

連載講座

ヒトを知るモデル動物としてのゼブラフィッシュ-4

多細胞システムを最適化し疾患発生を
予防する“細胞品質管理機構”の理解

石谷 太

Key words: ゼブラフィッシュ, 細胞品質管理機構, イメージング, エラー細胞, 細胞間コミュニケーション

近年の技術革新により、多細胞システムの構築過程においてはエラーが生じた細胞が頻繁に出現し、それらが疾患発症の原因となり得ることが明らかになりつつある。一方で、出現したエラー細胞を感知・制御し、組織の状態を最適に回復させる“細胞品質管理機構”が存在することもわかってきている。本稿では、生体内の多細胞集団のコミュニケーション解析と疾患モデリングに適したゼブラフィッシュを活用した、細胞品質管理機構の研究を紹介する。

I 発生過程ではエラー細胞が
頻繁に出現する

一般的には、動物の発生はゲノム情報に刻まれたプログラムに沿って粛々と進み、同一のゲノム情報を持つ受精卵は同一の発生プロセスをたどる、と考えられている。しかし、近年の技術革新により、その常識は覆されつつある。例えば、同じゲノム情報を持つ一卵性双生児であっても、その胚発生期において異なる部位で遺伝子変異細胞が生じており、その結果として、それぞれに異なる種類の変異モザイクを体内に内包することが明らかになりつつある^{1,2)}。また、マウス初期胚のイメージング解析によって、正常胚の発生過程において染色体異常細胞が多数出現することや³⁾、未分化なエピプラスト細胞集団において多能性因子の発現が低い低品質な細胞が出現すること⁴⁾も

報告された。このように、脊椎動物の発生プログラムはわれわれの想定とは異なり厳密でなく、エラー細胞が頻繁に生じることがわかってきた。

II エラー細胞の一部は生存してモザイクを形成し、疾患発症に関わる

当然ではあるが、胚発生時に生じたエラー細胞に由来するモザイクは、多くの疾患に関わる。例えば、PI3K/Akt/mTOR 経路の活性化変異を持つエラー細胞が脳においてモザイクを形成すると、てんかん症状を高確率で引き起こす。また、アルツハイマー病や自閉症などの神経疾患や糖尿病や高血圧などの成人病の患者の一部でも、胚発生期に生じた遺伝子変異細胞やエピゲノム異常細胞を起源とするモザイクが疾患発症に関与する可能性が示された⁵⁻⁹⁾。このように、胚発生過程ではゲノム・エピゲノム異常を持つエラー細胞が頻繁に生じ、それらから生じた病的なモザイクが多様な小児疾患・成人疾患に関与することが明らかになりつつある(図1上段)。しかしながら、これらの知見はゲノム解析などをベースとして得られたものであり、胚に生じたエラー細胞がどのようなプロセスを経て生存・増殖してモザイクを形成し、疾患を引き起こすのかはいまだ不明である。

Understanding the cell-quality-control machineries optimizing multicellular systems

Ishitani Tohru: 大阪大学微生物病研究所生体統御分野(〒565-0871 大阪府吹田市山田丘3-1)

0370-9531/04/¥500/論文/JCOPY

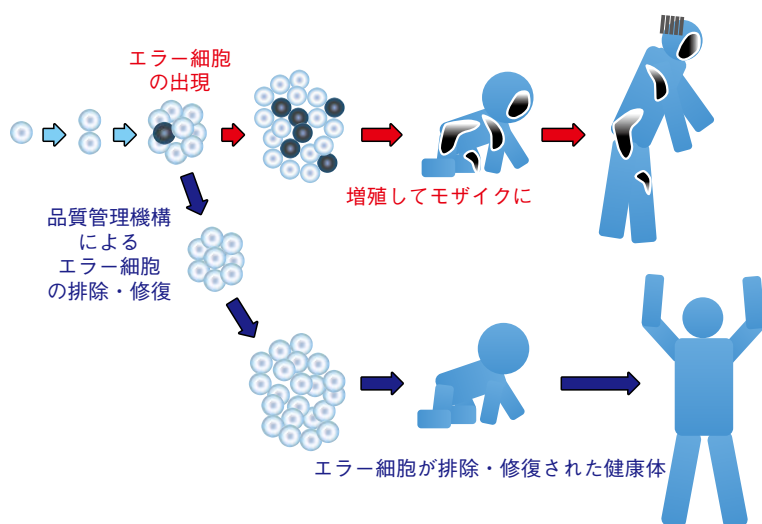


図 1 エラー細胞の出現と細胞品質管理機構による制御

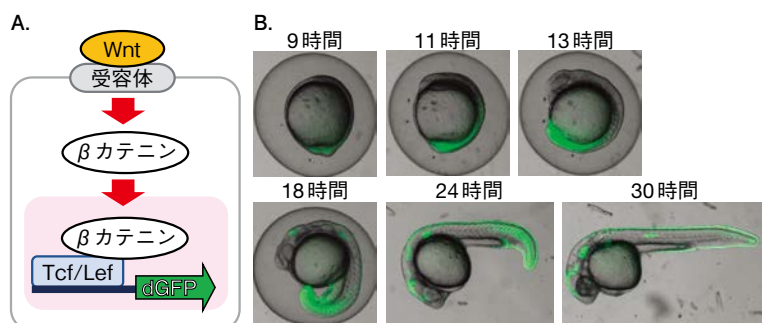


図 2 Wnt シグナルレポーターの構造 (A.) と受精後 9-30 時間後の Wnt シグナル動態 (B.)

Ⅲ 胚組織はエラー細胞の出現に抗う細胞品質管理機構を備える

筆者らは最近、ゼブラフィッシュのイメージング解析により、胚がエラー細胞を感知・排除し、胚組織の細胞品質を維持する“細胞品質管理機構”を備えていることを発見した。その経緯を以下に記述する。

筆者は、細胞運命制御シグナルである Wnt シグナルの機能と制御の研究を 25 年間継続して行っており、*in vivo* における Wnt シグナルの制御機構を理解するために、ライブイメージング解析に適したゼブラフィッシュ胚において Wnt シグナルの活動を可視化する系を構築した。Wnt シグナルは、細胞外リガンド分子を細胞が受容することで活性化し、細胞質中で安定化した β カテ

ニンタンパク質が核内移行して転写因子 Tcf/Lef と複合体を形成して標的遺伝子の転写を活性化し、これにより細胞の運命を制御する (図 2A)。筆者らは、転写因子 Tcf/Lef が結合するコンセンサス DNA 配列の下流に dGFP (不安定化 GFP) 遺伝子をつないだレポーターを作製し、これをゼブラフィッシュに導入することで、生きた胚における Wnt シグナルの活性動態を緑色蛍光に変換して可視化することに成功した¹⁰⁾ (図 2B)。また、不安定化エメラルドルシフェラーゼによる生物発光を利用した、より高感度で時間分解能の高い新たなシグナルレポーターの作製にも成功し、ゼブラフィッシュ胚における定量的リアルタイム Wnt シグナルイメージングを実現した¹¹⁾。

Wnt シグナルは、発生過程で特定の組織領域において活性化あるいは不活性化されることで、

組織にパターンを誘導したり，幹細胞・前駆細胞の増殖・分化を空間的に制御したりすることがよく知られているが，筆者らはこれらの高感度レポーターを用いた解析により，正常なゼブラフィッシュ胚において Wnt シグナルが異所的に活性化あるいは不活性化した異常な細胞が頻繁に自然発生することを見いだした。このような異常細胞の出現部位や数は個体ごとに異なっており，発生プログラムによって生じたものではなく，シグナル伝達にエラーが生じた細胞であると考えられた。また，興味深いことに，エラー細胞の出現は一過的なものであり，場には不適合なシグナルエラー細胞が出現すると 30 分～数時間の間に細胞死を起こして消失することもわかってきた。筆者らは，この観察結果から「動物胚では Wnt シグナルエラーを起こした細胞が頻繁に生じるものの，胚が積極的にエラー細胞を排除することで発生プログラムの進行を守っているのではないか」という仮説を立てた。

この仮説を検証するために，筆者らは任意のタイミングで胚に蛍光ラベルした少数のシグナル異常細胞を誘導する系（図 3）を構築し，人為的に誘導したエラー細胞に対して胚組織がどのように対応するかを解析した。興味深いことに，Wnt シグナル異常活性化細胞は Wnt シグナルが低い領域に導入されたときには細胞死を起こすが，シグナルが高い領域に導入された場合は細胞死を起こさないことや，Wnt シグナル異常不活性化細胞は Wnt シグナルが高い領域に導入されたときには細胞死を起こすが，シグナルが低い領域に導入

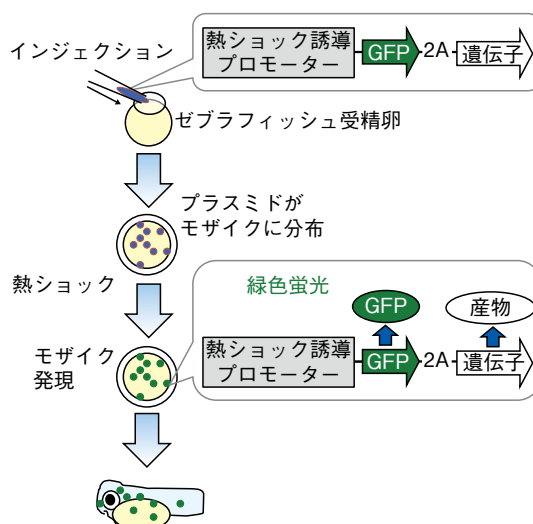


図 3 少数の異常細胞を任意のタイミングで誘導する系
導入する遺伝子を変えることで任意の異常を誘導可能である。

された場合は細胞死を起こさないことがわかってきた。すなわち，周辺細胞とのシグナル活性の差の大きさがシグナル異常細胞の細胞死のトリガーとなることがわかってきた。

更に，Wnt シグナルエラー細胞を蛍光ラベルしてセルソーターで回収し，トランスクリプトーム解析を行うことで制御因子を探索すると共に，イメージングを駆使してシグナルエラー細胞の動態解析を行った結果，詳細なメカニズムを明らかにすることができた。具体的には，正常胚において Wnt シグナルが細胞膜上のカドヘリンを安定化すること（図 4 上段），自然発生した，あるいは人為的な誘導によって生じた Wnt シグナルエ

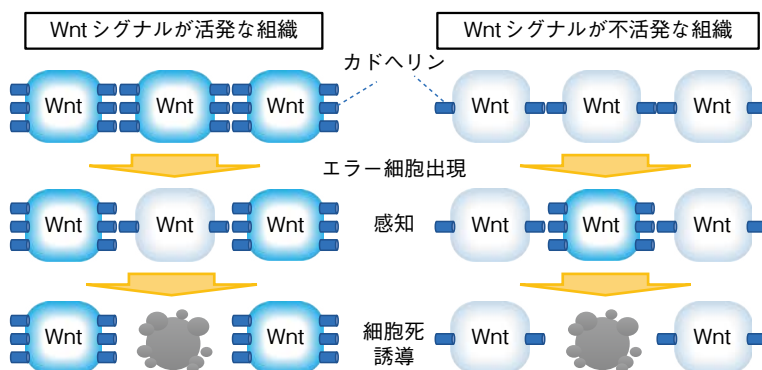


図 4 Wnt シグナル制御破綻細胞を感知・排除する細胞品質管理機構

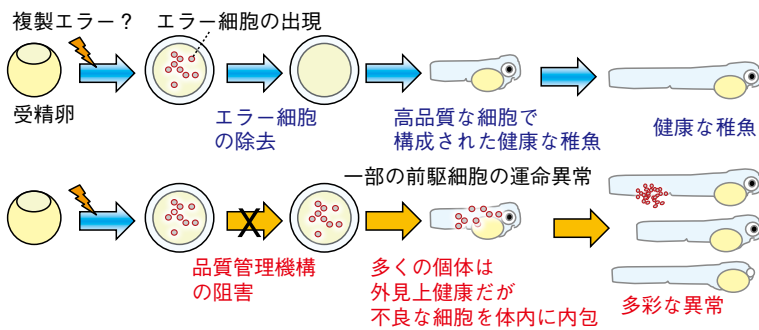


図 5 エラー細胞の排除に失敗した個体は成長に伴って多彩な異常を示す

ラー細胞ではカドヘリン量に変化し(図4中段)、隣接正常細胞とのコミュニケーションを経てシグナルエラー細胞におけるカドヘリン量異常が感知され、結果としてエラー細胞において転写制御因子 Smad の活性化とそれに伴う活性酸素の過剰産生、細胞死抑制因子 Bcl2 の発現低下が起き、最終的にエラー細胞がアポトーシスを起こして組織から除去されて細胞集団の Wnt シグナル活性が最適化されることを明らかにした¹¹⁾。このように、細胞集団内に生じたシグナルエラー細胞を感知・排除する細胞品質管理機構の存在が明らかになった。

また、このシグナルエラー細胞の排除機構を人為的に阻害すると、自然発生した Wnt シグナルエラー細胞が胚に蓄積し、胚組織の細胞運命制御が乱れ、組織前駆細胞の異所的な形成などが誘導された(後方に作られるべき脊髄の神経前駆細胞が脳の前方領域に生み出されてしまうなど)。そして、このようなごく一部の細胞の異所的形成という軽微な異常であるため、多くの個体は孵化時には外見上正常であるが、その後、個体の成長に伴って多彩なモザイク状の異常(一部の組織の局所的過形成や異所的形成、腫瘍形成など、個体ごとに異なる形態異常)を生じた(図5)¹¹⁾。

更に、継続的な解析により、ゼブラフィッシュ胚では Wnt シグナルエラー細胞のみならず、染色体分配異常細胞や DNA 損傷細胞、ヒストン修飾異常細胞など多様なエラー細胞が自然発生し、それらの多くが時間経過と共に細胞死を起こして胚組織から排除されることを発見した。また、胚に出現したこれらエラー細胞の多くが、Wnt シグナルの異所的活性化を引き起こし、前述のカド

ヘリンを介したメカニズムによって排除されることも見いだした(投稿準備中)。

一方で、注目すべきことに、哺乳類胚においても類似の細胞品質管理機構が機能することがわかりつつあり、マウス初期胚エピブラストにおいて染色体異常細胞や多能性因子の発現の低い細胞、転写因子 Myc の発現量が少ない細胞が出現すると、これらの細胞が隣接細胞とのコミュニケーションを経て排除される^{4,12)}ことが報告された。これらの事実を合わせて考えると、動物胚は種を超えて保存された細胞品質管理機構を備え、突発的に生じたエラー細胞を積極的に除去しているのはまちがいないだろう。そして、前述したヒト患者でみられる胚細胞由来のモザイクは、おそらく、胚の細胞品質管理機構による排除を回避したエラー細胞を起源として発生した、あるいは、細胞品質管理機構の破綻の結果として生じたのではないかと推測される。

IV 多細胞システムを最適化する多様な細胞品質管理機構

このような“同種の細胞で構成された集団に適応度の低い細胞が出現すると隣接細胞群がこれを感じ・排除する現象”は“細胞競合”と呼ばれ、多細胞システムの最適化を担う新たな分子細胞機構として近年注目されている¹³⁾。細胞競合はもともと、ショウジョウバエ成虫原基においてリボソーム変異細胞と正常細胞を人為的に共存させると、変異細胞が正常細胞によって細胞死を誘導されて駆逐される現象として、Morata 博士らによって発見された¹⁴⁾。その後、極性崩壊細胞や Myc 低発現細胞など、細胞競合によって細胞死を誘導さ

れる新たな変異・異常が多数発見され、また、哺乳類培養上皮やマウス個体においても細胞競合が起こることも明らかにされた^{13,15)}。しかし、人為的に生じさせた異常細胞が引き起こす細胞競合についての理解が進む一方で、生理的な細胞競合の研究は進んでいなかった。そのようななか、前述のように、動物胚の細胞品質管理に細胞競合が利用されていることがわかってきた。

また、エラー細胞の排除の方法は細胞死のみにとどまらない。例えば、哺乳類上皮に生じた Ras 異常活性化細胞は、隣接正常細胞とのコミュニケーションを経て上方向 (apical 方向) へ押し出される¹⁵⁾。筆者らもゼブラフィッシュの稚魚皮膚において、同様の機構によって Ras 異常活性化細胞の対外への排除が起こることを確認した¹⁶⁾。更に筆者らは、がん抑制遺伝子 *p53* に変異を持つ稚魚皮膚、あるいは DNA ダメージが蓄積した稚魚皮膚はエラー細胞排除活性が低下しており、Ras 異常活性化細胞を誘導すると排除されずに皮膚にとどまって、更に炎症性サイトカインを分泌して隣接正常細胞の増殖活性を変化させて腫瘍を形成することを発見した(投稿中)。この事実は、上皮に生じたエラー細胞を体外へはじき出す細胞品質管理機構が一種の“がん抑制機構”として働いている可能性と、上皮環境の変化による細胞品質管理機構の活性低下が、がんの初期発生の起動に関わる可能性を示している。

多細胞システムを最適化する細胞品質管理機構には、エラー細胞の排除を伴わないものもある。例えば、ゼブラフィッシュの神経管のイメージングによって前駆細胞がソーティング(細胞移動によって性質の近い細胞同士で集まること)を起こすことで、神経管の細胞配置が最適化されることが示された¹⁷⁾。まず、神経管の形成過程においては、その背腹軸に沿って適切なタイプの運動神経細胞や介在神経細胞の前駆細胞が配置されるが、その形成過程初期においては配置が正確ではなく、誤った場所に一時的に配置される細胞も多いことが明らかになった。しかし、背側に配置されるべき前駆細胞と腹側に配置されるべき前駆細胞は異なるレベルでカドヘリンファミリーのタンパク質を発現しており(背側に配置されるべき細胞

は N カドヘリンを高発現し、腹側に配置されるべき細胞ではその発現レベルが低くなるなど)、その結果、前駆細胞群はカドヘリンの量を認識し合って近い量の同種カドヘリンを発現する細胞同士が集まるようになり、最終的に適切な場所に各前駆細胞が配置されることが示された¹⁷⁾。このように、生体内の細胞集団がその構築、あるいは恒常性維持の過程で、不適切な状態の細胞を認識し、細胞間コミュニケーションを介して集団を最適化していることがわかりつつある。

また、この細胞集団最適化を担う細胞品質管理機構が、正確な発生・組織構築のみならず、疾患リスクの低減にも重要な役割を果たすこともわかり始めており、今後、細胞品質管理機構が発生物学・疾患生物学において新たな視点となる可能性も大いに期待できる。しかしながら、細胞品質管理機構の研究はいまだ黎明期にあり、そのメカニズムはほんの一部しかわかっていない。前述のとおり、動物組織の発生・維持過程では多様なエラー細胞が出現し、一部のエラー細胞は共通の細胞品質管理機構によって感知・排除されることがわかりつつあるものの、どのタイプのエラー細胞に対してどのような細胞品質管理機構が働くのか、そして、それぞれの感知・排除のメカニズムにどこまで共通性があるのか、は不明である。エラー細胞が生じるメカニズムも全く不明である。現時点では、複製エラーなどが想定されているが、推測の域を出ない。今後はこれらの未解決課題に取り組む必要があるだろう。

加えて、細胞品質管理機構および細胞競合による組織最適化にどのような生物学的意義があるのかもほとんど理解が進んでおらず、現時点では前述した“発生プログラムのエラー修復”や“発がん抑制”などが報告されているが、今後、他の成人疾患の発症抑制や老化抑制など、多様な生態防御現象への関与が明らかになってくるものと思われる。

V ゼブラフィッシュは発生細胞生物学および先天性疾患の解析に最適なモデルである

前述のような細胞品質管理機構を発見できたの

は、ゼブラフィッシュのモデルとしての特性によるところが大きい。ゼブラフィッシュは、体外発生する小型の脊椎動物であるため、個体の状態を把握しながらその体内の分子・細胞動態、更には細胞間コミュニケーション動態を解析できる“*in vivo* 細胞生物学”に最適なモデル動物と言える。従来の *in vivo* 細胞生物学の主要なモデルであるショウジョウバエと比べても、ゼブラフィッシュの細胞のほうずっと大きいために、イメージングのみならずオミクス解析も比較的容易に実行可能という意外な利点もある。また、発生が早く（受精後 3 日で孵化し、5 日程度で泳いで餌を食べ始める）、ヒト疾患に関わる遺伝子の 70% 以上が保存され、かつ、個体レベルの解析に適した脊椎動物であるため、発生期に生じた異常に起因する疾患（先天性疾患や前述のモザイクに関連する疾患など）のモデリングに適している。事実、最近筆者らは、希少先天性疾患のゼブラフィッシュ稚魚におけるモデリングに成功し、CDK8 や CDK19 といった遺伝子の *de novo* 変異が疾患発症を引き起こす機序の一端解明に成功した^{18, 19)}。そして、現在筆者らは、細胞品質管理機構とヒト疾患（先天性疾患およびモザイク関連疾患）の関連の解析に着手している。胚の細胞品質管理機構の破綻とヒト疾患の関連の実験的証明はいまだになく、また、生体内に突発的に生じるエラー細胞が疾患を生じさせる初期のプロセスは不明であるが、ゼブラフィッシュの特性を活かして、これらの課題に取り組みたいと考えている。

おわりに

従来の発生生物学は組織・個体をどのようにして作り上げ、細胞を更新しながら維持し、そしてどのように再生させるかについての研究が進められ、それらを制御する分子基盤の大意が明らかにされた。これに対し、本稿で紹介した細胞品質管理機構研究は“動物の発生プログラムの進行において頻繁に生じるエラー”とそれらを修復する細胞間コミュニケーション機構、そして、その破綻と疾患の関連を問う研究であり、発生研究・疾患研究に新たな道を切り拓くと確信している。また、多細胞システムを構成する細胞群がどのよう

に互いの状態を認識し合いながら集団を最適化するか、という生命科学の根本的な疑問にも迫れるだろう。

筆者は今後、この“発生細胞生物学と疾患研究を融合させた細胞品質管理機構の研究”を継続、発展させると共に、ゼブラフィッシュの研究モデルとしてのポテンシャルを高めていきたいと考えている。また、われわれは多様な医歯薬生命科学の研究者と共同研究を積極的に行っており、特に疾患モデリングに力を入れている。もし本稿を読まれてゼブラフィッシュに興味を持たれた研究者がいらっしゃれば、是非ご遠慮なくお声がけいただきたい。

●文 献

- 1) Jonsson H, Magnusdottir E, Eggertsson HP et al : *Nat Genet.* **53** : 27–34, 2021
- 2) Ju YS, Martincorena I, Gerstung M et al : *Nature.* **543** : 714–718, 2017
- 3) Mashiko D, Ikeda Z, Yao T et al : *Sci Rep.* **10** : 854, 2020
- 4) Hashimoto M, Sasaki H : *Dev Cell.* **50** : 139–154, 2019
- 5) Machiela MJ, Chanock SJ : *Semin Hematol.* **50** : 348–359, 2013
- 6) Poduri A, Evrony GD, Cai X, Walsh CA : *Science.* **341** : 1237758, 2013
- 7) Berko ER, Suzuki M, Beren F et al : *PLoS Genet.* **10** : e1004402, 2014
- 8) Morimoto Y, Ono S, Imamura A et al : *Hum Genome Var.* **4** : 17032, 2017
- 9) Wei W, Keogh MJ, Aryaman J et al : *Genet Med.* **21** : 904–912, 2019
- 10) Shimizu N, Kawakami K, Ishitani T : *Dev Biol.* **370** : 71–85, 2012
- 11) Akieda Y, Ogami S, Furuie H et al : *Nat Commun.* **10** : 4710, 2019
- 12) Sancho M, Di-Gregorio A, George N et al : *Dev Cell.* **26** : 19–30, 2013
- 13) Bowling S, Lawlor K, Rodriguez TA : *Development.* **146** : dev167486, 2019
- 14) Morata G, Ripoll P : *Dev Biol.* **42** : 211–221, 1975
- 15) Hogan C, Dupré-Crochet S, Norman M et al : *Nat Cell Biol.* **11** : 460–467, 2009
- 16) Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R et al : *Curr Biol.* **30** : 670–681, 2020
- 17) Tsai TY, Sikora M, Xia P et al : *Science.* **370** : 113–116, 2020
- 18) Uehara T, Abe K, Oginuma M et al : *Sci Rep.* **10** : 17575, 2020
- 19) Zarate YA, Uehara T, Abe K et al : *Genet Med.* **23** : 1050–1057, 2021