

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03166

研究課題名(和文) 腸管に出現したがん変異細胞の排除機構の破綻メカニズム

研究課題名(英文) Molecular dissection of malfunction of cell competition-mediated elimination of transformed cells in intestine

研究代表者

昆 俊亮 (Kon, Shunsuke)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・講師

研究者番号：70506641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：正常上皮細胞層に出現したRasV12変異細胞は、隣接する正常上皮細胞との細胞競合によって、管腔へと押し出されるように排除される。本研究では、ヒト家族性大腸がん好発するAPC/Rasの変異蓄積を再現した結果、細胞競合が脱制御し、変異細胞が基底膜へとびまん性に浸潤することを見出した。その分子機序として、細胞非自律的にNF- κ B/MMP21経路が活性化することが変異細胞の基底膜浸潤に重要であることを明らかにした。これらの結果より、遺伝子変異が蓄積したがん変異細胞は細胞競合を利用することにより、自己の基底膜浸潤を促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞競合は、正常上皮細胞が担う抗腫瘍機能として注目を浴びている。しかしながら、個体が実際に発がんに至る過程において、細胞競合の機能がどのように変容するかはよく分かっていない。本研究では、ヒト家族性大腸がん好発するAPC/Rasの変異蓄積をマウスにて再現したところ、細胞競合によって本来管腔へと排除されるべき変異細胞の一部が、基底膜側へとびまん性に浸潤することを見出し、その分子論的メカニズムの一端を明らかにした。この研究成果より、複数の遺伝子変異が蓄積した変異細胞は細胞競合現象を利用することにより基底膜浸潤すること、またこのプロセスに関わる分子が新たながん治療標的となり得ることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Normal epithelial cells exert their competitive advantage over RasV12-transformed cells and eliminate them into the apical lumen via cell competition. In this study, we examine the effect of sequential accumulation of gene mutations, mimicking multi-sequential carcinogenesis on RasV12-induced cell competition in intestinal epithelial tissues. Consequently, we find that directionality of RasV12-cell extrusion in Wnt-activated epithelia is reversed, and transformed cells are delaminated into the basal lamina via non-cell autonomous MMP21 upregulation. Subsequently, diffusively infiltrating, transformed cells develop into highly invasive carcinomas. Elevated production of MMP21 is elicited partly through NF- κ B signaling, blockage of which restores apical elimination of RasV12 cells. Collectively, this study shows that cells with high mutational burdens exploit cell competition for their benefit by behaving as unfit cells, endowing them with an invasion advantage.

研究分野：がん生物学

キーワード：細胞競合 多段階発がん NF- κ B MMP21

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞はその高い増殖能や外来性成分に晒されているため、遺伝子変異が生じやすい。個体器官の中でもとりわけ腸管は遺伝子変異が好発する器官の一つである。上皮細胞層にがん原性の変異が誘導されたとき、変異細胞と隣接する正常上皮細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」という現象が生じ、変異細胞が組織より排除されることが近年明らかとなってきた。研究代表者の研究グループは、腸管の最終分化した吸収上皮細胞の少数に活性化 Ras 変異(RasV12)をモザイク誘導するマウス(細胞競合マウスモデル)を作出し、ほとんどの Ras 変異細胞が細胞競合によって管腔側に押し出されるように逸脱することを報告した(Kon et al., Nat. Cell Biol., 2017)。このように、細胞競合は生体内で偶発的に産生されたがん変異細胞を駆逐する生理的機能を担っていると考えられているため、基礎と臨床の広範な分野で注目されている。

2. 研究の目的

細胞競合はがん変異細胞の排除に限らず、代謝や極性形成、酸化ストレス応答に不全な細胞の排除など、細胞社会の恒常性維持に寄与する普遍的な生命機能であることが様々な生物モデルによって示されている。しかしながら、この分野の未解決かつ重要な課題は、恒常性維持の破綻が生起する発がんにおいて、細胞競合の制がん機能がどのように変容または不活性化するのか、その分子論的機序は不明である。一般的に、がんは複数のがん関連遺伝子の変異蓄積により発生することから、研究代表者の研究グループでは、ヒト家族性大腸がんで好発する APC→Ras の多段階発がんを細胞競合マウスにて再現したところ、基底膜側へ逸脱、浸潤する変異細胞数が増加することを見出した。この結果は、Wnt シグナルが活性化すると細胞競合の機能が変容し、本来管腔へと排除される変異細胞の一部が基底膜にびまん性に浸潤することを示唆した。また、上皮細胞の細胞種によってがん発生率やその病態が異なるという背景のもと、腸管の幹細胞に活性化 Ras 変異をモザイク誘導するマウスを新たに導入したところ、細胞競合によるがん変異細胞の排除効率が著しく低下することを見出している。そこで本研究課題では、

(1) APC→Ras の変異蓄積によって細胞競合の機能が変容する分子機構

(2) 上皮細胞の分化度の違いによって細胞競合の排除効率が異なる要因

の 2 つの課題に取り組み、細胞競合と発がんとの関連を個体レベルで理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) APC 変異により細胞競合の機能が変容する分子論的メカニズムの解明

APCmin/RasV12 変異マウスで観察されたがん細胞のびまん性浸潤を培養細胞にて再現するため、APC 変異と同様に Wnt シグナルを活性化する β -catenin の変異体 (β -cat Δ N) を恒常的に発現する細胞株 (β -cat Δ N 細胞) とこの変異体を恒常的に発現し、かつテトラサイクリン依存的に活性化 Ras 変異を誘導できる細胞株を樹立した (β -cat Δ N/RasV12 細胞)。上記細胞株を混合培養し、細胞層形成後、テトラサイクリン添加により Ras 変異を誘導し、マウスと同様の条件を構築した。興味深いことに、 β -cat Δ N/RasV12 細胞の単独培養時にはコラーゲン層への浸潤は認められなかったが、 β -cat Δ N 細胞との混合培養時にコラーゲン層に浸潤する β -cat Δ N/RasV12 細胞が著しく増加し、マウスと同様に細胞非自律的な変異細胞のびまん性浸潤を再現することに成功した。そこで β -cat Δ N/RasV12 細胞を単独培養、もしくは β -cat Δ N 細胞と共培養した後、 β -cat Δ N/RasV12 細胞のみを回収し、オミクス解析を行った。有意に発現変化が認められた分子に関して、細胞競合における機能を培養細胞ならびにマウス個体内で解析することにより、変異細胞の基底膜浸潤を制御する分子を同定した。また、ヒト早期大腸がんの臨床検体を用い、本研究にて同定した分子カスケードの分子病理学的意義についても評価した。

(2) Ras 変異幹細胞が有する細胞競合に対する抵抗性獲得機構の解明

他グループの研究成果より、細胞競合を負に制御する機構が上皮細胞に備わっていることが以前に示されており、いくつかの重要な分子が同定されている。そこで、マウス腸管オルガノイド、もしくはマウス腸隠窩において、これら細胞競合のネガティブレギュレーターを発現や局在を観察した。また、特異的阻害剤を用いて当該分子の機能を阻害した際の Ras 変異腸管幹細胞の排除効率を調べた。

4. 研究成果

(1) APC 変異により細胞競合の機能が変容する分子論的メカニズムの解明

まず、 β -cat Δ N/RasV12 細胞を単独培養、もしくは β -cat Δ N 細胞と混合培養 (β -cat Δ N/RasV12 細胞: β -cat Δ N 細胞=1:50) し、 β -cat Δ N/RasV12 細胞のみを FACS ソーティングし、マイクロアレイ解析を行なった。その結果、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の一つである MMP21 が β -cat Δ N 細胞と混合培養した β -cat Δ N/RasV12 細胞で発現増加することを突き止めた。そこで、MMP ファミリーの発現を定量的 PCR にて解析した結果、MMP21 のみ著増することが分かった (図 1)。そこで、培養細胞、マウス腸管にて MMP21 の免疫染色を行ったところ、細胞非自律的に MMP21 の発現が変異細胞内で増加することが明らかとなった。続いて、MMP21 の機能的な重要性を評価するために、培養細胞ではノックダウン、マウスでは MMP21 ノックアウトマウスを APCmin/RasV12 変異マウスに掛け合わせた結果、変異細胞の基底膜への浸潤率が有意に低下したことから、MMP21 が Wnt シグナルの活性化に伴う細胞競合依存的な変異細胞のびまん性浸潤に必要な分子の一つであることの証左となった。

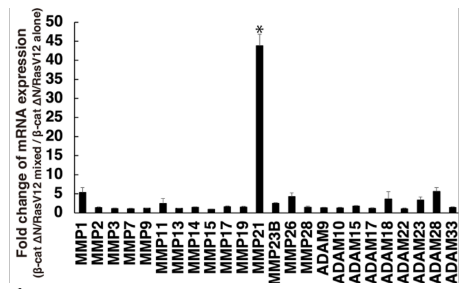


図 1. MMP ファミリーの定量的 PCR の結果

図 1. MMP ファミリーの定量的 PCR の結果

続いて、MMP21 の発現増加を司る上流因子を探索するため、上述したマイクロアレイのデータを基に GSEA 解析を行った。その結果、 β -cat Δ N 細胞と共培養した β -cat Δ N/RasV12 細胞では、NF- κ B シグナルの下流因子群が顕著に発現増加することが分かった。そこで、NF- κ B 応答配列が 4 つタンデムに組み込まれたルシフェラーゼレポーターを導入したところ、 β -cat Δ N 細胞と共培養した β -cat Δ N/RasV12 細胞において NF- κ B シグナルが活性化することが確認できた。次に、マウス小腸の組織切片において NF- κ B 複合体のサブユニットである p65 の局在を検討した結果、APC 変異下で GFP をモザイクに誘導したマウス、単独に RasV12 変異を誘導したマウスではその局在に変化が認められなかったが、APCmin 細胞に囲まれた APCmin/RasV12 細胞では p65 が核内に移行していた。また、腸管オルガノイドを用いた結果より、APCmin/RasV12 細胞が複数存在するクラスター集団では p65 の局在に変化がなかったが、モザイクに Ras 変異誘導された APCmin/RasV12 細胞では p65 が核内へと顕著に移行していた。続いて、MMP21 の発現制御と NF- κ B シグナルの関連を調べるため、NF- κ B シグナルの阻害剤である BAY 11-7082 を β -cat Δ N 細胞と β -cat Δ N/RasV12 細胞との混合培養、もしくは腸管オルガノイドに添加した。その結果、BAY 11-7082 の存在下では細胞非自律的な MMP21 の発現増加、ならびに変異細胞の基底膜浸潤率が有意に抑制された。さらに、BAY 11-7082 の濃度依存的に管腔への逸脱率が増加したことから、NF- κ B シグナルが変異細胞が逸脱する方向性を規定する中心的なカスケードであり、下流の MMP21 を介して細胞競合依存的な変異細胞のびまん性浸潤を促進することが示唆された (図 2)。

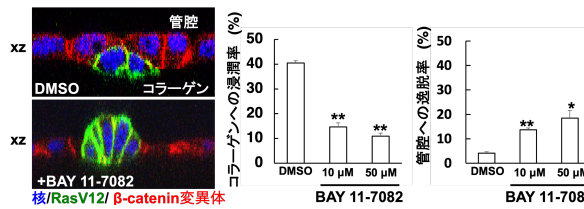


図 2. NF- κ B シグナルを阻害した際の変異細胞の挙動

さらに解析を進めた結果、MMP21 遺伝子のプロモーター領域に p65 の結合配列を有していることが分かったため、この領域を用いて ChIP assay を行った結果、p65 が直接的に MMP21 の上流プロモーターに結合することも明らかにした。

本研究により見出した NF- κ B-MMP21 経路がヒトの発がんに関与しているかを検討するため、ヒト早期大腸がんと診断された 9 検体について、MMP21、p65、 β -catenin、MAPK 経路の活性指標として p-ERK の免疫染色を行い、その発現強度を H-score として評価した。その結果、正常部位に比べて腫瘍部ではいずれの分子の H-score 値が増加していた。さらに、腫瘍部における MMP21 の H-score 値は p65、 β -catenin、p-ERK のそれらと正に相関していたことから、Wnt ならびに MAPK が活性化している早期大腸がんにおいて、NF- κ B-MMP21 経路がその進展に重要な機能的役割を担っていることが示唆された (図 3)。

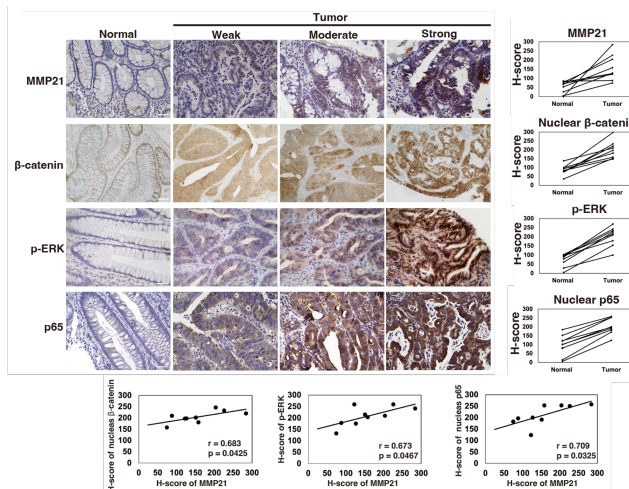


図 3. 早期大腸がんにおける NF- κ B-MMP21 経路の変化

(2) Ras 変異腸管幹細胞が有する細胞競合に対する抵抗性獲得機構の解明

他グループの研究成果より、がん変異細胞に隣接する正常上皮細胞ではシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現が増加し、下流のプロスタグランジン E2 (PGE2) の発現を亢進することにより、細胞競合によるがん変異細胞の管腔への逸脱を抑制することが示されている (Sato et al., *Commun. Biol.*, 2020)。そこで、腸管オルガノイドを用いて内在性 COX-2 の発現を観察したところ、Lgr-5 陽性の腸管幹細胞に隣接するパネート細胞における COX-2 の発現が顕著に高いことが分かった。さらに、COX-2 阻害剤である lumiracoxib を添加すると、Ras 変異幹細胞の管腔への逸脱率が増加したことから、パネート細胞内の COX-2 が腸管幹細胞の細胞競合に対する抵抗性獲得に寄与することが示唆された (図 4)。

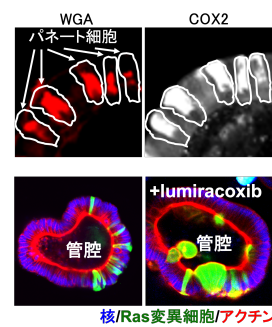


図 4. 腸管オルガノイドの COX2 の発現と COX2 阻害時の Ras 変異腸管幹細胞の挙動

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kon, S. and Fujita, Y.	4. 巻 476
2. 論文標題 Cell competition-induced apical elimination of transformed cells, EDAC, orchestrates the cellular homeostasis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 112-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ydbio.2021.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori, Y., Shiratsuchi, N., Sato, N., Chaya, A., Tanimura, N., Ishikawa, S., Kato, M., Kameda, I., Kon, S., Haraoka, Y., Ishitani, T. and Fujita, Y.	4. 巻 32
2. 論文標題 Extracellular ATP facilitates cell extrusion from epithelial layers mediated by cell competition of apoptosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 2144-2159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.03.057	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kajiwara, K., Chen, P., Abe, Y., Okuda, S., Kon, S., Adachi, J., Tomonaga, T., Fujita, Y. and Okada, M.	4. 巻 32
2. 論文標題 Src activation in lipid raft confers epithelial cells with invasive potential to escape from apical extrusion during cell competition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3460-3476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.06.038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi, N., Miyata, K., Loo, T.M., Chiba, M., Hanyu, A., Nishio, M., Kawasaki, H., Zeng, H., Toyokuni, S., Kon, S., Moriyama, K., Fujita, Y. and Takahashi, A.	4. 巻 13
2. 論文標題 Hepatocyte growth factor derived from senescent cells attenuates cell competition-induced apical elimination of oncogenic cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4157
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-31642-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akter, E., Tasaki, Y., Mori, Y., Nakai, K., Hachiya, K., Lin, H., Konno, M., Kamasaki, T., Tanabe, K., Umeda, Y., Yamano, S., Fujita, Y. and Kon, S.vvvvvvv	4. 巻 40
2. 論文標題 Non-degradable autophagic vacuoles are indispensable for cell competition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Akter, E. and Kon, S.	4. 巻 1
2. 論文標題 Autophagic perturbation caused by reduced lysosomal activity positively regulates cell competition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2022.2140559	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 昆 俊亮
2. 発表標題 がん細胞が誕生したときの生体内反応
3. 学会等名 第53回 フォーラム富山「創薬」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 昆 俊亮
2. 発表標題 デノボがん細胞のリンパ管侵襲機構
3. 学会等名 日本リンパ学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 昆 俊亮
2. 発表標題 デノボがん細胞のリンパ行性転移機構
3. 学会等名 第31回 日本がん転移学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 昆 俊亮	4. 発行年 2021年
2. 出版社 北陵館	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」	

〔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