

令和元年5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15113

研究課題名(和文)上皮細胞層の細胞間認識機構を担うカルシウムの新しい役割の解明

研究課題名(英文)Elucidation of calcium wave in epithelial homeostasis

研究代表者

竹内 康人 (Takeuchi, Yasuto)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特別研究員 (PD)

研究者番号：10735187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：正常上皮細胞層に生じた変異細胞や死細胞は、上皮組織から積極的に排除されることが知られている(apical extrusion)。しかし、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究は、細胞内カルシウムに着目し、上皮細胞における変異細胞の認識メカニズムを明らかにすることを目的とした。RasV12変異細胞内でカルシウム濃度が増加し、連続して、同心円状に周囲の複数の正常細胞に渡って、カルシウム濃度の増加の伝搬を発見した(カルシウムウェーブ)。解析の結果、カルシウムウェーブは、apical extrusionのトリガーであり、変異細胞の排除を促進する役割があることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、カルシウムウェーブは、進化的に保存され、上皮細胞のextrusionに共通した普遍的な現象であることが、明らかになった。このことは、上皮組織が、不要な変異細胞や死細胞を排除するために、カルシウムウェーブを用いて上皮恒常性維持している可能性が示唆された。ほとんどのがんが上皮細胞から生じることから、本研究によって、カルシウムを介した新たな上皮細胞層の恒常性維持機構のメカニズムが明らかになり、従来の方法と全く異なるがんの予防や治療につながるさらなる成果が今後期待される。

研究成果の概要(英文)：When oncogenic transformation or cell death occurs within the epithelial monolayer, the newly emerging harmful cells are apically extruded from tissues to maintain epithelial homeostasis. However, the underlying molecular mechanism of apical extrusion still remains elusive. In this study, we first show using mammalian cultured epithelial cells and zebrafish embryos that we first show prior to apical extrusion of RasV12-transformed cells, calcium wave occurs from the transformed cell and propagates across the surrounding cells in an explosive fashion. Calcium propagation also promotes apical extrusion of apoptotic cells. These results demonstrate that calcium wave is an evolutionarily conserved, general regulatory mechanism of cell extrusion.

研究分野：生物学

キーワード：カルシウム 上皮恒常性 細胞競合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発がんの超初期段階では、正常な上皮細胞層に、がん原性遺伝子変異が生じ、正常細胞と変異細胞が共存する上皮細胞層となる。この時、正常細胞と変異細胞の境界で細胞非自律的な変化が生じ、正常細胞に囲まれた変異細胞は、上皮細胞層から排除されることが知られている (Hogan et al, Nature Cell Biology, 2009)。免疫系細胞が関与しない変異細胞の排除現象 (apical extrusion) は、EDAC (Epithelial Defense Against Cancer) と呼ばれている。この発見は、正常な上皮細胞には、隣接する変異細胞を認識し、排除する機能が備わっていることを示唆している。しかし、正常細胞がどのように排除対象となる変異細胞を認識しているのか、そのメカニズムは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内セカンドメッセンジャーとして働く細胞内カルシウム (Ca^{2+}) に着目し、上皮細胞における変異細胞の認識メカニズムを明らかにすることを目的とした。さらに、カルシウムを介した上皮細胞における新たな細胞間コミュニケーションのメカニズムを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

イヌ腎上皮細胞株である MDCK 細胞にカルシウムインジケーターである GCaMP6S を恒常発現させた MDCK-GCaMP6S 細胞を樹立し、タイムラプスにより細胞内カルシウムを観察した。用いた培養系は、以下に示す発がんの超初期段階を模倣したモデルを用いた。(1) 正常細胞層 (MDCK-GCaMP6S) に mCherry/Myc-RasV12 あるいは mCherry のみを一過性に発現させる。(2) 正常細胞 (MDCK-GCaMP6S) と染色した Myc-RasV12 細胞を 50:1 の比率で混合培養する。タイムラプス観察により、Myc-RasV12 発現細胞が、上皮細胞層から排除 (apical extrusion) する際の、Ras 細胞とその周囲の正常細胞での細胞内カルシウムの変化に着目した。また、これまでの報告から、ゼブラフィッシュの上皮に Ras 細胞を導入した際にも、Ras 細胞の排除 (apical extrusion) が生じることが知られている。そこで、細胞培養系だけでなく、ゼブラフィッシュにおいても、カルシウムインジケーター (GCaMP7) を用いて、カルシウムイメージングを行なった。

4. 研究成果

(1) MDCK-GCaMP6S 細胞層に、mCherry/RasV12 を一過性に導入したところ、はじめに、RasV12 細胞内でカルシウム濃度が増加し、連続して、同心円状に周囲の複数の正常細胞に渡って、カルシウム濃度の増加の伝搬が見られた。これをカルシウムウェーブと定義した。カルシウムウェーブは、ゼブラフィッシュの上皮に Ras 細胞を導入した際にも観察された。そこで、カルシウムウェーブと Ras 細胞の apical extrusion との関係を明らかにするために、Ras 細胞の面積の解析を行なったところ、カルシウムウェーブが生じた直後に apical extrusion が開始していた。また、カルシウムウェーブの有無と apical extrusion との関係を調べたところ、カルシウムウェーブが生じると有意に Ras 細胞の apical extrusion の頻度が増加していた。以上の結果から、カルシウムウェーブは、apical extrusion のトリガーであり、apical extrusion を促進していることが示唆された。

(2) カルシウムウェーブの発生メカニズムを明らかにするために、様々なカルシウムチャネル阻害剤を用いた実験を行なった。細胞内カルシウム濃度は、主に細胞膜カルシウムチャネル・小胞体膜カルシウムチャネル・細胞間結合の 3 つの経路によって調節されている。そこで、この 3 つの経路に対する以下の阻害剤を用いた。細胞膜上の機械受容カルシウムチャネル阻害剤 (GsMTx)、L 型カルシウムチャネル阻害剤 (Amlodipine)、小胞体膜上のリアノジン受容体阻害剤 (Dantrolene)、IP3 受容体阻害剤 (Xestospongin)、GAP 結合阻害剤 (α GA) である。このうち、機械受容カルシウムチャネル阻害剤、IP3 受容体阻害剤、GAP 結合阻害剤の 3 つは、カルシウムウェーブ並びに Ras 細胞の apical extrusion を抑制した。このことから、この 3 者がカルシウムウェーブに関与していることが示唆された。さらに、機械受容カルシウムチャネル阻害剤が特異的に阻害する TRP (transient receptor potential) C1 および C6 チャネルに着目し、これらのノックダウン細胞株 (MDCK-GCaMP TRPC1/C6 knockdown) を樹立し、カルシウムウェーブ並びに Ras 細胞の apical extrusion への影響を調べた。その結果、TRPC1 ノックダウン細胞によって、カルシウムウェーブ並びに Ras 細胞の apical extrusion が抑制された。以上の結果から、カルシウムウェーブは、TRPC1、IP3 受容体、GAP 結合の 3 者によって調節されていることが示唆された。

(3) カルシウムウェーブの機能的意義を明らかにするために、apical extrusion 過程にある Ras 細胞の周囲の正常細胞の移動の解析を行なった。細胞の移動は、細胞頂点の動きを解析することによって、その移動量と方向性を定量的に評価した。まず、カルシウムウェーブが生じた細胞は、生じていない細胞に比べて、その移動量が有意に大きく、その移動方向は、Ras 細胞が存在する方向へ向いていた。この結果から、カルシウムウェーブは、細胞の motility と方向性に影響を与えることが示唆された。

さらに、apical extrusion 過程にある Ras 細胞の周囲の正常細胞の F-actin に着目したところ、興味深い結果が得られた。apical extrusion 過程にある Ras 細胞の周囲の正常細胞の F-actin は、cortical region だけでなく、細胞質と核膜周囲に集積を認めた。F-actin の細胞質と核膜周囲への集積変化を actin phenotype と定義した。一方、細胞層に留まり、apical extrusion が開始していない Ras 細胞の周囲の正常細胞では、cortical region にのみ F-actin が観察された。この結果から、actin phenotype は Ras 細胞の apical extrusion に付随した現象であることが示唆された。そこで、次にカルシウムウェーブとの関係を明らかにするために、カルシウムウェーブを抑制した時に、actin phenotype に影響を与えるかを、阻害剤並びにノックダウン細胞を用いて検証した。阻害剤は、機械受容カルシウムチャネル阻害剤 (GsMTx) と、IP3 受容体阻害剤 (Xestospongin) を使用し、ノックダウン細胞は、MDCK-GCaMP TRPC1 knockdown 細胞を用いた。その結果、細胞質と核膜周囲で観察された F-actin の集積が、機械受容カルシウムチャネル阻害剤・IP3 受容体阻害剤、ならびに TRPC1 ノックダウン細胞で、有意に抑制された。この結果から、actin phenotype の上流にある調節因子の 1 つとしてカルシウムシグナルが存在することが示唆された。

これまでに核膜周囲の F-actin の機能は明らかになっていない。しかし、Inverted formin2 (INF2) が関与していると言う報告がある。そこで、INF2 ノックアウト細胞 (MDCK INF2 knockout) を樹立し、actin phenotype への影響を調べたところ、細胞質と核膜周囲で観察された F-actin の集積が、完全に観察されなくなった。以上より、apical extrusion 過程にある Ras 細胞の周囲の正常細胞で観察された actin phenotype に、INF2 が関与していることが示唆された。さらに、この INF2 ノックアウト細胞を用いて、Ras 細胞の apical extrusion 並びに、apical extrusion 過程にある Ras 細胞の周囲の正常細胞の移動の解析を行なった。Ras 細胞を INF2 ノックアウト細胞で囲ませると、apical extrusion は有意に抑制された。また、Ras 細胞が extrusion した際においても、extrusion 時間の延長と Ras 細胞へ向かう方向性の消失が見られた。以上より、カルシウムウェーブは、部分的にはあるものの、周囲正常細胞の actin phenotype を介して、apical extrusion が促進されていることが示唆された。

(4) これまでの報告から、死細胞においても、上皮細胞層から apical extrusion (apoptotic extrusion) されることが報告されている。そこで、カルシウムウェーブは変異細胞だけでなく、死細胞においても観察されるかどうかを検証した。代表的な apoptotic 誘導因子の 1 つである caspase-8 を導入することで細胞死を誘導した。MDCK-GCaMP6S 細胞層に、mCherry-Caspase-8 を一過性に導入したところ、Ras 変異細胞の時と同様に、はじめに、RasV12 細胞内でカルシウム濃度が増加し、連続して、同心円状に周囲の複数の正常細胞に渡って、カルシウム濃度の増加の伝搬が見られた。死細胞の誘導は、ゼブラフィッシュでも laser-ablation を用いた方法で検証したところ、やはり死細胞周囲の正常細胞でカルシウムウェーブは観察された。さらに、カルシウムウェーブに対する阻害剤の影響、Caspase-8 発現細胞の周囲正常細胞の移動量・移動方向並びに actin phenotype を MDCK 培養系を用いて調べたところ、Ras 細胞の時と同様の結果が得られた。以上の結果から、カルシウムウェーブは、進化的に保存され、上皮細胞の extrusion に共通した普遍的な現象であることが、明らかになった。このことは、上皮組織が、不要な変異細胞や死細胞を排除するために、カルシウムウェーブを用いて上皮恒常性維持している可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. Watanabe H, Ishibashi K, Mano H, Kitamoto S, Sato N, Kato M, Matsuzawa F, **Takeuchi Y**, Shirai T, Ishikawa S, Morita Y, Imagawa T, Sakaguchi K, Yonezawa S, Kon S, Fujita Y. Mutant p53-expressing cells undergo necroptosis via cell competition with the neighboring normal epithelial cells. *Cell Reports*. 2018 Jun;23(13):3721-3729.(査読有)
2. Yako Y[†], Hayashi T[†], **Takeuchi Y**[†], Ishibashi K, Kasai N, Sato N, Kuromiya K, Ishikawa S, Fujita Y. ADAM-like Decysin-1 (ADAMDEC1) is a positive regulator of Epithelial Defense Against Cancer (EDAC) that promotes apical extrusion of RasV12-transformed cells. *Scientific Reports*. 2018 Jun;8(1):9639. [†]Equally contribution. (査読有)

[学会発表](計 4 件)

1. **Takeuchi Y**, Narumi R, Sato J, Fujita Y. Analysis of calcium wave in epithelial homeostasis. The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, Japan, 2018.11.28-30.
2. **Takeuchi Y**, Narumi R, Fujita Y. Analysis of calcium wave in epithelial homeostasis. The Joint Symposium of the 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Science and the 28th Hot Spring Harbor International Symposium 2018, Biomedical Sciences in the Era of

3. **Takeuchi Y**, Narumi R, Fujita Y. Analysis of calcium wave in epithelial homeostasis. The 37th Sapporo International Cancer Symposium, Deciphering the Complexity of Cancer Microenvironment, Sapporo, Japan, 2018.7.17-19.
4. **Takeuchi Y**, Hayasaka T, Fujita Y. Search for membrane lipids that specifically function at the boundary between normal and transformed epithelial cells. 3rd International Symposium on Cell Competition, Cell Competition in Development and Cancer, Clark Memorial Student Center, Sapporo, Japan, 2017. 8.29.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：