

博士論文  
令和 5 年度

細胞外小胞の形成が細胞脱落の実行を駆動する

京都産業大学大学院  
生命科学研究科 生命科学専攻  
博士後期課程 3 年  
学生証番号 187112  
氏名 吉良 彰人

## ○目次

1. 要旨	・・・4
2. 序論	・・・5
3. 略語表	・・・7
4. 材料及び方法	・・・8
4-1. 細胞培養	
4-2. ショウジョウバエの遺伝型、維持管理	
4-3. プラスミド	
4-4. タイムラプス撮影	
4-5. ショウジョウバエ蛹表皮の解析	
4-6. 免疫染色およびその他の染色法	
4-7. 電子顕微鏡による解析	
4-8. タイムラプス画像の定量化、定量化のための細胞押出における各工程の定義	
4-9. 画像解析ソフトウェアを用いた定量方法	
4-10. 統計分析	
5. 結果	・・・13
5-1. 脱落細胞は部分的に小胞化し、その小胞は隣接する細胞に貪食される	
5-2. 脱落細胞の PS の露出による小胞形成は脱落の実行に重要な役割を果たす	
5-3. 脱落細胞における小胞形成の普遍性と生体内での役割	
5-4. 脱落細胞が形成する小胞は、マイクロベシクルの形成機構を用いて形成される 一方、アポトーシス小体の特徴を持つ	
5-5. 脱落細胞の EV 形成は隣接細胞の侵入を介して、細胞脱落を促進する	
6. 考察	・・・19
6-1. 本研究で得られた知見のまとめと意義	
6-2. 脱落細胞が形成する EV の特徴と生理作用	
6-3. アクチン動態と EV 形成の関連	
6-4. 脱落細胞での EV 形成が細胞脱落の実行を駆動する	
6-5. EV 形成における PS 露出の役割	
6-6. 今後の方向性：細胞脱落の実行機構の破綻が組織の恒常性に及ぼす影響	

7. 参考文献	• • • 23
8. 謝辞	• • • 27

## 1. 要旨

上皮組織では細胞のターンオーバーが高頻度でおこっており、絶えず細胞分裂により新たな細胞が供給されると共に、同等数の不要な細胞が除去されている。上皮細胞が組織から除去される細胞の終焉様式は「細胞脱落」と呼ばれる組織からの離脱である。細胞脱落は、隣接細胞との相互協調作用によって実行され、不要または有害な細胞及び細胞死をおこした細胞を除去することで組織の細胞数の調節など恒常性の維持に重要な役割を果たしている。しかし、細胞が組織からどのようにして離脱するか、すなわち細胞脱落の実行機構は、未だ不明な点が多く残されている。

私は、アポトーシス細胞の脱落の実行機構の解析を行い、脱落するアポトーシス細胞が細胞外小胞を形成することで組織からの離脱が駆動されるという、動物種を越えて保存された細胞脱落の実行機構を明らかにし、本論文においてこれを報告する。

まず私は、哺乳類上皮培養細胞とショウジョウバエの生体上皮における細胞脱落において、脱落細胞が細胞外小胞を形成すること、及び、この小胞形成は、細胞が脱落する方向とは反対側の部位で局所的におこることを見出した。続いて、脂質スクランブラーゼの働きによるホスファチジルセリンの細胞膜脂質二重層の外層への局所的露出が脱落細胞での小胞の形成に関与していることを示した。そして、この過程を阻害すると、脱落細胞が組織から離脱するのに長時間を要すること、及び、組織の恒常性が妨げられることがわかった。さらに、この細胞外小胞は、細胞外小胞の1つであるマイクロベシクルの形成機構と同様の機構で担われていること、及び、一方で、アポトーシス小体の特徴も持つことを明らかにした。最後に、この細胞外小胞の形成は、隣接細胞が侵入するスペースを作り出すことで細胞脱落を促進することを強く示唆した。

本研究は、これまでアクチン-ミオシンの動態によって説明されてきた細胞脱落の実行機構に、脱落細胞の細胞外小胞形成という新規のプレイヤーが普遍的に関与することを示し、細胞膜の動態が、脱落細胞と隣接する細胞の挙動を連動させることにより、細胞脱落の実行に重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究での知見を用いることで、生体内で細胞脱落の実行を妨げることが可能になると考えられ、今後、細胞脱落の実行の異常が腸炎などの疾患をもたらすかを解析することが可能になる。また、本研究は、古くからその現象は知られながらも生体内での作用が明らかでなかった、アポトーシス小体の生理的意義を提示した。



## 2. 序論

細胞同士が緊密に結合している上皮組織において、日常的に多くの不要または有害な細胞及び細胞死をおこした細胞が、組織の恒常性を破壊させることなく、除去されている。細胞脱落は、細胞が組織から離脱して除かれる細胞の終焉様式であり、死細胞や、がん細胞、あるいは細胞競合において敗者となった細胞などを除去することで、組織の細胞数の調節や恒常性を維持するために不可欠な役割を担っている<sup>1-3</sup>。この細胞脱落は、脱落する細胞と、脱落する細胞に隣接する細胞との相互協調作用によって実行される点が特徴であり、血球細胞などの浮遊細胞の細胞終焉と比較して、細胞社会における、より社会的な細胞終焉と位置づけることができる。細胞脱落は、一連の様々なプロセスを経て実行され、脱落細胞は、隣接細胞との接着を解消し、脱落細胞と隣接細胞それぞれの細胞骨格分子のリモデリングを介して、細胞層から離脱する<sup>4-12</sup>。

このような、細胞の細胞層からの離脱である細胞脱落は、アポトーシスをおこした細胞が脱落する死細胞脱落、細胞が生きたまま脱落する生細胞脱落、癌細胞が正常細胞に隣接する状況下で脱落する癌細胞脱落に大別することができる。死細胞脱落では脱落細胞から sphingosine-1-phosphate (S1P) が分泌され、隣接する細胞が S1P のレセプターである Sphingosine-1-phosphate receptor 2 (S1P<sub>2</sub>) によって受容することで脱落細胞を認識し、隣接細胞が形成するアクトミオシン複合体のリング構造の収縮によって脱落が導かれると考えられている<sup>13</sup>。あるいは脱落細胞と隣接細胞の物理的な接着を担っているアドヘレンスジャンクションの構成分子である E-cadherin を介したメカノトランスダクションによって、脱落細胞の収縮が隣接細胞に伝達され、隣接細胞が脱落細胞を細胞層から脱落させる反応を惹起することが報告されている<sup>8, 10, 14, 15</sup>。

生細胞脱落では、細胞密度の上昇によって、圧力を感知する機械刺激チャネルである Piezo1 によって脱落細胞内にシグナルが伝達され、やはり脱落細胞からの S1P の分泌を介して隣接細胞がアクトミオシンリングを形成することで細胞が生きたまま脱落することなどが報告されている<sup>6</sup>。しかし、同時に報告されたショウジョウバエの上皮組織形成における細胞密度上昇による生細胞脱落は<sup>7</sup>、他のグループの報告で否定されるなど、生体内にどれだけ生細胞脱落が存在するのかも不確定な状況にある<sup>16</sup>。

癌細胞脱落は、脱落細胞は生存している点では生細胞脱落と共通の特徴を持つが、癌原変異をおこした細胞が脱落するケースを指し区別される。*src* や *ras* などの癌遺伝子に癌原変異が入った細胞を隣接する正常細胞が認識し、癌細胞を管腔などの頂端 (apical) に脱落させる現象であり、免疫細胞ではなく上皮細胞が、がん細胞を排除する、癌の発生を抑止する機構として注目を集めている<sup>1, 17</sup>。*ras* 変異細胞における脱落では、この現象を発見したグループを中心に、分子機構の解析が精力的に進められ、脱落する *ras* 変異細胞でも S1P が関与することに加え、癌原細胞側での PKA や MAPK を介したシグナル伝達経路やグルコース代謝経路、カルシウムを介した細胞間での情報伝達、隣接細胞側でのフィラミ

ンビメンチンの集積とそれを引き起こす Protein kinase C の活性化など、様々な分子及び機構が細胞脱落の実行に重要な要素として報告されている<sup>18-22</sup>。全体像として、癌細胞脱落の分子機構は、死細胞脱落とは異なる要素が大きいことが分かってきていると言える。以上のように、脱落細胞と隣接細胞の相互作用を経て起こる細胞脱落は、組織の恒常性を維持するために不可欠であり、その異常は、上皮組織における炎症や、癌の原因と関連していると考えられている<sup>23</sup>。しかし、現状では、細胞脱落の分子機構に関する知見は、細胞脱落におけるシグナル伝達を除いては、断片的であり、さらには複数の報告で矛盾点があるケースも存在し、細胞脱落の一連の過程における分子機構は不明な部分が多い。特に、細胞が組織から離脱する細胞脱落の実行過程は、未だ、十分に解明されていない根本的な命題であり、死細胞脱落では、種々の実験系において、様々なタイプのアクトミオシン複合体（例えば、脱落細胞における apical 側のリング構造や、細胞中央部への集積、basal 側の放射状の繊維構造、apico-basal のケーブル構造、隣接細胞におけるリング構造など）の構築と、その収縮によって生み出される物理的な力が、脱落細胞の細胞層からの離脱を導いていることが示されているが<sup>12, 14, 15, 24-26</sup>、細胞膜の動態など、他の機構が細胞脱落の実行過程において重要な役割を果たしているかどうかはわかっていない。

本研究で注目する細胞膜の動態は、細胞の形態、運動を始めとする多くの細胞の機能に深く関与している。例えば、エンドサイトーシスやエキソサイトーシスなどの小胞輸送も重要な膜動態の一つであるが、その中でも近年、注目を集めているものに細胞外小胞の形成がある。細胞外小胞は主にエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体の3種類に大別される<sup>27-30</sup>。それぞれの細胞外小胞が形成される機構は様々であるが、通常、細胞膜の脂質二重層の内層に限局するホスファチジルセリン（phosphatidylserine:PS）が外層に露出することが共通しており、特にマイクロベシクルでは、PSの露出過程がその形成に必要であると考えられている。このPSの露出は、脂質スクランブラーゼの働きによって行われ、貪食細胞が細胞死をおこした細胞を貪食する際の‘eat me’シグナルとして知られる。<sup>31, 32</sup>細胞外小胞は、血液凝固や細胞の移動、アポトーシス、及び様々な疾患の局面において観察されており、中でも、マイクロベシクルとエクソソームは生理活性タンパク質、核酸、脂質を含み、細胞間のシグナル伝達を媒介している。一方、細胞死をおこした細胞で形成されるアポトーシス小体の生理的な役割は、アポトーシスをおこし、断片化した細胞が貪食細胞によって貪食されることを促進することが報告されているが<sup>33</sup>、不明瞭な点が多い。

本研究は、死細胞脱落において、PSの局所的な露出を介した脱落細胞の細胞外小胞の形成が、細胞脱落の実行過程において、保存された重要な役割を果たしていることを示す。アクトミオシンの動態によって説明されてきた細胞脱落の実行機構に、細胞外小胞の形成、すなわち膜動態を軸にした新たな理解の枠組みを提唱する。

### 3. 略語表

- S1P : Sphingosine 1-phosphate
- S1P<sub>2</sub> : Sphingosine 1-phosphate receptor 2
- GFP : Green fluorescent protein
- RFP : Red fluorescent protein
- DMEM : Dulbecco's Modified Eagle's medium
- MDCK : Madin-Darby canine kidney
- PFA : Paraformaldehyde
- PBS : Phosphate buffered saline
- PBT : TritonX-100 in PBS
- DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole
- Lgl : Lethal giant larvae
- PS : Phosphatidylserine
- dlg : discs large
- LEC : larval epithelial cell
- Arf : ADP ribosylation factor
- Pld : Phospholipase D
- EV : extracellular vesicle
- AJ : adherens junction

## 4. 材料及び方法

### 4-1. 細胞培養

MDCKI、MDCKII および EpH4 細胞 (University Children's Hospital Zurich の Dr. E. Reichmann から分与いただいた) は、L-グルタミン、フェノールレッド、ピルビン酸ナトリウムを含む Dulbecco's modified Eagle's medium 培地 (D-MEM) (高グルコース) (和光、043-30085)、抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液、ナカライテスク、26253-84)、ウシ胎児血清 (FBS、HyClone) (MDCKII は 5%、MDCKI および EpH4 細胞は 10%) を含む培地 (以下、標準培地と呼ぶ) で培養した。

MFG-E8 (WT) または MFG-E8 (D89E) の一過性発現のために、組織培養処理したガラス底ディッシュ上で 30%~80%コンフルエント状態の MDCKII 細胞および EpH4 細胞に、Lipofectamine™ LTX 試薬 (Thermo Fisher) を用いて pCAG-MFG-E8 (WT):GFP または pCAG-MFG-E8 (D89E) をトランスフェクションした。トランスフェクションの 30 分前に、標準培地を FBS 無添加の D-MEM (高グルコース、グルタミン無添加、カルシウム無添加) (Thermo Fisher、21068028) に交換した。トランスフェクションは、プラスミドとリポフェクタミンの複合体形成の段階でも D-MEM (高グルコース、グルタミン無添加、カルシウム無添加) を使用する以外は、メーカーの指示に従って行った。培地はトランスフェクションの 5~7 時間後に標準培地に交換した。トランスフェクションの 1 日半後、または 2 日後に、ライブイメージングを行った。

膜結合型 GFP、RFP、Actin:GFP を安定的に発現する形質転換株を樹立するために、直径 6cm の細胞培養ディッシュ (VIOLAMO) で上記と同様にトランスフェクションを行い、2 日後に標準培地を 400 mg/mL G418 sulfate (Wako) または、200 mg/mL Hygromycin B (Wako) を含むものに交換し、細胞を 10~14 日間培養した。その後、生存したコロニーから、単一細胞由来のクローンを得た。

caspase3 ノックアウト EpH4 細胞株は、CRISPR/Cas9 システムを用いた標準的な方法で作製した。sgRNA (5' -UCUUCAGGCGACUACUGC-3') と Cas9 をレンチウイルス感染システムにより EpH4 細胞に導入し、ピューロマイシン耐性により、導入された細胞を選別し、さらに、単一クローンとして単離し、ウェスタンブロットと配列解析で確認した。

パルミトイル化 GFP 発現 MDCKII 細胞と RFP 発現 MDCKI 細胞の共培養によるモザイク解析では、各細胞株を、2 日前に 1:4 の割合で播種し、タイムラプスイメージングを行った。

マウスの小腸由来のオルガノイドは雌性の C57BL/6N マウス (SLC) から調製した<sup>34</sup>。

### 4-2. ショウジョウバエの遺伝型、維持管理

ショウジョウバエは 25 °C で飼育を行い、標準的な餌を与えた。メスは日齢 1~3 日にオスから分離し、解析まで維持し、使用した。Gene Switch システムを用いた実験の場合<sup>35</sup>、日齢 5 日のハエを 73 mg/mL の Mifepristone (Sigma Aldrich、M8046) を含む餌を入れたブ

ラスチックバイアルに移し、2 日毎に Mifepristone を含む餌の入った新しいバイアルに移した。Myo I A-Gal4 (112-001) および Esg-Gal4 (114-268) は京都ストックセンター (DGRC) から入手した。UAS-*Arf79F* RNAi (66174)、UAS-*Xk* (CG32579) RNAi (57784)、RNAi isogenic control (36303, 36304)、UAS-*Arf51F:GFP* (65867)、*tsh*-Gal4 (3040)、*Eip71CD*-Gal4 (6871)、*hs-FLPG5* (55817)、*act<cd2<Gal4*、UAS-RFP (30558)、UAS-mCD8:mRFP (27398) は Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC) から入手した。UAS-*Xk* (CG32579) RNAi (110645)、RNAi isogenic control (60100)、UAS-Dicer2 (60007) は Vienna Drosophila Resource Center (VDRC) から入手した。その他の使用系統は以下の通り、*Lgl:GFP*<sup>36</sup>、*Pswitch CSG5966*<sup>37</sup>、*Sqh:mKate2*<sup>38</sup>、*act < y+ < LexA*, *LexAop-CD8:GFP*<sup>39</sup>。クローン解析の場合、羽化後 13~19 日 (18 °C で生育) のハエを 37 °C で 15 分間ヒートショック処理した。その 7 日後 (25 °C で生育)、解剖し、中腸をレーザー共焦点顕微鏡で観察した。

#### 4-3. プラスミド

pCAG-mGFP (palmitoylated EGFP) および pEGFP-actin は、それぞれ Addgene (14757) および Clontech から購入した。pCAG-EcadSal:GFP は、奈良県立医科大学の Dr. A. Nagafuchi から分与頂いた。pCAG-MFG-E8 (WT):GFP、pCAG-MFG-E8 (D89E):GFP は pEF1-MFG-E8 (WT) または pEF1-MFG-E8 (D89E) (いずれも大阪大学の Dr. S. Nagata から分与頂いた<sup>40</sup>) から増幅した MFG-E8 コード配列をプライマー 5' -ATGCAGGTCTCCCGTGTGCTG-3' および 5' -ACAGCCCAGCAGCTCCAGGC-3' を用いて増幅し、pCAG-mLSR:cGFP (生理学研究所の Dr. M. Furuse から分与頂いた<sup>41</sup>) の EcoRI サイトにサブクローニングした<sup>41</sup>。増幅部分の DNA 配列は、通常の DNA 配列解析によって確認した。

#### 4-4. タイムラプス撮影

培養細胞を組織培養処理したガラス底ディッシュ (CELLVIEW™ CELL CULTURE DISH, Greiner Bio-One, 627870) に播種し、2~3 日後 (細胞がコンフルエントに達してから 0.5~1 日後)、タイムラプス画像を取得した。標準培地は、5%または 10%FBS、抗生物質、Gluta Max™ Supplement (Thermo Fisher 社、35050061) を含む Fluoro Brite™ D-MEM (Thermo Fisher 社、A1896701) に、画像取得の 1 時間前に交換した。MFG-E8 (WT) または MFG-E8 (D89E) の過剰発現については、分泌された MFG-E8 (WT) または MFG-E8 (D89E) タンパク質を培地中に蓄積させるため、画像取得開始の 6 時間前に培地交換を行った。ほとんどのタイムラプス画像は、レーザー共焦点顕微鏡 (TCS SP8, Leica または FV3000, Olympus) を用い、20 倍または 63 倍油浸対物レンズ、タイムラプスモジュール、マルチポジションモジュールを使用し、CO<sub>2</sub> (5%) チャンバー (Tokai Hit)、37 °C 環境下で実施した。TCS SP8 での検出にはハイブリッド検出器 (Leica) を用いた。共焦点画像の解析および動画ファイルの作成には、Las X ソフトウェア (Leica) または FV31S-SW (Olympus) を

使用した。本報告で使用した全ての画像は、特記ない限り、単一の z 位置での共焦点画像から作成した。

#### 4-5. ショウジョウバエ蛹表皮の解析

蛹化後、16~18 時間経過した蛹を回収し、両面テープを貼り付けたスライドガラス（松浪硝子）に固定し、囲蛹殻を取り除いた。ハロカーボンオイル 700（Sigma Aldrich, H8898）を蛹の腹部の背面部に滴下し、その上からカバーガラスで覆い、マルチポジショニングモードとアダプティブフォーカスコントロールモードを備えたレーザー共焦点顕微鏡を用いて、25 °C 環境下でタイムラプスイメージングを行った。

#### 4-6. 免疫染色および、その他の染色方法

ショウジョウバエの中腸を PBS 中で解剖し、PBS（Wako）4%パラホルムアルデヒドで 25 °C、1 時間、一次固定した後に、メタノールで、-30 °C、30 分間、二次固定した。次に、PBS 1%（v/v）TritonX-100 で透過処理し、Blocking One（ナカライテスク、03953-66）でブロッキングした後、中腸をマウス抗 discs large モノクローナル抗体（4F3）（1:100、Developmental Studies Hybridoma Bank）でインキュベートし、続いて Alexa Fluor 546 ヤギ抗マウス IgG（1:1000、Life Technology、A11003）でインキュベートした。対比染色は 1  $\mu$ g/mL の DAPI（Wako、340-07971）で行った。

培養細胞は、染色実験の 2~3 日前にチャンバースライド（マツナミ）に播種し、コンフルエント状態の細胞を 1%パラホルムアルデヒドを含む PBS で 25 °C、20 分間固定した。次に、0.1%（v/v）Triton X-100 を含む PBS（PBT）で透過処理した後、Blocking One でブロッキング（ナカライテスク）し、ウサギ抗 cleaved caspase3 モノクローナル抗体（Asp175）（1:300、Cell Signaling Technology、9661）でインキュベートし、続いて、Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG（H+L）（1:1200、molecular probes、A11011）でインキュベートした。対比染色は 0.5  $\mu$ g/mL の DAPI と Phalloidin-TRITC（1:2000 Sigma Aldrich、P1951）で行った。

培養細胞の Annexin V 染色には、Annexin V Alexa Fluor™ 555 conjugate（1:20、Molecular Probes、A35108）を用い、Hoechst33342（Wako、346-07951）を 1  $\mu$ g/mL 添加し、メーカーの指示に従って染色を行った。染色前に、Annexin V を細胞の基底側部分にも侵入させるため、ピペットチップを用いて細胞層の数カ所に傷をつけた。染色終了後 30 分以内に画像取得を行った。

細胞膜を可視化するために、2.5  $\mu$ g/mL の CellMask™ Deep Red Plasma membrane Stain（Thermo Fisher、C10046）をタイムラプスイメージング開始の 1 時間前に添加した。

リソソームの染色には、150 nM の LysoTracker™ Red DND-99（Thermo Fisher、L7528）をタイムラプスイメージングの 1 時間前に添加した。

#### 4-7. 電子顕微鏡による解析

EpH4 細胞もしくは MDCKII 細胞を 37 °C で、培養ディッシュ (m-Dish 35 mm, high Grid-500, ibidi, Martinsried, Germany) を使用し、標準培地で培養した。細胞を 0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) 1% グルタルアルデヒドで室温、1 時間、その後、4 °C で固定した。次に、0.1 M カコジル酸緩衝液で 5 回洗浄した後、50 mM HEPES 緩衝液 1.5% フェロシアン化カリウム、2% 四酸化オスミウムで 4 °C、45 分間固定し、Milli-Q 水で 5 回洗浄した。続いて、1% チオカルボヒドラジド溶液で 60 °C、45 分間インキュベートし、Milli-Q 水で 5 回洗浄後、Milli-Q 水 2% 四酸化オスミウムで 4 °C、45 分間インキュベーションし、Milli-Q 水で 5 回洗浄した。そして、Milli-Q 水 4% 酢酸ウラニルで 4 °C、45 分間インキュベート後、Milli-Q 水で 5 回洗浄し、アスパラギン酸鉛溶液 (Walton) に 60 °C、45 分間浸漬した。さらに、Milli-Q 水で 5 回洗浄した後、細胞をエタノール系列 (20、50、70、90、99.5% で各 5 分間、100% で 10 分間×2 回) で脱水し、最後に、Epon 812 樹脂 (TAAB) で浸漬し、重合は 65 °C、72 時間行った。ポリマーカバースリップを除去するため、プラスチック皿の樹脂ブロックをトルエンに浸漬し、ウルトラミクロトーム (Leica EM UC7, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) でダイヤモンドナイフを用いて超薄切片 (60-80 nm) を切り出してシリコンウェハー上に置き、電界放出型走査電子顕微鏡 JSM-IT800SHL (JEOL、東京、日本) を用い、後方散乱電子検出器を用いて 3 kV で観察した。

#### 4-8. タイムラプス画像の定量化、定量化のための細胞脱落における各工程の定義

細胞側面の細胞膜 (細胞の境界、細胞の形状、膜の出芽、小胞形成、脱落) は、CellMask 染色、膜結合 (GAP43 のパルミトイル化シグナル) GFP、または Lgl1:GFP によって可視化した。脱落開始の解析は、細胞境界の細胞膜のシグナルが最も直線状になる  $z$  平面 (アドヘレンスジャンクションを含む平面の可能性が高い) を対象に行った。脱落が開始すると脱落細胞と隣接する細胞との境界のほとんどで直線性が失われ、細胞が丸く変形する。また、 $x$ - $y$  平面における面積の連続的な減少を脱落の開始と定義した。

出芽の開始は、連続的な blebbing と蕾のような細胞膜の形態変化の開始と定めた。この時点では、小胞は細胞膜から分離しておらず、脱落細胞は細胞層から離脱していない。小胞形成の定義は細胞膜の球形のシグナルの検出、すなわち、脱落細胞の細胞膜の部分的な分離 (時には貪食と同時) と定義した。脱落の完了は、隣接する細胞の最 apical 部分が互いに接触した時、つまり、細胞層から脱落細胞が完全に排除された時と定義した (細胞層からの完全な離脱を厳密に評価するのは困難であるため、常に完全な離脱を示すとは限らない)。主観的な要因が入り込む可能性のある解析は、結果を検証するために、2 人の独立した解析によって (場合によっては盲検法で) 実施した。特記のない場合、 $t=0$  は「脱落の開始」を表し、「Total 時間」は「脱落開始」から「完了」までの時間の長さと定義した。

#### 4-9. 画像解析ソフトウェアを用いた定量方法

取得した画像の定量は Fiji (ImageJ) の基本測定ツールを用いて行った<sup>42</sup>。脱落細胞の突出の距離の定量化 (Fig. 1E) については、一連の細胞膜が可視化された細胞の、z スタック画像を順次解析することで、脱落細胞に隣接する細胞の apical 表面の膜シグナルが現れる z 位置を検出し、これを細胞層の apical 端と定義し、脱落細胞の apical 端も同様に決定した。次に、脱落細胞の apical 端と細胞層の apical 端との距離を計算し、「突出の距離」としてプロットした。

細胞体積の定量化のために、細胞は、脱落前は円柱、脱落後は楕円球とみなし解析を行った。計算のためのそれぞれの長さは、一連の連続 z スタック画像による解析から決定した。

LEC における細胞の脱落の進行を評価するために、脱落開始から最も apical 面の直下の面での脱落細胞の断面積がゼロになるまでの時間を解析した。また、LEC 領域の幅を定量化するために、200  $\mu\text{m}$  までの z スタックの最大投影画像を用いて解析を行った。

ショウジョウバエの成虫の腸の幅の定量は、取得した画像の内、最も腸の幅が太くなる箇所を、Line ツールを使用して計測し、グラフに示した。

#### 4-10. 統計分析

P 値の決定には両側 Welch の t 検定を用い、P 値 $<0.05$  を有意とみなした。箱ひげ図では、外れ値は常に十字でプロットした。



## 5. 結果

### 5-1. 脱落細胞は部分的に小胞化し、その小胞は隣接する細胞に貪食される

私は、細胞膜の動態が、細胞が細胞層から離脱する局面において重要な役割を果たしているという仮説を立て、まず、哺乳類培養細胞において、細胞膜に局在する GFP を用いて細胞膜を可視化し、脱落細胞と、脱落細胞に隣接する細胞における細胞膜の動態の詳細を解析した。Madin-Darby canine kidney II (MDCKII) 細胞では、細胞がコンフルエント状態に達した後、細胞密度を調整するためと考えられる細胞脱落が無刺激条件下でおこる<sup>6</sup>。私は膜局在 GFP を発現する MDCKII 細胞のライブイメージング解析により、細胞脱落の過程において、脱落細胞の細胞膜の湾曲と出芽様の形態変化に続き、出芽部位が切り取られることによる小胞形成、そして隣接する細胞内に多数の小胞様構造が出現することを見出した (92 個/92 個の脱落細胞) (Fig. 1A)。続いて、脱落細胞はアポトーシスをおこしているかを調べるため、アポトーシスのマーカーとなる活性化 caspase3 に対する免疫染色を行ったところ、脱落細胞の細胞質に加え、隣接する細胞内の小胞様構造にも活性化 caspase3 のシグナルが検出された (110/113 の脱落細胞) (Fig. 1B)。これらのことから、脱落した細胞はアポトーシスをおこしていること、そして、隣接細胞内に観察された小胞は、脱落したアポトーシス細胞に由来し、脱落細胞が形成した小胞を隣接細胞が貪食したものであることが強く示唆された。これを検証するために、細胞質に赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現する MDCKII 細胞と膜局在 GFP を発現する MDCKII 細胞の共培養によるモザイク解析を行って、RFP 発現細胞が脱落するケースを解析した。脱落を開始した細胞は細胞膜を湾曲させ、10-15 分後には、出芽様の細胞膜の動態を示した (Fig. 1C、1D)。その後、出芽部分は切り取られて小胞を形成し、膜 GFP 発現細胞 (すなわち RFP を発現しない) の隣接細胞内に RFP を含む GFP 陽性の小胞が観察された (10/10 脱落細胞) (Fig. 1C) ことから、脱落細胞が小胞を形成し、その小胞は速やかに隣接する細胞に貪食されることがわかった。さらに、リソソームを可視化するライソトラッカー染色を行ったところ、隣接細胞内の小胞は、その出現直後は、ライソトラッカーシグナルが陰性であるが、30-60 分後に陽性に転じ、この小胞は貪食胞であり、最終的にリソソームと融合することが示された (Fig. 1F)。脱落細胞の小胞形成と隣接細胞による貪食は 10-15 分間継続し、小胞の形成によって、脱落開始前と比較して体積を 41.2%ほどに (Fig. 1G) 減少させた脱落細胞 (体積が、各小胞よりも明らかに大きいので区別できる) は、細胞層から離脱した (Fig. 1A、1D、1F)。よって脱落細胞は、その一部を小胞化し、それらは隣接細胞に貪食され、その残りの部分は細胞層から脱落し、2 つの異なる機構を介して除去されることがわかった。そして興味深いことに、小胞形成と貪食は、細胞層の頂端-基底 (apical-basal) 軸の basal 側半分の部位で優先的に起こった (10/10 の細胞脱落) (Fig. 1D)。さらに、小胞形成及び貪食と同じタイミングで、脱落細胞の細胞層からの突出が開始しており

(Fig. 1D、1E)、これらの結果から、脱落細胞の細胞層からの離脱には小胞形成/貪食が関与していることが示唆された。

## 5-2. 脱落細胞の PS の露出による小胞形成は脱落の実行に重要な役割を果たす

アポトーシス細胞は、通常、細胞膜の脂質二重層内層に局在するホスファチジルセリン (Phosphatidylserine:PS) を‘eat me’シグナルとして外層に露出させ、貪食細胞はこれを認識してアポトーシス細胞を貪食する<sup>31</sup>。蛍光標識した PS 結合タンパク質である Annexin V を用いて PS の露出を検出する実験を行ったところ、脱落過程にある MDCKII 細胞において、basal 側側面部と basal 側に斑点状のシグナルが観察された (Fig. 2A)。よって、脱落細胞が形成する小胞では PS が露出しており、これが隣接細胞に認識されて貪食されていることが示唆された。このことから、脱落細胞が形成する小胞が隣接細胞に貪食される意義を調べるため、私は milk-fat-globule-EGF factor 8 (MFG-E8) の変異タンパク質によって貪食を阻害する実験を試みた。MFG-E8 は、分泌タンパク質であり、アポトーシス細胞が細胞膜上に露出した PS と貪食細胞のインテグリンの両方に結合し、アポトーシス細胞と貪食細胞を結合させることで貪食を促進する役割を担っている<sup>40</sup>。MFG-E8 のインテグリン結合モチーフに変異を持つ MFG-E8-D89E 変異タンパク質 (D89E) は、PS には結合するが、インテグリンには結合しないことで、PS を介した貪食をドミナントネガティブな様式で阻害することが知られており<sup>40</sup>、MDCKII 細胞で D89E を過剰発現させると、脱落細胞が形成した小胞の隣接細胞による貪食が阻害され、小胞が細胞の間隙に残存することを期待して実験を行った。実際に、D89E の過剰発現によって、隣接細胞の小胞の貪食像は、脱落開始後、通常観察される時間が経過しても観察されなかったが、予想に反して、貪食に先立っておこる小胞形成の過程が阻害されており、その結果、貪食像が出現するまでに時間を要していることがわかった。通常、小胞は、脱落開始後 15 分程で出芽様構造を経て形成されるが、D89E を過剰発現させると脱落開始から 100 分以上経過しても出芽様構造が観察されず、小胞形成が遅延した。この時、小胞形成の遅延がおこった脱落細胞は、それに伴って、脱落細胞が、脱落を開始してから細胞層を離脱するまでの時間、すなわち脱落に要する時間も延長した (Fig2B、2C)。

この小胞形成と脱落に関して、別の細胞株でも観察されるかを検証するため、哺乳類上皮培養細胞株である EpH4 細胞においても解析を行った。Eph4 細胞においても、MDCKII 細胞と同様に、コンフルエント状態に達した後、無刺激で細胞脱落がおこり、脱落細胞では小胞の形成が観察され (61/61 脱落細胞)、小胞形成は脱落細胞の basal 側半分でおこっていた (10/10 脱落細胞)。しかし、MDCKII 細胞とは異なり、小胞は隣接する細胞に速やかに貪食されることなく、細胞間隙を移動する像が観察された (Fig. 2D)。そして、共同研究者の実験により、小胞の貪食がおこらない EpH4 細胞においても、D89E を過剰発現させると脱落細胞の小胞形成及び、細胞層から離脱するまでの時間が延長することが示された。

PS の露出そのものを妨げる目的で、アポトーシス細胞における PS の露出を担う脂質スクランブラーゼである *Xkr* ファミリー<sup>43,44</sup>、の内、EpH4 細胞で最も多く発現している *Xkr8* をノックダウンした場合も、小胞形成に異常をきたし、脱落を阻害することが明らかとなっている（同じく共同研究者の実験結果）。以上のことより、PS の露出を介した小胞形成の過程が、両細胞株の共通の機構として、脱落細胞の細胞層からの離脱を促進することが強く示唆された。

### 5-3. 脱落細胞における小胞形成の普遍性と生体内での役割

培養細胞で観察された脱落細胞の小胞形成が生体内でもおこっているかを調べるため、生体内ライブイメージングが容易なショウジョウバエの蛹上皮をモデル系に用い、解析を行った。蛹化後 20-30 時間の時期の蛹の腹部背皮の上皮組織では、変態に伴って大型のサイズの幼虫上皮細胞（larval epithelial cell:LEC）が、細胞分裂を行いながら移動してくる小型の成体上皮細胞（histoblast）に、数時間の内に完全に置き換わる組織のリモデリングをおこし、この過程ですべての LEC は basal（基底）側に細胞脱落することで組織から除かれる<sup>45,46</sup>（Fig. 3A）。この実験系を用い、細胞の lateral（側面）の細胞膜に局在する GFP（Lgl:GFP）を発現させてライブイメージングを行ったところ、培養細胞と同様に、脱落する LEC において、小胞形成が観察された（23/23 脱落細胞）（Fig. 3B）。さらに、RFP が LEC のみで発現し、Lgl:GFP が LEC と histoblast の両方で発現する蛹を用いてモザイク解析を行った結果、RFP 陽性の小胞が、脱落細胞に隣接する histoblast において観察され（5 個中 5 個）、脱落細胞が小胞を形成し、その小胞は隣接細胞によって貪食されることがわかった（Fig. 3C）。よって、脱落細胞における小胞形成が、生体内の、発生過程での生理的な細胞脱落においてもおこることが示された。

興味深いことに、小胞形成と貪食は、脱落する方向とは逆側の脱落細胞の apical 側半分で観察された（4/5 脱落細胞）。続いて、哺乳類の *Xkr* ファミリーホモログであるショウジョウバエの *Xk* 遺伝子（*Xk* または CG32579）のノックダウンを LEC 特異的に行ったところ、脱落細胞が形成する小胞の数が減少した（小胞の数が少ないと判断した脱落細胞が、control では 2/16 であるのに対し、*Xk* ノックダウンでは 12/13）（Fig. 3D）。この時、LEC の細胞層の apical 半分側の小胞形成がおこる付近での脱落細胞の断面積を経時的に測定し、脱落の進行を評価したところ、*Xk* をノックダウンした脱落細胞は control に比べ、脱落の進行が遅延し、長時間、細胞層に留まることが強く示唆された（Fig. 3E）。さらに、上皮組織における LEC が占める領域の幅を経時的に測定することで、LEC の histoblast への入れ替わりを組織レベルで測定したところ、*xk* をノックダウンした蛹では、この組織リモデリングも遅延することが分かった（Fig. 3F）。

次に、変態期の蛹上皮に加え、成体において細胞のターンオーバーの際に細胞脱落がおこるショウジョウバエ成体の腸上皮についても解析を行ったところ、脱落する細胞に隣接する細胞内に小胞が観察され（Fig. 3G、3H）、さらに、マウスの小腸のオルガノイドにお

いても同様に脱落細胞の小胞形成が観察された (Fig. 3I)。そこで、ショウジョウバエの腸上皮細胞特異的に *Xk* をノックダウンすると、腸組織の幅の増大 (Fig. 3J、3K) と個体の短命化が観察された (共同研究者のデータ)。これらの結果は PS の露出を介した脱落細胞の小胞の形成が、in vivo においても普遍的なプロセスであり、組織の発達と恒常性を維持するために重要な役割を果たしていることを示している。

#### 5-4. 脱落細胞が形成する小胞は、マイクロベシクルの形成機構を用いて形成される一方、アポトーシス小体の特徴を持つ

脱落細胞が形成する小胞は、細胞が形成・放出する小胞である細胞外小胞 (Extracellular Vesicle: EV) であると考えることができる。EV はその形成機構やサイズ等の様々な特徴の相違に基づいてエクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体に大別される。この内、マイクロベシクルの形成には PS の露出が必要と考えられており、ADP ribosylation factor (Arf) ファミリーと、phospholipase D (Pld) の働きを必要とし、出芽部分の切り取りにアクトミオシンの集積が重要であることが報告されている<sup>47,48</sup>。脱落細胞での EV 形成には PS の露出が必要であること (Fig. 2B、3E、3F) から、この EV がマイクロベシクルの性質を持つ可能性を考え、アクトミオシンの局在、動態を解析した。その結果、MDCKII 細胞において、小胞の出芽部位の根元にアクチンが集積している

(Fig. 4A) (10/10 Actin:GFP 発現細胞) こと、及びショウジョウバエの LEC において、小胞の出芽部位の根元にミオシンが集積している (Fig. 4B) (10/10 脱落細胞) ことがわかった。

そこで、続いて、脱落細胞での EV 形成における Arf ファミリー、PLD の関与を検討した。*Arf51F* (哺乳類の *Arf6* のホモログ) は、ショウジョウバエの LEC での EV 形成の際に、脱落細胞の apical 側、すなわち EV が形成される側に集積 (6/6 脱落細胞) (Fig. 4C) することがわかった。さらに LEC において *Arf79F* (哺乳類の *Arf1* のホモログ) のノックダウンを行うと、小胞形成が遅延し、脱落に要する時間も延長した (Fig. 4D、4F)。

それらに加え、共同研究者の実験結果において、EpH4 細胞で *Arf1*、*Arf6*、または *Pld1* をノックダウンした場合においても、EV 形成の遅延と、それに伴う脱落の遅延が観察された。また、*Arf6*、*Pld1* をノックダウンした EpH4 細胞は、脱落が阻害されつつも、局所的な PS の露出が観察された (脱落細胞の内、PS の露出を示した細胞の割合は control 77%、*Arf6* ノックダウン 55%、*Pld1* ノックダウン 58%)。これらの結果は PS の露出が EV の形成に先行しておこるといふ知見とも一致している。

以上の結果から、脱落細胞の EV 形成は、マイクロベシクルの形成と同様のメカニズムによって担われており、EV の形成が、細胞脱落の実行に寄与していることが示された。

一方で、哺乳類上皮培養細胞における脱落細胞が形成した EV において、形成中の小胞及び、貪食されたと考えられる隣接細胞内の小胞は DNA 染色のシグナルが陽性であり、内部に DNA を含むものが多く観察された (Fig. 5A)。その内部に断片化された核やミトコンド

リアなどの細胞内小器官を含むのはEVの中でもアポトーシス小体のみに見られる特徴である。電子顕微鏡を用いた解析 (RIKEN 米村重信博士、尾上健太博士、及び東京医科歯科大学 荒川聡子先生との共同研究)においても、EVには核の断片やミトコンドリアが含まれていることが示された (Fig. 5B、5B')。また、caspase3 をノックアウトした EpH4 細胞では、細胞脱落が著しく減少したことに加え、出芽のような細胞膜の形態変化が継続するのにも関わらず EV 形成及び脱落が阻害された (Fig. 5C)。以上の結果から、脱落細胞が形成する小胞は、アポトーシス小体とマイクロベシクルの両方の特徴を示すことがわかった。

#### 5-5. 脱落細胞の EV 形成は隣接細胞の侵入を介して、細胞脱落を促進する

最後に、脱落細胞の EV 形成がどのような機構で細胞脱落を駆動するのかについて解析を行った。まず、EV 形成によって、細胞間の物理的な接着を担うアドヘレンスジャンクション (adherens junction: AJ) を消失させることで脱落細胞を細胞層から離脱させている可能性を考え、検証を行った。AJ の接着分子である E-cadherin を E-cadherin:GFP 融合タンパク質の発現によって可視化すると共に、染色によって細胞膜を可視化した EpH4 細胞のタイムラプスイメージングを行ったところ、脱落細胞の EV 形成がおこるタイミングと脱落細胞と隣接細胞間の E-cadherin が消失するタイミング (脱落の完了前に消失する: 中井彩香らの未発表データ) は異なっており (Fig. 6G、6H)、脱落細胞の小胞形成は AJ の消失には寄与しないことがわかった。

細胞脱落では、隣接細胞が、脱落細胞の底面 (最も basal の部位) に葉状仮足によって侵入することも、脱落の実行に重要な過程であることが報告されている<sup>26, 49</sup>。そこで次に、EV 形成によって、隣接細胞の底面での侵入が促される可能性を検討するため、膜局在 GFP を発現する MDCKII 細胞において、脱落細胞の底面の面積の経時的変化を測定したところ (Fig. 6A、most basal)、底面の面積の減少は、EV の形成の前からおこっており (Fig. 6A、6B、6D)、小胞形成と隣接細胞の底面への侵入に明確な関連性は見出されなかった。

これに対し、EV 形成が最も頻繁におこる、底面よりやや apical 側 (3  $\mu\text{m}$  程 apical 側) の部位における脱落細胞の断面積の測定も行ったところ (Fig. 6A、basal-middle)、EV が形成される前後で、面積減少が最も顕著に観察されることがわかった (Fig. 6B、6D)。EV 形成時に、脱落細胞の底面の面積減少は、脱落開始前の面積を 100% とした時の約 10% であるのに対し (Fig. 6B、6D)、EV 形成面の面積減少は 50% 以上であった。そしてこの時、面積減少の過程において、脱落細胞と隣接細胞は常に密着しており、面積減少によって生じたスペースには隣接細胞が隙間なく侵入していることもわかった (Fig. 6A)。この、EV 形成面での、EV 形成に伴う断面積の大きな減少及びこれに伴う隣接細胞の侵入は、ショウジョウバエの LEC (脱落方向が哺乳類培養細胞とは逆側の LEC の場合、頂端面より、やや basal 側) およびマウス小腸オルガノイドにおいてもみられた (Fig. 6E、6F)。さらに、MDCKII 細胞で MFG-E8 D89E 変異体を過剰発現させ、EV 形成が遅延した場合、EV 形成面で

の面積減少もそれに伴って遅延した (Fig. 6C、6D)。以上の結果より、EV の形成は、隣接細胞が侵入するスペースの形成に寄与し、これを介して、脱落細胞の細胞層からの離脱を促進することが示唆された (Fig. 6I)。

## 6. 考察

### 6-1. 本研究で得られた知見のまとめと意義

本研究は、脱落細胞における、PS の露出及び、PLD と ARF ファミリーの働きを介した時間的に制御された EV の形成は、細胞層から脱落細胞を効率よく離脱させるための種を越え、保存された機構であることを明らかにした。これにより、これまで専らアクトミオシンの動態によって説明されてきた細胞脱落の実行機構に EV 形成という膜動態が重要な役割を果たすことを示した。そして、この過程を阻害すると脱落に要する時間が延長し、上皮組織に異常が生じることを示した。さらに脱落細胞の EV 形成によって隣接細胞の侵入が駆動されることを強く示唆し、細胞脱落の本質的部分である、脱落細胞と隣接細胞の相互協調作用を担う重要なプロセスを明示したと言える。狭義の細胞脱落に加え、「細胞の組織からの離脱」は、がん細胞の浸潤や神経細胞の分化など、様々な局面で観察される基本的な細胞の振る舞いと言える<sup>3</sup>。本研究の成果は、細胞がどのようにして組織から離脱するのかという細胞生物学的問題についての理解を大きく進展させるものである。

### 6-2. 脱落細胞が形成する EV の特徴と生理作用

EV の既知の働きとして、EV に内包されるタンパク質や micro RNA を他の細胞に受け渡すことによる細胞間のシグナル伝達が挙げられるが<sup>27-30, 50</sup>、今回の場合、脱落細胞の EV 形成と脱落方向への突出は同時におこっていることから (Fig. 1E)、脱落の実行過程において、EV の形成による脱落細胞と隣接細胞間のシグナル伝達が、その役割を果たしている可能性は低く、シグナル伝達以外の機能を担っていると考えられる。

脱落細胞の EV の形成は、マイクロベシクル形成に関与する *Arf* または *Pld* ファミリー遺伝子のノックダウンによって阻害された (Fig. 4D) 一方で、小胞は内部に DNA やヒストンを含み (Fig. 5B、5B')、その大きさもアポトーシス小体として分類されるサイズである (共同研究者のデータ) ことなどから、脱落細胞の EV はマイクロベシクルとアポトーシス小体の両方の特徴を持っていると言える。また、共同研究者のデータにより、哺乳類血球系細胞株に抗癌剤エトポシドによってアポトーシスを誘導し、ここに *Pld1* 阻害剤を添加したところ、FDC-P1 細胞の断片化、すなわちアポトーシス小体の形成が強く抑制されることが示されている。アポトーシス小体の形成機構は、未だ明らかにされていない部分が多いが、以上のことをあわせると、実はマイクロベシクルの形成と同様の機構によって担われている可能性も考えられる。

アポトーシス小体の形成によって死細胞の食食効率が上昇することなどが報告されているが<sup>33</sup>、生理的意義を明確に示した知見は乏しく、存在意義に懐疑的な見方すらある。本研究による結果は、細胞脱落の実行にアポトーシス小体の形成が重要な役割を果たすことを強く示唆しており、アポトーシスという現象の発見と共に報告されながら、長らく不明

であったその形成機構と生理作用の理解に大きく道を拓くものと言える。

### 6-3. アクトミオシン動態と EV 形成の関連

脱落細胞及び隣接細胞における多様なアクトミオシン動態が、脱落の実行を駆動することが報告されている<sup>12, 14, 15, 25, 26, 49, 51</sup>。本研究では、脱落細胞の EV 形成と関連する actin 動態について、EV の出芽部位周辺への集積 (Fig. 4A、4B) が観察された。また、共同研究者のデータにより、EV 形成の際に隣接細胞が脱落細胞側に侵入する細胞膜の先端部での集積も観察されている。加えて、報告されている脱落の際のアクチン動態の最も代表的なものである、隣接細胞が形成するアクトミオシンのリング構造も観察されたが、顕著にこれが観察されるのは、脱落細胞の小胞の形成後であった (Fig. 7C)。

以上のようなアクトミオシン動態と脱落細胞の EV 形成の関連をさらに調べるため、EpH4 細胞を、Rho を活性化するキナーゼである ROCK の阻害剤で処理したところ、脱落細胞の EV の出芽部位周辺でのアクチン集積と、その後の EV の切り取りの過程が阻害され (Fig. 7A、7B)、脱落完了までに要する時間が延長した (Fig. 7B)。この結果は、アクトミオシンの集積がマイクロベシクルの切り取りに重要という知見<sup>48</sup>とよく一致する。また、ROCK 阻害剤での処理によって、EV の出芽の遅延または出芽自体の阻害が観察された (Fig. 7B) ことは、ROCK はアポトーシス小体形成時の膜のブレベイングに関与するとの報告と関連するかもしれない<sup>52</sup>。一方で、共同研究者により、P1d1 阻害剤処理を行うと、小胞の出芽部位にアクチンが集積せず (2/4 脱落細胞)、Arf-P1d のシグナルが脱落細胞での EV 形成を担うという、今回得られた知見を補強したことに加えて、この時、隣接細胞でのアクトミオシンリング構造の形成も阻害されることがわかった。脱落細胞での EV 形成が隣接細胞のアクトミオシンリング形成に関与するならば、予期されなかった意外な機構でありさらにこれを追求する必要がある。

以上のことを総合すると、脱落細胞の EV 形成は、複数のステップに渡って、アクトミオシンの動態と密接に、且つ、相互に関係しあっていることが強く示唆される。これらの 1 つ 1 つのステップを切り分けて解析することは簡単ではなく、正確な詳細を伴う全容の解明にはさらなる多くの解析が必要であり、今後の課題と位置づけられる。

細胞脱落の際のアクトミオシン動態は、脱落の実行を駆動するコアマシナリーとして広く認識されている一方、様々な構造と機能が種々の解析系でなされ、互いに矛盾した報告も存在するなど、実情は混沌としていると言える。今回報告した脱落細胞の EV 形成は、私達が観察した死細胞脱落では共通に観察されており、より普遍的な、細胞脱落の実行の根幹を担う機構である可能性がある。

### 6-4. 脱落細胞での EV 形成が細胞脱落の実行を駆動する

本研究での定量イメージング解析によって、脱落細胞の EV 形成がスペースを形成することで隣接細胞の侵入を促し、細胞脱落の実行を促進していることが強く示唆された。培



養細胞での解析において、底面における、隣接細胞の葉状仮足の伸長・侵入は、EV 形成に先立って進行しており、効率的な細胞の脱落には、隣接細胞と脱落細胞の双方において、多くの順序だったプロセスが重要であると考えられる。

脱落細胞と隣接細胞が互いにスペースを奪い合っていることを前提とした数理モデル解析（シンガポール国立大学 平島剛志博士との共同研究）においても、脱落細胞における、脱落方向とは反対側の部位での EV 形成が細胞の組織からの離脱を促すことが支持された。また、この解析では、隣接細胞の侵入スペースを形成するためには、形成された EV がその場に在り続けなければならないことの重要性が提示された。これは、実験・観察結果における、隣接細胞による貪食か、EV の細胞間隙での速やかな移動（EpH4 細胞のケース）によって達成されていると解釈できる。

ある種の細胞競合では、敗者となった細胞全体を貪食することが、敗者細胞の排除に重要である場合があるが、本研究で報告する機構は、EV 形成そのものの重要性を示したものであり、貪食は形成された EV をその場から除去するための手段の 1 つという位置付けで、これまでにはなかったスキームを提示するものである。

また、癌化した細胞の浸潤の場合、小胞の形成によって AJ を含む apical 側を規定する因子を除去し、basal 側へ脱落する報告があるが<sup>53</sup>、本研究でのケースでは、AJ の消失と EV 形成のタイミングが異なる（Fig. 6G、6H）ことや、哺乳類培養細胞においてもショウジョウバエの LEC においても EV 内に E-cadherin が検出されないことから（データは示していない）、今回報告する小胞形成の役割は、AJ の消失とは関連しないと考えられる。癌化した細胞は、浸潤のために、細胞が機能するための一般的な機構である細胞分裂の際の収縮環形成を利用しているという報告<sup>54</sup>のように、基本的な細胞脱落の機構である EV 形成を転用・改変し、AJ を除去しているという可能性が考えられるかもしれない。

EV 形成は、脱落細胞の脱落方向と反対側の部位において、細胞の脱落方向への突出と同時に起こることから、脱落の方向性を制御している可能性もある。共同研究者のデータにおいて、培養細胞を P1d1 阻害剤で処理し、EV 形成を遅延させた場合に、一部、EV 形成部位の局在が乱れ、脱落方向に影響を及ぼすことが示唆されており、詳細に解析を進めることで、脱落の方向の決定という細胞脱落での大きな命題に答が得られるかもしれない。

#### 6-5. EV 形成における PS 露出の役割

脱落細胞での EV 形成には局所的な PS の露出が重要な役割を果たすことが明らかになった。PS の露出は、アポトーシス細胞の貪食のための‘eat me’シグナルとして作用することがよく知られるが、これ以外の作用によっても、細胞の終焉の局面で PS 露出が役割を果たすことを示し、リン脂質動態の分野においても重要な知見を加えた。

EV 形成における PS 露出の作用機序については、まだ不明な点が多い。PS の露出そのものが、細胞膜の曲率の変化を促すことが報告されており<sup>55</sup>、これが EV の出芽に寄与している可能性はあるが、MFG-E8 D89E 変異体の過剰発現によって露出した PS を塞ぐことでも

EV 形成が阻害されることから、PS 受容体を含め、PS 結合分子を介した作用が脱落細胞の EV 形成に関与している可能性が考えられる<sup>31</sup>。さらに、アポトーシスを誘導した EpH4 細胞は、非コンフルエント条件下で EV の出芽様の動態を示したが、EV 形成はほとんど観察されなかったことから (Fig. 7D)、これまでに示されてきた EV 形成機構とは異なり、細胞非自律的な機構が示唆された。脱落細胞で露出した PS を隣接細胞が認識し、何らかの作用によって脱落細胞の EV 形成を誘導するという仮説 (Fig. 7E) を考えており、既知の PS 結合タンパク質の関与を調べるなどして、今後これを検証していく必要がある。

#### 6-6. 今後の方向性:細胞脱落の実行機構の破綻が組織の恒常性に及ぼす影響

本研究では、速やかな細胞脱落の実行が、組織の恒常性の維持に関連することが示唆された。共同研究者のデータにおいて、ショウジョウバエの成虫において、EV 形成に関与する遺伝子を腸上皮細胞特異的にノックダウンすると、個体の寿命が短縮する結果が得られている。細胞脱落が阻害されると上皮が形成するバリア機能の破綻がおこること<sup>10,23</sup>、バリア機能が破綻した消化管は個体の寿命が短縮すること<sup>56</sup>、がそれぞれ報告されており、私達の結果は、脱落細胞における EV 形成が、上皮のバリア機能の維持に貢献している可能性を提示している。

今後は、本研究で明らかとなった EV 形成を起点として、アクトミオシン動態や細胞接着の動態との関連などの詳細も明らかにすることで、細胞脱落の普遍的な実行機構の全容解明を達成していく必要がある。本研究及び今後の研究で得られる知見を用いることで、生体内で細胞脱落の実行を妨げることが可能になり、細胞脱落の異常と、癌や炎症などの上皮性疾患との関連についての理解が進展することが期待される。

## 7. 参考文献

1. Tanimura, N. & Fujita, Y. Epithelial defense against cancer (EDAC). *Semin. Cancer Biol.* **63**, 44–48 (2020).
2. Gudipaty, S. A. & Rosenblatt, J. Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 132–140 (2017).
3. Ohsawa, S., Vaughen, J. & Igaki, T. Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Dev. Cell* **44**, 284–296 (2018).
4. Gagliardi, P. A. *et al.* Collective ERK/Akt activity waves orchestrate epithelial homeostasis by driving apoptosis-induced survival. *Dev. Cell* **56**, 1712-1726.e6 (2021).
5. Dwivedi, V. K. *et al.* Replication stress promotes cell elimination by extrusion. *Nature* **593**, 591–596 (2021).
6. Eisenhoffer, G. T. *et al.* Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature* **484**, 546–549 (2012).
7. Marinari, E. *et al.* Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature* **484**, 542–545 (2012).
8. Lubkov, V. & Bar-Sagi, D. E-Cadherin-Mediated Cell Coupling Is Required for Apoptotic Cell Extrusion. *Curr. Biol.* **24**, 868–874 (2014).
9. Thomas, M., Ladoux, B. & Toyama, Y. Desmosomal Junctions Govern Tissue Integrity and Actomyosin Contractility in Apoptotic Cell Extrusion. *Curr. Biol.* **30**, 682-690.e5 (2020).
10. Duszyc, K. *et al.* Mechanotransduction activates RhoA in the neighbors of apoptotic epithelial cells to engage apical extrusion. *Curr. Biol.* **31**, 1326-1336.e5 (2021).
11. Valon, L. *et al.* Robustness of epithelial sealing is an emerging property of local ERK feedback driven by cell elimination. *Dev. Cell* **56**, 1700-1711.e8 (2021).
12. Teng, X., Qin, L., Le Borgne, R. & Toyama, Y. Remodeling of adhesion and modulation of mechanical tensile forces during apoptosis in *Drosophila* epithelium. *Development* dev.139865 (2016) doi:10.1242/dev.139865.
13. Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R. & Rosenblatt, J. Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J. Cell Biol.* **193**, 667–76 (2011).
14. Kuipers, D. *et al.* Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J. Cell Sci.* jcs.138289 (2014) doi:10.1242/jcs.138289.
15. Michael, M. *et al.* Coronin 1B Reorganizes the Architecture of F-Actin Networks for Contractility at Steady-State and Apoptotic Adherens Junctions. *Dev. Cell* **37**, 58–71 (2016).
16. Levayer, R., Dupont, C. & Moreno, E. Tissue Crowding Induces Caspase-

- Dependent Competition for Space. *Curr. Biol.* **26**, 670–677 (2016).
17. Hogan, C. *et al.* Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **11**, 460–467 (2009).
  18. Kasai, N. *et al.* The paxillin-plectin-EPLIN complex promotes apical elimination of RasV12-transformed cells by modulating HDAC6-regulated tubulin acetylation. *Sci. Rep.* **8**, 2097 (2018).
  19. Kajita, M. *et al.* Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat. Commun.* **5**, 4428 (2014).
  20. Yamamoto, S. *et al.* A role of the sphingosine-1-phosphate (S1P)-S1P receptor 2 pathway in epithelial defense against cancer (EDAC). *Mol. Biol. Cell* **27**, 491–499 (2016).
  21. Kon, S. *et al.* Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.* **19**, 530–541 (2017).
  22. Takeuchi, Y. *et al.* Calcium Wave Promotes Cell Extrusion. *Curr. Biol.* **30**, 670-681.e6 (2020).
  23. Duszyc, K. *et al.* Apical extrusion prevents apoptosis from activating an acute inflammatory program in epithelia. *Dev. Cell* **58**, 2235-2248.e6 (2023).
  24. Atieh, Y., Wyatt, T., Zaske, A. M. & Eisenhoffer, G. T. Pulsatile contractions promote apoptotic cell extrusion in epithelial tissues. *Curr. Biol.* **31**, 1129-1140.e4 (2021).
  25. Gagliardi, P. A. *et al.* MRCK  $\alpha$  is activated by caspase cleavage to assemble an apical actin ring for epithelial cell extrusion. *J. Cell Biol.* **217**, 231–249 (2017).
  26. Le, A. P. *et al.* Adhesion-mediated heterogeneous actin organization governs apoptotic cell extrusion. *Nat. Commun.* **12**, 397 (2021).
  27. Sung, B. H., Parent, C. A. & Weaver, A. M. Extracellular vesicles: Critical players during cell migration. *Dev. Cell* **56**, 1861–1874 (2021).
  28. Akers, J. C., Gonda, D., Kim, R., Carter, B. S. & Chen, C. C. Biogenesis of extracellular vesicles (EV): exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *J. Neurooncol.* **113**, 1–11 (2013).
  29. Tkach, M. & Théry, C. Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. *Cell* **164**, 1226–1232 (2016).
  30. Catalano, M. & O’Driscoll, L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *J. Extracell. Vesicles* **9**, 1703244 (2020).
  31. Nagata, S., Hanayama, R. & Kawane, K. Autoimmunity and the Clearance of Dead Cells. *Cell* **140**, 619–630 (2010).
  32. Kawano, M. & Nagata, S. Efferocytosis and autoimmune disease. *Int. Immunol.* **30**, 551–558 (2018).
  33. Orlando, K. A., Stone, N. L. & Pittman, R. N. Rho kinase regulates fragmentation

- and phagocytosis of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 5–15 (2006).
34. Mahe, M. M. *et al.* Establishment of Gastrointestinal Epithelial Organoids. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* **3**, 217–240 (2013).
  35. Osterwalder, T., Yoon, K. S., White, B. H. & Keshishian, H. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 12596–12601 (2001).
  36. Huang, J., Zhou, W., Dong, W., Watson, A. M. & Hong, Y. Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 8284–8289 (2009).
  37. Mathur, D., Bost, A., Driver, I. & Ohlstein, B. A Transient Niche Regulates the Specification of *Drosophila* Intestinal Stem Cells. *Science* **327**, 210–213 (2010).
  38. Pinheiro, D. *et al.* Transmission of cytokinesis forces via E-cadherin dilution and actomyosin flows. *Nature* **545**, 103–107 (2017).
  39. LeGoff, L., Rouault, H. & Lecuit, T. A global pattern of mechanical stress polarizes cell divisions and cell shape in the growing *Drosophila* wing disc. *Development* **140**, 4051–4059 (2013).
  40. Hanayama, R. *et al.* Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* **417**, 182–187 (2002).
  41. Masuda, S. *et al.* LSR defines cell corners for tricellular tight junction formation in epithelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 548–555 (2011).
  42. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
  43. Suzuki, J., Imanishi, E. & Nagata, S. Exposure of Phosphatidylserine by Xk-related Protein Family Members during Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **289**, 30257–30267 (2014).
  44. Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R. & Nagata, S. Xk-Related Protein 8 and CED-8 Promote Phosphatidylserine Exposure in Apoptotic Cells. *Science* **341**, 403–406 (2013).
  45. Ninov, N., Chiarelli, D. A. & Martín-Blanco, E. Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Camb. Engl.* **134**, 367–379 (2007).
  46. Nakajima, Y., Kuranaga, E., Sugimura, K., Miyawaki, A. & Miura, M. Nonautonomous Apoptosis Is Triggered by Local Cell Cycle Progression during Epithelial Replacement in *Drosophila*. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 2499–2512 (2011).
  47. Schlienger, S., Campbell, S. & Claing, A. ARF1 regulates the Rho/MLC pathway to control EGF-dependent breast cancer cell invasion. *Mol. Biol. Cell* **25**, 17–29 (2014).
  48. Muralidharan-Chari, V. *et al.* ARF6-Regulated Shedding of Tumor Cell-Derived

- Plasma Membrane Microvesicles. *Curr. Biol.* **19**, 1875–1885 (2009).
49. Kocgozlu, L. *et al.* Epithelial Cell Packing Induces Distinct Modes of Cell Extrusions. *Curr. Biol.* **26**, 2942–2950 (2016).
  50. Gupta, K. H. *et al.* Apoptosis and Compensatory Proliferation Signaling Are Coupled by CrkI-Containing Microvesicles. *Dev. Cell* **41**, 674–684.e5 (2017).
  51. Rosenblatt, J., Raff, M. C. & Cramer, L. P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol.* **11**, 1847–1857 (2001).
  52. Coleman, M. L. *et al.* Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat. Cell Biol.* **3**, 339–345 (2001).
  53. Fadul, J. *et al.* KRas-transformed epithelia cells invade and partially dedifferentiate by basal cell extrusion. *Nat. Commun.* **12**, 7180 (2021).
  54. Anton, K. A., Kajita, M., Narumi, R., Fujita, Y. & Tada, M. Src-transformed cells hijack mitosis to extrude from the epithelium. *Nat. Commun.* **9**, 4695 (2018).
  55. Xu, P., Baldrige, R. D., Chi, R. J., Burd, C. G. & Graham, T. R. Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *J. Cell Biol.* **202**, 875–886 (2013).
  56. Resnik-Docampo, M. *et al.* Tricellular junctions regulate intestinal stem cell behaviour to maintain homeostasis. *Nat. Cell Biol.* **19**, 52–59 (2017).

## 8. 謝辞

本研究を遂行し、本論文をまとめるにあたり、終始、誠に熱心なご指導と御鞭撻を賜りました恩師、京都産業大学生命科学研究科 川根公樹准教授に深甚な謝意を表します。

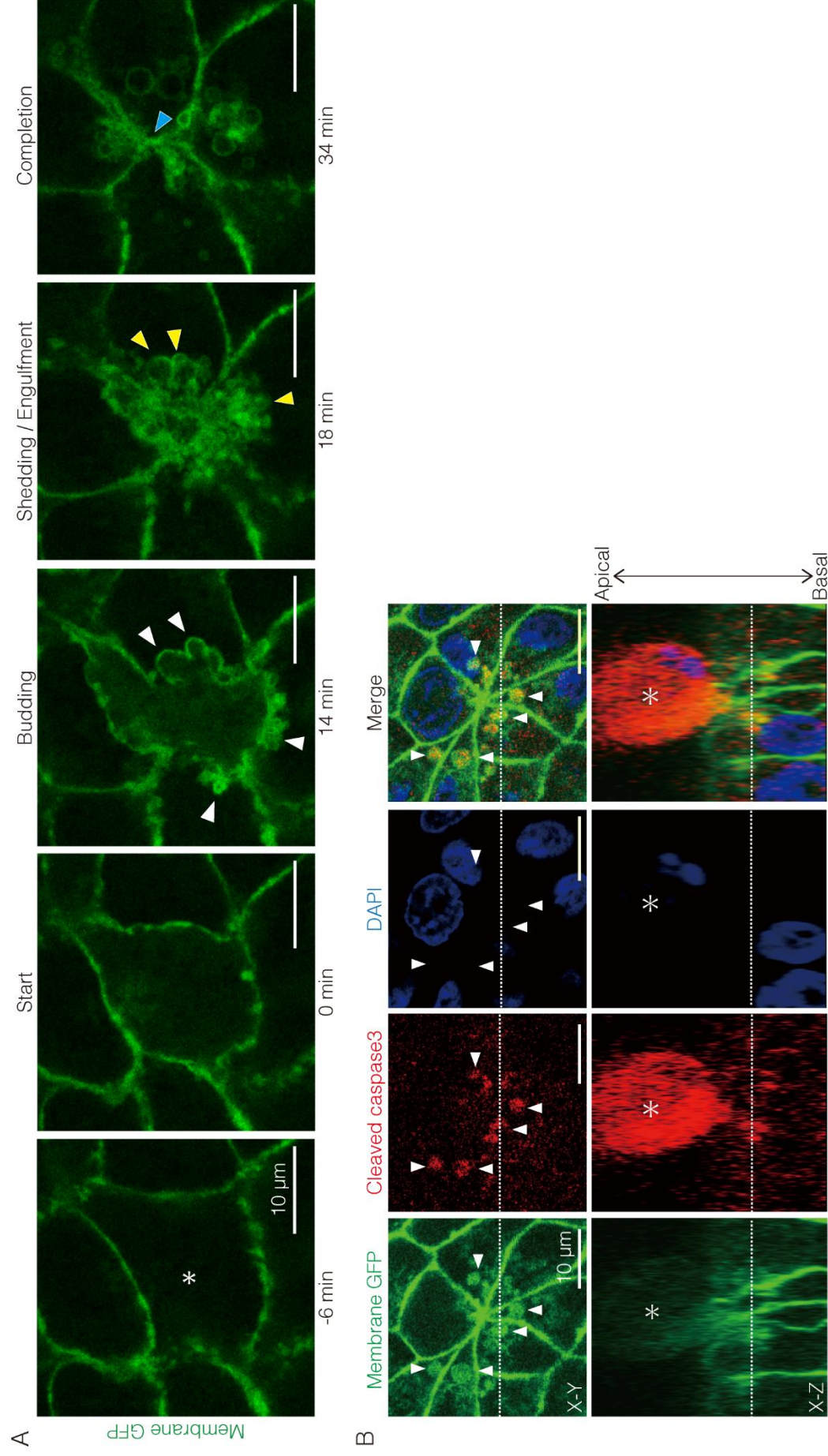
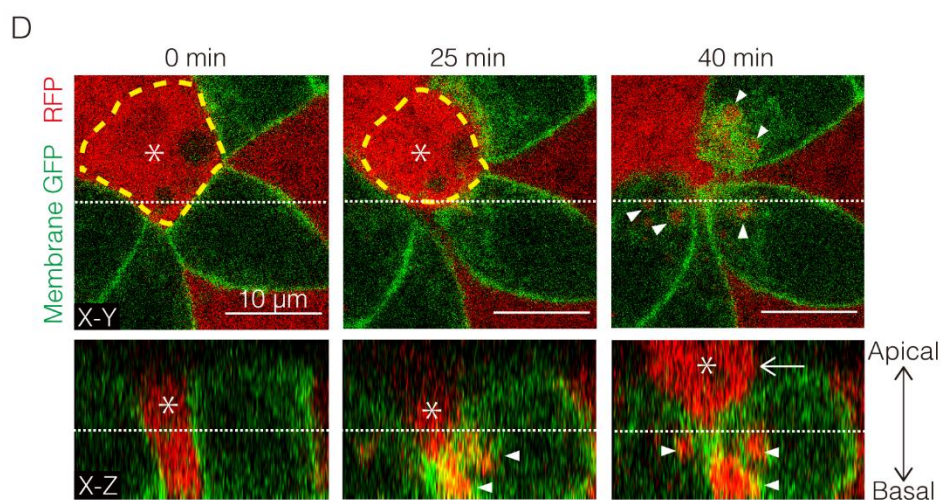
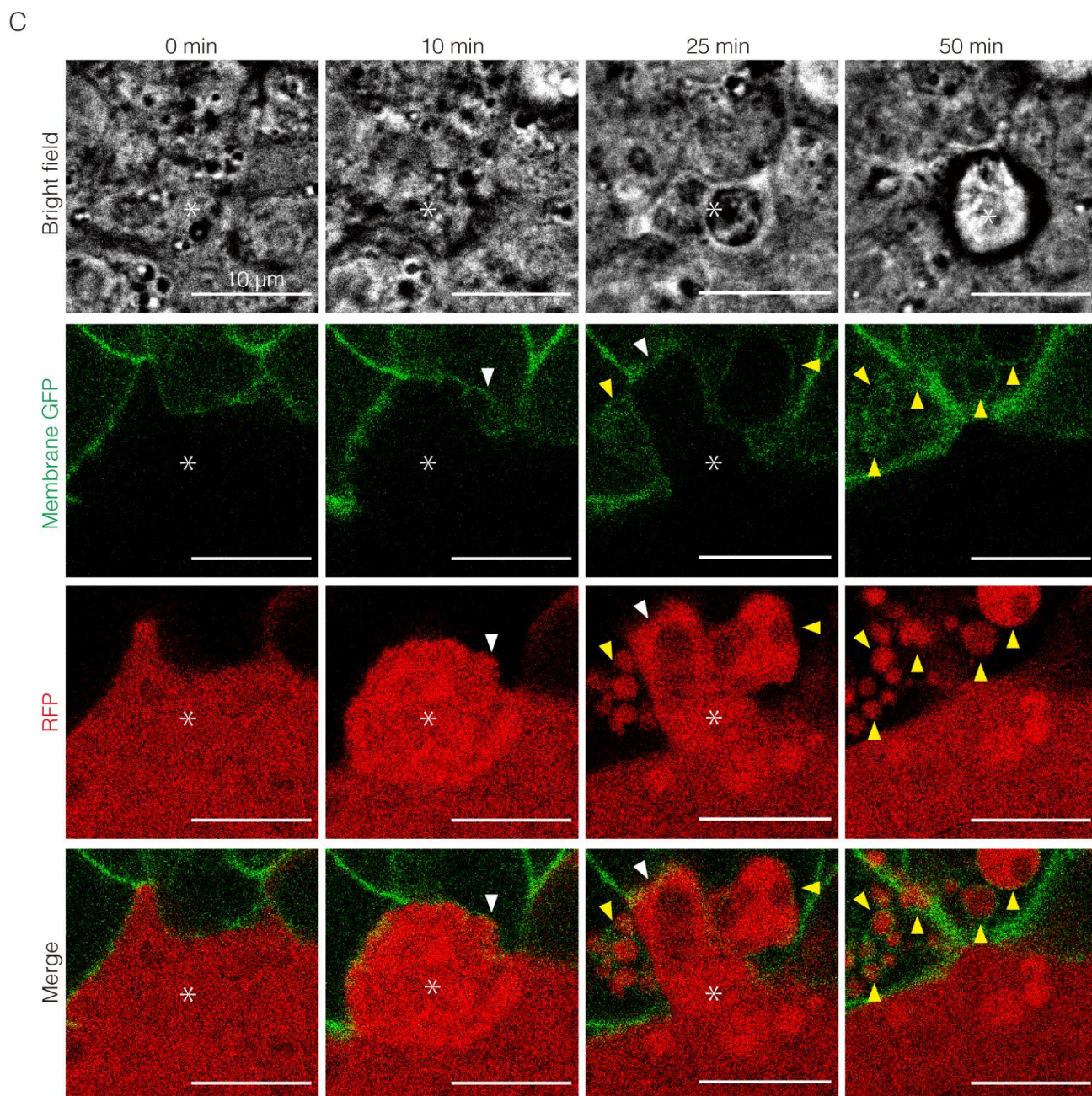


Figure 1. 哺乳類上皮培養細胞における脱落細胞の小胞形成と隣接細胞による貪食

(A) パルミトイル化GFP (膜GFP) を発現するMDCKII細胞における、脱落細胞 (アスタリスク) の隣接細胞内における膜動態の代表的な画像 (x-y平面像)。白矢頭は細胞膜の出芽を示し、黄色矢頭は隣接細胞に貪食された小胞を示し、青矢頭はapical領域で隣接細胞間の新たな接触箇所を指す。各画像はapical領域 (Start)、出芽 (Budding)、小胞形成 (Shedding) / 貪食 (Engulfment)、完了 (Completion) の各過程のタイムラプスの詳細な定義は4. 材料及び方法に記載する)。(B) 膜GFP発現MDCKII細胞の4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた活性caspase3の免疫染色の画像。白矢頭は、脱落細胞 (アスタリスク) の隣の細胞内における小胞を示し、破線は別の角度から見た画像 (x-y平面像またはx-z断面像) において互いに対応する位置を示す。

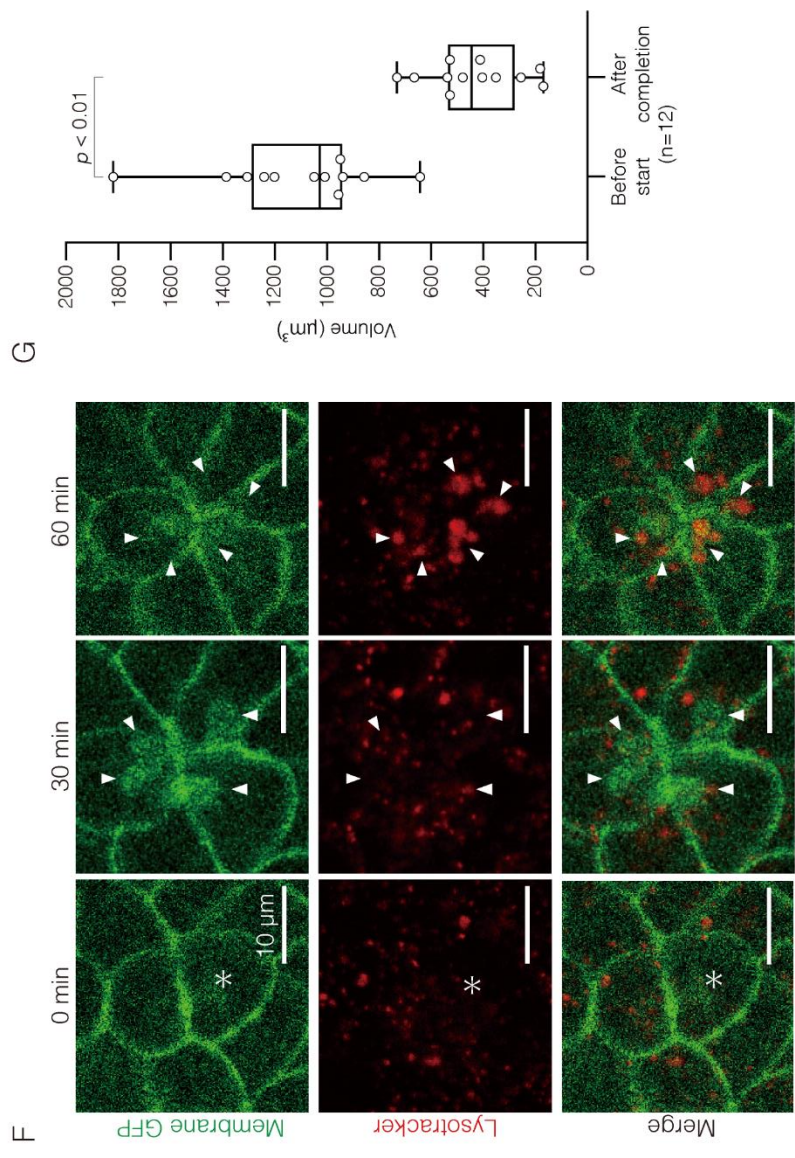
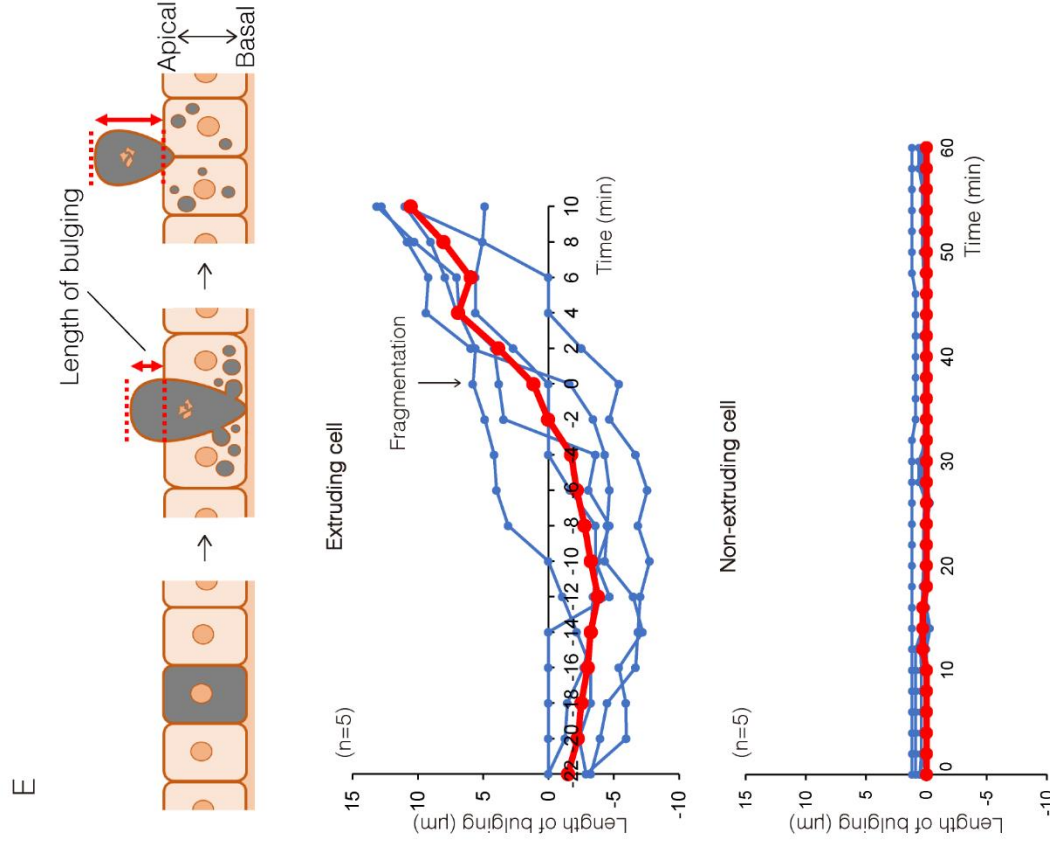




(C) 膜GFP発現MDCKII細胞とRFP発現MDCK細胞の共培養によるモザイク解析の画像。白矢頭はRFPを発現している脱落細胞（アスタリスク）における出芽部位を示し、黄色矢頭はGFPを発現している隣接細胞内の膜GFPとRFPを含む小胞を示す。(D) MDCK細胞の共培養条件下（x-y平面像およびx-z断面像）での、RFPを発現する脱落細胞（アスタリスク）におけるbasal側の小胞形成（白矢頭）および、同時にかかる脱落細胞のapical側の突出（白矢印）（8 image、10/10脱落細胞）。

Figure 1





(E) 定量化した脱落細胞または非脱落細胞のapical端面と細胞層のapical端面との距離を示す模式図 (詳細な定量方法は4.材料及び方法に記載する)。Time 0を小胞形成の開始と定義し、グラフ中の青線は個々の脱落細胞の突出の距離を、赤線は平均値を示す。(F) 膜GFP発現MDCKII細胞におけるLysoTracker染色の画像。脱落細胞 (アスタリスク) の小胞形成に由来する、隣接細胞で貪食された小胞 (白矢頭) は、その後、30-60分でLysoTrackerシグナル陽性となった (32/36脱落細胞)。(G) 脱落開始前と脱落完了後のEpH4細胞の脱落細胞の体積を、各画像から算出した (詳細な方法は4.材料及び方法に記載する) (3 image、12脱落細胞)。

Figure 1

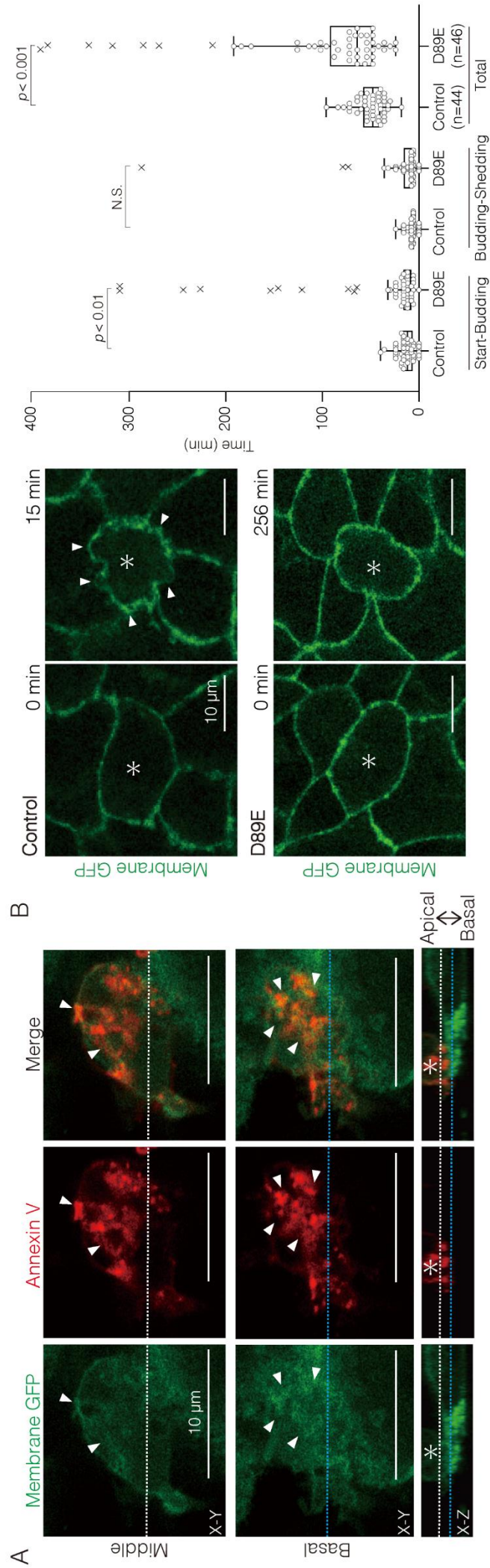
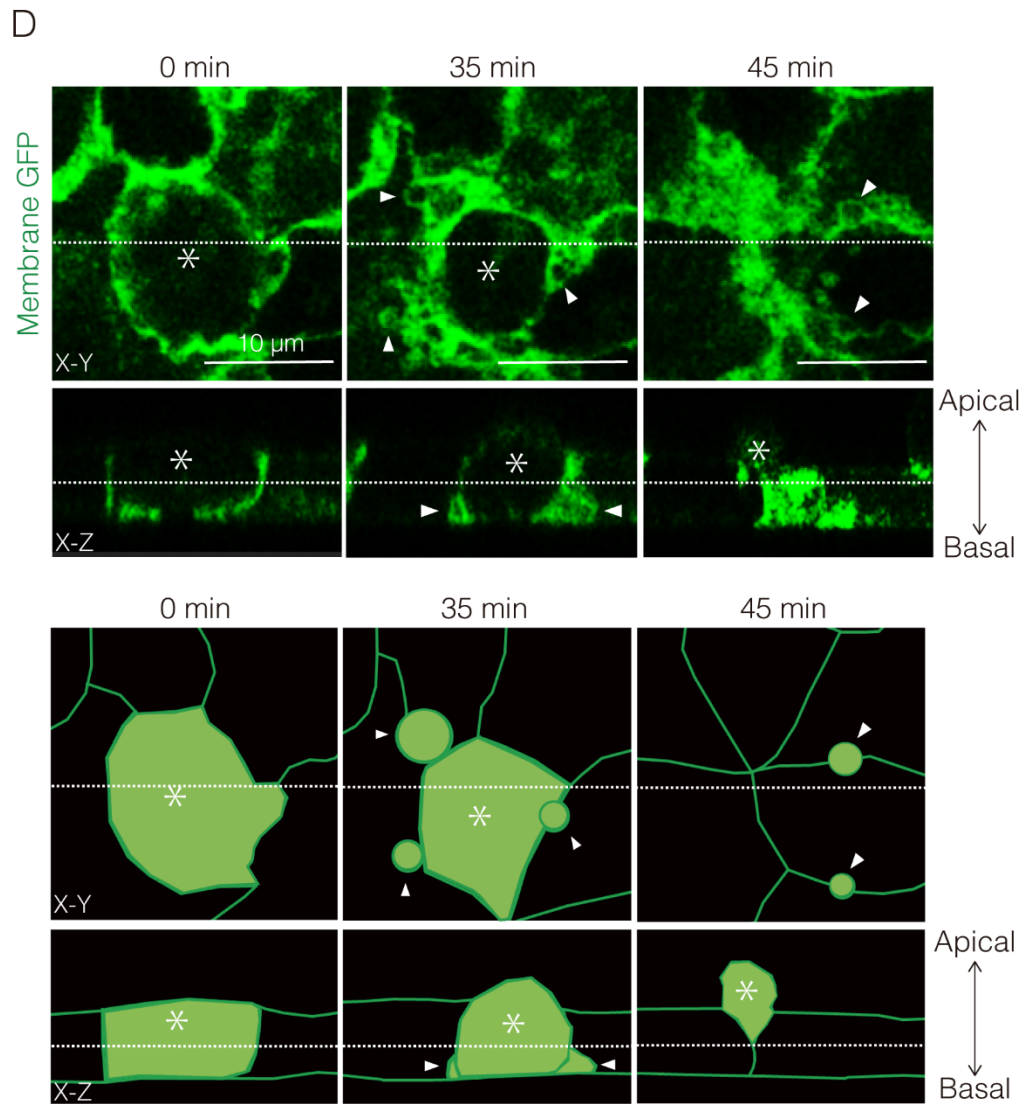


Figure 2





(D) 膜GFP発現EpH4細胞における脱落細胞（アスタリスク）の小胞形成の代表的な画像と、それに対応する模式図（x-y平面像またはx-z断面像）。小胞（白矢頭）は隣接細胞に貪食されず、細胞間隙を遊走する（9 image、10/10脱落細胞）。

Figure 2

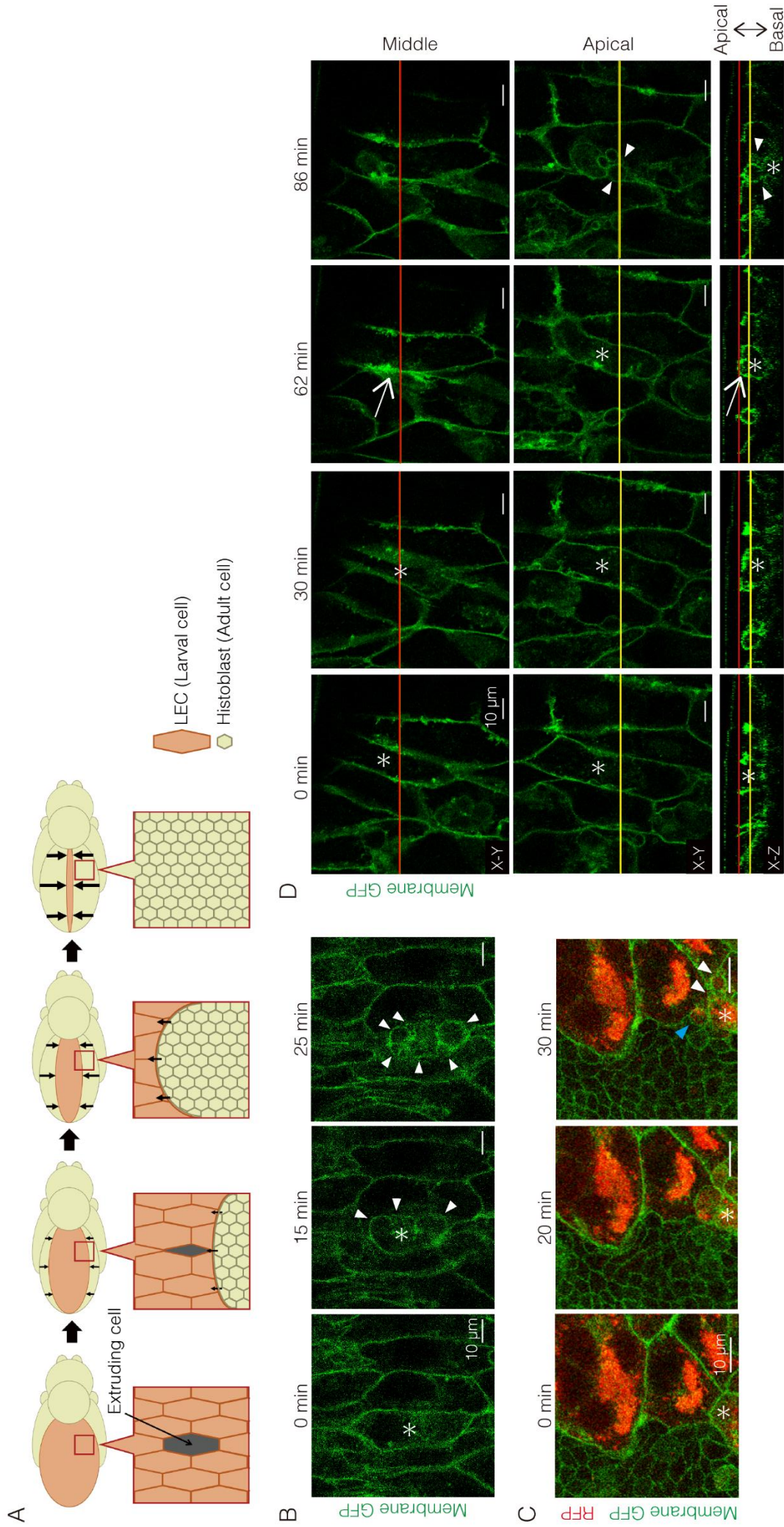
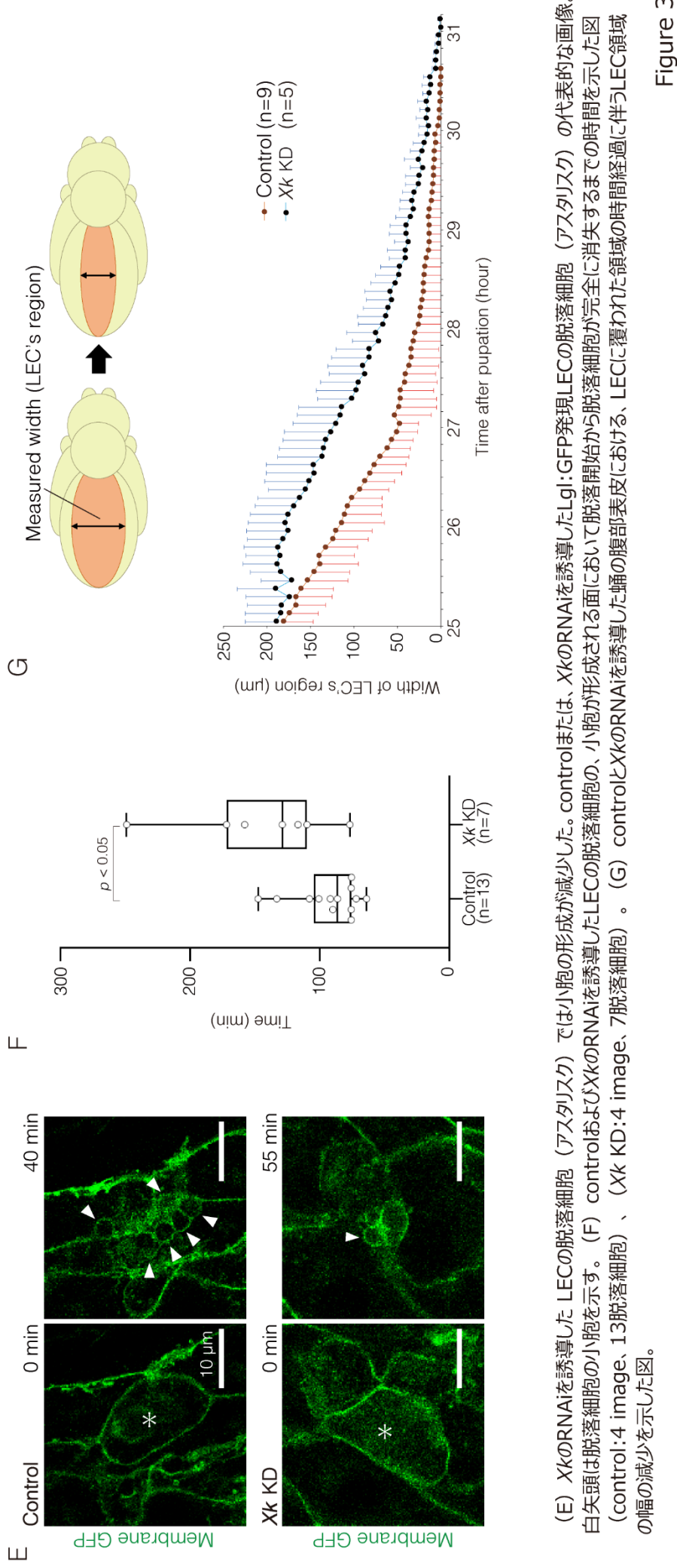
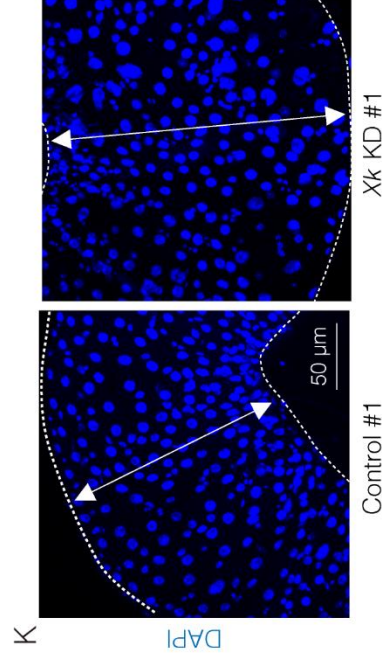
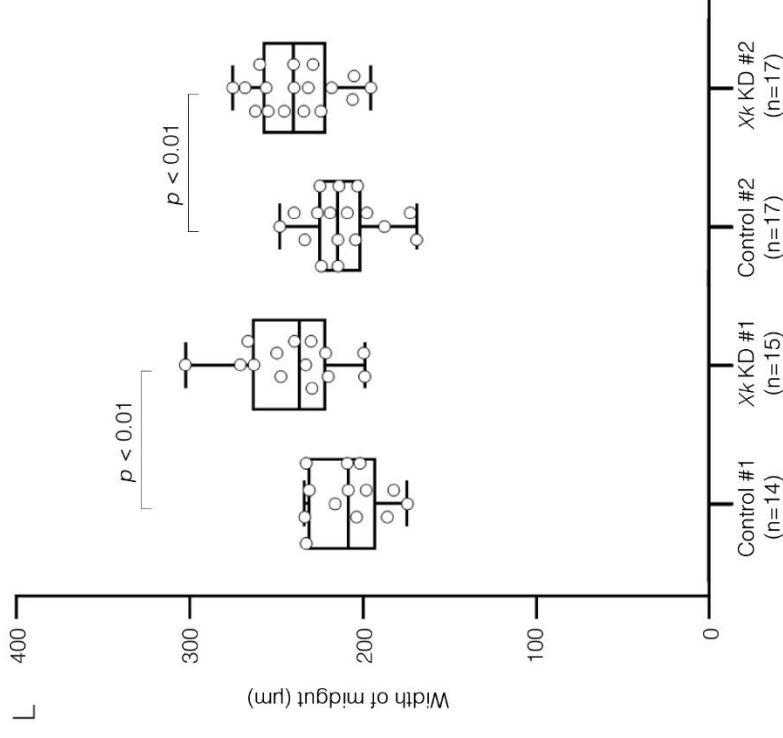
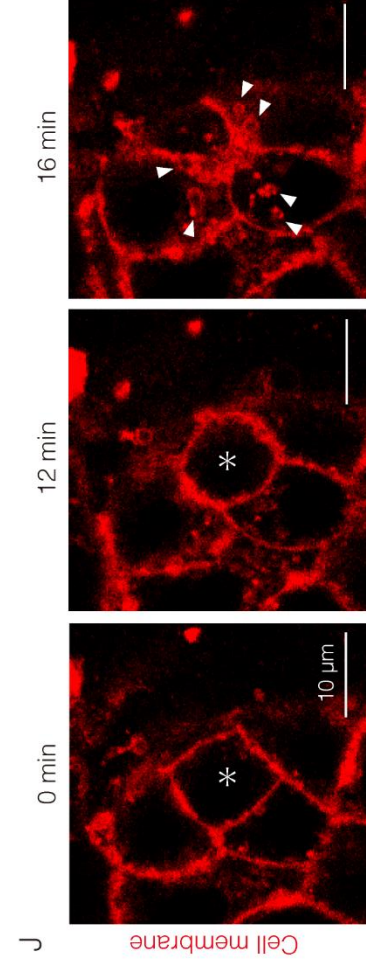
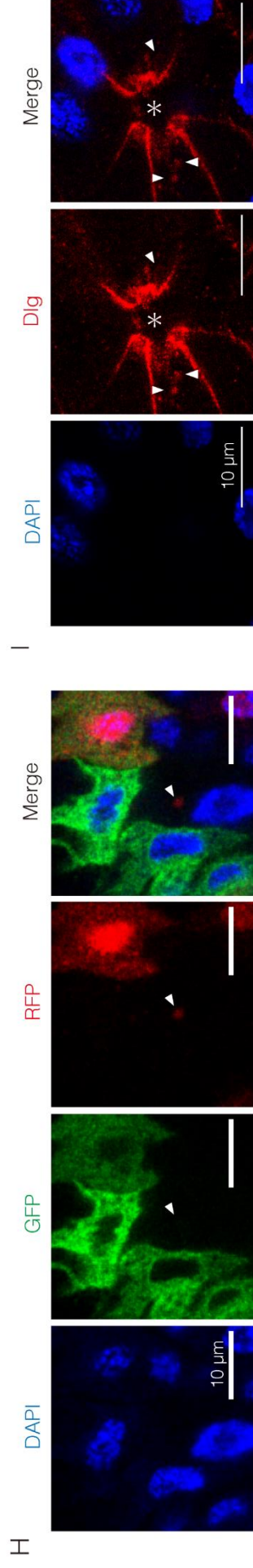


Figure 3. PSの露出を介した脱落細胞の小胞形成は、ショウジョウバエの蛹腹部表皮における細胞脱落の実行を促進し、組織の発達に寄与する (A) ショウジョウバエの蛹の腹部表皮でLECがhistoblastに置き換わる際の細胞脱落の図。 (B) Lgl:GFP (膜GFP) を発現する蛹腹部表皮における脱落したLEC (アスタリスク) の小胞形成 (白矢頭)。 (C) LECのみがRFPを発現し、LECとhistoblastの両方がLgl:GFPを発現している蛹の腹部表皮の画像。白矢頭、青矢頭はそれぞれLECとhistoblastにおける脱落細胞 (アスタリスク) 由来のRFP陽性の小胞を示す。 (D) Lgl:GFPを発現している脱落するLEC (アスタリスク) の小胞形成 (白矢頭) は、隣接する細胞同士によるapical面の閉鎖 (矢印) の直後に起こった。小胞の形成はLECのapical側で起こり、LECはbasal方向へ脱落する。Apical側および、中央付近のx-y、x-z断面像を示す。







(H) 及び (I) ショウジョウバエの成虫の中腸上皮における小胞形成と貪食の像。(H) DAPIで染色した、中腸上皮におけるモザイク解析の代表的な画像。各上皮細胞はGFPまたはRFP、あるいはその両方をランダムに発現している。蛍光非発現細胞にRFP陽性の小胞（白矢頭）が観察された。(I) 中腸上皮におけるDilgとDAPIの免疫染色の画像。脱落細胞（アスタリスク）に隣接する細胞で貪食された小胞（白矢頭）が観察された。(J) CellMaskで染色したマウスの小腸由来のオルガノイドにおける脱落細胞（アスタリスク）のbasal側半分の小胞形成（白矢頭）を示した画像。(K) ショウジョウバエの成虫の中腸において、中腸上皮細胞特異的なRNAiによるxkノックダウンを、GeneSwitchシステムを用いて誘導した。DAPIで染色したcontrolとRNAiを誘導した中腸（領域4<sup>20</sup>）の代表的な画像（Max intensity projection）。破線は各中腸を示す。(L) controlおよび、XkのRNAiを誘導した中腸（領域4<sup>20</sup>）において (J) の両側矢印で示した中腸の幅を測定した図。



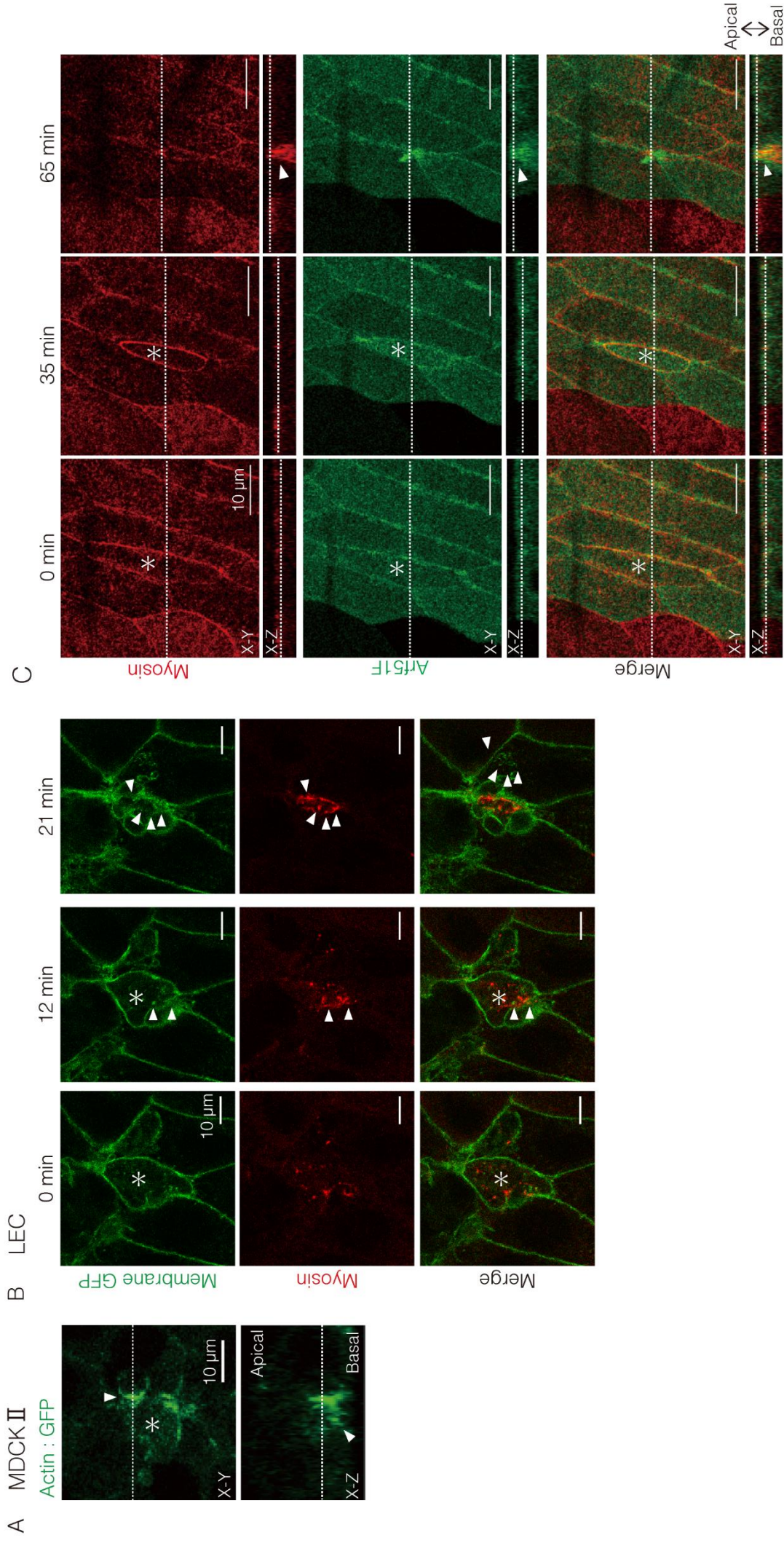
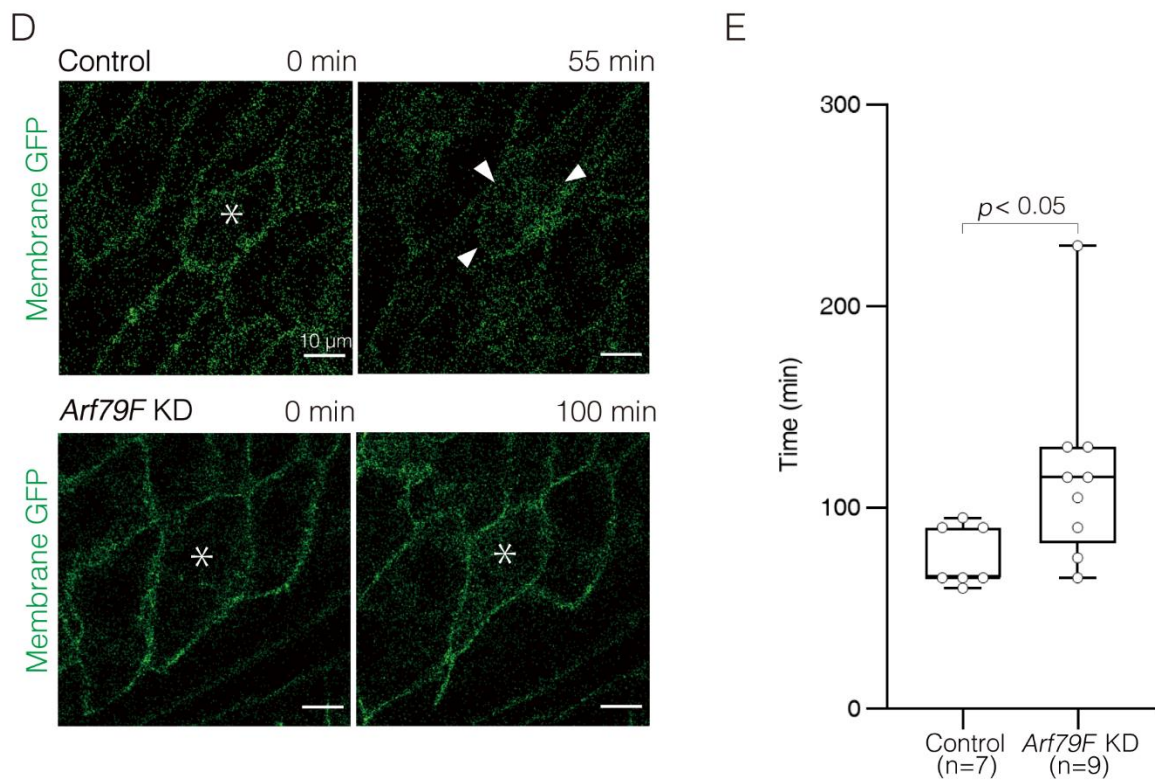


Figure4. Arfファミリーが介在するEV形成は、ショウジョウバエの蛹腹部表皮において効率的な細胞脱落を促進する

(A) Actin:GFPを発現するMDCKII細胞の脱落細胞（アスタリスク）では、basal側半分の出芽部位にアクチン（白矢頭）が集積している。(B) Lgl:GFPおよびsqh (myosin regulatory right chain) :mKate2を発現するLECにおける脱落細胞（アスタリスク）の小胞形成部位の根本部分に集積するmyosinの画像（白矢頭）。(C) Arf51F:GFPおよびsqh:mKate2を発現するLECにおいてArf51Fの局在を示した画像。脱落するLEC（アスタリスク）のapical側にArf51Fが集積する（白矢頭）。

Figure 4





(D) controlと*Arf79F*のRNAiを誘導したLgl:GFPを発現するLECの代表的な画像。アスタリスクは脱落細胞、白矢頭は小胞を示す。  
 (E) controlおよび*Arf79F*のRNAiを誘導したLECの、小胞が形成される面において、脱落開始から脱落細胞が完全に消失するまでの時間を示した図 (control : 4 image、7脱落細胞)、*Arf79F* KD : 2 image、9脱落細胞)。

Figure 4

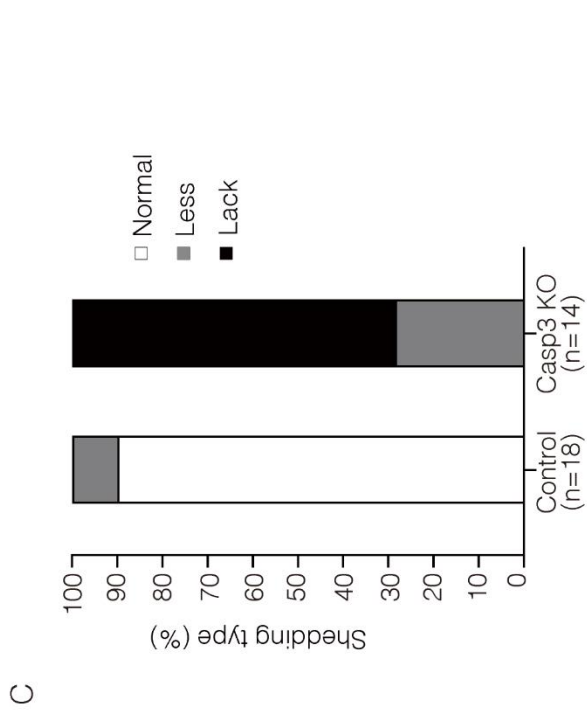
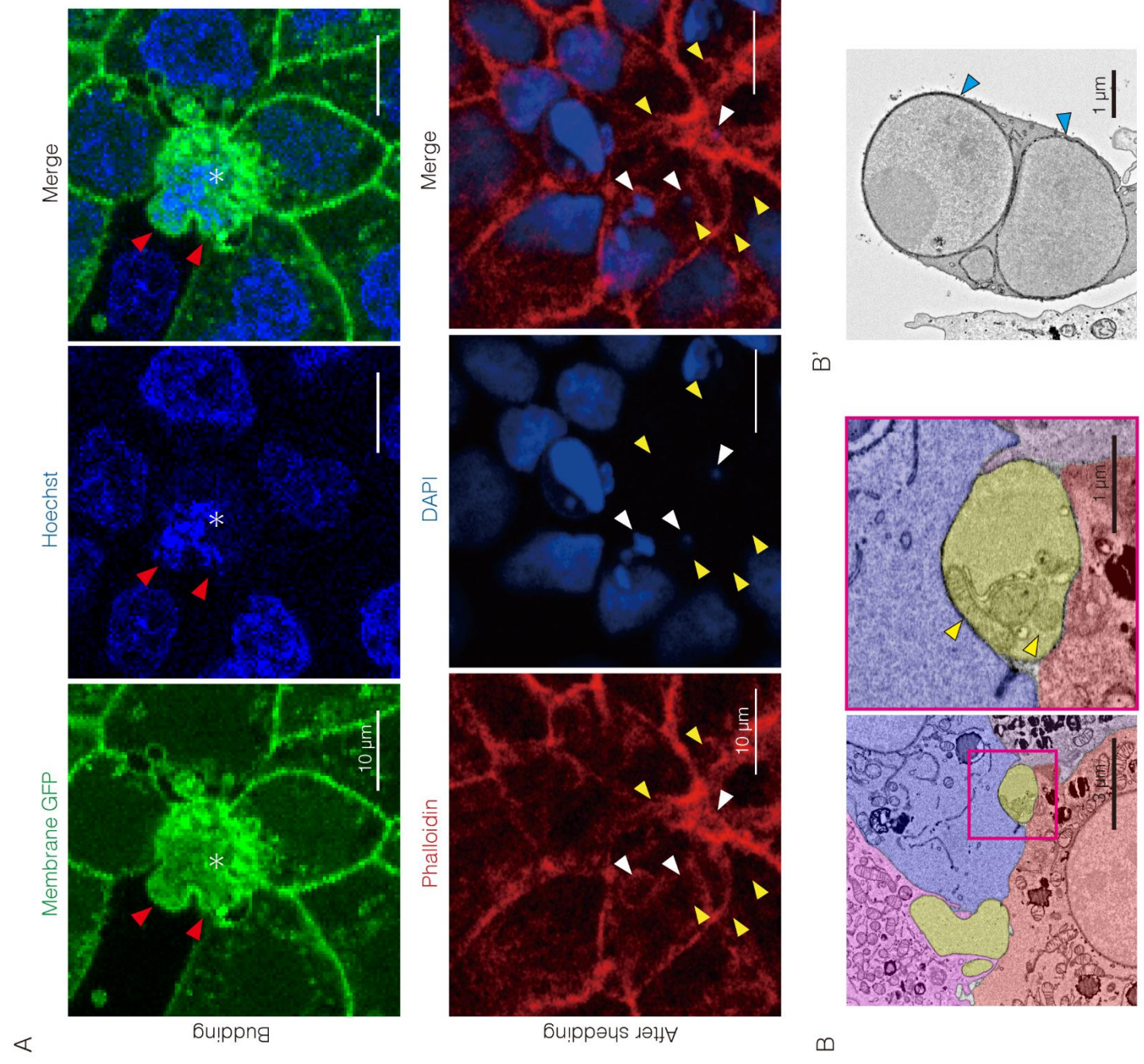


Figure5. 脱落細胞が形成した小胞はアポトーシス小体の特徴を示す  
 (A) 脱落細胞由来の小胞内のDNAシグナルを示した画像。脱落したMDCKII細胞 (アスタリスク) の出芽中 (上段、赤矢頭) または小胞形成・貪食後 (下段、白矢印) の小胞内のDNAの代表画像。D NAはHoechst (上段、白矢印) または、DAPI (下段) で染色し、細胞膜と小胞は膜GFP (上段) またはPhalloidin (下段) で可視化した。黄矢頭は、DNAシグナルを含まない小胞 (下段)。(上段: 7 image、18脱落細胞)、(下段: 6 image、14脱落細胞)。(B、B') 各細胞、または小胞を識別するための疑似色を付けた、脱落細胞および形成された小胞の代表的な電子顕微鏡像。(B) EpH4細胞の細胞間隙に存在するミトコンドリア (黄矢頭) を含む小胞 (黄色疑似色)。(B') MDCKII細胞の核断片 (青矢頭) を含む小胞。(C) controlとcaspase3ノックアウトEph4細胞における脱落細胞の小胞形成パターンの分類。

Figure 5





A

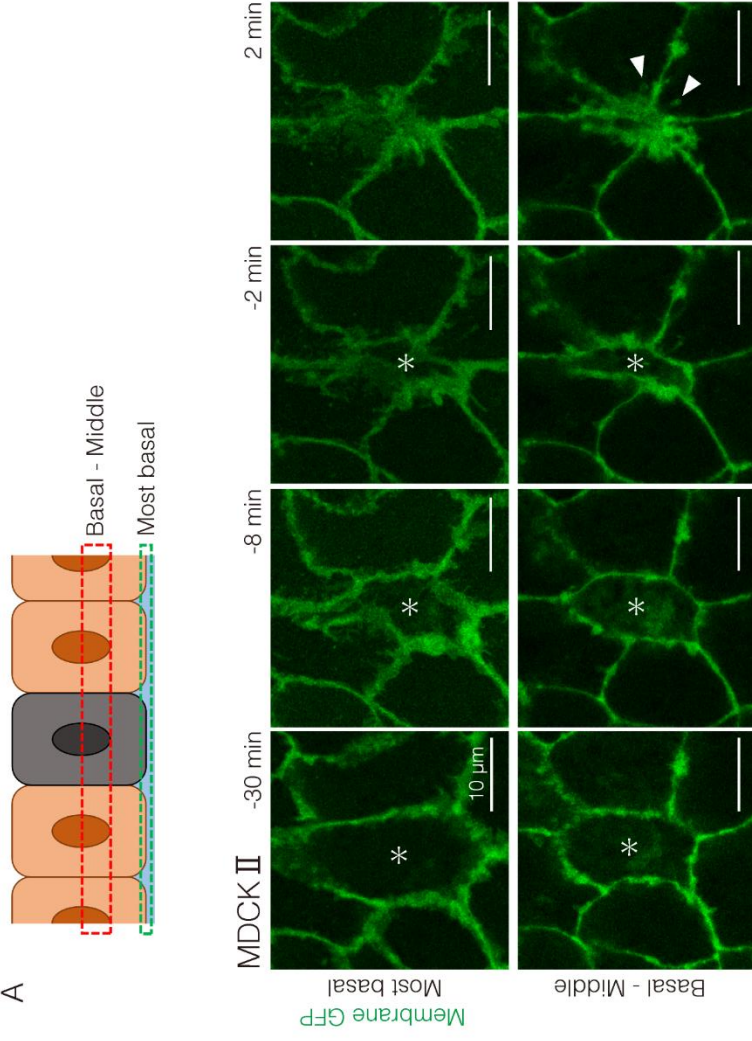
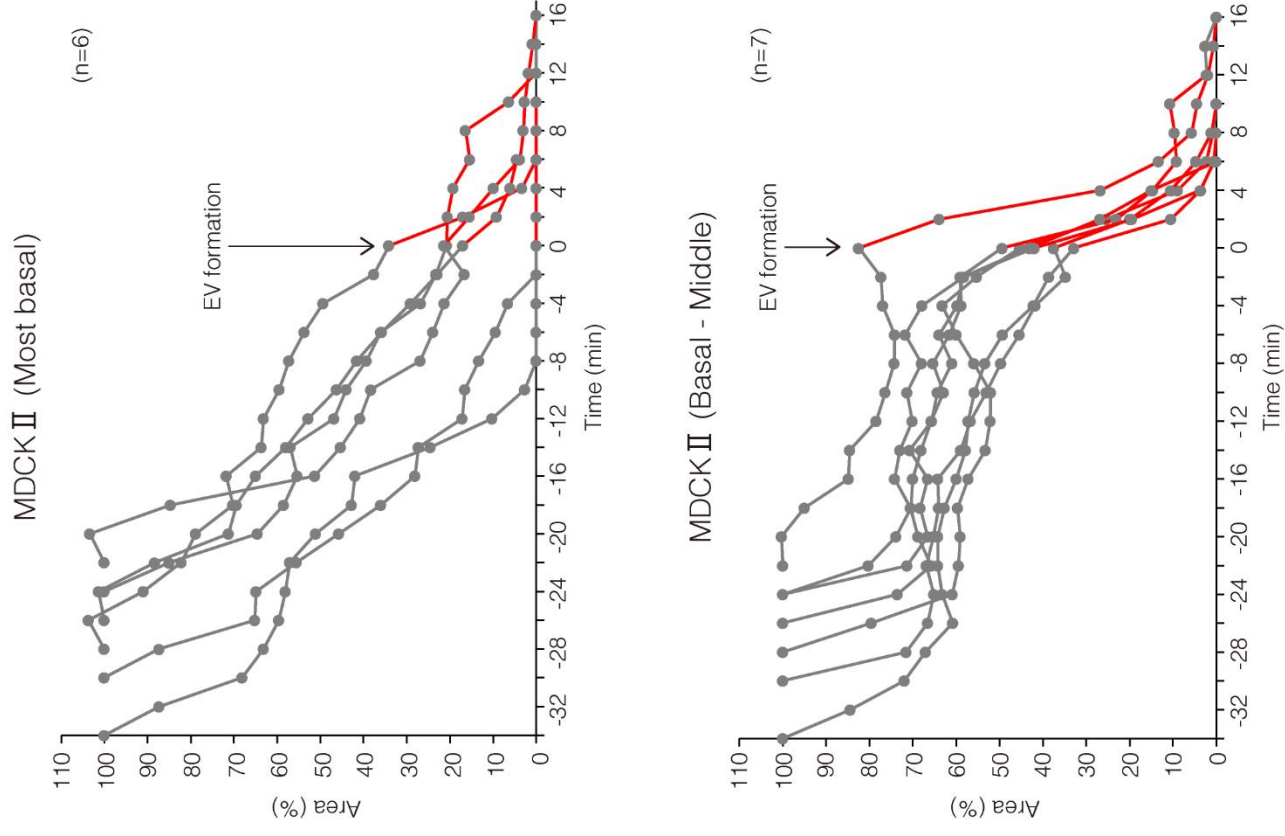
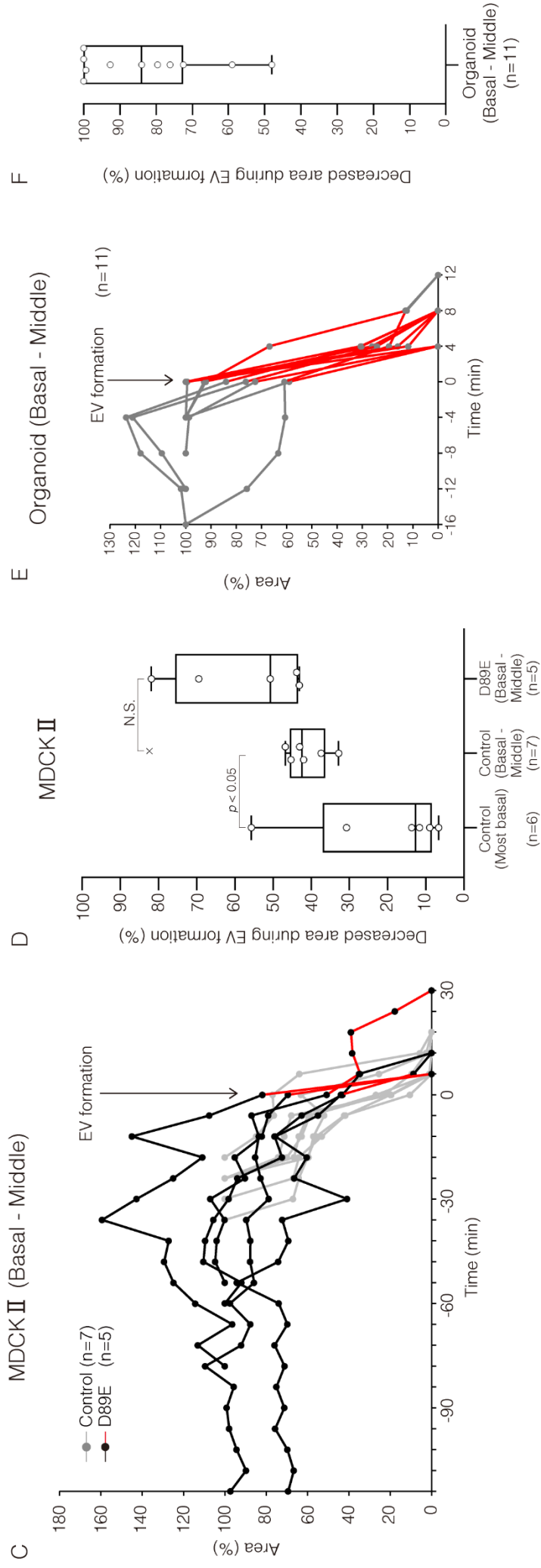


Figure6. 小胞の形成は、隣接細胞の侵入のための空間形成を介して、細胞脱落を促進する  
 (A) 膜GFP発現MDCKII細胞（アスタリスク）の脱落細胞における、最も基底側（Most basal）のx-y平面像と、小胞形成が頻繁に起こる領域（Basal-Middle）のx-y平面像における代表的な画像。白矢頭は形成された小胞を示す。  
 (B) 膜GFPを発現するMDCKII細胞のMost basalおよびBasal-Middleのx-y平面（Aに示す）における脱落細胞の面積の経時的変化を定量化した図。100%は細胞脱落開始時の面積と定義する。赤線は小胞の形成期間、Time 0を小胞形成開始と定義する。

Figure 6

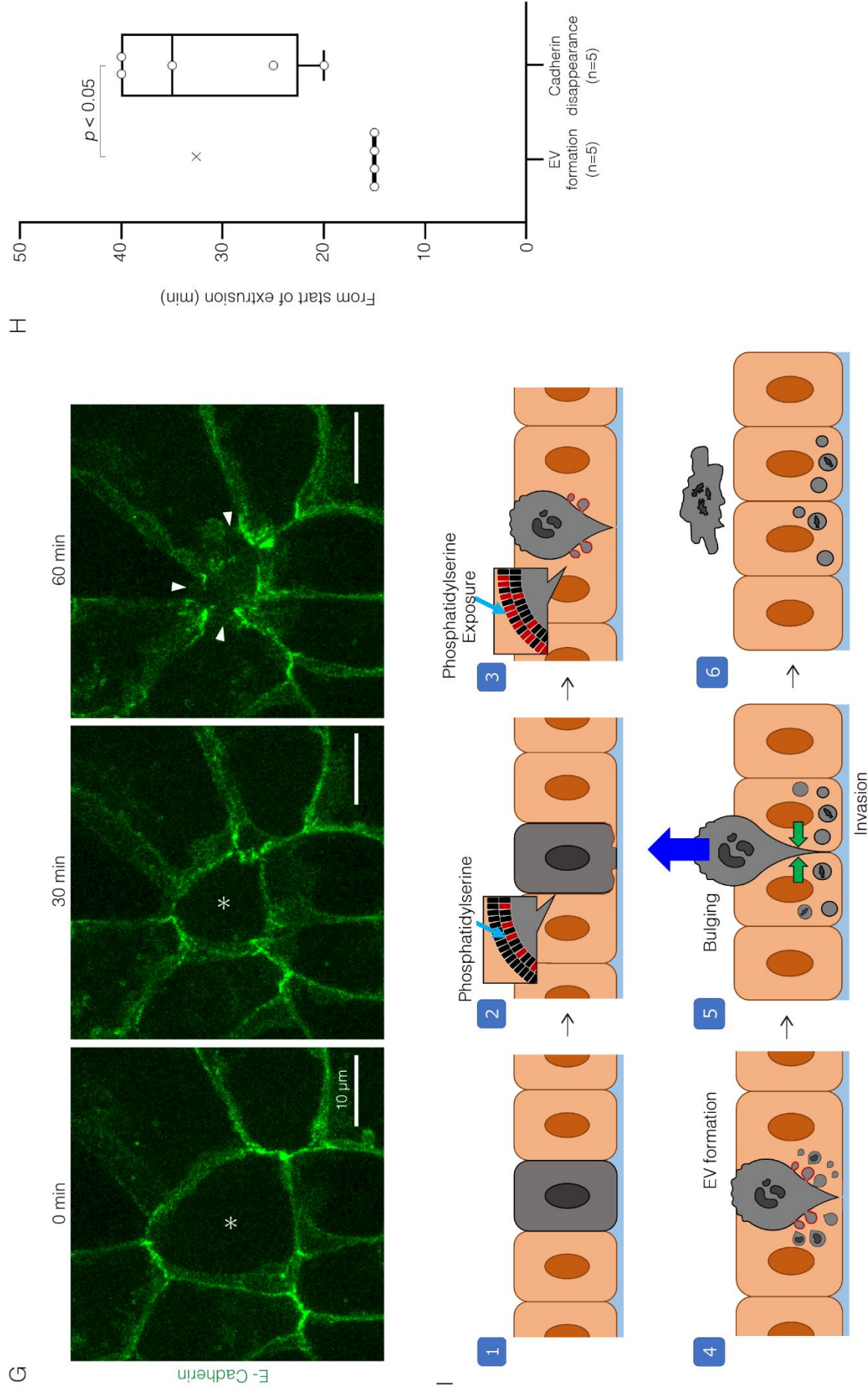
B





(C) MFG-E8 D89Eを過剰発現させた (黒線)、またはさせなかった (灰色線) 膜GFP発現MDCKII細胞のBasal-Middleのx-y平面における脱落細胞の面積の経時的変化を定量した図。赤線はMFG-E8 D89E発現細胞における小胞の形成期間を示す。(D) MFG-E8 D89Eを過剰発現させたMDCKII細胞の脱落開始時と小胞形成後の脱落細胞の断面積をcontrolと比較した。Most basalおよびBasal-Middleのx-y平面において、小胞形成により減少した面積の比率を示した図。(E) マウスの小腸由来のオルガノイドにおける細胞脱落の、Basal-middleのx-y平面の経時的変化を定量した図。100%は細胞脱落開始時の面積と定義する。赤線は小胞の形成期間、Time 0を小胞形成開始と定義する。(F) オルガノイドの脱落細胞のBasal-Middleのx-y平面において、小胞形成により、減少した面積の比率を示した図。

Figure 6



(G) E-cadherin:GFPを発現するEph4細胞が脱落する際 (アスタリスク) のアドヘレンスジャンクション消失 (白矢頭) の代表的な画像。(H) 脱落するE-cadherin:GFP発現Eph4細胞における小胞形成 (CellMaskにより細胞膜を可視化した) とE-cadherinが消失するタイミング (いずれも脱落開始からの時間) を示した図。箱ひげ図中の十字は外れ値を示す。(I) 実験結果に基づいて、提案する細胞脱落の実行モデル。

Figure 6



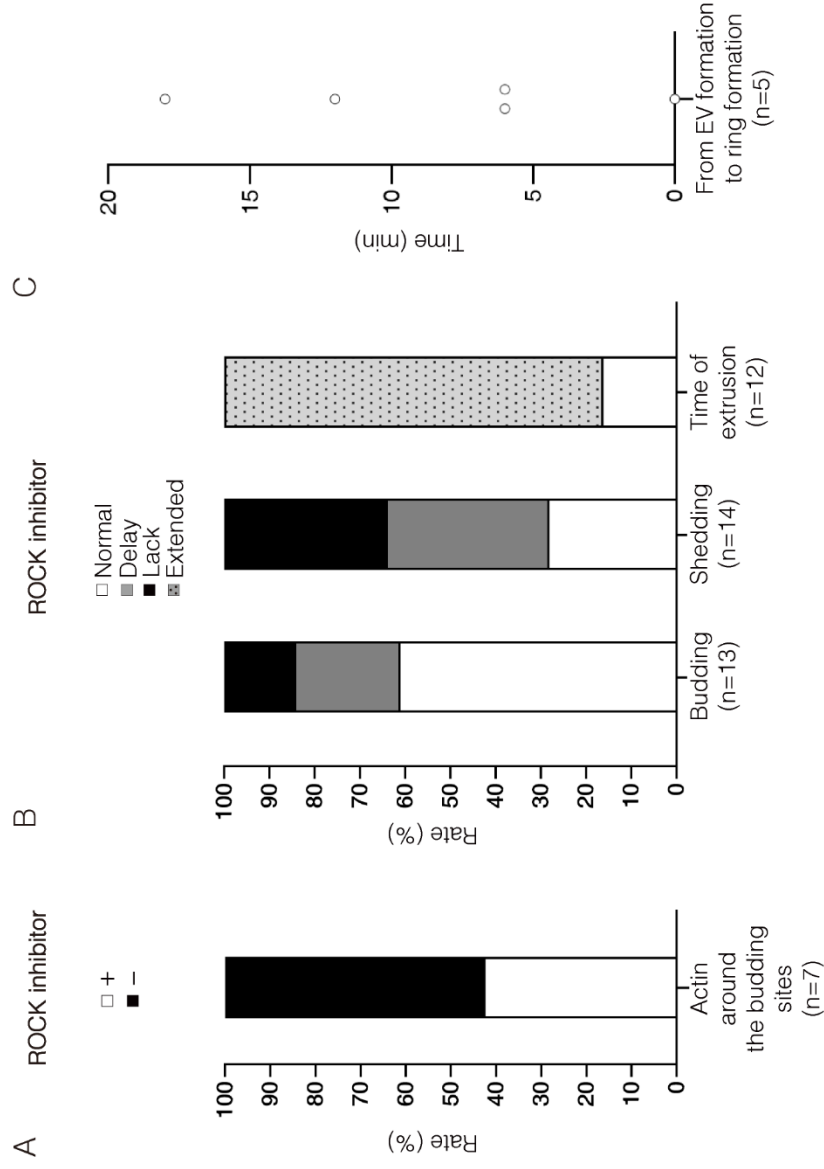
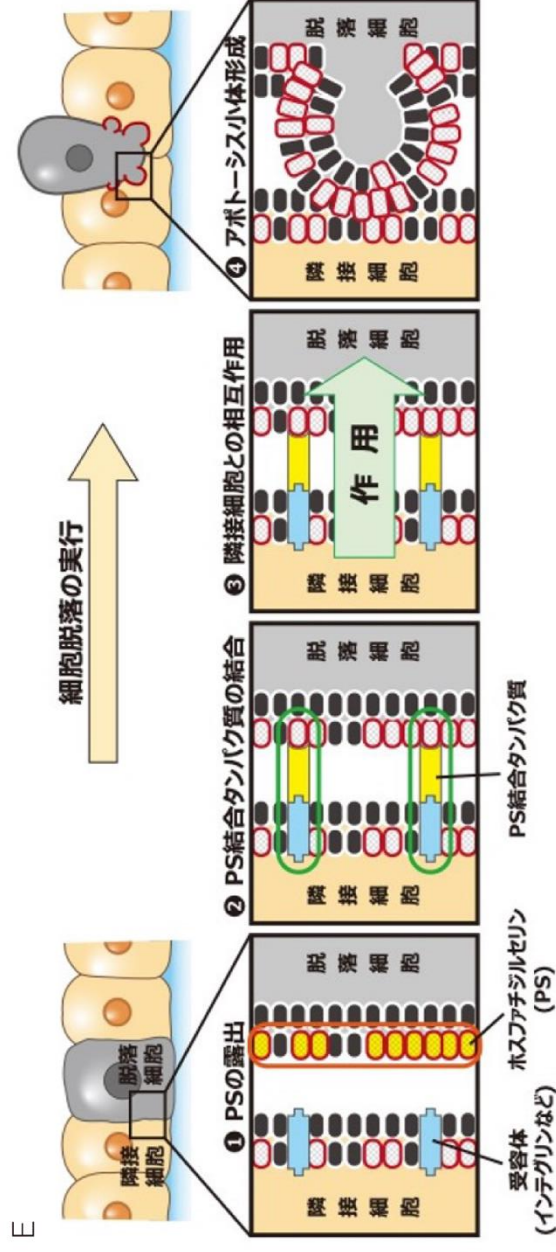
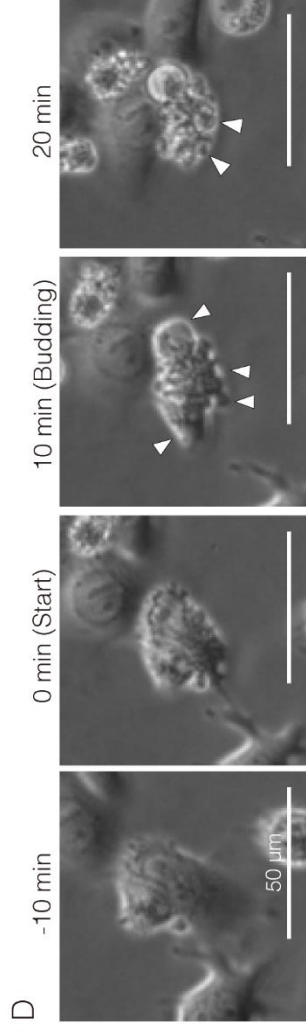


Figure7. 脱落細胞と隣接する細胞におけるアクチンの動態及び、隣接細胞の作用

(A) Lifeact:mRuby2発現EpH4細胞と非発現EpH4細胞との共培養において、ROCK阻害剤処理により小胞の出芽部位周辺にアクチンが蓄積した脱落細胞(+)と蓄積しなかった脱落細胞(-)の割合を示した図(4 image、7脱落細胞)。(B) (A)に示した実験における、出芽(左)または小胞形成(中)延長や欠損、および細胞脱落に要する時間(右)の延長が観察された脱落細胞の割合を示した図(4 image、12~14脱落細胞)。(C) 脱落細胞の小胞形成からアクチンのリング構造が出現するまでの時間を示した図。小胞形成がアクチンのリング構造の形成に先行していることを示す(4 image、5脱落細胞)。

Figure 7



(D) 非コンフルエント条件下でetoposide処理によりapoptosis誘導されたEpH4細胞の脱落の代表的な画像。白矢頭は、小胞形成することなく死滅した脱落細胞における出芽部位を示す。

(E) 脱落細胞の露出したPSがPS結合タンパク質を介し、隣接細胞の作用を受けることで細胞外小胞が形成されるモデルの予想図。

Figure 7