

腫瘍抑制因子による細胞分裂方向の制御メカニズム

東北大学 学際科学フロンティア研究所

中嶋 悠一郎

1. はじめに

ヒトのがんの約9割は上皮由来である。上皮性の腫瘍においては、極性や接着といった上皮細胞が本来備える性質に異常がみられ、上皮構造の破綻と病態とが強く相関する。これまでに上皮構造の異常と腫瘍化の関係は、培養細胞系やモデル動物を用いたがん原遺伝子や腫瘍抑制因子の研究によって進展してきた。しかしながら、これら遺伝子異常を持った細胞が正常な上皮組織にどのような影響を与え、異常な細胞がどのような振る舞いを示して上皮構造の破綻を誘導し、腫瘍化が亢進するのか、その細胞レベルの仕組みの多くは未だ不明である。

近年、上皮組織における細胞分裂方向の異常は腫瘍形成やがんの悪性化への関与が指摘され、その制御機構の重要性が認識され始めている。われわれのこれまでの研究より、上皮と平行な細胞分裂方向が、ScribおよびDlgという腫瘍抑制因子によって制御されており、分裂方向の制御は上皮構造の維持と腫瘍化の抑制に重要であることが明らかとなった。本研究では、腫瘍抑制因子ScribとDlgが制御する細胞分裂方向の仕組みを体系的に明らかにし、上皮組織の恒常性維持の理解と、分裂方向の異常が誘導する腫瘍形成・がん化メカニズムの理解を目指すことを目的とする。

背景・序論

われわれヒトを含む多細胞動物の発生過程や恒常性維持において、上皮細胞の多くは上皮シートに対して平行な細胞分裂を行い、同じサイズの娘細胞を生み出す「対称分裂」を行う。細胞分裂方向が上皮と平行であることで、組織の平面的な成長を促すだけでなく、組織恒常性の維持にも寄与することが提案されてきた。近年、上皮の細胞分裂方向の異常は多発性嚢胞腎や腫瘍形成といった病態への関与が指摘されており、その制御機構の重要性が世界的にも認識されている^{1,2}。

細胞分裂方向の研究は、これまで神経前駆細胞や幹細胞などの「非対称分裂」において精力的に行われてきた³。非対称分裂の場合においては、分裂方向の異常が細胞運命の変化や、細胞分化の異常につながり、発生段階にとどまらず成体でもその表現型が観察されるなど、比較的わかりやすい表現型によって異常が確認できた背景がある。また分裂方向を制御する因子が、細胞極性因子とともに同定されてきたという歴史的な経緯があった。中でも、Gai-LGN-NuMAを介した経路は、ほとんどの細胞分裂方向の制御に関わる、進化的に保存された仕組みである⁴。その一方、上皮組織での対称分裂における分裂方向の仕組みや、分裂方向の生理的意義はほとんど明らかでなかった。

上皮シートと平行な方向に上皮細胞は分裂する、という事実はこれまでも報告されていたが⁵、その分裂方向を決定する分子メカニズムは長い間不明であった。2008年頃より、上皮と平行な細胞分裂方向に注目した研究が発表され始め、分裂方向の制御メカニズムは、主にほ乳類の上皮系培養細胞で解析されてきた^{6,7}。特に、培養上皮細胞を3次元培養した際にできる嚢胞を用いた上皮形成を模倣した系を使って、分裂方向の制御メカニズムが盛んに研究されてきた⁸。しかしながら、生体内の上皮において適切な遺伝子操作が簡便に行え、かつ、分裂方向異常の表現型や、その過程を観察しやすい系が確立されていなかったことから、生体内における分裂方向を制御する仕組みや、分裂方向の組織構築や構造維持における役割は明らかでなかった。

われわれはこうした問題を解決するために、遺伝学的ツールが豊富で、比較的単純な上皮構造をもつショウジョウバエ翅原基を生体上皮モデルとして、上皮と平行な細胞分裂方向の制御メカニズム、ならびに、分裂方向が組織構造に果たす役割の研究を開始した。その過程で、動物細胞の分裂期に普遍的に観察される、アクチン細胞骨格を介した細胞球形化が分裂方向の制御に必要であることを明らかにした。また、球形化した細胞内において、細胞間結合部位に局在するがん抑制因子 Scrib と Dlg によって正確な分裂方向が決定されることを示した。さらに、上皮と平行な分裂方向が上皮構造の維持に必要であり、分裂方向の制御が異常な上皮間葉転換 (Epithelial-to-Mesenchymal Transition; EMT) を介した上皮の腫瘍化を抑制する働きがある、という生理的意義を明らかにした⁹。

われわれの発表に続いて、ショウジョウバエの包卵被膜上皮やニワトリ神経上皮においても Dlg が上皮と平行な分裂方向の制御に必要であることが報告された^{10,11}。さらに、Scrib や Dlg と相互作用をするがん抑制因子 Lgl や、がん抑制因子である Hippo 経路も分裂方向の制御に関わるという報告が相次いでなされ、生体上皮における上皮と平行な分裂方向の研究は活発に行なわれている¹²⁻¹⁴。これら研究成果は、がん抑制遺伝子をはじめとした上皮極性や成長制御に関与する分子が、生体上皮における細胞分裂方向の制御にも関与することを示唆している。本研究では、われわれが見出した「腫瘍抑制因子 Scrib と Dlg が制御する細胞分裂方向の仕組み」について、その分子メカニズムを体系的に明らかにし、分裂方向の異常が誘導する腫瘍形成への理解を深めることを目的とする。具体的には、細胞間結合部位に局在する Scrib と Dlg が、どのようにして分裂期の紡錘体を認識して細胞分裂方向を決定しているのか、その詳細な分子メカニズムの解明を試みた。

2. 方法

本研究でモデルとして使用したのはショウジョウバエの翅成虫原基（翅原基）である。これまで腫瘍抑制因子 *Scrib* および *Dlg* は上皮の頂底軸方向の極性を制御する仕組みが精力的に研究されてきた一方で、どのようにして細胞分裂方向の決定に関与しているのか、その分子メカニズムはほとんど明らかでない。*Scrib/Dlg* は分裂期も安定して細胞間結合部位に局在し、タンパク質相互作用に関与するドメインを複数もつ。本研究では、*Scrib/Dlg* が分裂期特異的なタンパク質複合体を形成している可能性を想定し、*Scrib/Dlg* と相互作用して分裂方向の制御に関わる因子の探索を（1）生化学的スクリーニングと（2）遺伝学的な手法を組み合わせで行う。さらに（3）因子の機能解析を行い、機能欠失体の腫瘍形成への影響までを調べる。

（1）では、ショウジョウバエ胚から内在性の *Dlg* 複合体を免疫沈降して回収したサンプルについて MudPIT を用いたプロテオミクス解析を行った。（2）においては、（1）で明らかとなった候補因子に対して、翅原基特異的なノックダウン実験により候補因子の機能を解析した。免疫染色法により、分裂期スピンドルを標識して分裂期細胞の分裂方向を画像から測定した(Fiji/Image J 使用)。（3）では、同定した因子のノックダウン系統や変異体を使用して、分裂期スピンドルへの影響を同様に測定し、さらに分裂方向異常を示した細胞の運命を調べた。またライブイメージング解析には翅原基の組織外培養法 (*ex vivo culture*) を使用した。

3. 結果・研究成果

まず、われわれの先行研究⁹で明らかにした分裂方向を制御する腫瘍抑制因子 *Scrib*, *Dlg* そして分裂期スピンドルの制御因子 *Mud* の関係性について解析した。*Scrib* と *Dlg* は無脊椎動物のセプタイトジャンクション（注：脊椎動物のタイトジャンクションに機能的に相当する）に局在しており、互いに局在を制御し合っていることが機能欠失実験より確認できた。また *Mud* の細胞皮質への局在には *Scrib/Dlg* が必要であることが明らかとなった。さらに分裂期スピンドルの動態をライブイメージングにより解析したところ、*scrib*, *dlg* あるいは *mud* のノックダウンによる機能阻害は、それぞれ同様にスピンドル方向の決定がランダムになった。以上の結果から、これら因子が協調して分裂方向の決定に寄与していることが示唆された。

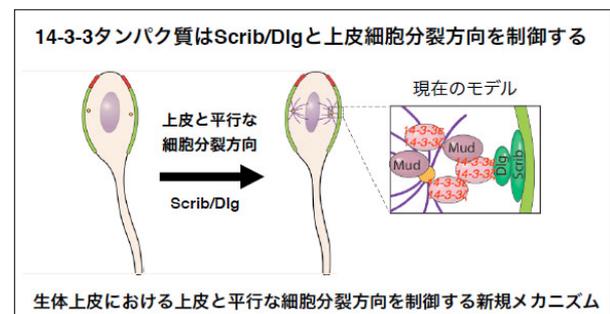
次に細胞間結合部位に局在する *Scrib/Dlg* と *Mud* をリンクする分子の探索をプロテオミクス解析により行った。*Dlg* と相互作用する因子を想定して、ショウジョウバエ胚から内在性の *Dlg* 複合体を *Dlg* 抗体を使用した免疫沈降を行って回収した。*Dlg* 複合体について MudPIT を用いたプロテオミクス解析を行ったところ、約 200 の候補因子が確認された。その中で 14-3-3 タンパク質が繰り返し観察された。ショウジョウバエには 2つの 14-3-3 タンパク質のアイソフォームがあり (14-3-3 ϵ /14-3-3 ζ)、細胞周期や極性、シグナル伝達などに機能することが知られている。14-3-3 タンパク質の細胞分裂方向の制御への関与については、培養細胞において示唆されているものの、生体内での細胞分裂方向への関与は不明であった。

そこでまず、14-3-3 タンパク質が翅原基で *Dlg* と相互作用することを共免疫沈降実験により確認した。14-3-3 タンパク質の局在を抗体やプロテイントラップシステムを用いて調べたところ、細胞皮質と分裂期スピンドルに局在する様子を見せたことから、分裂方向への関与が期待された。実際、14-3-3 ϵ 変異体クローンを作成して上皮と平行な細胞分裂方向を解析したところ、約 20%の細胞において細胞分裂方向が異常になることがわかった。さらにもう1つのアイソフォームである 14-3-3 ζ の機能阻害を 14-3-3 ϵ 変異体バックグラウンドで行ったところ (14-3-3 ϵ 変異体における 14-3-3 ζ の RNAi によるノックダウン)、約半数近くの分裂期細胞において分裂方向の顕著な異常がみられた。興味深いことに、14-3-3 ϵ は *scrib* や *mud* 遺伝子とも遺伝学的な相互作用を示したことから、14-3-3 タンパク質が、*Scrib/Dlg* および *Mud* と同じ経路で細胞分裂方向の制御に関与していることが示唆された (図)。

それでは、14-3-3 タンパク質の機能阻害は分裂方向の異常を介した EMT や腫瘍化につながるのだろうか。われわれの先行研究⁹では、細胞分裂方向の異常は上皮からの細胞脱落と基底側でのアポトーシスを示したが、同様の表現型は 14-3-3 の機能阻害下 (14-3-3 ϵ /14-3-3 ζ の阻害) でも確認された。さらにアポトーシスの阻害下では 14-3-3 変異体クローンは EMT 様の表現型も示した。以上の結果より、14-3-3 タンパク質は翅原基において、上皮と平行な細胞分裂方向の制御に必要であることが明らかとなった。

4. 考察・まとめ

これまでに 14-3-3 タンパク質が生体内上皮における細胞分裂方向を制御するという知見はなく、腫瘍抑制因子 *Scrib* および *Dlg* と協調して細胞分裂方向を制御する新規のメカニズムであると考えられる (図)。翅原基においては、進化的に保存された分裂制御因子の1つである Pins (脊椎動物の LGN オーソログ) が細胞分裂方向の制御に必要でないことが示唆されており¹⁵ (申請者未発表データ)、上皮と平行な細胞分裂方向が Pins 非依存的にどのように決定されているかが注目されていた。今回の研究成果は、上皮と平行な細胞分裂方向の制御メカニズムは進化的に共通した分子である *Dlg* や *Mud* と、組織や細胞ごとに特異的に働く分子と考えられる 14-3-3 を採用することで多様性をもっていることも示唆していると考えられる。14-3-3 タンパク質が、ほ乳類を含めた他の動物組織においても分裂方向の制御に関係するのか、そして腫瘍化を含めた病態への寄与があるのか、今後解明されることが期待される。



謝辞

本研究にご支援を賜りました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に深く感謝申し上げます。

5. 発表論文、参考文献

発表論文

Kawamoto Y, **Nakajima YI**, *Kuranaga E. Apoptosis in Cellular Society: Communication between Apoptotic Cells and Their Neighbors. *Int J Mol Sci* 2016, 17(12).

***Nakajima YI**, *Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell Death Differ* 2017, 24(8): 1422-1430.

(*はcorresponding author)

なお、本研究の直接の成果は申請者を筆頭著者とした論文として現在投稿準備中である。

参考文献

1. Noatynska A, Gotta M, Meraldi P. Mitotic spindle (DIS)orientation and DISease: cause or consequence? *J Cell Biol* 2012, 199(7): 1025-1035.
2. Pease JC, Tirnauer JS. Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. *J Cell Sci* 2011, 124(Pt 7): 1007-1016.
3. Siller KH, Doe CQ. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat Cell Biol* 2009, 11(4): 365-374.
4. Morin X, Bellaiche Y. Mitotic spindle orientation in asymmetric and symmetric cell divisions during animal development. *Dev Cell* 2011, 21(1): 102-119.
5. Reinsch S, Karsenti E. Orientation of spindle axis and distribution of plasma membrane proteins during cell division in polarized MDCKII cells. *J Cell Biol* 1994, 126(6): 1509-1526.
6. den Elzen N, BATTERY CV, Maddugoda MP, Ren G, Yap AS. Cadherin adhesion receptors orient the mitotic spindle during symmetric cell division in mammalian epithelia. *Mol Biol Cell* 2009, 20(16): 3740-3750.
7. Jaffe AB, Kaji N, Durgan J, Hall A. Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J Cell Biol* 2008, 183(4): 625-633.
8. McCaffrey LM, Macara IG. Epithelial organization, cell polarity and tumorigenesis. *Trends Cell Biol* 2011, 21(12): 727-735.
9. Nakajima Y, Meyer EJ, Kroesen A, McKinney SA, Gibson MC. Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation. *Nature* 2013, 500(7462): 359-362.
10. Bergstralh DT, Lovegrove HE, St Johnston D. Discs large links spindle orientation to apical-basal polarity in *Drosophila* epithelia. *Curr Biol* 2013, 23(17): 1707-1712.
11. Saadaoui M, Machicoane M, di Pietro F, Etoc F, Echard A, Morin X. Dlg1 controls planar spindle orientation in the neuroepithelium through direct interaction with LGN. *J Cell Biol* 2014, 206(6): 707-717.
12. Bell GP, Fletcher GC, Brain R, Thompson BJ. Aurora kinases phosphorylate Lgl to induce mitotic spindle orientation in *Drosophila* epithelia. *Curr Biol* 2015, 25(1): 61-68.
13. Carvalho CA, Moreira S, Ventura G, Sunkel CE, Morais-de-Sa E. Aurora A triggers Lgl cortical release during symmetric division to control planar spindle orientation. *Curr Biol* 2015, 25(1): 53-60.
14. Dewey EB, Sanchez D, Johnston CA. Warts phosphorylates Mud to promote Pins-mediated mitotic spindle orientation in *Drosophila*, independent of Yorkie. *Curr Biol* 2015, 25(21): 2751-2762.
15. Bergstralh DT, Lovegrove HE, Kujawiak I, Dawney NS, Zhu J, Cooper S, *et al*. Pins is not required for spindle orientation in the *Drosophila* wing disc. *Development* 2016, 143(14): 2573-2581.