

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26250026

研究課題名(和文) 正常上皮細胞が保持する抗腫瘍メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of EDAC (Epithelial Defense Against Cancer)

研究代表者

藤田 恭之 (Fujita, Yasuyuki)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授

研究者番号：50580974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常上皮細胞が変異細胞を排除する現象に関与する分子群を様々なスクリーニング手法によって網羅的に同定し、その機能解析を行った。その結果、液性因子ADAMDEC1の発現が、変異細胞と隣接する正常細胞において更新し、それが変異細胞の上皮層からの排除に重要な役割を果たしていることが明らかになった。さらに、変異細胞に隣接する正常細胞においてCOX-2の発現が亢進し、炎症様の反応を誘起することによって細胞競合を負に制御していることを示した。このように、細胞競合を正に制御する因子だけではなく、負の制御因子の存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have identified molecules that are involved in EDAC (epithelial defense against cancer) whereby transformed cells are eliminated from epithelia via cell competition with the surrounding normal epithelial cells. First, we have found that expression of a soluble factor ADAMDEC1 is non-cell-autonomously upregulated in normal cells neighboring transformed cells, which positively regulate apical extrusion of transformed cells. In addition, we also demonstrate that expression of COX-2 is increased in normal cells surrounding transformed cells, which induces inflammatory responses thereby negatively regulating cell competition. Collectively, these results indicate the presence of both negative and positive regulators of cell competition.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：細胞競合

1. 研究開始当初の背景

1980年頃に最初のがん遺伝子 *Src* が発見されて以来、数多くのがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子が同定されてきた。そして、それらの変異がどのように細胞のシグナル伝達や性状に影響を与え、がん化につながっているかについて研究が進んできた。しかし、ヒトの上皮細胞層に変異が生じた際に、変異細胞と直接それを取り囲む正常上皮細胞の間で何が起こるかについては明らかでなく、がん研究のブラックボックスとなっている。ショウジョウバエにおいては、上皮細胞層の少数の細胞に変異が起こったとき、変異細胞と周囲の正常細胞が互いに生存を争う「細胞競合」と呼ばれる現象が生じることが知られている。しかし、哺乳類細胞でも同様の現象が起こるかについては分かっていなかった。

我々は、テトラサイクリン依存性のがんタンパク質 (*Ras*、*Src* など) の発現あるいはがん抑制タンパク質 (*Scribble* など) の shRNA の発現を誘導できる上皮培養細胞系を確立し、哺乳類でも正常上皮細胞と変異細胞の境界で細胞競合現象が起こることを世界で初めて明らかにしてきた。例えば、がん遺伝子 *Src* 変異細胞や *Ras* 変異細胞を正常上皮細胞と共培養すると、変異細胞が正常上皮細胞層からはじき出されるように管腔側 (体内への浸潤とは逆方向) へ排出されることが観察された。また、がん抑制遺伝子 *Scribble* 変異細胞や *Mahjong* 変異細胞を正常上皮細胞と共培養すると、変異細胞がアポトーシスを起こし正常上皮細胞層から失われていくことも明らかとなった。重要なことに、これらの現象は変異細胞のみが存在した時には起こらない。このことは、正常上皮細胞と変異細胞の相互作用が、変異細胞の上皮細胞層からの除去を引き起こす、すなわち正常上皮細胞が変異細胞を駆逐する能力を有していることを示している。さらに我々は、ゼブラフィッシュやマウスモデルシステムを用いて、*in vivo* においても変異細胞が正常上皮細胞層から積極的に排除されることを示した。がんの超初期段階で生じる現象に焦点を当てたこの新規がん研究分野の次の課題は、正常上皮細胞がどのようにして変異細胞を認識し、積極的に排除しているか、その分子機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

(1) 正常上皮細胞の「抗腫瘍能」を制御する分子メカニズムの解明

正常上皮細胞内の抗腫瘍能を制御する分子機構の全貌を明らかにするため、様々なタイプの変異細胞と正常細胞の混合培養条件下において、定量的質量分析法やマイクロアレイ法によるスクリーニングを精力的に行い、変異細胞に隣接する正常上皮細胞で特異的に発現が増減する分子を網羅的に同定す

る。さらに、それらの上流あるいは下流で機能するタンパク質を免疫沈降法やプロモーター解析にて探索し、正常上皮細胞における未知の「抗腫瘍シグナル伝達経路」を解明する。このような正常細胞と超初期がん細胞間の細胞競合制御分子の大規模スクリーニングは、我々の知るところでは世界で初の試みとなる。

(2) 細胞競合モデルマウスを用いた正常細胞が保持する抗腫瘍分子機構の *in vivo* 解析

我々は、タモキシフェン投与により膵臓上皮あるいは腸上皮細胞層に様々ながん原性変異をモザイク状に誘導する細胞競合マウスモデルを世界に先駆けて作成した。また実際に、このマウスの腸上皮細胞層から *RasV12* 発現細胞が管腔側に逸脱することも観察した。このマウスモデルシステムを用いて、スクリーニングで同定された分子が正常上皮細胞と変異細胞の境界でどのように同居しているかを解析する。また、同定された分子が変異細胞の上皮細胞層からの排除をどのように制御しているかを明らかにしていく。

3. 研究の方法

(1) 正常上皮細胞の「抗腫瘍能」を制御する分子群の網羅的同定及びその作用機序の解明

(2) 細胞競合モデルマウスを用いた正常細胞が保持する抗腫瘍分子機構の *in vivo* 解析
この二つの計画によって、正常上皮細胞がどのように変異細胞の存在を認識し、積極的に排除するのか、その分子メカニズムと作用機序を明らかにしていく。

(1) 正常上皮細胞の「抗腫瘍能」を制御する分子群の網羅的同定

正常上皮細胞と変異細胞間の認識機構やその下流の細胞内シグナル伝達経路の制御に関与する分子を、定量的質量分析法 (SILAC) を中心とした生化学的スクリーニングとマイクロアレイ解析を用いて網羅的に同定する。

SILAC 法によるスクリーニング

SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino acids in Cell culture) 法では、異なる培養細胞中のタンパク質を質量の異なる安定同位体 (窒素および炭素) を含有するリジン・アルギニンで標識することができ、トリプシン分解で得られたペプチドの大規模な定量的解析が可能となる。

(1) 正常上皮細胞の「抗腫瘍能」を制御する分子群の作用機序の解明

上記のスクリーニングを継続するとともに、同定されたタンパク質については、正常上皮細胞の「抗腫瘍能」にどのような役割を果たしているか、その作用機序を明らかにしていく。まず抗体を購入あるいは作成し、免疫染色法にて変異細胞に隣接する正常細胞にお

ける局在を解析する。また、それらの分子の過剰発現、ノックダウン、あるいはドミナントネガティブ型変異体の発現が、正常上皮細胞による抗腫瘍作用にどのような影響を及ぼすかについて精査する。さらに、正常上皮細胞と変異細胞の混合培養条件下で免疫沈降をおこない、それらの分子と複合体を形成するタンパク質群を同定し、上流あるいは下流でどのような機能を果たしているかを詳細に調べていく。

(2)細胞競合マウスモデルを用いた正常細胞が保持する抗腫瘍分子機構の *in vivo* 解析
我々は最近の研究において、タモキシフェン投与により膵臓上皮あるいは腸上皮細胞層に変異をモザイク状に誘導する細胞競合マウスモデルを作成した。またこのマウスの腸上皮細胞層から RasV12 発現細胞が管腔側に逸脱することも明らかにした。この細胞競合マウスモデルシステムを用いて、スクリーニングで同定された分子が正常上皮細胞と変異細胞の境界でどのように局在しているかを免疫組織染色にて明らかにする。

4. 研究成果

1) 細胞競合制御因子 ADAMDEC1 の同定

SILAC による解析によって、液性因子 ADAM-DEC1 の発現が、Ras 変異細胞と隣接する正常細胞において亢進している事が分かった。さらに、Ras 変異細胞を ADAM-DEC1 ノックダウン細胞で取り囲むと、Ras 変異細胞の上皮細胞層からの逸脱が有意に抑制された。このデータは、細胞非自律的に生じる ADAM-DEC1 の発現亢進が変異細胞の上皮細胞層から管腔側への排除に重要な役割を果たしていることを示している。

さらに、変異体を用いた解析によって、ADAMDEC1 のプロテアーゼ活性がこの分子機構に関与していないことが分かった。それに加えて、ADAMDEC が変異細胞に接する正常細胞に生じる細胞骨格タンパク質 Filamin の集積の上流で機能していることを見出した。これらの知見については現在論文投稿準備中であるが、これまでがん研究のブラックボックスであった発がんの超初期段階で生じる現象に風穴を空けるものであり、当研究分野に大きなインパクトを与えることが期待できる。また、液性因子が細胞競合に影響を与える例はまだ多くなく、生物学的にも重要な知見と言える。

2) COX2 を介した炎症応答が細胞競合を抑制する

マイクロアレイ解析によって、変異細胞に隣接する正常細胞において COX-2 の発現が亢進していることを見出した。さらに、COX-2 のノックダウンや阻害剤である NSAID の投与によって、変異細胞の上皮層からの逸脱が

亢進することが明らかになった。一方、COX-2 が産生する PGE2 を加えると変異細胞の逸脱は抑制された。それに加えて、マウスモデルにおいて、NSAID の投与が膵管上皮からの Ras 変異細胞の排除を促進することを見出した。このデータは、COX-2 が誘起する炎症様の反応が細胞競合を負に制御していることを示している。現在 COX-2 の細胞競合におけるさらなる機能解析を行っている。

3) 細胞競合マウスモデルの確立とそれを用いた解析

CK19 プロモーターを用いることによって、タモキシフェン投与により膵臓・肺・腸など様々な上皮組織にがん原性変異をモザイク状に誘導する細胞競合マウスモデルを世界に先駆けて作成することに成功した。それを用いて、解析を行うことによって、*in vitro* で得た知見を *in vivo* にて検証する事が可能になった。例えば、正常上皮細胞に囲まれた Ras 変異細胞において、ミトコンドリアの機能低下と解糖系の亢進というワールブルグ様の代謝変化が起こることを哺乳類培養系を用いて見出したが、同様の現象がマウスの腸上皮でも起こることを示した (Kon et al., Nature Cell Biology, 2017)。

さらに、高脂肪食を与えて肥満を誘導したマウスでは、Ras 変異細胞の体外への排出が抑制される事がわかった。さらに、その分子メカニズムとして、脂肪酸代謝と慢性炎症が原因であることも見いだした。実際に、肥満マウスに抗炎症剤アスピリンを投与すると、Ras 変異細胞の膵臓や腸管からの排除が亢進した。これまで統計学的なデータ解析から、肥満になるとがんの罹患率が上昇することが知られていたが、今回得られた知見は、がんの超初期段階における変異細胞の排除率に肥満が影響を与えることを示唆しており、興味深い。また、抗炎症剤のがん予防効果が超初期段階から生じていることも示唆している。これらのデータは、2018 年 Cell Reports にて発表した。

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8件)

1. Kasai, N., Kadeer, A., Kajita, M., Saitoh, S., Ishikawa, S., Maruyama, T. and Fujita, Y. The paxillin-plectin-EPLIN complex promotes apical elimination of RasV12-transformed cells by modulating HDAC6-regulated tubulin acetylation. Scientific Reports, 8(1):2097. doi: 10.1038/s41598-018-20146-1.(2018) 査読有り
2. Bove, A., Gradeci, D., Fujita, Y., Banerjee, S. Charras, G. and Lowe, A.R. Local cellular

- neighbourhood controls proliferation in cell competition. *Molecular Biology of the Cell*, 7;28(23):3215-3228. doi: 10.1091/mbc.E17-06-0368.(2017) 査読有り
3. Maruyama, T. and Fujita, Y. Cell competition in mammals —novel homeostatic machinery for embryonic development and cancer prevention. *Current Opinion in Cell Biology*, 15;48:106-112.DOI: 10.1016/j.ceb.2017.06.007(2017) 査読有り
 4. Kon, S., Ishibashi, K., Katoh, H., Kitamoto, S., Shirai, T., Tanaka, S., Kajita, M., Ishikawa, S., Yamauchi, H., Yako, Y., Kamasaki, T., Matsumoto, T., Watanabe, H., Egami, R., Sasaki, A., Nishikawa, A., Kameda, I., Maruyama, T., Narumi, R., Morita, T., Sasaki, Y., Enoki, R., Honma, S., Imamura, H., Oshima, M., Soga, T., Miyazaki, J., Duchon, M. R., Nam, J.-M., Onodera, Y., Yoshioka, S., Kikuta, J., Ishii, M., Imajo, M., Nishida, E., Fujioka, Y., Ohba, Y., Sato, T., and Fujita, Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nature Cell Biology*, 19(5):530-541. DOI: 10.1038/ncb3509(2017) 査読有り
 5. Saitoh, S., Maruyama, T., Yako, Y., Kajita, M., Fujioka, Y., Ohba, Y., Kasai, N., Sugama, N., Kon, S., Ishikawa, S., Hayashi, T., Yamazaki, T., Tada, M., and Fujita, Y. Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 114 (12), E2327-E2336.(2017) 査読有り
 6. Kadeer, A., Maruyama, T., Kajita, M., Morita T., Sasaki, A., Ohoka, A., Ishikawa, S., Ikegawa, M., Shimada, T., and Fujita, Y. Plectin is a novel regulator for apical extrusion of RasV12-transformed cells. *Scientific Reports*, 7:44328. doi: 10.1038/srep44328.(2017) 査読有り
 7. Porazinski, S., Navascues, J., Yako, Y., Hill, W., Jones, M.R., Maddison, R., Fujita, Y., and Hogan, C. EphA2 drives the segregation of Ras-transformed epithelial cells from normal neighbors. *Current Biology*, 5;26(23):3220-3229.(2016) 査読有り
 8. Chiba, T., Ishihara, E., Miyamura, N., Narumi, R., Kajita, M., Fujita, Y., Suzuki, A., Ogawa, Y. and Nishina, H. MDCK cells expressing constitutively active Yes-associated protein (YAP) undergo apical extrusion depending on neighboring cell status. *Scientific Reports*, 6:28383. doi: 10.1038/srep28383.(2016) 査読有り
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. 藤田恭之「細胞競合の分子機構と生理的意義：どこまでわかって何がわからないのか」2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017
 2. 藤田恭之「Cell Competition between normal and transformed epithelial cells」33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University、2017
 3. 藤田恭之「Cell Competition between normal and transformed epithelial cells」12th International Symposium of the Institute Network、2017
 4. 藤田恭之「Cell competition between normal and transformed epithelial cells in mammals」CHAMPALIMAUD RESEARCH SYMPOSIUM 2017、2017
 5. 藤田恭之「Cell competition: Cancer-host network in carcinogenesis 細胞競合：発がんにおけるがん-宿主ネットワーク」第76回日本癌学会学術総会、2017
 6. 藤田恭之「細胞競合とワールブルグ効果」第42回日本医用マスペクトル学会年会、2017
 7. 藤田恭之「Cell competition between Normal and Transformed Epithelial Cells」24th Asia Pacific Cancer Conference (APCC2017)、2017
 8. 藤田恭之「細胞競合を利用した新規がん予防的治療薬の開発」日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会、2017
 9. 藤田恭之「Cell competition between normal and transformed epithelial cells」The 15th Stem Cell Research Symposium、2017
 10. 藤田恭之「正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合」第16回日本再生医療学会総会、2017
 11. 藤田恭之「Cell competition and Warburg effect」Cell Competition, Apoptosis and Cancer、2016
 12. 藤田恭之「細胞競合がもたらすワールブルグ効果」第16回日本再生医療学会総会、2017

グ効果様の代謝変化」第 75 回日本癌学会
学術総会、2016

13. 藤田恭之「Cell competition in mammalian carcinogenesis」CELL COMPETITION IN FLIES AND MICE in The Allied Genetics Conference 2016、2016
14. 藤田恭之「Competitive interactions between normal and transformed epithelial cells」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015
15. 藤田恭之「Cell Competition and Warburg effect」第 46 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム、2015
16. 藤田恭之「EDAC(Epithelial Defence Against Cancer)」第 74 回日本癌学会学術総会、2015
17. 藤田恭之「Cell Competition and Warburg effect」第 1 回国際シンポジウム Cell Competition in Development and Cancer、2015
18. 藤田恭之「EDAC(Epithelial Defence Against Cancer)」第 67 回日本細胞生物学会、2015
19. 藤田恭之「EDAC(Epithelial Defence Against Cancer)」Ad Hoc CNIC SEMINAR、2015
20. 藤田恭之「Cell to Cell competition: survival of the fittest as a system of a cellular society」RISK-IR MEETING 「Integration and Conceptual Framework Meeting」、2015
21. 藤田恭之「EDAC:Epithelial Defense Against Cancer」第 37 回日本分子生物学会年会、2014
22. 藤田恭之「EDAC:Epithelial Defense Against Cancer」Cold Spring Harbor Conference Asia、2014
23. 藤田恭之「Interface between normal and transformed epithelial cells」第 87 回日本生化学会大会、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤田 恭之 (FUJITA, Yasuyuki)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・教授
研究者番号：50580974