

## 35. 細胞競合の分子基盤と発生における役割の研究

佐々木 洋

大阪大学 大学院生命機能研究科 初期胚発生研究室

Key words : マウス初期胚, 細胞競合, Hippo シグナル, 細胞間コミュニケーション, NIH3T3 細胞

### 緒言

私たちの体は発生によって作られる。発生の重要な特徴の一つは正確性であるが、胚内の個々の細胞にはばらつきがあり、その様な細胞の集団が正確に体をつくり上げるためには、隣接する細胞同士がコミュニケーションすることで、その挙動を調和させることが必要であると考えられる。しかし、そのような隣接細胞の状態を認識した細胞間コミュニケーションの仕組みはあまりわかっていない。

私は、これまでのマウス胚発生および培養細胞を用いた研究によって、Hippo シグナル経路が細胞間の接着によって活性化される細胞間コミュニケーションに関わるシグナル経路であり、細胞が細胞密度の変化を認識して、細胞増殖を制御する事に関わっていること<sup>1-3)</sup>、また、細胞密度の認識には細胞骨格の変化が関与していること<sup>4)</sup>などを明らかにしてきた。さらに、マウス胚線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞を用いて Hippo シグナル経路の研究を進める中で、Hippo 経路の下流で働く転写因子 Tead の転写活性の異なる細胞を混ぜて共培養すると、Tead 活性の高い細胞が優先的に増殖し Tead 活性の低い細胞が排除される、細胞競合と呼ばれる細胞間コミュニケーションが起こることを見出した<sup>5)</sup>。

細胞競合の研究はショウジョウバエを中心に進められているが、ショウジョウバエにおいても、どのようにして隣接細胞の状態を認識するのかなど、そのしくみの多くがわかっていない。さらに、哺乳類においては、着床後のマウス初期胚など、いくつかの系で細胞競合が起こる報告がある<sup>6,7)</sup>ものの、そのしくみや発生における役割などは、ほとんどわかっていないのが現状である。そこで本研究では、発生の正確性の分子基盤を明らかにすることを将来的な目標として、細胞競合に注目して、そのしくみと発生に果たす役割とを明らかにすることを目的として研究を行った。

### 方法

#### 1. キメラ胚を用いた *in vivo* での細胞競合検定系

EGFP を発現する胚性幹 (ES) 細胞に CRISPR/Cas9 法を用いて細胞競合関連遺伝子・候補遺伝子の欠損 ES 細胞を作製した。EGFP を発現する欠損 ES 細胞と mCherry を発現する正常 ES 細胞とを混ぜて 8 細胞期胚に注入し、偽妊娠マウスに移植してキメラ胚を作製した。胎生 5.5-7.5 日で胚を回収し、EGFP と mCherry の発現細胞の数を比較することで、細胞競合活性を解析した。

#### 2. NIH3T3 細胞を用いた細胞競合関連遺伝子の検索

Cas9 を発現させた NIH3T3 細胞に Koike-Yusa らの CRISPR/Cas9 システムのゲノムワイドな gRNA レンチウイルスライブラリー<sup>8)</sup> (Nat Biotech 32, 267-273, 2014) を感染させ、様々な遺伝子に変異を持つ NIH3T3 細胞の集団、すなわち変異細胞ライブラリーを作製した。この変異細胞ライブラリーを培養すると、細胞競合に関わる遺伝子に変異を持つ細胞は、時間とともにその存在比率が変化すると考えられる。すなわち、細胞競合の勝者になる細胞は存在比率が増加し、敗者になる細胞は存在比率が減少する。そこで、元の gRNA ライブラリー、培養 4 日目と 10 日目の変異細胞ライブラリーに含まれる各 gRNA を次世代シーケンサーで解読し、各 gRNA の存在比率の経時的な増減を指標として細胞競合関連遺伝子を検索した。

### 3. NIH3T3 細胞を用いた細胞競合の検定

マウス胚線維芽細胞由来の NIH3T3 細胞に、CRISPR/Cas9 法のレンチウイルスベクターを感染させることで、GFP 標識された新規細胞競合関連候補遺伝子の破壊細胞を作製した。その細胞を正常な NIH3T3 細胞と混合して共培養し、2-3 日おきに、それぞれの細胞数を計測することで、細胞の増殖曲線を作成した。

## 結果および考察

### 1. マウス胚における Tead 活性による細胞競合

我々は、NIH3T3 細胞において、Hippo 経路の転写因子 Tead 活性の違う細胞の間で細胞競合が起こることを報告してきた<sup>5)</sup>。そこで、*in vivo*においても Tead 活性の差による細胞競合が起こるかどうかを調べるために、EGFP を発現する *Tead1* 欠損 ES 細胞と mCherry を発現する正常 ES 細胞を用いてキメラ胚を作製した。*Tead1* 欠損 ES 細胞あるいは正常 ES 細胞だけでキメラ胚を作製すると、胎生 7.5 日では、どちらの細胞も胚全体に存在していたのに対し、両者を混合してキメラ胚を作ると、胚のほぼ全ての細胞が mCherry を発現する正常細胞であり、EGFP を発現する *Tead1* 欠損細胞はほとんど存在しなかった。したがって、正常細胞が存在すると、*Tead1* 欠損細胞が細胞競合の敗者となり胎生 7.5 日までに排除されると考えられた (図 1)。これまで、胎生 6.0–6.5 日胚で、Myc の発現量の違いによる細胞競合が起こることが報告されていた<sup>6,7)</sup> が、*Tead1* 欠損細胞の排除は、それよりも早い胎生 5.5 日までに起こっていた。Myc による細胞競合は、多能性を持ったエピプラスト細胞が、三胚葉への分化を開始する前に、Myc の発現レベルの低い細胞を排除して均質化を行う役割を果たしていると考えられている<sup>6,7)</sup> が、より早い時期に起こる Tead 活性による細胞競合が、胚発生においてどのような役割を果たしているのか、今後明らかにしていくことが必要である。

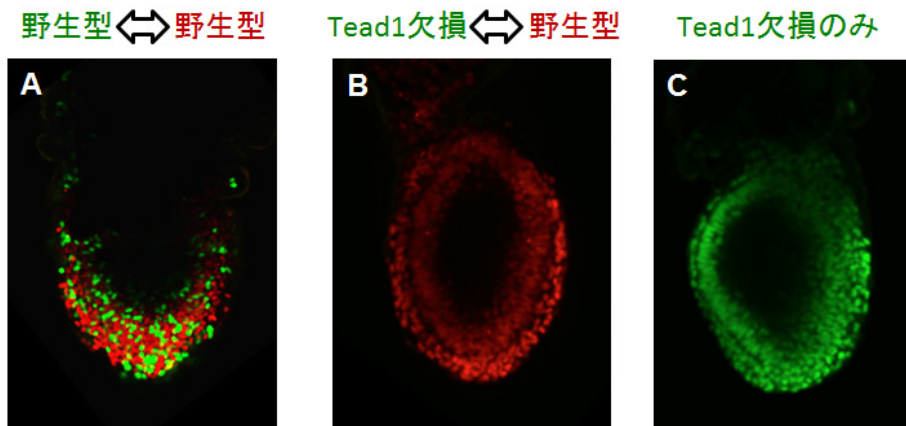


図 1. マウス初期胚における Tead 活性の違いによる細胞競合

胎生 7.5 日のキメラ胚。(A) 緑あるいは赤色蛍光タンパク質を発現する 2 種類の ES 細胞のキメラ胚では両方の細胞が混ざった胚ができる。(B) *Tead1* 欠損 ES 細胞と正常 (野生型) ES 細胞のキメラ胚では、*Tead1* 欠損細胞が排除される。(C) *Tead1* 欠損 ES 細胞のみでキメラ胚を作製すると、*Tead1* 欠損細胞からなる胚が形成される。倍率: 75 倍

### 2. NIH3T3 細胞を用いた新規細胞競合関連遺伝子の検索

我々が樹立した NIH3T3 細胞における細胞競合系<sup>5)</sup>を用いて、細胞競合に関与する遺伝子の網羅的な検索を行った。Koike-Yusa らの CRISPR/Cas9 システムのゲノムワイドな gRNA レンチウイルスライブラリー<sup>8)</sup>を用いて NIH3T3 の変異細胞ライブラリーを作製し、スクリーニングを行った。

Hippo 経路に異常を持つ細胞は、細胞競合の勝者になり、時間と共に存在比率の増加が予想されるが、スクリーニングの結果 *Nf2*, *Sav1*, *Amotl2* などの Hippo 経路の遺伝子に対する gRNA の存在比率が顕著に増加しており、本実験系によって細胞競合関連遺伝子の検索が可能であることが示された (図 2)。

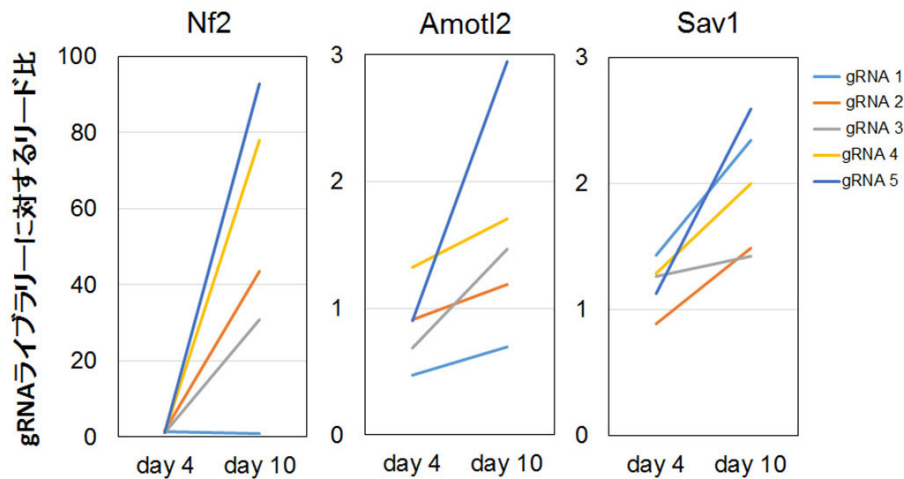


図2. 新規細胞競合関連遺伝子スクリーニング系における Hippo 因子の挙動  
NIH3T3 細胞を用いた新規の細胞競合関連遺伝子のスクリーニング系では、Hippo 経路の遺伝子 (*Nf2*, *Amotl2*, *Sav1*) を破壊した細胞は、その存在比率の増加が見られた。

また、時間とともに増加する細胞競合の勝者になる新規遺伝子の候補のリストと、時間と共に減少する敗者になる新規遺伝子の候補のリストが得られた。リストの上位の遺伝子から順に、NIH3T3 細胞において細胞競合への関与を検証したところ、変異により細胞競合の勝者になる遺伝子を 7 個、変異により敗者になる遺伝子を 6 個新たに同定した (図 3)。

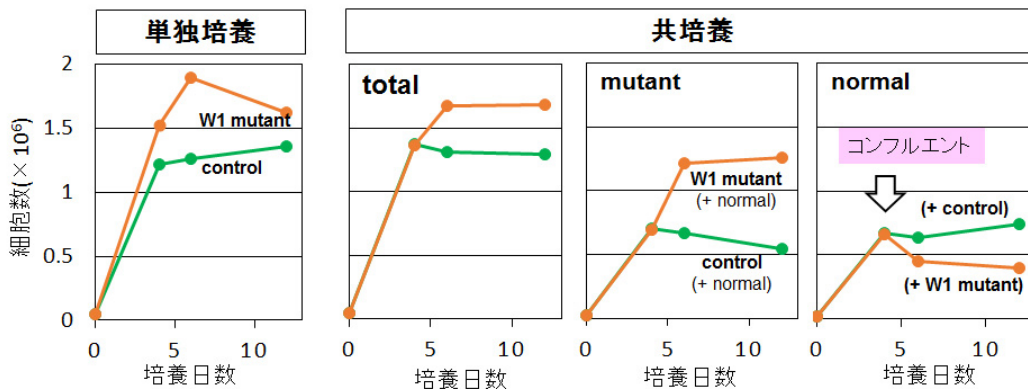


図3. NIH3T3 細胞における新規遺伝子変異による細胞競合  
スクリーニングによって得られた新規遺伝子 (仮に W1 と呼ぶ) を欠損した NIH3T3 細胞は、単独培養で正常細胞より良く増える。また正常細胞と共培養すると、コンフルエントに達した後 W1 変異細胞が増殖を続けるのに対し正常細胞の数が減少する。

さらに現在それらの遺伝子について遺伝子欠損 ES 細胞を作製し、キメラ胚を作製することにより、*in vivo*での細胞競合への関与を解析しているが、これまでに 1 つの遺伝子 (仮に *W1* と呼ぶ) について、その変異細胞が胎生 7.5 日から 8.5 日において胚の後方・基部や尿嚢特異的に細胞競合の勝者になることを見出している (図 4)。

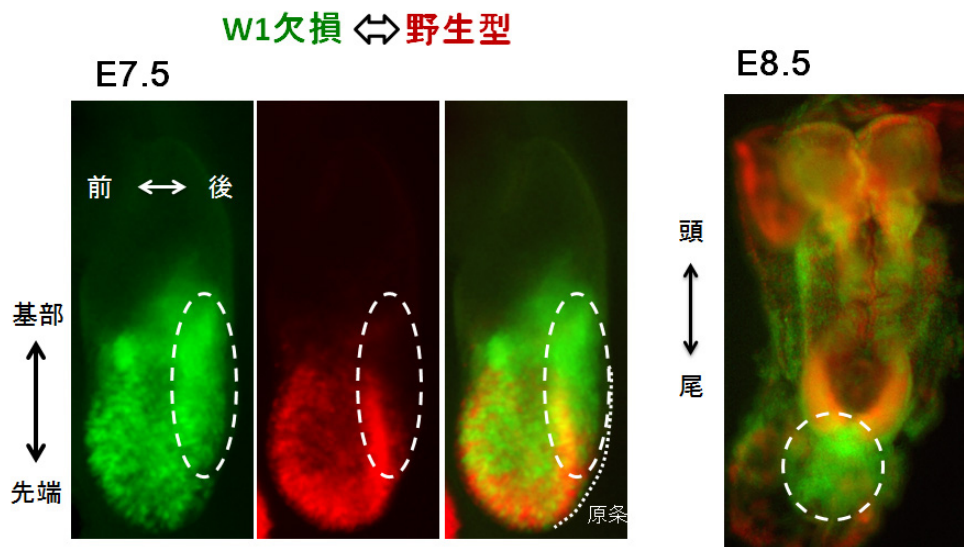


図4. マウス胚における新規遺伝子による細胞競合

新規遺伝子 W1 を欠損した細胞は、マウス胚で部位特異的に勝者細胞になる。胎生 7.5 日胚では、胚の後方・基部で勝者に、胎生 8.5 日胚では、胚の後端にある尿膜で強い勝者になっている。倍率：50 倍 (E7.5)、25 倍 (E8.5)。

これらの結果は、発生中の胚の中では、細胞競合機構は発生時期や胚内の部位によって異なることを示している。今後、他の候補遺伝子についても *in vivo*での細胞競合への関与を検討し、これらの新規遺伝子の欠損が細胞競合を起こす仕組み、さらに、胚における役割を解析することにより、発生の正確性を支える細胞間コミュニケーション機構を明らかにできることが期待される。

### 共同研究者

本研究の共同研究者は大阪大学生命機能研究科の橋本昌和、竹之下憂祐、東京大学理学系研究科生物科学専攻の岩崎渉、松井求、国立遺伝学研究所の豊田敦である。

### 文 献

- 1) Ota M, Sasaki H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development*. 2008 Dec;135(24):4059-69. doi: 10.1242/dev.027151. PubMed PMID: 19004856
- 2) Nishioka N, Inoue K, Adachi K, Kiyonari H, Ota M, Ralston A, Yabuta N, Hirahara S, Stephenson RO, Ogonuki N, Makita R, Kurihara H, Morin-Kensicki EM, Nojima H, Rossant J, Nakao K, Niwa H, Sasaki H. The Hippo signaling pathway components Lats and Yap pattern Tead4 activity to distinguish mouse trophoctoderm from inner cell mass. *Dev Cell*. 2009 Mar;16(3):398-410. doi: 10.1016/j.devcel.2009.02.003. PubMed PMID: 19289085
- 3) Hirate Y, Hirahara S, Inoue K, Suzuki A, Alarcon VB, Akimoto K, Hirai T, Hara T, Adachi M, Chida K, Ohno S, Marikawa Y, Nakao K, Shimono A, Sasaki H. Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr Biol*. 2013 Jul 8;23(13):1181-94. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.014. PubMed PMID: 23791731
- 4) Wada K, Itoga K, Okano T, Yonemura S, Sasaki H. Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers. *Development*. 2011 Sep;138(18):3907-14. doi: 10.1242/dev.070987. PubMed PMID: 21831922
- 5) Mamada H, Sato T, Ota M, Sasaki H. Cell competition in mouse NIH3T3 embryonic fibroblasts is controlled by the activity of Tead family proteins and Myc. *J Cell Sci*. 2015 Feb 15;128(4):790-803. doi: 10.1242/jcs.163675. PubMed PMID: 25588835

- 6) Sancho M, Di-Gregorio A, George N, Pozzi S, Sánchez JM, Pernaute B, Rodríguez TA. Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation. *Dev Cell*. 2013 Jul 15;26(1):19-30. doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.012. PubMed PMID: 23867226
- 7) Clavería C, Giovinazzo G, Sierra R, Torres M. Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature*. 2013 Aug 1;500(7460):39-44. doi: 10.1038/nature12389. PubMed PMID: 23842495
- 8) Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera Mdel C, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nat Biotechnol*. 2014 Mar;32(3):267-73. doi: 10.1038/nbt.2800. PubMed PMID: 24535568