

論文の内容の要旨

論文題目 極性崩壊細胞の排除を担う FGF21 を介した細胞競合の分子機構の解析

氏 名 小川基行

【序論】

上皮組織は常に外界環境に曝されており、外部からの様々なストレスを絶え間なく受けている。こうしたストレスによって正常上皮細胞に遺伝子変異が入ると、細胞は増殖能や浸潤能を獲得して腫瘍を形成すると考えられる。したがって生体は組織の恒常性を維持するため、こうした変異細胞を早期に発見・排除するメカニズムが重要である。近年このメカニズムの一つとして細胞競合という機構が注目されている。細胞競合とは、腫瘍の原因となるがん原細胞などが周囲の正常細胞の働きにより組織から選択的に排除される現象である。例えば、細胞極性を維持するがん抑制遺伝子 *Scribble* を欠損したショウジョウバエ上皮組織は過剰に増殖して腫瘍が形成されるが、こうした *Scribble* 欠損細胞が正常細胞に囲まれると細胞競合により細胞死を介して排除される。この現象は哺乳類培養細胞の MDCK 細胞においても観察されている。テトラサイクリン (Tet) 依存的に *Scribble* が発現抑制される細胞 (*scrib^{KD}* 細胞) は Tet 依存的に周囲からの圧迫に脆弱になり、細胞競合では周囲の正常細胞に物理的に圧迫されて p38 を介した細胞死により排除される。*Scribble* 欠損細胞のような極性崩壊細胞の排除機構は発がん初期過程における重要ながん抑制機構であると考えられる。しかし正常細胞が *Scribble* 欠損細胞をどのように認識して圧迫により排除するのか、その詳細な分子機構は未解明であった。私は本学修士課程において、*scrib^{KD}* 細胞から分泌される線維芽細胞増殖因子 FGF21 がこの細胞競合の誘導に必要であることを見出していた。そこで本研究において、FGF21 による細胞競合誘導機構を詳細に解析することで、細胞競合による極性崩壊細胞の排除機構を明らかにしようと考えた。

【方法・結果】

1. FGFR1 は細胞競合に必要である

まず FGF21 が正常細胞に作用するか検討するため、正常細胞において FGF21 の受容体である FGFR1 をノックアウト (KO) して細胞競合に必要であるか検討した。正常細胞と *scrib^{KD}* 細胞を混合培養して Tet 処置により細胞競合を誘導すると、*scrib^{KD}* 細胞の生存率が約 30%程度にまで減少した。ここで正常細胞側でのみ FGFR1 を KO すると、生存率が有意に回復した (図 1A, 1B)。したがって、*scrib^{KD}* 細胞から分泌された FGF21 は正常細胞の FGFR1 を介して細胞競合を誘導することが示唆された。

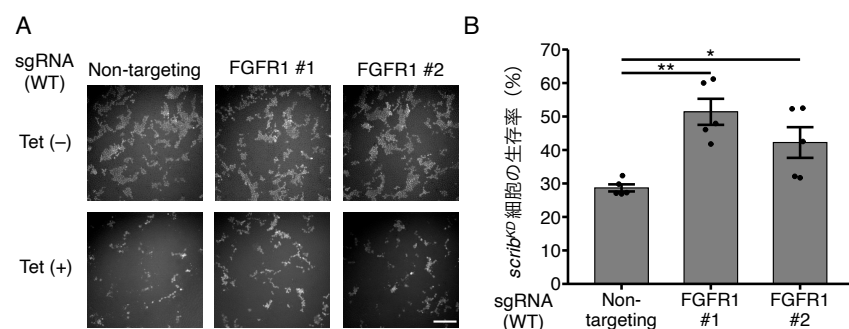


図 1. FGF21 は FGFR1 を介して細胞競合を誘導する

A) 正常 (WT) 細胞と GFP 陽性の *scrib^{KD}* 細胞を 3:1 で混合し、Tet 処置 60 時間後に画像を取得した。Scale bar, 200 μ m
B) 正常細胞で FGFR1 を KO すると *scrib^{KD}* 細胞の生存率が回復する。(n=5, *p<0.05; **p<0.01, mean \pm SEM)

2. FGF21 は正常細胞を誘引することで *scrib^{KD}* 細胞が押し込まれるのを促進する

正常細胞集団と *scrib^{KD}* 細胞集団を共存させて Tet を添加すると、正常細胞集団が *scrib^{KD}* 細胞集団に向かって移動し、接触後 *scrib^{KD}* 細胞が押し込まれる様子が観察された (図 2A)。このことから私は、*scrib^{KD}* 細胞から分泌された FGF21 が正常細胞を誘引して物理的な圧迫を誘導する可能性を考えた。*scrib^{KD}* 細胞で FGF21 を発現抑制すると、*scrib^{KD}* 細胞集団が押し込まれる程度が抑制された (図 2B)。*scrib^{KD}* 細胞方向への正常細胞集団の移動距離を計測すると、Tet 処置で移動距離が長くなった。一方 *scrib^{KD}* 細胞で FGF21 を発現抑制すると、その移動距離が短くなった (図 2C)。

FGF21 過剰発現細胞を樹立して同様に観察すると、正常細胞集団が FGF21 過剰発現細胞集団方向に移動し、接触後 FGF21 過剰発現細胞集団が押し込まれた (図 2D, 2E). 以上より *scrib*^{KD} 細胞から分泌された FGF21 が正常細胞を誘引することで *scrib*^{KD} 細胞が押し込まれる可能性が示された.

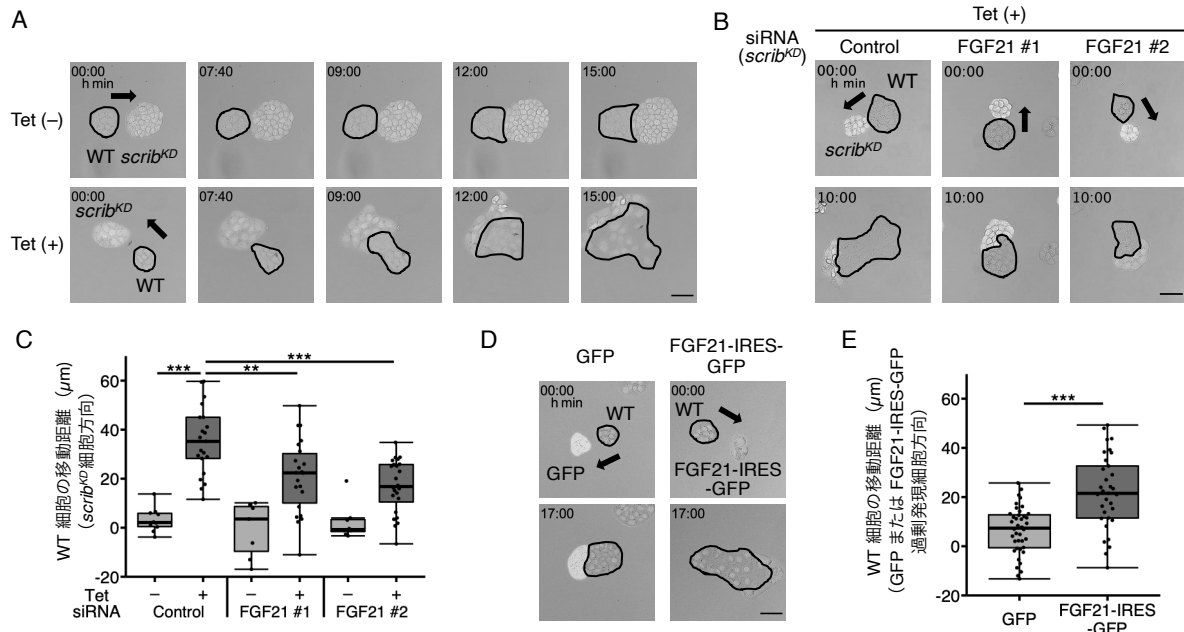


図 2. FGF21 は *scrib*^{KD} 細胞が正常細胞に押し込まれるのを促進する

A), B) *scrib*^{KD} 細胞集団は Tet 依存的に正常 (WT) 細胞集団 (黒線内) に押し込まれる. *scrib*^{KD} 細胞で FGF21 を発現抑制すると, *scrib*^{KD} 細胞集団が正常細胞集団に押し込まれる程度が抑制される. Scale bar, 50 μm

C) *scrib*^{KD} 細胞で FGF21 を発現抑制すると, *scrib*^{KD} 細胞集団に向かう正常細胞集団の移動距離が短くなる. (n = 7–24 from three independent experiments, **p < 0.01; ***p < 0.001, mean ± SEM)

D) FGF21-IRES-GFP 発現細胞集団は NLS-tdTomato 発現正常細胞集団 (黒線内) に押し込まれる. Scale bar, 50 μm

E) FGF21-IRES-GFP 発現細胞集団に向かう正常細胞集団の移動距離は, GFP 発現細胞集団に向かう正常細胞集団の移動距離より長い. (n = 40, 33 from three independent experiments, ***p < 0.001, mean ± SEM)

3. FGF21 は *scrib*^{KD} 細胞が正常細胞に物理的に圧迫されて排除されるのに必要である

細胞競合において, FGF21 が正常細胞を誘引して物理的な圧迫を誘導することで *scrib*^{KD} 細胞が排除される可能性を考えた. 二つの細胞集団を対峙させて接触させる cell confrontation assay という系を利用して, 正常細胞と *scrib*^{KD} 細胞の境界面で起こる現象を観察すると, *scrib*^{KD} 細胞が正常細胞に押し込まれて排除される様子が観察された (図 3A). *scrib*^{KD} 細胞において FGF21 を発現抑制すると, *scrib*^{KD} 細胞が押し込まれる程度が抑制された (図 3A, 3B). したがって, 細胞競合により *scrib*^{KD} 細胞が物理的に圧迫されて排除されるのに FGF21 が必要であることが示された.

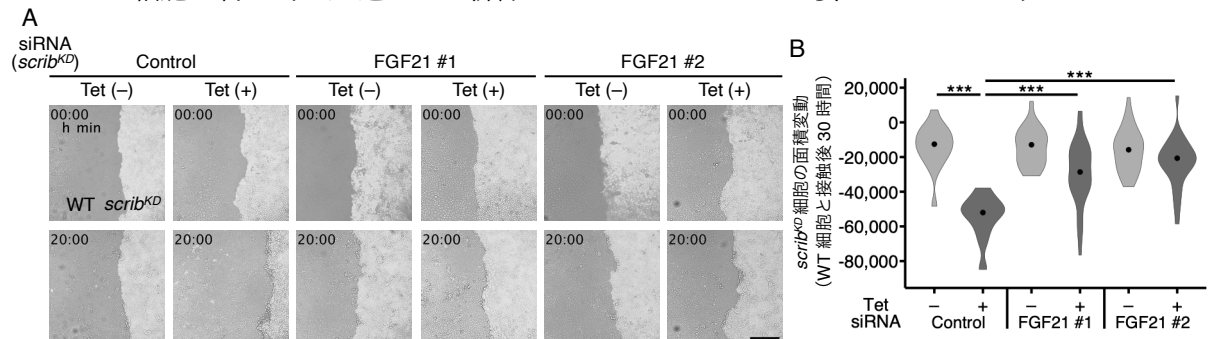


図 3. *scrib*^{KD} 細胞は FGF21 依存的に正常細胞に物理的に圧迫されて排除される

A), B) *scrib*^{KD} 細胞 (視野右側) は Tet 依存的に正常 (WT) 細胞 (視野左側) に押し込まれる. *scrib*^{KD} 細胞で FGF21 を発現抑制すると, *scrib*^{KD} 細胞が正常細胞に押し込まれる程度が抑制される. (n = 18–35 from three independent experiments, ***p < 0.001. The black dots show the median.) Scale bar, 200 μm

4. Scribble の欠損により活性化した ASK1-p38 経路を介して FGF21 が発現誘導される

細胞競合による *scrib^{KD}* 細胞の排除に p38 が関与する報告があることから、p38 に注目して解析を行った。*scrib^{KD}* 細胞において Tet 処置により Scribble を発現抑制すると、FGF21 の発現誘導とともに p38 のリン酸化の亢進が観察された。ここで p38 を発現抑制すると、FGF21 の発現誘導が顕著に抑制された (図 4A)。さらに Tet 処置により p38 を活性化する ASK1 のリン酸化の亢進も観察されたことから ASK1 を発現抑制すると、p38 のリン酸化の亢進の減弱とともに、FGF21 の発現誘導が抑制された (図 4B)。したがって、Scribble の発現抑制により活性化する ASK1-p38 経路が FGF21 を発現誘導することが示された。そこで ASK1 も p38 と同様に細胞競合に関与するか検討した。*scrib^{KD}* 細胞において ASK1 または p38 を発現抑制すると、細胞競合による *scrib^{KD}* 細胞の生存率が回復した (図 4C)。以上より、Scribble の発現抑制により活性化する ASK1 も p38 と同様に細胞競合に必要であることが示された。

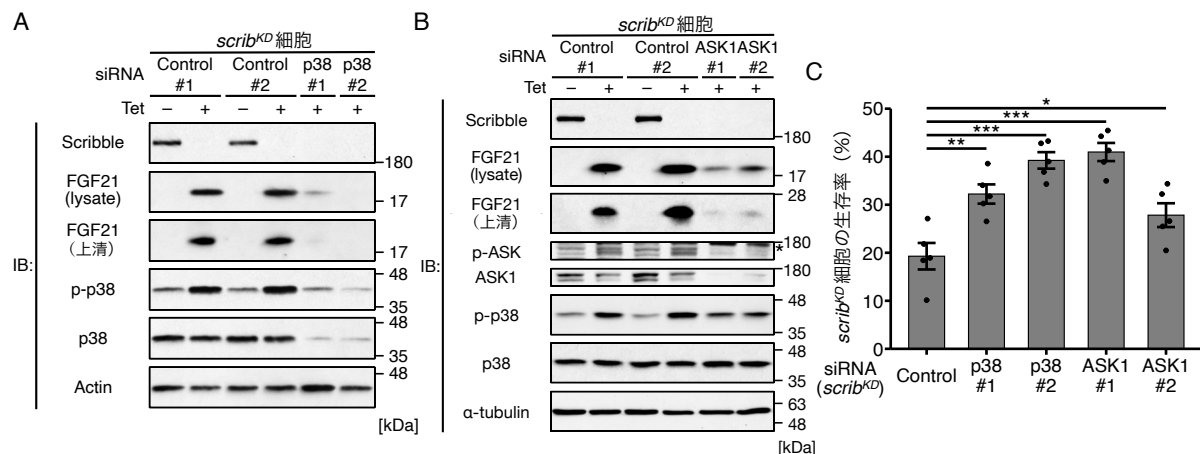


図 4. Scribble の発現抑制により活性化する ASK1-p38 経路は FGF21 の発現誘導を介して細胞競合を誘導する

A) *scrib^{KD}* 細胞で p38 の発現抑制により、Scribble の発現抑制依存的な FGF21 の発現上昇が抑制される。

B) *scrib^{KD}* 細胞で ASK1 の発現抑制により、Scribble の発現抑制依存的な p38 の活性化および FGF21 の発現上昇が抑制される。*; Non-specific bands

C) *scrib^{KD}* 細胞で p38 または ASK1 を発現抑制すると *scrib^{KD}* 細胞の生存率が回復する。(n = 5, *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001, mean ± SEM)

【総括・展望】

本研究において私は、*scrib^{KD}* 細胞から分泌された FGF21 が物理的な圧迫を促進することで細胞競合を誘導することを明らかにした (図 5, 論文投稿中)。これまで FGF21 は主に個体の代謝活性化因子として解析されてきたが、細胞間コミュニケーションを担うという新たな生理学的機能を示した。また哺乳類の細胞競合において排除される細胞から分泌された液性因子が細胞競合を惹起するという新たなタイプの細胞競合誘導機構を提示した。FGF21 KO マウスは肥満食による肝細胞がんの形成を促進することから、FGF21 による細胞競合が生体内でがん抑制機構として働いている可能性がある。今後、本研究が見出した細胞競合誘導機構を標的とした新規がん治療戦略が構築されることが期待される。

図 5. FGF21 による細胞競合のモデル図

正常細胞集団中に *scrib^{KD}* 細胞が生じると、*scrib^{KD}* 細胞から ASK1-p38 経路を介して FGF21 が分泌される。FGF21 は周囲の正常細胞を *scrib^{KD}* 細胞に向かって誘引することで、*scrib^{KD}* 細胞が物理的に圧迫されて排除される。

