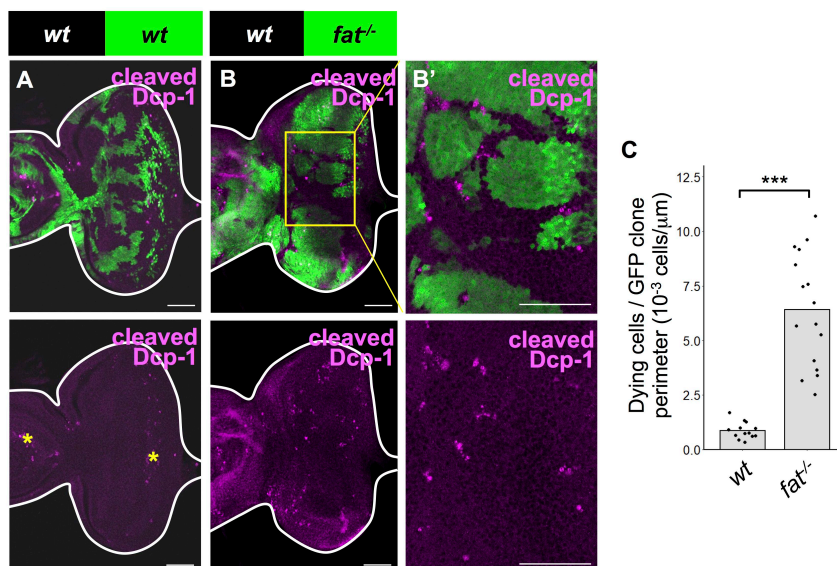


図 2 *fat* 変異細胞は野生型細胞を駆逐して細胞競合の勝者となる

(A-B') MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A) 及び *fat*^{-/-} (B) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。B'は B の拡大図を示す。*は内在性の細胞死を示す。(C) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10⁻³ cells/μm) を *wild-type* (n=13、disc の枚数) 及び *fat*^{-/-} (n=16) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

***は p<0.001 を示す。Scale bar=50μm

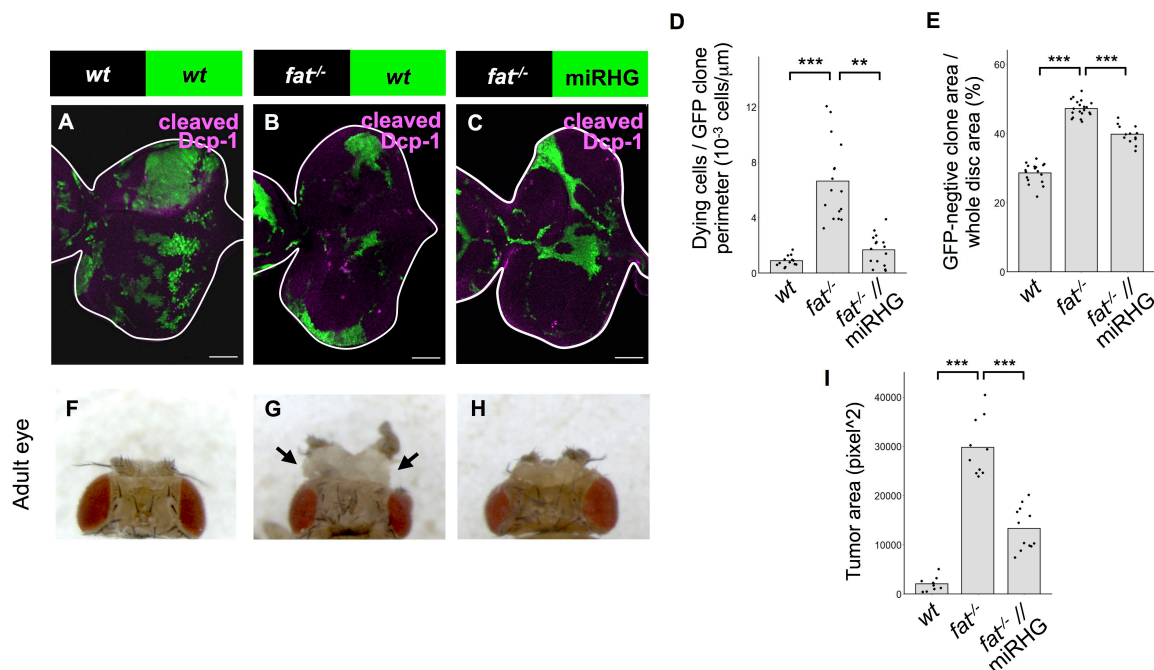


図3 *fat* 変異細胞に囲まれた野生型細胞の細胞死を抑制すると腫瘍形成が抑制される

(A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wt // wt* (A)、*fat^{-/-} // wt* (B) 及び *fat^{-/-} // miRHG* (C) クロンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて染色した。//はモザイククロンを示す。
 (D) GFP クロンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10⁻³ cells/μm) を *wt // wt* (n=13、disc の枚数)、*fat^{-/-} // wt* (n=16) 及び *fat^{-/-} // miRHG* (n=16) について定量し、Steel-Dwass' test により検定した。
 (E) disc あたりの GFP ネガティブクロンの割合 (GFP-negative clone area / disc area * 100) を *wt // wt* (n=18、disc の枚数)、*fat^{-/-} // wt* (n=20) 及び *fat^{-/-} // miRHG* (n=13) について定量し、Turkey's t-test により検定した。
 (F-H) *wt // wt* (F)、*fat^{-/-} // wt* (G) 及び *fat^{-/-} // miRHG* (H) のショウジョウバエ成虫の頭部を示した。*fat* 変異クロンを誘導すると、頭部に腫瘍が形成される (G、矢印)。
 (I) *wt // wt* (n=10、個体数)、*fat^{-/-} // wt* (n=10) 及び *fat^{-/-} // miRHG* (n=10) の頭部の腫瘍の面積を定量し、Steel-Dwass' test により検定した。***は P<0.001 を示す。Scale bar=50μm

そこで次に、*fat* 変異細胞が周りの野生型細胞に細胞死を引き起こすメカニズムを解析するために、野生型細胞に様々な遺伝子変異を誘導した際に触覚の腫瘍形成が抑制されるシステムを探索するための遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、FLP-FRT システム (第2章「材料と方法」参照) を用いてショウジョウバエ複眼-触覚原基に *fat* 変異細胞クロンを誘導し、同時に周囲の野生型細胞クロンに Crispr-Cas9 によって作製した一連の遺伝子の機能欠損アレル(第2染色体左腕のほぼ全域をカバーする遺伝子変異) をホモ接合に誘導して、成虫触覚の腫瘍形成が抑制されるシステムを探索した (図 4A-C)。本スクリーニングは、名古屋大学大学院理学研究科

の大澤志津江教授・赤井菜々美博士との共同研究で行った。その結果、オートファジー関連遺伝子¹⁵である *Atg18b* や *Atg4a*、V-ATPase¹⁶ のコンポーネントである *Vha68-3* や *Vha100-5*、NFκB である *Dif* や *dl* 変異が腫瘍形成のサプレッサーとして得られた(図 4D, E)。ここで、組織最適化型細胞競合の分子メカニズムとして、正常細胞に近接する変異細胞(敗者細胞)ではオートファジーの下流で NFκB の活性を介して細胞死が引き起こされることがわかっている(第1部参照)。以上のことから、*fat* 変異によるスーパーコンペティションにおいて、*fat* 変異細胞の周囲の正常細胞(敗者細胞)が同様のメカニズムで細胞死を起こしている可能性が考えられた。

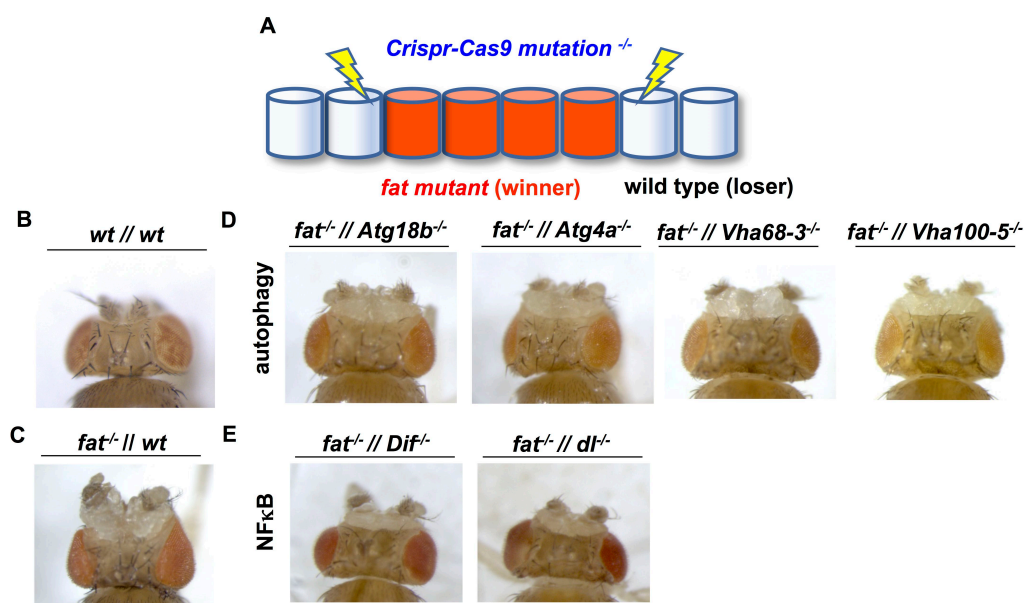


図4 *fat* 変異による頭部の腫瘍形成は周りにオートファジー関連遺伝子の変異や NFκB 変異を誘導すると抑制される

(A) ショウジョウバエ複眼に *fat* 変異細胞(赤色)と野生型細胞(白色)のクローンを誘導した際に、野生型細胞側に Crispr-Cas9 のホモ変異を誘導する。この時、触覚の腫瘍が小さくなるサプレッサーを探索した。

(B, C) 遺伝的モザイク法を用いてショウジョウバエ複眼に *wt // wt* (B) 及び *fat⁻ // wt* (C) クローンを誘導した(左から順)。

(D) 遺伝的モザイク法を用いてショウジョウバエ複眼に *fat⁻ // Atg18b⁻*、*fat⁻ // Atg4a⁻*、*fat⁻ // AtgVha68-3⁻* 及び *fat⁻ // Vha100-5⁻* クローンを誘導した(左から順)。

(E) 遺伝的モザイク法を用いてショウジョウバエ複眼に *fat⁻ // Dif⁻* 及び *fat⁻ // dl⁻* クローンを誘導した(左から順)。

3-1-2 *fat* 変異細胞に近接する野生型細胞はオートファジーの活性化を介して排除される

3-1-1 のスクリーニングによりオートファジー関連因子の変異が腫瘍形成のサプレッサーとして得られたことから、まずオートファゴソームマーカーである Atg8a-mCherry¹⁷ を用いて *fat* 変異クローンを誘導した組織においてオートファジー活性を解析した。その結果、*fat* 変異細胞に近接する野生型細胞で Atg8a シグナルが顕著に増加していることがわかった (図 5A, B、図 5D にて定量)。また、このときクロロキン処理によりオートリソソーム形成を阻害すると Atg8 シグナルが有意に増加したことから (図 5C、図 5D にて定量) (クロロキン処理の意義とその解釈については第 1 部参照)、野生型細胞においてオートファジー活性が上昇していることがわかった。

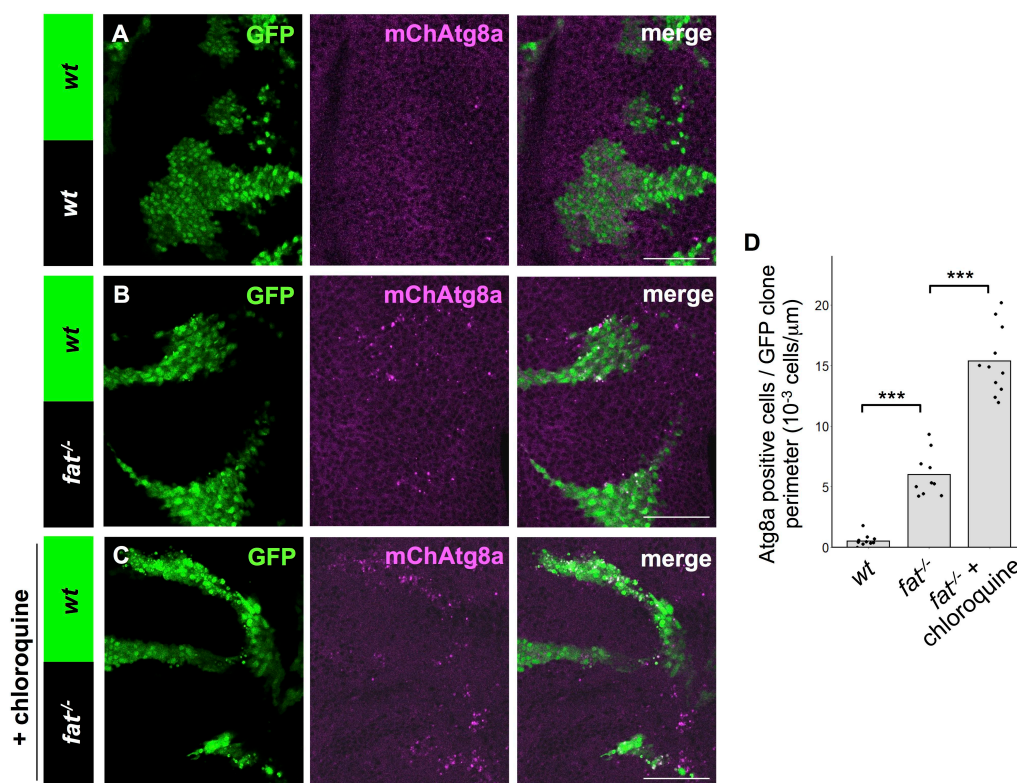


図 5 *fat* 変異細胞の周りの野生型細胞でオートファジーが活性化される

(A-C) MARCM法を用いて複眼原基にGFPで標識した3xmCherry-Atg8a/+ (A)、*fat*^{-/-} + 3xmCherry-Atg8a/+ (B) 及び *fat*^{-/-} + 3xmCherry-Atg8a/+ (クロロキン処理) (C) クローンを誘導した。(D) GFPクローンの周囲の長さあたりのAtg8aポジティブ細胞数 (10⁻³ cells/μm) を wild-type (n=12, discsの枚数)、*fat*^{-/-} (n=10) 及び *fat*^{-/-} (クロロキン処理) (n=11) について定量し、Turkey's testにより検定した。***は P<0.001 を示す。Scale bar=50μm

次に、*fat* 変異クローンの周りの細胞でオートファジーを阻害した際の細胞死を解析した。*fat* 変異クローンを誘導し、周囲の野生型細胞にのみ *Atg18b* 変異を誘導してオートファジーを阻害すると、*fat* 変異クローンの周りでみられる細胞死が顕著に抑制され（図 6A-C、図 6D, E にて定量）、触覚の腫瘍形成も抑制された（図 6F-H、図 6I にて定量）。また、オートファジー活性を示す *Atg8a* シグナルとカスパーゼの活性化を示す抗 cleaved Dcp-1 抗体染色シグナルが共局在することもわかった（図 6J、図 6K にて定量）。以上の結果から、*fat* 変異細胞に近接する正常細胞でオートファジー活性が上昇し、これが細胞死を引き起こしていると考えられた。

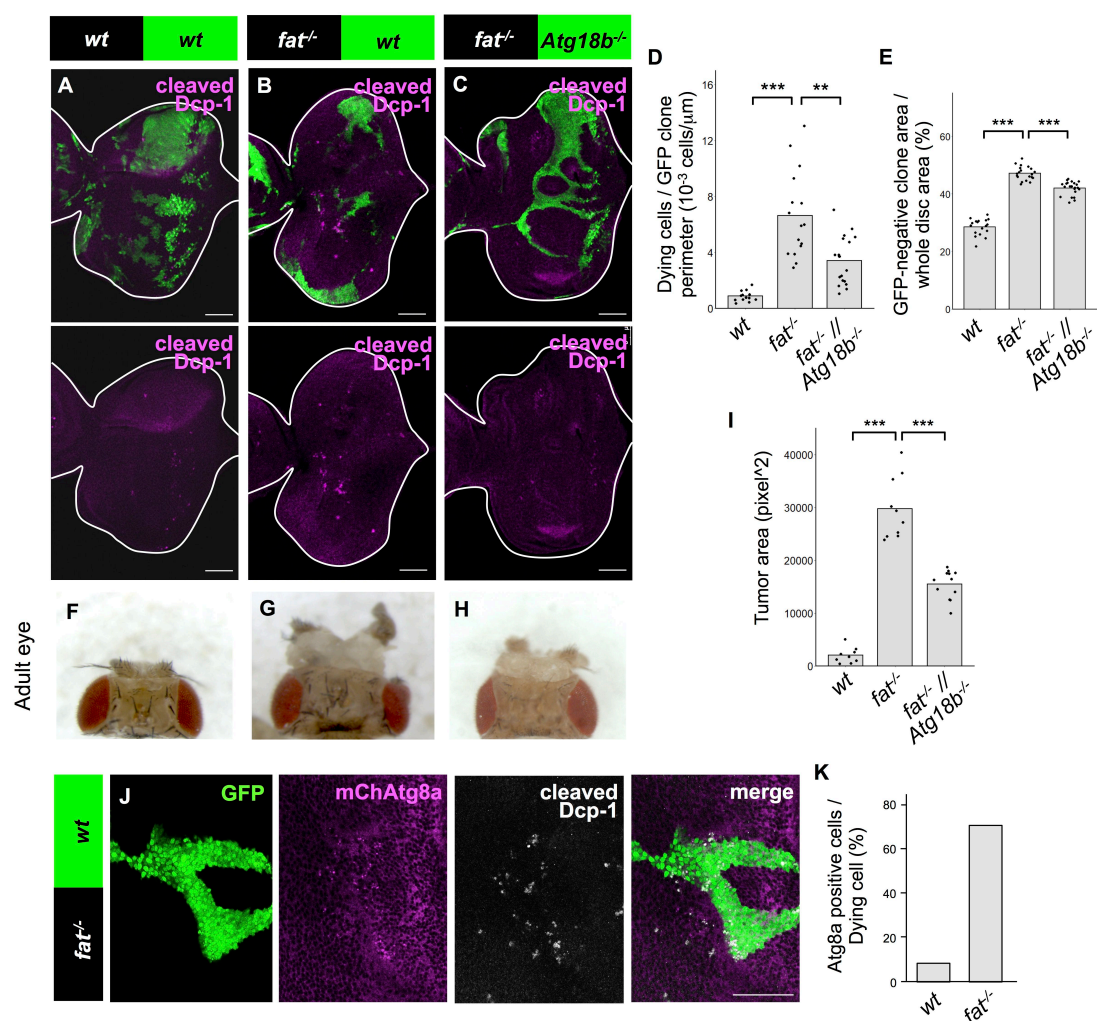


図 6 *fat* 変異細胞に囲まれた野生型細胞はオートファジー依存的に細胞死を引き起こす

(A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wt* // *wt* (A)、*fat*^{-/-} // *wt* (B) 及び *fat*^{-/-} // *Atg18b*^{-/-} (C) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて染色した。

(D) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10⁻³ cells/μm) を *wt* // *wt* (n=13、disc の枚数)、*fat*^{-/-} // *wt* (n=16) 及び *fat*^{-/-} // *Atg18b*^{-/-} (n=19) について定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(E) disc あたりの GFP ネガティブクローンの割合 (GFP-negative clone area / disc area*100) を *wt* // *wt*

(n=18、disc の枚数)、*fat*^{-/-} // *wt* (n=20) 及び *fat*^{-/-} // *Atg18b*^{-/-} (n=22) について定量し、Turkey's test により検定した。

(F-H) *wt* // *wt* (A)、*fat*^{-/-} // *wt* (B) 及び *fat*^{-/-} // *Atg18b*^{-/-} (C) のショウジョウバエ成虫の頭部を示した。

(I) *wt* // *wt* (n=9、個体数)、*fat*^{-/-} // *wt* (n=10) 及び *fat*^{-/-} // *Atg18b*^{-/-} (n=11) の頭部の腫瘍の面積を定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(J) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *fat*^{-/-} + 3xmCherry-Atg8a/+ クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。

(K) Dcp-1 ポジティブ細胞あたりの Atg8a puncta ポジティブ細胞の割合 (%) を *fat*^{-/-} + 3xmCherry-Atg8a/+ クローンについて定量した。

***は P<0.001、**は p<0.01 を示す。Scale bar=50µm

3-1-3 オートファジーの下流で IκB の発現低下を介して *hid* の発現が誘導される

組織最適化型細胞競合では、勝者細胞 (正常細胞) に近接する敗者細胞 (変異細胞) でオートファジーが活性化し、これが NFκB を介して細胞死遺伝子 *hid* の発現を誘導することがわかった (第 1 部参照)。したがって、*fat* 変異によるスーパーコンペティションも同様のメカニズムによって制御される可能性が考えられた。そこで次に、オートファジーによる NFκB の活性化メカニズムの解析を行った。NFκB は、通常その阻害タンパク質である IκB によって抑制されており、IκB がユビキチン-プロテアソーム系で分解されることで活性化する¹⁸。そこで、ショウジョウバエの IκB ホモログである Cactus タンパク質の発現レベルを解析したところ、複眼で Atg1 を過剰発現させると内在性の Cactus の発現が低下することがわかった (図 7A, B、図 7E にて定量)。重要なことに、この Atg1 過剰発現による Cactus の発現低下は、Atg1 の下流分子である Atg8b や Atg5 をノックダウンすることで抑制された (図 7B-D、図 7E にて定量)。つまり、オートファジーの活性化により Cactus タンパク質の発現が低下することがわかった。また、Atg1 過剰発現による *hid* の発現上昇が Cactus を共発現させることで抑制されたことから (図 7F-H、図 7I にて定量)、オートファジーの活性化による *hid* の発現誘導には Cactus の発現量が重要であることが示唆された。さらに、*fat* 変異細胞の周りで Cactus を過剰発現させると *fat* 変異クローンが小さくなることもわかった (図 7J, K、図 7L にて定量)。以上のことから、オートファジーの活性上昇による IκB の発現低下が NFκB を活性化することで敗者細胞の細胞死を誘導すると考えられた。

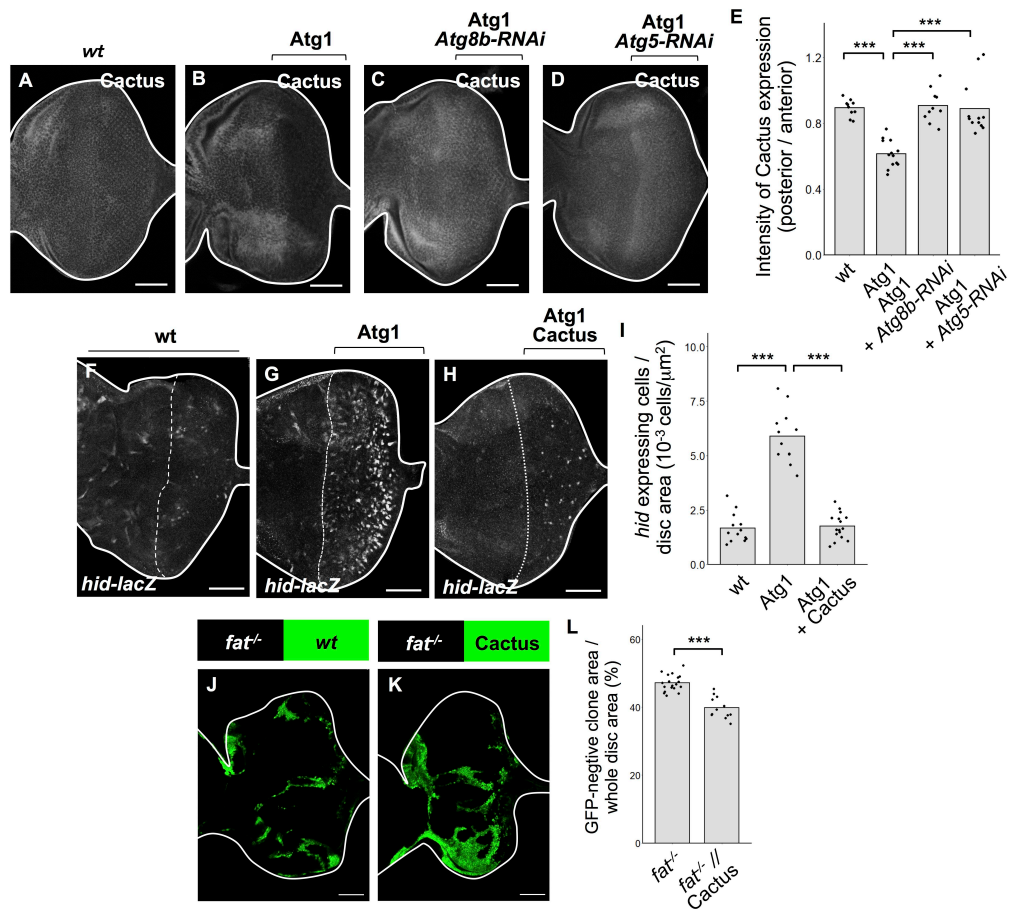


図7 IκBの分解を介して *hid* の発現が誘導される

(A-D) 複眼原基に GMR-Gal4 (A)、GMR-Gal4 + UAS-Atg1 (B)、GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + *Atg8b-RNAi* (C) 及び GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + *Atg5-RNAi* (D) を誘導し抗 Cactus 抗体で染色した。

(E) 抗 Cactus 抗体のシグナル強度の比率 (anterior/posterior) を wild-type (n=10、disc の枚数)、UAS-Atg1 (n=13)、UAS-Atg1 + *Atg8b-RNAi* (n=10) 及び UAS-Atg1 + *Atg5-RNAi* (n=12) について定量し、Turkey's test により検定した。

(F-H) 複眼原基に *hid-lacZ*/+ GMR-Gal4 (F)、*hid-lacZ*/+ GMR-Gal4 + UAS-Atg1 (G) 及び *hid-lacZ*/+ GMR-Gal4 + UAS-Atg1 + UAS-Cactus (H) を誘導し、抗 β-galactosidase 抗体で染色した。

(I) GMR 発現領域あたりの *hid* 発現細胞数 (10⁻³ cells/μm²) を wild-type (n=13、disc の枚数) UAS-Atg1 (n=12) 及び UAS-Atg1 + UAS-Cactus (n=16) について定量し、Turkey's test により検定した。

(J, K) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *fat*^{-/-} // wt (J) 及び *fat*^{-/-} // UAS-Cactus (K) クロオンを誘導した。

(L) disc あたりの GFP ネガティブクロンの割合 (GFP-negative clone area / disc area*100) を *fat*^{-/-} // wt (n=20、disc の枚数) 及び *fat*^{-/-} // UAS-Cactus (n=11) について定量し、Welch's test により検定した。

***は p<0.001 を示す。Scale bar=50μm

以上のことから、*fat* 変異細胞によるスーパーコンペティションにおいて敗者細胞（正常細胞）のオートファジー活性上昇や NFκB の活性化が必要であることがわかった。また、図 3 の実験より *fat* 変異細胞の周りの正常細胞で miRHG 過剰発現により細胞死遺伝子 *rpr*、*hid*、*grim* を抑制するとその排除が抑制されたことから、NFκB の下流で *hid* が発現誘導されている可能性が考えられた。そこで、*hid* の発現を *hid-lacZ* レポーターを用いて調べた結果、*fat* 変異細胞に近接する野生型細胞で確かに *hid* の発現が誘導されており（図 8A-B'、図 8D にて定量）、*fat* 変異細胞の周りでオートファジーを阻害すると *hid* の発現が抑制された（図 8C、図 8D にて定量）。以上のことから、*fat* 変異細胞の周りの野生型細胞では、オートファジーの下流で NFκB の活性化を介して *hid* の発現が誘導されることで細胞死が引き起こされていると考えられた。

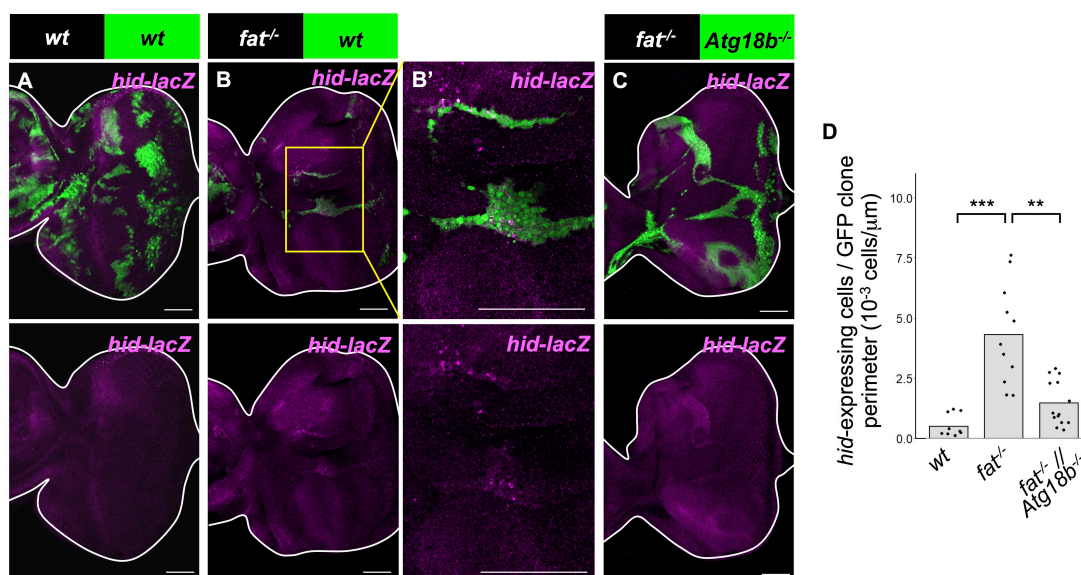


図 8 *fat* 変異細胞に囲まれた野生型細胞では *hid* が発現誘導される

(A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wt // wt + hid-lacZ/+* (A)、*fat^{-/-} // wt + hid-lacZ/+* (B) 及び *fat^{-/-} // Atg18b^{-/-} + hid-lacZ/+* (C) クローンを誘導し、抗 b-galactosidase 抗体で染色した。B' は B の拡大図を示す。

(D) GFP クローンの周囲の長さあたりの *hid-lacZ* ポジティブ細胞数 (10^{-3} cells/ μ m) を *wt // wt* (n=10, disc の枚数)、*fat^{-/-} // wt* (n=11) 及び *fat^{-/-} // Atg18b^{-/-}* (n=14) について定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

***は $p < 0.001$ 、**は $p < 0.01$ を示す。Scale bar=50 μ m

3-2 細胞非自律的なオートファジー誘導機構の解析

3-2-1 *fat* 変異細胞における TOR 経路を介したタンパク質合成レベルの上昇が周囲の野生型細胞のオートファジーを誘導する

組織最適化型細胞競合の敗者となる変異細胞では、近接する勝者細胞（正常細胞）に比べてタンパク質合成能が低下していた（第1部参照）。このことは、敗者細胞のオートファジー誘導には勝者-敗者間のタンパク質合成能の差が重要であることを示唆している。そこで、*fat* 変異クローンを誘導した組織のタンパク質合成レベルを puromycin アナログである OPP（第1部参照）を用いて解析したところ、*fat* 変異細胞では正常細胞に比べてタンパク質合成レベルが上昇していることがわかった（図 8A, B）。ここで、タンパク質合成を促進するシグナル経路として TOR シグナルが知られている。TOR シグナルは、細胞内のアミノ酸や ATP レベルに応答して TOR 複合体が Ribosomal protein S6 kinase (S6K) をリン酸化することで翻訳を促進する。またこれと同時に、TOR 複合体はショウジョウバエの 4E-BP ホモログである Thor（翻訳開始因子 eIF4E に結合してこれを阻害するタンパク質）をリン酸化して不活化することにより翻訳を促進する¹⁹。そこで、*fat* 変異クローンを誘導した組織において抗リン酸化 S6 抗体²⁰を用いて TOR シグナル活性を検出すると、*fat* 変異細胞では TOR シグナルが顕著に活性化していることがわかった（図 9D, E）。また、*fat* 変異細胞内で *Tor* をノックダウンするとタンパク質合成レベルの上昇が抑制されたことから（図 9C, F）、*fat* 変異細胞では TOR シグナルを介してタンパク質合成が上昇していることがわかった。

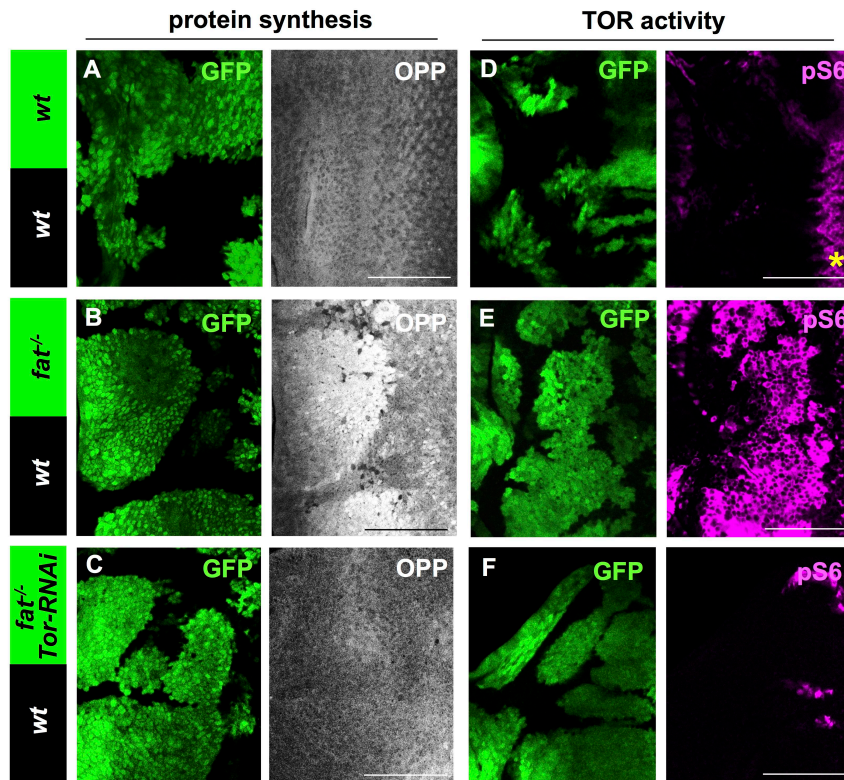


図9 *fat* 変異細胞は TOR シグナルを介してタンパク質合成を上昇する

(A-C) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、*fat^{-/-}* (B) 及び *fat^{-/-} + Tor-RNAi* (C) クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。

(D-F) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、*fat^{-/-}* (B) 及び *fat^{-/-} + Tor-RNAi* (C) クローンを誘導し、抗 pS6 抗体を用いて TOR シグナルを検出した。*は内在性のシグナルを示す。Scale bar=50μm

そこで次に、この *fat* 変異細胞内の TOR シグナルの活性上昇が周りの野生型細胞のオートファジーや細胞死誘導に必要かどうかを解析した。重要なことに、*fat* 変異細胞内で *Tor* をノックダウンすると周りの野生型細胞でみられる *Atg8a* シグナルが顕著に減少することがわかった (図 10A, B、図 10C にて定量)。また、このとき野生型細胞の細胞死も減少し (図 10D, E、図 10F, G にて定量)、触覚の腫瘍形成も顕著に抑制された (図 10H, I、図 10J にて定量)。つまり、*fat* 変異細胞内での TOR シグナル活性を介したタンパク質合成レベルの上昇が近接する野生型細胞のオートファジー誘導とそれによる細胞死に必要なことがわかった。

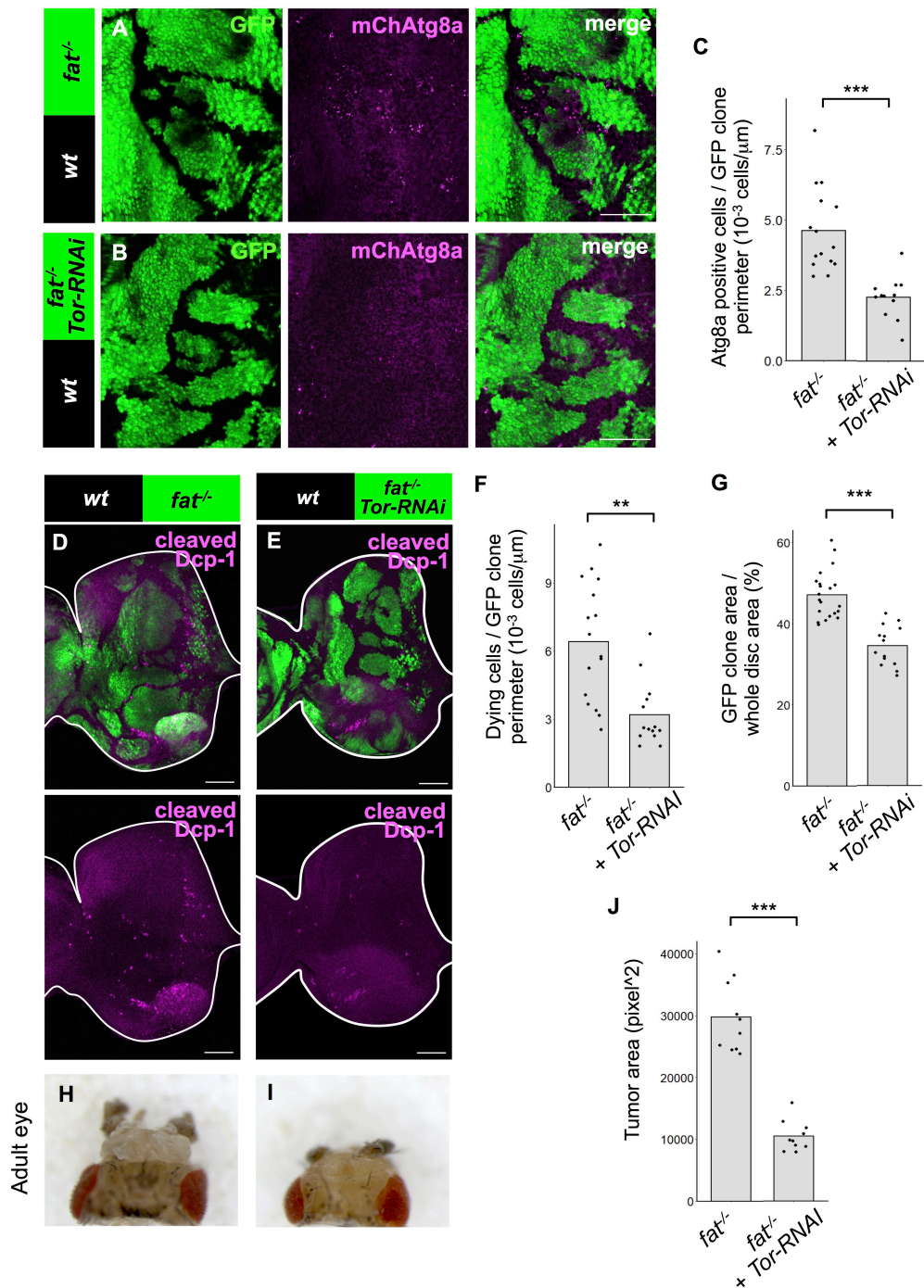


図 10 *fat* 変異細胞内の TOR シグナルの活性が、周りの野生型細胞のオートファジーや細胞死誘導に必要なである

(A, B) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *fat^{-/-}* + 3xmCherry-Atg8a/+ (A) 及び *fat^{-/-}* + *Tor-RNAi* + 3xmCherry-Atg8a/+ (B) クローンを誘導した。

(C) GFP クローンの周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10⁻³ cells/μm) を *fat^{-/-}* (n=10, discs の枚数) 及び *fat^{-/-}* + *Tor-RNAi* (n=12) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(D, E) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *fat^{-/-}* (D) 及び *fat^{-/-}* + *Tor-RNAi* (E) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。

(F) GFP クローン周囲の長さあたりの細胞死数 (10^{-3} cells/ μm) を *fat^{+/+}* (n=16, disc の枚数) 及び *fat^{+/+} + Tor-RNAi* (n=14) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(G) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area *100) を *fat^{+/+}* (n=21, disc の枚数) 及び *fat^{+/+} + Tor-RNAi* (n=14) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(H, I) *fat^{+/+}* (H) 及び *fat^{+/+} + Tor-RNAi* (I) のショウジョウバエ成虫の頭部を示した。

(J) *fat^{+/+}* (n=10, 個体数) 及び *fat^{+/+} + Tor-RNAi* (n=10) の頭部の腫瘍の面積を定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

***は $P < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm

3-2-2 *fat* 変異細胞内の *bantam*-TOR 経路の活性が周囲の野生型細胞のオートファジーを誘導する

次に、*fat* 変異細胞内の TOR シグナルの活性化メカニズムを明らかにするために、Yki のターゲット遺伝子^{10,21} と考えられている *diap1*、*cycE*、*upd*、*wg*、*Insulin receptor (InR)*、*Myc*、及び miRNA *bantam* について、① *fat* 変異クローン内でその発現が上昇しているか、② その発現を抑制した際に *fat* 変異クローン内のタンパク質合成が抑制されるか、③ その発現を抑制した際に野生型細胞で引き起こされる細胞死が抑制されるかの3点について調べた (データ未掲載)。その結果、①から③を全て満たすものとして miRNA *bantam* が得られた。まず、*bantam-lacZ* レポーターを用いて *fat* 変異クローン内で *bantam* が発現上昇していることを確認した (図 11A, B)。次に、*bantam* に相補的な配列を 10 個連結させたコンストラクトである *bantam-sponge*²² を *fat* 変異クローン内で過剰発現させることで *bantam* の機能を阻害すると、*fat* 変異細胞内のタンパク質合成レベルの上昇や TOR シグナル活性上昇が抑制されることがわかった

(図 12A-C, E-G)。ここで、ショウジョウバエの脂肪体や前胸線で *bantam* を過剰発現させると TOR シグナルが活性化することが報告されていることから²³、同様の現象が複眼-触覚原基においても起こるかどうかを検証した。その結果、複眼-触覚原基に *bantam* の過剰発現クローンを誘導すると TOR シグナルが活性化し (図 12D)、タンパク質合成レベルも上昇することがわかった (図 12H)。これらのことから、*fat* 変異クローン内では Yki のターゲットである *bantam* の発現上昇を介して TOR シグナルが活性化すると考えられた。このことと一致して、*fat* 変異細胞内で *bantam-sponge* を過剰発現させて *bantam* の機能を阻害すると、周りの野生型細胞でみられる Atg8a シグナルが顕著に減少した (図 13A-B', 図 13C にて定量)。また、このとき野生型細胞の細胞死も減少し (図 13D, E, 図 13F, G にて定量)、触覚の腫瘍形成も抑制された (図 13H, I, 図 13J にて定量)。つまり、*fat* 変異細胞内では *bantam*-TOR シグナルを介してタンパク質合成レベルが上昇し、これに依存して近接する野生型細胞のオートファジー活性が上昇すると考えられた。

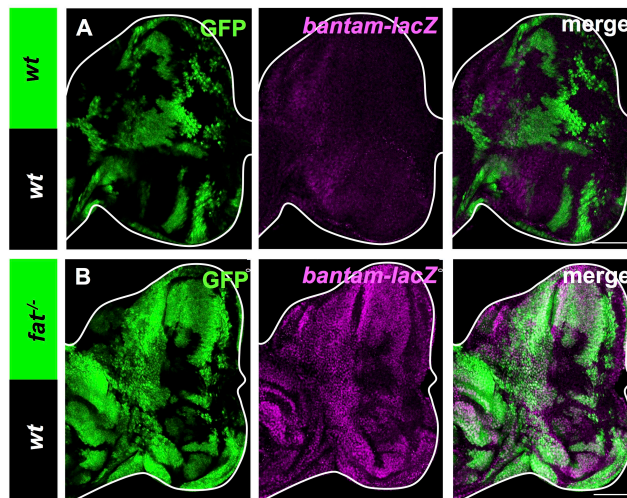


図 1 1 *fat* 変異細胞では *bantam* が発現上昇する

(A, B) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *bantam-lacZ/+* (A) 及び *fat^{-/-} + bantam-lacZ/+* (B) クローンを誘導し、抗b-galactosidase 抗体で染色した。Scale bar=50μm

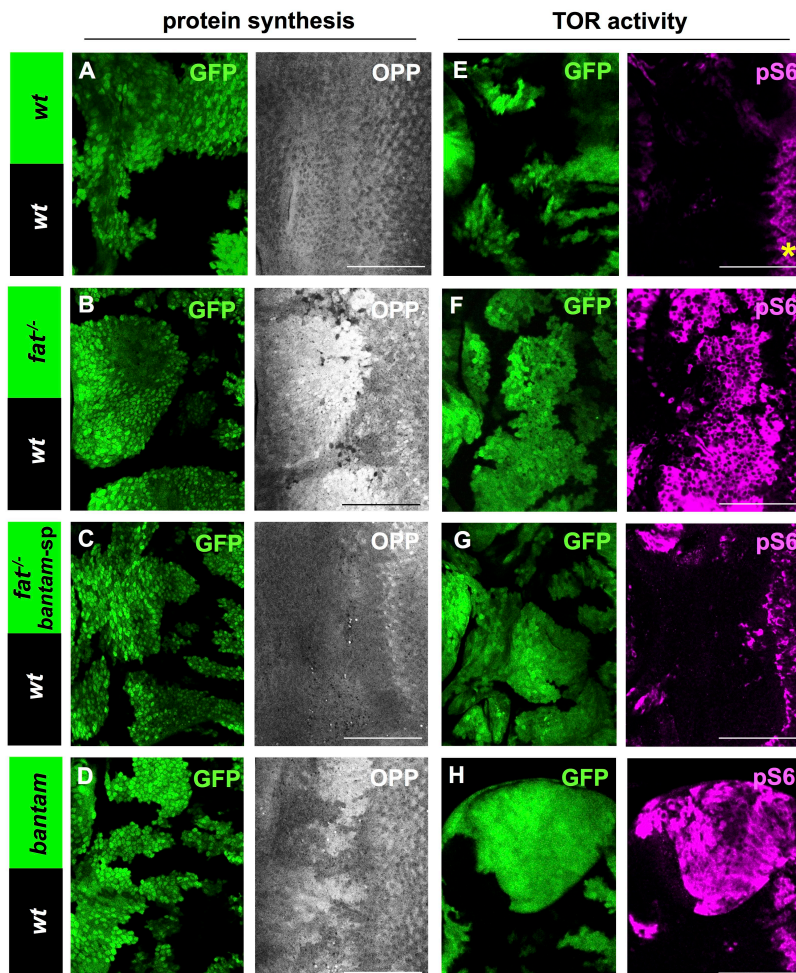


図 1 2 *fat* 変異細胞は *bantam*-TOR 経路を介してタンパク質合成を上昇する

(A-D) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、*fat*^{-/-} (B)、*fat*^{-/-} + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (C)、及び UAS-*bantam* (D) クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。

(E-H) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *wild-type* (A)、*fat*^{-/-} (B)、*fat*^{-/-} + UAS-*bantam*-sponge (C)、及び UAS-*bantam* (D) クローンを誘導し、抗 pS6 抗体を用いて TOR シグナルを検出した。*は内在性のシグナルを示す。Scale bar=50µm

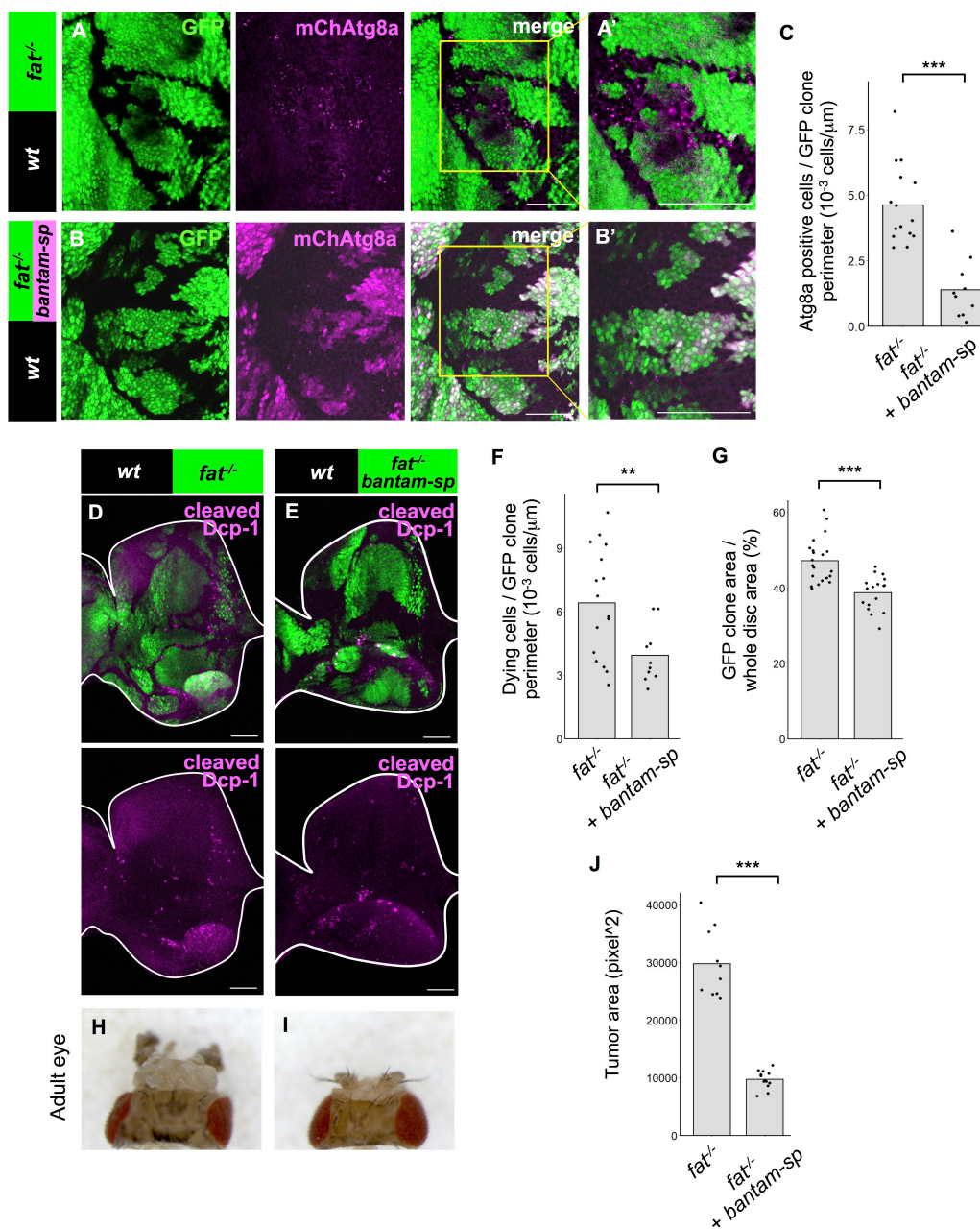


図 1 3 *fat* 変異細胞内の *bantam* の機能が周りの野生型細胞のオートファジーや細胞死誘導に必要である

(A-B') MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *fat^{+/+}* + 3xmCherry-Atg8a/+ (A) 及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge + 3xmCherry-Atg8a/+ (B) クローンを誘導した。A'はAの、B'はBの拡大図を示す。

(C) GFP クローンの周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10^{-3} cells/ μm) を *fat^{+/+}* (n=10、disc の枚数) 及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (n=10)について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(D, E) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した *fat^{+/+}* (D) 及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (E) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。

(F) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10^{-3} cells/ μm) を *fat^{+/+}* (n=16、disc の枚数) 及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (n=10)について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(G) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area *100) を *fat^{+/+}* (n=21、disc の枚数)及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (n=17)について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(H, I) *fat^{+/+}* (H) 及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (I) のショウジョウバエ成虫の頭部を示した。

(J) *fat^{+/+}* (n=10、個体数) 及び *fat^{-/-}* + UAS-dsRed-*bantam*-sponge (n=11) の頭部の腫瘍の面積を定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

***は $P < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm

3-2-3 *bantam* の発現レベルが細胞競合の勝者・敗者を決定する

3-2-2 より、*fat* 変異によるスーパーコンペティションの誘導には *bantam*-TOR シグナルを介した *fat* 変異細胞内のタンパク質合成レベルの上昇が必要であることがわかった。では、タンパク質合成の上昇だけで近接する正常細胞のオートファジー活性は上昇するのだろうか。これを検証するために、TOR シグナルを負に制御する GTPase 活性化タンパク質 Tsc1²⁴ をノックダウンした細胞クローンを複眼-触覚原基に誘導し、オートファジー活性を解析した。その結果、これら Tsc1 ノックダウンクローン内では確かにタンパク質合成レベルが上昇していたが、このとき周囲の野生型細胞にオートファジーは誘導されなかった (図 14A、図 14C にて定量)。一方、興味深いことに、*bantam* 過剰発現クローンを複眼-触覚原基に誘導すると、周囲の野生型細胞にオートファジーや細胞死が誘導されることがわかった (図 14B, D、図 14E, F にて定量)。これらのことから、細胞間の単純なタンパク質合成量の差だけではなく、*bantam* の発現レベルの差 (*bantam* の下流イベントの活性の差) が細胞競合の勝者・敗者を決定づけるのではないかと考えた。この仮説と一致して、*bantam*-sponge 発現クローンを複眼-触覚原基に誘導すると、野生型細胞に近接する *bantam*-sponge 発現細胞で細胞死が引き起こされることがわかった (図 15A-B'、図 15C, D にて定量)。また、*bantam*-sponge 発現クローンでは確かにタンパク質合成レベルが低下していた (図 15E)。以上のことから、隣接する細胞間でのタンパク質合成レベルの差に加えて、*bantam* の下流イベント活性の相対的な差が細胞競合の勝者・敗者を決定するという可能性が示唆された。

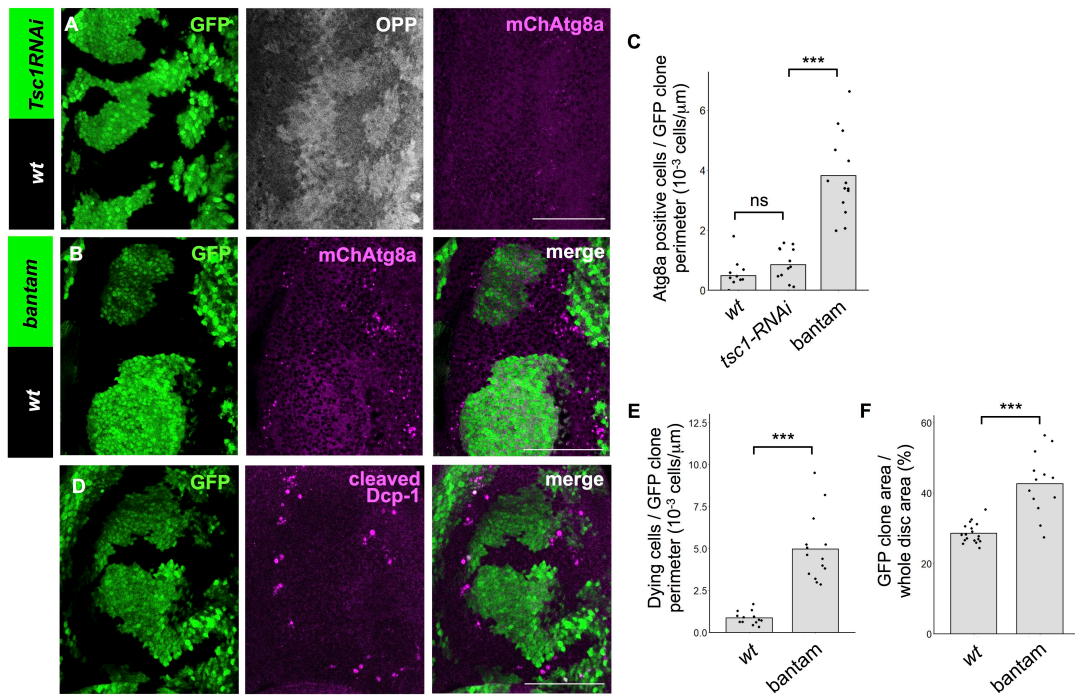


図 1 4 *bantam* 過剰発現は周りの野生型細胞にオートファジーや細胞死を誘導する

(A) MARCM法を用いて複眼原基に GFP で標識した *Tsc1-RNAi* + 3xmCherry-Atg8a/+ クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。

(B) MARCM法を用いて複眼原基に GFP で標識した *UAS-bantam* + 3xmCherry-Atg8a/+ クローンを誘導した。

(C) GFP クローンの周囲の長さあたりの Atg8a ポジティブ細胞数 (10^{-3} cells/ μm) を *Tsc1-RNAi* (n=13、discs の枚数)、*UAS-bantam* (n=14) について定量し、Steel-Dwass' test により検定した。

(D) MARCM法を用いて複眼原基に GFP で標識した *UAS-bantam* クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。

(E) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10^{-3} cells/ μm) を *wild-type* (n=13、disc の枚数)、及び *UAS-bantam* (n=13) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(F) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP clone area / disc area *100) を *wild-type* (n=18、disc の枚数)、及び *UAS-bantam* (n=13) について定量し、Welch's t-test により検定した。

***は $P < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm

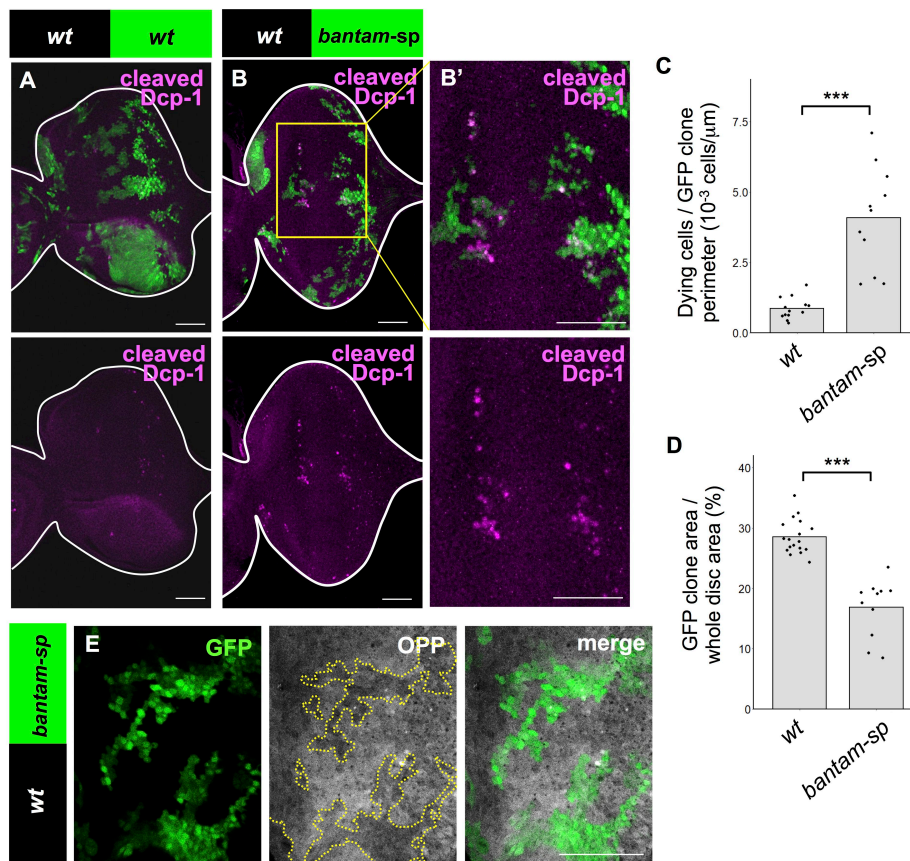


図 1 5 *bantam* の発現が低下した細胞は野生型細胞との境界面で細胞死を引き起こして排除される

(A-B') MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した wild-type (A) 及び UAS-dsRed-*bantam*-sponge (B) クローンを誘導し、抗 cleaved Dcp-1 抗体を用いて細胞死を検出した。B'は B の拡大図を示す。

(C) GFP クローンの周囲の長さあたりの細胞死数 (10^{-3} cells/ μm) を *wild-type* (n=13、disc の枚数)、及び UAS-dsRed-*bantam*-sponge (n=11) について定量し、Mann-Whitney's U-test により検定した。

(D) disc あたりの GFP クローンの割合 (GFP lone area / disc area *100) を *wild-type* (n=18、disc の枚数)、及び UAS-dsRed-*bantam*-sponge (n=11) について定量し、Welch's t-test により検定した。

***は $P < 0.001$ を示す。Scale bar=50 μm

(E) MARCM 法を用いて複眼原基に GFP で標識した UAS-dsRed-*bantam*-sponge クローンを誘導し、OPP 染色により新生タンパク質合成を検出した。黄色の点線は GFP クローンを示している。

第4章 考察

4-1 スーパーコンペティションは細胞非自律的なオートファジー誘導によって駆動される

これまでの研究で著者は、組織最適化型細胞競合において野生型細胞に近接する変異細胞でオートファジー活性が上昇し、これが変異細胞の細胞死を引き起こすことを見出した（第1部参照）。本研究（第2部）では、がん原性の変異細胞が正常細胞を駆逐する腫瘍抑制型細胞競合（スーパーコンペティション）の分子メカニズムを、Hippo 経路コンポーネントである *fat* の変異細胞をモデルとして用いて解析した。その結果、驚くべきことに変異細胞に近接する正常細胞においてオートファジーの活性上昇が起こり、これが NFκB-*hid* を介して正常細胞に細胞死を引き起こすことが明らかとなった。すなわち、組織最適化型細胞競合で変異細胞に起こる現象が、スーパーコンペティションによって排除される正常細胞においても起こることがわかった。これらの結果は、組織最適化型細胞競合の敗者細胞（変異細胞）が「自律的に」オートファジー活性を上昇するポテンシャルを有しているわけではなく、隣接する細胞間の何らかのシグナルの相対的な差が一方の細胞に「非自律的に」オートファジーを誘導するという興味深い事実を示している。本研究により、組織最適化型細胞競合と腫瘍促進型細胞競合はいずれも勝者細胞による敗者細胞へのオートファジー誘導というメカニズムによって敗者細胞を排除することがわかった。

著者のこれまでの研究により、組織最適化型細胞競合の敗者となる変異細胞では共通してタンパク質合成レベルが低下していることがわかっていた（第1部参照）。そこで、細胞間のタンパク質合成レベルの差がオートファジー誘導に重要なのではないかと考え、実際に *fat* 変異によるスーパーコンペティションモデルを用いて解析した。その結果、細胞間のタンパク質合成レベルの差が敗者細胞のオートファジー誘導に必要であることがわかった。具体的には、*fat* 変異細胞では Yki のターゲットである *bantam* を介して TOR シグナルが上昇しており、これが周りの野生型細胞のオートファジー誘導に必要であると考えられた。しかしながら、タンパク質合成レベルを上昇させただけでは周りの野生型細胞のオートファジーは誘導されなかった。これに対し、*bantam* 過剰発現クローンは、周りの野生型細胞にオートファジーを誘導した。以上のことから、*bantam* の下流のイベントとタンパク質合成レベルの上昇の両方が周りの細胞のオートファジー誘導に必要であると考えられた（図 16）。そのため、今後は *bantam* のターゲット遺伝子群を解析することで、細胞非自律的なオートファジー誘導機構を明らかにできると考えられる。また、*bantam-sponge* を過剰発現させるだけで野生型細胞とのクローン境界上の *bantam-sponge* 細胞に細胞死が誘導されたことから、*bantam* の発現低下が細胞競合の敗者になるための十分条件であると考えられた。

しかし、組織最適化型細胞競合を引き起こす *Hel25E* 変異細胞で *bantam* の発現を解析したところ、変異細胞内で *bantam* の発現に変化はみられなかった（データ未掲載）。つまり、*bantam* の発現低下は必ずしも敗者細胞で起こる現象ではないということがわかり、この結果から2つの可能性が考えられた。一つは、種々の細胞競合現象において、*bantam* の発現低下以外で *bantam* の下流イベントのシグナル活性が低下している可能性が考えられる。もう一つは、細胞競合の敗者細胞になるための条件が、*bantam* の下流イベントの活性変化以外にも存在する可能性である。今後は、組織最適化型細胞競合と腫瘍抑制型細胞競合の両方のモデルを用いて遺伝学的スクリーニングと single-cell RNA-seq 解析を行うことで、細胞非自律的なオートファジー誘導機構の分子メカニズムを解析していく予定である。これら2種類のモデルの利点を活用することで、勝者・敗者細胞のそれぞれを遺伝学的に制御することが可能となり、効率的にメカニズム解析を進めることができると考えられる。

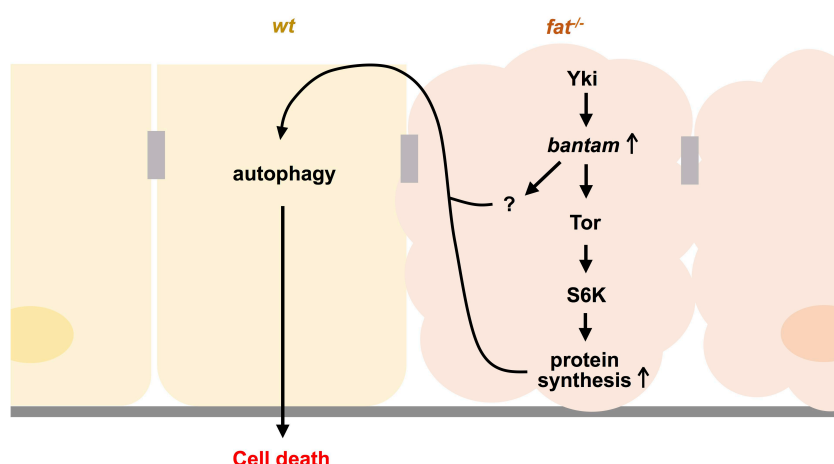


図 1 6 メカニズムの仮説

4-2 敗者細胞の細胞死誘導が腫瘍形成を促進するメカニズム

本研究により、Hippo 経路変異細胞の周りの野生型細胞で細胞死が引き起こされることが Hippo 経路変異細胞の腫瘍形成に必要であることがわかった。では、なぜ細胞死が引き起こされるだけで腫瘍化が促進するのだろうか。主に3つの可能性が考えられる。①一つは、死につつある細胞が周辺細胞の増殖を促す「代償性増殖」が起こっている可能性である。ショウジョウバエ上皮では、死にゆく細胞においてカスパーゼ9のホモログである Death regulator Nedd2-like caspase (Dronc) の活性化を介して Wg や decapentaplegic (Dpp) などの分泌性の増殖因子が発現誘導されることが知られている²⁵⁻²⁷。またこの現象は、Dronc の抑制や miRHG 過剰発現によって *rpr*、*hid*、*grim* を抑制することで阻害されることが分かっている。実際に、本研究で miRHG を周囲

の正常細胞で過剰発現させると変異細胞の腫瘍形成が抑制されたことから、*fat* 変異細胞の周りの野生型細胞で代償性増殖を起こす因子の発現が亢進している可能性が考えられる。②二つ目は、野生型細胞の細胞死により上皮細胞シート上に局所的な機械的・力学的な変化が生じることで、*fat* 変異細胞が増殖しやすくなる可能性である。上皮シート中で細胞死が引き起こされると、周りの細胞への張力・圧力に変化が生じると考えられる。例えば、ショウジョウバエの蛹期 *notum* 領域で細胞が圧力をうけると細胞増殖に関わるキナーゼ Erk の活性が低下して細胞死を起こすことが知られている²⁸。また、哺乳類培養細胞を用いた実験では、細胞に張力が生じると Erk 活性が上昇することが知られている²⁹。③三つ目は、上皮組織中の死細胞に免疫細胞（ヘモサイト）が集まり、このヘモサイトが分泌因子などの発現を介して Hippo 経路変異細胞の増殖を促進する可能性である。実際に、ヘモサイトは上皮組織中の JNK を活性化して増殖を制御しうるということが知られている^{30,31}。以上のいずれかあるいは複数の要因により腫瘍形成が促進している可能性が考えられるため、今後詳細な解析を進めていく予定である。

4-3 スーパーコンペティションの進化的保存性

Hippo 経路はショウジョウバエから哺乳類まで保存されており、YAP の活性化による細胞競合現象は哺乳類においても観察されている。例えば、マウス初期発生における後期胚盤胞のエピブラストにおいて、YAP を高発現する幹細胞が細胞競合を介して選択的に組織に残ることが示されている³²。また、マウスの肝臓に腫瘍を誘発し、この腫瘍の周りの細胞で YAP を活性化させると、腫瘍細胞に細胞死が誘導されて腫瘍が縮小することが報告されている³³。このような哺乳類における現象に、オートファジーによる細胞死誘導メカニズムが働いているかどうかを解析することは興味深い。本研究では miRNA *bantam* の下流のシグナルレベルとタンパク質合成レベルが周りの細胞のオートファジー誘導に重要であることが示唆された。*bantam* の完全な哺乳類ホモログは報告されていないが、類似する配列や機能を持った miRNA が存在することが報告されている^{34,35}。今後は、*bantam* のターゲットとして考えられる遺伝子のスクリーニングを行うことで、周りの細胞のオートファジー誘導に必要な *bantam* 下流イベントを同定する。具体的には、タンパク質合成レベルの低下と同時に *bantam* のターゲット遺伝子をノックダウンしたクローンを誘導し、この時の野生型細胞のオートファジーを解析する。これにより細胞非自律的オートファジーの誘導メカニズムが完全に明らかになれば、同じメカニズムが哺乳類でも機能しうるかを解析していくことで、進化的に保存された細胞競合の分子メカニズムを理解できるようになるかもしれない。さらには、細胞競合を介した細胞死誘導という今までにないメカニズムに着目したがん治療に応用できるかもしれない。

文献

- 1 Nagata, R., Nakamura, M., Sanaki, Y. & Igaki, T. Cell Competition Is Driven by Autophagy. *Dev. Cell* **51**, 99-112.e114, doi:10.1016/j.devcel.2019.08.018 (2019).
- 2 de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. & Johnston, L. A. *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-116 (2004).
- 3 Moreno, E. & Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-129 (2004).
- 4 Tyler, D. M., Li, W., Zhuo, N., Pellock, B. & Baker, N. E. Genes affecting cell competition in *Drosophila*. *Genetics* **175**, 643-657, doi:10.1534/genetics.106.061929 (2007).
- 5 Harvey, K. F., Pflieger, C. M. & Hariharan, I. K. The *Drosophila* Mst ortholog, hippo, restricts growth and cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell* **114**, 457-467, doi:10.1016/s0092-8674(03)00557-9 (2003).
- 6 Pantalacci, S., Tapon, N. & Léopold, P. The Salvador partner Hippo promotes apoptosis and cell-cycle exit in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* **5**, 921-927, doi:10.1038/ncb1051 (2003).
- 7 Wu, S., Huang, J., Dong, J. & Pan, D. hippo encodes a Ste-20 family protein kinase that restricts cell proliferation and promotes apoptosis in conjunction with salvador and warts. *Cell* **114**, 445-456, doi:10.1016/s0092-8674(03)00549-x (2003).
- 8 Udan, R. S., Kango-Singh, M., Nolo, R., Tao, C. & Halder, G. Hippo promotes proliferation arrest and apoptosis in the Salvador/Warts pathway. *Nat. Cell Biol.* **5**, 914-920, doi:10.1038/ncb1050 (2003).
- 9 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, doi:10.1016/j.cell.2005.06.007 (2005).
- 10 Zhao, B., Tumaneng, K. & Guan, K. L. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* **13**, 877-883, doi:10.1038/ncb2303 (2011).
- 11 Zheng, Y. & Pan, D. The Hippo Signaling Pathway in Development and Disease. *Dev. Cell* **50**, 264-282, doi:10.1016/j.devcel.2019.06.003 (2019).
- 12 Willecke, M. *et al.* The fat cadherin acts through the hippo tumor-suppressor pathway to regulate tissue size. *Curr. Biol.* **16**, 2090-2100, doi:10.1016/j.cub.2006.09.005 (2006).
- 13 Silva, E., Tsatskis, Y., Gardano, L., Tapon, N. & McNeill, H. The tumor-suppressor gene fat controls tissue growth upstream of expanded in the hippo signaling pathway. *Curr. Biol.* **16**, 2081-2089, doi:10.1016/j.cub.2006.09.004 (2006).
- 14 Kanda, Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical

- statistics. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 452-458, doi:10.1038/bmt.2012.244 (2013).
- 15 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**, 1811-1836, doi:10.15252/emj.201796697 (2017).
- 16 Dow, J. A. The multifunctional *Drosophila melanogaster* V-ATPase is encoded by a multigene family. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**, 75-83 (1999).
- 17 Mauvezin, C., Ayala, C., Braden, C. R., Kim, J. & Neufeld, T. P. Assays to monitor autophagy in *Drosophila*. *Methods* **68**, 134-139, doi:10.1016/j.ymeth.2014.03.014 (2014).
- 18 Hayden, M. S. & Ghosh, S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* **132**, 344-362, doi:10.1016/j.cell.2008.01.020 (2008).
- 19 Texada, M. J., Koyama, T. & Rewitz, K. Regulation of Body Size and Growth Control. *Genetics* **216**, 269-313, doi:10.1534/genetics.120.303095 (2020).
- 20 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* **42**, 363-375.e364, doi:10.1016/j.devcel.2017.07.020 (2017).
- 21 Ikmi, A. *et al.* Molecular evolution of the Yap/Yorkie proto-oncogene and elucidation of its core transcriptional program. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 1375-1390, doi:10.1093/molbev/msu071 (2014).
- 22 Becam, I., Rafel, N., Hong, X., Cohen, S. M. & Milán, M. Notch-mediated repression of bantam miRNA contributes to boundary formation in the *Drosophila* wing. *Development* **138**, 3781-3789, doi:10.1242/dev.064774 (2011).
- 23 Texada, M. J. *et al.* Autophagy-Mediated Cholesterol Trafficking Controls Steroid Production. *Dev. Cell* **48**, 659-671.e654, doi:10.1016/j.devcel.2019.01.007 (2019).
- 24 Gao, X. *et al.* Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat. Cell Biol.* **4**, 699-704, doi:10.1038/ncb847 (2002).
- 25 Huh, J. R., Guo, M. & Hay, B. A. Compensatory proliferation induced by cell death in the *Drosophila* wing disc requires activity of the apical cell death caspase Dronc in a nonapoptotic role. *Curr. Biol.* **14**, 1262-1266, doi:10.1016/j.cub.2004.06.015 (2004).
- 26 Pérez-Garijo, A., Martín, F. A. & Morata, G. Caspase inhibition during apoptosis causes abnormal signalling and developmental aberrations in *Drosophila*. *Development* **131**, 5591-5598, doi:10.1242/dev.01432 (2004).
- 27 Ryoo, H. D., Gorenc, T. & Steller, H. Apoptotic cells can induce compensatory cell proliferation through the JNK and the Wingless signaling pathways. *Dev. Cell* **7**, 491-501, doi:10.1016/j.devcel.2004.08.019 (2004).
- 28 Moreno, E., Valon, L., Levillayer, F. & Levayer, R. Competition for Space Induces Cell Elimination through Compaction-Driven ERK Downregulation. *Curr. Biol.* **29**, 23-34.e28,

- doi:10.1016/j.cub.2018.11.007 (2019).
- 29 Hino, N. *et al.* ERK-Mediated Mechanochemical Waves Direct Collective Cell Polarization. *Dev. Cell* **53**, 646-660.e648, doi:10.1016/j.devcel.2020.05.011 (2020).
- 30 Fogarty, C. E. *et al.* Extracellular Reactive Oxygen Species Drive Apoptosis-Induced Proliferation via *Drosophila* Macrophages. *Curr. Biol.* **26**, 575-584, doi:10.1016/j.cub.2015.12.064 (2016).
- 31 Diwanji, N. & Bergmann, A. Basement membrane damage by ROS- and JNK-mediated Mmp2 activation drives macrophage recruitment to overgrown tissue. *Nature communications* **11**, 3631, doi:10.1038/s41467-020-17399-8 (2020).
- 32 Hashimoto, M. & Sasaki, H. Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells. *Dev. Cell* **50**, 139-154.e135, doi:10.1016/j.devcel.2019.05.024 (2019).
- 33 Moya, I. M. *et al.* Peritumoral activation of the Hippo pathway effectors YAP and TAZ suppresses liver cancer in mice. *Science* **366**, 1029-1034, doi:10.1126/science.aaw9886 (2019).
- 34 Ibáñez-Ventoso, C., Vora, M. & Driscoll, M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* **3**, e2818, doi:10.1371/journal.pone.0002818 (2008).
- 35 Shen, S. *et al.* A miR-130a-YAP positive feedback loop promotes organ size and tumorigenesis. *Cell Res.* **25**, 997-1012, doi:10.1038/cr.2015.98 (2015).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始御指導をしていただきました京都大学大学院生命科学研究科システム機能学分野の井垣達吏教授に心より感謝を申し上げます。また、実験技術や研究に関する御指導をしていただきました菅田浩司准教授、榎本将人助教、谷口喜一郎助教、中村麻衣博士、名古屋大学大学院理学研究科の大澤志津江教授、赤井菜々美博士、Curie Institute の佐奈喜祐哉博士に厚く御礼を申し上げます。また、次世代シーケンスの解析には、京都大学大学院生命科学研究科の近藤武史助教にご助言をいただきました。Crispr-Cas9 変異体は国立遺伝学研究所の近藤周助教、斎藤都暁教授よりいただきました。システム機能学研究室の皆様には、日々のディスカッションや研究のサポートをしていただきました。深く感謝を申し上げます。本研究の一部は、（公財）東京生化学研究会奨学生及び日本学術振興会特別研究員 DC 2 として行われました。

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。

Rina Nagata, Mai Nakamura, Yuya Sanaki and Tatsushi Igaki

Cell Competition Is Driven by Autophagy

Developmental Cell 51:99-112, 2019

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.08.018>