

正常上皮細胞と変異上皮細胞間の相互作用

梶田 美穂子, 藤田 恭之

がん遺伝子やがん抑制遺伝子の発見以来, それらの変異がどのように細胞のがん化に関与しているか, その分子メカニズムの解明は飛躍的に進んできた. 一方, 我々の体の中ではがん細胞は正常細胞に囲まれているという事実は, これらの研究においてあまり顧みられることはなかった. 近年, 正常上皮層内で最初の変異が生じた際に, 変異細胞とそれを取り囲む正常上皮細胞の間で様々な現象が起こることが報告されてきた. また, ある条件下では正常細胞と変異細胞が互いの差異を認識し, 両者の細胞内シグナル伝達に相互に影響を与えることが明らかになってきた. この総説では, 『正常上皮細胞と変異上皮細胞との相互作用』という新しい分野における最新の知見を紹介し, また将来の展望と問題点, 臨床研究への応用について概説する.

1. はじめに

我々の体の中で起こるがんの80%以上は, 肺・胃・大腸・乳腺などの上皮細胞由来のものである. また, 臨床で検出されるがんの多くでは, 複数の変異ががん遺伝子やがん抑制遺伝子に起こっていることが知られている. 1980年代から数多くのがん遺伝子・がん抑制遺伝子が発見されてきた. 以来, それらがコードする発がんタンパク質・がん抑制タンパク質がどのタンパク質と結合し, また細胞内シグナルにどのような影響を及ぼすかについて, 多くの研究者によって精力的に研究されてきた. その結果, それらの変異が細胞の増殖, 分化, アポトーシス, 運動能など様々な現象に関わっていることが明らかになってきた. さらに, 組織特異的ノックアウトあるいはノックインマウスの解析などによって, 変異が *in vivo* でどのようにがん化に関わっているかについても情報が蓄積されてきた. このように, 発がんタンパク質・がん抑制タンパク質の変異が cell-autonomous (自律的) に細胞に与える影響については, 研究が大きく進展してきた.

一方, 我々の体の中ではがん細胞は正常細胞に囲まれているという事実は, これらの研究においてあまり顧みられることはなかった. また技術的に難しいこともあり, 正常上皮層内の細胞に最初の変異が起こった際にどのような現象が発生するのかについては未だ明らかにされておらず, がん研究におけるブラックボックスとなっている. 正常上皮細胞は, 隣の細胞に変異が起こったとき, それを感知することができるのであろうか? また, 変異細胞に何かのアクションを起こすのであろうか? 一方, 変異細胞も正常上皮細胞との差異を感知し, 何らかの行動を起こすだろうか? あるいは, 正常細胞, 変異細胞ともにお互いを無視し合うだろうか? 実は, これらの疑問は決して新しいものではなく, 正常細胞と変異細胞が混在した時にお互いの行動・性質に影響を与えることは以前よりいくつか報告されていた¹⁻⁴⁾. そして, さらに数年前より, ショウジョウバエと脊椎動物において, 正常上皮細胞層で変異が生じた際に起こる様々な現象について, 分子レベルでの解明が少しずつ進んできた (表1). この総説では, 正常上皮細胞と変異細胞との相互作用についての最新の知見および将来の展望について概説する. また, 上皮がん細胞と基底 (basal) 側にある繊維芽細胞や血管内皮細胞との相互作用も現在ホットなトピックになっているがそれについては, 他の総説を参考にされたい⁵⁾.

Interaction between normal and transformed epithelial cells
Mihoko Kajita and Yasuyuki Fujita (Medical Research Council, Laboratory for Molecular Cell Biology and Cell Biology Unit, and Department of Cell and Developmental Biology, University College London, Gower Street, London, WC1E 6BT, United Kingdom)

表1 正常上皮細胞と変異細胞の相互作用

変異	現象	文献
ショウジョウバエ		
<i>Minute</i>	<i>Minute</i> 変異細胞のアポトーシス	Morata et al. ²⁾
<i>Myc</i>	<i>Myc</i> 発現量の少ない細胞のアポトーシス	Moreno et al. ⁹⁾ de la Cova et al. ⁸⁾
<i>Src (Csk)</i>	<i>Src</i> 活性化細胞の基底側への離脱およびアポトーシス	Vidal et al. ⁶⁾
<i>Scribble</i>	<i>Scribble</i> 変異細胞のアポトーシス	Brumby et al. ¹⁸⁾
<i>Ras</i>	<i>Ras</i> 活性化細胞の頂端側あるいは基底側への離脱	Hogan et al. ²⁴⁾
	<i>Ras</i> 活性化細胞を取り囲む正常細胞のアポトーシス	Hogan et al. (未発表データ) Karim et al. ³⁰⁾
脊椎動物		
<i>Ras</i>	<i>Ras</i> 活性化細胞の頂端側への離脱あるいは基底側への突起形成	Hogan et al. ²⁴⁾
<i>Src</i>	<i>Src</i> 活性化細胞の頂端側への離脱	Kajita et al. (未発表データ)

2. ショウジョウバエにおいて

ショウジョウバエは遺伝子導入・欠失が比較的容易に操作できること、多数の突然変異体のストックが入手可能であることなどからがんのモデルシステムとして盛んに利用されている⁹⁾。上皮細胞の研究には、将来成虫の翅や脚に分化する幼虫体内の成虫原器 (imaginal discs) がよく用いられる。また、ショウジョウバエでは遺伝子の発現をモザ

イク様にコントロールすることが可能であることから、正常細胞と変異細胞の相互作用を観察するのに適した研究材料であるといえる。

まず、1975年にMorataらにより、正常細胞と変異細胞が共存した時に起こる興味深い現象が発表された²⁾。*Minute* はリボソームタンパク質に起こる変異である。*Minute* のホモ接合体ショウジョウバエはタンパク質合成が起こらないことから致死になるが、ヘテロ接合体ショウジョウバエは成虫への発達が多少遅れるものの、生存可能でありサイズもほぼ正常となる。だが面白いことに、正常細胞と*Minute* 細胞を混在させると、*Minute* 細胞はアポトーシスによって除外され、正常細胞が*Minute* 細胞の細胞死を補うように増殖し最終的な個体のサイズは保たれることが観察された。このデータは正常細胞と変異細胞の間で生存を争うバトルが繰り返されることを示唆している。しかし、どのようにして正常細胞に囲まれた時にのみ*Minute* 細胞のアポトーシスが引き起こされるのか、その分子メカニズムは少しずつ明らかになってきたものの⁷⁾、未だ完全には理解されていない。Morataらの論文の発表後30年近くこの現象が顧みられることはなかったが、近年になって、ショウジョウバエの正常上皮細胞と変異細胞の間で non-cell-autonomous (非自律的) に起こる様々な現象が相次いで発表された。ちなみに cell-autonomous な現象とは、変異が細胞に生じた際にそれが細胞内に引き起こす変化を指す。一方、その変異がもたらす変化が、変異細胞を取り巻く環境にも影響される時、それを non-cell-autonomous な現象という。正常細胞と変異細胞が生存を争う現象は、

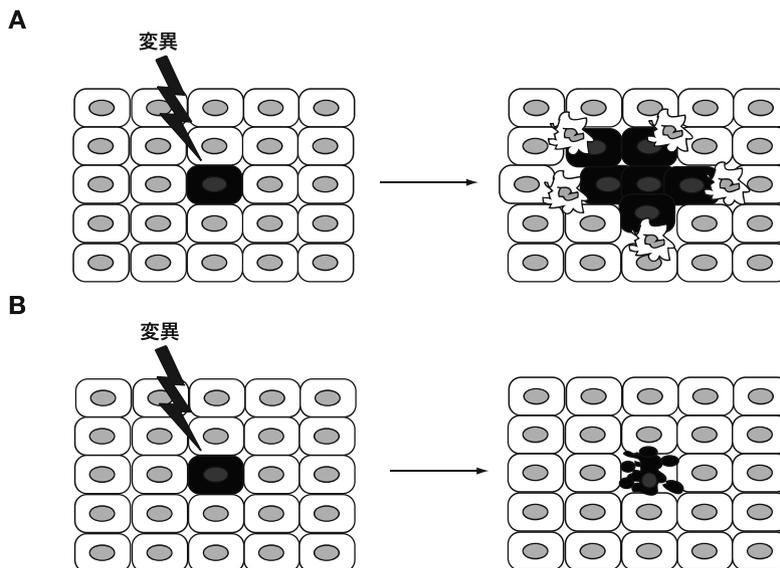


図1 Cell competition

(A) 変異細胞は『super-competitor』となり、周囲の正常細胞のアポトーシスを引き起こしながら増殖し、空いたスペースを埋めていく。変異例：*Myc*。
(B) 変異細胞は正常細胞に取り囲まれるとアポトーシスを起こし上皮細胞層より除かれる。変異例：*Minute*, *Scribble*。

ショウジョウバエの分野で cell competition (細胞間競争) と呼ばれ、大きな注目を集めつつある (図 1)。以下、正常上皮細胞とがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子変異細胞との相互作用についての最近の知見について触れていく。

2-1. Myc 変異細胞と正常細胞

Myc タンパク質は、タンパク質合成やその他の代謝を司る様々な遺伝子群の発現をコントロールする転写因子である。また、Myc はマウスやヒトの腫瘍で過剰発現が高率に見られるがん遺伝子でもある。ショウジョウバエの上皮細胞でも、Myc の過剰発現が cell-autonomous に細胞増殖を亢進させることは知られていた。2004年に Basler と Johnston の二つのグループは、wing disc の上皮細胞層内で Myc の発現量の異なる細胞が混在すると、cell competition が起こることを発表した^{8,9)}。まず、正常細胞と Myc hypomorphic (形質発現の不完全なもの) 変異細胞を混在させたところ、Myc hypomorphic 細胞はアポトーシスによる細胞死を起こし、上皮細胞層より除かれた。Myc hypomorphic 細胞のみが存在した時は、増殖速度は遅いものの細胞死は起こらないことから、この細胞死が non-cell-autonomous な現象であり、正常細胞との境界でのみ起こることが明らかとなった。次に、Myc の発現が通常の2倍多い細胞と正常の細胞を混在させたところ、Myc 過剰発現細胞と接した正常細胞はアポトーシスを起こし、生き残ることができなかった。興味深いことに、正常細胞の細胞死で生じたスペースを補うように、正常細胞と接した Myc 過剰発現細胞の増殖が促進され、最終的に生じた disc のサイズは正常のものと同じであった。このように、Myc 過剰発現細胞は“super-competitor”細胞となり、周りの正常細胞の細胞死を引き起こしながら自らのテリトリーを広げた (図 1A)。なお、disc の前方側の Myc 過剰発現細胞は後方側の正常細胞のアポトーシスを引き起こすことはできなかった。これは、Myc による cell competition が cell-context (細胞環境) 依存性であること、すなわち他の因子がこの現象に影響を与え得ることを示唆している。また、PI3K-p110 やサイクリン D/Cdk4 の過剰発現細胞は cell competition を起こさなかったことから、細胞のサイズあるいは細胞増殖の増加のみでは、同様の現象を誘起しないことが分かる。それでは、どのようにして、Myc の発現レベルの違いがこのようなアポトーシスを引き起こすのであろうか？ Myc 過剰発現細胞の周りの正常細胞では proapoptotic gene の *hid* の発現が亢進しており、それが正常細胞のアポトーシスに関与していることが示唆された⁸⁾。しかしその他の点については、二つのグループのデータにはお互いに矛盾する点があるため明らかな結論は出ていない。また、2007年に Johnston のグループは、ショウジョウバエ由来の S2 培養細胞を用いて、Myc の発現レベルの

違いが引き起こす細胞死に何らかの液性因子が関わっているというデータを発表した¹⁰⁾。この液性因子はまだ同定されていないが、この分子は正常細胞と Myc 過剰発現細胞が共培養された時のみどちらかの細胞で分泌される。このことは、細胞が Myc の発現レベルの違いを何らかの機序で感知し、それに対応してこの液性因子の分泌を制御していることを示唆している。しかし、どのようにしてお互いを認識しているのか、その分子メカニズムは未だ明らかになっていない。

さて、この Myc による cell competition はどのようにがん化に関わっているのであろうか？ 残念ながら、脊椎動物において、Myc が同様の cell competition を引き起こすかは不明である。が、もしそうであれば、『field cancerization』(正常上皮細胞と見分けのつかない変異細胞群)の形成に関与している可能性が考えられる。臨床の現場では、がんの発見・診断はほとんどの場合、がん細胞の形態的な変化 (たとえば隆起あるいは浸潤を伴った異常増殖など) に基づいてなされる。しかしがんの早期のステージでは、形態的には正常上皮細胞と見分けがつかない変異細胞群が正常の細胞と混じって存在し得ることが、数多くの上皮組織で明らかになってきた¹¹⁾。この変異細胞群は『field cancerization』と呼ばれ、がん研究者や臨床病理学者の注目を集めつつある。この状態においては、それらの pre-malignant cancer layer (悪性化する前の変異細胞層) 中の (おそらく一つの) 細胞がさらなる変異を得ることで検知可能ながん細胞になっていくものと考えられている。Myc による変異は上皮細胞では主に細胞増殖や細胞死を制御し、細胞極性・細胞骨格などには影響を与えないため、個々の細胞の形態にはあまり変化を与えない。そのため、もし Myc 変異細胞が、周りの正常細胞の細胞死と共に細胞増殖を進めるならば (cell competition が起こる場合)、上皮細胞構造は正常のものと同じでなくなるであろう。一方、もし Myc 変異細胞の増殖が正常細胞の細胞死を引き起こさないなら (cell competition が起こらない場合)、Myc 変異細胞は増殖後その細胞塊を正常上皮細胞層外に形成し、隆起型あるいは浸潤型の腫瘍として存在するようになるだろう。このように、形態的には見分けのつかない『field cancerization』の研究の進展と共に、がん発生の過程における cell competition の関与を考慮することが、今後ますます必要となってくるものと思われる。

2-2. Src 変異細胞と正常細胞

c-Src (以後、Src と表記) はニワトリのラウス肉腫ウイルスに由来するがん遺伝子 *v-Src* の正常細胞型として同定された非受容体型チロシンキナーゼである¹²⁾。その後の研究により、Src の活性化が様々な種類のがんの悪性化、すなわち転移能や浸潤能の亢進、さらには細胞死に対する抵

抗性に寄与していることが明らかになってきた¹³⁾。また、Srcは細胞の分化・増殖・接着に関わる重要なシグナル伝達分子としても機能している。Srcチロシンキナーゼ活性はSrc分子内のC末端チロシンがCsk (C-terminal Src kinase)によってリン酸化されることで抑制されることが知られている。2006年、CaganらのグループはCsk RNAiを用いてSrcの活性化がどのようにショウジョウバエの上皮細胞の動態に影響を与えるかについて研究成果を発表した¹⁴⁾。まず、wing disc全体の上皮細胞のSrcを活性化したところ、細胞増殖の亢進とアポトーシスの低下により、翅のサイズの増大が認められた。次に、モザイク様にSrcを活性化させたところ、正常上皮細胞とSrc活性化細胞間で起こる興味深い現象が観察された。正常細胞とSrc活性化細胞の境界を詳細に調べたところ、正常細胞と接したSrc活性化細胞は上皮細胞層から基底側へ抜け落ち、その後アポトーシスにより細胞死を起こすことが明らかになった。アポトーシスは、Src活性化細胞の基底側への移動の原因ではなく、結果であることも示された。また、MAPキナーゼの一つであるJNK (別名 stress-activated protein kinase)の活性化がSrc活性化細胞の移動と細胞死の両方に関与していることも明らかになった。さらに、JNK活性化の上流で低分子量Gタンパク質Rhoが働いていることも示された。これらのデータで重要な点は、Src活性化細胞の基底側への移動・細胞死やRho/JNK活性化が、正常細胞に囲まれた時のみ起こる non-cell-autonomous な現象だということである。このことは、正常細胞が何らかの機序でSrc活性化細胞内のシグナルに影響を与えていることを示している。今後の研究によって、Src変異に伴って生じるこれらの現象を司る分子メカニズムの解明がさらに進展していくことが期待される。

2-3. *Scribble* 変異細胞と正常細胞

*Scribble*は2000年にBildlerらによってショウジョウバエでがん抑制遺伝子として機能していることが発表された¹⁵⁾。その後、ヒトの大腸がんや乳がんでも欠損が頻繁に見られることが分かってきた^{16,17)}。*Scribble*はLAP4 protein (16 leucine-rich repeats with 4 PDZ domains)に属する細胞質足場タンパク質である。*Scribble*タンパク質は、正常上皮細胞では細胞膜の側底 (basolateral) 側に局在し、他のがん抑制タンパク質であるIgl (lethal giant larvae) やdlg (disc large) と共に上皮細胞の細胞極性形成に重要な役割を果たしている¹⁵⁾。*Scribble*欠損がショウジョウバエの卵胞上皮細胞やwing disc全体に起こると、細胞極性が失われ、また顕著な細胞増殖の亢進が起こることが観察された¹⁵⁾。

2003年にRichardsonのグループは、*Scribble*変異 (*Scribble*)をeye discでモザイク様に導入することにより、

*Scribble*欠損細胞と正常細胞の間で起こる興味深い現象を発表した¹⁸⁾。正常細胞に囲まれた*Scribble*欠損細胞ではサイクリンE発現の上昇とそれに伴う細胞増殖の増加が観察された。しかし、それを大きく上回るアポトーシスが*Scribble*欠損細胞で起こるために、発生のステージが進むにつれて*Scribble*欠損細胞は上皮細胞層から姿を消していった。さらに、*Scribble*欠損細胞に起こるアポトーシスはJNK活性の亢進に依存することも明らかとなった。しかしどのようにして、正常細胞に囲まれた*Scribble*欠損細胞内でJNK活性化が起こるのかその分子メカニズムは明らかとなっていない。このように、cell-autonomousには細胞増殖を引き起こす*Scribble*欠損が、正常細胞に囲まれた際にのみ non-cell-autonomous に細胞死を引き起こすことが分かった。以前に報告されてきた cell competition の事例 (*Minute*, *Myc* など)では、細胞増殖の遅い細胞がアポトーシスによって除かれていたが、この*Scribble*欠損細胞の研究により、cell competition が細胞増殖速度に関わらず起こり得ることが明らかとなった。それではいったいどのようにして*Scribble*欠損細胞のアポトーシスが誘導されるのだろうか？ これは、自殺、それとも他殺なのであろうか？ 同様の現象は、脊椎動物でも観察されるのだろうか？ 今後の研究によりこれらの疑問が解決されることを期待したい。

3. 脊椎動物 (哺乳類) において

脊椎動物、特に哺乳類においても、正常細胞と変異細胞間で相互作用があることはこれまでいくつか報告されてきた。正常細胞を培養すると、それらの細胞密度が最大飽和に達したとき、増殖と運動は停止する。この現象は接触阻害としてよく知られている^{19,20)}。一方、変異細胞では、この接触阻害機構が失われ、増殖と運動が正常にコントロールされなくなる。1960年代より正常細胞が変異細胞の破綻した接触阻害機構にどう作用するか、主に細胞増殖の視点からいくつかの研究結果が報告されてきた^{1,3,4)}。1964年にStokerは、正常細胞と変異細胞の共培養により、正常細胞が変異細胞の異常増殖を阻害することを報告した³⁾。この論文では、まずハムスター繊維芽細胞株のBHK21細胞、またはマウス胚から採取した初期培養の繊維芽細胞を異なる細胞密度 (スパース (疎) とコンフルエント (密)) で培養した。その上にポリオーマウイルスによって形質転換したBHK21細胞 (Py細胞)を加えた。すると、先に播種した正常細胞の細胞密度が高く接触阻害が起こっている場合に限って、Py細胞によるコロニー (細胞集団) 形成が抑えられた。この現象はコンフルエントな正常細胞に囲まされると、Py細胞の増殖が抑制されることを示している。Stokerらはこの現象をさらに追究し、Py細胞の増殖阻害には培地中の液性因子ではなく、コンフルエントな状態の

正常細胞との接触、もしくは極めて近い距離に存在することが必要であることを明らかにした³⁾。一方、Mehtaらは、正常細胞が変異細胞の増殖を阻害するには、ギャップジャンクションを介した両者のコミュニケーションが必要だということを示した²¹⁾。しかしその後、ギャップジャンクションの構成因子のノックアウトや阻害剤を用いた場合でも、正常細胞による変異細胞の増殖阻害が観察されたことから、細胞同士の接触は必要だが、ギャップジャンクションには依存しないという論文も発表され、ギャップジャンクション以外の因子の関与が示唆されている^{22,23)}。

また上皮細胞では、1998年にJavaherianらは、ヒトの新生児から採取した角化細胞と、活性型H-rasによって形質転換した角化細胞細胞株(HaCaT)とを異なる比率(正常細胞:変異細胞=1:1, 12:1など)で混合し、その混合細胞群をヌードマウスに移植して、生体に近い状態で変異細胞の挙動を調べた。すると、1:1の混合比率では、変異細胞は形態的に異常な細胞塊を形成するが、正常細胞が高率に存在する(12:1)場合、変異細胞の増殖は抑制され、正常細胞と同様に分化することが分かった。この結果は、多数の正常細胞に囲まれた変異細胞が、その異常性を失い正常に復することを示唆し、非常に興味深い。

以上に述べたように、脊椎動物において、正常細胞により変異細胞の異常性が抑制されることは複数報告されてきた。しかし、具体的な分子メカニズムはほとんど分かっていない。さらに、多くの実験では、正常細胞を先に播種しておき、その上に変異細胞をまいて変異細胞の増殖巣形成を測定している。この方法では、変異細胞の異常増殖能に与える影響は見ることができるが、正常細胞層で一つもしくは少数個の細胞に変異が起こった際に生じる変異細胞と正常細胞との相互作用を研究するには適した実験系ではない。これらの理由から、正常細胞と変異細胞の相互作用を分子レベルで解析できる新たなモデル系が必要とされている。そこで、次に我々が確立した上皮細胞を用いた新しいモデル系を用いて得られた知見を紹介する。

3-1. Ras 変異型細胞と正常細胞

Rasは低分子量GTP結合タンパク質の一つであり、その活性型遺伝子変異が30%以上のがんで見出されている。Ras変異型細胞と正常細胞との間で起こる現象を分子レベルで解明するため、われわれは腎上皮由来で非形質転換(non-transformed)のMDCK細胞を用いて、テトラサイクリン添加によりGFP-RasV12(活性化型Ras)の発現を誘導することのできる細胞株(MDCK pTR GFP-RasV12細胞)を樹立した²⁴⁾。まず、テトラサイクリン非存在下で培養したMDCK pTR GFP-RasV12細胞を細胞膜透過型の蛍光物質(CMPTX)で染色した後、正常MDCK細胞と1:100(MDCK pTR GFP-RasV12:MDCK)の割合で混ぜ、コラー

ゲンゲル上で数時間培養した。混合した細胞が細胞間接着を構築し、一層の上皮細胞シートを形成した後、テトラサイクリンを添加しtime-lapse microscopeで細胞の挙動を調べた。RasV12の発現が誘導されてから4-6時間後、RasV12細胞の細胞丈はxz方向(apico-basal)に徐々に伸長した。そして、11-22時間後にRasV12細胞が正常上皮細胞層の頂端(apical)側にはじき出て行く(extrusion)のが観察された(図2A)。このRasV12細胞のapical extrusionは観察した全RasV12細胞の80%程度の頻度で見られた。カスパーゼ阻害剤はextrusionに影響を与えず、また、RasV12細胞ははじき出た後も増殖を続け48時間後には大きな球状塊となった(図3)ことから、RasV12細胞のapical extrusionは細胞死非依存性に起こる現象であることが示唆された。続いて、蛍光染色したRasV12細胞をRasV12細胞と混ぜ上記と同様の条件下で観察したところ、RasV12細胞のapical extrusionは全く起こらなかった(図2B, 3)。これらのデータは、RasV12の発現のみではapical extrusionを引き起こすのに十分でなく、正常細胞との接着が必要であることを示唆している。すなわち、RasV12細胞のapical extrusionはcell-autonomousには起こらず、non-cell-autonomousな現象である。これは、この研究において最も重要な点である。

前述したように、RasV12細胞のapical extrusionは観察したRasV12細胞の80%でしか見られなかった。そこでわれわれは、正常上皮細胞に囲まれながらもapical extrusionしなかったRasV12細胞の解析を行った。興味深いことに、上皮細胞層に留まったRasV12細胞は非常にダイナミックに伸展-退縮する突起(protrusion)を正常細胞の基底側に伸ばすことが分かった(図4)。このbasal protrusionはapical extrusionを起こしたRasV12細胞では全く観察されず、また逆にbasal protrusionを伸ばしたRasV12細胞がapical extrusionを起こすこともなかった。これは、RasV12細胞のapical cell extrusionとbasal protrusionが相反する現象であることを示している。また、このbasal protrusionはRasV12細胞同士の間では見られず、正常細胞とRasV12細胞の細胞間でのみ観察された。これは、RasV12細胞のprotrusion形成もapical extrusionと同様にnon-cell-autonomousに起こる現象であることを示している。

さて、どのような分子メカニズムでRasV12細胞のapical extrusionやbasal protrusionが引き起こされるのだろうか? またどのようにしてそれらの選択が決定するのだろうか? まず我々は様々な阻害剤を用いて、種々のシグナル伝達機構や細胞骨格系がそれらの現象に関与しているか調べた。Rasは10以上の異なる下流ターゲットを有しているが、その中でもRasの引き起こす形質発現に大きく関わっているのがMAPキナーゼおよびPI3キナーゼ経路である。まず、MAPキナーゼ経路阻害剤の効果を調べた

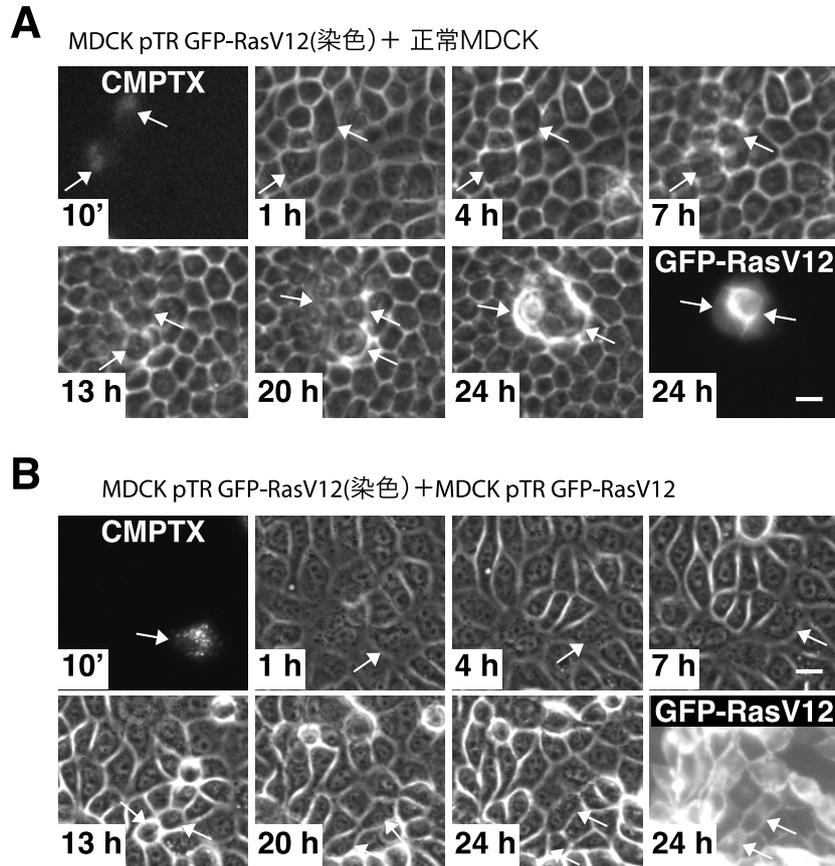


図2 正常細胞との境界でのみ non-cell-autonomous に起こる RasV12 細胞の apical extrusion

MDCK pTR GFP-RasV12 細胞を蛍光物質 (CMPTX) で染色した後 (図中矢印), (A) 正常 MDCK 細胞あるいは (B) MDCK pTR GFP-RasV12 細胞と 1:100 の割合で混ぜ、テトラサイクリンを添加し、time-lapse microscope にて観察した。(文献 24 より一部改変) (A) 正常細胞に囲まれた RasV12 細胞は、分裂を繰り返しながら正常上皮細胞層の頂端側にはじき出される (11-22 時間後). (B) RasV12 細胞の単独培養では、RasV12 細胞はそのまま細胞層に留まる.

ところ、apical extrusion と basal protrusion の両者を強く抑制することが分かった。一方、PI3 キナーゼ経路阻害剤は basal protrusion のみを抑制し、apical extrusion には影響を与えなかった。また、アクチン重合を阻害するサイトカラシン D は apical extrusion, basal protrusion とともに抑制した。これは、ダイナミックなアクチン重合の制御がこれらの現象に関わっていることを示唆している。また、F-アクチンの再構築 (bundling, contractility) に関与しているミオシン-II を阻害する blebbistatin は apical extrusion のみを抑制した。PI3 キナーゼ阻害剤や blebbistatin がそれぞれ basal protrusion あるいは apical extrusion のみを抑制することは、この二つの現象が、少なくとも部分的に、異なる分子メカニズムによって制御されていることを示している。

次に、種々の不活性型あるいはドミナントネガティブ変異のタンパク質を RasV12 と共発現させ、apical extrusion や basal protrusion に種々のシグナル伝達系がどのように関与しているかを調べてみた。不活性型の Cdc42 を RasV12

細胞に発現させたところ、RasV12 細胞の apical extrusion は抑制され、一方 basal protrusion は亢進した (図 5)。このことは、Cdc42 が apical extrusion, basal protrusion にそれぞれポジティブあるいはネガティブな役割を果たしていることを示している。不活性型 Rac の発現はこれらの現象に影響を与えなかった。また、活性化型 Cdc42 に特異的に結合する WASP-CRIB を用いて内在性 Cdc42 の活性を見たところ、正常細胞に囲まれた RasV12 細胞で Cdc42 活性が上昇していた。重要なことに、RasV12 細胞のみを培養した際には、このような Cdc42 活性の変化は見られなかった。さらにわれわれは、ドミナントネガティブ変異の ROCK (Rho キナーゼ) の共発現が、不活性型 Cdc42 と同様に、RasV12 細胞の apical extrusion を抑制する一方、basal protrusion を亢進することを見出した (図 5)。また、ROCK の下流ターゲットであるミオシン-II 軽鎖 (MLC) のリン酸化が、正常細胞に囲まれた RasV12 細胞で上昇していることも観察された。これらのデータは、Cdc42 あるい

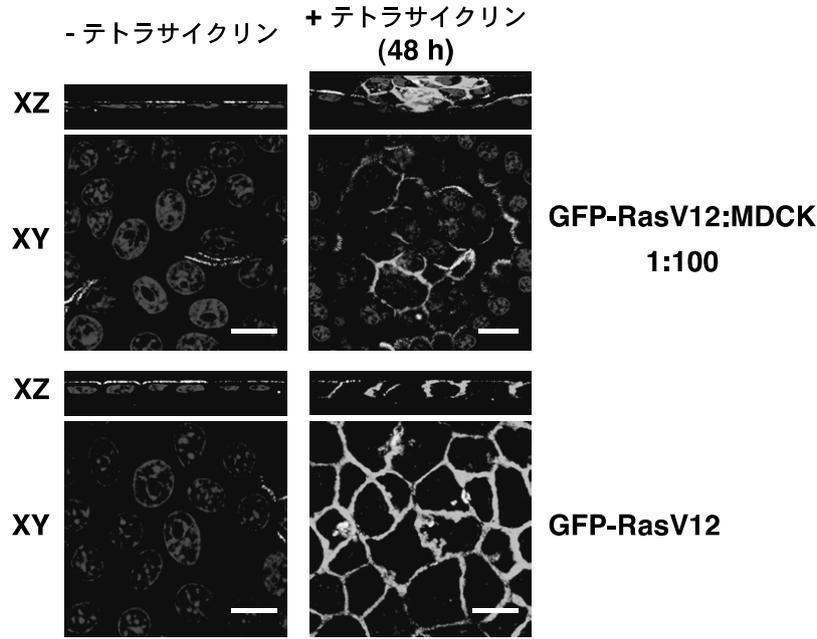


図3 テトラサイクリン添加48時間後、頂端側にはじき出されたRasV12が正常細胞層の上に形成した細胞塊

MDCK pTR GFP-RasV12 細胞と正常 MDCK 細胞の混合培養 (パネル上). MDCK pTR GFP-RasV12 細胞単独培養 (パネル下). 細胞をテトラサイクリン存在下, あるいは非存在下で48時間培養した後, 抗 gp135 (apical ドメインのマーカ―) 抗体にて免疫染色した (図は gp135, Hoechst, GFP の Merge 像). (文献 24 より一部改変)

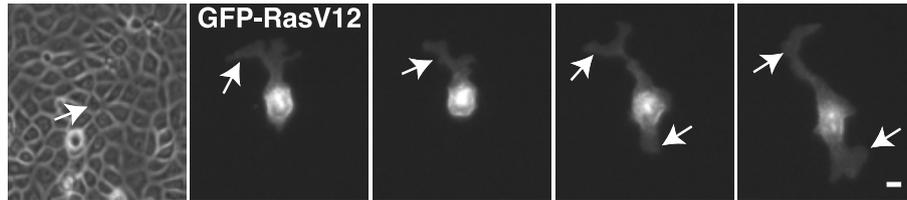


図4 apical extrusionを起こさなかったRasV12細胞が伸ばすダイナミックなbasal protrusion
正常細胞に囲まれたMDCK pTR GFP-RasV12細胞をtime-lapse microscopeで観察した.
RasV12細胞 (左側矢印), basal protrusion (右側図矢印; 50分毎の像). (文献 24 より一部改変)

は ROCK/ミオシン-II 経路が RasV12 細胞の apical extrusion, basal protrusion に関与していることを示している。

最後に, われわれは RasV12 細胞を取り囲む正常細胞の状態, 特にそれらの細胞接着が RasV12 細胞に与える影響について調べた。まず, 上皮細胞間接着に関わる E-カドヘリンをノックダウンするため, テトラサイクリン依存性に E-カドヘリン shRNA を発現する MDCK 細胞株を樹立した。続いて RasV12 細胞と E-カドヘリン shRNA 細胞を共培養 (1:100) し RasV12 細胞の挙動を調べたところ, 周りを取り囲む細胞の E-カドヘリン発現レベルの低下に伴って, RasV12 細胞の apical extrusion は抑制され, 一方 basal protrusion は亢進することが観察された。このように, RasV12 細胞を取り囲む正常細胞の細胞間接着が, RasV12 細胞の振る舞いに影響を与えることが分かった。

このデータは正常な細胞間接着が失われる病的な状態下 (例えば慢性的な炎症や感染) では, Ras 変異細胞が基底側に潜り込む頻度が増える可能性を示唆している。

以上に示したように, 正常な上皮細胞層において一つあるいは少数の細胞で Ras 変異が起こると正常細胞と Ras 細胞の境界で二つの現象 (apical extrusion または basal protrusion) が起こる (図 6)。Ras 細胞は何らかの機序で正常細胞との違いを認識し, Cdc42 や ROCK を活性化させる。Ras 細胞内の Cdc42 および ROCK の活性度, あるいは取り囲む正常細胞の細胞間接着の強さなどが, Ras 細胞が頂端側にはじき出されるか, あるいは基底側に突起を伸ばし上皮細胞層に留まるかという選択に影響を及ぼす。重要なことはこれらの現象が non-cell-autonomous に正常細胞と Ras 細胞の境界でのみ起こるというポイントである。これ

らのデータは, *in vivo* では技術的に観察の難しい初期がん発生のメカニズムを解明する一助となるものと考えられ

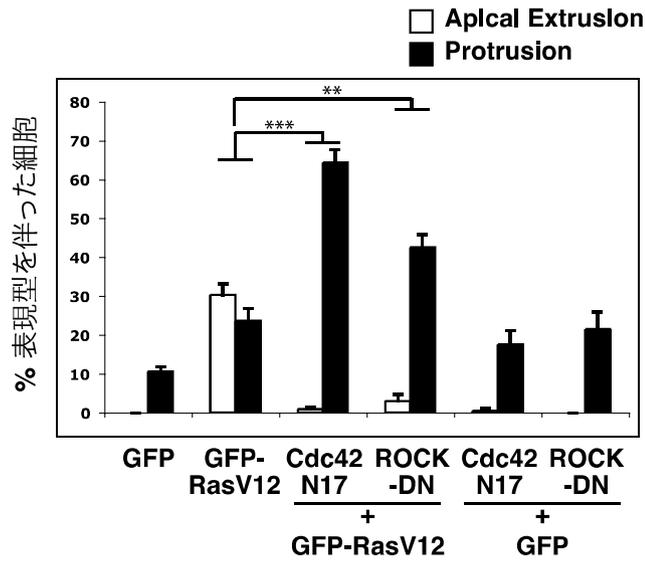


図5 RasV12細胞のapical extrusionまたはbasal protrusionに関わるシグナル分子の同定

正常細胞に囲まれたRasV12細胞内のCdc42及びROCK活性が,RasV12細胞がapical extrusionを起こすかあるいはbasal protrusionを形成するかの決定に大きく関与している.MDCK細胞に不活性型Cdc42(Cdc42 N17)あるいは不活性型ROCK(ROCK-DN)をGFP-RasV12と共発現させ,apical extrusionを起こした細胞とbasal protrusionを伸ばした細胞をカウントした.** $P < 0.005$,*** $P < 0.0001$.(文献24より一部改変)

る.

3-2. Src 変異型細胞と正常細胞

apical extrusionはRasV12細胞に限定した現象なのだろうか?我々は,RasV12以外のがん遺伝子である*v-Src*を用いて細胞を形質転換した場合にはどのような現象が起こるか調べた.*v-Src*は1977年にラウス肉腫ウイルスによる細胞の形質転換の原因遺伝子として発見されて以来²⁵⁾,ヒトのがんでも変異が報告され,最も研究されているがん遺伝子の一つである¹³⁾.正常細胞が*Src*変異細胞の異常増殖を抑制することは,ラットの繊維芽細胞やマウスのグリア細胞を用いた実験で報告されている^{22,23)}.これらの論文では,過剰数の正常細胞存在下では,*Src*変異細胞は増殖巣形成を阻害されるということを示している.しかし,増殖巣形成には日数がかかるため(9-14日)正常細胞層の一つ存在するような初期の変異細胞と正常細胞との相互作用については考慮されておらず,また増殖巣形成がどのような分子メカニズムを介して阻害されているのかも全く未知である.

我々は,温度感受性型*v-Src*を発現させたMDCK細胞(*Src*細胞)を用いて,RasV12細胞の系と同様の実験を行った.まず蛍光物質で染色した*Src*細胞と正常MDCK細胞を1:100(*Src*細胞:MDCK細胞)の割合で混ぜ,コラーゲンゲル上で6-8時間培養した後,温度シフトによ

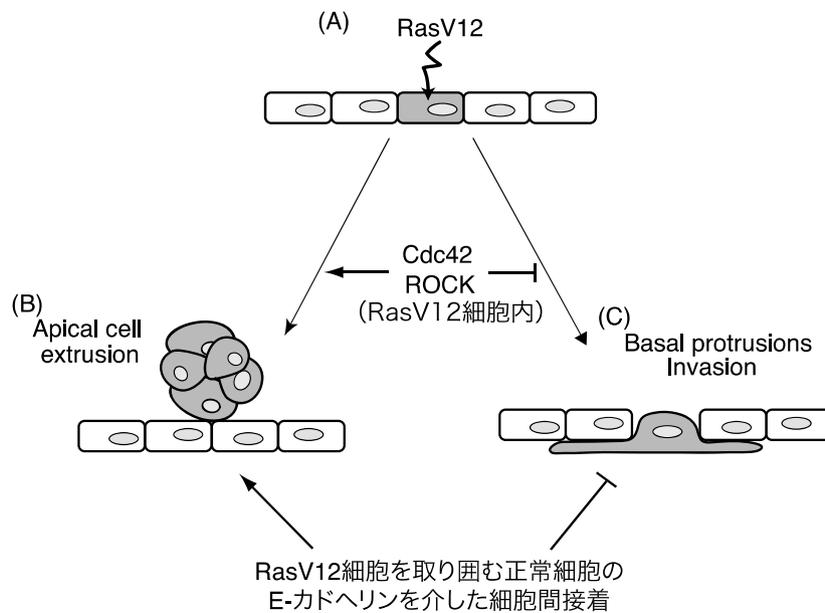


図6 正常細胞とRasV12変異細胞間で起こる現象の概念図

正常上皮層の細胞内でRasV12変異が起こったとき(A),non-cell-autonomousに生じる二つの現象.RasV12細胞は正常細胞の頂端側にはじき出され,細胞塊を構築する(B)か,あるいはbasal protrusionをダイナミックに伸展させ基底側に侵入していく(C).どちらの現象が起こるかはRasV12細胞内のCdc42もしくはROCK活性,あるいはそれを取り囲む正常細胞層のE-カドヘリンを介した細胞間接着により左右される.(文献24より一部改変)

り、*v-Src* を活性化した。その結果、RasV12細胞と同様に、Src細胞も正常MDCK細胞層の頂端側にはじき出された(12-18時間後)(Kajita et al., 未発表データ)。はじき出されたSrc細胞は、死細胞を染色する色素では染まらず、またアポトーシス阻害剤はこのapical extrusionを抑制しなかったことから、この現象は細胞死非依存性に起こることが示唆された。さらにこの現象はSrc細胞のみで培養した場合には見られなかった。つまり、Src細胞のapical extrusionもnon-cell-autonomousに起こる現象であることが分かった。興味深いことに、Src細胞ではRasV12細胞で見られたようなbasal protrusionは全く見られなかった。今後、Src細胞のapical extrusionについて、RasV12細胞でのシグナル経路と比較しながら、分子レベルの解析を進めていきたい。

4. 今後の展望と課題

以上に述べてきたように、正常細胞と変異細胞が共存した時、それらの間で多種多様な現象が起こることが少しずつ明らかとなってきた。だが、この分野はこれまであまり顧みられてこなかったこともあり、どのようにしてそのような現象が起こるのか、その分子メカニズムはまだ解明されていないことが山積している。これらの研究を進めていくのに必要なことは何だろうか？ また、これらの研究はどのように医学的な応用へとつながっていくのだろうか？

4-1. 正常細胞・変異細胞間の認識及びシグナル伝達に関わる分子の同定

上述したいくつかのデータは、正常細胞と変異細胞がお互いにその違いを認識できることを示唆している。正常細胞は変異細胞内でcell-autonomousに起こった変化を認識し、一方、変異細胞は隣の正常細胞が自分達とは異なることを感知する。残念ながら、現在のところ、細胞間の認識がどのような分子メカニズムを介しているのかについては全く分かっていない。しかし、可能性として次の四つの関与が考えられる。1) 細胞外に分泌される液性因子、2) 接着する細胞間の膜の構成因子(膜タンパク質、膜外側脂質層、糖鎖など)、3) ギャップジャンクション、4) 接着する細胞間の物理的性状(膜の表面張力、弾力性、硬度など)。特に、4)の物理的環境の認識については、細胞が細胞外マトリックスや隣接する細胞の物理的変化を認識する能力を有しており、またそれに応じて形態・行動を変えていくことが、近年明らかになってきた²⁶⁻²⁹⁾。実際、RasV12細胞と正常細胞の物理的性状をatomic force microscopy (AFM)を用いて調べてみたところ、RasV12細胞は正常細胞よりも高い膜弾力性と細胞質粘度を有していることが明らかとなった²⁴⁾。1)から4)のパラメーターのいずれ(単数あるいは複数の)が正常細胞と変異細胞の細胞間認

識のメカニズムとして使われているのか、今後の研究による解明が期待される。

また、細胞間の差異が認識された後、どのようにして正常細胞あるいは変異細胞内でシグナル伝達が行われ、変異細胞の頂端側あるいは基底側への離脱、または正常細胞や変異細胞のアポトーシスへとつながっていくのだろうか？例えば、正常細胞に囲まれた際に観察されたRasV12細胞内のCdc42やミオシン-IIの活性の亢進はどのようなメカニズムで引き起こされるのであろうか？また、正常細胞に囲まれたScribble変異細胞に起こるアポトーシスは自殺かそれとも他殺なのだろうか？これらのさまざまな現象は共通の分子群により引き起こされるのか、それともそれぞれ全く特異的な分子メカニズムにより起こっているのだろうか？今後、これらの分子メカニズムの解明、関与する分子の同定が進むにつれて、正常細胞と変異細胞の相互作用の全貌がより大きく明らかに見えてくることであらう。

4-2. 哺乳類 *in vivo* system での解析

これまで明らかになってきた正常上皮細胞と変異細胞間で起こる現象は、哺乳類の細胞培養系かショウジョウバエをモデルシステムとして観察されたもので、実際にこれらの現象が我々の体内、あるいは哺乳類の*in vivo*で起こるのかについては、未だ不明である。哺乳類では、マウスががん研究のモデル動物として最も頻繁に使われてきた。しかし、ほとんどの研究では組織特異的なプロモーターを用いて遺伝子発現の調節を行うため、遺伝子の変異が同組織のすべての細胞に同時に起こる。これは、遺伝子の変異がどのようにcell-autonomousに細胞をがん化するのか、その分子メカニズムを研究するには大変有用な系であった。だが、実際のがんは正常細胞に取り囲まれながら起こるという点は再現できていないという短所があった。また、細胞培養の系では、Ras変異やアポトーシスで頂端側に離脱した細胞は、正常細胞の頂端面と非常に緩やかな細胞接着でしかつながっておらず、わずかな物理的刺激(少し揺するなど)で培養液内に失われてしまう。*in vivo*では頂端側は物理的に厳しい環境にさらされることから(例、腸管での糞便の流れ、腎臓での尿流など)、頂端側に離脱した細胞はすぐに失われてしまうことが予想される。よって組織切片を観察する旧来の様式は、頂端側へ離脱した上皮細胞の検出には適さない。今後、マウスなどにおいて、上皮細胞層でモザイク様にがん遺伝子やがん抑制遺伝子に変異を起こした後、ビデオで経時的に変異細胞とそれを取り巻く正常細胞の動態の変化を観察していくようなシステムを開発・導入していく必要がある。

4-3. がん診断・治療への応用

発がんタンパク質、がん抑制タンパク質の発見以来、それらの下流の cell-autonomous なシグナル伝達機構については、多くの研究者により精力的に研究されてきた。現在のがん研究の潮流は、がん細胞をターゲットに、それらのシグナル伝達を制御することでがんの治療に結びつけるというものである。実際、それらの研究により有用な治療法がいくつか開発され、臨床的にも活用され始めている。一方、正常上皮細胞とがん細胞との相互作用の研究は、non-cell-autonomous なシグナル伝達を明らかにするものであり、これまではなかった全く新しいタイプの治療法へと結びつく可能性を秘めている。上記したように、ある種のがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の変異が正常上皮細胞層内の一つあるいは少数の細胞に起こった際、変異細胞が頂端側に離脱する、またはアポトーシスにより細胞死を起こすことが明らかになってきた。これらの分子メカニズムを明らかにすることにより、変異細胞を正常細胞層から除くことを促進するような新規の治療の開発へと結びついていくことが期待される。

さらに、正常細胞とがん細胞の境界で発現や活性が上がるタンパク質が同定されれば、それはがんの、特に早期がんの診断のマーカーとして非常に有効に活用されるだろう。現在、正常細胞と形態的に見分けのつかない早期のがん (field cancerization) を検出・診断することは技術的に困難である。正常・がん細胞境界タンパク質の発見は、それらの早期がんの発見を可能とし、早期手術や頻回なフォローアップの喚起へとつながっていくであろう。

このまだ新しく未開な研究分野が今後どのように発展・展開していくのか、自らの研究に没頭しつつ、心から楽しみにしている。拙文が、この分野に読者の興味を少しでも引くことができたならば、幸いである。

文 献

- Borek, C. & Sachs, L. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **56**, 1705-1711.
- Morata, G. & Ripoll, P. (1975) *Dev. Biol.*, **42**, 211-221.
- Stoker, M. (1964) *Virology*, **24**, 165-174.
- Stoker, M.G., Shearer, M., & O'Neill, C. (1966) *J. Cell Sci.*, **1**, 297-310.
- Bissell, M.J. & Radisky, D. (2001) *Nat. Rev. Cancer*, **1**, 46-54.
- Vidal, M. & Cagan, R.L. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **16**, 10-16.
- Moreno, E., Basler, K., & Morata, G. (2002) *Nature*, **416**, 755-759.
- de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P., & Johnston, L.A. (2004) *Cell*, **117**, 107-116.
- Moreno, E. & Basler, K. (2004) *Cell*, **117**, 117-129.
- Senoo-Matsuda, N. & Johnston, L.A. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18543-18548.
- Dakubo, G.D., Jakupciak, J.P., Birch-Machin, M.A., & Parr, R. L. (2007) *Cancer Cell Int.*, **7**, 2.
- Hunter, T. & Sefton, B.M. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1311-1315.
- Frame, M.C. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1602**, 114-130.
- Vidal, M., Larson, D.E., & Cagan, R.L. (2006) *Dev. Cell*, **10**, 33-44.
- Bilder, D., Li, M., & Perrimon, N. (2000) *Science*, **289**, 113-116.
- Gardioli, D., Zacchi, A., Petrer, F., Stanta, G., & Banks, L. (2006) *Int. J. Cancer*, **119**, 1285-1290.
- Navarro, C., Nola, S., Audebert, S., Santoni, M.J., Arsanto, J. P., Ginestier, C., Marchetto, S., Jacquemier, J., Isnardon, D., Le Bivic, A., Birnbaum, D., & Borg, J.P. (2005) *Oncogene*, **24**, 4330-4339.
- Brumby, A.M. & Richardson, H.E. (2003) *EMBO J.*, **22**, 5769-5779.
- Abercrombie, M. & Heaysman, J.E. (1954) *Exp. Cell Res.*, **6**, 293-306.
- Levine, E.M., Becker, Y., Boone, C.W., & Eagle, H. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **53**, 350-356.
- Mehta, P.P., Bertram, J.S., & Loewenstein, W.R. (1986) *Cell*, **44**, 187-196.
- Alexander, D.B., Ichikawa, H., Bechberger, J.F., Valiunas, V., Ohki, M., Naus, C.C., Kunimoto, T., Tsuda, H., Miller, W.T., & Goldberg, G.S. (2004) *Cancer Res.*, **64**, 1347-1358.
- Martin, W., Zempel, G., Hulser, D., & Willecke, K. (1991) *Cancer Res.*, **51**, 5348-5351.
- Hogan, C., Dupré-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-López, L.A., Vincent, J.-P., Itoh, Y., Hosoya, H., Pichaud, F., Fujita, Y. (2009) *Nat. Cell Biol.*, in press
- Beemon, K. & Hunter, T. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3302-3306.
- Schwartz, M.A. & Desimone, D.W. (2008) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **20**, 551-556.
- Orr, A.W., Helmke, B.P., Blackman, B.R., & Schwartz, M.A. (2006) *Dev. Cell*, **10**, 11-20.
- Lecuit, T. & Lenne, P.F. (2007) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 633-644.
- Krieg, M., Arboleda-Estudillo, Y., Puech, P.H., Kafer, J., Graner, F., Muller, D.J., & Heisenberg, C.P. (2008) *Nat. Cell Biol.*, **10**, 429-436.
- Karim, F.D. & Rubin, G.M. (1998) *Development*, **125**, 1-9.