

45. 腫瘍形成最初期における組織統合性の破綻

田守 洋一郎

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 構造遺伝学研究センター 遺伝子回路研究室

Key words : 腫瘍形成, 上皮組織, 癌抑制遺伝子, ショウジョウバエ

緒言

これまでの癌生物学研究の長い歴史の中で、悪性新生物の組織学的特徴は詳細に記述され、その原因となる遺伝学的バックグラウンド、特に癌の進行に関与する癌遺伝子や癌抑制遺伝子ならびに関連するシグナル経路の変異に関しては膨大な知識が蓄積されてきた¹⁾。これらから、腫瘍形成は正常な上皮組織に出現した変異細胞に端を発するとの共通理解が得られているが、始めに出現した前癌細胞がどのようにして上皮組織の協調的統合性の制御下から逃れて過増殖を開始するのかという、実際の生体内における腫瘍形成最初期の細胞学的事象は未だによく解っていない。その一方で近年の研究から、細胞競合と呼ばれる細胞間の生存競合現象が、正常上皮組織に出現した前癌細胞の運命に深く関わっていることが分かってきた。つまり、正常上皮細胞に囲まれた前癌細胞は、この細胞競合によって上皮組織から除去されるのである²⁾。代表的なものとして、進化的に保存されている新生癌抑制遺伝子 (neoplastic tumor suppressor genes, nTSG) の変異細胞は、正常細胞に囲まれるとアポトーシスを起こし、上皮層から押し出されて除去される事がショウジョウバエ翅原基及び哺乳類表皮由来培養細胞で確認されている³⁾。これに対し、我々はショウジョウバエ翅原基に出現した nTSG 変異細胞の挙動が部域によって異なる事を発見した (図 1A-C)。即ち、組織の大部分では正常細胞に囲まれた nTSG 変異細胞は基底側から押し出され細胞死を起こすが、同組織内の特定の部域 (近位ヒンジ部の一部) では、上皮層頂端側から抜け出して細胞死を起こす事無く増殖を開始する (図 1D-F)。その結果、腫瘍形成は必ずこの特定の部域で始まる事から、この部域を「腫瘍形成ホットスポット」、その他の通常腫瘍形成に至らない部域を「コールドスポット」と定義し、両部域の違いを詳細に解析する事により腫瘍形成の最初期過程を明らかにできると考えた。

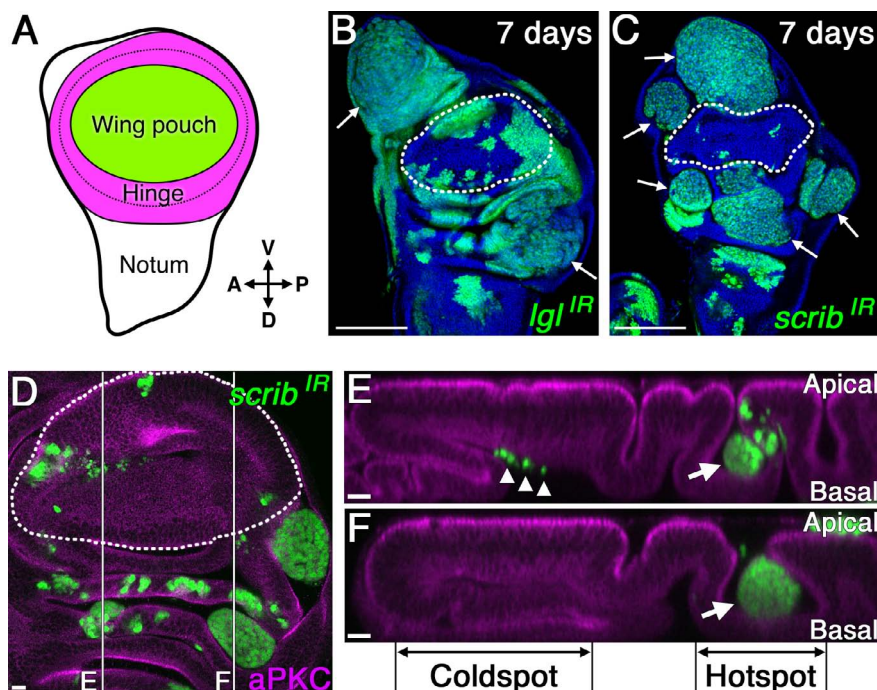


図1. ショウジョウバエ翅原基の腫瘍形成ホットスポット

A) ショウジョウバエ翅原基の模式図。グリーンの wing pouch はコールドスポット、マゼンタの hinge はホットスポットに対応する。B-C) 翅原基内に誘導した *Igl* (B) と *scrib* (C) のノックダウンモザイククローン (GFP)。RNAi 発現後7日目。青：DAPI による核染色。D) 翅原基内に誘導した *scrib* のノックダウンモザイククローン (GFP)。RNAi 発現後5日目。マゼンタ：aPKC 抗体による上皮頂端側染色。白点線：コールドスポット (wing pouch)。E-F) (D) の翅原基の白線上横断面。矢印：腫瘍組織。矢頭：アポトーシスを起こして基底側に押し出された細胞。スケールバー：100 μ m。

方法および結果

1. 腫瘍形成ホットスポットとコールドスポットの内在的な相違点

Igl (*lethal giant larvae*)、*scrib* (*scribble*) といった nTSG 変異細胞の上皮層から押し出される方向がホットスポットとコールドスポットでは逆になる原因が、両スポット間の内在的形態の違いにあるのではないかと考え、本研究の予備実験において、両スポットの内在的な細胞構造の違いを電子顕微鏡観察と細胞骨格関連蛋白質等の抗体染色によって調べたところ、以下のことが分かった。(1) コールドスポットでは微小管が頂端側に多く局在するのに対し、ホットスポットでは基底側に多く局在している。(2) Rho family small GTPases 活性化に関わる因子の一つ、RhoGEF2 (Rho guanine nucleotide exchange factor 2)⁴⁾ はコールドスポットの頂端側に多く局在するのに対し、ホットスポットではこの頂端側の局在が少ない。(3) 上皮細胞の形態が、コールドスポットでは背が高く頂底軸に沿った柱状であるのに対し、ホットスポットでは背が低く基底側で湾曲し複数の突起を伸ばすことにより複雑な細胞嵌合を形成している。以上の観察結果から、RhoGEF2 が上皮細胞内の微小管の局在極性と細胞形態の形成もしくは維持に関与している可能性を検証するために、RhoGEF2 に対する RNAi を用いてコールドスポットにおいて RhoGEF2 のノックダウンを行いその影響を解析した (図 2A-C)。その結果、通常のコールドスポットの細胞では頂端側に多く局在する微小管が、RhoGEF2 をノックダウンした細胞では基底側に多く局在することを発見した (図 2D-E)。また、細胞の形態も通常のコールドスポットのものより背が低くなりホットスポットのものに近い形態への変化が観察された。

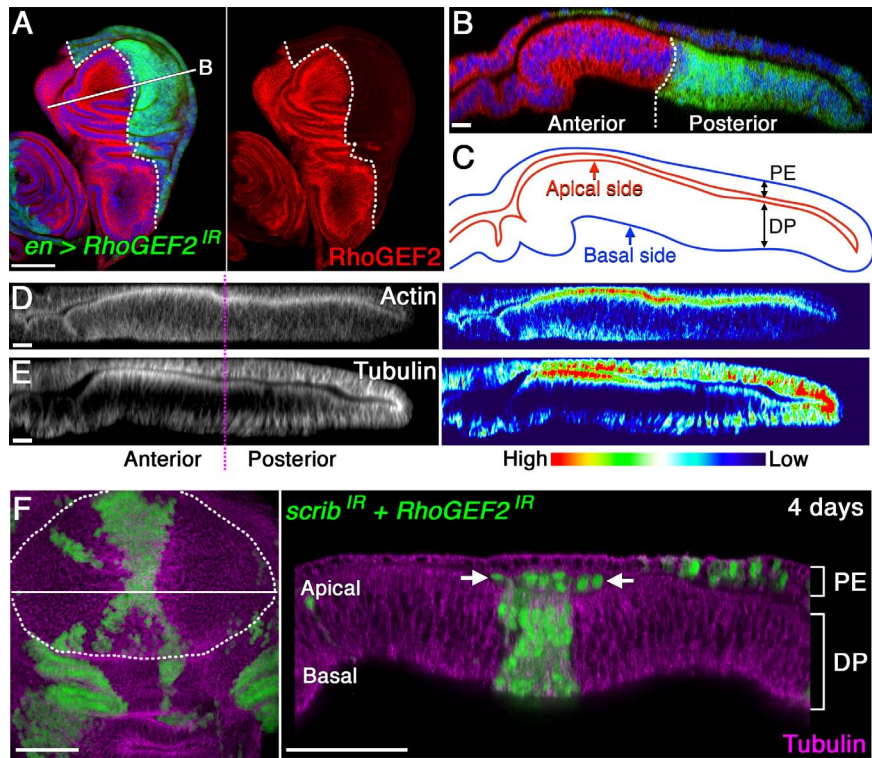


図2. RhoGEF2 ノックダウンによる nTSG 変異細胞の押し出し方向の逆転

A) *en-Gal4* ドライバーを用いた翅原基後方半分のみでの *RhoGEF2* ノックダウン (GFP)。白点線：前後コンパートメント境界。赤：RhoGEF2 の抗体染色。青：DAPI による核染色。B) (A) の翅原基の横断面。C) (B) の上皮層頂端側 (赤) と基底側 (青) のトレース。D-E) 後方半分のみで *RhoGEF2* をノックダウンした翅原基の横断面。Phalloidin による F-actin の染色 (D) と tubulin 抗体による微小管の染色 (E)。右パネル：左パネルのシグナルヒートマップ。F) 翅原基内に誘導した *scrib* と *RhoGEF2* のダブルノックダウンモザイククローン (GFP)。RNAi 発現後4日目。マゼンタ：tubulin 抗体による微小管の染色。白点線：コールドスポット (wing pouch)。右パネル：左パネル内翅原基の白線上横断面。矢印：頂端側に押し出されたクローン。PE: peripodial epithelium。DP: disc proper epithelium。スケールバー：(A) と (F) は $50\mu\text{m}$ (B-E) は $10\mu\text{m}$ 。

2. RhoGEF2 ノックダウンによる押し出し方向の逆転

RhoGEF2 のノックダウンによって、コールドスポットの細胞に部分的にホットスポット型の形態を誘導することができたことから、RhoGEF2 のノックダウンが nTSG 変異細胞の上皮層からの押し出しの方向を変更するのではないかと考えた。そこで、nTSG 変異細胞において RhoGEF2 をノックダウンしたところ、コールドスポットにおいてもホットスポットと同様に頂端側からの押し出しが観察された (図 2F)。このとき、コールドスポットで頂端側に押し出された nTSG 変異細胞は、アポトーシスを起こさなかったが、ホットスポットで見られるような過増殖は起こさなかった。以上のことから、ホットスポットにおける nTSG 変異細胞の頂端側からの逸脱にはホットスポット特異的な細胞形態が関与していることが分かったが、腫瘍形成開始には、頂端側からの逸脱以外にも何か別の要因が関与していると考えた。

3. 腫瘍形成開始に必要な JAK/STAT 経路の内在活性

一般的に腫瘍形成には、細胞増殖に関わるシグナル経路の活性が関与していると考えられる⁵⁾。ここでモデルとしているショウジョウバエ翅原基では、JAK/STAT (Janus kinase/signal transducer and activator of transcription) 経路の内在的な活性が近位ヒンジ部において高いことが報告されている⁶⁾。この JAK/STAT 経路の内在的な活性がホットスポットでの腫瘍形成に関与しているのかどうか調べるために、nTSG 変異細胞において STAT の発現を阻害したところ、腫瘍形成は抑制された (図 3A)。これとは逆に、nTSG 変異細胞において STAT の活性化フォームを強

発現させて JAK/STAT 経路を異所的に活性化させると、ホットスポットにおいて nTSG 変異細胞の腫瘍形成はより早い時期から観察され、腫瘍成長の促進が認められた (図 3B)。しかしながらこれらの細胞は、コールドスポットでは依然基底側から押し出されてアポトーシスを起こしており、腫瘍形成には至ることがなかった。以上のことから、ホットスポットにおける nTSG 変異細胞の腫瘍形成開始には、頂端側からの逸脱と JAK/STAT 経路の内在的な活性の両方が同時に必要であると考えた。そこで、nTSG 変異細胞において RhoGEF2 のノックダウンと STAT 活性化フォームの強発現を同時に誘導したところ、コールドスポットにおいて頂端側から逸脱した nTSG 変異細胞の腫瘍形成が観察された (図 3C)。

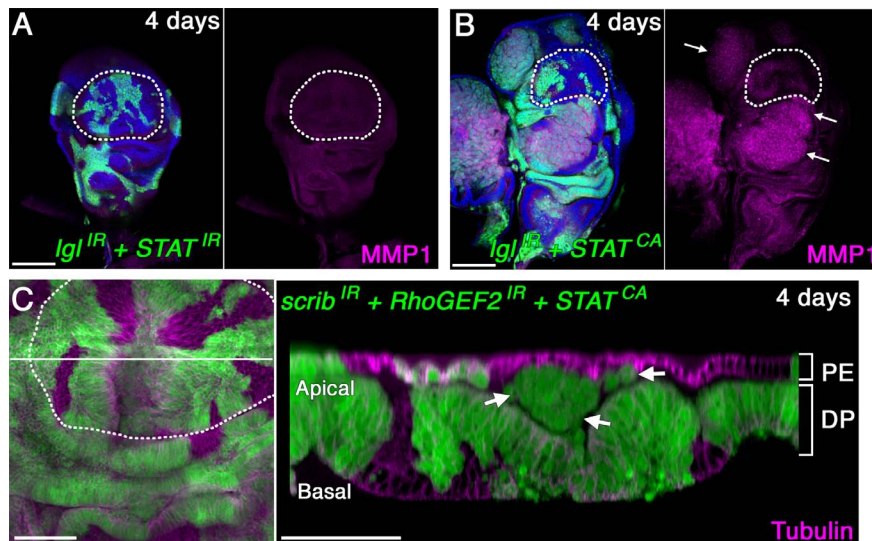


図 3. 腫瘍形成開始に必要な JAK/STAT 経路の内在活性

A) 翅原基内に誘導した *Igl* と *STAT* のダブルノックダウンモザイククローン (GFP)。RNAi 発現後 4 日目。
 B) 翅原基内に誘導した *Igl-RNAi* と *STAT* 活性化フォーム両方を強制発現したモザイククローン (GFP)。強制発現後 4 日目。マゼンタ: MMP1 の抗体染色。白点線: コールドスポット (wing pouch)。矢印: 腫瘍組織。
 C) 翅原基内に誘導した *scrib-RNAi* と *RhoGEF2-RNAi* と *STAT* 活性化フォームを強制発現したモザイククローン (GFP)。RNAi 発現後 4 日目。マゼンタ: tubulin 抗体による微小管の染色。白点線: コールドスポット (wing pouch)。右パネル: 左パネル内翅原基の白線上横断面。矢印: 腫瘍形成。PE: peripodial epithelium。DP: disc proper epithelium。スケールバー: (A-B) は 100 μm、(C) は 10 μm。

考 察

ショウジョウバエの翅原基上皮組織をモデルにした本研究によって、頂端極性が乱された nTSG 変異細胞のような前癌細胞は、通常は細胞競合によって上皮組織から除去されているが、同一上皮組織内でも特異な細胞構造を持つ部域 (ホットスポット) では腫瘍形成に至ることが示された。さらに一連の実験結果から、このホットスポットにおける nTSG 変異細胞の上皮層頂端側からの逸脱と、内在性の JAK/STAT 経路の活性化が、腫瘍形成の開始を引き起こす二つの要因であることを発見した⁷⁾。

同じ上皮組織内でも、前癌細胞が除去される部域と腫瘍形成に至る部域が存在するという事実はこれまでに報告されておらず、ここで示す「腫瘍形成ホットスポット」という概念は、今まで癌生物学にはなかった新しい考え方である。ヒトの上皮組織において、異形成はしばしば移行上皮の境界付近に観察されるという記述は古典的な腫瘍病理学において見つけることができるが⁸⁾、これがこのホットスポットと同様のものかどうかは今後の研究結果が待たれる。ヒト乳腺細胞の三次元培養において、前癌細胞が上皮層頂端側から抜け出すことにより管腔側で腫瘍形成を起こすこと⁹⁾、JAK/STAT のような炎症性シグナル経路に関わる慢性炎症と癌化との関連性¹⁰⁾、そして進化的によく保存されている上皮細胞の形態等を考え合わせると、上皮組織における腫瘍形成は一般的に腫瘍形成ホットスポットから本研究で示されたようなプロセスで生じている可能性が高いと考えられるだろう。

文 献

- 1) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–674. PMID: 21376230
- 2) Tamori Y, Deng W-M. Cell competition and its implications for development and cancer. *Journal of Genetics and Genomics*. 2011 Oct 20;38(10):483–495. PMID: PMC3891807
- 3) Tamori Y, Bialucha CU, Tian A-G, Kajita M, Huang Y-C, Norman M, Harrison N, Poulton J, Ivanovitch K, Disch L, Liu T, Deng W-M, Fujita Y. Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition. *PLoS Biol*. 2010;8(7):e1000422. PMID: PMC2903597
- 4) Barrett K, Leptin M, Settleman J. The Rho GTPase and a Putative RhoGEF Mediate a Signaling Pathway for the Cell Shape Changes in *Drosophila* Gastrulation. *Cell*. 1997 Dec;91(7):905–915.
- 5) Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for Growth Factors in Cancer Progression. *Physiology*. 2010 Apr 29;25(2):85–101.
- 6) Ayala-Camargo A, Anderson AM, Amoyel M, Rodrigues AB, Sol Flaherty M, Flaherty MS, Bach EA. JAK/STAT signaling is required for hinge growth and patterning in the *Drosophila* wing disc. *Dev Biol*. 2013 Oct 15;382(2):413–426. PMID: PMC3795806
- 7) Tamori Y, Suzuki E, Deng W-M. Epithelial tumors originate in tumor hotspots, a tissue-intrinsic microenvironment. *PLoS Biol*. 2016 Sep 1;14(9):e1002537. PMID: 27584724
- 8) Mcnairn AJ, Guasch G. Epithelial transition zones: merging microenvironments, niches, and cellular transformation. *Eur J Dermatol*. 2011 May;21 Suppl 2:21–28. PMID: 21628126
- 9) Leung CT, Brugge JS. Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature*. 2012 Feb 16;482(7385):410–413. PMID: 22318515
- 10) Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*. 2009 Nov;9(11):798–809. PMID: 19851315