

## I型コラーゲンによる上皮間葉転換の誘導

### はじめに

上皮間葉転換 EMT (epithelial mesenchymal transition) とは、上皮細胞が上皮としての形質を失い間葉系の形質を獲得する現象であり、上皮細胞が有する細胞極性の消失、細胞間接着の減少、細胞遊走能の亢進、アクチン系細胞骨格の改築を特徴とする<sup>1,2)</sup>。生体内では原腸陥入や神経管形成などの発生段階に関わる現象として報告されてきたが、近年はがん細胞の浸潤、転移に関わっていることが判明し注目されている<sup>3,4)</sup>。EMTは腫瘍間質に含まれる様々な増殖因子で誘導されるが、本稿では腫瘍間質を形成する細胞外基質の一つであるコラーゲンも EMT に深く関与していることを示し、そのシグナル伝達系を解説する。

### 1. EMT とカドヘリンスイッチング

カドヘリンは膜 1 回貫通型のタンパク質で、細胞接着において機能する細胞間接着分子であり、アドヘレンスジャンクションを形成する<sup>5)</sup>。膜貫通領域に隣接する部位には P120-カテニンが結合し、接着能の制御や低分子 G タンパク質の活性化などのシグナル分子として働く。C 末端側には  $\beta$ -カテニンや  $\gamma$ -カテニンが結合し、さらに  $\alpha$ -カテニンが結合してアクチン系細胞骨格へとつながる。 $\beta$ -カテニンは Wnt シグナル伝達系の腫瘍構成因子として知られ、核内の転写調節因子としても機能している。

カドヘリンには、上皮型 (E 型)、神経型 (N 型)、胎盤型 (P 型)、網膜型 (R 型) などのサブタイプが存在し、それらの間で結合特異性がみられる。異なるタイプのカドヘリンが発現する細胞種が混在すると、同じタイプが発現する細胞同士が集まり塊をつくる。一般に上皮は E-カドヘリンを発現しているのに対して、間葉系細胞は N-カドヘリン、R-カドヘリンやカドヘリン-11 を発現している。間葉系細胞は上皮細胞に比して、極性に乏しく高い遊走能をもつ。器官発生過程などで、E-カドヘリンを発現する上皮細胞から N-カドヘリンを発現する細胞群が出現し、細胞集団の分離、遊走が起こることがわかり、これをカドヘリンスイッチングと呼んでいる。上皮由来のがん細胞でも同様に E-カドヘリン発現が減少し、他のカドヘリン発現が上昇していることが報告され、がん細胞における EMT

の中心的な現象と考えられる<sup>6)</sup>。こうした不適切なカドヘリンの発現変化で、がん細胞の細胞間接着力が変化し、がん細胞が分離し、血管やリンパ管に侵入しやすくなることで、浸潤能や転移能の獲得に関わっている<sup>7)</sup>。

### 2. I型コラーゲンに誘導される EMT

腫瘍間質内では、がん細胞自体から、またがん細胞から何らかの刺激が線維芽細胞などの間質細胞に伝わり、TGF (transforming growth factor)- $\beta$ 、HGF (hepatocyte growth factor)、EGF (epidermal growth factor) などの増殖因子が放出され、がん細胞の EMT を誘導する<sup>3)</sup>。これらは腫瘍間質とがん細胞のクロストークと考えられ、がんが増殖・浸潤していく過程で重要である。さらに、がんは進行するにつれ、I型コラーゲンを主成分とする豊富な線維性間質をもつ。われわれは、上皮型がん細胞がコートなしのプレート、フィブロネクチンや I 型ラミニン上で島状に増生するのに対して、I型コラーゲン上では細胞がばらばらになる (scattering) ことに注目した<sup>8-10)</sup>。多くのがん腫、とくに膵がんや肺がんの腫瘍間質で I 型コラーゲンが豊富に見られることから、主に膵がんや肺がん細胞を用い、数種類の細胞でこの現象を確認した。図 1A に膵がん細胞である BxPC-3 を示した。I型コラーゲン上で細胞がばらばらになっているのに対して、他の基質上では島状に増生している。I型コラーゲン上では N-カドヘリンや他の EMT マーカーであるビメンチン、フィブロネクチンのタンパク質量やメッセンジャー RNA 量が増加した (図 1B, C)。コラーゲン上では、E-カドヘリンがアドヘレンスジャンクションから細胞質内へ取り込まれ、細胞間接着が減弱している (図 1D)。またコラーゲンでコートしたプレートやチャンバーを用いて細胞遊走能を測定すると、他の基質に比べて遊走能が高いことがわかった。これらの現象は増殖因子の中和抗体などでも抑制できず、細胞が増殖因子を自己分泌したわけではなく、I型コラーゲンそのものが EMT を引き起こすと考えられた。

### 3. I型コラーゲンによる EMT のシグナル伝達

I型コラーゲンの受容体として最も重要なのは  $\alpha 2\beta 1$ -インテグリンなどの  $\beta 1$  インテグリンファミリーである。インテグリン- $\beta 1$  をノックダウンしたが、I型コラーゲンによる EMT を抑制できないことがわかった。そこで他のコラーゲン受容体として発見された受容体型チロシンキナーゼ DDR (discoidin domain receptor) 1 をインテグリン- $\beta 1$  と同時にノックダウンしたところ、EMT を完全に抑制す

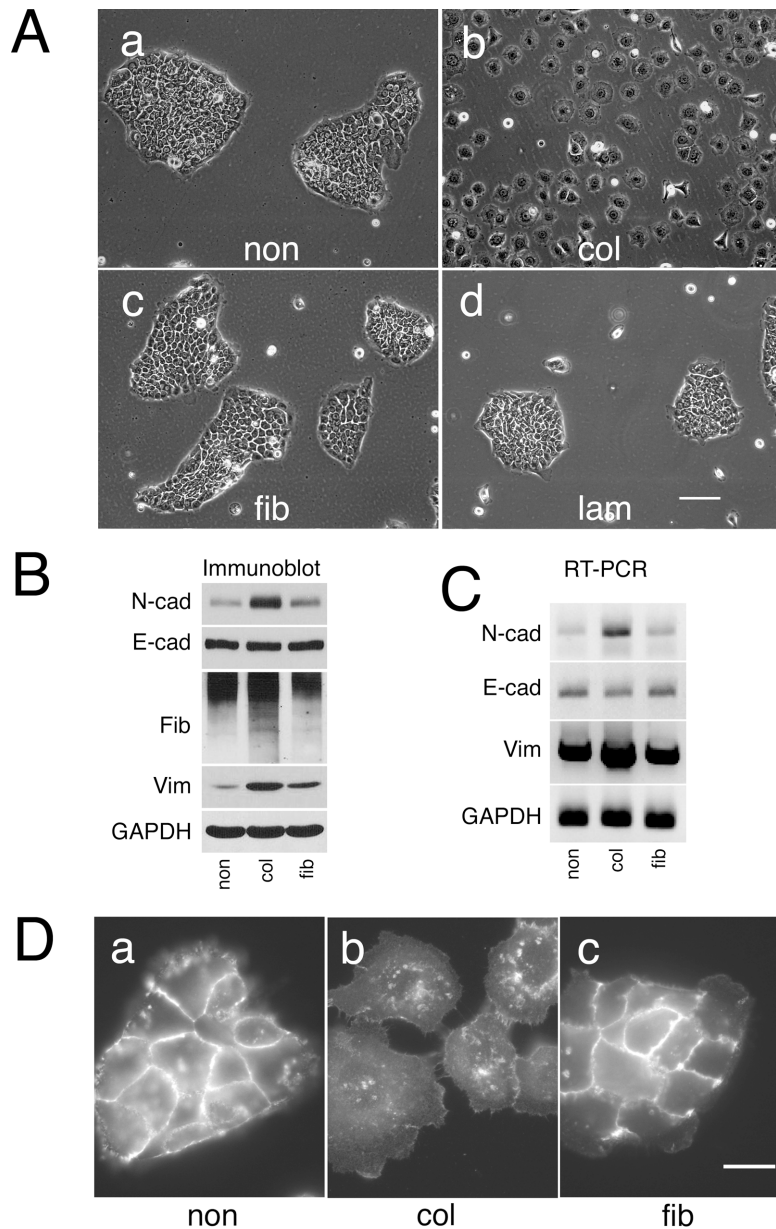


図1 コラーゲンによって誘導された EMT

A) BxPC-3 膵がん細胞を様々な基質上で培養した (10×, bar=100 μm). B)–C) 基質上で 2 日間培養した細胞からタンパク質, メッセンジャー RNA を抽出しプロットした. D) 基質上で 2 日間培養した細胞を E-カドヘリンで染色した (60×, bar=20 μm). non; コートなし, col; I 型コラーゲン, fib; フィブロネクチン, lam; I 型ラミニン.

ることができた. したがって, コラーゲンからのシグナルは両受容体を通して伝達されると考えられた. さらにインテグリン-β1 と DDR1 のノックダウンで FAK (focal adhesion kinase) と pyk2 (FAK-related protein tyrosine kinase) が

それぞれ抑制されることから, インテグリンにより FAK が, DDR1 により pyk2 が特異的に活性化されると考えている. 次にその下流シグナルをスクリーニングするために, Src, PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), JNK (c-Jun

NH2-terminal kinase), p38MAPK (mitogen activated protein kinase), ERK (extracellular regulated kinase) のインヒビターを用いて, BxPC-3 の EMT 誘導を抑制するかどうかを検討したところ, JNK インヒビター (SP600125) が細胞 scattering とカドヘリンスイッチングを完全に抑制することがわかった. 実際にコラーゲン上では細胞内の JNK のリン酸化が増加し, 基質である c-Jun のリン酸化が増加した. さらに JNK2 ではなく JNK1 のノックダウンで c-Jun のリン酸化が消失し, EMT が完全に抑制されることがわかった. 最終的には図 2 に示すように,  $\alpha 2\beta 1$ -インテグリンと DDR1 から発進されたシグナルが細胞内へ伝えられ, N-カドヘリンの発現増加と細胞 scattering を引き起こすことを報告した<sup>11)</sup>.

一方, 細胞がコラーゲンへ接着することで SIP (Smad-interacting protein) 1 といった zinc finger 転写因子が誘導され, E-カドヘリンのプロモーター部位に結合し, E-カドヘリンの発現を抑制することが報告されている. さらに, イ

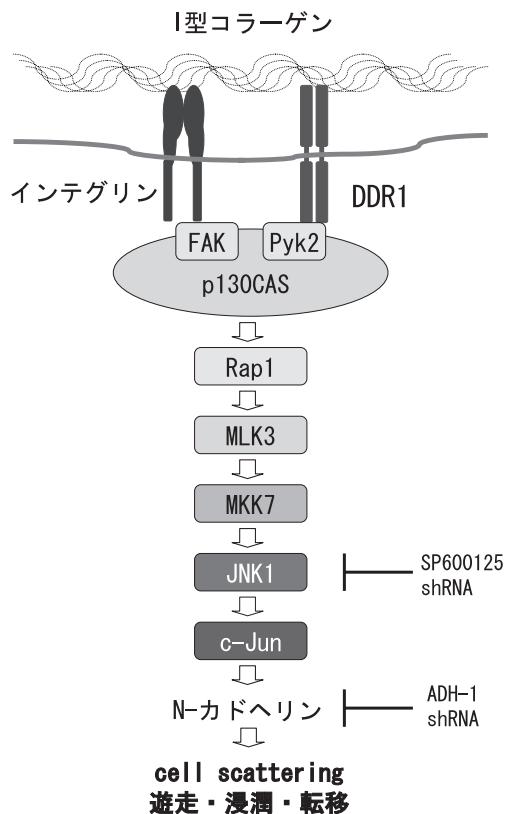


図 2 コラーゲンから伝えられる細胞内シグナル JNK インヒビターの SP600125 や N-カドヘリンの機能阻害ペプチド ADH-1, またノックダウンによって EMT シグナルを抑制することで, 細胞 scattering が抑えられる.

ンテグリン- $\beta 1$  からのシグナルで Src, FAK が活性化され,  $\beta$ -カテニンがリン酸化されることで E-カドヘリンとの結合が阻害され, アドヘレンスジャンクションにおける E-カドヘリンの安定性が低下すると考えられる<sup>12)</sup>. 遊離した  $\beta$ -カテニン は主に転写因子として働き, 細胞周期を進める方向へ機能する. 以上のように, 様々なシグナル経路を通して, カドヘリンスイッチングが起こり, がん細胞が集団から分離・遊走し, 浸潤・転移能を獲得する (図 3).

#### 4. EMT における N-カドヘリンの役割

EMT のシグナル伝達経路を抑制したところ, I 型コラーゲンによる N-カドヘリン発現の増加は認められず, 細胞 scattering も認められない. 一方, N-カドヘリンをノックダウンした細胞はコラーゲン上で scattering せず, 遊走能も低下する. N-カドヘリンの過剰発現自体が scattering を誘導するわけではないが, コラーゲン上での遊走能が増加した. 以上より, N-カドヘリンの増加, つまりカドヘリンスイッチングは scattering するために必要であり, また細胞遊走能に密接に関連していると考えられる<sup>9)</sup>.

*in vivo* での N-カドヘリンの役割を検討するために, N-カドヘリンをノックダウンした細胞, N-カドヘリンを過剰発現した細胞を用いて, マウス腫瘍同所移植モデルで転移実験を行った. N-カドヘリンを過剰発現した細胞は, 有意に腹膜播種や肺転移が増加し, N-カドヘリンを抑制した細胞は転移能の低下が認められた. 以上より, N-カドヘリンの増加が腫瘍進展・転移に大きな役割を果たしていると考えられた.

N-カドヘリンが細胞遊走や転移能獲得にどのように関連しているか, 様々な議論がなされてきた. N-カドヘリンからのシグナルで Rac1 などの低分子 G タンパク質が活性化するという報告や, N-カドヘリンが FGF (fibroblast growth factor) 受容体と二量体を形成し, 受容体の安定化, FGF シグナルの増強, さらにマトリックスメタプロテアーゼの発現を誘起するという報告<sup>13)</sup>がある. また血管内皮細胞は血管内皮型 (VE-) カドヘリン, N-カドヘリンを発現しているため, N-カドヘリンを発現したがん細胞が血管内皮細胞に接着できることで, がん細胞が転移先に生着するメカニズムも考えられる (図 3).

また P120-カテニンは低分子 G タンパク質の活性を制御することが報告されており, 細胞遊走や浸潤能を調節する重要な候補分子と考えられ, カドヘリンスイッチングにおける役割が注目されている. 今後カドヘリンのサブタイプ別に P120 の機能を評価することが必要であろう.

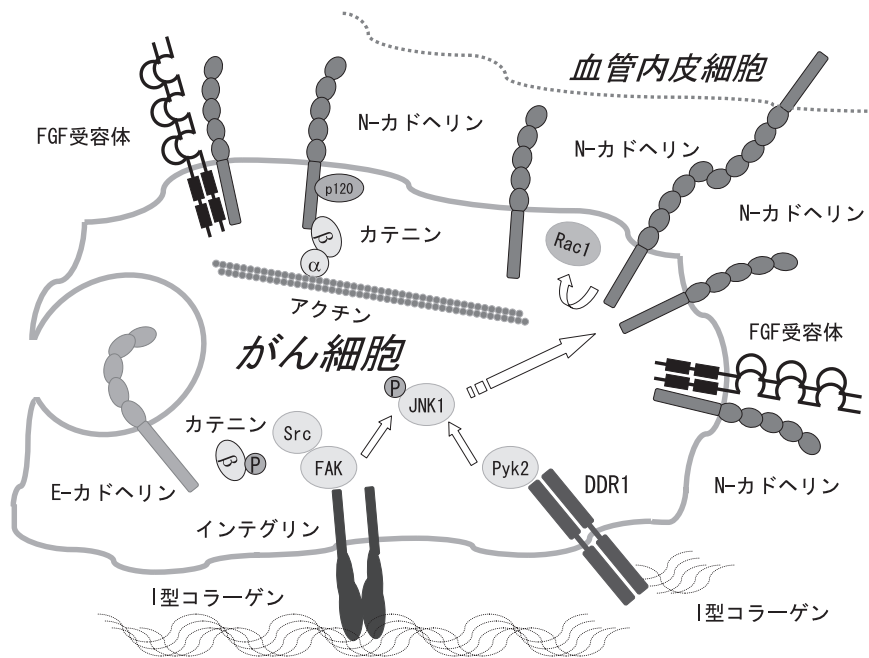


図3 がん細胞でのN-カドヘリンの役割

コラーゲンからのシグナルでN-カドヘリンの発現が誘導される。増加したN-カドヘリンは、Rac1の活性化、FGFR (FGF受容体)と二量体形成・FGFシグナルの増強、血管内皮との接着に関与し、遊走・浸潤・転移能を獲得すると考えられる。

## 5. EMT制御によるがん治療の可能性

マウス肺がん同所移植モデルを用いた転移実験で、N-カドヘリン発現を抑制すると、転移が抑制されることから、EMT制御ががん治療につながる可能性が示唆される。

His-Ala-Val (HAV) モチーフを含むサイクリックペプチド (N-Ac-CHAVC-NH<sub>2</sub>: ADH-1) はN-カドヘリンに対するアンタゴニストであり、N-カドヘリンの機能を特異的に阻害すると報告された<sup>14)</sup>。N-カドヘリンを発現する血管内皮細胞で、このペプチドがアポトーシスを誘導することから、血管新生を抑制する可能性が示唆された。われわれは、コラーゲンによるscatteringがペプチドによって抑制され、*in vivo* モデルでも、がん細胞移植後にこのペプチド (50mg/kg/day) を腹腔内投与することで、腫瘍進展、腹膜播種を抑制することを報告した<sup>15)</sup>。欧米では、悪性疾患に対する臨床試験も進行中である。

また、カドヘリンスイッチングを誘起するシグナルとしてJNK1が重要であり、JNK1をノックダウンした細胞は*in vitro*, *in vivo* で遊走、転移能が低下する。したがって、JNKもがん治療の標的分子になり得るが、JNKにはアポトーシスの誘導など複雑な機能が存在し、サブタイプ別の

機能評価やインヒビターについての詳細な研究が期待される。

以上より、がん治療においてカドヘリンスイッチングが新しい分子標的になり得る可能性が示唆され、今後EMTを抑制する治療の開発が急務であると考えている。

- 1) Boyer, B., Valles, A.M., & Edme, N. (2000) *Biochem. Pharmacol.*, 60, 1091-1099.
- 2) Gumbiner, B.M. (2005) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 622-634.
- 3) Savagner, P. (2001) *BioEssays*, 23, 912-923.
- 4) Thiery, J.P. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, 2, 442-454.
- 5) Wheelock, M.J. & Johnson, K.R. (2003) *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15, 509-514.
- 6) Wheelock, M.J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K.R. (2008) *J. Cell Sci.*, 121, 727-735.
- 7) Nieman, M.T., Prudoff, R.S., Johnson, K.R., & Wheelock, M.J. (1999) *J. Cell Biol.*, 147, 631-644.
- 8) Shintani, Y., Wheelock, M.J., & Johnson, K.R. (2006) *Mol. Biol. Cell*, 17, 2963-2975.
- 9) Shintani, Y., Hollingsworth, M.A., Wheelock, M.J., & Johnson, K.R. (2006) *Cancer Res.*, 66, 11745-11753.
- 10) Shintani, Y., Maeda, M., Chaika, N., Johnson, K.R., & Wheelock, M.J. (2008) *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38, 95-104.
- 11) Shintani, Y., Fukumoto, Y., Chaika, N., Svoboda, R., Wheelock, M.J., & Johnson, K.R. (2008) *J. Cell Biol.*, 180, 1277-

- 1289.
- 12) Imamichi, Y. & Menke, A. (2007) *Cells Tissues Organs*, 185, 180-190.
  - 13) Suyama, K., Shapiro, I., Guttman, M., & Hazan, R.B. (2002) *Cancer Cell*, 2, 301-314.
  - 14) Williams, E., Williams, G., Gour, B.J., Blaschuk, O.W., & Doherty, P. (2000) *J. Biol. Chem.*, 275, 4007-4012.
  - 15) Shintani, Y., Fukumoto, Y., Chaika, N., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., Wheelock, M.J., & Johnson, K.R. (2008) *Int. J. Cancer*, 122, 71-77.

新谷 康

(大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター呼吸器外科)

Collagen I-induced epithelial mesenchymal transition  
 Yasushi Shintani (Department of Thoracic Surgery, Osaka Prefectural Hospital Organization, Osaka Prefectural Medical Center for Respiratory and Allergic Disease, 3-7-1 Habikino, Habikino-city, Osaka 583-8588, Japan)

**血管内皮細胞の遺伝子発現制御研究から  
 みた *in vivo* プロモーター解析の重要性**

1. はじめに

遺伝子発現制御メカニズムの研究は、時代と共に大きく進歩し、DNA とそこに直接結合する転写因子だけが役者であった時代から、転写因子に結合するコファクター複合体、ヒストンの修飾やDNA のメチル化、これら全てが作り上げるクロマチン構造とその変化など、ゲノム上で誘起されるダイナミックな変化を考慮にいれて議論しなければ

ならない時代へと変化してきた。このため、これら核内で起こる多分子による複合的な変化を試験管内 (*in vitro*) で忠実に再現し研究することは非常に難しくなり、より生理的条件に近い状態を反映しうる遺伝子改変動物を用いた *in vivo* プロモーター解析の導入が不可欠となりつつある。本稿では、まず血管内皮細胞研究の側面からみた *in vivo* プロモーター解析の重要性について述べ、次に、種々の遺伝子改変マウスを用いたプロモーター解析法の特徴について、最後に、血管内皮細胞特異的に発現する *Robo4* 遺伝子をモデルとした *in vivo* プロモーター解析例について概説する。(なお、本稿における「*in vitro* プロモーター解析」は培養細胞への一過的な遺伝子導入実験によるプロモーター活性の評価を指し、「*in vivo* プロモーター解析」は、遺伝子改変動物を用いたプロモーター活性の評価をそれぞれ指すものとする。)

2. 血管内皮細胞研究からみた *in vivo* プロモーター解析の重要性

これまでの遺伝子発現調節機構の研究は、各遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、これにレポーター遺伝子(ルシフェラーゼなど)を連結したDNA断片を持つプラスミドを細胞に一過的に導入しプロモーター活性を評価する *in vitro* の手法で行われてきた(図1)。この *in vitro* 手法は簡便かつ有用なアプローチであるが、しばしば、この手法で解析された結果と、*in vivo* で解析した結果に相違が見られることが知られている。Longらは、この点を指摘し、*in vitro* 手法は生理的条件下でのプロモーターの活性を完全には評価できておらず、遺伝子改変マウス等を用いた *in vivo* 解析を行うことが重要であると述べてい

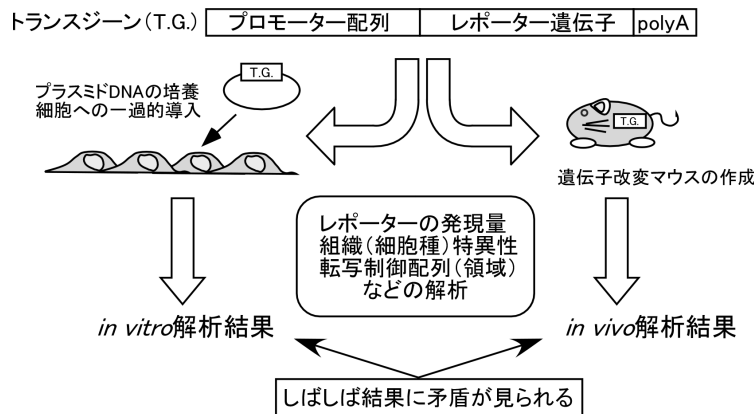


図1 レポーター遺伝子を用いた *in vitro* プロモーター解析と *in vivo* プロモーター解析