

## 研究課題別評価

1. 研究課題名 :モルフォゲンシグナル分子の濃度調節による病的組織の修復

2. 研究者氏名 :安達 (山田) 卓

3. 研究の狙い :

<目標> がんの自然治癒という立場からみた生体のもつ一つの戦略として、アポトーシスの誘導を挙げることができる。アポトーシスとは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子に傷害をもった細胞は、がん化する前にアポトーシスを起こして取り除かれる、という仕組みである。この現象に代表されるように、生体は異常組織を未然に取り除く積極的な性質をもっていることが知られるが、いかなる種類の異常細胞も、同様な方法で取り除くことができるのかどうか？という問題に答えるための知識は、数年前までほとんど得られていなかったと言って良い。しかしこの問題の重要性は、発生生物学上の1テーマとしての意義に限定されず、体細胞突然変異に起因する様々な疾患の予防・治療への発展や、自然免疫メカニズムの延長線上という観点からも注目されるべきである。本研究では、このような観点における研究の端緒として、位置情報を与えるモルフォゲンのシグナル強度が異常となった細胞が、如何にして取り除かれるか？についての解明を目指した。

<目的> 未分化な組織が特殊化した形態や機能をもつ組織へと発展するための初期段階には、モルフォゲンと呼ばれる細胞外物質からの刺激を受けることが必要である。モルフォゲンは未分化な組織のごく限られた部域で産生されて、それが組織全体へと拡散することによって作られる濃度勾配が、各細胞の分化方向を運命付ける位置情報をもたらすと考えられている。もしもモルフォゲンの濃度勾配が崩れると、あるいはモルフォゲンが惹き起こすシグナル伝達強度が強まったり弱まったりして正常値から外れると、組織は異常形態を形成してしまうが、一方で組織には異常発生を認識し、アポトーシスによってそれを破壊しながら正常形態へと修復していく機構が備わっている。本研究課題では、このような状況のモデルとしてショウジョウバエの翅におけるモルフォゲン Dpp (Decapentaplegic)を扱い、異常形態の修復過程が包含する細胞応答と分子機構の探求を試みた。

<解決すべき問題> ショウジョウバエ翅原基上にモルフォゲンシグナルである Dpp シグナルの異常が起きた細胞を作り出す際に、組織全体が異常になった時と、正常組織の中に異常細胞が現れた時の両方をそれぞれ作り出してアポトーシス誘発状況を比較し、それらが別現象として捉えられるかどうかの検証が必要であった (Hh シグナルに対する依存性の違いから最終的に別現象という結論に到達している)。またアポトーシスシグナルとして、ストレス応答性のシグナル伝達因子 JNK の活性を検出することを考えた。JNK のシグナルが一部のアポトーシス誘導に必要であるという事実は、現在では常識化したと考えられるが、本研究が開始された当初、それに対する認識は高いものではなかった。そこで、従来からアポトーシス誘導分子として知られる Caspase-3 の活性と JNK 活性を同時に検出して、両者を比較検討した。

<問題解決へのアプローチ> 結果から見ると、異常細胞を取り除くための非自律的細胞死

「Morphogenetic Apoptosis」の発見には、Caspase-3 活性よりも JNK 活性を観察する事が決定的に重要であった。JNK 活性を見るためには、JNK 活性化によって転写誘導される事が知られる遺伝子 puckerd の発現を検出し、またそれが JNK 活性化因子 Hemipterous (=MKK7) の突然変異体バックグラウンドでは消失することを、実験毎に一つ一つ確認した。一方、Caspase-3 の活性化を見るために、現在では市販されているが当時は入手困難であった抗 Human Cleaved Caspase-3 抗体の譲渡を、IDUN Pharmaceutical 社 (アメリカ) と交渉の上で受けることができた。

#### 4. 研究結果：

Dpp シグナルは、本来は翅原基の中央部でシグナル強度が高い。これを低くする操作を行うと、翅原基の中央部は異常な発生運命 (翅原基の周辺部としての運命) をたどるが、それだけでなく、この時細胞死誘導性のタンパク質リン酸化酵素 JNK の活性化が起きて細胞が除去される。周辺細胞のうち、なぜ翅原基の中央部にあるものだけが除去されるのかを説明するために、中央部にだけ存在するもう一つのモルフォゲン Hh (Hedgehog、短距離拡散性) に着目した。通常中央部では常に Dpp シグナルも Hh シグナルもどちらも高く、周辺部ではどちらも低い。そこで、中央部で Dpp シグナルが低くなった状況に加え、さらに Hh シグナルも低くなった状況をもたらしたところ、細胞死は完全に抑圧された。つまり複数のモルフォゲンシグナルのバランスが乱れるとアポトーシスが起きるようにプログラムされており、それが異常細胞の除去につながっていることが示された。

一方、野生型の組織の中に Dpp シグナル伝達因子突然変異体のクローンを作成すると、突然変異体クローンと周辺の野生型細胞との境界線を中心として、その両側 (クローン内外) で細胞死誘導性のタンパク質リン酸化酵素 JNK の活性化が見られる。つまり本来緩やかなスロープを作るべきモルフォゲン活性勾配の中に大きな段差が生じると、段差の両側の細胞が段差の存在を認識して、その細胞から順次遠方の細胞へと JNK を活性化して細胞死を導き始め、最終的に突然変異体クローンを完全に除去して、緩やかなモルフォゲン活性勾配を再び出現させる。この現象は、体細胞突然変異などによって生じた異常細胞を除去し、正常形態形成を保証するために獲得されたメカニズムと考えられ、Morphogenetic Apoptosis と名付けられた。

この現象、Morphogenetic Apoptosis は、異常レベルのモルフォゲン刺激を受容したために、誤った発生運命を進行させていく悪性のクローンを組織内で検出し、除去するためのメカニズムであり、体細胞突然変異に起因する異常形態の自然治癒には必須の細胞応答で、正常発生を保証していると考えられる。しかし Morphogenetic Apoptosis の存在意義は、単にモルフォゲン活性勾配のスロープの修復にとどまらず、生体内に発生する様々な異常細胞集団 (例えば、環境汚染物質に曝露された細胞や発癌初期における変異細胞クローンなど) の検出と排除にも使われている可能性がある。今後はそれら、Morphogenetic Apoptosis が活用される生体内現象や疾患を広く探索するほか、如何なる分子が正常細胞とのコミュニケーションに用いられ、細胞死シグナルの発生と伝播に関与するのかなどの問題について取り組み、研究を進展させていく計画である。

#### 5. 自己評価：

モルフォゲンシグナルのレベルが異常となった細胞がいつのまにか除去される現象自体はかつてから知られていたが、組織内部にはもともとモルフォゲンシグナルのレベルが高い細胞と低

い細胞が存在しているのに、なぜ異常レベルの細胞の除去が可能になるのかは問題視されたことがなかった。一言で言うと、その方法について調べたのが本研究である。研究を開始して直ちに判明した事は、モルフォゲンシグナルレベルが異常になった細胞のみが徐々に細胞死していく(取り除かれていく)のではなく、レベルの非常に異なる細胞が隣接すると、両者が異常事態を認識して細胞死を起こし、それが繰り返された結果、異常な細胞を取り除くことが可能となる、という全く予想されたこともないメカニズムであった。しかし、それはモルフォゲンシグナルレベルが高い細胞と低い細胞の両方が存在している状況下で異常細胞を発見するには、この方法以外には有り得ないのではないかと、とらけの極めて合理的なメカニズムであり、さらに、生体内に起こり得る様々な種類の異常細胞の除去においても適用されている可能性がある、言わば多くの普遍性が期待される非常に意義の大きいしくみの発見であったと考えている。

しかし、研究成果公表に至るまでの流れとその後の発展の困難さには、正直な所感として満足できない面が多々あった。まず、この研究成果の斬新さ、意義、面白さ、発展性、そういった実質面がレビューワーからまった評価されず、多くの研究者が目にするメジャー・ジャーナルへの掲載ができなかったのは残念な体験であった。レビューワーからは、あるいは逆に評価されたのかも知れないが、膨大な時間と労力を要する要求を突き付けられ、それに正面から応えるべくこちらが1年以上苦闘している間に、結論が似かよったシンプルな実験結果が大御所からハイレベルジャーナルに出された。実はこれは長引くリバイスの過程から大いに危惧していたことで、論文が受け入れないのならジャーナルではなく、インターネット上で私的に論文を公開してプライオリティーを確保できないか、とまで半ばノイローゼ的に考えたりもしたが、最終的にはそのような非常識な行いをする度胸ももつことはできなかった。今冷静に振り返ってみて、提出する論文にはなるべくスキを見せない細心の注意が必要であることを戒めとして学ぶことができたし、尋常でないリバイスを求められた時に打つべき次の手段を予め考えておく入念さなど、研究とは別次元の技術が、現実問題として重要であることも学んだ。上記の競合論文の内容が、我々のものとは随分異質であることを、せめて幸いに思いたいと考えている。

次にこの研究は、1997年ごろに私が日本で行っていた研究が端緒となり、さらにアメリカへ留学中に自由な発想のもとに始めさせてもらった実験に直接由来している。留学中、日本からサラリーをもらっていたためにそのような自由を与えて下さった留学先の教授 Michael B. O'Connor 氏に謝意を表すべく、彼に Corresponding Author となっていた。しかし、自分でジャーナルと交渉しない分、最終的に論文の内容やエディタへの対応に必ずしも満足できない面が残ってしまったことは事実である。謝意と責任所在はもちろん別件であり、自らの責任で行った研究はやはり自らが Corresponding Author になるべきもの、と今は考えている。

最後に研究そのものの内容についてであるが、Morphogenetic Apoptosis を誘発・伝播する細胞間シグナルが何であるか、この最も単純で大きな興味を解決することが、未だに全くできていないことが極めて残念である。これをスクリーンする方法にいくつか手出ししてみたが、簡単に言うと「異常細胞が残ってしまう突然変異体(サプレッサー)」というのがそもそも致命的に弱く、突然変異誘発が成功しても系統化できないというジレンマが生じて研究が持続できない。そこで、従来型のサプレッサー突然変異体スクリーンとはまったく異なるアイデアを考え出して取り組むべき問題

である、と現在その方法を模索中である。

以上のように本研究の成果には、極めて満足できる面と全くそうでない面との両方があるため、そうでない面の今後の成果を切望して、私自らの自己評価点を5段階評価の「3」としたいと考えている。

#### 6. 研究総括の見解：

動物の個体がその多細胞体制を構築し維持する上で、不必要あるいは異常となった細胞を排除する現象は古くから知られ研究されてきた。本研究はこの課題に独創的に取り組み、異常細胞を排除するための非自律的細胞死を発見し、morphogenetic apoptosis と定義付け、その仕組みの概要を明らかにした。この成果は研究の更なる発展を担保すると共に、傷害やがんの克服にも応用しうる新技術の開発にも結びつくものとして高く評価できる。ただ、個人研究であることを深く自覚し、論文発表の際の correspondence にはより責任を持つことが望まれる。

#### 7. 主な論文等：

##### 主な論文

1. Adachi-Yamada, T.; puckered-GAL4 driving in JNK-active cells. *Genesis*, 34, 19-22 (2002).
2. Adachi-Yamada, T. and O'Connor, M.B.; Morphogenetic apoptosis; A mechanism correcting discontinuities in morphogen gradients. *Dev. Biol.*, 251, 74-90 (2002).

##### 口頭発表

1. 安達 卓, Michael B. O'Connor Morphogenetic Apoptosis: モルフォゲンシグナル勾配の不連続を修復する細胞死 .第 25 回日本分子生物学会年会 (2002) 横浜 .
2. Adachi-Yamada, T. and Michael B. O'Connor.: Morphogenetic Apoptosis: a mechanism for correcting discontinuities in morphogen gradients. *Keystone Symposia* (2003) Keystone, USA.
3. 安達 卓, Mark Stapleton, Michael B. O'Connor :ショウジョウバエの Dpp シグナル抑制因子 / アポトーシス誘導因子としての *Taip6* .日本発生生物学会第 36 回大会 (2003) 札幌 .
4. 春本 敏之, 上田 龍, 西郷 薫, 安達 卓 :ダイオキシンレセプターのショウジョウバエホモログ *Spineless* の活性化が導くアポトーシスの 性質について .日本発生生物学会第 36 回大会 (2003) 札幌 .
5. Adachi-Yamada, T.: Roles of morphogenetic apoptosis during imaginal disc development .第 2 回日韓ショウジョウバエ シンポジウム (2003) 東京 .
6. 春本 敏之, 安達 卓 Molecular basis of distance-dependent variation of nonautonomous apoptosis mediated by by Ras .日本ショウジョウバエ研究会第 6 回研究集会 (2003) 東京 .
7. 大庭圭介, 春本敏之, 安達 卓 :モルフォゲン Dpp のシグナルレベルの異常が誘導する細胞死のメカニズム .第 26 回日本分子生物学会年会 (2003) 神戸 .
8. Harumoto, T. and Adachi-Yamada, T.: Distance-dependent variation of apoptotic responses caused by activated Ras in *Drosophila* wing. *Keystone Symposia* (2004) Snowbird, USA.