



Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in Drosophila

Takino, Kyoko

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6392号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006392>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in *Drosophila*

Rab5 の機能破綻は TNF および Ras シグナルを介して細胞非自律的に細胞増殖を促進する

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

遺伝学

(指導教員：南 康博 教授)

瀧野 恭子

がんの発生・進展において、細胞内エンドサイトーシス経路の異常が重要な役割を果たすことが推察されているが、その分子機構はこれまでほとんど不明であった。当研究室では、がんの発生・進展を駆動する細胞間コミュニケーションの分子基盤を生体レベルで解明するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、まずショウジョウバエ複眼原基の上皮組織において、活性化型 Ras (RasV12) を発現する細胞クローンを誘導すると、良性腫瘍が形成される。このRas 誘導性良性腫瘍に対してさらなる突然変異を導入し、変異細胞自身ではなく周りの正常細胞群が過剰に増殖する変異体 (*non-cell autonomous growth (nag)* 変異体) をスクリーニングした。その結果、初期エンドソームの形成・機能に関わる低分子量Gタンパク質 *rab5* 遺伝子の変異体が単離された。さらに興味深いことに、*rab5* 変異細胞群はRasV12発現細胞群と協調した場合のみならず、*rab5* 変異細胞群でcaspaseを介する細胞死を阻害するp35を発現させた場合においても、周辺細胞の増殖を促すことがわかった。

そこで私は、*rab5* 変異が駆動する細胞非自律的な増殖促進機構を遺伝学的に解析した結果、*rab5* 変異群で増殖因子Unpaired (Upd) (IL-6 ホモログ) の発現が上昇し、これが周囲の正常細胞群に影響を及ぼし、細胞非自律的な増殖を引き起こすことを明らかにした。近年の報告で、細胞増殖抑制経路であるHippo経路によりUpdの発現が抑制されることがわかつた。そこで、*rab5* 変異細胞群におけるHippo経路の活性を検証したところ、*rab5* 変異細胞内でHippo経路が抑制され、その結果ターゲット遺伝子であるdiaplやexpandedの発現上昇が起こっていることがわかつた。また、Hippo経路の標的転写共役因子であるYkiのリン酸化酵素Warts (Wats) を過剰発現させてHippo経路を抑制するとUpdの発現上昇と細胞非自律的増殖が抑制されたことから、*rab5* 変異細胞群はHippo経路の不活性化を介してUpdの発現上昇を起こしている事がわかつた。

次に、*rab5* 変異細胞内で Yki がいかにして活性化しているのかを検証した。Yki の活性化は JNK (c-jun N-terminal kinase) 経路によって正に制御されていることが知られているため、*rab5* 変異細胞群における JNK の活性化を観察したところ、JNK 経路の転写ターゲットである mmp1 (matrix metalloprotease-1) の発現上昇を観察する事ができた。すなわち、*rab5* 変異細胞内で JNK 経路が活性化していることがわかつた。また、*rab5* 変異細胞内で JNK のショウジョウバエホモログである Basket のドミナントネガティブフォームを発現させるとUpdの発現上昇が抑制され、細胞非自律的増殖能も抑制された。これらのデータは、*rab5* 変異細胞群が JNK 経路の活性化を介して Yki を活性化していることを示している。

さらに、*rab5* 変異細胞がいかにして JNK 経路を活性化しているかを検証した。ショウジョウバエの TNF (Tumor Necrosis Factor) ホモログである Eiger は JNK を介して活性化することが知られている。組織全体で Eiger を欠損させると Upd の発現上昇が抑制され、細胞非自律的増殖能も低下することが判明した。一方、*rab5* 変異細胞の細胞膜において Eiger のタンパク量の上昇が観察された。これは、*rab5* の機能障害による細胞膜上でのタンパク輸送の障害によるものと思われ、蓄積した Eiger が JNK 経路の活性化を促進していると考えられる。以

上の結果から、*rab5* 変異細胞群では Eiger-JNK 経路を介して *Upd* の発現上昇が引き起こされていると考えられた。

他方、*rab5* 変異細胞内で F-actin の集積がみられることがわかったため、細胞骨格制御に何らかの異常があるのではないかと考え、Rho ファミリーGTPase の一つである Cdc42 の機能を低下させたところ、*Upd* の発現上昇と細胞非自律的増殖能が抑制された。そこで、Cdc42 がどのようにして *rab5* 変異細胞群に増殖能を付与しているのか検証したところ、Cdc42 欠損が Eiger 依存的な細胞死を抑制することがわかった。以上の結果をふまえると、Cdc42 が JNK の下流において活性化していると考えられる。しかしながら、JNK 経路の活性化だけでは細胞非自律的増殖能を獲得できないことがわかり、JNK 経路の活性化以外になんらかのシグナル伝達経路が関わっている可能性が考えられた。当研究室において、ミトコンドリア機能障害と活性化型 Ras が協調すると JNK シグナル伝達経路の活性化を引き起こすことを見いだしている。このことから、*rab5* 変異細胞内で Ras 経路が何らかの役割を果たしているのではないかと考えた。*rab5* 変異細胞内での Ras シグナル活性を検証したところ、*rab5* 変異細胞内で HMG-box プロテインである capicua の発現低下がみられた。Capicua は Ras シグナルの活性化に伴い発現が低下する。つまり、*rab5* 変異細胞内で Ras シグナルが活性していると考えられた。一方、Ras 経路のエフェクターである Raf のドミナントネガティブフォームを発現させると、*Upd* の発現上昇が抑制され、細胞非自律的増殖能も抑制された。ここで、Raf の機能を抑制しても Jnk 経路の抑制は起こらなかった。これらのことから、細胞非自律的増殖には Eiger-JNK-Cdc42 の経路と Ras-MAPK のシグナルが独立に必要であると考えられた。

最後に、*rab5* 変異細胞内で Ras 経路がいかにして活性化されるのかを検証した。*rab5* 変異細胞群はエンドサイトーシスに異常をきたしていることから Ras シグナルを活性化するレセプターになんらかの異常があるのではないかと考えた。実際に、*rab5* 変異細胞内で EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) のタンパク量が上昇していることがわかった。また、*rab5* 変異細胞内で EgfrRNAi によって EGFR の機能を低下させると、*Upd* の発現上昇と細胞非自律的増殖能が抑制された。一方、Cdc42 と Ras 経路の活性化を同時に起こした場合は、*Upd* の発現上昇は観察できなかった。以上のことから、*rab5* 変異細胞内で Ras 経路と JNK 経路がパラレルに活性化することにより Hippo 経路の抑制と *Upd* の発現上昇を介して細胞非自律的細胞増殖がおこると考えられた。

ショウジョウバエ上皮において組織全体が *rab5* 変異細胞であるとき、自律的な増殖と浸潤をおこすことが知られており、これは *rab5* 遺伝子ががん腫瘍化抑制因子であることを示している。本研究では、*rab5* の機能障害は細胞間相互作用を介した腫瘍悪性化にも寄与することを初めて示した。がんが正常組織内において発がん性の小さな細胞集団から生じるとすると、*rab5* 機能障害が引き起こす細胞非自律的な腫瘍増殖メカニズムは、むしろ自律的な発がんメカニズムより重要であると考えられる。類似の非自律的増殖は vps22、vps25、ept といった ESCRT 遺伝子の変異細胞群によっても観察されることが報告されている。しかし、これらの

ESCRT 変異細胞群とは異なり、*rab5* 欠損に起因する非自律的増殖は Notch シグナル伝達を介さず、Hippo 経路の不活化を介して引き起こされる。Hippo 経路の不活化は、多くの種類のヒトのがんで観察されることが示されている。

多細胞生物における細胞死と細胞増殖の協調的な制御に、“細胞競合”と呼ばれる現象が関わることがわかってきてている。細胞競合とは、適応度のより高い細胞が周辺の適応度が低い細胞を細胞死により組織から駆逐し、適応度の高い勝者細胞が余分に増殖して空いたスペースを埋める現象である。興味深いことに最近、ショウジョウバエ成虫原基において *rab5* 変異細胞群が細胞競合の敗者となつて組織から排除されるという報告がなされた。すなわち、*rab5* 変異が駆動する Eiger-JNK-Cdc42 経路と EGFR-Ras 経路の活性化は細胞競合における勝者の代償的な細胞増殖に重要な役割を果たすのではないかと考えられる。本研究で明らかになつた経路が進化的に保存されていることを考慮すると、脊椎動物において *rab5* の機能障害が駆動する細胞増殖とがん悪性化機構を標的とした新たながん治療戦略の基盤の構築が期待される。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2507 号	氏名	瀧野 恵子
論文題目 Title of Dissertation	<p>Rab5 の機能破綻は TNF および Ras シグナルを介して細胞非自律的に細胞増殖を促進する</p> <p>Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in <i>Drosophila</i></p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 伊藤 俊樹</p> <p>副査 Vice-examiner 古瀬 令夫</p> <p>副査 Vice-examiner 平島 正則</p>		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

がんの発生・進展において、細胞内エンドサイトーシス経路の異常が重要な役割を果たすことが推察されているが、その分子機構はほとんど不明である。そこで、がんの発生・進展を駆動する細胞間コミュニケーションの分子基盤を生体レベルで解明するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした遺伝学的解析を行った。当研究室の先行研究により、ショウジョウバエ複眼原基の上皮組織において、Ras 誘導性良性腫瘍に対してさらなる突然変異を導入し、変異細胞自身ではなく周りの正常細胞群が過剰に増殖する変異体 (non-cell autonomous growth (nag) 変異体) をスクリーニングが行われた。その結果、初期エンドゾームの形成・機能に関わる低分子量 G タンパク質 rab5 遺伝子の変異体が単離された。さらに興味深いことに、rab5 変異細胞群は RasV12 発現細胞群と協調した場合のみならず、rab5 変異細胞群で caspase を介する細胞死を阻害する p35 を発現させた場合においても、周辺細胞の増殖を促すことが明らかとなった。そこで私は、rab5 変異が駆動する細胞非自律的な増殖促進機構を遺伝学的に解析した結果、rab5 変異群で増殖因子 Unpaired (Upd) (IL-6 ホモログ) の発現が上昇し、これが周囲の正常細胞群に影響を及ぼし、細胞非自律的な増殖を引き起こすことを明らかにした。近年の報告で、細胞増殖抑制経路である Hippo 経路により Upd の発現が抑制されることがわかつた。そこで、rab5 変異細胞群における Hippo 経路の活性を検証したところ、rab5 変異細胞内で Hippo 経路が抑制され、その結果ターゲット遺伝子である diap1 や expanded の発現上昇が起こっていることがわかつた。また、Hippo 経路の標的転写共役因子である Yki のリン酸化酵素 Warts (Wats) を過剰発現させて Hippo 経路を抑制すると Upd の発現上昇と細胞非自律的増殖が抑制されたことから、rab5 変異細胞群は Hippo 経路の不活性化を介して Upd の発現上昇を起こしている事がわかつた。次に、rab5 変異細胞内で Yki がいかにして活性化しているのかを検証した。Yki の活性化は JNK (c-jun N-terminal kinase) 経路によって正に制御されていることが知られているため、rab5 変異細胞群における JNK の活性化を観察したところ、JNK 経路の転写ターゲットである mmp1 (matrix metalloprotease-1) の発現上昇を観察する事ができた。すなわち、rab5 変異細胞内で JNK 経路が活性化していることがわかつた。また、rab5 変異細胞内で JNK のショウジョウバエホモログである Basket のドミナントネガティブフォームを発現させると Upd の発現上昇が抑制され、細胞非自律的増殖能も抑制された。これらのデータは、rab5 変異細胞群が JNK 経路の活性化を介して Yki を活性化していることを示している。さらに、rab5 変異細胞がいかにして JNK 経路を活性化しているかを検証した。ショウジョウバエの TNF (Tumor Necrosis Factor) ホモログである Eiger は JNK を介して活性化することが知られている。組織全体で Eiger を欠損させると Upd の発現上昇が抑制され、細胞非自律的増殖能も低下することが判明した。一方、rab5 変異細胞の細胞膜において Eiger のタンパク量の上昇が観察された。これは、rab5 の機能障害による細胞膜上でのタンパク輸送の障害によるものと思われ、蓄積

した Eiger が JNK 経路の活性化を促進していると考えられる。以上の結果から、rab5 変異細胞群では Eiger-JNK 経路を介して Upd の発現上昇が引き起こされていると考えられた。他方、rab5 変異細胞内で F-actin の集積がみられることがわかったため、細胞骨格制御に何らかの異常があるのではないかと考え、Rho ファミリーGTPase の一つである Cdc42 の機能を低下させたところ、Upd の発現上昇と細胞非自律的増殖能が抑制された。そこで、Cdc42 がどのようにして rab5 変異細胞群に増殖能を付与しているのか検証したところ、Cdc42 欠損が Eiger 依存的な細胞死を抑制することがわかった。以上の結果をふまえると、Cdc42 が JNK の下流において活性化していると考えられる。しかしながら、JNK 経路の活性化だけでは細胞非自律的増殖能を獲得できないことがわかり、JNK 経路の活性化以外になんらかのシグナル伝達経路が関わっている可能性が考えられた。当研究室において、ミトコンドリア機能障害と活性化型 Ras が協調すると JNK シグナル伝達経路の活性化を引き起こすことを見いだしている。このことから、rab5 変異細胞内で Ras 経路が何らかの役割を果たしているのではないかと考えた。rab5 変異細胞内での Ras シグナル活性を検証したところ、rab5 変異細胞内で HMG-box プロテインである capicua の発現低下がみられた。Capicua は Ras シグナルの活性化に伴い発現が低下する。つまり、rab5 変異細胞内で Ras シグナルが活性していると考えられた。一方、Ras 経路のエフェクターである Raf のドミナントネガティブフォームを発現させると、Upd の発現上昇が抑制され、細胞非自律的増殖能も抑制された。ここで、Raf の機能を抑制しても Jnk 経路の抑制は起こらなかった。これらのことから、細胞非自律的増殖には Eiger-JNK-Cdc42 の経路と Ras-MAPK のシグナルが独立に必要であると考えられた。最後に、rab5 変異細胞内で Ras 経路がいかにして活性化されるのかを検証した。rab5 変異細胞群はエンドサイトーシスに異常をきたしていることから Ras シグナルを活性化するレセプターになんらかの異常があるのではないかと考えた。実際に、rab5 変異細胞内で EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)のタンパク量が上昇していることがわかった。また、rab5 変異細胞内で EgfrRNAi によって EGFR の機能を低下させると、Upd の発現上昇と細胞非自律的増殖能が抑制された。一方、Cdc42 と Ras 経路の活性化を同時に起こした場合は、Upd の発現上昇は観察できなかった。以上のことから、rab5 変異細胞内で Ras 経路と JNK 経路がパラレルに活性化することにより Hippo 経路の抑制と Upd の発現上昇を介して細胞非自律的細胞増殖がおこると考えられた。

以上のように、本研究はがんの発生および進展過程について、ショウジョウバエ上皮組織を用いた遺伝学的手法により変異細胞が周囲細胞の「非自律的増殖」を促進する分子機構を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった発がん機構における低分子量 G タンパク質 Rab5 の関与について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。