

細胞競合を介したオートファジーの がん抑制機構

東京理科大学 研究推進機構 生命医科学研究所
博士課程

あくたる
明果瑠 いるま

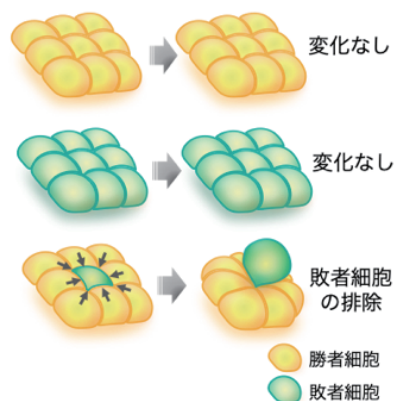
東京理科大学 研究推進機構 生命医科学研究所
講師

こん しゅんすけ
昆 俊亮

はじめに

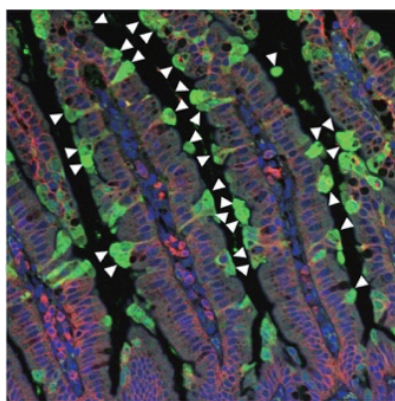
がん細胞のほとんどは上皮細胞に由来します。がん発生初期では、正常上皮細胞にまずがん関連遺伝子の変異が生じ、これらのがん変異細胞にさらに遺伝子変異が複数蓄積することにより、最終的に悪性化したがん細胞へと性質転換します。散発性の遺伝子変異の要因として、紫外線や発がん性物質への暴露などの外的要因や細胞分裂などの内的要因が知られています。最近のゲノミクス研究により、体内の至る所でがん変異化した細胞が日常的に産生されていることが、正常組織を対象とした研究より明らかとなっています。しかしながら、多くの場合に発がんに至らないのは、がん変異細胞を排除する機構が生体内に備わっているためです。そのような抗腫瘍機構の一つが細胞競合です。細胞競合とは、異なる性質を有する上皮細胞が隣り合ったとき、細胞間の相互作用によって、適応度が相対的に高い細胞が勝者細胞として生き残り、適応度が低い細胞が敗者細胞として排除される現象です。重要なこととして、勝者細胞または敗者細胞のみが存在した場合には、細胞は生存し、組織または個体の発育には

影響ないことが細胞競合の定義の一つであり、すなわち個体発生には問題がない程度の変異を有する細胞が周辺の正常細胞の作用によって排除されることが細胞競合の役割です【図1】。マウスを用いたこれまでの研究により、初期胚、心筋、小腸、膵臓、肝臓、肺、造血器官などの組織に産生された変異細胞が細胞競合により排除されることが示されてきたことから、細胞競合は生体内の普遍的な恒常性維持機能であると考えられています。細胞競合によって敗者細胞が排除される様式は様々で、アポトーシスやネクロプトーシスによる細胞死、老化誘導、さらには勝者細胞からの物理的圧力によって敗者細胞が上皮層より逸脱する‘cell extrusion’まで多様です。そして、細胞競合の重要な生理的な役割の一つが、上皮層に出現したがん変異細胞を駆逐することです。これまでに私たちの研究グループでは、イヌ腎尿細管由来の上皮細胞株であるMDCK細胞を用いて、がん原遺伝子であるRasの活性化型変異体を上皮細胞層に少数誘導すると、正常細胞に囲まれたRas変異細胞が単層上皮層から管腔側へと排除されることを見出しておりました。また、マウス腸管にRas変異細胞をモザイクに産生する細胞



【図1】細胞競合の説明

勝者細胞もしくは敗者細胞が単独に存在したときは何もおこらないが、両者が共存したときにのみ敗者細胞は排除される。



【図2】細胞競合によって排除されるRas変異細胞

マウス腸管にモザイク誘導されたRas変異細胞（緑）は細胞競合によって管腔へと排除される（矢頭）。

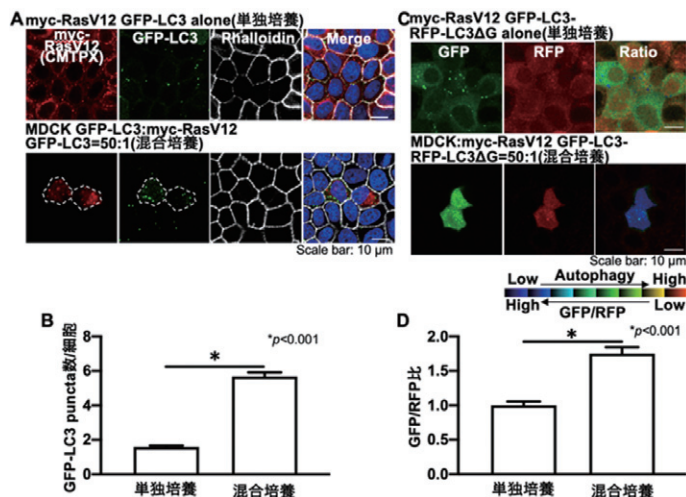
競合マウスモデルを作出、解析の結果、正常上皮細胞に囲まれた活性化型Ras変異細胞のほとんどが管腔側へと排除されることを明らかにし、哺乳類の生体内においても細胞競合が引き起こされることを報告しました¹⁾【図2】。このように、細胞競合は正常上皮細胞に備わっている制がん機能として近年大変注目を浴びていますが、細胞競合を制御する分子論的メカニズムについてはよく分かっていません。

我々の研究グループではこれまでに、正常細胞に囲まれたRas変異細胞ではミトコンドリアの機能が低下し、ワ

ールブルグ効果様の代謝変化が引き起こされることを見出していました。このことから、細胞競合下のがん変異細胞では代謝機構がロバストに変容することが強く示唆されていました。そこで、細胞質成分や細胞内小器官のリサイクル機構であるオートファジーに着目しました。一般的に、がんにおけるオートファジーの役割には二面性があることが知られています。腫瘍が進展するがんの中・後期においては、オートファジーが細胞内成分を分解し、アミノ酸レベルを維持することにより、腫瘍組織内のがん細胞の生存と増殖を助長します。一方、発がん自体に対しては、むしろ抑制的に機能することがオートファジー制御因子のノックアウトマウスの研究より示唆されていましたが、その制がん機構の詳細はよく分かっていませんでした。このような背景より、細胞競合とオートファジーとの関連について詳細に解析を行うこととしました。本稿では、我々の研究グループで得られた最新の知見を紹介します²⁾。

がん変異細胞内でのリソソームの機能低下によるオートファゴソームの蓄積が細胞競合を正に制御する

まず初めに、細胞競合におけるオートファジーの役割を調べるため、テトラサイクリン依存的に活性化 Ras 変異体 (RasV12) を発現誘導する MDCK 細胞に、オートファゴソームマーカーである GFP-LC3 を恒常的に発現する細胞株 (RasV12 GFP-LC3 細胞) を樹立しました。正常 MDCK 細胞と赤色蛍光色素である CMTPX で染色した RasV12 GFP-LC3 細胞を混合培養し (MDCK: RasV12 GFP-LC3=50: 1)、RasV12 を誘導し 24 時間後の LC3 陽性の puncta 数、すなわち、オートファゴソームの数を評価しました。その結果、単独培養時に比べて混合培養下でオートファゴソーム数が著増していることが分かりました。細胞内でオートファゴソーム数が増加する要因として、1. オートファジーが活性化する 2. オートファゴソームの分解が阻害される の 2 つの可能性が考えられました。そこで、細胞内にてオートファゴソームが形成され、最終的にリソソーム内で分解される一連の過程 (オートファジーフラックス) を観察したところ、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞ではオートファジーフラックスが低下することを見出しました【図 3】。この結果により、正常細胞と共培養した Ras 変異細胞ではオートファゴソームの分解が阻害された結果、細胞内に蓄積することが分かりました。

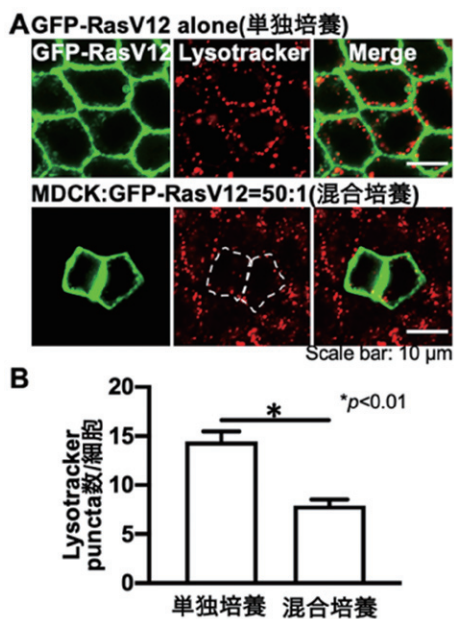


【図 3】正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞ではオートファジーフラックスが低下し、オートファゴソームが蓄積する

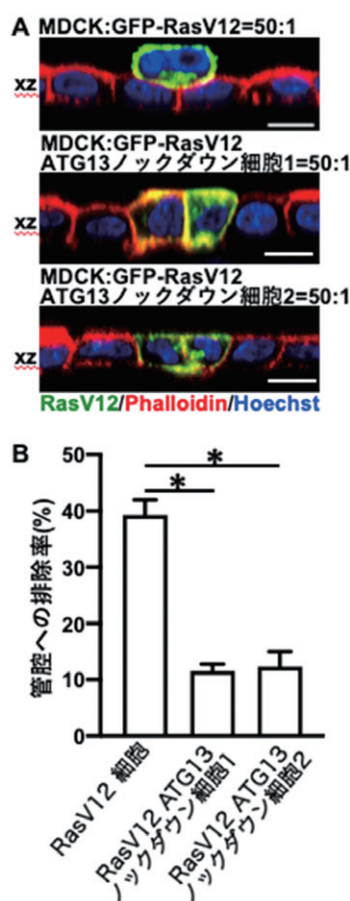
(A) myc-RasV12 GFP-LC3 細胞の単独培養、または MDCK GFP-LC3 細胞との共培養の共焦点顕微鏡画像 (赤; Ras 変異細胞 緑; LC3) を示す。(B) myc-RasV12 GFP-LC3 細胞の LC3 陽性 Puncta 数を定量した結果を示す。(C) myc-RasV12 GFP-LC3-RFP-LC3ΔG 細胞の単独培養、または MDCK 細胞と共培養した共焦点顕微鏡画像を示す。(D) myc-RasV12 GFP-LC3-RFP-LC3ΔG 細胞のオートファジーフラックス (GFP/RFP) を定量した結果を示す。オートファジーのフラックスが低いほど GFP が分解されないため、GFP/RFP 値が高くなる。

続いて、オートファジーフラックスが停滞する原因を調べるため、リソソームの機能を評価しました。機能的なリソソームを特異的に標識する LysoTracker を細胞内に取り込ませたところ、混合培養時の Ras 変異細胞内の機能的なリソソームの数が低下していたことから、リソソームの機能が細胞非自律的に障害されることが明らかとなり、これがオートファゴソーム蓄積の要因であることが示唆されました【図 4】。

次に、細胞競合におけるリソソームの機能低下の意義を理解するために、フォルスコリンによって人為的にリソソームの機能を回復させ、Ras 変異細胞の管腔側への逸脱率を定量しました。その結果、フォルスコリンの濃度依存的に Ras 変異細胞の管腔側への逸脱率が低下することが分かりました。したがって、リソソームの機能異常が Ras 変異細胞の管腔側への逸脱を促していることが示唆されました。これまでの結果より、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞内ではリソソームの機能が低下し、オートファゴソームが蓄積することが示されましたが、オートファゴソームの形成自身が細胞競合に必要などうか続いて検討しました。オートファゴソーム形成の初期に中心的に機能する ATG13 をノックダウンした Ras 変異細胞を樹立し、正常細胞と共培養すると、管腔への逸脱率が有意に低下したことから、オートファゴソームの形成は必要だが必ずしも分解されない、すなわち「オートファゴソームの非分解機能」が細胞競合によってがん変異細胞



【図4】細胞非自律的にリソソームの機能が低下する (A) MDCK-pTR GFP-RasV12 細胞の単独培養、または MDCK 細胞と共培養した共焦点顕微鏡画像を示す (緑; Ras 変異細胞 赤; Lysotracker)。 (B) MDCK-pTR GFP-RasV12 細胞の Lysotracker 陽性 Puncta 数を定量した結果を示す。



【図5】オートファゴソームの形成を阻害すると、Ras 変異細胞の管腔側への逸脱率が低下する

(A) GFP-RasV12 細胞、または GFP-RasV12 ATG13 ノックダウン細胞 1 と GFP-RasV12 ATG13 ノックダウン細胞 2 を MDCK 細胞と共培養した共焦点顕微鏡の xz 画像を示す (緑; Ras 変異細胞 赤; アクチン 青; 核)。 (B) MDCK 細胞と共培養した GFP-RasV12 細胞、または GFP-RasV12 ATG13 ノックダウン細胞 1 と GFP-RasV12 ATG13 ノックダウン細胞 2 の管腔側への逸脱率を定量した結果を示す。

による物理的な排除圧が変異細胞内のリソソームの機能低下ならびにオートファゴソームの蓄積を誘引し、さらにこれらの非分解性オートファゴソームが正常細胞のフィラミン集積を促すといった、ポジティブフィードバック機構が細胞競合を制御することを見出しました【図6】。

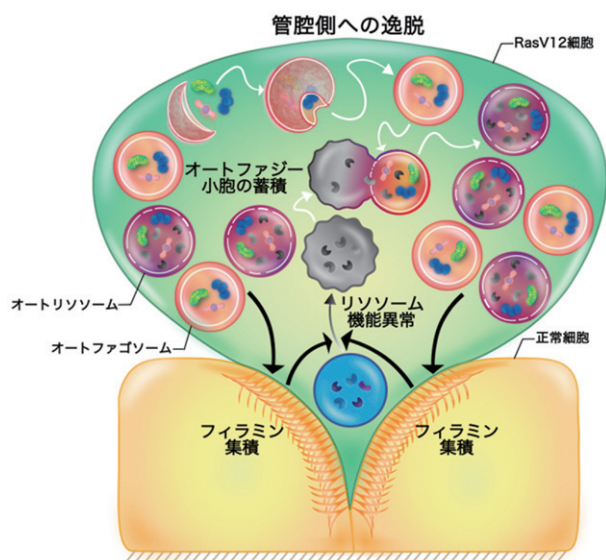
が排除されるために必要であることを見出しました【図5】。

がん変異細胞で蓄積するオートファゴソームと隣接する正常細胞内のフィラミン集積とのポジティブフィードバック機構が細胞競合を制御する

続いて、リソソームの機能低下によるオートファゴソームの蓄積がどういったメカニズムで生じるかを調べました。先行研究より、変異細胞に隣接する正常細胞の境界面でアクチン架橋因子であるフィラミンが集積し、これが駆動力となって変異細胞を押し出すことが分かっていました³⁾。そこで、フィラミンをノックダウンした正常細胞と Ras 変異細胞を混合培養すると、変異細胞内の LC3 陽性の puncta 数が低下しました。この結果より、正常上皮細胞のフィラミンを介した物理的な排除圧がオートファゴソームの分解異常を引き起こすことが明らかになりました。さらに、ATG13 がノックダウンされた Ras 変異細胞に接する正常細胞ではフィラミンの集積率が低下したことから、変異細胞内で蓄積したオートファゴソームが正常細胞のフィラミンの集積を誘引していることも分かりました。以上の結果から、正常細胞で集積したフィラミン

オートファゴソームの形成阻害による細胞競合の不全は慢性膵炎を引き起こす

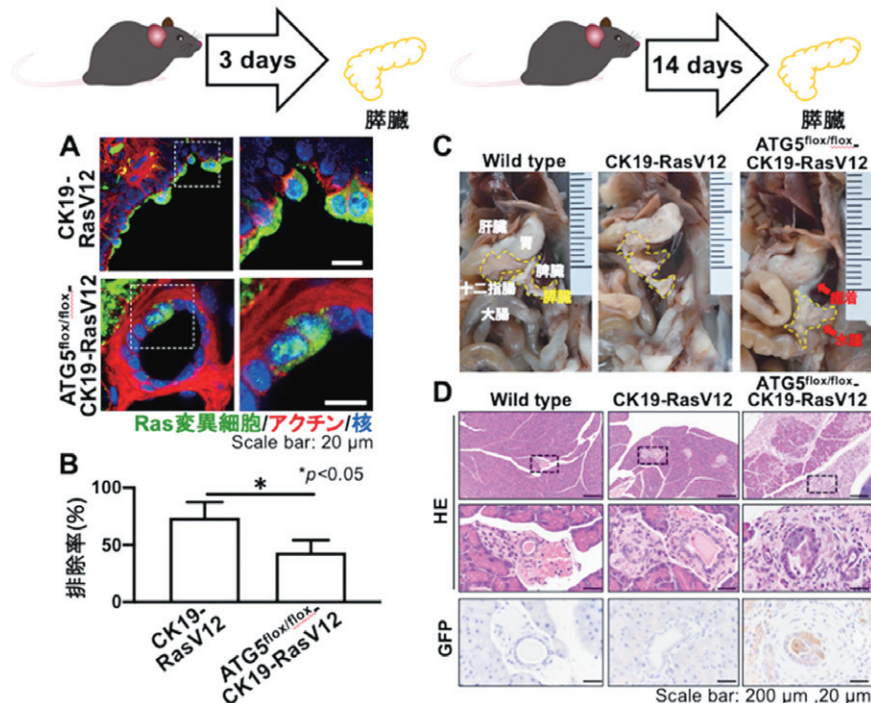
最後に、生体内の細胞競合におけるオートファジーの役割を評価するために、低濃度のタモキシフェン投与によって上皮細胞層に GFP-RasV12 タンパクをモザイクに発現誘導する細胞競合モデルマウスを用いてオートファジー活性を検討しました。マウス腸管のオルガノイドに Azurite-LC3 を導入し、オートファゴソーム数を測定した結果、複数の Ras 変異細胞で構成された集団ではほとんどオートファゴソームの形成は認められなかったのに対し、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞ではその数が著増していました。また、機能的なリソソームの数が細胞非自律的に Ras 変異細胞内で減少していたことから、生体内においても細胞競合により Ras 変異細胞内でリソソームの機能低下とオートファゴソームの蓄積が生じることが分かりました。続いて、オートファジー制御因子である ATG5 のノックアウトマウスを上述の細胞競合マウスモデルと交配し、Ras 変異細胞の排除率を検討しました。膵管と腸管において、タモキシフェン投与3日後の Ras 変異細胞の管腔への逸脱率を定量した結果、ATG5 がノックアウトされると Ras 変異細胞の管腔への逸脱



【図6】細胞競合におけるオートファジーの役割

正常細胞のフィラミン集積が変異細胞内のリソソーム機能低下ならびにオートファジー小胞の蓄積を誘引し、さらに蓄積したオートファジー小胞が正常細胞内のフィラミン集積を促す。

率が有意に低下することを見出しました。そこで、残存した Ras 変異細胞の運命を追跡するため、タモキシフェン投与 14 日後のマウスを解剖したところ、膵臓の水腫や、膵臓と胃や脾臓などの周辺臓器との癒着が認められました。また、病理解析を行なった結果、



【図7】Ras 変異誘導 3 日、14 日後のマウス膵管での変異細胞の挙動

(A) Ras 変異誘導 3 日後の Ras 単独変異マウス (CK19-RasV12) とオートファゴソーム形成不全 Ras 変異マウス (ATG5^{flox/flox}-CK19-RasV12) の膵管の様子を示す (緑; Ras 変異細胞 赤; アクチン 青; 核)。 (B) CK19-RasV12 マウスと ATG5^{flox/flox}-CK19-RasV12 マウスにおける Ras 変異細胞の管腔への排除率を示す。 (C) Ras 変異誘導 14 日後の解剖写真。ATG5^{flox/flox}-CK19-RasV12 マウスでは膵臓の水腫や胃、脾臓との癒着が認められる。 (D) Ras 変異誘導 14 日後の HE ならびに GFP (Ras 変異細胞) の免疫染色画像。ATG5^{flox/flox}-CK19-RasV12 マウスでは変異細胞が膵管に堆積し、膵管構造が破綻する。また、外分泌系組織の退行と膵管周辺に炎症性細胞の蓄積が認められる。

Ras 変異細胞が膵管に堆積し、膵管構造が破綻していることが観察されました。また、膵管の周辺組織には炎症性細胞が蓄積していたことから、慢性膵炎様病変が惹起されることが分かりました【図7】。

以上の研究結果より、オートファジーは細胞競合を介してがん変異細胞を排除し、上皮組織の恒常性維持に寄与していることが分かりました。

さいごに

本研究結果より、がん変異細胞が産生された発がんの超初期において、オートファジーは細胞競合を介してがん変異細胞を除去することにより抗腫瘍的に機能することを見出しました。一方で、がんが進展する中・後期では、オートファジーはがん細胞の増殖や生存を助長していることが知られており、腫瘍発生におけるオートファジーの役割には二面性があることが分かりました。したがって、現在世界中においてオートファジーの活性を阻害する抗がん剤の開発が精力的に行われていますが、本研究成果よりオートファジー阻害剤は細胞競合能を低下させることが考えられるため、腫瘍の進展度を十分に考慮して使用する必要があると

思います。今後、細胞競合を制御するオートファジーのより詳細な分子機序が明らかとなれば、がん変異細胞の排除効率のみを増強させるような制がん戦略の確立へと繋がっていくことが期待されます。

【参考文献】

- 1) Kon S. et al. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. Nat. Cell Biol. 19, 530–541, 2017.
- 2) Akter E. et al. Non-degradable autophagic vacuoles are indispensable for cell competition. Cell Rep. 40, 111292, 2022.
- 3) Kajita M. et al. Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. Nat. Commun. 5, 4428, 2014.