

TNF-JNK 経路による上皮の内在性がん抑制システム

1. はじめに

ヒトのがんのほとんどは上皮由来である。上皮細胞は通常、明確な頂底軸方向の極性 (apico-basal 極性) をもっており、この極性を保つことが上皮組織の恒常性の維持に重要な役割を果たしている。例えば、様々な実験系において、apico-basal 極性が崩壊した上皮細胞は異常な増殖能を獲得する。また、上皮由来がんにおいて、apico-basal 極性の崩壊とがんの悪性度とが正の相関を示すことも知られている。このような「極性の崩壊による増殖能の獲得」という現象は、進化的にも保存されている。例えば、ショウジョウバエ上皮において apico-basal 極性遺伝子 *scribble* (*scrib*), *discs large* (*dlg*), *lethal giant larvae* (*lgl*) など欠損した上皮細胞は、極性が崩壊すると同時に過剰に増殖して腫瘍を形成する。ところが興味深いことに、これらがん原性の極性崩壊細胞は、その周囲を正常組織に取り囲まれた場合にはその増殖能を発揮できず、むしろ組織から排除される。このことは、正常な上皮組織にはがん原性の異常細胞を積極的に認識・排除する組織レベルのがん抑制システムが内包されていることを示唆している。本稿では、このような細胞間コミュニケーションを介した上皮の内在性がん抑制システムとその分子機構について、筆者らが見出した最近の知見とともに概説したい。

2. 上皮の内在性がん抑制システム

がんは通常、遺伝的モザイクの様式で発生する。すなわち、組織中の一つまたはごく少数の細胞ががん原性の突然変異を獲得し、これら変異細胞が周囲の正常組織とは異なる遺伝的背景をもった細胞群として増殖・がん化していく。したがって、組織中に出現したがん原性の変異細胞は、直ちに直近の正常細胞と相互作用をもつこととなる。このがん原性細胞-正常細胞間の相互作用は、その状況に依存してがんの発生に対して促進的にも拮抗的にも働いていることが知られている。例えば、上皮由来がんの発生・進行過程において、サイトカインなどの分泌性タンパク質を介したがん細胞-間質細胞間の相互作用は、がんの進行に促進的に働くと考えられている。また、組織中にがんの多発“母地”が形成される field cancerization (広域発がん)

という現象が様々ながんにおいて観察されており¹⁾、この現象はがんの発生・進行において細胞間相互作用を介した“細胞非自律的”ながん原性変化が促進的に働いていることを示唆している。一方、種々の免疫系細胞は、上皮組織の腫瘍化に対して拮抗的に働くことが知られている。また、がん遺伝子 *ras* によってトランスフォームした線維芽細胞は、その周囲を正常組織に取り囲まれた状況下では生存率が低下することが示されている²⁾。さらに、がん原性 Ras を発現するイヌ腎臓尿管上皮由来 MDCK 細胞は、その周囲を野生型 MDCK 細胞に取り囲まれると上皮シートから排除されることが報告されている³⁾。このように、正常な上皮組織は細胞間相互作用を介した細胞増殖/組織成長の制御システムを内包しており、これらを時空間的・状況依存的に使い分けることによって正常発生や恒常性維持を実現していると考えられる。最近筆者らは、ショウジョウバエ遺伝学を用い、このような細胞間コミュニケーションを介した上皮の内在性がん抑制機構の一端を明らかにした (後述)。

ショウジョウバエ上皮の細胞間接着部位に局在するアダプタータンパク質 *Scrib*, *Dlg*, *Lgl* は、上皮細胞の apico-basal 極性の形成に必須の役割を果たしている⁴⁾。これらの遺伝子のうちのいずれかを欠損したショウジョウバエ変異体は、幼虫期において imaginal disc (成虫原基) の上皮細胞が過剰に増殖して腫瘍を形成する⁴⁾ (図 1A)。哺乳類の上皮細胞においても同様に、これらの遺伝子の機能欠損が細胞増殖を促進することが知られている。また、*Scrib* タンパク質がヒトパピローマウイルス感染によって形成された腫瘍においてプロテアソーム依存的に分解されることや、乳がんや大腸がんの悪性度が *Scrib* タンパク質の発現低下と相関していることも報告されている⁵⁻⁸⁾。すなわち、これらの極性遺伝子は、進化的に保存されたがん抑制遺伝子としても機能していると考えられる。興味深いことに、これらの極性遺伝子を欠損した変異細胞は、その周囲を正常上皮組織によって取り囲まれた場合には増殖能を発揮せず、むしろ組織から排除されることが分かってきた。例えば、遺伝的モザイク法により *scrib* ホモ変異細胞の体細胞クローンを成虫原基に誘導すると、これらの極性崩壊細胞は細胞死によって組織から排除される^{9,10)} (図 1B)。この *scrib* 変異細胞クローンの排除は、周囲の正常組織を細胞死によって除去すると起こらなくなる。また、変異細胞クローン内で c-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路が活性化していることや、このクローン内で JNK 経路を阻害すると細胞排除が抑制されることも明らかとなった。すなわち、

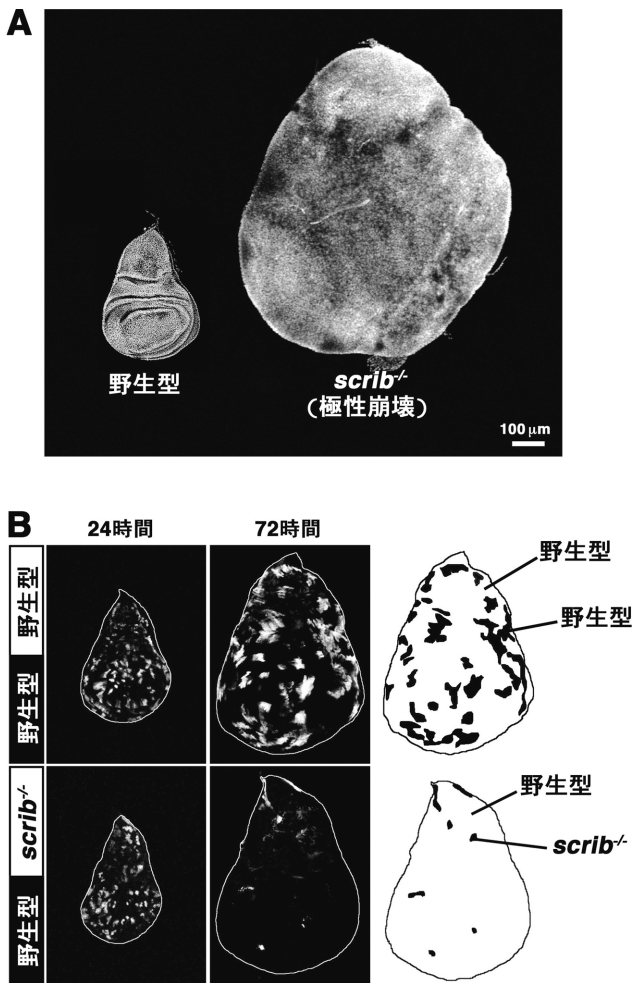


図1 上皮組織に内在するがん抑制システム

(A) *scrib* 遺伝子の変異により apico-basal 極性が崩壊した翅成虫原基は、過剰に増殖して腫瘍を形成する。野生型 (左) および *scrib*^{-/-} 変異体 (右) の3齢幼虫に形成された翅成虫原基の DAPI 染色像 (コンフォーカル画像) を示す。(B) 正常上皮組織に囲まれた *scrib*^{-/-} 変異細胞クローンは増殖能を発揮せず、むしろ経時的に組織から排除される。野生型または *scrib*^{+/-} の3齢幼虫の翅成虫原基 (野生型と同様の表現型を示す) において、GFP で標識した野生型 (上段) および *scrib*^{-/-} 変異 (下段) の体細胞クローンを誘導し、誘導後24時間および72時間でクローンの大きさを比較した。左2列はコンフォーカル画像、右端は72時間後のクローンの模式図を示す。

scrib などの極性遺伝子を欠損した極性崩壊細胞は、その周囲を正常組織に取り囲まされると JNK 依存的な細胞死によって組織から排除されることが示された^{9,10}。このことは、正常な上皮組織はがん原性の極性崩壊細胞が生じるとそれらを速やかに排除する組織レベルのがん抑制システムを内包していることを示唆している。

3. TNF-JNK 経路を介したがん原性細胞の排除機構

上皮の内在性がん抑制システムを駆動するこのような“状況依存的”な JNK 誘導性細胞死は、どのような機構で誘導されるのだろうか。ショウジョウバエにおける JNK 依存的細胞死シグナルとしては、筆者らが2002年に同定した Eiger (ショウジョウバエ腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF) ホモログ) シグナルが知られていた¹¹。Eiger を成虫原基で強制発現させると、JNK 経路の活性化とそれに伴う JNK 依存的細胞死が引き起こされる¹¹。筆者らは当時、*eiger* 遺伝子の機能欠失変異体の作出に成功したが、興味深いことに *eiger* 変異体において細胞死の異常は観察されなかった。この結果は、Eiger-JNK 細胞死シグナルは正常発生においては必須でないことを示しており、このシグナルはむしろ発生過程でプログラムされていないような非常事態における細胞死の誘導に機能している可能性を示唆するものであった。以来、Eiger-JNK 細胞死シグナルの生理的意義は長らく不明であったが、筆者らは最近、上述したような極性崩壊細胞がその周囲を正常組織に取り囲まれた際に誘導される細胞死が Eiger-JNK シグナルによって引き起こされることを見出し、その細胞死誘導機構を明らかにすることに成功した¹²。

筆者らはまず、成虫原基に誘導した *scrib* 変異クローンの組織からの排除が、*eiger* を欠損した個体においては全く起こらなくなることを見つけた。またこのとき、*scrib* 変異クローンは排除を免れるだけでなく、過剰に増殖して組織に腫瘍を形成した (図2)。このことは、*eiger* は極性崩壊細胞に対してがん抑制遺伝子として機能していることを示している。*eiger* を欠損した変異個体においては、*scrib* 変異クローン内の JNK 活性化が消失したことから、Eiger が *scrib* 変異細胞における JNK 活性化因子として機能していることが実証された。では、Eiger-JNK 経路はどのようにして極性崩壊細胞内で活性化されるのだろうか。上述したように、成虫原基において Eiger の発現は JNK 経路の活性化を誘導することから¹¹、まず単純に、Eiger の発現量が *scrib* 変異クローン内で上昇している可能性を検証した。ところが予想に反して、Eiger タンパク質の発現量は *scrib* 変異クローン内においてむしろ低下していることが分かった。この一見矛盾する現象の仕組みを探るため、Eiger タンパク質の *scrib* 変異細胞内での局在を詳細に解析した。その結果、興味深いことに Eiger は野生型細胞では細胞膜上に局在するが *scrib* 変異細胞内ではその大部分が細胞質内にドット状のシグナルとして観察されること

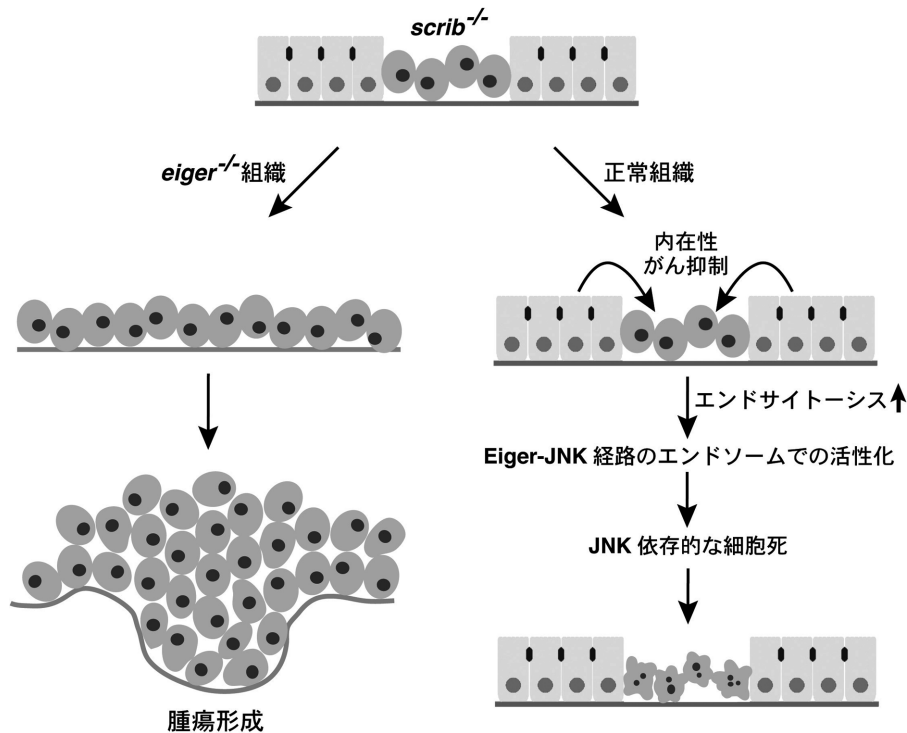


図2 TNF-JNK 経路による上皮のがん原性細胞排除機構

scrib 変異により極性が崩壊した細胞クローンは、*eiger* を欠損した組織においては大過剰に増殖して腫瘍を形成する (左)。一方、これらのクローンが正常な上皮組織の中に誘導されると、内在性がん抑制システムが働いて極性崩壊細胞内でのエンドサイトーシス経路が活性化し、これにより細胞膜上の Eiger/TNF がエンドソームへ移行する。これが引き金となってエンドソームで Eiger-JNK 経路の活性化が起こり、JNK 依存的な細胞死に至る (右)。

が分かった。この Eiger のドット状シグナルの実体を解析した結果、その局在は初期エンドソームのマーカーである Rab5 の局在と一致することが分かった。また、このドット状の Eiger のシグナルは、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた蛍光標識デキストランとも共局在した。これらの結果は、Eiger はがん原性の極性崩壊細胞内においてその局在を細胞膜上からエンドソームへ移行することを示している (図2)。通常、エンドサイトーシス経路に乗ったタンパク質は、その後速やかにリソソームにおける分解を受ける。すなわち、Eiger のエンドソームへの局在変化は、*scrib* 変異細胞内で Eiger のタンパク質レベルが低下していたこととも合致する。一方、*scrib* 変異細胞内において、JNK 経路の強い活性化がエンドソームに局在していることも分かった。このようなエンドソームにおける JNK 活性化は、JNK キナーゼである Hemipterous (Hep) の強制発現による JNK 経路刺激においては観察されなかったことから、Eiger シグナルに特異的な現象であ

ると考えられた。一般にエンドソームにおけるシグナル伝達経路の活性化は、哺乳類細胞の系において多く知られている。例えば、様々な細胞表面受容体シグナル (EGF 受容体シグナル, TGF β 受容体シグナル, G タンパク質共役受容体シグナル等) は、細胞膜直下においてのみならず、その下流シグナルコンポーネントが多く局在するエンドソームにおいても活性化する¹³⁾。また、哺乳類の TNF シグナル経路においても、細胞膜上の TNF-TNF 受容体複合体がエンドサイトーシスにより細胞内部に移行することがカスパーゼの活性化に必要であると報告されている¹⁴⁾。したがって、Eiger シグナルも同様にエンドソームに移行することで下流シグナル分子群と会合し、これが JNK 経路の活性化を促している可能性が考えられる (図3)。

それでは、なぜ Eiger は極性崩壊細胞内でエンドソームへ移行するのだろうか。筆者らは、極性崩壊細胞内でエンドサイトーシス活性自体が亢進していることを見出した (図2)。このことは、亢進したエンドサイトーシス活性が

細胞膜上の Eiger のエンドソームへの移行を促している可能性を示唆している。そこで、極性崩壊細胞内のエンドサイトーシス活性の亢進が、実際に Eiger-JNK 経路の活性化を引き起こしているのかどうかを検証した。まず、細胞死を誘導しない程度の低レベルの Eiger 強制発現細胞クローンにおいて、Rab5 を共発現させることでエンドサイトーシス活性を亢進させると、Eiger-JNK 経路の活性化が強く促進されて細胞死に至ることが分かった。また、*scrib* 変異によりエンドサイトーシス活性が亢進した細胞クローン

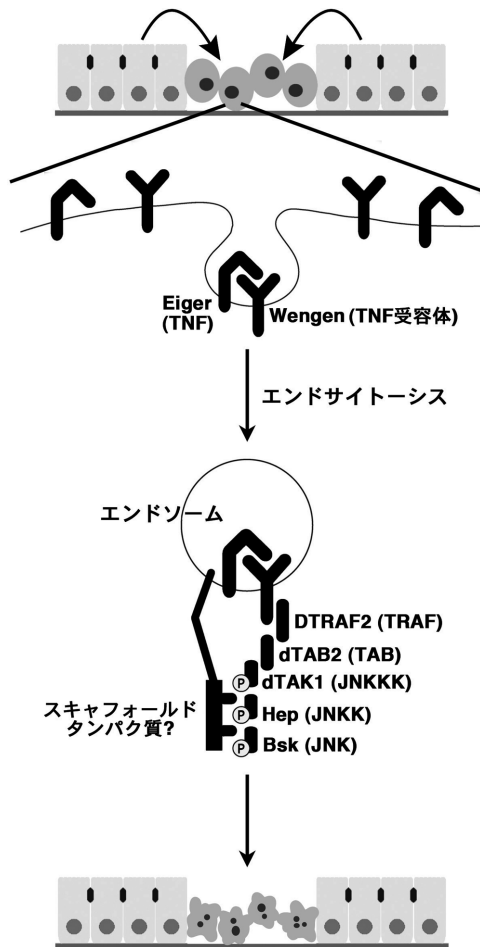


図3 Eiger-JNK 経路のエンドソームにおける活性化モデル
細胞膜上の Eiger (TNF) は、極性崩壊細胞内でその受容体 Wengen (TNF 受容体) と結合し、エンドサイトーシス経路を介してエンドソームへ移行すると考えられる。エンドソーム上には Eiger 経路の下流コンポーネントである DTRAF2 (TRAF), dTAB2 (TAB), dTAK1 (JNKKK), Hep (JNKK), Bsk (JNK) などを局在化させるスキャフォールドタンパク質が存在し、これが Eiger 経路の効率的な活性化を実現している可能性が考えられる。

では、異所的に活性化させた Eiger シグナルが増強した。さらに、*scrib* 変異細胞クローン内で Rab5 ドミナントネガティブを共発現させてエンドサイトーシス経路を阻害すると、JNK 経路の活性化とそれに伴う細胞排除が抑制された。以上の結果から、*scrib* 変異細胞内でエンドサイトーシス活性が亢進し、これが Eiger のエンドソームへの移行を促進して JNK シグナルの活性化を引き起こし細胞死に至ると考えられた (図2)。また、この現象は *scrib* 変異クローンのみならず別の極性遺伝子である *dlg* の変異クローンでも同様に観察されたことから、がん原性の極性崩壊細胞の出現に対して機能する普遍的ながん抑制システムであると考えられた。

以上の解析から、上皮に出現したがん原性の極性崩壊細胞が細胞死に至るまでの分子機構が明らかとなった。では、なぜ極性崩壊細胞はその周囲を正常細胞に取り囲まれた場合にのみ組織から排除されるのだろうか。筆者らは、極性崩壊細胞内のエンドサイトーシス活性の亢進が、周囲の正常組織を除去した際には起こらないことを見出した。すなわち、周囲の正常組織の存在自体が、極性崩壊細胞のエンドサイトーシス依存的細胞死経路をオンにする引き金となっていることが明らかとなった¹²⁾。

4. おわりに

ショウジョウバエ遺伝学を用いた一連の研究から、上皮組織が内包する組織レベルのがん抑制システムの動作原理が明らかとなりつつある。筆者らの研究により、がん原性の異常細胞がその周囲を正常組織に取り囲まれた際に、自身の細胞死スイッチをオンにする機構が明らかとなった。一方、このようながん原性細胞排除システムを駆動する最上流機構はいまだ不明である。すなわち、周囲の正常組織はいかにしてがん原性の極性崩壊細胞を“認識”し、“細胞非自律的”にエンドサイトーシス依存的細胞死シグナルをオンにするのか、その機構はまだ分かっていない。筆者らはこの疑問に答えるべく、このような“細胞非自律的”な作用に着目した新しいタイプの遺伝学的スクリーニング系を構築し、この現象に関わる分子群の網羅的探索・同定を行っている。すなわち、がん原性の極性崩壊細胞を取り囲む正常細胞にのみ突然変異を誘導し、極性崩壊細胞の排除機構に異常をきたす(排除できなくなる、あるいは排除能が亢進する)変異体の単離を行っている。一方で、上皮のがん原性細胞排除システムをライブで可視化する実験系の構築も進めている。これら遺伝学的アプローチとライブイメージング解析系の融合、さらにはショウジョウバエで

得られた知見を哺乳類培養細胞モデル系に適用することで、上皮の内在性がん抑制システムの普遍原理が明らかになっていくと期待される。

- 1) Slaughter, D.P., Southwick, H.W., & Smejkal, W. (1953) *Cancer*, 6, 963-968.
- 2) Land, H., Parada, L.F., & Weinberg, R.A. (1983) *Science*, 222, 771-778.
- 3) Hogan, C., Dupre-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-Lopez, L.A., Vincent, J.P., Itoh, Y., Hosoya, H., Pichaud, F., & Fujita, Y. (2009) *Nat. Cell Biol.*, 11, 460-467.
- 4) Bilder, D. (2004) *Genes Dev.*, 18, 1909-1925.
- 5) Gardiol, D., Zacchi, A., Petrera, F., Stanta, G., & Banks, L. (2006) *Int. J. Cancer*, 119, 1285-1290.
- 6) Massimi, P., Gammoh, N., Thomas, M., & Banks, L. (2004) *Oncogene*, 23, 8033-8039.
- 7) Nakagawa, S., Yano, T., Nakagawa, K., Takizawa, S., Suzuki, Y., Yasugi, T., Huibregtse, J.M., & Taketani, Y. (2004) *Br. J. Cancer*, 90, 194-199.
- 8) 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.
- 9) Brumby, A.M. & Richardson, H.E. (2003) *EMBO J.*, 22, 5769-5779.
- 10) Igaki, T., Pagliarini, R.A., & Xu, T. (2006) *Curr. Biol.*, 16, 1139-1146.
- 11) Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., & Miura, M. (2002) *EMBO J.*, 21, 3009-3018.
- 12) Igaki, T., Pastor-Pareja, J.C., Aonuma, H., Miura, M., & Xu, T. (2009) *Dev. Cell*, 16, 458-465.
- 13) Miaczynska, M., Pelkmans, L., & Zerial, M. (2004) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 16, 400-406.
- 14) Schneider-Brachert, W., Tchikov, V., Neumeyer, J., Jakob, M., Winoto-Morbach, S., Held-Feindt, J., Heinrich, M., Merkel, O., Ehrenschrwender, M., Adam, D., Mentlein, R., Kabelitz, D., & Schutze, S. (2004) *Immunity*, 21, 415-428.

井垣 達史

(神戸大学大学院医学研究科 細胞生物学分野 G-COE)

Epithelial intrinsic tumor suppression by TNF-JNK signaling
Tatsushi Igaki (Department of Cell Biology, G-COE, Kobe University Graduate School of Medicine, 7-5-1 Kusunokicho, Chuo-ku, Kobe 650-0017, Japan)

シナプスから核へのシグナリングとシナプス活動依存的遺伝子発現：前初期遺伝子 *Arc* の発現制御メカニズムを中心に

1. はじめに

他の多くの細胞種と同様に、神経細胞において細胞外シグナルに応答した遺伝子発現は、細胞の分化や生存、そして機能維持に根源的な意義をもつ。特に、脳の高次機能である長期記憶の形成・保持には、行動や経験に応じた遺伝子の新規発現・活性化が必須であることが明らかになってきた。神経細胞は極めて複雑な形態をもち、細胞体、軸索部、樹状突起部の三つのコンパートメントに大別される。軸索部に存在する前シナプスから神経伝達物質が放出されると、樹状突起上の後シナプス膜表面の受容体がこれを受け取り、細胞から細胞への情報の伝達が成立する。細胞の情報伝達はマイクロドメインに情報伝達分子を集積することにより効率化されているが、脂質ラフトを用いた効率化という戦略をとる一般的な体細胞と異なり、神経細胞ではシナプス前および後膜において高度に効率化されている。中枢神経系の一つの神経細胞は数百から数万ものシナプスをもち、複数の前シナプス細胞より時間的・空間的に統合された複雑なパターンのシナプス入力を受ける。このようなシナプス入力がある一定の閾値を超えると、細胞体にある核において遺伝子発現が引き起こされる。樹状突起は細胞体から長く伸長しているため、シナプスから核までが数百 μm 以上も離れている場合もある。つまり、流動性のある脂質ラフトがシグナル受容の中心である細胞種とは異なり、神経細胞では細胞膜表面から核へのシグナリングは、位置的に固定された、しかも、細胞体から遠く離れたシナプスから核へと伝えられなければならない(表1)。これはどのようにして実現されているのであろうか？ また、シナプス活動は多種類(おそらく数百種以上)の遺伝子を活性化しうることが知られており、その遺伝子産物の一部は樹状突起や軸索のシナプスで機能するタンパク質である。この場合、細胞体で産生された遺伝子産物は遠く離れたシナプス部位に輸送される必要があるが、これはどのような機構によるのであろうか？ このような神経細胞におけるシグナリングはまだ不明な点が多いが、いくつかのステップについては次第に明らかになりつつある。本稿では我々が最近明らかにしたシナプス活動依存的な遺伝子発現