

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07559

研究課題名（和文）正常上皮細胞と変異細胞の境界で生じる相互作用メカニズムの解明

研究課題名（英文）Ultrastructural analysis of the interaction between normal and transformed cells.

研究代表者

釜崎 とも子（Kamasaki, Tomoko）

北海道大学・医学研究院・特任助教

研究者番号：20384183

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がんの超初期段階では、正常細胞に囲まれたRas変異細胞は頭頂側に逸脱し、上皮細胞層から排除される。この抗腫瘍作用における正常-Ras変異細胞の相互認識メカニズムを明らかにするため、細胞間接着部位の電子顕微鏡解析を行った。その結果、cdc42-FBP17経路を介して形成される細胞突起finger-like protrusionが変異細胞と正常細胞の両方から伸長し、Ras変異細胞の上皮細胞層からの排除に重要であることが分かった。本研究により、正常細胞とRas変異細胞の境界における細胞間相互認識の仕組み‘protrusion to protrusion response’の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍多くは、複数のがん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子の変異が蓄積することによってがん化が進展していく。一方、がんの始まりは上皮細胞層の1個ないし数個の細胞に変異が生じることが要因となる。これまでに、変異細胞と直接それを取り囲む正常上皮細胞間で何が起こるかについて、まだ殆ど分かっておらず、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、変異細胞に隣接する正常細胞が特異的に細胞膜の形態および動態を制御する分子メカニズムが明らかになったことにより、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と考えられる。

研究成果の概要（英文）：At the initial stage of carcinogenesis, RasV12-transformed cells surrounded by normal cells are apically extruded from the epithelium. However, the underlying mechanisms of this tumor-suppressive process still remain enigmatic. We first show by electron microscopic analysis that characteristic finger-like protrusions are projected from both normal and RasV12 cells at their interface. In addition, FBP17 accumulates in RasV12 cells, as well as surrounding normal cells, which plays a positive role in the formation of finger-like protrusions and apical elimination of RasV12 cells. Furthermore, cdc42 acts upstream of these processes. These results suggest that the cdc42/FBP17 pathway is a crucial trigger of cell competition, inducing 'protrusion to protrusion response' between normal and RasV12-transformed cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞競合 RasV12 細胞膜 細胞突起 細胞間接着 BARファミリータンパク質

### 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 (**E**pithelial **D**efense **A**gainst **C**ancer) 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。EDAC が惹起される際には、直接的な細胞間接着が必要であることが知られている。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・形態制御メカニズムは明らかにされていなかった。

### 2. 研究の目的

申請者によるこれまでの電子顕微鏡 (電顕) 観察から、正常細胞と RasV12 細胞の細胞間接着部位で、細胞非自律的な細胞膜の形態制御が行われることが明らかになった (図 1A)。また、細胞間接着部位における変異細胞自身の細く短い細胞突起 'finger-like protrusion' の形成が、エンドサイトーシスに参与する FBP17 を介して制御されることで、EDAC に重要な役割を果たすことも分かってきた。そこで本研究では、正常細胞と Ras 変異細胞の境界において、正常細胞が変異細胞の自律的な変化を受容し、変異細胞を細胞層から排除する仕組みを明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

研究代表者が以前に確立した光顕-電顕相関観察法 (文献 3) を主に用いて、変異細胞と隣接する正常細胞の細胞間接着部位を詳細に観察した。その電顕像を基にして、細胞突起の出現頻度と細胞膜の waviness を解析することで細胞膜の形態を定量的に理解し、培養条件間で比較を行った。

### 4. 研究成果

(1) Ras 変異細胞自律的な細胞突起により、隣接する正常細胞の細胞突起形成が誘起される

FBP17 による Ras 変異細胞自律的な細胞突起形成が、その周囲の正常細胞へ与える影響を調べるため、Ras FBP17-shRNA 細胞と正常細胞の境界を電顕観察した。その結果、Ras FBP17-shRNA 細胞と正常細胞の細胞間接着部位では、Ras-正常細胞間で見られたような正常細胞側からの finger-like protrusion (図 1B, 矢頭) が減少していた。これらの観察から、Ras 変異細胞の細胞膜に局在する FBP17 は細胞自律的な細胞突起形成と、変異細胞に隣接する正常細胞からの細胞非自律的な細胞突起形成の両方を制御していることが示唆された。

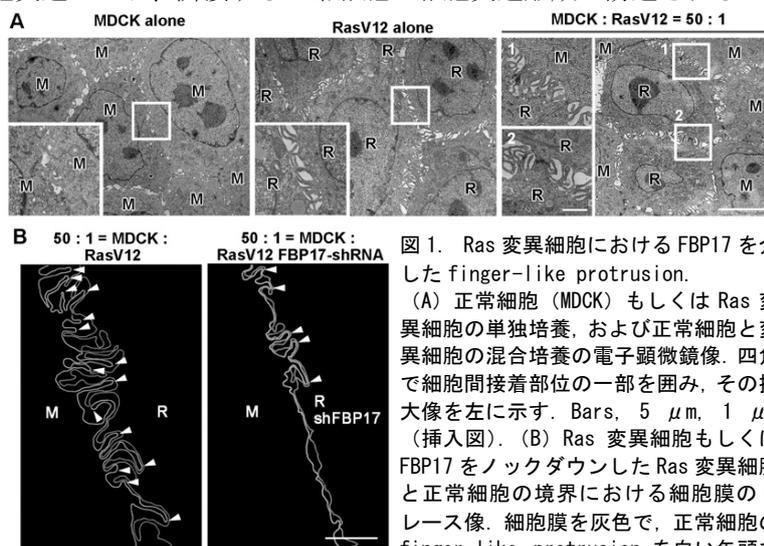


図 1. Ras 変異細胞における FBP17 を介した finger-like protrusion. (A) 正常細胞 (MDCK) もしくは Ras 変異細胞の単独培養, および正常細胞と変異細胞の混合培養の電子顕微鏡像. 四角で細胞間接着部位の一部を囲み, その拡大像を左に示す. Bars, 5  $\mu$ m, 1  $\mu$ m (挿入図). (B) Ras 変異細胞もしくは FBP17 をノックダウンした Ras 変異細胞と正常細胞の境界における細胞膜のトレース像. 細胞膜を灰色で, 正常細胞の finger-like protrusion を白い矢頭で示す. Bar, 1  $\mu$ m.

(2) 変異細胞を囲む正常細胞における FBP17 の集積を介した細胞競合制御

正常細胞が変異細胞に隣接することにより形成される細胞突起 (図 1) についても FBP17 が関与する可能性を調べた。mCherry-FBP17 を発現する正常細胞と変異細胞を混合培養すると、RasV12 の発現に伴って、変異細胞周囲の 3 列程の正常細胞の細胞間接着部位に mCherry-FBP17 が集積するようになった (図 2A)。これと一致して、finger-like protrusion も認められた (図 2B, 左)。また、FBP17 ノックダウン細胞と変異細胞を混合培養すると、正常細胞側で細胞非自律的に起こる finger-like protrusion の形成が減少し (図 2B, 右)、且つ変異細胞の細胞層からの排除も抑制された。この時 FBP17 ノックダウン細胞において、変異細胞との境界への EDAC マーカー-filamin の集積も減少した。これらの結果から、正常細胞の細胞膜における FBP17 も細胞競合の制御に重要であることが示唆された。

(3) Cdc42 は FBP17 を介した細胞突起の上流因子である

これまでに、cdc42 の活性化によって FBP17 の細胞膜への局在と膜を変形する活性が上昇することが報告されていた。そこで、cdc42 の活性化状態を WASP-CRIB タンパク質 (WASP の cdc42 結合ドメイン) による染色 (文献 1) によって見積もった。正常細胞もしくは変異細胞の単独培養と混合培養の染色を比較すると、混合培養条件の方が、変異細胞とその周囲の正常細胞における WASP-CRIB の強い染色が見られた。また、cdc42 阻害剤 ML141 で処理した正常-変異細胞境界においては、細胞突起が抑制されていた。これらの結果から、正常細胞と Ras 変異細胞間に生じる細胞競争において、cdc42 は細胞間接着部位の FBP17 を介した細胞突起の制御に重要な役割を果たすことが明らかになった。

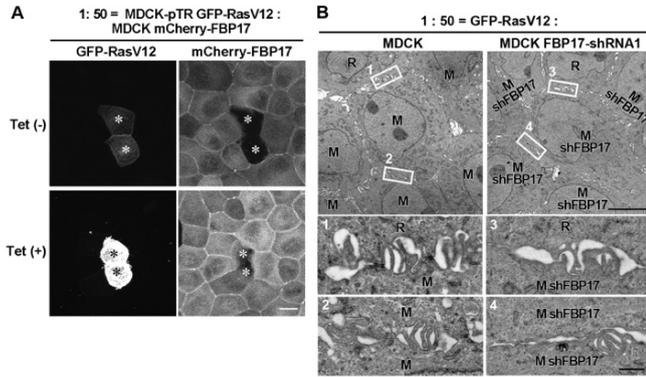


図 2. 変異細胞周囲の正常細胞における FBP17 の集積。  
(A)テトラサイクリン添加により GFP-RasV12 を発現する MDCK-pTR GFP-RasV12 細胞と mCherry-FBP17 を発現する MDCK 細胞の混合培養の蛍光顕微鏡像。星印は Ras 変異細胞を示す。Bar, 10  $\mu$ m. (B) Ras 変異細胞を囲む正常細胞もしくは FBP17 ノックダウン細胞の電子顕微鏡像。Box 1-4 で細胞間接着部位の一部を囲み、その拡大像を下に示す: 1) 正常細胞と変異細胞の境界, 2) 1 列目と 2 列目の正常細胞の境界, 3) FBP17 ノックダウン細胞と変異細胞の境界, 4) 1 列目と 2 列目の FBP17 ノックダウン細胞の境界. Bars, 5  $\mu$ m; 0.5  $\mu$ m (下図)。

(4) 正常細胞と変異細胞の相互認識メカニズム ‘protrusion to protrusion response’.

本研究において初めて、正常細胞と変異細胞の境界に関する詳細な電顕解析が行われ、細胞間接着部位の特徴的な微細構造として finger-like protrusion が見出された。この構造は cdc42/FBP17 経路を介して、RasV12 の発現に伴って細胞自律的に形成されること、そして正常細胞が変異細胞と隣接することで、正常細胞側から細胞非自律的に形成されることも明らかになった。以上の観察から、正常細胞と変異細胞の相互認識メカニズム ‘protrusion to protrusion response’ が存在する可能性が推測された (図 3)。この一連の過程による物理的・生理的シグナル伝達が、Ras 変異細胞の正常細胞層からの排除経路の一つとして存在すると推察される。今後は、finger-like protrusion が正常細胞と変異細胞間の相互認識シグナルを授受するためのツールとして機能する可能性 (図 3 (3), X) について、さらに分子・形態的メカニズムを追究したいと考えている。以上の成果を 2 報の筆頭・責任著者論文として発表した (文献 4, 5)。

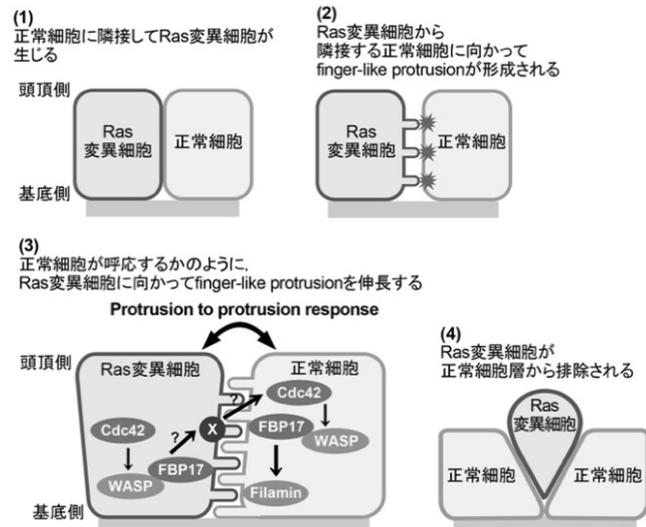


図 3. ‘Protrusion to protrusion response’ の模式図。

<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), 460-467, 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.*, 19 (5), 530-541, 2017  
 ④ Kamasaki T, Miyazaki Y, (他 8 名), Fujita Y\*: FBP17-mediated finger-like membrane protrusions in cell competition between normal and RasV12-transformed cells. *iScience* 24, 102994, 2021  
 ⑤ Kamasaki T, Uehara R, Fujita Y: Ultrastructural characteristics of finger-like membrane protrusions in cell competition. *Microscopy* 71 (4), 195-205, 2022

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

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, Kon S	4. 巻 40 (9)
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 Kuromiya K, Aoki K, Ishibashi K, Yotabun M, Sekai M, Tanimura N, Iijima S, Ishikawa S, Kamasaki T, Akiyama Y, Ishitani T, Hayashi T, Toda S, Yokoyama K, Lee CG, Usami I, Inoue H, Takigawa I, Gauquelin E, Sugimura K, Hino N, Fujita Y	4. 巻 40 (2)
2. 論文標題 Calcium sparks enhance the tissue fluidity within epithelial layers and promote apical extrusion of transformed cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111078	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 Kamasaki T, Uehara R, Fujita Y	4. 巻 71 (4)
2. 論文標題 Ultrastructural characteristics of finger-like membrane protrusions in cell competition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 195-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111078	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 釜崎とも子	4. 巻 94 (3)
2. 論文標題 正常細胞と変異細胞の境界における細胞突起を介した相互認識メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 402-405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940402	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 Kohashi K, Narumi R, Kozawa K, Kamasaki T, Ishikawa S, Kajita M, Kobayashi R, Tamori Y, Fujita Y	4. 巻 31
2. 論文標題 Sequential oncogenic mutations influence cell competition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3984-3995
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.06.064	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 Kamasaki T, Miyazaki Y, Ishikawa S, Hoshiba K, Kuromiya K, Tanimura N, Mori Y, Tsutsumi M, Nemoto T, Uehara R, Suetsugu S, Itoh T, Fujita Y	4. 巻 24
2. 論文標題 FBP17-mediated finger-like membrane protrusions in cell competition between normal and RasV12-transformed cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102994	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 Kozawa K, Sekai M, Ohba K, Ito S, Sakoh H, Maruyama T, Kaneko M, Shirai T, Kamasaki T, (他24名), Fujita Y	4. 巻 31 (14)
2. 論文標題 The CD44/COL17A1 pathway plays a vital role in the formation of multi-layered, transformed epithelia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 3086-3097
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2021.04.078	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 釜崎とも子, 藤田恭之	4. 巻 53 (10)
2. 論文標題 正常細胞と変異細胞間の細胞突起を介した細胞競合制御	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 細胞	6. 最初と最後の頁 35-39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 釜崎とも子, 佐藤絢, 藤岡容一朗, 酒井信明, 吉田藍子, 柏木彩花, 天野麻穂, 大場雄介
2. 発表標題 新規エンドソーム構造に関する形態学的解析
3. 学会等名 日本生理学会北海道地方会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 釜崎とも子, 佐藤絢, 藤岡容一朗, 酒井信明, 吉田藍子, 柏木彩花, 天野麻穂, 大場雄介
2. 発表標題 新規エンドソーム構造の微細形態学的同定を目指して
3. 学会等名 JSTさきがけ「微粒子」北海道大学交流会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 釜崎とも子, 佐藤絢, 藤岡容一朗, 酒井信明, 吉田藍子, 柏木彩花, 天野麻穂, 大場雄介
2. 発表標題 新規エンドソーム構造に関する形態学的解析
3. 学会等名 第2回「物質共生」領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 釜崎とも子, 藤田恭之
2. 発表標題 FBP17を介して形成されたfinger-like protrusionは変異細胞の上皮細胞層からの排除を制御する
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 釜崎とも子, 藤田恭之
2. 発表標題 FBP17により形成されたfinger-like protrusionは変異細胞の上皮細胞層からの排除を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 釜崎とも子
2. 発表標題 電子顕微鏡による細胞の三次元的・定量的可視化
3. 学会等名 超異分野meetup week 2020
4. 発表年 2020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
---------	---------