

細胞間コミュニケーションの原理を個体に問う

神戸大学大学院医学研究科 細胞生物学G-COE

井垣 達吏



1. アメリカへ

偶発的、確率論的な細胞間のコミュニケーションがいかにして組織や器官の秩序を生み出しているのか、その仕組みに迫りたくて、でもどこから迫ればいいのか分からなくて、とりあえずそこに近づくことのできるような方法論を開発した研究室に飛び込むことにした。今から7年前、大学院博士課程を修了して学位を取ったばかりの頃であった。ポスドクとして留学を受け入れてくれたのは、アメリカ東海岸にあるYale大学のTian Xu研究室。Tianはショウジョウバエを用いた「遺伝的モザイク法」の方法論¹を確立した人で、組織中に様々な遺伝的バックグラウンドをもつ体細胞クローンを誘導してこれらを蛍光等で標識し、その振る舞いを追跡する豊富な技術とツールをもっていた。Tianは当時、この技術を用いてショウジョウバエがん転移モデルを確立するという野心的なプロジェクトを進めていて、大学院生のRaymond Pagliariniが5年の歳月をかけてその基盤を確立しようとしていた。すなわちRaymondは、ショウジョウバエ成虫原基の上皮組織にがん原性Ras (RasV12) を発現する体細胞クローンを誘導すると良性腫瘍が形成されること、およびこの良性腫瘍細胞クローンに *scribble* や *discs large* 遺伝子などのapico-basal極性遺伝子の機能喪失変異を導入するとこれらの細胞は基底膜を突き破り、近隣組織さらには遠隔器官へと浸潤・転移することを見出した²。Tianは、まず私にRasV12発現細胞が極性を失うことでいかにして浸潤・転移能を獲得するのか、その分子メカニズムを解析してほしいと言ってきた。私はこのがん転移プロジェクトを進めつつ、自分の目指したい方向にアプローチするための方法をゆっくりと探すことができればと思った。

さて、RasV12発現細胞が極性を失うと何が起こるのか、もちろん解析は簡単には進まなかった。何も手がかりを得られぬまま月日だけが進んでいったが、海外生活が夢の一つでもあった私にとって、日々の生活はあまりにも楽しく刺激的で、研究が進まな

いことを悩むという行為の存在さえ忘れていた。街を歩けば誰もが英語を喋っていたり、薄暗い公園を歩けばいかにも危なそうな人たちがクールにたむろしているだけで、興奮の連続だった。毎日のようにダンキン・ドーナツでコーヒーを調達しているうちにカウンターのお姉さんに覚えられ、私が店のエントランスをくぐると同時にスモール・コーヒーのブラックを用意して笑顔とともに手渡してくれるようになった。おかげでその店ではスモール・コーヒーのブラック以外の商品を買うことが不可能になってしまったが、これがアメリカかとやはり興奮の毎日だった。このようなカルチャーショックの大きな第一波がそれでもなんとか過ぎ去って、そろそろ研究のことをシリアスに考え始めた頃、自分で納得できるポジティブデータを初めて得ることができた。ショウジョウバエ個体内を浸潤・転移しつつあるRasV12/*scribble*^{-/-}細胞がc-Jun N-terminal kinase (JNK) 経路を強く活性化していることを見つけ、これはなんとか論文にまとめられる仕事になるだろうと確信した。渡米して10ヶ月が経過した頃だった。その後はひたすら実験に没頭し、極性を崩壊した上皮細胞がJNKの活性化とE-カドヘリンの発現低下を同時に引き起こすこと、また、これら2つの現象がRas誘導性良性腫瘍に浸潤・転移能を付与するための必要十分条件であることを明らかにすることができた³。さらに、この成果とRaymondの最初の発見とを組み合わせ、ショウジョウバエを用いたがん浸潤・転移機構の遺伝学的スクリーニング系を確立し、米国および国際特許を取得することができた^{4,5} (図1)。

2. 細胞間コミュニケーションとの出会い

さて、偶然か必然かは分からないが、上記の解析を進めていく過程で非常に興味深い現象に出会うことができた。上述したように、われわれはRasV12発現細胞に *scribble* や *discs large* 遺伝子の変異を導入すると腫瘍が悪性化することを見出したわけだが、

ぶんぶんロジスティクス

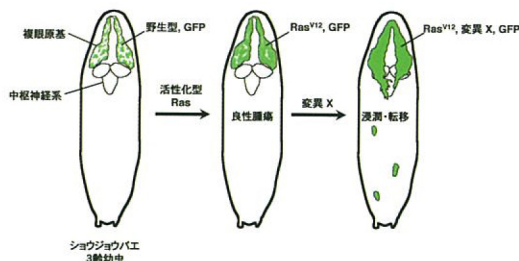


図1 ショウジョウバエがん浸潤・転移モデルを用いた遺伝学的スクリーニング
遺伝的モザイク法により、GFPで標識した体細胞クローンをショウ
ジョウバエ3齢幼虫の複眼原基に誘導する。RasV12を発現する体
細胞クローンを誘導した場合、非浸潤性の良性腫瘍が形成される。
この良性腫瘍にさらなる突然変異Xを導入し、この腫瘍が悪性化し
て隣接する中枢神経系や遠隔組織へ浸潤・転移する変異体をスクリー
ニングする。これまでに *scribble* や *discs large* などの一連の apico-
basal 極性遺伝子の突然変異がこの腫瘍悪性化を引き起こすことが
分かっている。

RasV12の発現なしに *scribble* や *discs large* 変異のみをもつ体細胞クローンを上皮に誘導すると、これらの変異細胞はむしろ細胞死によって組織から排除されることが分かった。そもそも *scribble* や *discs large*、*lethal giant larvae* などの極性遺伝子はがん抑制遺伝子として機能することが知られており、これらの遺伝子を欠損したショウジョウバエの成虫原基は過剰に増殖して腫瘍を形成する⁶。すなわち、本来高い増殖能を有しているがん原性の極性崩壊細胞は、その周囲を正常組織によって取り囲まれると逆に組織から排除されるという全く異なる振る舞いをする事が分かった。このことは、正常な上皮にはがん原性の異常細胞を認識・排除するような組織レベルのがん抑制システムが内包されていることを示唆している。そして、このシステムの実行には異常細胞 - 正常細胞間の細胞間コミュニケーションが重要な役割を果たしていると考えられた。また、がん原性 Ras 変異は、細胞がこの内在性がん抑制システムを免れてがん化するための手段として利用されていると考えることができた。私はこの現象に文字通りシビレ、この細胞排除システムの原理を明らかにすべく、直ちにその解析を開始した。大切な手がかりは、これら変異細胞クローンが JNK 経路を強く活性化して細胞死に至っていることであつた。

3. 衝撃、そしてメントラの世界へ

ショウジョウバエにおける JNK 依存的細胞死シグナルとしては、私が大学院時代に三浦正幸先生（現東大薬学部教授）のもとで同定した Eiger（ショウジョウバエで唯一の TNF ホモログ分子）によるシグナルが知られている⁷。Eiger はショウジョウバエ上皮において JNK 依存的細胞死を引き起こす細胞死リガンドであるが、残念なことに、いや、興味深いことに、当時作出した *eiger* 欠失変異体において細胞死の異常は全く観察されなかった。このことは、Eiger-JNK 細胞死シグナルは正常発生においては必須ではなく、むしろ発生過程でプログラムされていないような非常事態における細胞死の誘導に機能している可能性を示唆するものであった。以来、

Eiger-JNK 細胞死シグナルの生理的意義は不明のまま、私は JNK 依存的細胞死に出会う度に *eiger* 変異体ではどうなるのかを調べるのが一つの習慣となった。例によって *scribble* 変異細胞クローンを *eiger* 欠失変異体の成虫原基に誘導してみたとき、これらの変異細胞クローンの排除が全く起こらなくなるのを目にして、クラクラするほどの衝撃を受けた（図2）。

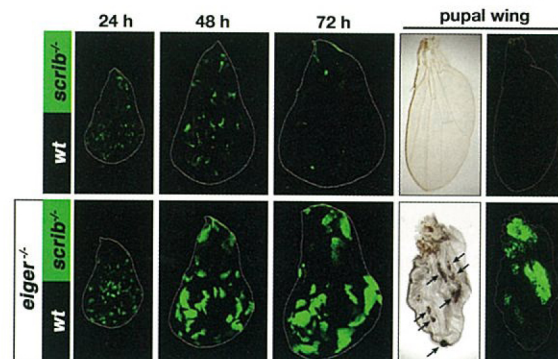


図2 *scribble* 変異クローンは Eiger を介して組織から排除される
GFP 標識した *scribble* (*scrib*) 変異細胞クローン（緑）
をショウジョウバエ3齢幼虫の翅原基に誘導し、経時的（24
時間、48時間、72時間、および96時間後）にコンフォー
カル解析した。野生型バックグラウンドの翅原基に
scrib クローンを誘導すると、これらのクローンは経時
的に組織から排除されたが（上段）、*eiger* 変異体の翅原
基に誘導した場合には排除されず、むしろ過剰に増殖し
て腫瘍を形成した（下段）。矢印は蛹期の翅に形成され
た腫瘍。（文献8より一部改変）

以後、週1回の映画館通い以外はこの極性崩壊細胞クローンの Eiger-JNK シグナルの解析に明け暮れた。*scribble* 変異細胞が正常組織に取り囲まれると Eiger-JNK 経路を活性化して細胞死に至る、というところまではすんなりと確認できた。次の疑問は、*scribble* 変異細胞ではなぜ Eiger が活性化するのかという点である。まず手始めに、Eiger の発現量が *scribble* 変異細胞クローン内で上昇している可能性を検証した。ところが予想に反して、Eiger タンパク質の発現量は *scribble* 変異クローン内においてむしろ低下していることが分かった。この一見矛盾する観察結果をどうやって説明できるのか、その手がかりを探るために、Eiger タンパク質の *scribble* 変異細胞内での局在を詳細に解析した。その結果、

ぶんぶんロジスティクス

Eigerは野生型細胞では細胞膜上に局在するのに対し、*scribble*変異細胞内ではその大部分が細胞質内にドット状のシグナルとして観察されることが分かった。メントラの世界に一歩足を踏み入れた、記念すべき瞬間でもあった。いくつかの解析を重ね、このEigerのドット状シグナルが初期エンドソームの局在と一致することを確認した。すなわち、Eigerはがん原性の極性崩壊細胞内においてその局在を細胞膜上からエンドソームへと移行させることが分かった。エンドソームへの局在変化は、その後のリソソームでの分解に連動すると考えられ、*scribble*変異細胞内でEigerのタンパク質レベルが低下していた先の結果とも合致する。エンドソームにおけるシグナル伝達経路の活性化という現象は、様々な細胞表面受容体シグナルにおいて知られているが、実際に*scribble*変異細胞においてエンドソームでJNK経路の強い活性化が起きていることが明らかとなった。さらに、正常組織に取り囲まれた極性崩壊細胞内ではエンドサイトーシス活性自体が亢進していること

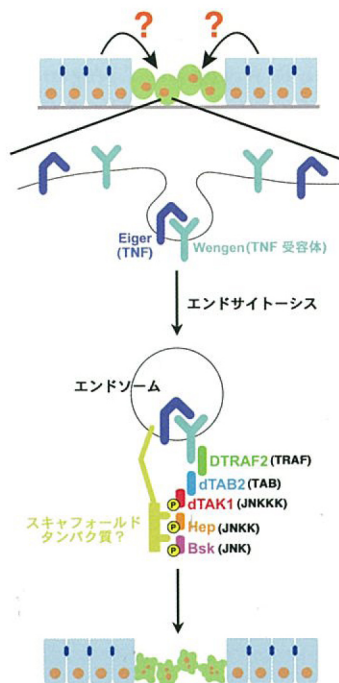


図3 Eiger-JNK経路を介した上皮の異常細胞排除システム
正常組織に取り囲まれた極性崩壊細胞は、エンドサイトーシス経路を亢進してEiger (TNF) を細胞膜からエンドソームへ移行させることでJNK経路を活性化する。細胞膜上のEigerはその受容体Wengen (TNF受容体) とともにエンドソームへ移行すると考えられる。エンドソーム上にはEiger経路の下流コンポーネントであるDTRAF2 (TRAF)、dTAB2 (TAB)、dTAK1 (JNKKK)、Hep (JNKK)、Bsk (JNK)などを局在化させるスキヤフォールドタンパク質が存在し、これがEiger経路の効率的な活性化を実現している可能性が考えられる

も分かった。*scribble*変異細胞クローン内でエンドサイトーシス経路を阻害すると、JNK経路の活性化とそれに伴う細胞排除が抑制されたことから、確かにこれらの変異細胞がエンドサイトーシス経路を介したEiger-JNKシグナルの活性化によって組織から排除されることが明らかとなった。この細胞排除現象は、*scribble*変異クローンのみならず*discs large*変異クローンでも同様に観察されたことから、がん原性の極性崩壊細胞の出現に対して応答・機能する普遍的ながん抑制システムであると考えられた⁸ (図3)。

4. 帰国、そしてはじまり

振り返ると、寝袋と銀マットを(実際に)ザックに背負ってとりあえずアメリカに飛び込んでからは、自由気ままな稜線の縦走を楽しみながら自分の山を探していたようなものだった。4年が経過して、山もかなり険しく深まった頃、周囲の岩場を覆っていたガスが少しずつ晴れて、自分の目指す未踏の(と信じた)山の頂をうっすらと視界に捉えることができるようになった。そして、そこへアプローチするための自分なりのルートを思い描けるようになった(と思い込んだ)とき、世界中のどこでもいいからその研究を自ら世界に発信したいと強く思った。もし可能ならばアメリカで挑戦してみたい、と思っていたところに、幸運にも日本のポジションを得ることができ、これも運命だと帰国を決意した。神戸大学医学部で、小さいながらも研究室を主宰するという素晴らしいチャンスを与えていただいた。2007年秋のことである。そんな生まれたばかりの弱小ラボに果敢にも飛び込んで来てくれた命知らず(?)のメンバーたちが、この2年半チームを引っ張ってくれた(図4)。私たちは神戸に拠点を構えてから、上述の細胞間コミュニケーションを介した細胞排除現象において最も興味深いポイントにアドレスしようということを始めた。すなわち、上皮にがん原性の異常細胞が生じた際に、周囲の正常組織の存在がいかにして異常細胞の排除を促すのか、この正常細胞側の役割の解析を開始した。その結果、正常な上皮細胞はその隣にがん原性の極性崩壊細胞が出現するとそれに応答してエンドサイトーシス活性を亢進することで(細胞死を誘導しないレベルの)JNK活性化を引き起こすこと、また、このJNK活性化が細胞骨格制御シグナルを介して細胞貪食能を亢進させ、それにより隣接する極性崩壊細胞を生きのまま貪食することでエンドサイトーシス様の細胞死を誘導して組織から排除することを遺伝学およびライブ

ぶんぶんロジスティクス



図4 現在のラボメンバー

狭いスペースにひしめく元気なラボメンバーたちに排除されないように、日々格闘中。たまにボーダーがかぶることも。

イメージング解析により明らかにした (Ohsawa et al., 投稿中)。現在は、この異常細胞排除システムを司る最上流イベントを明らかにするため、“細胞非自律的”な新しいタイプの遺伝学的スクリーニング系を構築してこの現象に関わる因子の網羅的探索を行っている。また、この異常細胞排除システムは上皮がんの発生初期に機能する生体防御機構と想定されるわけであるが、同様のシステムが正常発生過程においても機能しているのかどうかについても解析を進めている。さらに今後は、これらショウジョウバエで得られた知見を哺乳類培養細胞系にも適用し、細胞間コミュニケーションを介した上皮の内在性がん抑制システムとその破綻による腫瘍形成・悪性化機構の普遍原理を明らかにしていきたいと考えている。

5. おわりに

以上、現在行っている研究の背景を書いているうちにまとまりのない留学記のようになってしまったが、留学なしには出会えなかったモノであるということでお許しいただければ幸いである。細胞間のコミュニケーションの原理を知るには、直接個体に問いかけるのが一番であると考え。村上春樹氏が小説を書くときにキャラクターにセリフを与えるのではなくキャラクター自身に勝手に喋ってもらうように、個体の中で細胞に勝手に振る舞ってもらってそこから真理を教えてもらう、そういう研究を目指したい。私たちの研究に興味のある方は、いつでも見学を歓迎しています（研究室HP：<http://www.med.kobe-u.ac.jp/igalab/>）。

- 1 Xu, T. and Rubin, G. M., Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* 117 (4), 1223 (1993).
- 2 Pagliarini, R. A. and Xu, T., A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* 302 (5648), 1227 (2003).
- 3 Igaki, T., Pagliarini, R. A., and Xu, T., Loss of cell polarity drives tumor growth and invasion through JNK activation in *Drosophila*. *Curr Biol* 16 (11), 1139 (2006).
- 4 Xu T, Pagliarini R, and Igaki T (2005). A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. International Patent WO 2005/035729 A3.
- 5 Xu T, Pagliarini R, and Igaki T (2006). A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. United States Patent 20060288429.
- 6 Bilder, D., Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* 18 (16), 1909 (2004).
- 7 Igaki, T. et al., Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J* 21 (12), 3009 (2002).
- 8 Igaki, T. et al., Intrinsic tumor suppression and epithelial maintenance by endocytic activation of Eiger/TNF signaling in *Drosophila*. *Dev Cell* 16 (3), 458 (2009).