

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H03994

研究課題名(和文)細胞競合と接触阻害を統合的に制御する分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanisms regulating cell competition and contact inhibition

研究代表者

藤田 恭之(Fujita, Yasuyuki)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50580974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：ファージディスプレイスクリーニングなどによって、RasV12発現によって形質膜への集積が亢進する膜タンパク質としてCOL17A1とCD44を同定した。

COL17A1、CD44の両者ともに、多層化した変異細胞層の上層部の細胞間接着部位に強く集積することが分かった。続いて、COL17A1、CD44の発現低下によって、変異細胞の多層化が強く抑制されることが分かった。これらのデータは、COL17A1とCD44ががん化の初期に生じる単層上皮の多層化現象を制御する重要な因子であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の我々の研究によって、上皮多層化のプロセスにCOL17A1とCD44が重要な役割を果たしていることが明らかになった。COL17A1とCD44が上皮の多層化というこれまでがん診断・治療の対象になっていなかったプロセスの標的分子となる可能性を示している。今後は、多くのヒト前がん病変におけるCOL17A1とCD44の発現を調べるとともに、これらのin vivoにおける前がん病変形成への機能的関与を詳細に調べていく。

研究成果の概要(英文)：By performing a series of screenings targeting plasma membrane proteins, we have found that COL17A1 and CD44 accumulate in RasV12-, Src-, or ErbB2-transformed epithelial cells.

We further demonstrate that the expression of COL17A1 and CD44 is profoundly upregulated at the upper layers of multilayered, transformed epithelia in vitro and in vivo. The accumulated COL17A1 and CD44 suppress mitochondrial membrane potential and ROS production. The diminished intracellular ROS level then promotes resistance against ferroptosis-mediated cell death upon cell extrusion, thereby positively regulating the formation of multilayered structures. Moreover, we demonstrate that CD44 regulates membrane accumulation of COL17A1 in multilayered structures. These results suggest that CD44 and COL17A1 are crucial regulators for the clonal expansion of transformed cells within multilayered epithelia, thus being potential targets for early diagnosis and preventive treatment for precancerous lesions.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：接触阻害 上皮多層化 COL17A1 CD44

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生命体の細胞社会に、性質の異なる変異細胞（あるいは機能異常細胞）が出現した時、周りの正常細胞と異常な細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」という現象が起こることが、ショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスなど様々な生物種で報告されてきた。細胞競合は、個体発生における優良な細胞の選別や前がん細胞の排除など様々な生命現象に関与し、組織の恒常性維持に重要な役割を果たしている。

我々は独自に確立した哺乳類培養細胞系とマウスモデルを用いて、正常上皮細胞とがん原性変異細胞の間で細胞競合が生じることを哺乳類において世界で初めて報告した。例えば、Ras 変異細胞が正常上皮層に出現すると、変異細胞が上皮細胞層からはじき出されるように管腔側へと排出される (Hogan et al., Nat Cell Biol 2009)。また、がん抑制タンパク質 Lgl の新規結合タンパク質 Mahjong を同定・命名し、Mahjong 変異細胞が正常上皮細胞に囲まれると、変異細胞が細胞死を起こし上皮細胞層から失われていくことも明らかにした (Tamori et al., PLoS Biol 2010)。さらに、正常上皮細胞と変異細胞の境界では、それぞれの細胞内においてシグナル伝達・細胞骨格・代謝経路などに様々な細胞非自律的な変化が生じ、それらが細胞競合現象を制御していることを報告した (Kajita et al., Nat Commun 2014; Saitoh et al., PNAS 2017; Kon et al., Nat Cell Biol 2017 など)。このように、細胞競合の結果、敗者細胞が組織から排除される分子メカニズムについては多くが明らかになってきた。しかし、細胞競合現象を引き起こす最初のプロセス、すなわち「異なる細胞が互いの違いをどのように認識するのか」という最も興味深く重要な「問い」については、未だ明らかになっていない。

一方、単層で成長する細胞の機能調節機構である接触阻害 (contact inhibition of proliferation) とは、細胞が増殖し、細胞と細胞が密に接触するようになると増殖が停止する現象である。細胞ががん化すると、接触阻害機構が破綻し、細胞密度が高くなっても細胞は増殖を続け、重層に盛り上がった細胞塊を形成する。これまでの研究によって、Hippo シグナル経路の YAP が接触阻害の重要な制御因子であることが明らかになっている。YAP は細胞密度が低い時は核に局在し細胞増殖を正に制御するが、細胞密度が高くなると核から細胞質へ局在が移り細胞増殖を抑制する。しかし接触阻害において、「細胞はどのようにして細胞密度の違いを感知するのか」、その分子メカニズムについては、ほとんど分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、接触阻害の破綻による上皮層の構造変化がどのように引き起こされるのか、その分子メカニズムの解明を目指した。特に、Ras, Src, ErbB2 などのがん原性変異によって、接触阻害が破綻し、単層上皮が多層化する現象に着目し、その新規制御因子の同定を目指した。

## 3. 研究の方法

新規上皮制御因子の同定のために、ファージディスプレイスクリーニングを行なった。ライブラリには  $10^{11}$ ~ $10^{13}$  種類の多様なファージ抗体を含んでおり、この中から細胞パンニングと呼ばれる操作により、変異細胞に特異的に結合するものを選別した。まず正常細胞の単一培養下の細胞にファージライブラリを反応させ、これらに結合するファージをライブラリから取り除いた。その後、正常細胞と変異細胞の共培養下の細胞に残りのファージを反応させ、結合したファージを溶出し、大腸菌に感染させて増幅させた。その後、単離されたファージクローンのもつ抗体を用いて正常・変異細胞の共培養下で網羅的に免疫染色を行い、ハイスループットイメージングにより、正常細胞と変異細胞の境界部位に特異的な染色を示す抗体を同定した。

## 4. 研究成果

### (1) RasV12 発現は膜タンパク質 COL17A1 と CD44 の形質膜への局在を亢進する

正常 MDCK 細胞と RasV12 発現 MDCK 細胞を用いてファージディスプレイスクリーニングを行い、RasV12 変異細胞を特異的に認識するファージ抗体を同定することに成功した (図 1)。この抗体を用いて免疫沈降を行った結果、エピトープ分子が Collagen 17A1 (COL17A1) であることが分かった。COL17A1 は膜貫通ドメインを有する点で、コラーゲンファミリーのメンバーの中でも特徴的な分子である。RasV12 発現による COL17A1 発現上昇は、MDCK 細胞のみならず HPDE 細胞でも観察された。

またファージディスプレイスクリーニング以外にも、Cell Surface Marker Screening Panel を用いたスクリーニングを行い、RasV12 発現によって形質膜への集積が亢進する膜タンパク質として CD44 を同定した。さらに、免疫染色にて COL17A1 と CD44 の発現を制御する条件を探索した。すると、これらの分子の発現は、細胞密度が低い時には上昇し、細胞密度が高くなると低下することが分かった。さらに、細胞密度が高くなり管腔側へ逸脱した (apical extrusion) 細胞では COL17A1 と CD44 の形質膜への局在が亢進することも分かった。このように、COL17A1 と CD44 の発現は RasV12 変異のみならず、細胞密度や apical extrusion によっても制御されることが明らかになった。

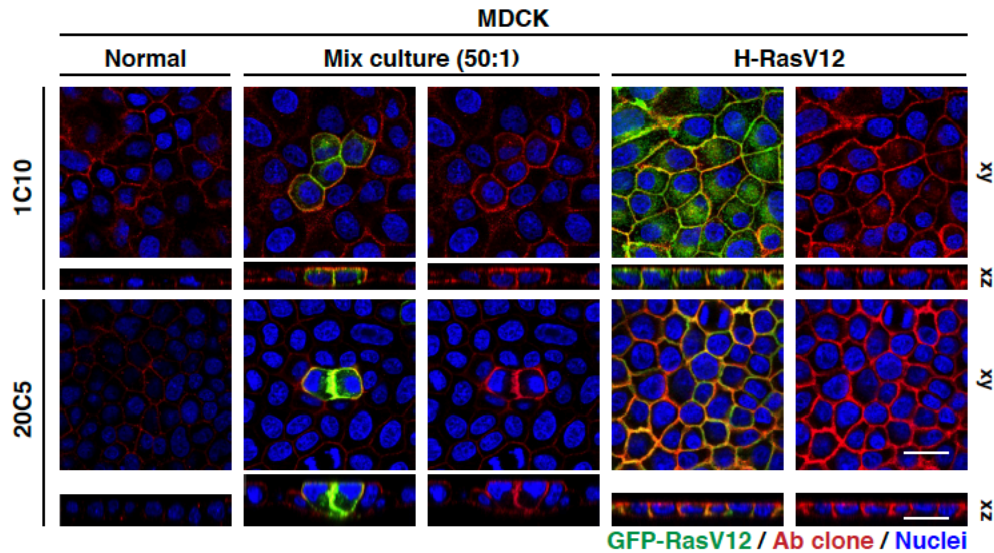


図 1. RasV12 変異細胞を特異的に認識するファージ抗体 (1C10, 20C5) の同定  
ファージディスプレイスクリーニングによって RasV12 変異細胞を特異的に認識する抗体を  
同定することに成功した。(スケールバー: 20  $\mu$ m)

(2) COL17A1 と CD44 はがん変異による単層上皮の多層化現象を制御する重要な因子である

さらに我々は、COL17A1 と CD44 の発現上昇と形質膜への集積が RasV12 の発現だけではなく、Src や ErbB2 によっても誘起することを見出した。RasV12、Src、ErbB2 は全て、単層上皮の多層化を引き起こすがん原性の変異である。そこで、COL17A1 と CD44 が多層化したこれらの変異上皮細胞において、どのような局在を示すかを免疫染色にて調べた。すると、COL17A1、CD44 の両者ともに、多層化した変異細胞層の上層部の細胞間接着部位に強く集積することが分かった (図 2)。

そこで、COL17A1 と CD44 が実際に多層化現象に機能的に関与しているかを調べるために、それらのノックダウン、あるいはノックアウトが変異上皮細胞の多層化にどのような影響を与えるかを調べた。すると COL17A1、CD44 の発現低下によって、変異細胞の多層化が強く抑制されることが分かった。これらのデータは、COL17A1 と CD44 ががん化の初期に生じる単層上皮の多層化現象を制御する重要な因子であることを示している。さらに、CD44 ノックダウンによって COL17A1 の集積が抑制されることから、CD44 が COL17A1 の集積を制御していることも明らかになった。

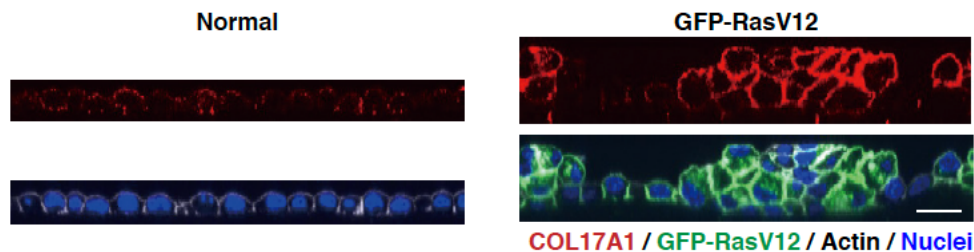


図 2. 多層化した RasV12 変異上皮細胞層の上層部の細胞間接着に集積する COL17A1  
CD44 も同様の集積を示す。(スケールバー: 20  $\mu$ m)

(3) COL17A1 と CD44 は管腔側へ逸脱した変異細胞内の ROS を低下させることによって細胞死を抑制する

単層上皮の多層化形成を引き起こす原因は、以下の 5 つのプロセスが考えられる。1) 無制限な細胞増殖、2) 細胞極性の崩壊、3) 細胞分裂軸の異常、4) 高細胞密度による apical extrusion の亢進、5) anoikis の抑制。そこで、COL17A1 ノックアウト、あるいは CD44 ノックダウンの効果を見ることによって、5 つのプロセスのうちどの異常が生じているかを調べたところ、COL17A1/CD44 発現低下細胞では、管腔側へ逸脱した変異細胞の細胞死が顕著に亢進することが分かった。また、管腔へ逸脱した COL17A1/CD44 発現低下細胞は、アポトーシスではなく、フェロプトーシスによる細胞死によって上皮細胞層から排除された。これらのデータは、変異細胞で発現が上昇した COL17A1 と CD44 は、管腔側へ逸脱した際にフェロプトーシスを抑制す

ることによって、多層化を促進していることを示唆している。  
COL17A1/CD44 発現低下細胞のフェノタイプについて、さらに解析を重ねた。すると、COL17A1/CD44 発現低下細胞では、ミトコンドリアの内膜の電位差が上昇し、ミトコンドリア由来の ROS (活性酸素) の発生が亢進し、それが管腔へ逸脱した細胞のフェロプトーシスを引き起こしていることが明らかになった。

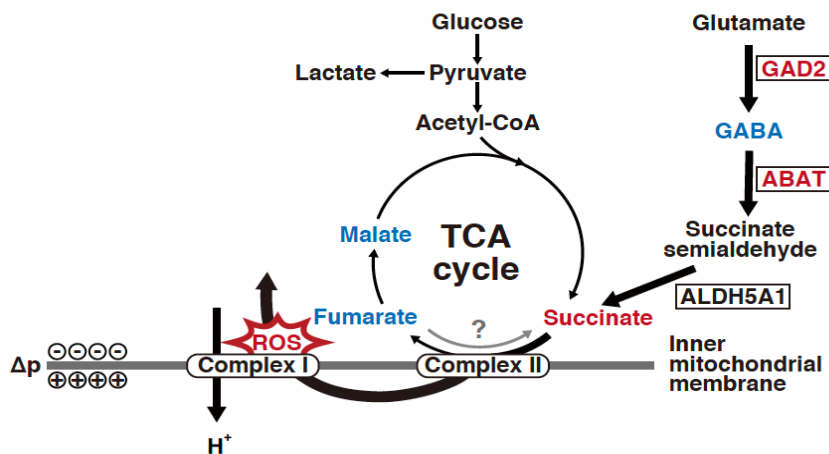


図 3. COL17A1 ノックアウト RasV12 変異細胞における代謝変化  
赤字、青字はそれぞれ含有量あるいは発現量上昇あるいは低下した代謝物や代謝酵素

分子メカニズムをさらに明らかにするために、慶應義塾大学先端生命科学研究所・曾我朋義先生との共同研究により、メタボローム解析を行った。RasV12 変異 MDCK 細胞と COL17A1 ノックアウト RasV12 変異 MDCK 細胞の 2 つの細胞における代謝物の比較解析を行ったところ、様々な代謝物の含有量が COL17A1 ノックアウト Ras 変異細胞において変化していることが明らかになった。例えば、TCA サイクルの代謝物の多くが低下している一方、コハク酸 (succinate) が上昇していた。また、GABA のレベルが低下しているとともに、glutamate-GABA 経路 (GABA シャント) に関わる複数の酵素の mRNA 発現が亢進していることからコハク酸の上昇は GABA シャント経路によって生じていることが示唆された。さらに、ミトコンドリア complex-I の阻害剤である Rotenone 投与によって COL17A1 ノックアウト RasV12 変異細胞におけるミトコンドリアが産生する ROS 量が減少した。これらのデータは、コハク酸量上昇に伴って、ミトコンドリア complex-I において電子移行が逆行し、その結果過剰量の ROS が産生されるというメカニズムを示唆している (図 3)。

#### (4) マウス発がんモデルにて多層化した前がん病変においても COL17A1 と CD44 の発現は上昇

続いて名古屋大学医学研究科の榎本篤先生との共同研究にて、COL17A1 や CD44 の発現上昇がマウス発がんモデルの多層化した前がん病変においても生じているかを検証した。膵管上皮特異的に *K-Ras* と *p53* の変異を誘導する KPC マウスの生後 8-10 週では、ヒトの膵臓前がん病変である PanIN に類似した多層化前がん病変を生じる。そこで、マウスの膵臓に生じた多層化した前がん病変について組織免疫染色を行ったところ、COL17A1、CD44 ともに形質膜への集積が観察された (図 4)。現在、COL17A1 や CD44 のノックアウトが多層化現象にどのような影響を与えるかについて検証している。

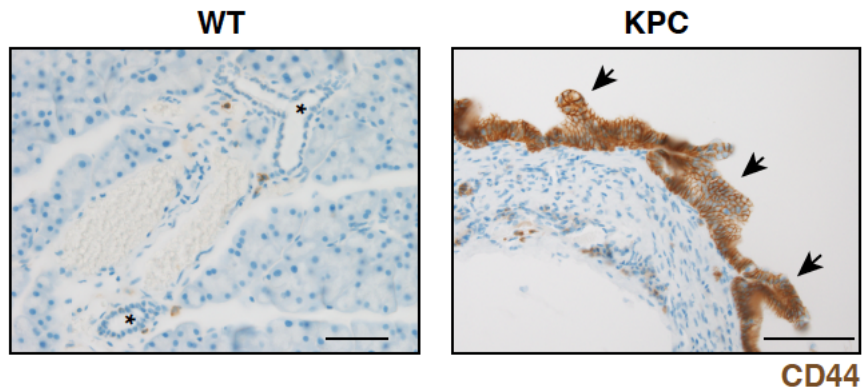


図 4. KPC マウスに生じた PanIN 様の多層化した前がん病変における CD44 の免疫染色像

星印：正常膀胱上皮、矢印：PanIN 様病変部位。(スケールバー: WT 50  $\mu\text{m}$ 、KPC 100  $\mu\text{m}$ )

研究成果は本研究費についての謝辞とともに *Current Biology* 誌にアクセプトされた (Kozawa et al., *Current Biology*, in press)。

このように、unbiased なファージディスプレイ抗体スクリーニングを行なった結果、当初の予想を超える研究成果を挙げる事ができた。がん化の初期段階において単層上皮が多層化する現象については、これまでも多くの報告がされているが、その分子メカニズムについては明らかになっていなかった。今回の我々の研究によって、上皮多層化のプロセスに COL17A1 と CD44 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらの研究成果は、COL17A1 と CD44 が上皮の多層化というこれまでがん診断・治療の対象になっていなかったプロセスの標的分子となる可能性を示している。今後は、多くのヒト前がん病変における COL17A1 と CD44 の発現を調べるとともに、これらの *in vivo* における前がん病変形成への機能的関与を詳細に調べていく。さらに、COL17A1 と CD44 が正常細胞と変異細胞間に生じる細胞競合のトリガー分子になっている可能性についても検証していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sasaki, A., Nagatake, T., Egami, R., Gu, G., Takigawa, I., Ikeda, W., Nakatani, T., Kunisawa, J. and Fujita, Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Obesity suppresses cell competition-mediated apical elimination of RasV12-transformed cells from epithelial tissues.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 974-982.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.03.104	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 該当する
1. 著者名 Watanabe, H., Ishibashi, K., Mano, H., Kitamoto, S., Sato, N., Hoshiba, K., Kato, M., Matsuzawa, F., Takeuchi, Y., Shirai, T., Ishikawa, S., Morioka, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K., Yonezawa, S., Kon, S. and Fujita, Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Mutant p53-expressing cells undergo necroptosis via cell competition with the neighboring normal epithelial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 3721-3729.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.05.081.	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 Yako, Y., Hayashi, T., Takeuchi, Y., Ishibashi, K., Kasai, N., Sato, N., Kuromiya, K., Ishikawa, S. and Fujita, Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 ADAM-like Decysin-1 (ADAMDEC1) is a positive regulator of Epithelial Defense Against Cancer (EDAC) that promotes apical extrusion of RasV12-transformed cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 9639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27469-z.	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 Takagi, M., Ikegawa, M., Shimada, T., Ishikawa, S., Kajita, M., Maruyama, T., Kamasaki, T. and Fujita, Y.	4. 巻 23
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 Anton, K.A., Kajita, M., Narumi, R., Fujita, Y. and Tada, M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Src-transformed cells hijack mitosis to extrude from the epithelium.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-07163-4	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 該当する

1. 著者名 Sogaard, P.P., Ito, N., Sato, N., Fujita, Y., Matter, K., and Itoh, Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 Epithelial polarization in 3D matrix requires DDR1 signaling to regulate actomyosin contractility.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800276.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201800276.	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 該当する

1. 著者名 Koso, H., Tshako, A., Matsubara, D., Fujita, Y. and Watanabe, S.	4. 巻 180
2. 論文標題 Ras activation in retinal progenitor cells induces tumor formation in the eye.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Eye Research	6. 最初と最後の頁 39-42.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exer.2018.11.025	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 Fujii, Y., Ochi, Y., Tuchiya, M., Kajita, M., Fujita, Y., Ishimoto, Y. and Okajima, T.	4. 巻 116
2. 論文標題 Spontaneous spatial correlation of elastic modulus in jammed epithelial monolayers observed by AFM.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biophysical Journal	6. 最初と最後の頁 1152-1158.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bpj.2019.01.037	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田恭之
2. 発表標題 細胞間コミュニケーションの究極の理解を目指して ~Cell Competition and Beyond
3. 学会等名 第91回日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuyuki Fujita
2. 発表標題 Sequential Oncogene Mutations Profoundly Influence the Outcome of Cell Competition
3. 学会等名 Cell Competition in Development and Disease（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田恭之
2. 発表標題 正常上皮細胞と変異細胞に生じる細胞競合
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会（招待講演）
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
---------	---------