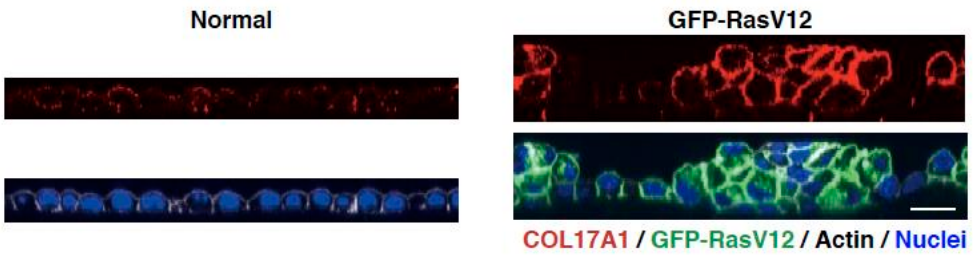
50　細胞競合を制御する膜タンパク質の同定	藤田　恭之

【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



50. 細胞競合を制御する膜タンパク質の同定

藤田　恭之

京都大学 大学院医学研究科 分子腫瘍分野

Key words：細胞競合，ファージディスプレイスクリーニング，上皮多層化，COL17A1，CD44

緒　言

我々の体内で生じるがんの 80%は肺、大腸、胃、乳腺などの上皮細胞から起こる。がんの超初期段階において、正常上皮層の一つの細胞にがんを誘発する変異が起きた時、新たに生じた変異細胞と直接それを取り囲む正常上皮細胞の境界で起こる現象についてはほとんど分かっておらず、現在がん研究のブラックボックスとなっている。我々は独自に確立した哺乳類培養細胞系やマウスモデルシステムを用いて、正常上皮細胞と変異細胞の境界で両者が生存を争う現象（細胞競合）が生じることを世界に先駆けて明らかにしてきた。例えば、がんタンパク質 Ras 変異細胞や Src 変異細胞が正常上皮細胞に囲まれると、変異細胞（敗者）が正常上皮細胞（勝者）層からはじき出されるように管腔側（体内への浸潤とは逆方向）へと排出されることを見いだした［1〜3］。本研究では、細胞競合の分子メカニズムの解明を目的にして、細胞競合を制御する膜タンパク質の同定を目指した。研究進展の結果、当初の予想を超える非常に興味深い新たな知見を得ることができた。

単層上皮細胞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［4］。

方　法

1. ファージディスプレイスクリーニング

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った。ファージ抗体ディスプレイ法は、細菌に感染するウィルスであるバクテリオファージのコートタンパク質遺伝子に、抗体の可変領域（Fv）遺伝子を組み込むことで、その抗体をファージ表面に提示する手法である。本研究では、健康なヒト脾臓および骨髄細胞の cDNA から構築されたファージ抗体のナイーブライブラリ、また、抗体可変部の相補性決定領域の遺伝子を適度な長さのランダムなアミノ酸配列で置換して構築された合成ライブラリの両方を用いたスクリーニングを行った。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。この操作を繰り返し行うことで、目的の結合活性を持つファージクローンを単離、濃縮した。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

1. RasV12 発現は膜タンパク質 COL17A1 と CD44 の形質膜への局在を亢進する

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（図 1）。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。COL17A1 は膜貫通ドメインを有する点で、コラーゲンファミリーのメンバーの中でも特徴的な分子である。RasV12 発現による COL17A1 発現上昇は、MDCK 細胞のみならず HPDE 細胞でも観察された。

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。さらに、免疫染色にて COL17A1 と CD44 の発現を制御する条件を探索した。すると、これらの分子の発現は、細胞密度が低い時には上昇し、細胞密度が高くなると低下することが分かった。さらに、細胞密度が高くなり管腔側へ逸脱した（apical extrusion）細胞では COL17A1 と CD44 の形質膜への局在が亢進することも分かった。このように、COL17A1 と CD44 の発現は RasV12 変異のみならず、細胞密度や apical extrusion によっても制御されることが明らかになった。

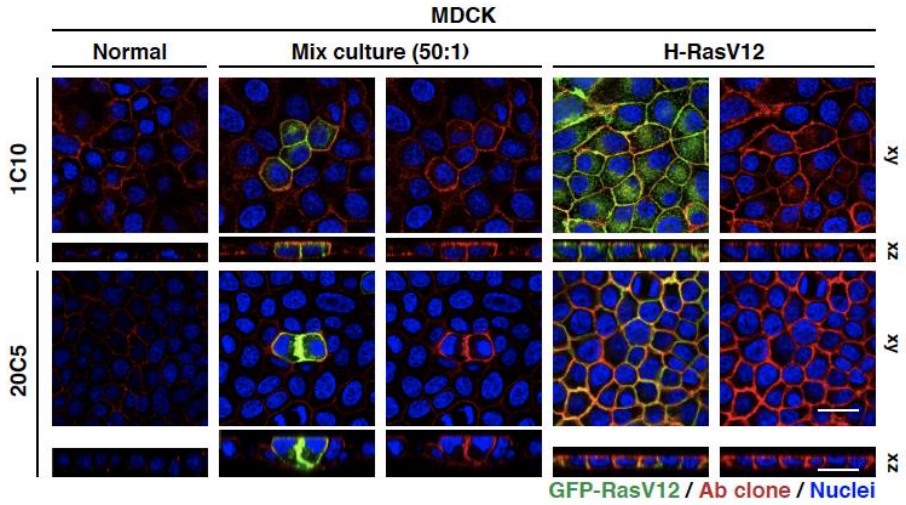


図 1. RasV12 変異細胞を特異的に認識するファージ抗体（1C10、20C5）の同定
ファージディスプレイスクリーニングによって RasV12 変異細胞を特異的に認識する抗体を同定することに成功した（スケールバー：20 μm）。

2. COL17A1 と CD44 はがん変異による単層上皮の多層化現象を制御する重要な因子である

さらに我々は、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。RasV12、Src、ErbB2 は全て、単層上皮の多層化を引き起こすがん原性の変異である。そこで、COL17A1 と CD44 が多層化したこれらの変異上皮細胞において、どのような局在を示すかを免疫染色にて調べた。すると、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（図 2）。

そこで、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。

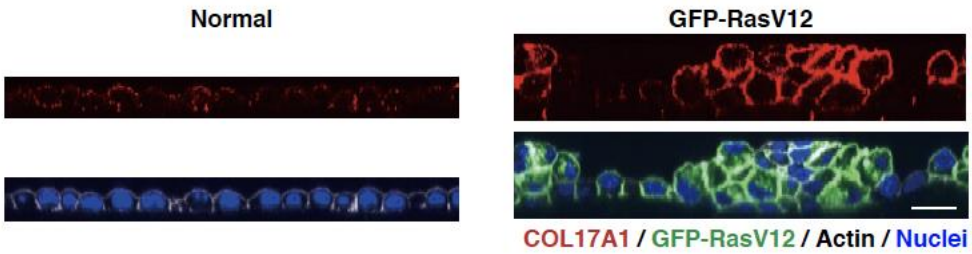


図 2. 多層化した RasV12 変異上皮細胞層の上層部の細胞間接着に集積する COL17A1
CD44 も同様の集積を示す（スケールバー：20 μm）。

3. COL17A1 と CD44 は管腔側へ逸脱した変異細胞内の ROS を低下させることによって細胞死を抑制する

単層上皮の多層化形成を引き起こす原因は、以下の 5 つのプロセスが考えられる。1. 無制限な細胞増殖、2. 細胞極性の崩壊、3. 細胞分裂軸の異常、4. 高細胞密度による apical extrusion の亢進、5. anoikis の抑制。そこで、COL17A1 ノックアウト、あるいは CD44 ノックダウンの効果を見ることによって、5 つのプロセスのうちどの異常が生じているかを調べたところ、COL17A1/CD44 発現低下細胞では、管腔側へ逸脱した変異細胞の細胞死が顕著に亢進することが分かった。また、管腔へ逸脱した COL17A1/CD44 発現低下細胞は、アポトーシスではなく、フェロプトーシスによる細胞死によって上皮細胞層から排除された。これらのデータは、変異細胞で発現が上昇した COL17A1 と CD44 は、管腔側へ逸脱した際にフェロプトーシスを抑制することによって、多層化を促進していることを示唆している。

COL17A1/CD44 発現低下細胞のフェノタイプについて、さらに解析を重ねた。すると、COL17A1/CD44 発現低下細胞では、ミトコンドリアの内膜の電位差が上昇し、ミトコンドリア由来の ROS（活性酸素）の発生が亢進し、それが管腔へ逸脱した細胞のフェロプトーシスを引き起こしていることが明らかになった。

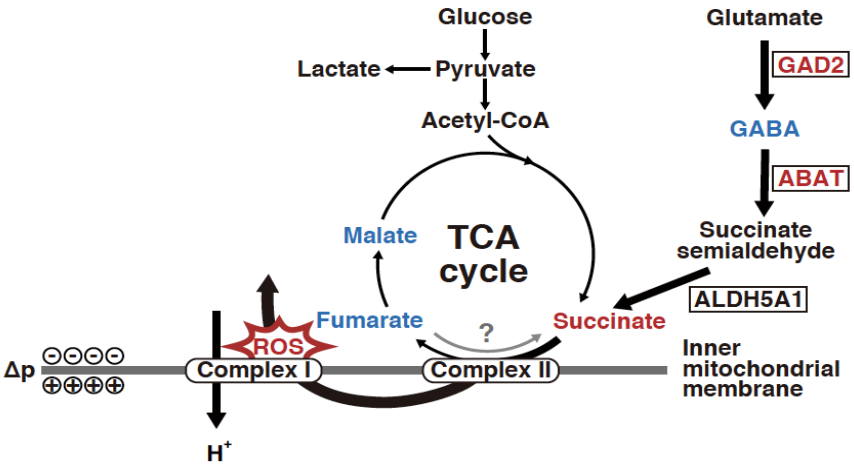


図 3. COL17A1 ノックアウト RasV12 変異細胞における代謝変化
赤字、青字はそれぞれ含有量あるいは発現量上昇あるいは低下した代謝物や代謝酵素

分子メカニズムをさらに明らかにするために、慶應義塾大学先端生命科学研究所の曽我朋義先生との共同研究により、メタボローム解析を行った。RasV12 変異 MDCK 細胞と COL17A1 ノックアウト RasV12 変異 MDCK 細胞の 2 つの細胞における代謝物の比較解析を行ったところ、様々な代謝物の含有量が COL17A1 ノックアウト Ras 変異細胞において変化していることが明らかになった。例えば、TCA サイクルの代謝物の多くが低下している一方、コハク酸（succinate）が上昇していた。また、GABA のレベルが低下しているとともに、glutamate-GABA 経路（GABA シャント）に関わる複数の酵素の mRNA 発現が亢進していることからコハク酸の上昇は GABA シャント経路によって生

じていることが示唆された。さらに、ミトコンドリア complex-I の阻害剤である Rotenone 投与によって COL17A1 ノックアウト RasV12 変異細胞におけるミトコンドリアが産生する ROS 量が減少した。これらのデータは、コハク酸量上昇に伴って、ミトコンドリア complex-I において電子移行が逆行し、その結果過剰量の ROS が産生されるというメカニズムを示唆している（図 3）。

4. マウス発がんモデルにて多層化した前がん病変においても COL17A1 と CD44 の発現は上昇

続いて名古屋大学医学研究科の榎本篤先生との共同研究にて、COL17A1 や CD44 の発現上昇がマウス発がんモデルの多層化した前がん病変においても生じているかを検証した。膵管上皮特異的に *K-Ras* と *p53* の変異を誘導する KPC マウスの生後 8～10 週では、ヒトの膵臓前がん病変である PanIN に類似した多層化前がん病変を生じる。そこで、マウスの膵臓に生じた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（図 4）。現在、COL17A1 や CD44 のノックアウトが多層化現象にどのような影響を与えるかについて検証している。

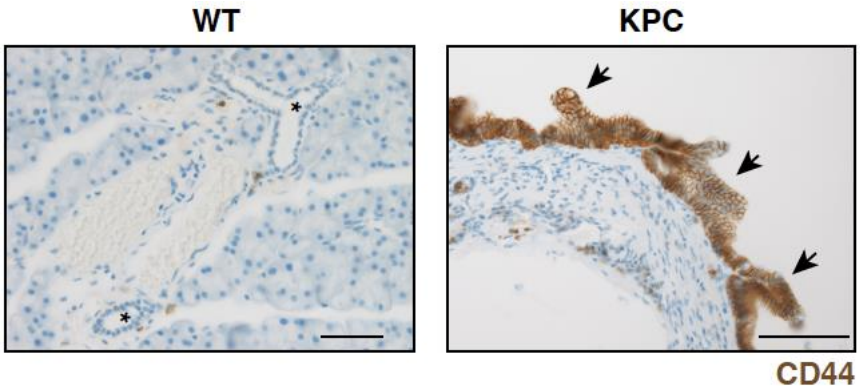


図 4. KPC マウスに生じた PanIN 様の多層化した前がん病変における CD44 の免疫染色像
星印：正常膵管上皮、矢印：PanIN 様病変部位（スケールバー: WT 50 μm、KPC 100 μm）。

考　察

unbiased なファージディスプレイ抗体スクリーニングを行った結果、当初の予想を超える研究成果を挙げることができた。がん化の初期段階において単層上皮が多層化する現象については、これまでも多くの報告がされているが、その分子メカニズムについては明らかになっていなかった。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。今後は、多くのヒト前がん病変における COL17A1 と CD44 の発現を調べるとともに、これらの *in vivo* における前がん病変形成への機能的関与を詳細に調べていく。さらに、COL17A1 と CD44 が正常細胞と変異細胞間に生じる細胞競合のトリガー分子になっている可能性についても検証していく。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、慶應大学慶應義塾大学先端生命科学研究所の曽我朋義先生、名古屋大学大学院医学研究科分子病理学・腫瘍病理学研究室の榎本篤先生である。最後に、この研究をサポートして頂いた上原記念生命科学財団に心から感謝の意を捧げる。

文　献

1) Hogan C, Dupré-Crochet S, Norman M, Kajita M, Zimmermann C, Pelling AE, Piddini E, Baena-López LA, Vincent JP, Itoh Y, Hosoya H, Pichaud F, Fujita Y. Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. Nat Cell Biol. 2009 Apr;11(4):460-7. doi: 10.1038/ncb1853. Epub 2009 Mar 15. PMID: 19287376

2) Kajita M, Hogan C, Harris AR, Dupre-Crochet S, Itasaki N, Kawakami K, Charras G, Tada M, Fujita Y. Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. J Cell Sci. 2010 Jan 15;123(Pt 2):171-80. doi: 10.1242/jcs.057976. Epub 2009 Dec 21. PMID: 20026643

3) Kon S, Ishibashi K, Katoh H, Kitamoto S, Shirai T, Tanaka S, Kajita M, Ishikawa S, Yamauchi H, Yako Y, Kamasaki T, Matsumoto T, Watanabe H, Egami R, Sasaki A, Nishikawa A, Kameda I, Maruyama T, Narumi R, Morita T, Sasaki Y, Enoki R, Honma S, Imamura H, Oshima M, Soga T, Miyazaki JI, Duchen MR, Nam JM, Onodera Y, Yoshioka S, Kikuta J, Ishii M, Imajo M, Nishida E, Fujioka Y, Ohba Y, Sato T, Fujita Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. Nat Cell Biol. 2017 May;19(5):530-541. doi: 10.1038/ncb3509. Epub 2017 Apr 17. PMID: 28414314

4) Kozawa K, Sekai M, Ohba K, Ito S, Sako H, Maruyama T, Kakeno M, Shirai T, Kuromiya K, Kamasaki T, Kohashi K, Tanaka S, Ishikawa S, Sato N, Asano S, Suzuki H, Tanimura N, Mukai Y, Gotoh N, Tanino M, Tanaka S, Natsuga K, Soga T, Nakamura T, Yabuta Y, Saitou M, Ito T, Matsuura K, Tsunoda M, Kikumori T, Iida T, Mizutani Y, Miyai Y, Kaibuchi K, Enomoto A, and Fujita Y　The CD44/COL17A1 Pathway Promotes the Formation of Multilayered, Transformed Epithelia. Current Biology, in press.