

令和 2 年 5 月 5 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15589

研究課題名(和文) 正常上皮細胞と変異細胞の境界で特異的に機能する細胞膜タンパク質の探索

研究課題名(英文) Analysis of molecular and ultrastructural mechanisms for epithelial defense against cancer

研究代表者

釜崎 とも子 (Kamasaki, Tomoko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・特別研究員(RPD)

研究者番号：20384183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：上皮細胞層に一個ないし数個のがん原性変異細胞が生じると、正常細胞に囲まれた変異細胞は上皮細胞層のアピカル側へ排除される。しかし、正常細胞と変異細胞の境界における相互作用に関する分子・形態的メカニズムはほとんど明らかにされていない。本研究では、正常細胞と変異細胞の相互作用を制御する細胞膜関連タンパク質を探索した。その結果、変異細胞の形態を制御するBARファミリータンパク質が同定され、変異細胞の正常細胞層からの排除に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近の次世代シーケンサーを用いた一細胞遺伝子解析によって、成人の多くの組織において、1つあるいは2つの変異のみを有する超初期がん細胞が島のように病変を形成し、正常細胞層に囲まれて存在していることが明らかになってきた。しかし、これまでに、変異細胞と直接それを取り囲む正常上間で何が起こるかについて、まだほとんど分かっておらず、また、これらの病変を検出する方法もないことから、病理診断および臨床治療の対象外となっている。本研究において、正常細胞と変異細胞の相互作用を制御する分子・形態メカニズムが明らかになることは、超早期がん病変の診断法およびがんの予防的治療薬の開発に繋がること期待される。

研究成果の概要(英文)：At the initial stage of carcinogenesis, transformed cells are surrounded by normal cells. Normal cells extrude neighboring transformed cells from an epithelial monolayer; however, the molecular and ultrastructural mechanisms underlying this phenomenon remain largely unknown. In this project, I focused on cell membrane related proteins to understand the cell-cell interaction between normal and transformed cells. Several molecules regulating epithelial defense against cancer were successfully identified.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Ras変異細胞 細胞膜タンパク質 BARファミリータンパク質 電子顕微鏡

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常上皮細胞層にがん原性変異が生じた時、正常細胞と変異細胞が上皮細胞層に共存することになる。このようながんの超初期段階において、正常細胞と変異細胞の境界で起こる現象についてはこれまで注目されてこなかった。私達のグループは、RasV12 もしくは v-Src 変異細胞が正常細胞に囲まれると、変異細胞は上皮細胞層の管腔側 (アピカル側) へ排除されることを世界で初めて報告し、EDAC (Epithelial Defense Against Cancer) と名付けた (文献 1, 2)。EDAC は、変異細胞に隣接する正常細胞が積極的に変異細胞を排除する生体防御の仕組みであると考えられている。

これまで、EDAC には直接的な細胞間接着が必要であることが知られていた。そのため、正常細胞と変異細胞の境界で互いを認識することにより EDAC が誘起されると考えられるが、その分子・形態的メカニズムは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、EDAC における正常細胞と変異細胞の相互認識が、正常細胞と変異細胞境界の細胞膜タンパク質を介して行われることにより誘起されるという仮説を立て、下記の 2 点を目的とした。

- (1) 正常細胞と変異細胞の境界で EDAC を制御する細胞膜タンパク質を網羅的に探索する。
- (2) 本研究で同定される細胞膜タンパク質の EDAC における分子メカニズム、およびその機能を反映した EDAC の形態的仕組みを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) EDAC を制御する細胞膜タンパク質の同定

正常細胞と Ras 変異細胞が隣接した時にのみ発現が増加もしくは減少する細胞膜タンパク質を網羅的に探索するため、SILAC (Stable Isotope Labeling by Amino acid in Cell culture) 法を用いる。安定同位体アミノ酸を含んだ培地で培養した MDCK 細胞から細胞膜タンパク質を抽出し、定量的質量分析を行う。

(2) 正常細胞と変異細胞の境界に注目した EDAC の形態的仕組みの解析

免疫染色や過剰発現系を用いて、EDAC における候補タンパク質の局在を解析する。ノックダウン細胞株を用いて、候補タンパク質の EDAC における機能を調べる。有力な候補については電子顕微鏡レベルでの解析も行う。

4. 研究成果

SILAC 法によりラベルした細胞膜タンパク質の定量的質量分析による網羅的探索により、9 種類の候補タンパク質 (Sprouty-related EVH1 domain containing protein2, Integrin alpha1, MHC class II antigen など) が得られた。

一方、正常細胞と変異細胞の単独培養もしくは混合培養を用いた電顕観察 (文献 3) から、細胞境界を構成する細胞膜の波打ち度合いや細胞膜の噛み合いが異なる可能性に気が付いた。その結果、単独培養において、Ras 変異細胞の細胞間接着部位が、正常細胞と比較して細胞突起に富んでいることを明らかにした。細胞膜の形態を制御する因子として BAR ファミリータンパク質が挙げられる。そこでまず、Ras 変異細胞の細胞自律的な形態制御に関与する BAR ファミリータンパク質を探索するため、細胞膜の突出および陥入構造の形成に関与する 5 種類の BAR タンパク質 (FBP17, SRGAP2, IRSP53, MIM, BAIAP2L1) について、免疫染色もしくは過剰発現細胞株を用いた解析を行った。その結果、細胞膜の陥入形成に関与する FBP17 および突起形成に関与する SRGAP2 を同定した。FBP17 と SRGAP2 は共に Ras 変異細胞において、RasV12 の発現依存的に細胞間接着部位に集積し、同様の挙動を示すことが明らかになった。さらに、Ras 変異細胞において FBP17 もしくは SRGAP2 をノックダウンした細胞株を樹立した。これらのノックダウン細胞の細胞膜の微細構造を観察した結果、ノックダウンしていない Ras 変異細胞と比較して、細胞突起および細胞間隙が劇的に減少していた (図 1)。また、Ras 変異細胞側での FBP17 もしくは SRGAP2 のノックダウンにより、変異細胞の正常細胞層からの逸脱が有意に抑制された。これまでに、正常細胞と変異細胞の相互作用 (細胞競合) が起きる際には、変異細胞に隣接する正常細胞の境界に、アクチン細胞骨格のフィラミンが集積することが

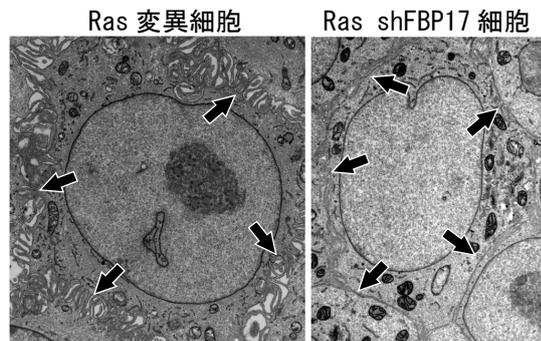


図1 Ras 変異細胞の形態を制御する BAR タンパク質の FBP17. 単独培養において Ras 変異細胞は細胞膜が波状の形態だが (左, 矢印), FBP17 をノックダウンした Ras 変異細胞では細胞膜が滑らくなる (右, 矢印).

報告されており（文献2）、細胞競合マーカーとして用いられている。本研究においては、FBP17もしくはSRGAP2をノックダウンしたRas変異細胞を囲む正常細胞で、フィラミンの集積が見られなくなった。以上の結果から、FBP17およびSRGAP2によるRas変異細胞の細胞自律的な形態変化が、正常細胞と変異細胞の相互認識に重要であることが明らかになった。

次に、正常細胞と変異細胞の境界を構成する細胞膜を介して起こる現象をさらに明らかにするため、正常細胞および変異細胞の単独培養もしくは混合培養を用い、それらの電子顕微鏡像を基にして、細胞膜の波打ち度合いおよび細胞突起の頻度を定量した。その結果、単独培養と比較して混合培養においては、正常細胞と変異細胞の境界を構成する正常細胞側の細胞膜で、細胞膜の波打ち度合いおよび細胞突起の頻度が上昇することが明らかになった（図2）。現在、その分子メカニズムに迫るため、BARタンパク質を始めとする候補について探索を進めている。

さらに、変異細胞の自律的な変化を隣接する正常細胞が受容する際、細胞間接着部位を構成する細胞膜が示す動態を明らかにするため、細胞膜を蛍光ラベルした変異細胞もしくは正常細胞を用いて、変異細胞と正常細胞の境界について超解像ライブイメージングを試みた。予備的解析から、細胞間接着部位での細胞突起のダイナミックな伸縮の様子や、多色観察の条件設定を行うことに成功した。今後、変異細胞と隣接する正常細胞の細胞膜を介したクロストークを可視化できることが予想され、変異細胞側でのFBP17およびSRGAP2が隣接する正常細胞側の細胞膜動態におよぼす影響が明らかになることが期待される。

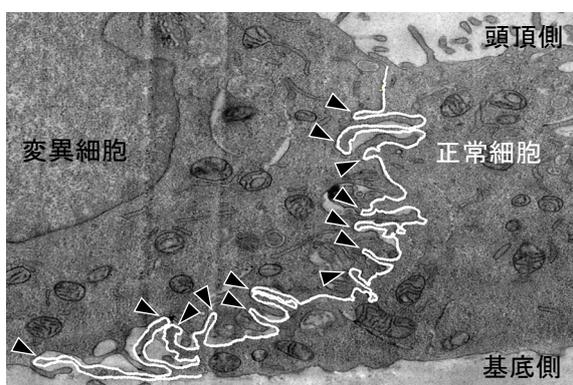


図2 正常上皮細胞が隣接する変異細胞に対して細胞突起（矢頭）を伸ばしている様子を示す電顕像。X-Z切片。細胞間接着部位を構成する正常細胞の細胞膜を白色でトレースしてある。

<引用文献>

- ① Hogan, C., Dupre-Crochet, S., (他 10 名), Fujita, Y. Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.*, 11 (4), 2009, 460-467 et al. *Nat Cell Biology* 2009
- ② Kajita, M., Sugimura, K., (他 17 名), Fujita, Y. Filamin is a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat. Commun.*, 5: 4428, 2014
- ③ Kon, S., Ishibashi, K., (他 37 名), Fujita, Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.*, 530-541, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mikio Takagi, Masaya Ikegawa, Takashi Shimada, Susumu Ishikawa, Mihoko Kajita, Takeshi Maruyama, Tomoko Kamasaki, Yasuyuki Fujita	4. 巻 23 (11)
2. 論文標題 Accumulation of the myosin-II-spectrin complex plays a positive role in apical extrusion of Src-transformed epithelial cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 974-981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12643	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 Hiruma, S., Kamasaki, T., Otomo, K., Nemoto, T., Uehara, R.	4. 巻 591
2. 論文標題 Dynamics and function of ERM proteins during cytokinesis in human cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Letter	6. 最初と最後の頁 3296-3309
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.12844	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 Kon, S., Ishibashi, K., Katoh, H., Kitamoto, S., Shirai, T., Tanaka, S., Kajita, M., Ishikawa, S., Yamauchi, H., Yako, Y., Kamasaki, T., (他27名), Fujita, Y.	4. 巻 19 (5)
2. 論文標題 Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 530-541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ncb3509	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 釜崎とも子, 宮崎裕美, 藤田恭之
2. 発表標題 正常細胞とRas変異細胞の相互認識に関する電子顕微鏡解析
3. 学会等名 第8回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 釜崎とも子
2. 発表標題 電子顕微鏡で解き明かす生物の仕組み.
3. 学会等名 2018年度生物工学若手研究者の集い 夏のセミナー (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 釜崎とも子, 宮崎裕美, 藤田恭之
2. 発表標題 正常上皮細胞とRas変異細胞間に生じる細胞競合に関する微細構造学的解析.
3. 学会等名 第7回細胞競合コロキウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 釜崎とも子
2. 発表標題 正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合における細胞の相互認識過程の解析.
3. 学会等名 資生堂女性研究者サイエンスグラント 第9回研究報告会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kohashi, K., Narumi, R., Kamasaki, T., Fujita, Y.
2. 発表標題 Sequential oncogenic mutations affect the cell fate of RasV12 cells: from loser to winner in cell competition.
3. 学会等名 第 43 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohashi, K., Narumi, R., Kamasaki, T., Fujita, Y.
2. 発表標題 Sequential oncogenic mutations affect the cell fate of RasV12 cells: from loser to winner in cell competition.
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohashi, K., Narumi, R., Kamasaki, T., Fujita, Y.
2. 発表標題 Sequential oncogenic mutations affect the cell fate of RasV12 cells: from loser to winner in cell competition.
3. 学会等名 Symposium: Cell competition in Development and Disease (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----