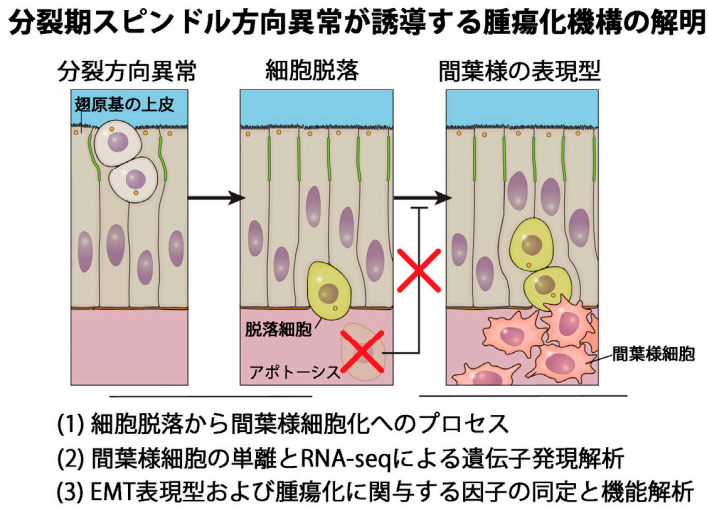
148　分裂期スピンドル方向異常が誘導する腫瘍化機構の解明	中嶋　悠一朗

【目的】ヒトのがんの約 9 割は上皮組織に由来する。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、上皮構造の破綻が広く観察される。また悪性化した腫瘍は上皮間葉転換（EMT）を経て上皮性を失い、間葉様の表現型を示す。がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異に注目した研究が精力的に行われてきた一方で、どのような異常細胞の振る舞いによって上皮構造の破綻が誘導され、腫瘍化が進行するのか、腫瘍形成の段階的な発生の仕組みの多くは未だ不明である。上皮細胞は通常、上皮シートに対して平行な細胞分裂を行う。細胞分裂時に形成される分裂期スピンドルの方向は、細胞分裂方向と一致しており、発生や恒常性維持の過程において厳密に制御されており、その異常は腫瘍形成やがんなどの病態への関与が示唆されている。しかしながら、生体内上皮において分裂期スピンドル方向に注目した研究は少なく、上皮と平行な分裂期スピンドル方向の生理的意義は明らかでなかった。本研究では遺伝学的ツールが豊富で、単純な上皮構造をもつショウジョウバエ翅成虫原基をモデルとして、分裂期スピンドル方向の異常が誘導する EMT および腫瘍形成メカニズムの解明を目指す。

【方法】本研究では分裂期スピンドル方向の異常が誘導する EMT の分子および細胞レベルの特徴を明らかにするために、1. 分裂期スピンドル方向の異常を示す細胞の振る舞いを細胞生物学的に明らかにするアプローチ、そして 2. 上皮から間葉細胞への変化に伴うゲノムワイドな遺伝子発現変化を RNA-seq 解析で明らかにする。また 3. 間葉様細胞で変化がみられる遺伝子発現を遺伝学的に操作し、EMT 形質の獲得および腫瘍化に必要な因子やシグナルを明らかにすることまでを試みた（図）。

【結果】分裂方向の異常は上皮性の喪失に先行していること、そして間葉系マーカーの発現が基底側に脱落した細胞において観察された。また EMT に伴う遺伝子発現変化を RNA-seq 解析した結果、翅原基の運命を失い、ストレスシグナル経路やサイトカイン、EMT 転写因子の発現といった間葉様細胞に特徴的な分子ダイナミクスが明らかとなった。さらに遺伝学的なアプローチによって JNK 経路や Yki 遺伝子が EMT 表現型の誘導に必要であることが示唆され、EMT 転写因子の発現によっても分裂期スピンドル方向の異常を伴う EMT 効果が観察された。これらの結果は、分裂期スピンドル方向の異常で誘導される EMT において、分裂期スピンドル方向の異常を起点としたメカニカルシグナルやストレスシグナルの関与や転写因子を介したフィードバックの仕組みが EMT 形質の獲得に寄与する可能性を示唆する。EMT は腫瘍の悪性化の様々な段階に関与することを考慮すると、上皮の分裂期スピンドル方向の異常が誘導する腫瘍の発生を体系的に明らかにすることは、ヒトにおける腫瘍発症機序の理解の向上につながると考えられる。

本研究計画が扱う現象の概念図とストラテジー



148. 分裂期スピンドル方向異常が誘導する腫瘍化機構の解明

中嶋　悠一朗

東北大学 学際科学フロンティア研究所 新領域創成研究部

Key words：分裂期スピンドル方向，細胞極性，上皮間葉転換（EMT），組織恒常性，ショウジョウバエ

緒　言

ヒトのがんの約 9 割は上皮組織に由来する。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、上皮構造の破綻が広く観察される。また、悪性化した腫瘍は上皮間葉転換を経て上皮性を失い、間葉様の表現型を示す。さらに、がん細胞は間質や免疫系といった、周囲の正常な組織・細胞と相互作用しながら腫瘍化を進行させることから、腫瘍形成は「異常な発生」と捉えることができる。これまでにがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異に注目した研究が精力的に行われてきた一方で、どのような異常細胞の振る舞いによって上皮構造の破綻が誘導され、腫瘍化が進行するのかという、上皮極性崩壊の過程や腫瘍形成の段階的な発生の仕組みの多くは不明である。上皮細胞は通常、上皮シートに対して平行な細胞分裂を行う。細胞分裂時に形成される分裂期スピンドルの方向は、細胞分裂方向と一致しており、発生や恒常性維持の過程において厳密に制御されており、その異常は腫瘍形成やがんなどの病態への関与が示唆されている。しかしながら、生体内上皮において分裂期スピンドル方向に注目した研究は少なく、上皮と平行な分裂期スピンドル方向の生理的意義は明らかでなかった。本研究では遺伝学的ツールが豊富で、単純な上皮構造をもつショウジョウバエ翅成虫原基をモデルとして、分裂期スピンドル方向の異常が誘導する上皮間葉転換、そして腫瘍形成メカニズムの解明を試みた。分裂期スピンドル方向の異常を示した細胞の振る舞いを解析したところ、分裂方向の異常は上皮性の喪失に先行していること、そして間葉系マーカーの発現が基底側に脱落した細胞において観察された。また上皮間葉転換に伴う遺伝子発現変化を RNA-seq 解析した結果、翅原基の運命を失いストレスシグナル経路やサイトカイン、分泌因子、さらに EMT 転写因子の発現が明らかとなった。上皮間葉転換は腫瘍の悪性化の様々な段階に関与すること、そしてヒトがんにおいても発現低下が観察されるがん抑制遺伝子が分裂期スピンドル方向を制御することを考えると、上皮の分裂期スピンドル方向の異常が誘導する腫瘍の発生を体系的に明らかにすることは、腫瘍発症機序の理解の向上につながり、その知見は将来的な医療応用に役立つことが期待される。

方法および結果

上皮間葉転換（Epithelial-to-Mesenchymal Transition：以下 EMT）は上皮細胞の極性や接着の喪失、上皮組織からの細胞脱落に加えて、最終的な間葉様の表現型を示すまでに、多くの遺伝子発現の変化を伴う複合的な現象である［1］。これまでに我々は、ショウジョウバエの翅原基の系を用いて、上皮と平行な分裂期スピンドル方向がスピンドル制御因子である Mud やがん抑制遺伝子である Scrib と Dlg によって制御されていることを明らかにした［2］。また分裂期スピンドル方向の異常を示した細胞が、上皮から脱落してアポトーシスしたことから、上皮と平行なスピンドル方向が、上皮構造の維持に必要であることを明らかにした。さらに、上皮から脱落した細胞は、アポトーシスの抑制下において間葉系の遺伝子発現を伴う EMT の表現型を示し、基底側で間葉様細胞からなる腫瘍を形成することが明らかとなった［2］。これらの結果は、分裂期スピンドル方向の異常によって、上皮構造の破綻と腫瘍化が段階的に進行している可能性を示唆している。しかしながら、分裂期スピンドル方向の異常を示した細胞がなぜ上皮から脱落して間葉様の表現型を示すのか、すなわち、どのような細胞および分子レベルの仕組みで間葉様細胞への運命転換が誘導されるのかは全く明らかでなかった。分裂期スピンドル方向の異常が誘導する EMT の分子および細胞レベルの特徴を明らかにするためには、(1) 分裂期スピンドル方向の異常を示す細胞の振る舞いを免疫組織化学およびライブイメージング観察によって

可視化して理解するアプローチ、そして（2）上皮から間葉細胞への変化に伴うゲノムワイドな遺伝子発現変化をRNA-seq 解析で明らかにすることが有効なアプローチである（図 1）。また、（3）間葉様細胞で変化がみられる遺伝子発現を遺伝学的に操作することで、EMT 形質の獲得および腫瘍化に必要な因子やシグナルを明らかにすることを試みた（図 1）。

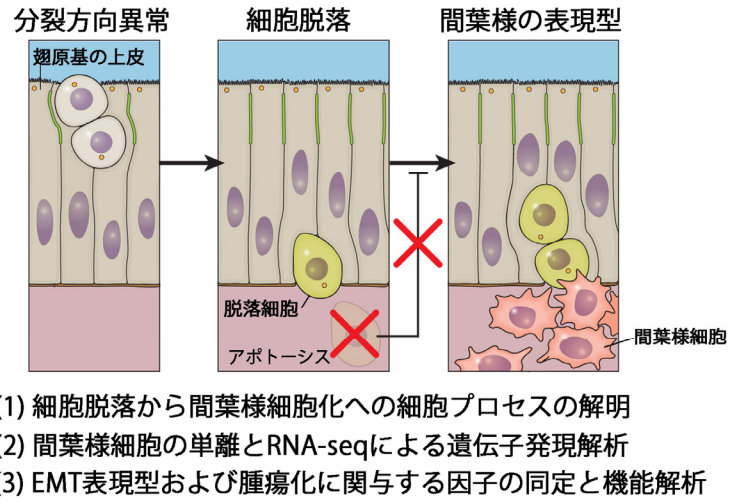


図 1. 分裂期スピンドル方向異常が誘導する EMT および腫瘍形成を解明するアプローチ
分裂方向異常とアポトーシス抑制によって誘導される EMT の概念図と、（1）細胞レベル（2）分子レベルの特性の解明と（3）遺伝学的な手法によるアプローチ。

1. 分裂期スピンドル方向異常は上皮性の喪失に先行し、基底方向へ脱落した細胞は間葉マーカーを発現する

分裂期スピンドル方向の変化で誘導される EMT は、上皮細胞の基底方向への脱落に始まり、間葉遺伝子の発現へと続く。ショウジョウバエ翅原基において分裂期スピンドル方向の異常を誘導した細胞の脱落過程を詳細に観察したところ、脱落する基底側の娘細胞には極性タンパク質や細胞間接着タンパク質である E カドヘリンが分配されず、上皮性を喪失している可能性が示唆された。また *E-cadherin::GFP* ノックイン系統を用いたライブイメージング観察によって、分裂期スピンドル方向の異常を示した細胞はアピカル収縮による脱落とは異なるプロセスによって脱落する様子が観察された。Matrix Metalloproteinase 1（Mmp1）のレポーター系統である *Mmp1-GFP* は、基底側に脱落した間葉様細胞で最も発現が高く、上皮中の細胞では中程度の発現が観察された。以上の結果から、分裂期スピンドル方向の異常は上皮極性の喪失に先行すること、そして脱落する細胞は基底側にて間葉マーカーの発現が上昇することが示唆された。

2. 分裂期スピンドル方向の異常で誘導された上皮間葉転換におけるゲノムワイドな遺伝子発現変化の同定

EMT 表現型を示す細胞に起こるゲノムワイドな遺伝子発現変化を明らかにするために、上皮から脱落した間葉様細胞の遺伝子発現プロファイルを取得した。翅原基において *mud-RNAi* と細胞死抑制因子 *p35* を共発現して誘導した間葉様細胞に関して、*Mmp1-GFP* をレポーターとしてラベルした。次に翅原基から分離した細胞をフローサイトメトリーにて GFP 陽性細胞を単離した。コントロールとして *p35* のみを発現した上皮を用いて、上皮と間葉様細胞の遺伝子発現プロファイルを RNA-seq 解析して、結果を比較した（図 2A）。分裂期スピンドル方向の異常が誘導する EMT に顕著な遺伝子発現変化をバイオインフォマティクス解析から抽出したところ、1057 遺伝子が顕著に発現上昇しており、その中には自然免疫反応やストレスシグナル（JNK や Keap1/Nrf2 経路）、サイトカイン（*Pvf1, upd*）、モルフォゲン（*dpp, wg*）、さらに EMT 転写因子 （*zfh1/ZEB1*）が観察された。一方、間葉様細胞においては 841 遺伝子が発現減少しており、その中には翅原基の運命決定因子（*Dll, vg, en*）や正常発生を制御する遺伝子（*dy, m, br*）が観察された（なお RNA-seq およびバイオインフォマティクス解析は Stowers Institute for Medical Research, USA の Gibson 博士および Seidel 博士との共同研究である）（図 2B）。これら発現上昇あるいは減少したいくつかの遺伝子に関して、実際に上皮から逸脱した間葉様細胞での発現を免疫組織化学法によって調べたところ、Dpp の集積や JNK シグナル活性

の上昇、また翅原基の運命決定に寄与する Dll や Vg といった転写因子の局在変化やシグナルの減少を確認することができた。

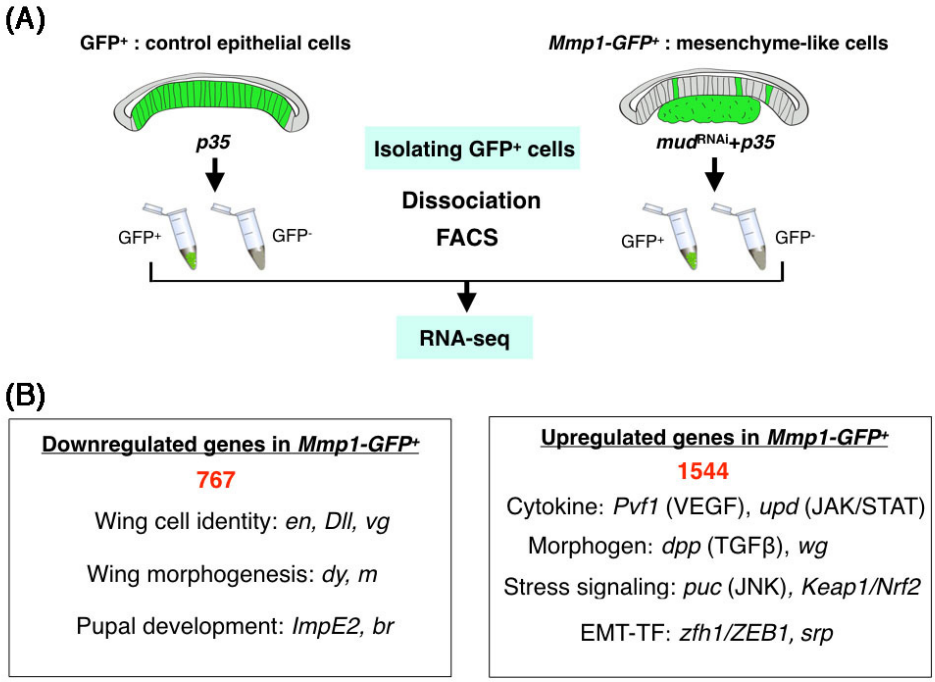


図 2. 分裂期スピンドル方向異常が誘導する EMT に伴う遺伝子発現変化の RNA-seq 解析

(A) コントロール上皮（*p35* のみを発現）と分裂期スピンドル方向異常とアポトーシス抑制によって誘導される間葉様細胞（*mud-RNAi+p35* を発現）をそれぞれ GFP 陽性、Mmp1-GFP 陽性細胞として分離（FACS）して RNA-seq 解析を行う。

(B) 有意に発現が減少した遺伝子の例（左）と発現が上昇した遺伝子の例（右）。

3. 分裂期スピンドル方向の異常が誘導する上皮間葉転換および腫瘍形成に関与する遺伝子の解析

JNK シグナルは組織傷害や腫瘍を含む慢性的な損傷などの多様なストレスに応答することが知られていることから、EMT 表現型への影響を遺伝学的に検討した。分裂期スピンドル方向の異常を誘導かつ JNK 活性がない状況下では（*mud-RNAi* かつ *JNK-DN* の発現）、上皮細胞は基底方向に脱落して異常な局在を示すものの、上皮層内に存在していること、そしてアクチン細胞骨格の再編成といった間葉細胞に特徴的な表現型は観察されなかった。Mmp1 が JNK の下流であること、そして基底膜の分解にも関与することを考えると、JNK 経路の活性化は分裂期スピンドル方向異常で誘導される EMT に必要であることが強く示唆された。また分裂方向の異常を誘導して基底方向へ脱落した間葉様細胞はショウジョウバエにおける Yap オーソログである Yorkie（Yki）の核局在を示すことを見出した。*mud-RNAi* と *p35* を共発現する細胞から *yki* を欠失させたところ、EMT に特徴的な表現型が消失したことから、Yki の核局在が細胞運命の可塑性に関与していることが示唆された（図 3）。

さらに興味深いことに、EMT 転写因子として知られる *zfh1/ZEB1* が分裂方向の異常で誘導した間葉様細胞に発現していたことから、*zfh1* を細胞クローンで発現したところ上皮細胞の基底方向への脱落が観察された。上皮組織中での *zfh1* 発現細胞の分裂期スピンドル方向を調べたところ、分裂方向の異常が観察された。同様にして *sna/SNAIL1* を異所的に発現した翅原基細胞においても分裂方向の異常を伴う EMT 効果が観察された。これらの結果より、転写因子によって誘導される EMT においても、増殖性の上皮においては EMT 開始が分裂期スピンドル方向の異常でトリガーされている可能性を示唆した。

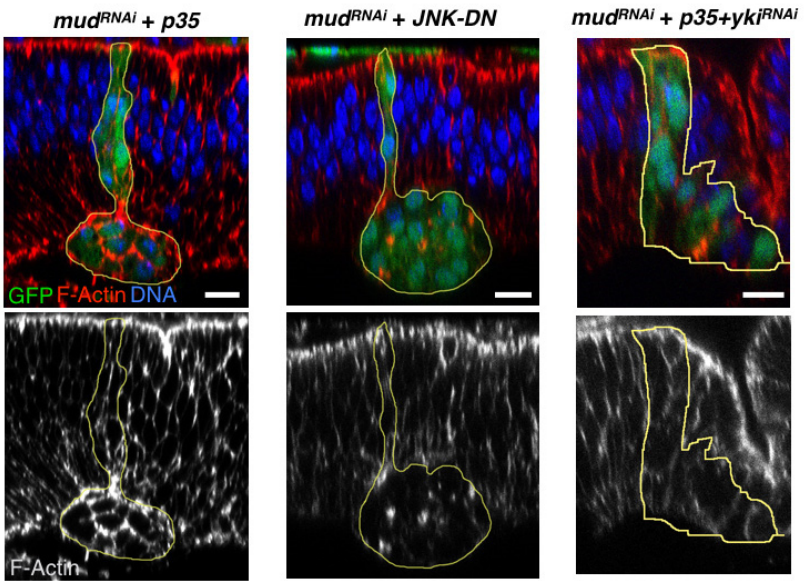


図 3. JNK および Yki は分裂期スピンドル方向異常が誘導する EMT に関与する
分裂期スピンドル方向異常とアポトーシス抑制によって誘導される間葉様細胞（*mud-RNAi+p35* を発現：左）に対して JNK 経路の抑制（*mud-RNAi +JNK-DN* を発現：中央）、*yki* 遺伝子発現の抑制（*mud-RNAi +p35+yki-RNAi* を発現：右）によって間葉様の形質が失われる。スケールバー：10 μm。

考　察

近年、上皮組織における分裂期スピンドル方向の異常は、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世界的にも認識され始めている［3, 4］。我々の報告に続いて、がん抑制因子 Lgl や Hippo 経路が分裂期スピンドル方向の制御に関与することが相次いで報告されるなど、上皮における分裂期スピンドル方向制御の研究は活発に行なわれている。分裂期スピンドル方向の生理機能に着目した研究は限定されているものの、近年、分裂期スピンドル方向の異常で誘導された間葉様細胞が実際に悪性の腫瘍としてショウジョウバエ成体内で振舞うことが示唆された［5］。今回の研究によって、分裂期スピンドル方向の異常で誘導される EMT においては上皮性の喪失と間葉への運命転換を遺伝子発現レベルで確認することができた。また間葉様細胞で発現がみられた EMT 転写因子の発現によって、分裂方向の異常が誘導されたことから、分裂期スピンドル方向の異常を起点としたフィードバックの仕組みが EMT 形質の獲得に寄与する可能性が示唆された。これらの結果は増殖性の上皮で異常な EMT を介した腫瘍化が誘導される仕組みの理解につながることが期待され、ヒトを含めた哺乳類でも類似の仕組みが保存されているのかどうか興味深い。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は Stowers Institute for Medical Research（USA）の Matt Gibson 博士および Chris Seidel 博士である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014 Mar;15 (3):178-96. doi: 10.1038/nrm3758.
2） Nakajima Y, Meyer EJ, Kroesen A, McKinney SA, Gibson MC. Epithelial junctions maintain tissue architecture by directing planar spindle orientation. Nature. 2013 Aug 15;500(7462):359-62. doi:

10.1038/nature12335.

3) Pease JC1, Tirnauer JS. Mitotic spindle misorientation in cancer--out of alignment and into the fire. J Cell Sci. 2011 Apr 1; 124:1007-16. doi: 10.1242/jcs.081406.

4) Noatynska A1, Gotta M, Meraldi P. Mitotic spindle (DIS) orientation and DISease: cause or consequence? J Cell Biol. 2012 Dec 24;199 (7):1025-35. doi: 10.1083/jcb.201209015.

5) Muzzopappa M, Murcia L, Milán M. Feedback amplification loop drives malignant growth in epithelial tissues. Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 29;114(35):E7291-E7300. doi: 10.1073/pnas.1701791114.