

論文の内容の要旨

論文題目 SARM1 を介した極性崩壊上皮細胞の排除メカニズムの解析

氏 名 河原崎 陽介

【序論】

生体の内外を覆っている上皮組織は、外部環境から様々な物理化学的ストレスに直接曝される組織であり、比較的高頻度で細胞に遺伝子変異が誘導される。遺伝子変異により形質転換した細胞は、増殖能や浸潤能の獲得などによりがんの原因となり得る。上皮組織にはその恒常性を維持するために、変異細胞を排除する機構が備わっていると考えられている。

この排除機構に関わる現象のひとつとして、変異細胞が正常細胞と近接したときに、変異細胞が非自発的に排除される細胞競合という概念が提唱されている。Scribble は上皮細胞の頂底極性を担う機能を有する分子だが、Scribble を欠損したショウジョウバエの翅原基が過増殖することなどから、Scribble はがん抑制遺伝子としても知られている。一方、この Scribble 欠損細胞を正常組織中にモザイク状に存在させると、細胞競合により排除されることが知られている。また、哺乳類細胞においても、イヌ腎上皮細胞 (MDCK 細胞) を用いた Scribble 欠損による細胞競合現象が報告されている。テトラサイクリン (以後 Tet と表記) 添加依存的に Scribble をノックダウンできる MDCK 細胞 (以後 Scribble KD 細胞と表記) と正常 MDCK 細胞を混合培養し、Tet を処置すると、細胞競合により Scribble KD 細胞が細胞死によって選択的に排除されることが知られている。Scribble の発現抑制により頂底極性が崩壊した細胞を排除するこのメカニズムは、生体にとって発がん過程における初期段階のがん細胞を取り除き、恒常性を維持する重要な機構と考えられている (Fig. 1)。一方で、この排除機構の詳細な分子メカニズムは未だ不明な点も多く、これを解明することはがんを抑制する新たな治療戦略の構築につながると考えられる。そこで私は、MDCK 細胞の Scribble 発現抑制系を用いて、Scribble 欠損細胞が細胞競合によって排除される分子メカニズムの解明を目指した。

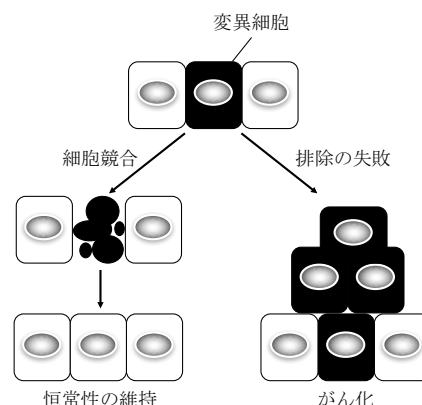


Fig. 1 上皮細胞での細胞競合は恒常性の維持に働く

【方法・結果】

1. MDCK 細胞における Scribble の発現抑制は自律的な細胞死も誘導する

まず私は、細胞競合現象を高い精度で定量的に評価する検出系の構築を行った。GFP 陰性細胞(=正常細胞)および GFP 陽性細胞(=Tet 依存的 Scribble KD 細胞)の混合培養系において、全自動イメージアナライザーを用い、核染色により細胞の数と位置を認識し、個々の細胞の GFP シグナルの有無からそれぞれの細胞数を計測した。正常細胞と Scribble KD 細胞を 10:1 の割合で混合し、Tet 処置有り無し状態で 54 時間培養すると、Tet 無しではほぼ 10:1 の割合が保たれるのに対し、Tet 添加群では、Scribble KD 細胞特異的に細胞数が減少し、細胞競合と思われる現象が検出された。一方、本検出系において、Scribble KD 細胞を単独で培養した場合にも取得した画像中に存在する細胞数の減少が観察された。そこで、細胞培養に用いていた Well 内のすべての細胞数の推移を計測したところ、正常細胞や Tet 非添加群に比べ、Scribble KD 細胞では、Tet 添加 48

時間後から細胞数の低下が見られ、72 時間後には 48 時間後よりも大きく減少することを見出した(Fig. 2)。このことから、MDCK 細胞の細胞競合環境における Scribble KD 細胞の減少には、細胞自律的な細胞死が一因となっている可能性が示唆された。

実際、Scribble KD 細胞の単独培養において、Tet 添加から 72 時間後の時点でアポトーシスの指標である Caspase-3 の活性上昇や、細胞膜崩壊の指標である培養上清への LDH 放出が認められた(Fig. 3)。

これらの結果から、MDCK 細胞の Scribble 発現抑制による細胞競合では、これまでに報告されている周囲の正常細胞からの細胞死誘導作用に加え、Scribble KD 細胞自身が自律的に獲得した脆弱性が寄与する可能性が示唆された。

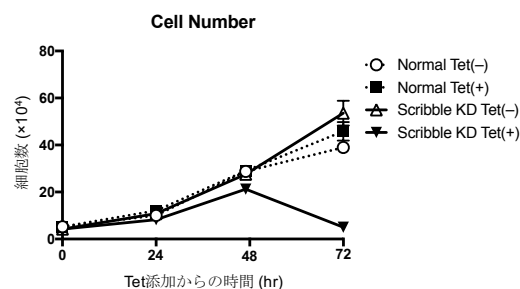


Fig. 2 Scribbleの発現抑制によって細胞数減少が確認された
Means \pm SE, n = 3

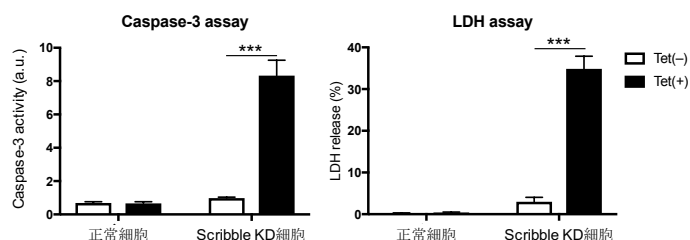


Fig. 3 Scribbleの発現抑制によって細胞死が誘導される
Means \pm SE, n = 4 (Caspase-3 assay), 3 (LDH assay), P*** < 0.001, Unpaired t-test

2. Scribble 発現抑制によって誘導される SARM1 が細胞死および p38 の活性化に必要である

Scribble KD によって誘導される自律的な細胞脆弱性獲得に関わる因子を探索すべく、DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を行った。細胞死を促進する遺伝子に着目したところ *SARM1* が Scribble KD 依存的に発現上昇することを見出した。*SARM1* はウイルス感染時の神経細胞死に必要であることや、ショウジョウバエで *dMyc* の発現量の差異が引き起こす細胞競合に必要であることが報告されている。また、*SARM1* はストレス応答性 MAP3K に属する *ASK1* の活性化因子であることが、線虫の遺伝学的解析や哺乳類の共発現系の実験などから強く示唆されている。これらの知見から、私は Scribble の発現抑制において見られる細胞死が、*SARM1* の発現上昇によってストレス応答性 MAPK シグナルが活性化することによって誘導される可能性を考えた。p38 の活性をモニターしたところ、Scribble KD 依存的な活性化が観察されたが、この活性化は *SARM1* の KD により抑制された(Fig 4)。ASK1 の KD でも同様に p38 の活性化が抑制された。さらに、*SARM1* を KD したところ、Caspase-3 活性ならびに LDH 放出でモニターされる細胞死の表現型が有意に抑制された(Fig. 5)。

ASK1 ならびに p38 の KD によっても、細胞死の抑制が確認された。このことから、Scribble 発現抑制による細胞死は、*SARM1* の発現上昇に依存する *ASK1* – p38 経路の活性化を介することが示唆された。また、*SARM1* の発現抑制は、細胞競合系における、正常細胞との混合状態で観察される Scribble KD 細胞の減少

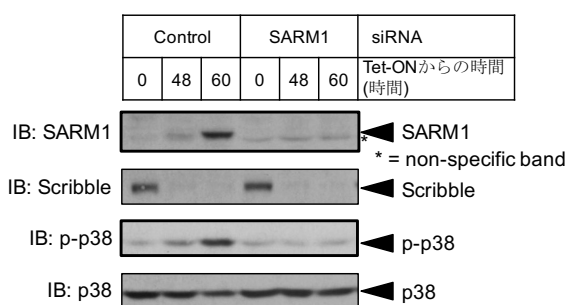


Fig. 4 Scribbleの発現抑制によるp38の活性化には SARM1が必要である

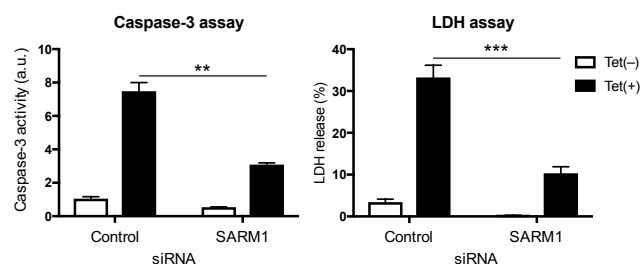


Fig. 5 Scribbleの発現抑制によって誘導される細胞死にはSARM1が必要である
Means \pm SE, n = 3 (Caspase-3 assay), 5 (LDH assay), P** < 0.01, P*** < 0.001, Unpaired t-test

をも抑制することが明らかになった。

3. Scribble の発現抑制による NAD⁺の濃度低下に SARM1 が必要である

SARM1 はごく最近、NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) を分解する NADase として働くことが報告された。この SARM1 の NADase としての働きは前述した神経系での細胞死に必要であることから、MDCK 細胞の Scribble KD によって起こる細胞死における SARM1 NADase 活性の関与を検討した。まず、細胞内 NAD⁺の濃度を測定したところ、Scribble の発現抑制により半分程度に低下した(Fig. 6)。この NAD⁺濃度低下は SARM1 の発現抑制によって有意に緩和された(Fig. 6)。このことから Scribble の発現抑制により発現上昇した SARM1 が NAD⁺を消費することが示唆された。さらに、

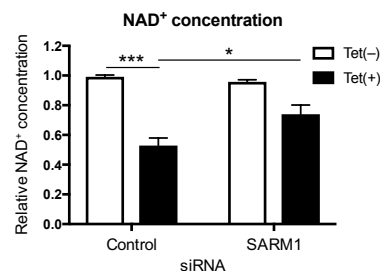


Fig. 6 Scribble KDによりNAD⁺濃度が減少し、その減少にSARM1が必要である
Means ± SE, n = 3, P* < 0.05, P*** < 0.001
One-way ANOVA followed by Tukey's test

SARM1 の NADase 活性が ASK1 の活性化に与える影響について検討した。SARM1 の NADase 活性は SARM1 分子内の TIR ドメインが担うことが報告されているが、TIR ドメインのみを有する SARM1 変異体との共発現により ASK1 の活性化が観察された。さらに、NADase 活性を欠失した TIR ドメイン変異体(E596K)では、共発現による ASK1 の活性化が見られなかった(Fig 7)。この結果から、SARM1 は NADase 活性依存的に ASK1 を活性化することが示唆された。さらに、NAD⁺の前駆体の Nicotinamide riboside を処置し、細胞内 NAD⁺濃度を回復させたときに、Scribble KD によって誘導される p38 活性化および細胞死が抑制された。このことから、この細胞死は SARM1 の NAD⁺分解が ASK1 – p38 経路の活性化を介していることが示唆された。

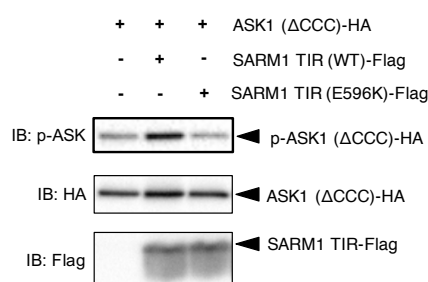


Fig. 7 SARM1によるASK1活性化は NADase活性依存的である

【まとめ・考察】

私は本研究において、Scribble の発現抑制によって細胞自律的に脆弱性が獲得され、ひいては細胞死が誘導されること、そしてその細胞死に SARM1 および ASK1 – p38 経路が必要であることを明らかにした。また、Scribble の発現抑制によって発現誘導される SARM1 が細胞内 NAD⁺の低下を引き起こすことも明らかにした。さらに、SARM1 が NADase 活性依存的に ASK1 を活性化することも示唆されたが、SARM1 の NADase 活性がどのようにして ASK1 を活性化させるかに関しては不明であり、今後明らかにしていきたい。

これまで SARM1 の機能解析は主に神経細胞を用いて行われ、SARM1 がワーラー変性の進行に関与することが示唆されている。一方、本研究で明らかにした、上皮細胞における Scribble 発現抑制による SARM1 の発現上昇とそれを介した細胞死の誘導は、極性喪失というがんの形質に対する重要な防御機構のひとつである可能性があり、SARM1 の新たな生理的意義を提示するものである。がんは複数の遺伝子が順次変異していくことで段階的に発生すると考えられており、実際にショウジョウバエの Scribble 欠損細胞は細胞競合で排除される一方で、Ras 変異が同時に誘導されると、細胞競合によって排除されことなく浸潤能を獲得することが知られている。そのため、単独の遺伝子変異の段階で変異細胞を排除することはがんの予防という観点からも重要であり、今回見出した SARM1 による細胞死誘導メカニズムはその役割を担っていることも考えられる。さらに、SARM1 が本研究で見出した Scribble 欠損以外の極性崩壊や、がんを誘導する他の遺伝子変異においても発現上昇するとすれば、初期の発がんマーカーとしての有用性も考えられ、新たながんの診断や早期の治療への応用も期待できる。