

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670141

研究課題名(和文)細胞競合を駆動する「細胞適応度」の同定とそれによるがん制御機構の解明

研究課題名(英文)Tumor growth regulation by switching JNK-dependent Hippo signaling regulation

研究代表者

榎本 将人(ENOMOTO, Masato)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：00596174

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、JNKシグナルはHippo経路の構成因子Warts (Wts) を活性化してYorkie (Yki) 活性を抑制することで腫瘍形成を負に制御していることがわかった。その一方でRasシグナルが活性化した細胞では、JNKシグナルはRasシグナルと協調してAjubaを介したアクチンフィラメントの動態変化によってWtsの不活性化を促し腫瘍形成を促進することが明らかとなった。このことから、RasシグナルはJNKシグナルの腫瘍形成と腫瘍抑制という二つの作用をスイッチすることでJNKシグナルによる「細胞適応度」の制御機構を破綻させて腫瘍形成を促進していることが示唆された。

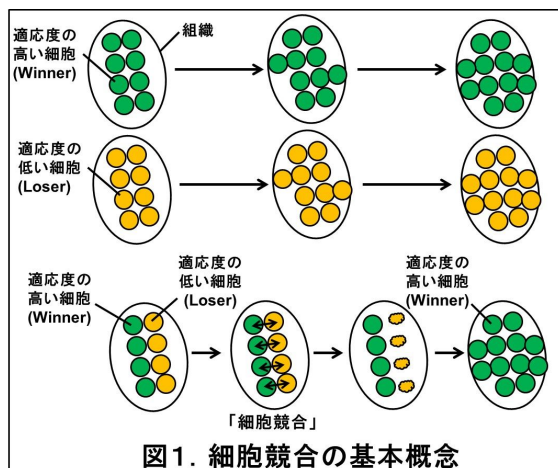
研究成果の概要(英文)：JNK signaling has long been recognized as a dual-functional oncogenic signaling that exerts both anti- and pro-tumor activities. However, the mechanisms by which JNK signaling switches its oncogenic roles in different cellular contexts are poorly understood. In this study, we found that JNK signaling also suppressed cell proliferation of these oncogenic clone. Mechanistically, JNK signaling inhibited the transcriptional coactivator Yorkie(Yki) through Warts(Wts) activation, thereby suppressed tumor growth. Interestingly, in cells with elevated Ras activities, JNK signaling induced F-actin accumulation through Ajuba protein by cooperation of Ras signaling. Changing F-actin dynamics leads to activate Yki through Wts inactivation, thereby induced tumor overgrowth. Our findings reveal that JNK signaling controls tumor progression by switching the Hippo pathway activity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：細胞競合 適応度 JNK Hippo経路 がん

### 1. 研究開始当初の背景

近年、多くのヒトのがん組織は均一の細胞集団で構成されるのではなく、ポリクローナルな起源をもつ細胞集団から成っていることがわかってきた。また、組織中のがんの多発「母地」が形成される「field cancerization (広域発がん)」と呼ばれる現象が様々ながんにおいて認められており、遺伝的要因以外の因子によってもがんの発生しやすい環境が形成されることがわかってきた。例えば、突然変異により生じた前がん細胞は、周辺細胞との細胞間相互作用を介して「細胞非自律的」にがんの発生・進行を正や負に制御している局面が存在する。このようながん制御に重要な細胞間相互作用として、細胞競合と呼ばれる現象が近年注目されつつある。細胞競合とは、同種の細胞間において相対的に「適応度」の高い細胞が選択され低い細胞が排除されるという、細胞の適者選択システムである(図1)。実際に、細胞競合は組織内に生じた異常細胞(がん原性細胞)の排除、がん細胞による周辺細胞の排除や幹細胞ニッチにおける優良幹細胞の選択といった多様な生命現象に関わることが示され始めており、組織中のがん原性細胞の「適応度」が、がん抑制/進展のアウトプットをスイッチする重要なファクターとなっている。しかしながら、これまでに細胞の適応度を規定する因子やその活性の変化によるがん進展メカニズムは不明な点が多かった。



### 2. 研究の目的

本研究は、ショウジョウバエ上皮をモデルとして、細胞競合を駆動する細胞の「適応度」を規定する因子を同定し、その因子によるがん制御の分子機構を明らかにする。それによって細胞競合によるがん制御の遺伝的基盤の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

これまでにがん遺伝子である Src 活性化細胞や上皮極性遺伝子 *scribble* (*scrib*) 変異

細胞の集団(クローン)をショウジョウバエ上皮に出現すると、それらは細胞競合によって細胞死を誘導されて、最終的に組織から排除されていくことがわかってきた。すなわち、これらのがん原性細胞は腫瘍形成能を有しているにも関わらず、正常細胞と隣接すると細胞競合の loser となる。そこで、本研究ではこれらのがん原性細胞を loser とする細胞適応度を明らかにすべく、Src 活性化細胞クローンや *scrib* 変異細胞クローンをショウジョウバエ上皮である複眼原基に遺伝的モザイク法を用いて誘導し、それらの細胞クローンの腫瘍形成を正負に制御する因子を探索した。さらに、そのメカニズムを遺伝学的手法および生化学的手法により解析した。

### 4. 研究成果

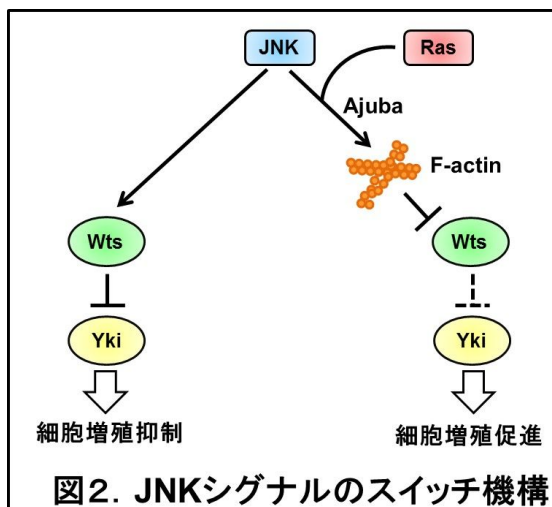
ショウジョウバエ上皮にがん原性細胞である Src 活性化細胞クローンや *scrib* 変異細胞のクローンを野生型細胞とモザイク状に誘導させると、これらの細胞クローンは細胞競合によって組織から排除されることがわかってきた。そこで、Src 活性化細胞や *scrib* 変異細胞を loser 細胞として規定している因子を解析した結果、c-Jun N-terminal kinase (JNK) シグナルが重要であることがわかった。まず、これらの loser 細胞は細胞競合による排除を阻害すると Hippo 経路の構成因子である Yorkie (Yki: 哺乳類 YAP/TAZ ホモログ) の活性化を引き起こして腫瘍を形成することから、JNK シグナルと Hippo 経路のとの遺伝学的相互作用について解析した。具体的には、Hippo 経路のコンポーネントである *hippo* (*hpo*: 哺乳類 Mst1/2 ホモログ)、*fat* (*ft*: 哺乳類 *fat4* ホモログ) および *warts* (*wts*: 哺乳類 *Lats1/2* ホモログ) の変異細胞クローンをショウジョウバエの複眼原基に誘導し、これらの変異細胞クローン内で JNK シグナルの活性化を引き起こした時の変異細胞クローンの増殖能を解析した。その結果、いずれの Hippo 経路のコンポーネントの変異細胞クローンとも JNK シグナルが活性化していない状況下では過剰に増殖し組織の過形成を引き起こす一方で、これら一連の変異細胞クローン内で JNK シグナルを活性化させたところ、JNK シグナルは *hpo* 変異細胞クローンや *ft* 変異細胞クローンの増殖能を抑制した。しかしながら、JNK シグナルは *Hpo* の下流因子である *wts* を欠損した変異細胞クローンではその増殖能を抑制できないことがわかった。このことから、JNK シグナルによる Src 活性化細胞や *scrib* 変異細胞の増殖抑制には *Wts* が必要であることが考えられた。さらに、どのように JNK シグナルが *Wts* を介して細胞増殖を抑制しているか、その分子機構を明らかにするため、JNK シグナルを活

性化した状況下における Wts 活性を生化学的に解析した。具体的には、ショウジョウバエの複眼原基に JNK の活性化を引き起こし、その成虫の複眼から Wts の標的因子である Yki を免疫沈降法によって単離し、さらに Yki の 168 番目のセリン残基のリン酸化状態を解析すべく（転写活性化因子である Yki はセリン 168 を Wts によりリン酸化されることで核内移行を抑制されて、その転写活性を阻害される）168 番目のセリン残基に特異的な抗リン酸化抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、JNK シグナルの活性化によって Yki のリン酸化が著しく上昇していることがわかった。すなわち、JNK シグナルは Wts の活性化を引き起こし、それによって Yki 活性を阻害していることがわかった。これら一連の実験結果から、JNK シグナルは Wts の活性化を介して Yki 活性を阻害することによって細胞増殖を負に制御していることが明らかとなった。実際に、JNK シグナルを抑制した Src 活性化細胞クローンや *scrib* 変異細胞クローンにおいて Wts の活性化を引き起こすと、これらのがん原性細胞クローンの腫瘍形成能は顕著に抑制された。

一方で、がん遺伝子である Epidermal growth factor receptor (EGFR) を活性化している細胞クローンをショウジョウバエ複眼原基にモザイク状に誘導したとき、EGFR 活性化細胞クローンは JNK シグナルを活性化しているにも関わらず、同時に Yki の活性化も引き起こしていることを見出した。このとき、EGFR 活性化細胞クローンは過剰に増殖し腫瘍を形成したことから、EGFR 活性化細胞内においては JNK シグナルによる Yki 活性の抑制作用が何らかのメカニズムによって機能していないことが考えられた。そこで、その分子メカニズムを遺伝学的に解析したところ EGFR 活性化細胞において Ras シグナルが活性化しており、これが JNK 依存的な細胞増殖の抑制作用を促進作用へとスイッチしていることがわかった。具体的には、活性化型 Ras である RasV12 を発現する細胞クローン内において JNK シグナルを活性化させたところ、JNK シグナルと Ras シグナルは協調して低分子量 G タンパク質である Rac1 を介したアクチンフィラメント (F-actin) の過剰な集積を引き起こし、それが Wts の不活性化を誘導していることがわかった。さらに、その分子機構の解析を進めた結果、JNK シグナルと Ras シグナルは LIM ドメインタンパク質 Ajuba の動態変化を引き起こして、これによって Rac1 依存的な F-actin の集積を引き起こすことが明らかとなった。実際に、JNK シグナルと Ras シグナルを活性化している EGFR 活性化細胞クローン内では F-actin の過剰な集積が認められた。すなわち、このことは Ras シグナル

が活性化している細胞内において JNK シグナルは細胞増殖を正に制御し、腫瘍形成を促進していることを示唆している。これらの結果は、Ras シグナルが JNK シグナルのもつ細胞増殖と細胞死という相反する 2 つの作用をスイッチさせることを示しており、Ras 活性が JNK シグナルの腫瘍形成・抑制の誘導に重要な因子であることを示唆している (図 2)。

以上の一連の事象から、細胞競合の loser 細胞で JNK シグナルは Hippo 経路を活性化 (Yki を不活性化) することで細胞の適応度を低下させることが示唆された一方で、このような loser 細胞内で強い Ras シグナルの活性化が引き起こされると JNK シグナルは Hippo 経路の不活性化 (Yki を活性化) を誘導し、それによって細胞適応度を上昇させてがん化へと促進させ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)

Enomoto M, Vaughen J, Igaki T, Non-autonomous overgrowth by oncogenic niche cells: Cellular cooperation and competition in tumorigenesis *Cancer Science*, 査読有, 106 巻, 2015, 1651-1658  
DOI: 10.1111/cas.12816

Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, Igaki T, JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity *Developmental Biology*, 査読有, 403 巻, 2015, 162-171  
DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.05.001

[学会発表](計 4 件)

榎本 将人, 竹本 大策, 井垣 達吏

がん遺伝子活性の不均一性による腫瘍悪性化の分子基盤

第 67 回日本細胞生物学会大会 (口頭)

タワーホール船堀 (東京)

2015 年 6 月 30 日 ~ 2015 年 7 月 2 日

Enomoto M, Takemoto D, Igaki T  
Tumor progression by a genetic heterogeneity of clones with distinct oncogenic activities

Barcelona Biomed Conference Drosophila as a model in cancer (ポスター)

バルセロナ (スペイン)

2015 年 6 月 15 日 ~ 2015 年 6 月 17 日

Enomoto M, Takemoto D, Igaki T  
Tumor progression by a genetic heterogeneity of cell clones with distinct oncogenic activities

54th Drosophila Research Conference (口頭)

シカゴ (アメリカ)

2015 年 3 月 4 日 ~ 2015 年 3 月 8 日

榎本 将人, 木澤 大輔, 井垣 達吏  
Tumor growth regulation by JNK-dependent switching of the Hippo pathway activity,  
第 11 回日本ショウジョウバエ研究会 (口頭)  
金沢歌劇座 (金沢)

2014 年 6 月 4 日 ~ 2014 年 6 月 6 日

[図書] (計 2 件)

榎本 将人, 井垣 達吏

実験医学 (羊土社)

がんの発生・進展を促すニッチ細胞

2014, 32, 2574-2581

榎本 将人, 井垣 達吏  
医学のあゆみ (医歯薬出版)  
細胞の協調と競合における Hippo 経路の役割,  
2014, 251, 389-396

[その他]

ホームページ等

[https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/?doing\\_wp\\_cron=1464946732.5285639762878417968750](https://www.lif.kyoto-u.ac.jp/genetics/?doing_wp_cron=1464946732.5285639762878417968750)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 将人 (ENOMOTO, Masato)

京都大学・大学院生命科学研究科・特定助教

研究者番号: 00596174

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし