

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16757

研究課題名（和文）薬剤誘導性のがん変異細胞排除を促進する細胞間コミュニケーション・シグナル

研究課題名（英文）Cell-cell communication to promote drug-induced elimination of transformed cells.

研究代表者

鴨下 渚（Kamoshita, Nagisa）

早稲田大学・高等研究所・研究助手

研究者番号：30835814

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：TMTKによって変異細胞の硬さが亢進するが、この硬さ依存的に周辺正常細胞で誘導されてくる機能未知の膜タンパク質Xを同定した。このITIMドメインは、チロシン残基がリン酸化されることが知られており、実際にリン酸化されていることを見出した。また、このリン酸化を認識し活性化することが知られているSHP-2タンパク質に注目した。SHP-2はROCK2経路を活性化する。これらのことから、同定した膜タンパク質Xは、SHP-2/ROCK2経路を介して、変異細胞の排除を促進していることを示してきた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「正常上皮細胞が超早期がんを駆逐する」機構は、今後がんを予防的に治療するために必須の研究対象である。すでに同定したTM121501はもちろんのこと、本研究で解明される細胞競合の根幹となる機構を対象とした薬剤が、この「予防的医療」という観点からの全く新しい治療法の確立に繋がることが大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：The stiffness of Ras-transformed cells is enhanced by TMTK, and we identified a membrane protein X of unknown function that is induced in the surrounding normal cells in a stiffness-dependent manner. The ITIM domain is known to be phosphorylated at tyrosine residues, and we found that it is indeed phosphorylated. We also focused on the SHP-2 protein, which is known to recognize and activate this phosphorylation; SHP-2 activates the ROCK2 pathway. Taken together, we have shown that the identified membrane protein X promotes the elimination of mutant cells through the SHP-2/ROCK2 pathway.

研究分野：がん

キーワード：がん

## 1. 研究開始当初の背景

独自に確立した細胞競合現象を指標としたハイスループット・スクリーニングにより、20 万化合物の中から細胞競合現象を効率的に促進する化合物群を見出した。同定した化合物の中でも TM121501 は、正常上皮細胞の「排除」効果のみならず、変異細胞自身の「逸脱」効果、これら両効果を促進することで効率的に変異細胞の排除を促す。加えて、TM121501 を *in vivo* 細胞競合モデルマウスに投与することで、マウス腭管上皮での変異細胞の排除効率の促進に世界で初めて成功した。

TM121501 のターゲット探索の結果、機能未知のタンパク質キナーゼ (TM121501-targeting kinase : TMTK) をターゲットとしていることを見出した。さらに、変異細胞側で TMTK をノックアウト (KO) したときにのみ変異細胞の排除効率が亢進した。このことから、TMTK が変異細胞の排除に対して負に働くことが示唆された。加えて、細胞競合時に変異細胞側で観察される Paxillin の集積が、TMTK-KO 変異細胞において亢進したことからこの結果は細胞競合依存的であることが支持されている。これらより、TMTK は変異細胞「自身」が逸脱しようとする機構を負に制御すると考えられた。一方で興味深いことに、変異細胞側での TMTK-KO は、正常細胞側の細胞競合マーカーである骨格形成因子 Filamin の集積も亢進していた。この事実に加え、正常細胞での TMTK の欠損は変異細胞の排除効率に影響を与えなかったことから、変異細胞の TMTK は、「変異細胞からの正常細胞への細胞間コミュニケーション・シグナル」の上流で作用し、正常細胞側の排除能をも制御していることを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究では、TM121501 が作用対象とするキナーゼ TMTK 制御性の細胞間シグナル関連分子を同定することで、これまで全く不明であった細胞競合における正常 変異細胞間コミュニケーション機構を明らかにする。これにより、細胞競合 促進薬剤創出のさらなる基盤を構築することをねらいとする。

## 3. 研究の方法

本研究では、未解明の正常 変異細胞間コミュニケーション機構の実態を解明するため、まず Q1) 変異細胞における関連膜タンパク質の同定を試みる。その後、Q2) 正常細胞側のカウンターパートを同定する。以下にアプローチする。

1. TMTK が制御する変異細胞側での細胞非自律的なシグナル関連膜タンパク質分子の同定：マイクロアレイ解析より、正常細胞側で変異細胞との混合条件特異的に発現が亢進する遺伝子をすでに同定している。この同遺伝子の遺伝子座に Venus 蛍光タンパク質を CRISPR/Cas9 システムを用いて導入する。これにより、変異細胞との共培養特異的に Venus タンパク質を発現する蛍光レポーター (Reporter : Rep) 「正常」細胞を作成する。Rep 正常細胞と変異細胞を混合し、TM121501 を加えることで Venus 蛍光強度が増強する。これにより、ダイナミックレンジを広げることが可能となるのみならず、TMTK が関与するシグナルを増強することで、TMTK 制御性の細胞間シグナルに関与する分子を特異的に同定する。一方で、MDCK 細胞を用いて目的遺伝子を同定するために、100 程度まで絞り込んだイヌ細胞膜タンパク質の sgRNA アレイライブラリーはすでに構築済みである (Maruyama *et al.*, *Nat Biotechnol.* 2015, Site-directed mutagenesis を基にしたライブラリー作成)。この sgRNA ライブラリーで、個々の遺伝子をノックアウトした「変異」細胞ライブラリーを作成する。このノックアウト変異細胞と正常細胞とを混和する。イメージング・アナライザで蛍光強度を定量し、遺伝子欠損により蛍光が減弱した遺伝子が細胞間シグナル関連タンパクの候補となる。

2. 正常細胞側の細胞間シグナル関連膜タンパク質の同定：Q1) で同定した変異細胞の膜タンパク質のカウンターパートを同定する。膜タンパク質のカウンターパートをプルダウン法などで同定することは比較的困難であると予想される。そこで、表面プラズモン効果法よりも簡便かつ安価であり、クルードサンプルからも相互作用解析が可能である Bio-Layer Interferometry (BLI) 法 (プライムテック社 ; BLItz) を用いて、Q1) で

同定した膜タンパク質のカウンターパートを探索する。まず、細胞外ドメインをリコンビナントタンパク質として作成し、この細胞外ドメインを担持したリガンドセンサーを準備する。また一方で、同定した変異細胞の膜タンパク質との相互作用が報告されている遺伝子を相互作用データベースより絞り込み、絞り込んだ遺伝子を個々に、正常細胞側で過剰発現させる。この過剰発現した正常細胞と変異細胞との混合培養条件下において、細胞表面を種々のプロテアーゼによって処理（シェーピング処理）し、シェード画分液を用意する。上述のリガンドを担持したセンサーを、このアナライトであるシェード画分液に浸すことで、正常細胞で過剰発現した膜タンパク質との相互作用があるかを詳細な相互作用情報から評価する。最終的に、リガンドセンサーに実際に相互作用した膜タンパク質のフラグメントを回収し、質量分析により確認することで、カウンターパートである膜タンパク質の同定確認をおこなう。

3. 1 および 2 で同定した遺伝子の *in vitro* および *in vivo* 細胞競合モデルシステムを用いた細胞競合現象への関与の解析：*in vitro* モデルシステムにおいては、テトラサイクリン依存的に RasV12 タンパク質を発現できる pTR-RasV12 MDCK 細胞もしくは正常 MDCK 細胞において、同定した遺伝子をゲノム編集技術でノックアウトする。これにより、変異細胞の排除効率に同定遺伝子が関与するかを解析する。また、すでに構築している少量のタモキシフェン投与により上皮組織全般にモザイク状に Ras 変異細胞を誘導できる *in vivo* 細胞競合モデルマウス（*CK19-CreERT2;LSL-RasV12-IRES-GFP*）の腸管上皮に siRNA をエレクトロポレーションで遺伝子導入することで、*in vivo* での同定遺伝子の生理的役割を解析する。

#### 4. 研究成果

TMTK が制御する変異細胞側での細胞非自律的なシグナル関連膜タンパク質分子の同定：TMTK によって変異細胞の硬さが亢進するが、この硬さ依存的に周辺正常細胞で誘導されてくる機能未知の膜タンパク質 X を同定した。この ITIM ドメインは、チロシン残基がリン酸化されることが知られており、実際にリン酸化されていることを見出した。また、このリン酸化を認識し活性化することが知られている SHP-2 タンパク質に注目した。SHP-2 は ROCK2 経路を活性化する。これまでの報告から、ROCK1/2 は Filamin の集積を促進することが知られている。正常細胞での Filamin の集積が、変異細胞の押出排除に関与するため、SHP-2 および ROCK2 が Filamin の集積および変異細胞の押出排除に関わるかを検討した。その結果、SHP-2 および ROCK2 の阻害剤処理は、Filamin の集積および変異細胞の排除効率を抑制した。これらのことから、同定した膜タンパク質 X は、SHP-2/ROCK2 経路を介して、変異細胞の排除を促進していることを示してきた。さらに、同膜タンパク質 X が細胞競合現象に関与するかを、ノックアウト細胞を樹立することで検証した。正常細胞側で膜タンパク質 X をノックアウトし、野生型の RasV12 変異細胞と共培養した。その結果、がん変異細胞の排除効率が統計的に有意に減少した。一方で、RasV12 変異細胞において、膜タンパク質 X をノックアウトしたところ、がん変異細胞の排除効率へは影響しなかった。これらのことから、膜タンパク質 X は正常細胞側で細胞競合現象に関与することが示された。これら *in vitro* の解析に加え、膜タンパク質 X の制御する細胞競合現象が、発がん抑制に関わるかを肺の発がんモデルにて検証した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shiyu Ayukawa
2. 発表標題 Epithelial cells recognize antigen presentation to promote elimination of tumorigenic cells
3. 学会等名 AEMD-CREST International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鮎川志優
2. 発表標題 抗原提示変化認識による上皮細胞間コミュニケーション制御
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------