

117. 上皮細胞の細胞接着・細胞極性形成機構の統合的解析

池ノ内 順一

九州大学 大学院理学研究院 生物科学部門 代謝生理学教室

Key words : 上皮細胞, 浸潤癌, プレブ

緒言

上皮細胞が互いの細胞接着を喪失し遊走能を獲得した結果、浸潤癌になる過程は癌の悪性を考える上で重要なステップである。研究の過程で、大腸がん由来の上皮細胞 DLD1 細胞は通常のプラスチックシャーレに播種したときには安定的な細胞接着を示すのに対して、Type1 コラーゲンのゲル中に播種した場合、細胞の接着が崩壊し特徴的な細胞の形態を示すことに気付いた。詳細にその形態を観察した結果、プレブと呼ばれる細胞膜の突出構造を形成していることが明らかになった。さらにプレブを起こした細胞は、細胞外マトリックス内を遊走する能力を示すことを見出した。プレブの形成退縮の分子機構はこれまでの研究でほとんど明らかになっていない。本研究において、DLD1 細胞の実験系を用いて、プレブの形成退縮に関わる分子機構の解明を目指して研究を行った。

方法

形質膜は常にアクチン細胞骨格によって裏打ちされている。何らかの要因により、形質膜がアクチン細胞骨格の裏打ちから解離すると、形質膜は細胞内圧により膨張し、アクチンの裏打ちを持たない形質膜の球状の突起構造、プレブが形成される。一旦プレブが形成されると、プレブは拡大を続けるが、形質膜直下にアクチン細胞骨格が急速に再集積し、プレブの拡大は停止する。その後、ミオシンが形質膜直下に集積し、アクトミオシンの収縮によってプレブは退縮に転じる。

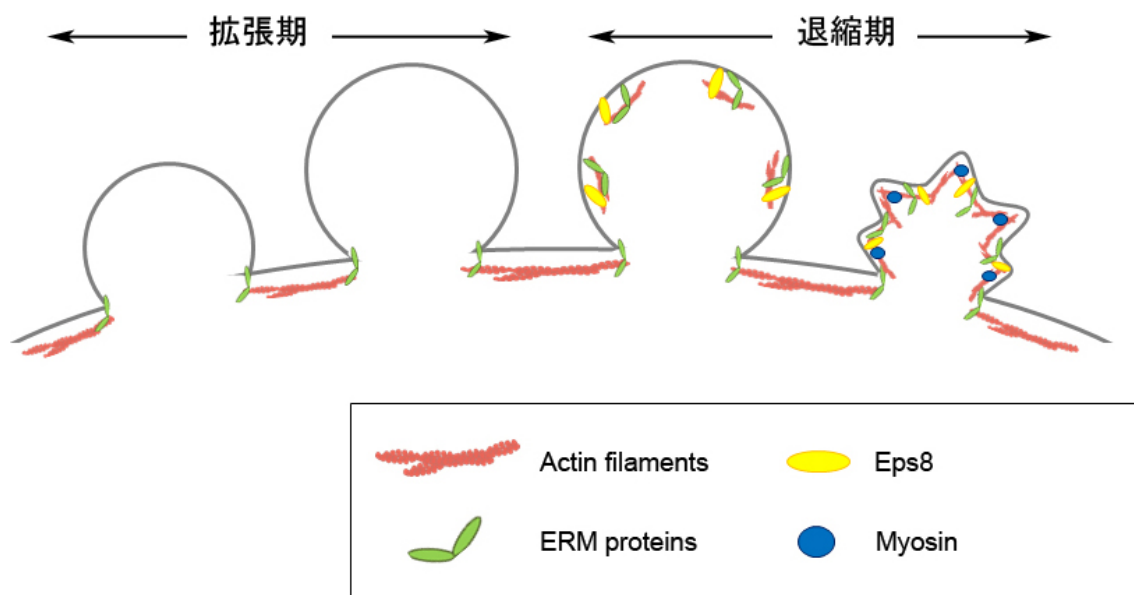


図1. プレブの形成・退縮のサイクル
プレブの形成・退縮のサイクルの模式図。

ブレブの形成・退縮過程は一見シンプルではあるが、例えば、どのようにしてアクチン細胞骨格の再集積が誘導されて、ブレブが拡大から退縮に転じるのかなど、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない¹⁾。近年になり、癌細胞が遊走する過程でこのブレブを利用しているという報告がなされている²⁾。

私はヒト大腸がん由来の培養上皮細胞株である DLD1 細胞を用いて細胞接着機構の実験していたところ、コラーゲンゲル中に DLD1 細胞を播種すると、細胞接着構造が破綻し、ブレブを形成して細胞遊走能を獲得することに気付いた。この現象に着目して、DLD1 細胞に GFP タグのついた遺伝子ライブラリーを導入して、ブレブの形成・退縮過程における GFP タンパク質の挙動をライブイメージング観察し、ブレブの形成退縮に関わる分子ネットワークの解明を行った³⁾。

結 果

DLD1 細胞に一過性に発現させた GFP タグ付きの遺伝子の中で、ブレブの退縮時にリクルートされる分子として、アクチンのキャッピングタンパク質である Eps8、及び、形質膜とアクチン細胞骨格を繋ぐ Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) ファミリータンパク質の 1 つ Ezrin を同定した。Ezrin の発現を消失させた DLD1 細胞 (Ezrin KO 細胞) を作出したところ、Eps8 が形質膜へリクルートされず、ブレブの退縮に必要なアクチンの再集積が顕著に遅延し、その結果、ブレブが大型化する表現型が観察された。また Ezrin KO 細胞はブレブの退縮時のアクチンの再集積が遅延しブレブの退縮にかかる時間が大幅に増えるため、細胞の運動能が低下することがわかった。

Ezrin が形質膜とアクチン細胞骨格の双方に結合するためには、リン酸化を受けて Open 型への構造変化が必要であることが知られている。Ezrin KO 細胞の表現型は、野生型の Ezrin を導入することにより回復したが、Ezrin の構造変化に重要なリン酸化部位である 567 番目のスレオニンをアラニンに置換した変異体では回復しなかった。このため、ブレブの退縮期には Ezrin のリン酸化が起こっていることが予想された。先行研究に於いて、Ezrin は Rho キナーゼ (ROCK) によりリン酸化を受けることが知られている。そこで、ブレブの退縮において RhoA-ROCK 経路が関与するのではないかと考えた。GFP タグを付けた ROCK1 はブレブ退縮時に形質膜上に集積することが明らかになった。また、RhoA のエフェクター分子の 1 つである Anillin に存在する GTP 型 RhoA に特異的に結合するドメイン (Anillin Homology domain) に GFP タグをつけて、GTP 型 RhoA の局在を観察したところ、Rho-GTP もまたブレブ退縮時に形質膜にリクルートされる様子が観察された。

ブレブ退縮時には RhoA-ROCK 経路が活性化するメカニズムとして、2 つの可能性を考えた。1 つ目は、ブレブの退縮時に RhoGEF がブレブ形質膜上にリクルートされ、RhoA を活性化させるという可能性である。もう一つの可能性として、ブレブ拡大時に RhoGAP が形質膜上に集積し RhoA の活性を抑えている可能性である。検討の結果、RhoGAP の 1 つである p190BRhoGAP がブレブ拡大時は形質膜に局在しており、ブレブ退縮時にはその形質膜における局在が失われていくことが分かった。p190BRhoGAP の活性化因子として、低分子量 G タンパク質の一つ Rnd3 (RhoE とも呼ばれる) が報告されている。Rnd3 は常時 GTP 型をとる低分子量 G タンパク質であり、p190BRhoGAP の活性化を介して RhoA に対して拮抗的に働くことが報告されている。そこでブレブの形成退縮過程における Rnd3 の局在の変化を観察した。その結果、Rnd3 はブレブ拡大時に形質膜に局在する一方、アクチン細胞骨格が再集積しブレブが退縮に転じると形質膜から排除されることが分かった。

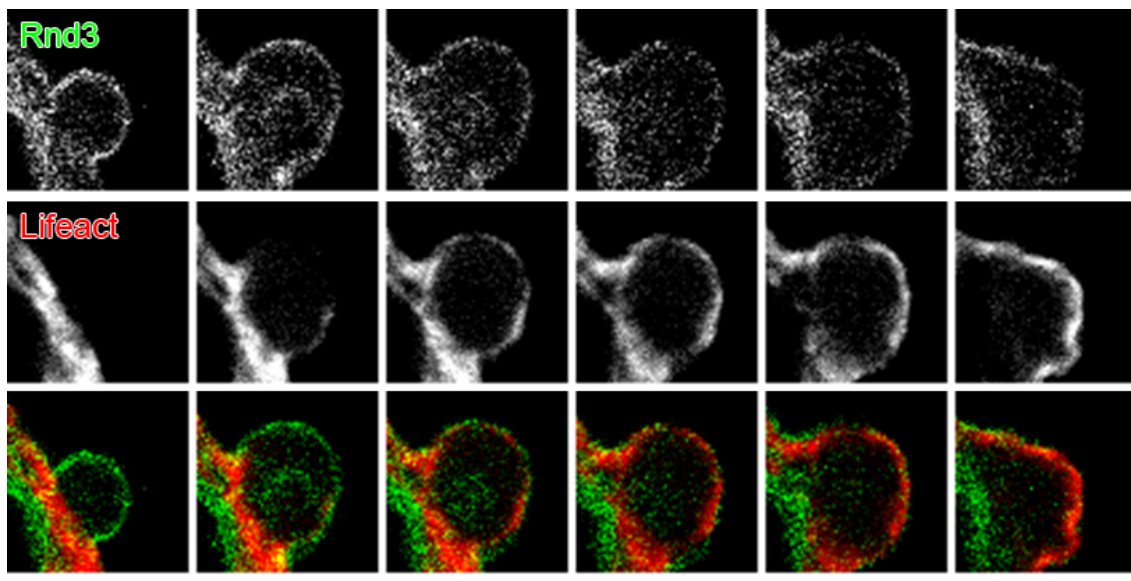


図2. ブレブの形成・退縮における Rnd3 の局在の変化

一つのブレブにおける形成・退縮の過程での Rnd3 の分布とアクチン細胞骨格の分布 (Lifeact を用いて可視化) を示す。スケールバーは $2\mu\text{m}$ 。図の左からブレブの形成が始まり、右に行くにつれて退縮に転じる。アクチン細胞骨格の再集積に伴って Rnd3 の分布が消失している。

Rnd3 は ROCK1 によってセリン 240 番目がリン酸化されると、14-3-3 に結合するようになり形質膜から排除されることが知られている⁴⁾。セリン 240 番目をアラニンに変異した Rnd3 は、ROCK による負の制御を受けないため、常時形質膜に局在する。この常時活性化型変異体 Rnd3 S240A を導入した DLD1 細胞では、Ezrin KO 細胞と同様、Eps8 が形質膜へリクルートされず、アクチン細胞骨格の再集積が大幅に遅延し、ブレブの退縮速度が低下した。

以上の結果から、ブレブの形成・退縮は以下のような分子機構で起こっているのではないかと考えられる。

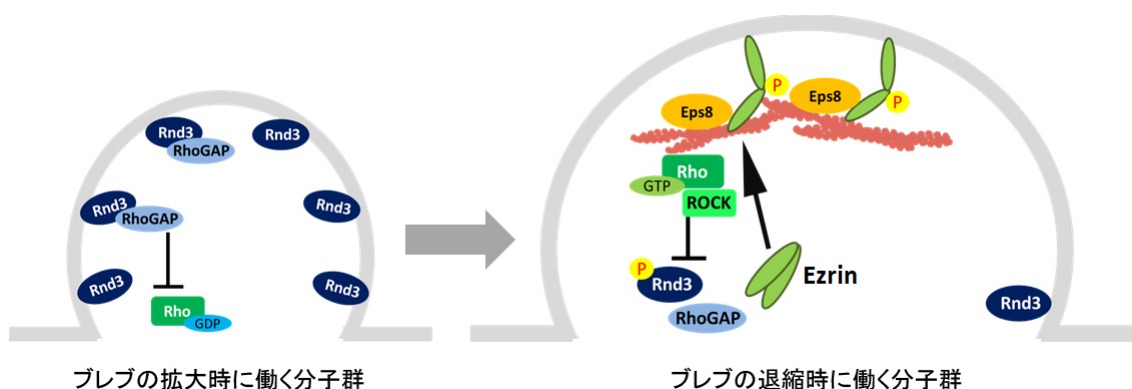


図3. ブレブの形成退縮の分子機構

ブレブの形成・退縮に関わる分子メカニズムに関する現在のモデル。

まず、ブレブの形成の初期段階には、アクチン細胞骨格に裏打ちされない細胞膜領域が形成され、そこに低分子量 G タンパク質の Rnd3 が特異的に集積する。Rnd3 は p190RhoGAP-B を活性化して、RhoA の活性化を抑制する。やがて、ブレブが拡大するにつれて、Rnd3 の細胞膜上の分布密度が低下する。この状況で、RhoA が一部の領域で散発的に活性化されて RhoA により ROCK が活性化されると、ROCK が Rnd3 をリン酸化して形質膜から Rnd3 を排除する。すなわち、ひとたび RhoA が活性化すると Rnd3 による RhoA の阻害効果が失われるため、一気に RhoA の活性化が

引き起こされる。RhoA の活性化は Eps8 や Ezrin といったアクチン細胞骨格の再集積を促進する因子を活性化して、アクチン細胞骨格の再形成と細胞膜とアクチン細胞骨格の安定的な接着を回復させる。細胞膜とアクチン細胞骨格の安定的な接着の回復によりブレブの退縮が起こる。このような Rnd3 と RhoA の相互に抑制し合う分子ネットワークによってブレブの拡張期と退縮期が形成されているという結論を得た。

考 察

上記のとおり、本研究において、私は上皮細胞の遊走能獲得機構としてのブレブに着目して、その分子機構の解明を行った。2015年に、マウスを用いて人為的に誘導した膵臓がんおよび肺がんにおいて、上皮間葉転換 (EMT) のマスター転写因子 (Snail や Twist) の発現を消失させた場合においても、癌の浸潤や転移能が失われないという報告がなされた⁵⁾。このことは癌の転移や浸潤に EMT が必ずしも必要でない場合が存在することを意味している。私たちは、そのような EMT 非依存的な細胞接着の破綻・細胞運動能の獲得機構として、ブレブを介した細胞運動が本体ではないかと考えており、引き続きブレブを介した浸潤癌の移動メカニズムに関する研究を進めている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、九州大学システム情報科学研究所の内田誠一教授である。

文 献

- 1) Charras G, Paluch E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 9(9):730-6. doi: 10.1038/nrm2453. PMID:18628785
- 2) Liu YJ, Le Berre M, Lautenschlaeger F, Maiuri P, Callan-Jones A, Heuze M, Takaki T, Voituriez R, Piel M. Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells. *Cell.* 2015 160(4): 659-72. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.007. PMID:25679760
- 3) Aoki K, Maeda F, Nagasako T, Mochizuki Y, Uchida S, Ikenouchi J. A RhoA and Rnd3 cycle regulates actin reassembly during membrane blebbing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 113(13):E1863-71. doi: 10.1073/pnas.1600968113. PMID:26976596
- 4) Riou P, Kjaer S, Garg R, Purkiss A, George R, Cain RJ, Bineva G, Reymond N, McColl B, Thompson AJ, et al. 14-3-3 proteins interact with a hybrid prenyl-phosphorylation motif to inhibit G proteins. *Cell.* 2013 153(3):640-53. doi: 10.1016/j.cell.2013.03.044. PMID:23622247
- 5) Zheng X, Carstens JL, Kim J, Scheible M, Kaye J, Sugimoto H, Wu CC, LeBleu VS, Kalluri R. Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature.* 2015 527(7579):525-30. doi: 10.1038/nature16064. PMID:26560028