

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012 年度

課題番号：23890003

研究課題名（和文）変異細胞と正常上皮細胞の境界で起こる現象の解明

研究課題名（英文）Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells.

研究代表者

梶田 美穂子 (KAJITA MIHOKO)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教

研究者番号：00607442

研究成果の概要(和文):癌発生の初期段階では、正常上皮細胞層の一つの細胞に変異が起こる。最近になって、ある種の変異細胞は正常上皮細胞層から排除されることが分かってきたが、その分子機構はまだ不明である。本研究では、生化学的スクリーニングを通じて、この現象をポジティブに制御する分子 filamin と vimentin を発見し、さらにこれらを介して変異細胞の周りの正常上皮細胞が、変異細胞をはじき出す現象に積極的に関与している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文): At the initial stage of carcinogenesis, transformation occurs in single cells within epithelia. Recent studies have shown that certain types of transformed cells are extruded from an epithelial monolayer. However, molecular mechanisms are not clearly understood. In this project, using a biochemical screening, I have found that filamin A and vimentin are specifically modulated when normal and transformed epithelial cells interact with each other. I have also found that normal epithelial cells actively eliminate neighboring transformed cells via filamin A and vimentin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・医科学一般

キーワード：癌、上皮細胞、Src、vimentin、filamin

## 1. 研究開始当初の背景

体内の正常上皮細胞層において、最初にがんを誘発するような変異が起きたとき、この変異細胞は正常上皮細胞に囲まれている。これまでの研究により、ある種の変異細胞が正常上皮細胞に囲まれると、正常細胞層の頭頂側へ排除されることが分かっている。しかし、どのように変異細胞が排除されるのか、その分子機構については不明であった。

## 2. 研究の目的

変異細胞と正常細胞の境界で起こる現象を分子レベルで解明する。

## 3. 研究の方法

本研究では正常上皮細胞としてイヌ腎上皮細胞である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞、変異細胞として温度感受性 v-Src を発現している MDCK 細胞とテトラサイクリン依存的に RasV12 を発現する MDCK 細胞を用いた。

(1) 変異細胞と正常上皮細胞の境界で特異的に機能する分子の探索

正常上皮細胞と変異細胞の境界で機能する分子を探索するために抗リン酸化チロシン抗体を用いて正常上皮細胞と変異細胞の境界で特異的に免疫沈降される分子を探索した。具体的には i) MDCK 細胞のみ、ii) MDCK 細胞と Src 変異細胞の混合培養、iii) Src 変異細胞のみ、の3つの条件で細胞を培養し、そのライセートを免疫沈降して比較す

ることにより、混合培養下で特異的に変化しているタンパク質を探索した。

(2) 上記(1)で新たに同定された分子 filamin が正常細胞側か変異細胞側のどちらで機能するのか細胞染色などにより確認した。またこの分子が、変異細胞が正常上皮細胞層の頭頂側へ排除される機構に関わるか、そのノックダウン細胞を用いて検証した。

(3) 上記(1)で同定された分子 filamin について、ゼブラフィッシュ胚を用いた生体モデルにおいて培養細胞と同様の機能を示すか調べた。

## 4. 研究成果

(1) 抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫沈降により、正常細胞と変異細胞を混合した場合に特異的に免疫沈降されるタンパク質として、本申請の時点ですでに発見していた vimentin に加えて、アクチン結合タンパク質である filamin を同定する事に成功した。(図1 矢印。)

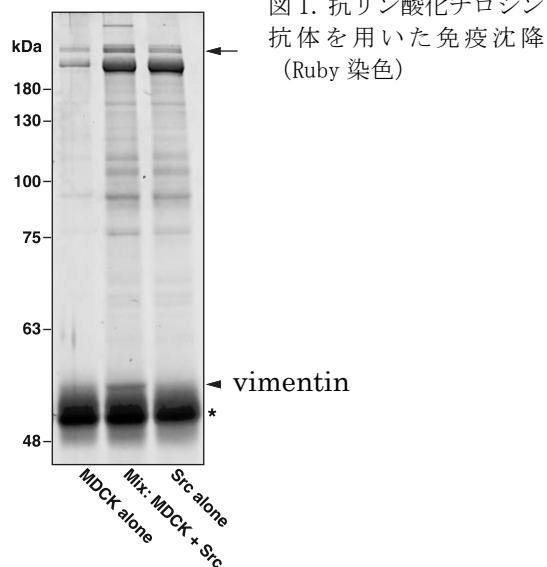


図1. 抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫沈降 (Ruby 染色)

(2) 抗リン酸化チロシン抗体を用いた免疫沈降により新たに同定された filamin について、細胞染色により局在を調べた結果、Src 変異細胞の周りの正常細胞側で、変異細胞を取り囲むように filamin が集積しているのが観察された (図 2)。同様の結果は RasV12 変異細胞についても確認した。

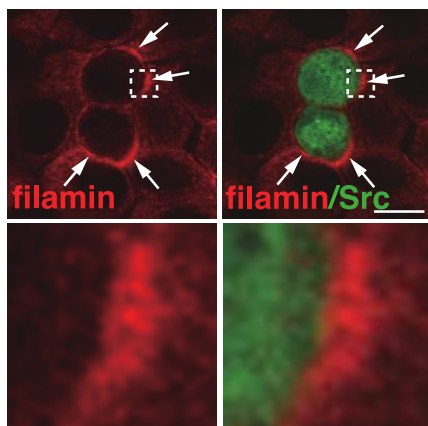


図 2. 抗 filamin 抗体を用いた細胞染色  
緑色蛍光色素で染色した Src 変異細胞の周りの正常上皮細胞内において、変異細胞を取り囲むように filamin が集積している (図中矢印)。下図は点線内の拡大図。スケールバー、10  $\mu\text{m}$ 。

また、filamin のノックダウン細胞を樹立し、この細胞で変異細胞を囲むと Src もしくは RasV12 変異細胞が細胞層の頭頂側へ押し出される現象が顕著に抑制されることが分かった。この結果により、変異細胞が押し出される現象には周りの正常細胞の filamin が関与していることが示された。さらに filamin が vimentin の上流で作用し、vimentin が変異細胞の周りに集積する現象に関わっている事も明らかとなった。これらの結果から filamin は正常上皮細胞と変異細胞の境界で起こる現象に中心的な役割を果たすことが示唆された。

(3) 私は既にゼブラフィッシュ胚を用いて、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞が細胞層の頭頂側へ押し出される現象を報告している (Kajita et al., 2010, JCS)。この現象に filamin が関与しているか明らかにするため、GFP-filamin を発現したゼブラフィッシュを作製した (ロンドン大学、多田正純博士との共同研究)。このゼブラフィッシュ胚を用いて、Src 変異細胞をモザイク状に発現させたところ、GFP-filamin は Src 変異細胞の周りの正常細胞において、Src 変異細胞を取り囲むように集積していた (図 3)。さらにゼブラフィッシュ胚から filamin をノックダウンしたところ、Src 変異細胞が細胞層の頭頂側へ押し出される現象は顕著に抑制され、filamin の発現を戻すとその抑制は解除された。これらの結果から、正常細胞と変異細胞の境界で起こる現象への filamin の関与は生体レベルでも確認され、さらに哺乳類からゼブラフィッシュまで保存された現象であることが明らかとなった。

#### GFP-filamin/v-Src

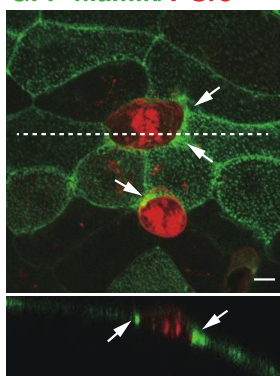


図 3. ゼブラフィッシュ胚における filamin 集積  
v-Src 発現細胞 (赤) の周りの正常細胞において、変異細胞を取り囲むように集積する GFP-filamin (緑)。矢印は集積した GFP-filamin を示す。下図は図中点線部の側面図。スケールバー、10  $\mu\text{m}$ 。

以上の結果は、変異細胞が正常上皮細胞の頭頂側へ押し出される現象に、周りの正常細胞が積極的に関わっていることが分子レベルで示された世界で初めての報告である。これ

らの結果は、癌発生の初期段階において、免疫細胞等が反応する前段階では、変異細胞の周りの正常細胞が“免疫細胞様”に作用する可能性を示唆している。今後さらにこのような研究を進展させることにより、周りの正常細胞の変異細胞に対する防御力を促進するような、新たな癌治療法に結びつくことが期待される。

現在は上記の内容について Nature への論文リバイス中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. 梶田美穂子、藤田恭之 「正常上皮細胞と変異細胞間で生じる細胞競合~がん細胞をとりまく新たな heterogeneity~」 実験医学、2013 Vol.31 No.1(Jan). P39-44. 査読なし

2. Kajita M, Fujita Y [Interactions between normal and transformed epithelial cells: their clinical applications]. Nihon Yakurigaku Zasshi 2012 Aug, 140(2) P76-80. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

1. Mihoko Kajita, ポスター発表 [Interaction with Src-transformed cells influences signalling pathways and behaviour of surrounding normal epithelial cells.] EMBO meeting, 2012 年 9 月 22-25 日 Nice Acropolis (フランス)

2. Mihoko Kajita 口頭発表 [Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signaling pathways and behavior of Src-transformed cells.] 第 71 回日本癌学会 2012 年 9 月 19-21 日 ホテルロイトン札幌 (札幌市)

3. Mihoko Kajita 口頭発表 [Epithelial defence against transformed cells via filamin-dependent vimentin reorganisation.] 北海道癌談話会 2012 年 9 月 8 日 北海道大学 (札幌市)

4. Mihoko Kajita 口頭発表 [Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells] 第 63 回日本細胞生物学会 2011 年 6 月 27-29 日 北海道大学 (札幌市)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶田 美穂子 (Kajita Mihoko)  
北海道大学・遺伝子病制御研究所・助教  
研究者番号：00607442

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：