

がん—上皮細胞間相互作用によるがん悪化機構の解明

山梨大学大学院 医学工学総合研究部
医学学域・基礎医学系 生化学第二教室
齋藤 正夫

1. はじめに

初期胚を構成する細胞は上皮細胞 (epithelial cell) と間葉細胞 (mesenchymal cell) である。上皮細胞が E-cadherin などの細胞接着因子を発現することによって、隣接する細胞どうしと接着し、基底膜上に細胞極性をもって規則正しく配置される一方、間葉細胞は散在かつ不定形であり運動性に富む。上皮細胞が間葉細胞に形質転換 (EMT; Epithelial-Mesenchymal Transition) することによってダイナミックな器官形成が可能になり、この現象は腎形成や心臓弁形成などの生理的な条件での研究が進められてきた。

近年、EMT の病理学的な作用も明らかになっている。マウスを応用した研究などにより、EMT により分化した線維芽細胞が線維症や癒痕形成で観察され、腎臓や肝臓における実験系線維症モデルの約 30% の線維芽細胞が EMT を介した上皮由来であることが報告された(1)。しかし、現時点ではヒト検体において、EMT を介した上皮由来の線維芽細胞は、未だ検出できていない。また、最近、がんにおける EMT も話題となっている。病理学的に悪性度の高いがん細胞のもつ特性が、間葉系細胞の特性と類似することは旧知より知られていたが、この分化調節機構に EMT を司る分子が関与していることが明らかにされ(2)、EMT を司る転写因子群の発現が、がんの悪性度や再発率と非常に強い正の相関をもつことも明らかになっている。また EMT が、がん幹細胞や、がん関連線維芽細胞 (CAF: Cancer-associated fibroblast) の発生機構のひとつとして、現在非常に注目されている(3, 4, 5)。申請者は、新たな EMT の作用機構として、上皮細胞が EMT によって形質変換した線維芽細胞様細胞 (EDAF 細胞) が、がん細胞の浸潤を促進させることを発見した(6)。したがって、EMT (上皮間葉転換) は、①がん幹細胞の発生機構、②がん細胞の低分化 (未分化) 型への分化調節機構、③がん関連線維芽細胞 (CAF, EDAF 細胞) の発生機構として、がんの悪化に非常に深く関与している。これらのことから、EMT を指標とした、がんの診断法の開発は極めて有用であると考えられる。しかしながら、EMT によって間葉様細胞へ分化した細胞と、既存する間質細胞とを形態的に鑑別することは非常に困難である。現在、EMT 特異的分子マーカーの探索が行われているにもかかわらず、未だ特定分子の同定には至っておらず、したがって、生体内で EMT を検出する手段はない。

TGF- β はがん化を抑制し、がんの悪性度を亢進させるユニークなサイトカインである。この二面性の作用のうち、がん抑制因子としての TGF- β の作用は古くより研究され、がん悪性因子としての作用は、がん微小環境の細胞へのパラクライン的な作用と理解されてきた。申請者は、TGF- β が、がん細胞自身に EMT を惹起し、運動性を亢進させる結果、悪性度を促進させていることを見出した(7)。したがって、この分子機構を解明することにより、TGF- β のがん抑制因子から促進因子への変換機構 (TGF- β スイッチとよばれる) を解明する手がかりとなり、TGF- β のもつ二面性を分離できるようなシグナル分子の同定が可能と考えられた。同時に、TGF- β シグナルをピンポイントで制御できるような制癌法の開発にもつながると考えられた。

そこで、本研究では、これまでの研究業績を下に、TGF- β 誘導性 EMT の分子機構を解析し、EMT を評価できる新たな分子を同定し、診断に応用できるような基礎的解析を目的として研究を行った。

2. 方法

(1) マイクロアレイデータの再評価

これまでにマウス上皮細胞を用いて、TGF- β 誘導性 EMT 時に発現変動する遺伝子を解析するため DNA マイクロアレイを既に施行している。さらに、最近、TGF- β により選択的スプライシングが変化することが EMT 誘導に必須であることがわかり、エキソアレイも既に施行している(8)。これらの情報をもとに、転写レベルのみならずスプライシング変化のある遺伝子を同定する。得られた分子に対する抗体を入手し、ヒトがん標本や *in vitro* での実験で検証した。

(2) TGF- β 誘導性 EMT の分子機構解析

Ras に活性型変異をもつ、がん細胞は TGF- β 単独刺激により、代表的 EMT 誘導転写因子である Snail の発現を上昇させる(9)。一方、Ras に活性型変異をもたないがん細胞は、EGF や HGF など増殖因子と協調した時のみ TGF- β は Snail を発現誘導することができる(9)。そこで、Snail プロモーター

活性を指標とし、siRNA ライブラリーをスクリーニングすることで、この協調作用を司る分子を同定を試みた。得られた遺伝子産物の機能を *in vitro* で解析し、また TGF- β のがん抑制作用に対する効果も検討した。

(3) EDAF細胞によるがん細胞浸潤促進の分子機構

TGF- β と FGF-2 で EMT を惹起させた上皮細胞はがん細胞の浸潤を促進させた(6)。このメカニズムを理解するために、単純な実験系を構築して、同様に結果を確認した。

3. 結果

(1) マイクロアレイデータの再評価

本研究では、診断への応用を念頭におき、細胞内で比較的発現が高い細胞骨格タンパク質などに焦点をあて、既に施行したマイクロアレイデータの再評価をおこなった。その結果、TGF- β 誘導性 EMT 時に特異的に発現が上昇する4つの遺伝子を得た。そこで、リアルタイムPCR法によって検討すると、この4つの遺伝子の発現上昇を確認できた。さらに、タンパク質レベルで検討すると、一部抗体の問題があり、確認できないものがあったが、2つの遺伝子産物 (geneA と geneB) の発現上昇がウエスタンブロット法で確認された。さらに両遺伝子産物は細胞染色でも検出することができた。

次に、EMT はがん細胞の分化に関与することから、所有している20種類の乳癌細胞株でその発現を検討したところ、上記2つの遺伝子産物のうち geneA は低分化・未分化型の細胞に、geneB は逆に高分化型の細胞に発現が認められた。また、geneA は ERK の活性化ならびに EMT 誘導転写因子である ZEB1 発現と付随することが判明した。そこで、ERK 活性を阻害剤で抑制すると、geneA と ZEB1 の発現が低下することがわかった。さらにこれらの現象は、ヒト乳癌病理組織標本でも確認することができた。

一方、エキソアレイによる結果をもとに、複数の遺伝子 mRNA の選択的スプライシングを検討した。まず、スプライシングにより機能変化が既にわかっている数種の遺伝子 (Mena, CD44, FGFR, Rac etc) は、TGF- β でスプライシングが変化し、いずれも運動性や未分化性を誘導するような、スプライシング変異体が生じていた。そこで、現在、これまでに機能が知られていない選択的スプライシング変異体に関する研究を遂行している。

(2) TGF- β 誘導性 EMT の分子機構解析

Ras に活性型の変異がない HeLa 細胞では、TGF- β の単独刺激では Snail 発現は上昇しないが、EGF との共刺激により上昇する(9)。これを Snail プロモーター活性 (Snail-Luc) でも評価できることが確認した。そこで、Snail-Luc の活性上昇を指標に、siRNA ライブラリーを用いて、分子機構の一端の解明を行った。その結果、複数の siRNA を同定し、off target 効果を否定するため、同遺伝子に対する複数の siRNA を新たに作製して検討し、その効果を同様に確認することができた。さらに、プロモーター活性だけでなく、内在性 Snail の発現に対しても確認できた。そこで、これらの複数の分子のうちで最も顕著な効果のある遺伝子 (geneC) をクローニングし、プラスミドを構築し、過剰発現系でも、その効果を確認した。一方で、TGF- β の癌抑制作用に対する効果を検討すると、geneC は TGF- β シグナルを減弱させることがわかった。つまり、geneC は TGF- β のがん抑制作用に対しては阻害効果があり、がん促新因子として作用に対しては促進的に機能することがわかった。つまり、この geneC は TGF- β スイッチとして働く可能性があり、現在、この geneC と TGF- β シグナル、また EGF シグナルとの作用点の解析を分子レベルで進めている。

(3) EDAF細胞によるがん細胞浸潤促進の分子機構

これまでコラーゲン上で、GFP を遺伝子導入したがん細胞と上皮細胞を共培養し、浸潤過程を GFP でモニターしてきた。しかしながら、ゲルからの細胞や RNA の抽出が困難であることから、chamber での再評価を行ったところ、同様な効果を再確認できた。また、上記(1)で発見した geneA を上皮細胞でノックダウンすると運動性が減弱することから、現在上皮細胞の geneA とがん細胞浸潤との関連性を解析している。

4. 考察 まとめ

DNA マイクロアレイにより得られた geneA は低分化型がん細胞に発現が高い事が明らかとなり、新たな EMT の分子マーカーである可能性がある。しかしながら、EMT の重要性はがん細胞だけでなく、特に、がん細胞の浸潤を促進させるような間質細胞への分化にも関与が示唆されている。本研究の主眼のひとつが、EDAF 細胞のような間質内にある EMT 獲得細胞による、がんの新たな診断法の開発である。しかしながら、geneA が、浸潤しているがん細胞にも発現が高いことは、癌微小環境内での EMT 獲得細胞の評価を困難にさせてしまっている。そこで、現在、エキソアレイ解析のデータを下に、スプライシング変異体特異的な分子に関して、解析を進めている。FGF 受容体

は細胞外領域に選択的スプライシング変異体が存在し、リガンドとの親和性を異にしている。実際、FGF-2/-4に結合親和性の高いIIIcアイソフォームは、TGF- β 誘導性EMTでスプライシング変化によって発現するようになり、EMTを促進させ(9,10)、また、浸潤性の高い乳癌細胞のみに発現が確認されている(9)。これらの選択的スプライシング変化には、ESRPと呼ばれる因子の関与を既に明らかにしている(8)。そこで、現在、ESRP過剰発現株でのエキソンアレイのデータベースも参考にして、未知な選択的スプライシング変異体を探索し、新たにEMT分子マーカーとなり得る可能性を今後その抗体作製と共に発展させる予定である。

一方、siRNAライブラリーのより同定されて複数遺伝子のうち、geneCが深く関与することがわかった。geneCはEGFとTGF- β に共刺激による、またRasとTGF- β による共刺激によるSnail発現を相乗的に促進する。しかし、geneCは、TGF- β のがん抑制作用としての機能は減弱させる。したがって、geneCが、これまで全くわかっていないTGF- β スイッチとして機能する可能性もある。今後はこの点を中心として解析を進め、geneCによるEMT診断法の開発や、治療へ応用を試みたい。

EMTは、がんの悪化に非常に深く関与し、TGF- β はEMTを最も強力に誘導する。EMTは現在、がん幹細胞発生にも深く関与していることが明らかとなっている。したがって、TGF- β 誘導性EMTを基本とし、その分子機構を明らかにし、得られた結果より、実際ヒト癌組織におけるEMTの実態を明らかにしたいと考えている。これらにより、新たな診断法の開発や治療へ応用に展開できるような研究を、今後おこなう予定である。

5. 参考文献

- ①Kalluri R, Weinberg RA. *J. Clin. Invest.* 2009 119; 1420-1428
- ②Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. *Cell* 2009 139; 871-890.
- ③Valastyan S, Weinberg RA. *Cell.* 2011 147:275-92.
- ④Thiery JP, et al. *Cell.* 2009 139:871-90
- ⑤Kalluri R. *J. Clin. Invest.* 2009 119:1417-9.
- ⑥Shirakihara T. Saitoh M. et al 2011 *EMBO J.* 2011 30:783-95
- ⑦Kondo M. Saitoh M. et al *Cell Death Differ.* 2004 11:1092-101
- ⑧Horiguchi K. Saitoh M. et al. 2012 *Oncogene.* 2012 31:3190-201
- ⑨Horiguchi k. Saitoh M. et al 2009 *J.Biol.Chem.* 2009 284:245-53.
- ⑩Saitoh M, Miyazawa K.J. *Biochem.* 2012;151:563-71.