総説

正常上皮細胞と変異上皮細胞間の
相互作用とその臨床応用

梶田美穂子, 藤田 恭之

要約: 発がん過程において, 上皮細胞層に生じた1つのがん細胞(変異細胞)は周りを正常上皮細胞に囲まれた状態で増殖していく。ショウジョウバエでは, 正常上皮細胞と変異細胞の境界において生存を懸けた競争が起こることが報告されている。一方, 他の動物種でも同様の現象が起こるのかは長い間不明であったが, 最近になって, ほ乳類においても正常上皮細胞と変異細胞の境界で様々な現象が起こることが明らかになってきた。たとえば, ある種のがん遺伝子が活性化した変異細胞と正常細胞の境界では, 変異細胞が細胞層の頭頂側へはじき出されるように離脱することが示された。このとき, 変異細胞内では複数のシグナル伝達系が活性化されており, 周りの正常細胞の存在が, 変異細胞内のシグナル変化と挙動に影響を与え得るということが分かった。また, ある種のがん抑制遺伝子のノックダウンによって変異した細胞では, 正常細胞に囲まれたときのみアポトーシスが誘導され, 細胞層の頭頂側へ排除されることが分かった。細胞層の頭頂側とは, 生体内では管腔側にあたるため, がんが浸潤する方向の反対側と見なすことができる。つまり, 正常上皮細胞には抗腫瘍能力が備わっており, 変異細胞の管腔側への離脱もしくはアポトーシスの誘導等により, 異常な細胞から生体を守っている可能性がある。さらに細胞培養系だけでなく, ゼブラフィッシュやマウスの *in vivo* システムにおいても正常細胞と変異細胞の境界で特異的な現象が報告されてきた。この総説では主には乳類における正常上皮細胞と変異細胞の境界で起こるさまざまな現象について紹介する。また, この新規の研究分野がどのようにがん予防・治療法の開発へとつながっていくかその展望を論説する。

はじめに

我々の体内で生じるがんの80%以上は上皮細胞由来である。がんは, 正常な上皮細胞層の中の1つの細胞に発がんを促す変異が起こることから生じ, その変異細胞が増殖し, さらなる変異が蓄積して悪性腫瘍へと変化していく。これまでの研究で, 発がん性変異に

よって細胞に生じるシグナル伝達の変化や増殖・運動等への影響について多くの分子メカニズムが解明されてきた。一方でがん発生の超初期段階である「正常上皮細胞層の1つの細胞に変異が起こった」とき, 新たに生じた変異細胞とそれを取り囲む正常上皮細胞の境界で何が起こるのかについてはほとんど明らかになっていない。変異細胞と正常細胞はお互いの違いを認識するのだろうか? またもし違いを認識するとすれば, 何か作用を及ぼし合うのだろうか?

ショウジョウバエにおいては, 正常上皮細胞と変異細胞の境界で様々な現象が起こることが報告されてきた。特にショウジョウバエの発生過程において, 正常細胞層内に生じた変異細胞と周りの正常細胞との間では生存を争う競争が繰り返される。競争に敗れた *loser* 細胞はアポトーシスによって排除され, *winner* 細胞は空いたスペースを埋めるように増殖する。この現象は「細胞競合」と呼ばれ, 現在ショウジョウバエの研究分野で非常にホットなトピックとなっている(1-3)。細胞競合は, リボソームタンパク質の機能欠損変異体である *Minute* 変異細胞が正常上皮細胞に囲まれるとアポトーシスを起こして排除される現象として, Morata らによって初めて報告された(4)。その後の研究で, がん遺伝子である *Myc*(5, 6)・*Ras*(7)・*Src*(*Csk*)(8), がん抑制遺伝子である *Scribble*(9, 10)・*Lgl*(*Lethal giant larvae*)等(11)に異常を持った変異細胞と正常細胞間においても細胞競合が起こることが示されてきた(表1)。一方で, ほ乳類においては正常上皮細胞と変異細胞の境界で起こる現象についてはほとんど報告されていなかった。しかし近年になっていくつかの興味深い論文が発表され, ほ乳類細胞においても, 正常上皮細胞と変異細胞の境界で様々な現象が起こることが明らかになりつつある(表1)。

1. Ras 変異細胞と正常上皮細胞間の相互作用

Ras は small GTPase ファミリーに属し, 細胞の増殖・分化・運動等に関わるシグナル分子である。また *Ras* 遺伝子の恒常的活性化型変異は膵臓がんや大腸が

キーワード: がん, 上皮細胞, 細胞競合, がん遺伝子, がん抑制遺伝子

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野 (〒060-0815 北海道札幌市北区北15条西7丁目)

E-mail: yasu@igm.hokudai.ac.jp 原稿受領日: 2012年4月20日, 依頼原稿

Title: Interactions between normal and transformed epithelial cells: their clinical applications

Author: Mihoko Kajita, Yasuyuki Fujita

んなど複数のがんで報告されており、ヒトのがんでは最も高率に変異がみられるがん遺伝子の1つである。Hogan らは、恒常的活性化型の Ras (RasV12) を発現する変異上皮細胞と正常上皮細胞の境界で起こる現象を詳細に解析した(12)。まず、イヌの腎尿細管上皮細胞由来の Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を用いて、テトラサイクリン依存的に RasV12 を発現する細胞株を樹立した (MDCK-pTR-GFP-RasV12 細胞：以下、RasV12 細胞と略称)。この変異細胞を蛍光色素で染色し、染色していない正常 MDCK 細胞と 1：100 (RasV12 細胞：正常 MDCK 細胞) の割合で混合した。数時間後に細胞同士が接着し一層の細胞層を形成した後に、テトラサイクリンを添加して RasV12 の発現を誘導した。タイムラプス顕微鏡にて細胞の挙動を観察したところ、80%以上の RasV12 細胞が正常上皮細胞層の頭頂側へはじき出されるように離脱する様子が観察された (図 1)。RasV12 細胞のみを培養してもこのような現象は生じないことから、この頭頂側への RasV12 細胞の離脱は Ras の活性化のみでは起こらず、周りを正常上皮細胞に囲まれているために起こる現象であることが示された。ここで、上皮細胞層の頭頂側というのは、生体内では管腔側にあたる。変異し

た細胞が浸潤・転移するには細胞は頭頂側とは反対の基底側に離脱する必要があるため、この変異細胞の頭頂側への逸脱は正常上皮細胞による転移を阻害する抗腫瘍的な現象であると考えられる。正常上皮細胞に囲まれた RasV12 細胞について、さらに解析を進めた結果、細胞層内の頭頂側へ離脱する前の RasV12 細胞では、周りの正常細胞と比べて明らかに細胞の高さが増していることが分かった。さらに正常細胞に囲まれた RasV12 細胞の細胞間接着部位では F-actin が集積しており、RasV12 細胞内ではミオシン活性も亢進していた。これらの変化は RasV12 細胞のみを培養したときには見られないため、周りの正常細胞の存在によって RasV12 細胞の形態や細胞骨格系のシグナルが影響を受けていることが示された。

一方、このような頭頂側への離脱は 20%の RasV12 細胞では観察されなかった。そこで、Hogan らは正常上皮細胞層から離脱しない RasV12 細胞について解析を行った。すると頭頂側に離脱しない RasV12 細胞は、周りの正常細胞の基底側にダイナミックな突起を伸長させることが明らかとなった。この基底側の突起は正常細胞と RasV12 細胞の境界でのみ特異的に形成され、RasV12 細胞同士の間では観察されなかった。つまり

表 1 正常細胞と変異細胞の相互作用

	変異	現象
ショウジョウバエ	<i>Myc</i>	Myc 発現量の少ない細胞のアポトーシス (5, 6)
	<i>Src</i> (<i>Csk</i>)	Src 活性化細胞の基底側への離脱 (アポトーシス非依存) (8)
	<i>Ras</i>	Ras 活性化細胞の周りの正常細胞のアポトーシス (7) Ras 活性化細胞の頭頂側あるいは基底側への離脱 (12)
	<i>Scribble</i>	<i>Scribble</i> 変異細胞のアポトーシス (9, 10)
	<i>Lgl</i>	<i>Lgl</i> 変異細胞のアポトーシス (11, 16)
哺乳類 (培養細胞)	<i>Ras</i>	Ras 活性化細胞の頭頂側への離脱あるいは基底側への突起形成 (12)
	<i>Src</i>	Src 活性化細胞の頭頂側への離脱 (15)
	<i>Mahjong</i>	<i>Mahjong</i> 変異細胞のアポトーシス (16)
	<i>Scribble</i>	<i>Scribble</i> 変異細胞のアポトーシス (17)
	<i>ErbB2</i>	<i>ErbB2</i> 過剰発現細胞の lumen 内への移動と増殖 (19) (三次元培養)
ゼブラフィッシュ (In vivo)	<i>Src</i>	Src 活性化細胞の頭頂側への離脱 (15)
マウス (In vivo)	<i>p53</i>	p53 変異細胞と正常細胞間の細胞競合 (18)

図 1 正常上皮細胞に囲まれた RasV12 細胞 (図中矢印) で起こる頭頂側への離脱
正常 MDCK 細胞と蛍光色素 CMTPX で染色した RasV12 細胞を 100：1 の割合で混合し、細胞層を形成後、テトラサイクリンを添加してタイムラプス顕微鏡によって観察した (文献 12 より一部改変)。時間はテトラサイクリン添加後の経過時間。スケールバー：20 μ m。

この突起形成は正常上皮細胞と RasV12 細胞の相互作用によって特異的に起こる現象である。さらに種々の阻害薬を使った実験により, RasV12 細胞の頭頂側への離脱は, ミオシン-II やアクチン重合, Ras シグナルの下流である MEK をそれぞれ阻害することにより抑制された。また, 基底側への突起形成は, MEK の阻害薬に加え, PI3 キナーゼの阻害薬によっても抑制された。これらの結果は, RasV12 細胞の頭頂側への離脱と基底側への突起形成が, 部分的には異なったシグナル経路によって引き起こされていることを示唆している。

最後に Hogan らは RasV12 細胞内の Cdc42 や Rho キナーゼ活性の抑制により, RasV12 細胞の頭頂側への離脱が阻害され, 基底側への突起形成が促進することを見いだした。さらに, RasV12 細胞の周りの正常細胞から細胞間接着因子である E-カドヘリンをノックダウンすると, RasV12 細胞の頭頂側への離脱が抑制され, 基底側へ潜り込むように浸潤していった。このことは, 慢性炎症や慢性感染など上皮細胞間の接着に異常をきたす病的な環境下では, RasV12 細胞が基底側に浸潤する頻度が増大するという可能性を示唆している。このように, RasV12 細胞が頭頂側にはじき出されるか, あるいは基底側に突起を伸ばし浸潤していくかという選択は, 変異細胞と周囲の正常上皮細胞内の複数のシグナル伝達系の活性状態によって影響を受ける (図 2)。

この研究において最も重要なのは, これらの現象が細胞非自律的に正常細胞と RasV12 細胞の境界でのみ起こるという点である。すなわち, Ras シグナル伝達系の活性化による細胞自律的な現象ではなく, 変異細胞と周囲の正常細胞との相互作用によって生じる「社会的な現象」である点である。正常細胞がどのように変異細胞の存在を認知し, その排除に積極的な機能を果たしているかそのメカニズムについて現在精力的に研究が行われている。

2. Src 変異細胞と正常上皮細胞間の相互作用

c-Src 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 (13)。近年 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 (14)。Kajita らは温度依存的に *v-Src* の活性が変化する MDCK 細胞を用いて (以下, Src 細胞と略称), Src 変異細胞と正常上皮細胞の境界で起こる現象を明らかにした (15)。この Src 細胞では, *v-Src* の活性が温度に依存しており, 40.5℃ では *v-Src* は不活性型, 35℃ では *v-Src* が速やかに活性化して細胞の形質転換を誘導するという細胞株である。上述した RasV12 細胞を用いた実験と同様に, Kajita らは *v-Src* が不活性の状態 Src 細胞: 正常 MDCK 細胞が 1:100 の割合になるように培養し, 細胞が一層の上皮細胞層を形成した後に, 35℃ に温度を変化させることによって Src の活性をオンにした。すると, *v-Src* の活性をオンにしてから 10~24 時間後に, 約 80% の Src 細胞が正常細胞層の頭頂側に離脱した。さらに離脱する前の Src 細胞では周りの正常細胞と比べて細胞の高さが増していることも観察された。またこの現象は Src 細胞のみを培養した場合には起こらなかった。一方で Ras 細胞とは異なり, Src 細胞では細胞の基底側への突起形成は見られなかった。また, 頭頂側へ離脱する前の正常上皮細胞に囲まれた Src 細胞内で, ミオシン-II やフォーカルアドヒージョンキナーゼの活性が亢進しており, その下流では, ERK の活性化が観察された。さらにこれらの分子の阻害薬を用いた実験から, これらの分子の活性化が Src 細胞の頭頂側への離脱に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また, Rho キナーゼの阻害薬は Src 細胞の離脱を抑制したが, PI3 キナーゼの阻害薬は影響を与えなかった。これらのデータから, Ras 細胞と Src

図2 正常上皮細胞と RasV12 細胞間で起こる現象

RasV12 細胞が細胞層の頭頂側へ離脱する (左側) か, あるいは基底側に突起を形成するか (右側) は, RasV12 細胞内と周囲の正常上皮細胞内の複数のシグナル伝達系の活性状態に依存している。

細胞の正常上皮細胞層からの離脱は、共通の分子メカニズムによって制御されている一方、異なるシグナル伝達によってもそれぞれコントロールされていることが分かった。

さらに Kajita らは、ゼブラフィッシュの胚発生段階における enveloping layer (EVL) をモデルシステムとして利用した(15)。EVL は胚発生のある段階においてゼブラフィッシュ胚の外側を覆うように形成される一層の上皮細胞層である。この EVL に v-Src をモザイク状に発現させた。すると、v-Src を発現している細胞は高頻度に細胞丈が高くなり、さらに正常細胞層の頭頂側へ離脱した。この結果から、v-Src 発現細胞の正常細胞層からの離脱は in vivo でも起こる現象であることが示された。

3. ほ乳類における細胞競合

ショウジョウバエの成虫原基 (imaginal disc) を用いた実験により、がん抑制遺伝子として知られる *Lgl* を欠損した細胞は正常上皮細胞との細胞競合によって上皮細胞層から除かれることが報告された(11, 16)。しかし、どのようにして正常上皮細胞に囲まれた *Lgl* 欠損細胞がアポトーシスを起こすのかその分子メカニズムは不明であった。Tamori らはほ乳類細胞において *Lgl* に結合する分子として Mahjong を同定した(16)。ショウジョウバエでも *Lgl* と Mahjong が結合することから Mahjong は進化の過程で保存された *Lgl* 結合タンパク質であることが分かった。さらにショウジョウバエの成虫翅原基 (wing disc) を用いた実験から、Mahjong の欠損細胞は細胞競合によって正常上皮細胞から排除されること、またこの現象において Mahjong が *Lgl* の下流で作用することを明らかにした。さらに興味深いことに、ほ乳類上皮細胞においても、Mahjong をノックダウンした細胞が正常上皮細胞に囲まれたときには Mahjong ノックダウン細胞がアポトーシスにより細胞層の頭頂側にはじき出されることが分かった。この現象は Mahjong ノックダウン細胞のみを培養した場合には見られなかったことから、周りの正常細胞の存在が Mahjong 細胞のアポトーシスを引き起こしていることが示された。また、ショウジョウバエ・ほ乳類細胞のどちらの場合でも、Mahjong 変異細胞のアポトーシスには JNK シグナル伝達系が関与していた。これらの結果から、ショウジョウバエの発生段階で発見された細胞競合という現象が、ほ乳類の上皮細胞においても保存された現象であることが初めて示された。

Mahjong に続いて、がん抑制タンパク質 Scribble についても、ほ乳類上皮細胞において細胞競合に関与していることが明らかとなった(17)。Norman らはテトラサイクリン依存的に Scribble ノックダウンを誘導できる MDCK 細胞を樹立し、Scribble ノックダウン細胞と正常 MDCK 細胞との境界で起こる現象を観察した。その結果、正常細胞に囲まれた Scribble 変異細胞はアポトーシスを起こし、正常細胞層の頭頂側へ排除されることが分かった。一方、Scribble 変異細胞のみを培

養した場合には、このような細胞死は見られなかった。さらに、正常細胞に囲まれた Scribble 変異細胞内では p38MAPK の活性が有意に亢進しており、p38MAPK の活性化が Scribble 変異細胞のアポトーシスに関与していた。ショウジョウバエにおいても Scribble 変異細胞は細胞競合によってアポトーシスを起こすが、その現象には p38MAPK ではなく JNK が関与している(9, 10)。このことから、この現象がほ乳類とショウジョウバエでは少なくとも部分的に異なるシグナル経路を介して誘起されていることが明らかとなった。

さらに、マウスの造血システムにおいて、ヒトのがんで最も頻繁に変異が報告されているがん抑制遺伝子 *p53* が細胞競合に関与していることが示された(18)。Bonder らは、*p53* 変異マウスと wild-type マウスからそれぞれ骨髓細胞を採取して混合し、骨髓を死滅させた別のマウスに移植した。16 週間後にそれぞれのドナーマウス由来の造血幹細胞と造血前駆細胞 (hematopoietic stem and progenitor cells: HSPCs) の数を調べたところ、ある種の条件下において、*p53* の機能レベルが低い細胞と高い細胞の間で細胞競合が起こり、前者が winner となって生き残ることが示された。また興味深いことに、これまで報告されてきた細胞競合とは異なり、敗者となる細胞 (*p53* の機能レベルが高い細胞) のアポトーシスではなく、細胞老化が関与していることも明らかになった。

まとめと薬理学的展望

以上に述べてきたように、ショウジョウバエ・ほ乳類培養細胞・ゼブラフィッシュ・マウスにおいて正常上皮細胞と変異細胞の境界で様々なシグナルのやり取りがなされていることが明らかになってきた。すなわち、がん発生の初期段階において正常上皮細胞層に新たに出現した様々なタイプの変異細胞と正常上皮細胞は互いの違いを認識し、それに応じてそれぞれのシグナル伝達系に影響を与え合う。次の大きな課題は、変異細胞と正常上皮細胞の境界で働く分子の探索である。変異細胞と正常上皮細胞はどのようにお互いを認識するのか？ またその認識はどのようにして細胞内シグナル伝達へと変換されるのか？ これらのプロセスに関わる分子群についてはまだ報告されていないが、我々の最近の研究で、数多くの分子が正常細胞と変異細胞の境界で特異的に機能していることが明らかになりつつある (未発表データ)。今後は網羅的なスクリーニング解析によってこれらの分子の同定を進めることにより、正常上皮細胞と変異細胞の相互作用の全貌が明らかになっていくことが期待される。

従来のがん研究・治療では、正常細胞とがん細胞におけるシグナル伝達系の相違を明らかにし、その情報を基にしてがん細胞を選択的にたたくというアプローチが取られてきた。創薬の標的となるのは、がん細胞において亢進している (あるいは低下している) シグナル伝達経路に関わる分子である。しかしそれらの分子は、正常細胞の生存や機能にとっても何らかの重要な働きをしていることが少なくなく、そのために重篤

図3 新しいタイプのがん治療のイメージ図

正常上皮細胞に備わった抗腫瘍作用を人為的に促進することにより、変異細胞の細胞死や管腔側への離脱を促進する。

な副作用を誘起することが薬理学的な大きな問題点であった。一方、正常上皮細胞と変異細胞の相互作用はこれまでのがん研究でほとんど手のつけられてこなかった未開拓の研究分野である。我々および他のグループの最近の研究によって、正常上皮細胞には変異細胞のアポトーシスや管腔側へ排除を誘導する抗腫瘍能力が備わっていることが示されてきた。またこの現象に関わる分子が少なからず存在していることも明らかになりつつある(20)。もし正常細胞と変異細胞の境界において特異的に機能している分子が同定されれば、それらは創薬のターゲットとなりえる。たとえば、正常細胞がどのように変異細胞の細胞死を誘導するか、そのメカニズムや分子群が明らかになれば、それらの働きを亢進するような低分子化合物や抗体を同定・開発することによって、周囲の正常細胞による変異細胞への攻撃能力を高める治療法につながる(図3)。あるいは、がんの進展とともに、変異細胞が正常細胞からの攻撃に対する抵抗力をどのように増すか、その分子メカニズムが明らかになればそれらを抑制することによって、周囲の正常細胞からの攻撃に対する変異細胞のディフェンスを弱めることができるであろう。このような、「正常上皮細胞と変異細胞の社会性」に着目した治療法は、我々の知るところではまだ報告がない。この新規のがん研究を進展していくことにより、これまでになかった、副作用の少ない新たなタイプのがん予防・治療法の開発へとつながっていくことが大いに期待される(図3)。

また、現在の臨床におけるがんの診断は、がんによる形態変化を主な判断基準としているため、体内に多数存在すると考えられる形態変化を伴わない初期段階のがん細胞を検出する方法はまだない。本研究の進展とともに、変異細胞と正常細胞の境界で発現が増加する分子が同定されれば、形態変化を伴わないがんを早期に検出する「初期がんの境界マーカー」として臨床診断学に革新的な効果・影響を与えることが予想される。

文 献

1) Baker NE, et al. Cancer Res. 2008;68:5505-5507.

- 2) Diaz B, et al. Exp Cell Res. 2005;306:317-322.
- 3) Johnston LA. Science. 2009;324:1679-1682.
- 4) Morata G, et al. Dev Biol. 1975;42:211-221.
- 5) de la Cova C, et al. Cell. 2004;117:107-116.
- 6) Moreno E, et al. Cell. 2004;117:117-129.
- 7) Karim FD, et al. Development. 1998;125:1-9.
- 8) Vidal M, et al. Dev Cell. 2006;10:33-44.
- 9) Igaki T, et al. Dev Cell. 2009;16:458-465.
- 10) Brumby AM, et al. EMBO J. 2003;22:5769-5779.
- 11) Grzeschik NA, et al. Dev Biol. 2007;311:106-123.
- 12) Hogan C, et al. Nat Cell Biol. 2009;11:460-467.
- 13) Hunter T, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77:1311-1315.
- 14) Frame MC. Biochim Biophys Acta. 2002;1602:114-130.
- 15) Kajita M, et al. J Cell Sci. 2010;123:171-180.
- 16) Tamori Y, et al. PLoS Biol. 2010;8:e1000422.
- 17) Norman M, et al. J Cell Sci. 2012;125:59-66.
- 18) Bondar T, et al. Cell Stem Cell. 2010;6:309-322.
- 19) Leung CT, et al. Nature. 2012;482:410-413.
- 20) Rhiner C, et al. Dev Cell. 2010;18:985-998.

著者プロフィール

梶田美穂子 (かじた みほこ)

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野, 助教, 医学博士。

◇ 2007年大阪大学大学院医学系研究科博士課程修了, 同年より英国 MRC LMCB 研究所博士研究員。'11年3月より現職。◇研究テーマ: 正常細胞と変異細胞の境界で起こる現象の解明。◇趣味: 歴史小説を読むこと, スカッシュ。

藤田 恭之 (ふじた やすゆき)

北海道大学 遺伝子病制御研究所 分子腫瘍分野, 教授, 医学博士。

◇ 1997年京都大学大学院医学系研究科博士課程修了。'97~'02年ドイツ Max-Delbrück Center 博士研究員を経て, '02年から'11年まで英国 MRC LMCB 研究所グループリーダー。'10年4月より現職。◇研究テーマ: 細胞競合を用いた新規癌治療法の確立。◇趣味: 空手, バドミントン。