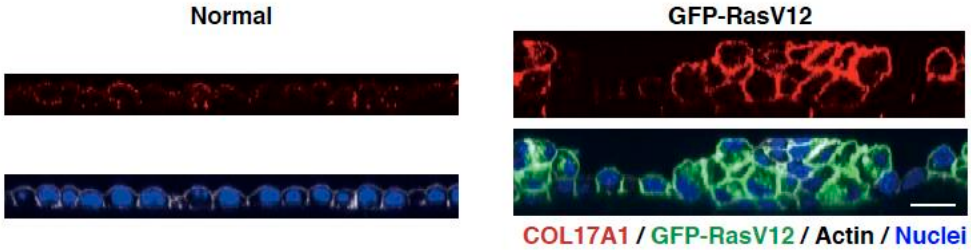
50　細胞競合を制御する膜タンパク質の同定	藤田　恭之

【目的】単層上皮のがん化の初期の段階で多層化現象が起こることは広く知られているが、がん原性の変異がどのような分子メカニズムで多層化を生じるかについては、多くが謎として残されていた。本研究において我々は、Collagen 17A1（COL17A1）と CD44 が多層化現象に機能的に関与する重要な分子であることを突き止めた。研究成果は上原記念生命科学財団への謝辞とともに Current Biology 誌にアクセプトされた。

【方法】新規上皮制御因子の同定のために、ファージディスプレイスクリーニングを行なった。ライブラリには 10^{11}～10^{13}種類の多様なファージ抗体を含んでおり、この中から細胞パンニングと呼ばれる操作により、変異細胞に特異的に結合するものを選別した。まず正常細胞の単一培養下の細胞にファージライブラリを反応させ、これらに結合するファージをライブラリから取り除いた。その後、正常細胞と変異細胞の共培養下の細胞に残りのファージを反応させ、結合したファージを溶出し、大腸菌に感染させて増幅させた。その後、単離されたファージクローンのもつ抗体を用いて正常・変異細胞の共培養下で網羅的に免疫染色を行い、ハイスループットイメージングにより、正常細胞と変異細胞の境界部位に特異的な染色を示す抗体を同定した。

【結果】正常 MDCK 細胞と RasV12 発現 MDCK 細胞を用いてファージディスプレイスクリーニングを行い、RasV12 変異細胞を特異的に認識するファージ抗体を同定することに成功した。この抗体を用いて免疫沈降を行った結果、エピトープ分子が COL17A1 であることが分かった。またファージディスプレイスクリーニング以外にも、Cell Surface Marker Screening Panel を用いたスクリーニングを行い、RasV12 発現によって形質膜への集積が亢進する膜タンパク質として CD44 を同定した。COL17A1 と CD44 の発現上昇と形質膜への集積が RasV12 の発現だけではなく、Src や ErbB2 によっても誘起することを見出した。さらに、COL17A1、CD44 の両者ともに、多層化した変異細胞層の上層部の細胞間接着部位に強く集積することが分かった（下図）。また、膵管上皮特異的に *K-Ras* と *p53* の変異を誘導する KPC マウスの膵臓で多層化した前がん病変について組織免疫染色を行ったところ、COL17A1、CD44 ともに形質膜への集積が観察された。続いて、COL17A1 と CD44 が実際に多層化現象に機能的に関与しているかを調べるために、それらのノックダウン、あるいはノックアウトが変異上皮細胞の多層化にどのような影響を与えるかを調べた。すると COL17A1、CD44 の発現低下によって、変異細胞の多層化が強く抑制されることが分かった。これらのデータは、COL17A1 と CD44 ががん化の初期に生じる単層上皮の多層化現象を制御する重要な因子であることを示している。さらに、CD44 ノックダウンによって COL17A1 の集積が抑制されることから、CD44 が COL17A1 の集積を制御していることも明らかになった。今回の我々の研究によって、上皮多層化のプロセスに COL17A1 と CD44 が重要な役割を果たしていることが明らかになった。これらの研究成果は、COL17A1 と CD44 が上皮の多層化というこれまでがん診断・治療の対象になっていなかったプロセスの標的分子となる可能性を示している。

多層化した RasV12 変異上皮細胞層の上層部の細胞間接着に集積する COL17A1