



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	正常上皮細胞層からの変異細胞の逸脱を制御するミオシン-II-スペクトリン複合体の役割の解明
Author(s)	高城, 幹太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13394号
Issue Date	2018-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13394
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72360
Type	doctoral thesis
File Information	Mikio_TAKAGI.pdf



正常上皮細胞層からの変異細胞の逸脱を制御する
ミオシン-II-スペクトリン複合体の役割の解明

北海道大学大学院総合化学院 総合化学専攻

生物化学コース 分子医化学講座 分子腫瘍分野研究室

高城 幹太

目次

要旨

図目次

略語

第 1 章 序論

1.1 細胞競合

1.2 ミオシン

1.3 スペクトリン

1.4 本研究に関わるその他の細胞競合マーカータンパク質

1.4.1 EPLIN

1.4.2 フィラミン

1.4.3 プレクチン

1.4.4 パキシリン

第 2 章 実験方法

2.1 抗体及び試薬

2.2 細胞培養

2.3 免疫蛍光染色法

2.4 免疫沈降法及びウエスタン・ブロッティング法

2.5 データ解析

第 3 章 正常上皮細胞層に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の局在の変化

とその役割

3.1 背景

3.2 正常細胞に囲まれた変異細胞において、NMHC-IIA が細胞非自律的に集積する

3.3 変異細胞における NMHC-IIA の集積が正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側への逸脱に積極的な役割を担う

3.4 変異細胞における NMHC-IIA の集積は F-アクチンに非依存的である

3.5 変異細胞における NMHC-IIA の集積はミオシン-II の活性に依存的である

3.6 正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA と EPLIN の相互作用

3.7 本章の小括

第 4 章 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下においてミオシン-II と結合する

タンパク質の同定

4.1 背景

4.2 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下における NMHC-IIA と強く結合するタンパク質としての α -spectrin の同定

- 4.3 正常細胞に囲まれた変異細胞において β -spectrin が細胞非自律的に集積する
- 4.4 変異細胞における β -spectrin の集積が正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側への逸脱に積極的な役割を担う
- 4.5 変異細胞における β -spectrin の集積は F-アクチンに非依存的である
- 4.6 変異細胞における β -spectrin の集積はミオシン-II の活性に依存的である
- 4.7 正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA と β -spectrin の相互作用
- 4.8 本章の小括

第 5 章 考察

- 5.1 本研究の総括と考察
- 5.2 今後の課題

第 6 章 引用

第 7 章 謝辞

図目次

- 図 1 多段階発がんの仕組み
- 図 2 正常上皮細胞層からの変異細胞の管腔側への逸脱 (Apical extrusion)
- 図 3 ミオシン-II の模式図とその働き
- 図 4 スペクトリンの模式図
- 図 5 実験手順
- 図 6 正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内の NMHC-IIA の集積
- 図 7 正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞内の NMHC-IIA の集積
- 図 8 NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞の樹立
- 図 9 NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を用いた変異細胞の逸脱
- 図 10 サイトカラシン D 添加時の Src 変異細胞における NMHC-IIA の
集積の変化
- 図 11 プレビスタチン添加時の Src 変異細胞における NMHC-IIA の
集積の変化
- 図 12 正常細胞に囲まれた NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞における
EPLIN の集積の変化
- 図 13 EPLIN ノックダウン Src 変異細胞の樹立
- 図 14 正常細胞に囲まれた EPLIN ノックダウン Src 変異細胞における
NMHC-IIA の集積の変化
- 図 15 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA との結合が
増加するタンパク質 α -spectrin の同定

図 16 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下における NMHC-IIA と α -spectrin の共免疫沈降

図 17 正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における α -spectrin の集積

図 18 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下における NMHC-IIA と β -spectrin の共免疫沈降

図 19 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞の樹立

図 20 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において NMHC-IIA と強く結合した β -spectrin は Src 変異細胞側で結合する

図 21 正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin の集積

図 22 正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞における β -spectrin の集積

図 23 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を用いた変異細胞の逸脱

図 24 サイトカラシン D 添加時の Src 変異細胞における β -spectrin の集積の変化

図 25 プレビスタチン添加時の Src 変異細胞における β -spectrin の集積の変化

図 26 正常細胞に囲まれた NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞における β -spectrin の集積の変化

図 27 正常細胞に囲まれた β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積の変化

図 28 正常細胞と Src 変異細胞との間に生じる Apical extrusion を制御する分子メカニズムの模式図

図 29 がんの新規的な予防的治療法の開発

表目次

表 1 ショウジョウバエと哺乳類における正常上皮細胞と変異細胞の細胞競合

略語

MDCK: Madin-Darby canine kidney

shRNA: short hairpin RNA

v-Src: viral Src

c-Src: cellular Src

EPLIN: Epithelial Protein Lost in Neoplasm

Ras: Rat sarcoma

GTP: guanosine triphosphate

EDAC: Epithelial Defense Against Cancer

NM-II: non-muscle myosin-II

NMHC-IIA: non-muscle myosin heavy chain-IIA

要旨

がんの発生過程は、1 つの正常な細胞に 1 つのがん原遺伝子に変異することから始まるとされている。変異した細胞には、さらに複数の変異が生じる。その後、複数の変異が生じた細胞が無秩序に増殖し、悪性化及び転移を経て、がんが発生すると言われている。この考え方を多段階発がん説という。

近年の研究では、がん発生過程の初期段階において、がん原遺伝子である Src もしくは Ras が変異した細胞が、正常上皮細胞層の管腔側へとしばしば逸脱し、排除されることが判明している (Apical extrusion)。この現象は、隣接する細胞が正常細胞ではなく、変異細胞であった場合には生じないということが知られている。したがって、正常細胞層から変異細胞が排除される、もしくは細胞死する現象は、正常細胞と変異細胞の間に生じる、細胞競合現象の一つである。

細胞競合現象に関する最近の研究では、正常細胞層に囲まれた変異細胞において、細胞骨格タンパク質である EPLIN やプレクチン、パキシリンが集積し、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に重要な役割を果たすことが報告されている。また、変異細胞に隣接する正常細胞において、細胞骨格タンパク質であるフィラミンが集積し、変異細胞の Apical extrusion に重要な役割を担うことも報告されている。しかし、正常上皮細胞層から変異細胞を管腔側へと逸脱し、排除させる分子メカニズムは、未だ明らかとなっていない点が多く存在する。

また近年、ミオシン-II の細胞競合現象への関与も注目されている。ミオシン-II は、細胞の移動や分裂に重要な働きを及ぼす細胞骨格タンパク質である。ミオシン-II は重鎖と軽鎖から構成されている。ミオシン-II の活性は、ミオシン軽鎖がリン酸化される

ことによって制御される。また、ミオシン軽鎖のリン酸化は、正常細胞に囲まれた変異細胞において亢進されることが報告されている。さらに、ミオシン-II の活性を抑制するブレビスタチンを添加することによって、正常細胞に囲まれた変異細胞の **Apical extrusion** が抑制されることも分かっている。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の活性が、変異細胞の **Apical extrusion** に対して重要な役割を担うことがこれまでの研究で明らかとなっている。しかし、正常細胞に囲まれた変異細胞内のミオシン-II の局在が、変異細胞の **Apical extrusion** に対してどのような働きをするのか、未だ明らかとなっていない。

本研究では、イヌ腎尿細管上皮細胞由来である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を用いて、1) 正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II が変異細胞の正常上皮細胞層からの逸脱に対する作用を明らかにすること、2) 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、ミオシン-II と結合するタンパク質の探索及び同定すること、を目的とした。本研究が進むことにより、ヒトのがんに対する予防医学において、新規的な治療法を確立することに繋がると考えている。

まず、MDCK 正常上皮細胞に囲まれた MDCK-pTR cSrc Y527F 変異細胞において、非筋肉型ミオシン-II の重鎖である NMHC-IIA (non-muscle myosin heavy chain-IIA) の局在に特異的な変化が生じるのか調べた。すると、Src 変異細胞の単独培養時と比べ、正常細胞に囲まれた変異細胞において NMHC-IIA が強く集積することが示された。また、Src 変異細胞における NMHC-IIA の発現を抑制させると、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の **Apical extrusion** の効率が低下することが分かった。この結果、変異細胞において集積した NMHC-IIA が、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の **Apical extrusion** を積極的に制御することが明らかとなった。

さらに、正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA と結合するタンパク質を解析した。すると、混合培養条件下において NMHC-IIA と強く結合するタンパク質として、スペクトリンを同定した。また、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞におけるスペクトリンのβ鎖であるβ-spectrin の局在の特異的な変化を調べた。すると、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞では、単独培養時よりもβ-spectrin が強く集積した。さらに、β-spectrin の発現を抑制させることで、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion が抑制されることが分かった。その上、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞におけるβ-spectrin の集積は、NMHC-IIA の下流で制御されることが明らかになった。

以上の結果をまとめると、MDCK 正常上皮細胞層に囲まれた Src 変異上皮細胞における、ミオシン-II 及びスペクトリンが細胞非自律的に集積し、正常上皮細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に対して重要な役割を担うことが示された。また、正常細胞に囲まれた変異細胞において集積したスペクトリンがミオシン-II の下流で制御されることも示された。本研究を通じて得られた知見が、正常上皮細胞層に囲まれた変異細胞の Apical extrusion の分子メカニズムをより詳細に解明することへ繋がると考えられる。

キーワード：Apical extrusion, Src, 上皮細胞, ミオシン-II, スペクトリン

第 1 章 序論

1.1 細胞競合

ヒトのがんは、その 80%以上が肺や腸管、腎臓、乳腺などの上皮組織において発症する。したがって、がんの発生過程を研究する上では、上皮細胞におけるがん原遺伝子の変異細胞に着目することが重要である (図 1)。上皮組織において、機能異常した細胞もしくは死細胞が上皮細胞層から排除される現象がしばしば観察されている。このような上皮恒常性の維持機構の一部は、細胞競合によって起こる現象であることが分かってきた。

細胞競合とは、増殖速度や適応度など異なる性質をもつ細胞が自らの生存のために互いに細胞非自律的に競合し、最終的に一方の細胞が増殖して他方の細胞が排除される現象のことである¹⁻¹¹。この現象は、ショウジョウバエを用いた実験において初めて発見された¹²。ショウジョウバエのリボソームタンパク質のヘテロ変異体である *Minute* 変異細胞は、その増殖速度が野生型に比べて遅いが、正常に個体発生する。しかし、*Minute* 変異細胞と野生型細胞を混合培養させると、変異細胞のみが排除されることが分かった^{12,13}。また、がん遺伝子である *Csk* 欠損による変異細胞が上皮細胞層からの排除される現象が報告されている¹⁴。変異細胞の排除のみならず、*myc* の発現量の差異¹⁵⁻¹⁶、もしくは *apico-basal* 極性遺伝子である *scribble* の機能欠失¹⁷によって、正常細胞に囲まれた変異細胞がアポトーシスによって細胞死する現象も報告されている。このように、正常細胞と様々な変異細胞による細胞競合が生じることが、ショウジョウバエを用いた実験により報告されている (表 1)。

また、ショウジョウバエ以外に哺乳類培養細胞を用いた実験でも、細胞競合現象が確認されている。例えば、がん抑制遺伝子である *Scribble* の発現を抑制させた変異細

胞が正常上皮細胞に囲まれると、アポトーシスによって変異細胞が細胞死し、排除されることが報告されている¹⁸。この他に、イヌ腎尿管上皮細胞由来の MDCK 細胞培養系において、がん原遺伝子である Ras や Src が変異した細胞が正常上皮細胞に囲まれた時、変異細胞が上皮細胞層の管腔側へと逸脱し、排除されるということが知られている (表 1, 図 2)¹⁹⁻²³。そこで、次に Ras 及び Src について説明する。

Ras は低分子量 GTP 結合タンパク質スーパーファミリーの一つであり、細胞の増殖や分化、生存、運動能など様々な細胞内プロセスを制御する²⁴。また、様々な種類の腫瘍において Ras 活性型の変異が確認されている。細胞競合現象の研究では、テトラサイクリン誘導性の活性変異型 Ras (RasV12) を発現する変異細胞を用いて、正常上皮細胞に囲ませると、変異細胞が上皮細胞層の管腔側へと排除されることが報告されている¹⁹。この現象は、Ras 変異細胞が単独培養された時には生じなかった。したがって、正常上皮細胞層に囲まれた RasV12 変異細胞は細胞非自律的に上皮細胞層から排除されることが明らかとなっている。

また、Src は非リセプター型のチロシンキナーゼで、様々なタンパク質のチロシン残基のリン酸化によって細胞増殖や細胞骨格、細胞間接着など様々な細胞内外プロセスに関与している^{25,26}。ラウス肉腫ウイルス由来 *Src* (*v-Src*) は 1977 年に初めて発見されたがん原遺伝子である²⁷。これまでに、多くのヒトのがんにおいて、Src の細胞性遺伝子である *c-Src* の発現の増加や活性の上昇が確認されている²⁸。細胞競合現象の研究では、温度感受性変異型である *v-Src* を発現する変異細胞が正常細胞に囲まれた時、Ras と同様、Src 変異細胞が正常細胞層から管腔側へと逸脱し、排除されることが報告されている²⁰。この現象は、Src 変異細胞が単独培養された時は生じなかった。したがって、Src 変異細胞も Ras 変異細胞と同様、正常細胞層に囲まれた変異細胞が細胞非自律的に排除されることが分かっている。

以上の報告より、Ras もしくは Src 変異細胞が正常上皮細胞層から排除される現象では、正常上皮細胞と変異細胞が互いに存在を認識することによって、変異細胞が上皮細胞層から積極的に排除されるのではないかと考えられる。この機構は、正常上皮細胞が免疫細胞の影響を受けることなく、抗腫瘍活性をもつことを意味しており、この防御機構は EDAC (epithelial defense against cancer) と呼ばれている²⁹。EDAC は、哺乳類培養細胞以外に、ゼブラフィッシュの受精卵²⁰ やマウス個体^{30,31} を用いた *in vivo* 実験系の条件下での実験でも確認されている。しかし、EDAC の分子メカニズムは未だに明らかとなっていない点が多く残されている。

本研究では、正常細胞と変異細胞間の細胞競合における重要なタンパク質として、細胞骨格タンパク質であるミオシン-II とスペクトリンに着目している。そこで、ミオシン-II とスペクトリンについて、これまでに明らかとなっている機能について述べる。また、これまでの細胞競合現象の研究において報告されているタンパク質についても説明する。

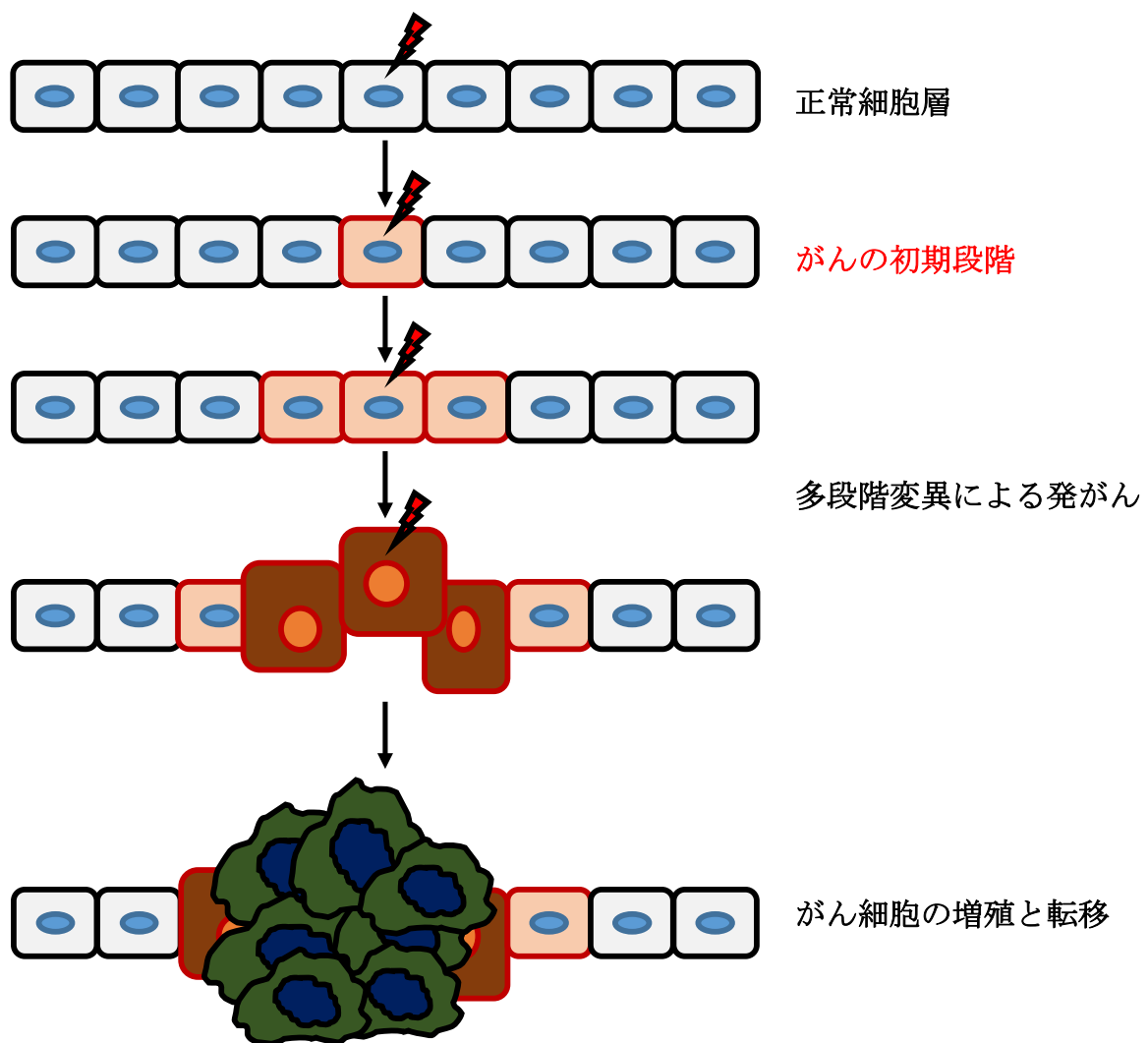


図 1 多段階発がんの仕組み

発がんの初期段階では、正常上皮細胞層内の 1 つの細胞に変異が生じる。その後、変異細胞は隣接する正常上皮細胞に囲まれながら複数の変異が生じ、無秩序に増殖する。その後、悪性化及び転移が進み、最終的にがんが発生する。

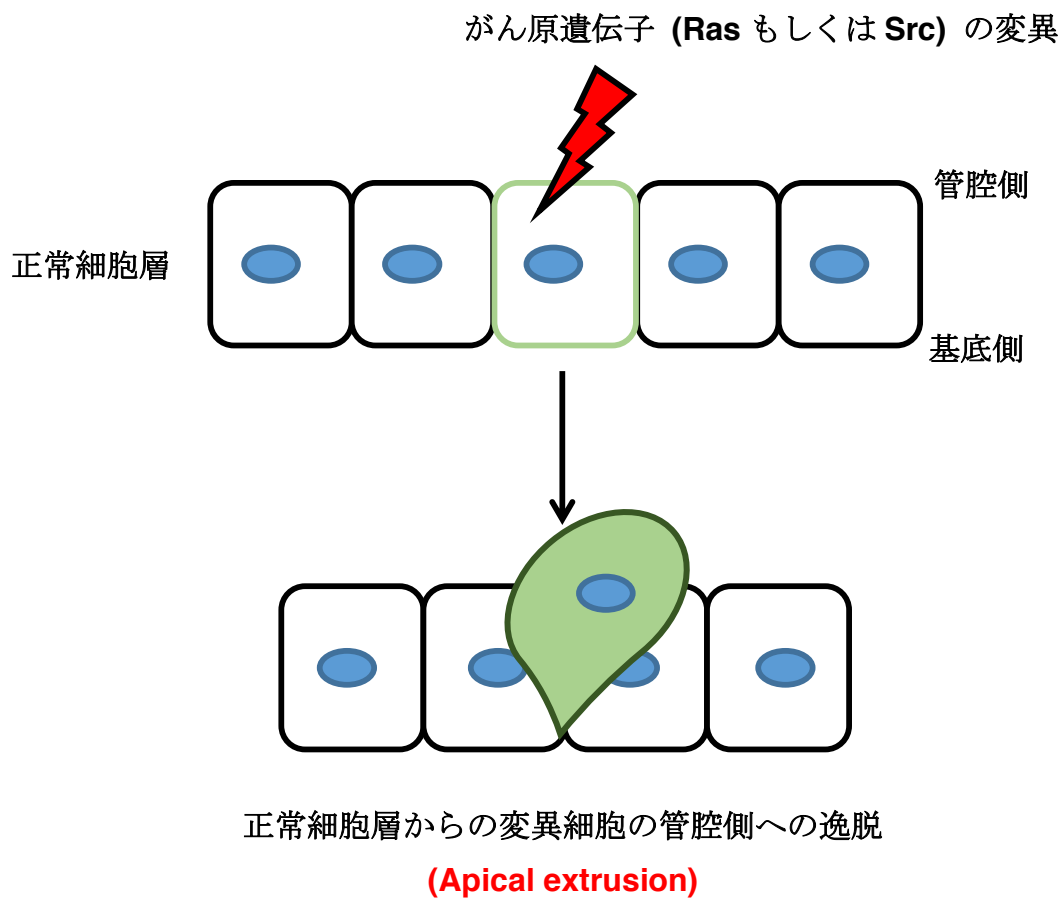


図 2 正常上皮細胞層からの変異細胞の管腔側への逸脱 (**Apical extrusion**)

がんの初期段階において、1 つの変異が生じた細胞は正常細胞層から管腔側へと逸脱する。この変異細胞が逸脱する現象を **Apical extrusion** という。

変異	生じる現象	引用
<i>Drosophila</i>		
Minute	<i>Minute</i> 変異細胞のアポトーシス	Morata and Ripoll, 1975
Myc	<i>Myc</i> の発現量が低い細胞のアポトーシス	Moreno and Basler, 2004 De la Cova et al., 2004
Src (Csk)	<i>Src</i> 変異細胞のApical extrusionとアポトーシス	Vidal et al., 2006
Scribble	<i>Scribble</i> ノックダウン細胞のアポトーシス	Brumby and Richardson, 2003
Ras	<i>Ras</i> 変異細胞のApicalもしくはBasal extrusion	Hogan et al., 2009
Lgl/Mahjong	<i>Mahjong</i> もしくは <i>Lgl</i> ノックダウン細胞のアポトーシス	Grzeschik et al., 2007 Tamori et al., 2010
Mammals		
Ras	<i>Ras</i> 変異細胞のApical extrusionもしくはBasal protrusion	Hogan et al., 2009
Src	<i>Src</i> 変異細胞のApical extrusion	Kajita et al., 2010
Scribble	<i>Scribble</i> ノックダウン細胞のアポトーシス	Norman et al., 2012
Mahjong	<i>Mahjong</i> ノックダウン細胞のアポトーシス	Tamori et al., 2010
ErbB2	<i>ErbB2</i> を過剰発現させた細胞のApical extrusion	Leung and Brugge, 2012
p53	p53変異細胞のネクロプトーシス	Watanabe et al., 2018

表 1 ショウジョウバエと哺乳類における正常上皮細胞と変異細胞の細胞競合

1.2 ミオシン

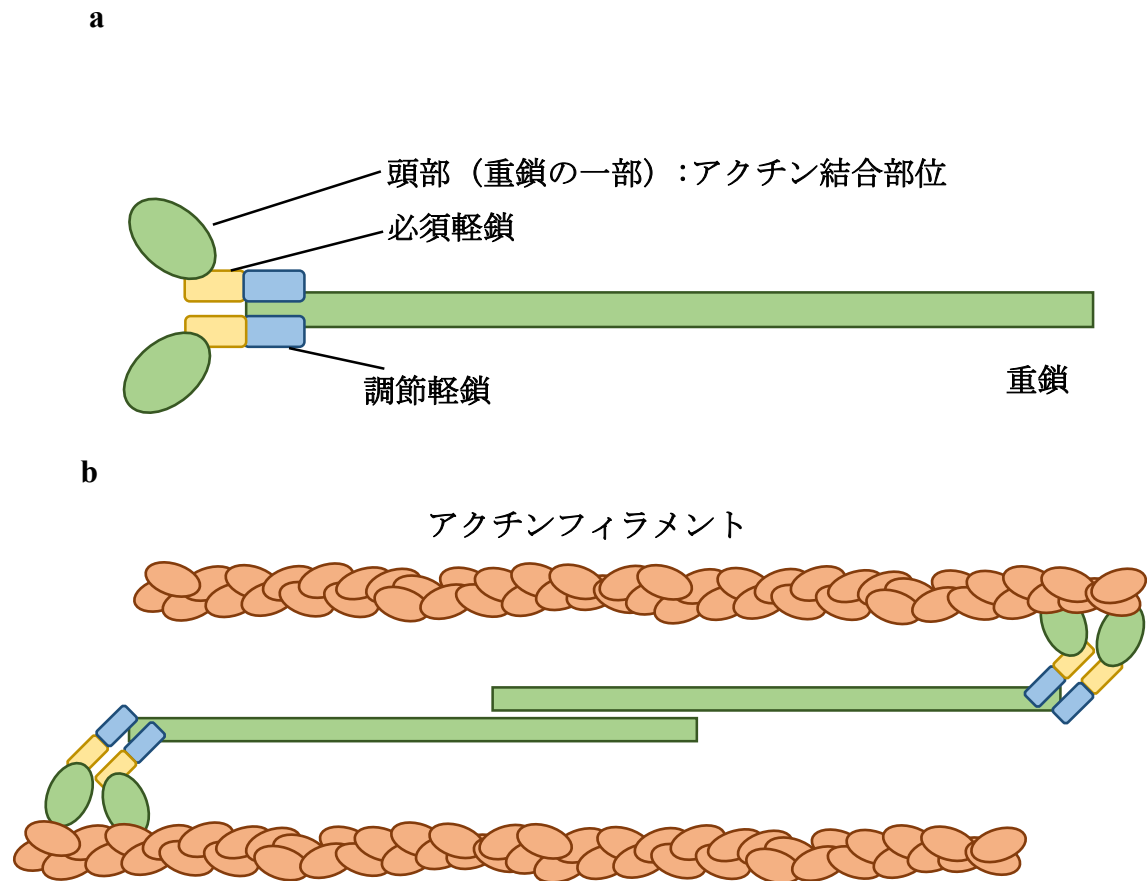
ミオシンは様々な物理的な力を要する細胞内プロセスにおいて重要な役割を担う、モータータンパク質のスーパーファミリーをである³²⁻³⁴。ミオシンの機能には、i) アクチンフィラメント上を移動する、ii) アクチンフィラメントがスライドする運動を促進させる、iii) アクチンフィラメントの張力を生み出す、という働きがある (図 3b)。これらのミオシンの運動にはエネルギーが必要であり、ATP の加水分解によって運動エネルギーが供給される。ミオシンには ATPase 活性をもつ触媒部位が存在し、その活性を利用してアクチンフィラメントを運動させている。ミオシン触媒部位は分子の N 末端である頭部にしばしば存在し、触媒部位はアクチンと結合することによって活性化される。また、いくつかのミオシンは C 末端側で細胞内の積み荷タンパク質と結合し、運搬する。一方、その他のミオシンは C 末端にてフィラメントで自己会合し、その頭部にアクチンフィラメントと結合させ、張力を働かせる³⁴。また、ミオシンは、インテグリンなどの接着関連タンパク質もしくはシグナル変換分子を近接させるために、アクチンを介して間接的に作用する³⁴。

ほとんどのミオシンは、クラス II に属している。ミオシン-II は、アクチンとともに心筋や骨格筋、平滑筋の収縮性のあるタンパク質を作り上げる。そして、ミオシンフィラメントとアクチンフィラメントが結合したスライドする架橋が、血液の循環や生体内における物質の運搬、胎児の排出などに対して力を供給する³⁴。また、筋肉部位のものと機能が構造が類似したミオシン分子は、非筋肉由来の真核細胞に存在することが明らかとなっている³⁴。非筋細胞及び組織におけるミオシン-II は、細胞移動や細胞分裂、細胞接着といった細胞の運動や再形成を必要とする過程に重要な働きを及ぼす³⁴。

ミオシン-II は筋肉型と非筋肉型に分類され、非筋肉型ミオシン-II (NM-II) は全ての真核細胞に存在する。NM-II はホモ二量体を構成する 230 kDa の重鎖と 20 kDa の 2 つの調節軽鎖、そして 17 kDa の 2 つの必須軽鎖から構成されている (図 3a)³⁴。ミオシンの調節軽鎖は、ATP の加水分解によって NM-II の活性を制御する働きがあり、必須軽鎖は重鎖の構造を安定化させる役割を担う³⁴。

NM-II の主な機能として、細胞の移動や分裂、形態変化等の細胞プロセスを制御することが挙げられる。NM-II は、アクチンとの架橋結合及び NM-II のリン酸化や活性によって制御された収縮力を利用して、上記の現象に関わる³²⁻³⁴。哺乳類細胞の NM-II は、重鎖の種類 (NMHC-IIA, B, C) によって決定され、NM IIA、IIB、IIC の 3 種類のアイソフォームが存在する。その中で、NM IIA は細胞間接着を安定化させる上で必要であることが報告されている³⁴。

細胞競合現象の最新の研究において、NM-II の軽鎖のリン酸化が正常細胞に囲まれた Src もしくは Ras が変異した細胞内で亢進することが報告されている^{19,20}。しかし、ミオシン軽鎖のリン酸化の亢進は変異細胞の単独培養では観察されていない。この結果、変異細胞に隣接する正常細胞の存在により、NM-II の軽鎖の活性化が細胞非自律的に誘導されると考えられる。さらに、ミオシン-II の活性を抑制するプレビスタチンの添加や変異細胞のミオシン軽鎖の機能阻害変異体が、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion を抑制することも報告されている^{19,20}。



Vicente-Manzanares, M. *et al.*, 2009 より改変

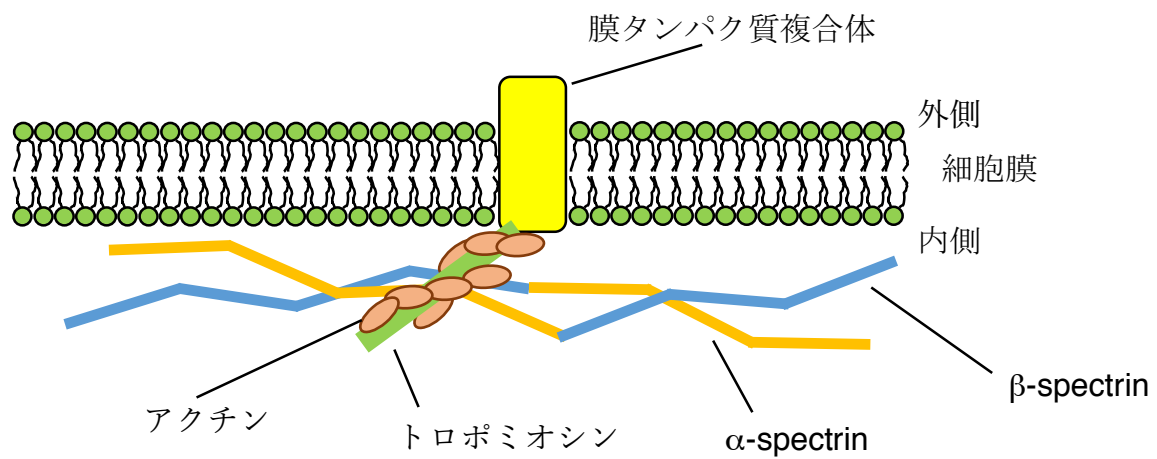
図 3 ミオシン-II の模式図とその働き

(a) ミオシン-II の模式図。ミオシン-II は重鎖と 2 種類の軽鎖から構成される。ミオシン重鎖には、アクチン結合部位が存在し、ミオシン重鎖の頭部に位置する。(b) ミオシン-II は二量体を形成し、上図のようにアクチンフィラメントと結合し、細胞移動や細胞分裂を行う。

1.3 スペクトリン

スペクトリンは動物細胞に存在する細胞膜骨格の主要なタンパク質であり、細胞膜の内側に位置する。スペクトリンの機能として、有核細胞において細胞膜の安定化や細胞の構造及び形状の維持に関与することが知られている。細胞膜の内側に存在するスペクトリンはアクチン及びトロポミオシンを介して、膜タンパク質複合体と結合する^{35,36}。この結合によって、スペクトリンは細胞膜で足場を構成し、細胞の形状を維持する (図 4)。

スペクトリンは α 鎖と β 鎖の 2 つのサブユニットから成り、主にヘテロ四量体として存在する。それらのサブユニットは、桿体状の α 鎖と β 鎖の二量体から構成され、左右交互に組まれている (図 4)。哺乳類において、 α 鎖は α I-と α II-スペクトリンがあり、全ての非赤血球細胞では α II-スペクトリンのアイソフォームが発現する。また、 β 鎖は β I-から β V-スペクトリンが存在する。これらのアイソフォームの発現は、複合組織及び発生段階の時期特異的に制御される。これらのスペクトリンの β 鎖の中で、 β II-スペクトリンは全ての有核細胞に存在することが分かっている。また、NM IIA はスペクトリン-アクチン細胞膜骨格と相互作用することが、これまでの研究で明らかとなっている^{37,38}。細胞競合現象の研究において、スペクトリンが正常上皮細胞に囲まれた変異細胞の逸脱及び排除に重要であるということはこれまでに報告されていない。



Machnicka, B., *et al.*, 2014 より改変

図 4 スペクトリンの模式図

スペクトリンは α 鎖と β 鎖から構成されており、上図のように細胞膜の内側に位置する。そして、スペクトリンはアクチンとトロポミオシンを介して、膜タンパク質複合体と結合し、細胞の形状を維持する足場タンパクとしての役割をもつ。

1.4 本研究に関わるその他の細胞競合マーカータンパク質

1.4.1 EPLIN

EPLIN (epithelial protein lost in neoplasm) はアクチン結合タンパク質として元来同定されており、ヒトの上皮組織に発現することが知られている。しかし、様々ながん細胞では、しばしば EPLIN の発現が減少もしくは消失することが報告されている³⁹⁻⁴¹。また、EPLIN はその機能としてアクチンと相互作用し、アクチンフィラメントを架橋結合もしくは安定化させることによって、アクチンフィラメントの動きを制御する⁴²。さらに、EPLIN は α -カテニンとも相互作用する。それによって、EPLIN はカドヘリン-カテニン複合体をアクチンフィラメントに関連づけるということが知られている。したがって、EPLIN は細胞の接着結合の確立に重要な働きを及ぼすタンパク質であることが分かる⁴³。また、細胞競合現象の研究では、変異細胞における EPLIN は単独培養した時に比べ、正常細胞に囲まれた時に変異細胞の頂端側及び側面に集積することが分かっており、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に重要な因子であることが明らかとなっている⁴⁴。

1.4.2 フィラミン

フィラミンはホモ二量体のアクチン結合タンパク質であり、細胞表層の F-アクチンフィラメントと架橋結合し、フィラメントを安定化させる⁴⁵⁻⁴⁸。また、フィラミンは 3 種類（フィラミン A, B, C）のホモログが存在する。フィラミン A と B はどちらも広範に発現しており、一方でフィラミン C は筋肉組織において特異的に発現する。フィラミンは膜貫通タンパク受容体やシグナル分子を含む多くのタンパク質と結合し、細胞接着や細胞移動、転写制御といった様々な細胞プロセスに関わっている。さら

に、フィラミンは細胞内の機械的なシグナル伝達にも関わっているということも判明している⁴⁹。また、細胞競合現象の研究では、変異細胞が正常細胞に囲まれた時、変異細胞に隣接する正常細胞において、フィラミンが特異的に集積し、正常細胞に囲まれた変異細胞の **Apical extrusion** に対して重要な役割を担う因子であるということが報告されている²⁹。

1.4.3 プレクチン

プレクチンは高分子量 (> 500 kDa) の多用途の細胞骨格のリンカータンパク質である⁵⁰⁻⁵³。また、プレクチンの機能として、微小管や中間径フィラメントを含む多くの細胞骨格タンパク質と結合し、細胞骨格ネットワークの確立や動的な調節に関わることが知られている。プレクチンは、全ての種類の間径フィラメントやアクチンフィラメントと結合するだけではなく、膜貫通受容体や核膜の構成物と結合したり、細胞移動や増殖、エネルギー代謝といった既知の役割をもつ幾つかのキナーゼと結合したりすることが報告されている⁵²。さらに細胞競合現象の研究では、変異細胞におけるプレクチンは単独培養した時に比べ、正常細胞に囲まれた時に特異的に集積することが分かっており、正常細胞に囲まれた変異細胞の **Apical extrusion** における制御因子であることが判明している⁵⁴。

1.4.4 パキシリン

パキシリンは一般的に、細胞と細胞外マトリックスの細胞接着部位の細胞の内側に局在する足場タンパク質として知られている⁵⁵。また、パキシリンはインテグリンを介した接着斑の複合体を構成するタンパク質としても報告されている⁵⁵。さらに、微

小管のアセチル化やゴルジ体の構造、極性をもった細胞の移動を制御するために、パキシリンがヒストン脱アセチル化酵素である HDAC6 を抑制することも報告されている⁵⁶。細胞競合現象の研究において、変異細胞におけるパキシリンは、変異細胞を単独培養した時に比べて、正常細胞に囲まれた時に特異的に集積し、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion を制御する上で重要な因子であることが明らかとなっている⁵⁷。

1.5 本研究の目的

これまで、哺乳類培養細胞を用いた細胞競合に関する研究において、ミオシン-II の活性が変異細胞の正常上皮細胞層からの排除に重要な役割を担うことが示されてきた。しかし、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の局在やその制御メカニズム等、細胞競合現象に対する詳細な働きについては未だ明らかになっていない点が多く残っている。そこで本研究では、MDCK 細胞を用いて、1) 正常上皮細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II が、変異細胞の正常上皮細胞層からの逸脱に対する作用を明らかにすること、2) 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、ミオシン-II と結合するタンパク質の探索及び同定、を目的として本研究を進めた (図 5)。

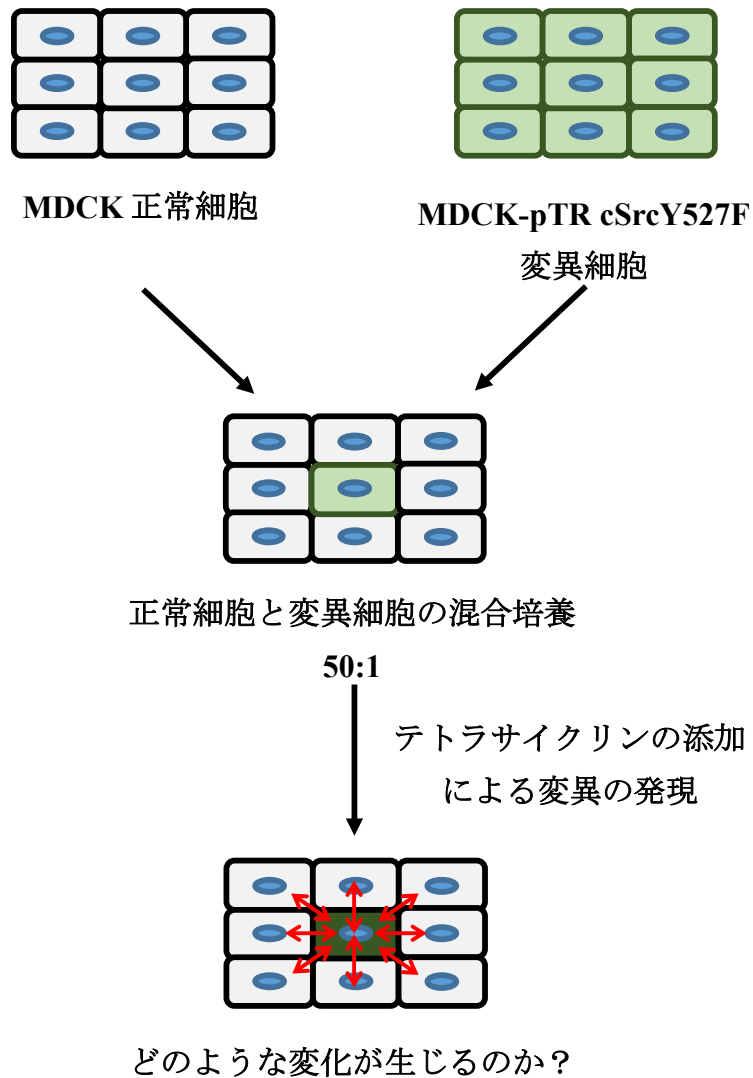


図 5 実験手順

MDCK 正常細胞; 極性をもつ上皮単細胞層を形成する哺乳類培養細胞、MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞; テトラサイクリン誘導性の GFP タグをもつ発がん性 cSrcY527F を発現させる MDCK 細胞。

正常細胞に囲まれた変異細胞において、条件特異的にどのような変化が生じ、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に影響を及ぼすのか調べた。

第 2 章 実験方法

2.1 抗体及び試薬

Rabbit 抗 NMHC-IIA (LS-B2802) 抗体は LifeSpan BioSciences, Inc より購入した。

Rabbit 抗 NMHC-IIA (M 8064) 抗体は Sigma-Aldrich より購入した。前者は免疫蛍光染色法に利用し、後者はウェスタン・ブロッティング法及び免疫沈降法に利用した。

Mouse 抗 EPLIN (sc-136399) 及び Mouse 抗 β -spectrin (sc-136074) 抗体は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。Mouse 抗 α -spectrin (MAB1622) 抗体及び Mouse 抗 actin (Clone C4) 抗体は Millipore より購入した。Alexa-Fluor-568 及び-647 二次抗体は ThermoFisher Scientific より購入した。Hoechst 33342 (Life Technologies) は免疫蛍光染色法にて 1:5,000 の希釈率にて使用した。上記の一次抗体は免疫蛍光染色法にて 1% BSA を含んだリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて 1:100 の割合で希釈した。さらに、二次抗体は 1:200 の割合で同様に希釈した。Alexa-Fluor-647 ファロイジン (Life Technologies) は 1.0 U ml^{-1} の濃度にて使用した。ウェスタン・ブロッティング法では、全ての一次抗体を 1:1,000 の希釈率で、二次抗体も 1:1,000 の希釈率で使用した。本研究にて使用した阻害剤は以下の通りである；サイトカラシン D (Sigma-Aldrich, 100 nM) 及びブレビスタチン (Millipore, 30 μM)。DMSO (Sigma-Aldrich) はコントロールとして添加した。

2.2 細胞培養

イヌ腎尿細管上皮細胞由来である MDCK 及び MDCK-pTR GFP-cSrcY527F、ts-Src MDCK 細胞は先行研究と同様の方法を用いて培養した^{19,44}。EPLIN-shRNA を恒常的に発現させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞は先行研究にて用いた shRNA を利用して樹立した⁴⁴。NMHC-IIA-shRNA もしくは β -spectrin-shRNA を恒常的に発現させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞は以下の配列の shRNA を用いて樹立した。

NMHC-IIA-shRNA 配列をコードする二重鎖 DNA 断片 (NMHC-IIA-shRNA sequences

(NMHC-IIA -shRNA1: 5'-GATCCCC GCTGCTAAGAAGCTGGTAT TTCAAGAGA

ATACCAGCTTCTTAGCAGC TTTTTC-3' and 5'-

TCGAGAAAAAGCTGCTAAGAAGCTGGTAT

TCTCTTGAAATACCAGCTTCTTAGCAGCGGG-3' or NMHC-IIA-shRNA2: 5'-

GATCCCCGCAACTGACAGCCATGAAATTCAAGAGATTTTCATGGCTGTCAGTTGCTTT

TTC-3' and 5'-

TCGAGAAAAAGCAACTGACAGCCATGAAATCTCTTGAAATTTTCATGGCTGTCAGTTG

CGGG-3') or β -spectrin-shRNA sequences (β -spectrin-shRNA1: 5'-

GATCCCCGCACAGGTTTGAGAGCCTTTTCAAGAGAAAGGCTCTCAAACCTGTGCTT

TTTC-3' and 5'-

TCGAGAAAAAGCACAGGTTTGAGAGCCTTTCTCTTGAAAAGGCTCTCAAACCTGTG

CGGG -3' or β -spectrin-shRNA2: 5'-GATCCCCGCACACTACATTTGAGCAT

TTCAAGAGAATGCTCAAATGTAGTGTGCTTTTTTC-3' and 5'-

TCGAGAAAAAGCACACTACATTTGAGCATTCTCTTGAAATGCTCAAATGTAGTGTG

CGGG-3')) は pSUPER.neo + gfp (Oligoengine) の *Bgl*III 部位と *Xho*I 部位に挿入されてい

る。MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて、

pSUPER.neo + gfp NMHC-IIA-shRNA もしくは β -spectrin-shRNA を遺伝子導入させた。

その後、 $5\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ blasticidin (InvivoGen) 及び $400\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ zeocin (InvivoGen) 、
 $800\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ G418 (Life Technologies) を含む培養液で抗生物質選択を行なった。GFP-cSrcY527F の発現を誘導させるため、テトラサイクリン誘導型 MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を $2\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ テトラサイクリン (Sigma-Aldrich) を用いて処理した。阻害剤添加実験では、**2.1.** の項にて述べた阻害剤をテトラサイクリンとともに添加した。テトラサイクリン添加後は 16 もしくは 24 時間細胞を培養した。免疫蛍光染色法もしくは正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion を解析するために、細胞を Type-I collagen をマウントさせたカバーガラスに播種した。Type-I collagen (Cellmatrix Type I-A) は新田ゼラチンにて購入し、メーカーの説明に基づいて最終濃度が 2 mg ml^{-1} となるように氷上で中和させて使用した。

2.3 免疫蛍光染色法

MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を MDCK 細胞と 1:50 の割合で混合させ、先行研究と同様の方法でコラーゲンマトリックス上にて培養した¹⁹。免疫蛍光染色法にて解析するために、単層形成するまで混合した細胞を 8 から 12 時間培養した。その後、16 時間テトラサイクリン処理を行った。

テトラサイクリンで処理した後、PBS を溶媒とした 4%パラフォルムアルデヒドで細胞を固定させ、PBS を溶媒とした 0.5% Triton X-100 にて透過処理を行い、PBS を溶媒とした 1% BSA にてブロッキングを行なった。一次抗体は 2 時間インキュベートし、二次抗体は 1 時間インキュベートした。それぞれの作業を全て、室温にて行った。

免疫蛍光染色した画像は Olympus FV1200 システムと Olympus FV10-ASW ソフトウェアにて取得した。免疫蛍光染色の蛍光強度を定量化するために、各実験で 1 つのサンプルに対する 30 個以上の変異細胞の解析を MetaMorph (Molecular Devices) ソフトウェアを用いて行った。

変異細胞の Apical extrusion 実験の解析を行う上では、サンプルは上記の通り行い、テトラサイクリンは 24 時間処理した。各実験にて 1 つのサンプルに対する変異細胞を 30 個以上の細胞を解析し、管腔側へ逸脱した細胞を定量化した。

2.4 免疫沈降法及びウエスタン・ブロッティング法

免疫沈降法を行うために、MDCK 細胞 0.9×10^7 個と MDCK ts-Src 細胞もしくは MDCK-pTR cSrcY527F 細胞各々 0.9×10^7 個の混合培養、そして MDCK 細胞もしくは ts-Src MDCK 細胞、MDCK-pTR cSrcY527F 細胞各々 1.8×10^7 個を 14.5-cm の培養皿に播種した。これらのサンプルを各実験にて 14.5-cm の培養皿 1 もしくは 2 枚分を用いた。その後、細胞が単層を形成するまで図 15 の実験では 40.5°C にて、図 16-18 の実験では 37°C にて 9 時間培養した。その後、図 15 では ts-Src の活性を誘導するために 35°C で、図 16-18 では cSrcY527F の活性を誘導するためにテトラサイクリンを添加して 37°C で培養した。図 15 の実験では 35°C にて 14 時間、図 16-18 の実験ではテトラサイクリン添加後 37°C で 16 時間培養した後、1 mM Na_3VO_4 を含む ice-cold PBS で細胞を洗浄し、1 mM Na_3VO_4 及び 10 mM NaF、 $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride、7.2 trypsin inhibitor units の aprotinin を含む Triton X-100 lysis buffer (20 mM Tris-HCl [pH 7.5]、150 mM NaCl、1% Triton X-100) を用いて 30 分間、回収した細胞を溶解し、ライセートを作製した。細胞ライセートを 21,500 g で 10 分間遠心した後、まず上清を Protein G sepharose を用いて 4°C にて 30 分間 pre-clear を行った。次に、pre-clear された細胞ライセートを、control rabbit IgG (5 もしくは 10 μg) を結合させた Dynabeads protein G (Life Technologies) と 4°C で 30 分間インキュベートし、最後に rabbit 抗 NMHC-IIA 抗体 (5 もしくは 10 μg) と結合した Dynabeads Protein G と 4°C で 1 時間免疫沈降させた。免疫沈降化したタンパク質を SDS-PAGE 法にて処理し、SYPRO® Ruby タンパク質ゲル染色試薬 (Life Technologies) もしくは 2.1 にて記述した抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法を行った。SYPRO® Ruby タンパク質ゲル染色法はメーカーの説明に基づいた方法で行った。ウエスタン・ブロッティング法は先行研究と同様の方法を用いて行った⁵⁸。一次抗体は

1:1000 の希釈率にて使用した。染色したゲル及びウエスタン・ブロッティングのデータは ImageQuantTM LAS4010 (GE healthcare) を用いて解析した。

検出したタンパク質のバンドは、先行研究にて行なった同様の方法での質量分析法により同定した²⁹。NMHC-IIA 及び β -spectrin、EPLIN のノックダウン効率を調べるために、NMHC-IIA-shRNA もしくは β -spectrin-shRNA、EPLIN-shRNA を恒常的に発現させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を 6-well dishes (Corning) 上に細胞を播種した。播種した 12 から 24 時間後、細胞を以下のタンパク質分解酵素阻害剤を含む Triton X-100 lysis buffer で溶解した ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$ leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 7.2 trypsin inhibitor units of aprotinin)。その後、SDS-PAGE sample buffer にて直接煮沸した。

2.5 データ解析

データを解析するために、両側のスチューデントの t 検定は統計解析の P 値を決定するために行われた。

第 3 章 正常上皮細胞層に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II

の局在の変化とその役割

3.1 背景

哺乳類細胞を用いた細胞競合に関する先行研究において、正常上皮細胞に囲まれた Src 及び Ras 変異細胞は上皮細胞層の頂端部へと逸脱し、排除されることが明らかとなっている。また、これまでに正常細胞に囲まれた変異細胞内や変異細胞に隣接する正常細胞における様々な細胞骨格タンパク質の変化やそれらの相互作用を解明してきた。しかし、それらの細胞競合現象に対する機能は、未だに明らかとなっていない点も多く存在する。また、正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側への逸脱は、変異細胞を単独培養させた場合には生じず、正常細胞に囲まれた時に特異的に生じることが知られている、したがって、この変異細胞の逸脱現象は変異細胞とそれと隣接する正常細胞は互いに認識し合うことによって生じると考えられる。しかし、どのようにして正常細胞と変異細胞が相互に認識しあうのか、そのメカニズムも未だ判明していない。

ミオシン-II はあらゆる細胞において、物理的な働きを行う上で重要なタンパク質であり、細胞移動や細胞分裂、細胞の形態変化などに対して重要な役割を担う³²⁻³⁴。これまでの細胞競合現象に関する研究では、正常細胞に囲まれた変異細胞においてミオシン-II の軽鎖のリン酸化が条件特異的に亢進することが分かっている^{19,20}。この結果より、変異細胞内のミオシン-II の軽鎖のリン酸化が正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に関わると考えられる。また、変異細胞を正常細胞に囲ませた状態でミオシン-II の活性阻害剤であるブレビスタチンを添加すると、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion の効率が低下することも明らかとなっている²⁰。この結果か

ら、変異細胞もしくはそれに隣接する正常細胞のどちらかのミオシン-IIの活性が正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に重要であることが分かる。しかし、ミオシン-II 自体の局在の変化は、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対して重要であるかどうか、未だ明らかとなっていない。本研究では、ミオシン-II の活性だけでなく、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の局在が変異細胞の Apical extrusion に対してどのような働きを及ぼすのかについて明らかにした。

3.2 正常細胞に囲まれた変異細胞において、NMHC-IIA が細胞非自律的に

集積する

MDCK 正常細胞に囲まれた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の Apical extrusion に対するミオシン-II の局在の変化を明らかにするため、非筋肉型ミオシン-II の重鎖 (NMHC-IIA) の局在について免疫蛍光染色法にて調べた。すると、Src 変異細胞が正常上皮細胞によって囲まれると、NMHC-IIA が Src 変異細胞において強く集積することが分かった (図 6)。また、Src 変異細胞が単独で存在する場合には、NMHC-IIA の局在は観察されず、免疫蛍光染色による NMHC-IIA の蛍光強度は正常細胞のそれと同等の結果になった (図 6b)。この結果より、Src 変異細胞に隣接する正常細胞の存在が変異細胞における NMHC-IIA の集積を細胞非自律的に誘導することが示唆された。また、NMHC-IIA の集積は正常細胞に囲まれた RasV12 変異細胞でも生じる (図 7)。RasV12 変異細胞においても、単独培養時より正常細胞に囲まれた時により強く集積した。しかし、Src 変異細胞に比べると、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞内の集積は弱かった (図 6, 7)。したがって、本研究では主に Src 変異細胞を用いて、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対する NMHC-IIA の役割に注目した。

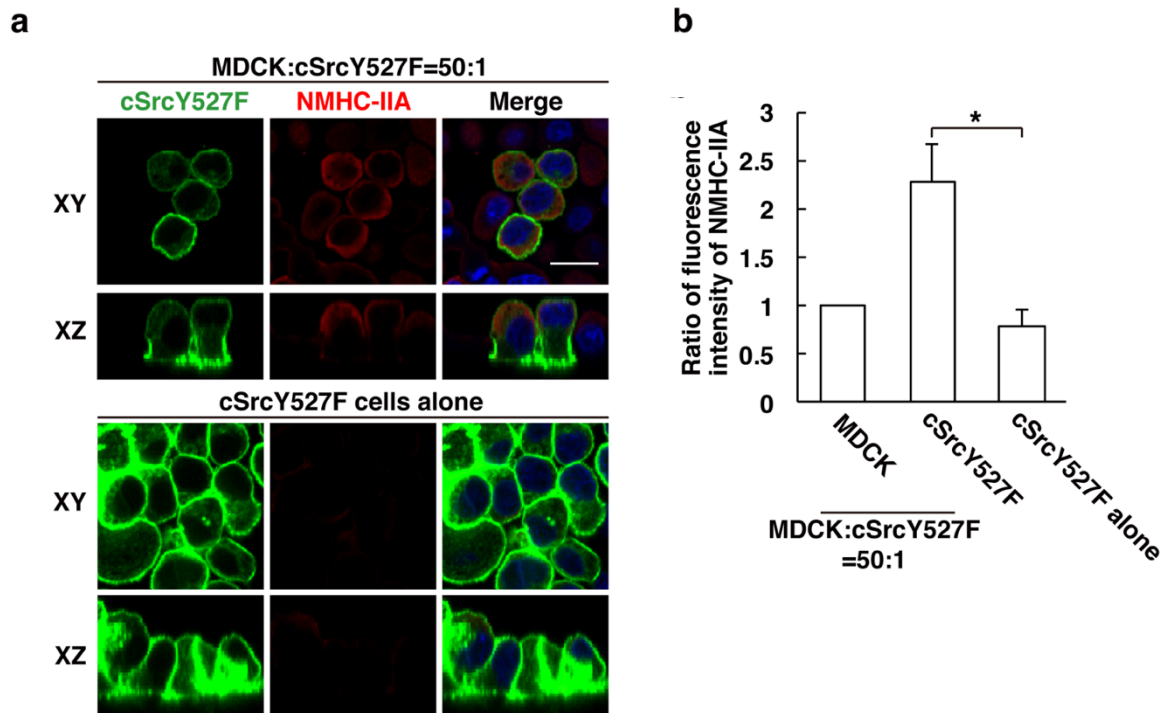


図 6 正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内の NMHC-IIA の集積

(a) MDCK 細胞と共培養もしくは単独培養させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞の免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理して Src 変異を発現させ、NMHC-IIA (赤) と細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μm である。(b) NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。* $P<0.05$ (Student t -test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

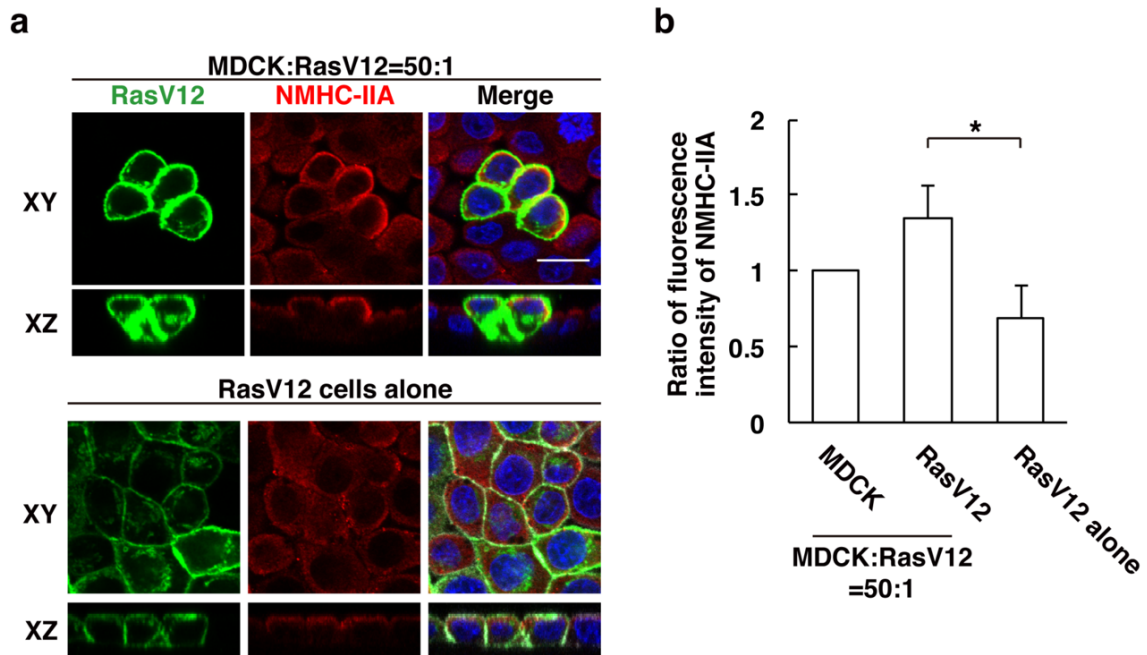


図 7 正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞内の NMHC-IIA の集積

(a) MDCK 細胞と共培養もしくは単独培養させた MDCK-pTR RasV12 変異細胞の免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理して Ras 変異を発現させ、NMHC-IIA (赤) と細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μm である。(b) NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。* $P<0.05$ (Student t -test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

3.3 変異細胞における NMHC-IIA の集積が正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の

管腔側への逸脱に積極的な役割を担う

正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA が、変異細胞の Apical extrusion に重要かどうか調べるために、まず NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を樹立した (図 8)。樹立したノックダウン変異細胞を用いて、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion 効率を調べた。すると、Src 変異細胞における NMHC-IIA の発現を抑制させることで、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion 効率が低下することが分かった (図 9)。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に対して、変異細胞における NMHC-IIA の集積が重要な役割を果たすことが明らかとなった。これらの結果は、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion を制御するのはミオシン-II の活性だけでなく、ミオシン-II の局在の変化も関係するということを意味する。

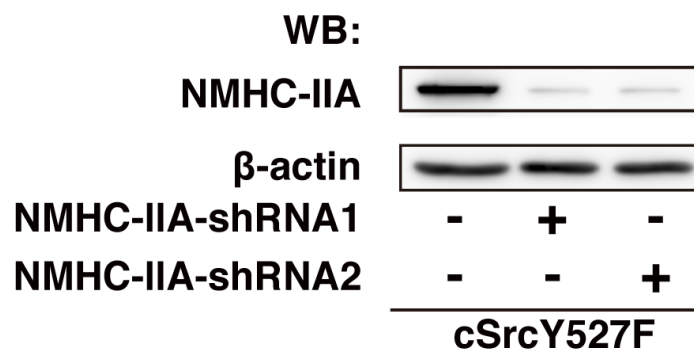


図 8 NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞の樹立

NMHC-IIA-shRNA1 もしくは-shRNA2 を恒常的に発現させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞株の樹立。各々の NMHC-IIA-ノックダウン変異細胞株のライセートを抗 NMHC-IIA 抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法によって解析した。

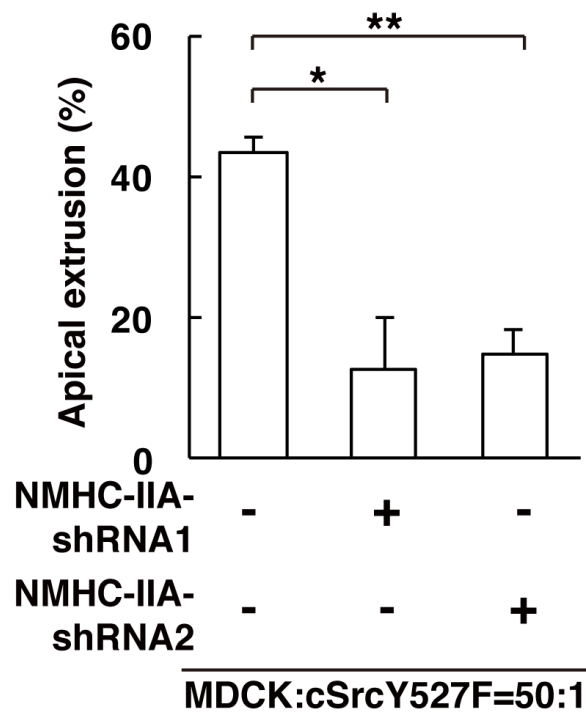


図 9 NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を用いた変異細胞の逸脱

正常細胞に囲まれた変異細胞の逸脱に対する NMHC-IIA のノックダウンの効果。

MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞及び MDCK-pTR GFP-cSrcY527F NMHC-IIA-shRNA1 もしくは-shRNA2 細胞を MDCK 正常細胞と共培養し、テトラサイクリンで 24 時間処理し、正常細胞に囲まれた変異細胞の逸脱を解析した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。 $*P<0.05$; $**P<0.005$ (Student *t*-test) 。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

3.4 変異細胞における NMHC-IIA の集積は F-アクチンに非依存的である

これまでの実験において、F-アクチンは正常細胞に囲まれた Src 及び Ras 変異細胞内で、条件特異的な集積を確認することができなかった^{18,19}。また一般的に、ミオシン-II はアクチン結合タンパク質として知られている。しかし、正常細胞に囲まれた変異細胞における F-アクチンと NMHC-IIA の集積の変化が異なっていた。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積は、F-アクチンに依存しているのかどうかは不明であった。

そこで、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を添加することによって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積がどのように変化が生じるかどうか調べた。その結果、サイトカラシン D の添加は、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積に対して有意に影響を及ぼさなかった (図 10)。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA の集積は F-アクチンに依存しないことが分かった。

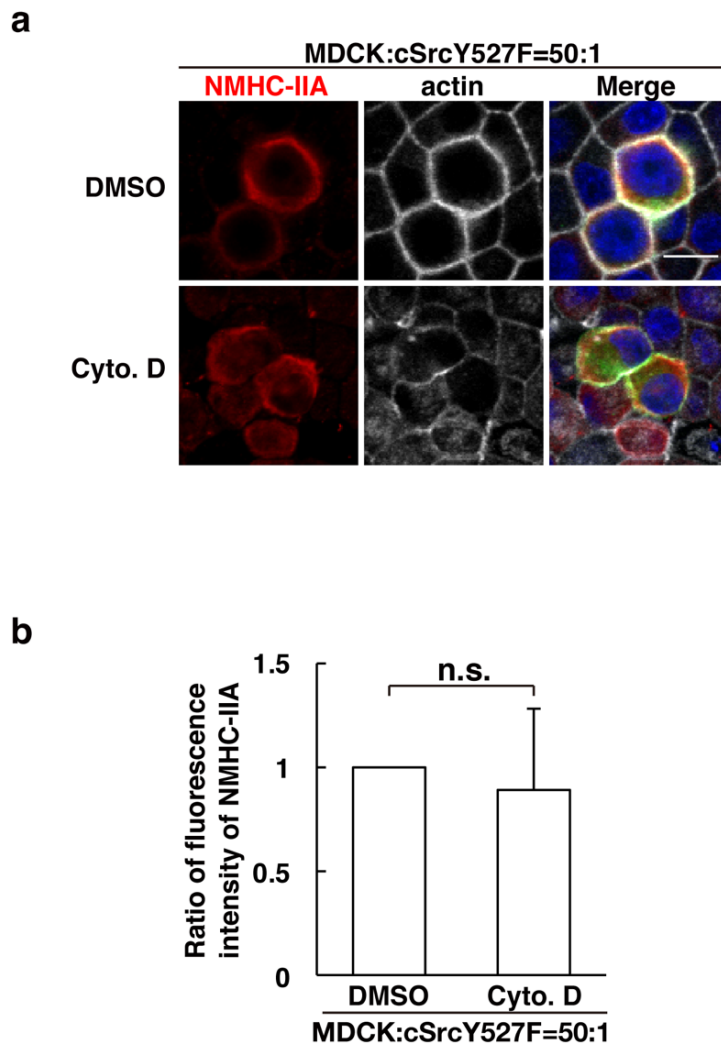


図 10 サイトカラシン D 添加時の Src 変異細胞における NMHC-IIA の
集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を共培養させ、テトラサイクリンと、サイトカラシン D もしくは DMSO によって 16 時間処理し、NMHC-IIA (赤)とアクチン (白)、細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μ m である。

(b) 変異細胞内の NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。n.s.: not significant (Student *t*-test) 。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

3.5 変異細胞における NMHC-IIA の集積はミオシン-II の活性に依存的である

本章の研究において、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内における NMHC-IIA は集積することが分かった。また、これまでの細胞競合現象に関する研究により、ミオシン-II の活性を抑制するブレビスタチンの添加によって、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion 効率が低下し、ミオシン-II の活性が変異細胞の Apical extrusion に重要であることが判明している²⁰。しかし、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積とミオシン-II の活性にどのような関係性があるのか未だ明らかとなっていない。

そこで、ブレビスタチンを添加することにより、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の NMHC-IIA の集積にどのような変化が生じるのか調べた。すると、ブレビスタチンの添加によって、正常細胞に囲まれた変異細胞内の NMHC-IIA の集積が有意に変化することが分かった (図 11)。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積は、ミオシン-II の活性に依存することが分かった。

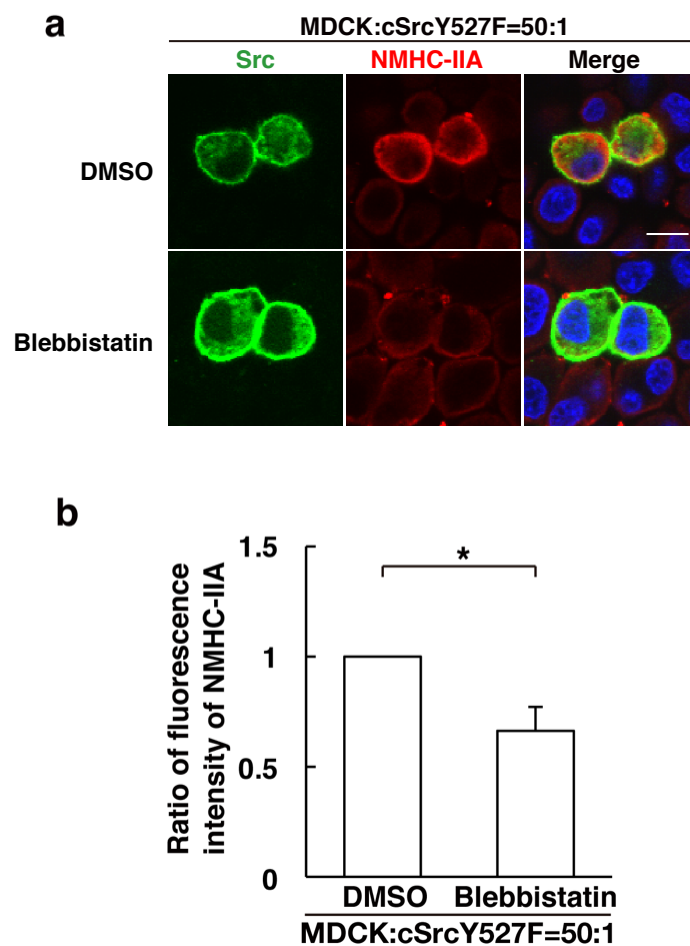


図 11 プレビスタチン添加時の Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を共培養させ、テトラサイクリンと、プレビスタチンもしくは DMSO によって 16 時間処理し、NMHC-IIA (赤) と細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μ m である。(b) 変異細胞内の NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。

* $P < 0.05$ (Student *t*-test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

3.6 正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA と EPLIN の

相互作用

これまでの細胞競合現象の研究では、正常細胞に囲まれた変異細胞において EPLIN が細胞非自律的に集積し、正常細胞層からの変異細胞の Apical extrusion に重要であることが判明している⁴⁴。そこで、EPLIN と同様、正常細胞に囲まれた変異細胞内で細胞非自律的に集積する NMHC-IIA とどのように相互作用するのかどうか、免疫蛍光染色法により調べた。

まず、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA が EPLIN の集積を制御するのかどうか、NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を用いて変異細胞内の EPLIN の集積の変化を調べた。すると、Src 変異細胞における NMHC-IIA の発現を低下させても、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における EPLIN の集積に有意な変化はなかった (図 12)。

さらに、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内の EPLIN が NMHC-IIA の集積を制御するのかどうか、EPLIN ノックダウン Src 変異細胞を樹立して (図 13)、変異細胞内の NMHC-IIA の集積の変化を調べた。すると、変異細胞における EPLIN の発現を低下させても、正常細胞に囲まれた変異細胞の NMHC-IIA の集積は有意に変化しないことが分かった (図 14)。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積は EPLIN の集積とは相互作用を示さないことが明らかとなった。

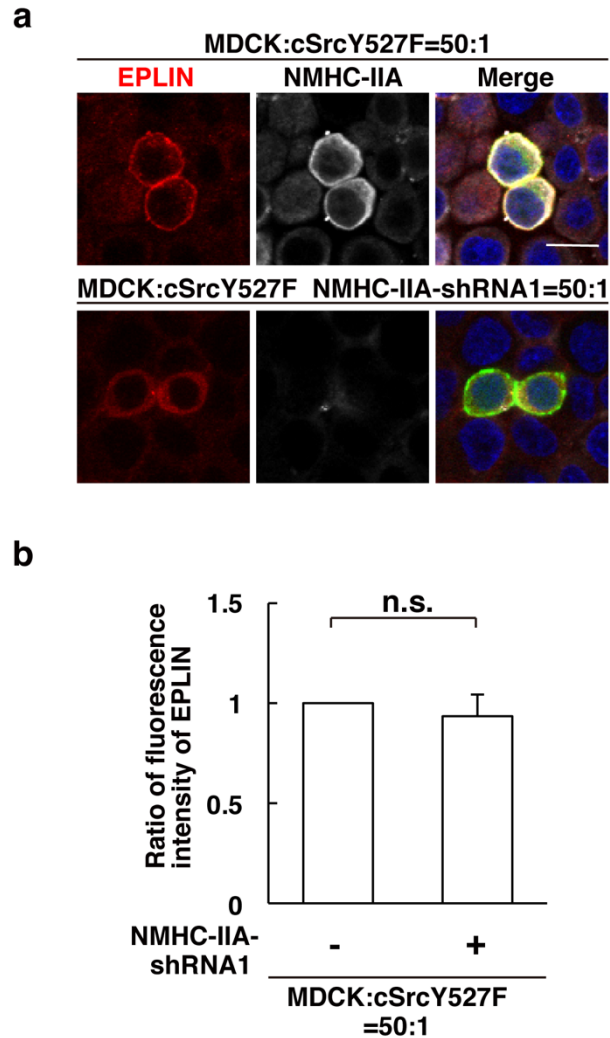


図 12 正常細胞に囲まれた NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞における

EPLIN の集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞もしくは NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を共培養させた免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、EPLIN (赤) と NMHC-IIA (白)、細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μm である。(b) 変異細胞内の EPLIN の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。n.s.: not significant (Student *t*-test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

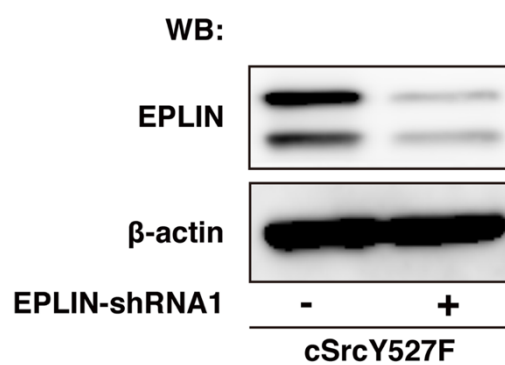


図 13 EPLIN ノックダウン Src 変異細胞の樹立

EPLIN-shRNA1 を恒常的に発現させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞株の樹立。各々の EPLIN ノックダウン変異細胞株のライセートを、抗 EPLIN 抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法によって解析した。

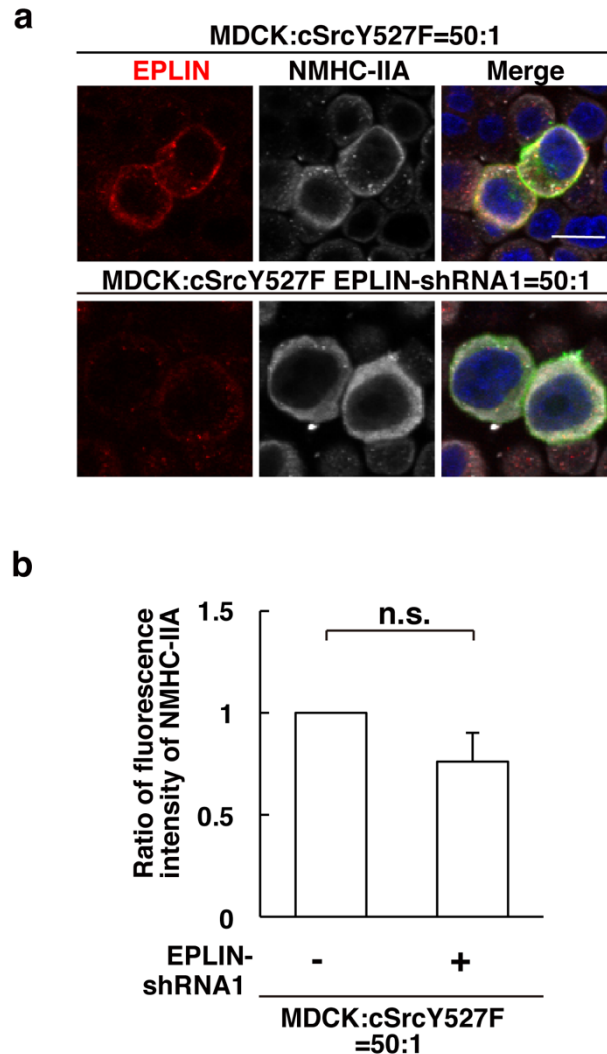


図 14 正常細胞に囲まれた EPLIN ノックダウン Src 変異細胞における

NMHC-IIA の集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞もしくは EPLIN ノックダウン Src 変異細胞を共培養させた免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、EPLIN (赤) と NMHC-IIA (白)、細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μm である。(b) 変異細胞内の NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。n.s.: not significant (Student *t*-test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

3.7 本章の小括

第 3 章の結果をまとめる。正常細胞に囲まれた変異細胞において、NMHC-IIA は細胞非自律的に集積することが分かった。さらに、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に対するミオシン-II の集積の役割を調べるため、NMHC-IIA-shRNA を恒常的に発現させる cSrcY527F 変異細胞を樹立した。樹立した NMHC-IIA ノックダウン変異細胞を用いて、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion 効率を調べたところ、Src 変異細胞の Apical extrusion 効率は大きく減少した。これは NMHC-IIA が正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に重要な役割を担うことを示している。また、正常細胞に囲まれた変異細胞内の NMHC-IIA の集積は、F-アクチンに対して非依存적であることが分かった。さらに、正常細胞に囲まれた変異細胞内の NMHC-IIA の集積は、ミオシン-II の活性には依存していることも判明した。

また、これまでの細胞競合現象に関する研究により、正常細胞に囲まれた変異細胞において EPLIN が NMHC-IIA と同様に細胞非自律的に集積し、変異細胞の Apical extrusion に重要な働きをすることが示されている。そこで、新たに細胞競合マーカータンパク質として着目した NMHC-IIA と EPLIN は相互作用するのか、それぞれのノックダウン変異細胞を用いて調べた。その結果、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において集積した NMHC-IIA と EPLIN は相互に作用し合わないことが確認された。したがって、EPLIN と NMHC-IIA は正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、それぞれ異なる作用機序により、Src 変異細胞の Apical extrusion に影響を及ぼすのではないかと考えられる。この点については、第 5 章でも議論したい。

第 4 章 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において

ミオシン-II と結合するタンパク質の同定

4.1 背景

前章の研究において、正常細胞に囲まれた変異細胞内の NMHC-IIA の集積が、変異細胞の Apical extrusion に重要であることが分かった。この集積した NMHC-IIA は正常細胞に囲まれた変異細胞において、他のタンパク質と結合して複合体を形成し、変異細胞の Apical extrusion に関与する可能性が考えられる。

そこで、正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA と結合するタンパク質の探索及び同定、その条件特異的な局在の変化について調べた。また、同定したタンパク質が、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion にどのように関わるのかについても調べた。

4.2 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下における NMHC-IIA と

強く結合するタンパク質としての α -spectrin の同定

正常細胞と変異細胞の混合培養条件下で、NMHC-IIA と条件特異的に結合するタンパク質を同定するため、抗 NMHC-IIA 抗体を用いた免疫沈降法にて調べた。さらに、SDS-PAGE 及び SYPRO® Ruby タンパク質ゲル染色法により、単独培養時に比べて混合培養条件下で NMHC-IIA と強く結合するタンパク質のバンドを確認した (図 15) 。さらに、検出したタンパク質がどのようなものなのか、質量分析法により調べたところ、混合培養条件下において NMHC-IIA と強く結合するタンパク質として、 α -spectrin を同定した。また、ウェスタン・ブロッティング法により単独培養の時に比べ、混合

培養条件下において α -spectrin が NMHC-IIA とより強く結合することが示唆された (図 16) 。ただし、ウエスタン・ブロッティング法による α -spectrin の検出を確認する実験での再現性が低かったため、今後も検証を重ねる必要があると考える。また、私の所属する研究室にて所有する抗 α -spectrin 抗体を用いた免疫蛍光染色法にて、MDCK 細胞における α -spectrin を特異的に検出することができなかった (図 17) 。

α -spectrin は β -spectrin とヘテロ四量体を形成することが、一般的に知られている。

そこで、 β -spectrin も正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、特異的に NMHC-IIA と結合するタンパクであるかどうか、抗 NMHC-IIA 抗体を用いた免疫沈降法及びウエスタン・ブロッティング法により調べた。すると、 β -spectrin も混合培養条件下において NMHC-IIA と強く結合することが分かった (図 18) 。

さらに、正常細胞と変異細胞の混合培養条件下で NMHC-IIA と特異的に強く結合した β -spectrin は MDCK 由来のものなのか、それとも Src 変異細胞由来なのか調べた。そのために、 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を樹立し (図 19) 、抗 NMHC-IIA 抗体を用いた免疫沈降法によって、正常細胞と β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞の混合培養を、正常細胞と Src 変異細胞の混合培養の条件と比較したところ、混合培養条件下で NMHC-IIA と強く結合する β -spectrin は Src 変異細胞由来であることが分かった (図 20) 。

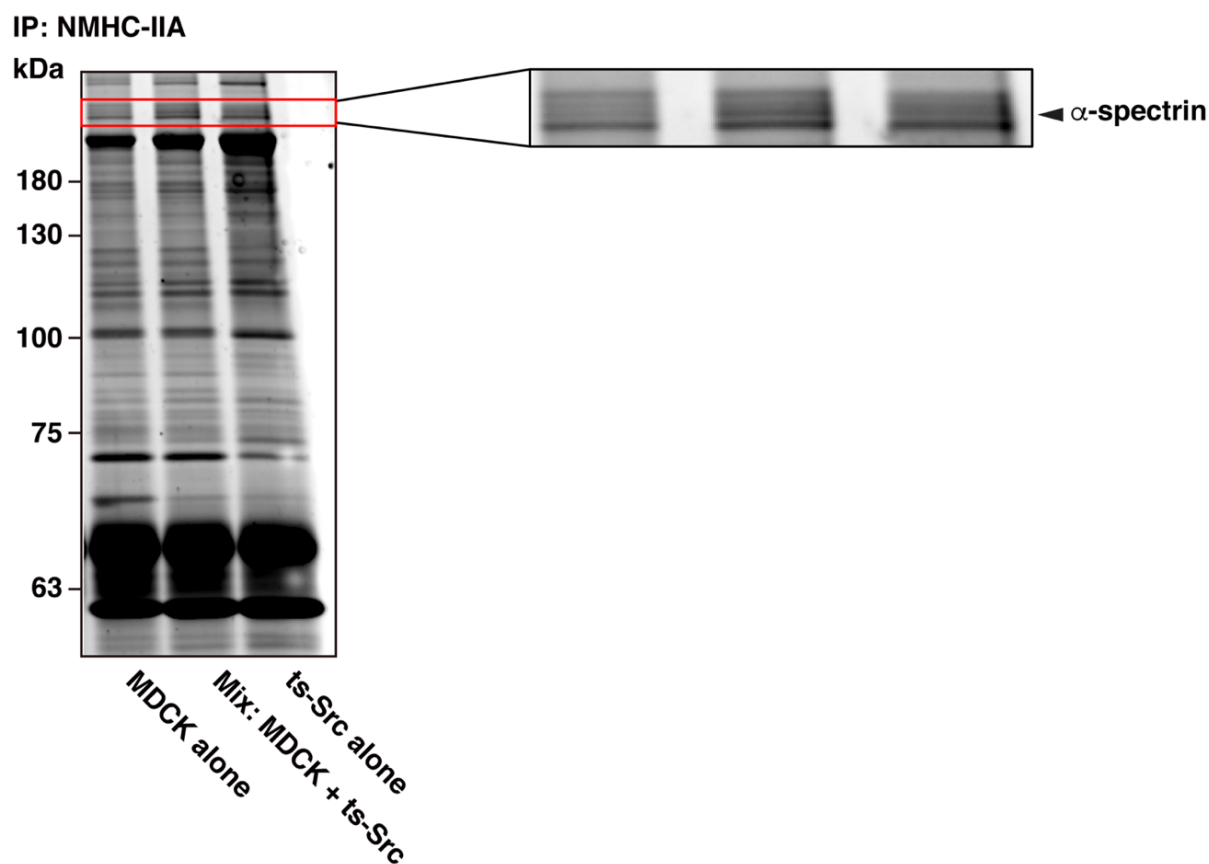


図 15 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA との結合が増加するタンパク質α-spectrin の同定

抗 NMHC-IIA 抗体を用いた免疫沈降タンパク質を SYPRO® Ruby タンパク質ゲル染色法により、タンパク質の染色を行なった (8% SDS-PAGE)。細胞は三種類の異なる条件で培養した；i) MDCK 正常細胞の単独培養、ii) MDCK 正常細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の混合培養、iii) MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の単独培養。cSrcY527F の発現誘導から 16 時間後に、細胞ライセートを control IgG 及び抗 NMHC-IIA 抗体を用いて免疫沈降した。

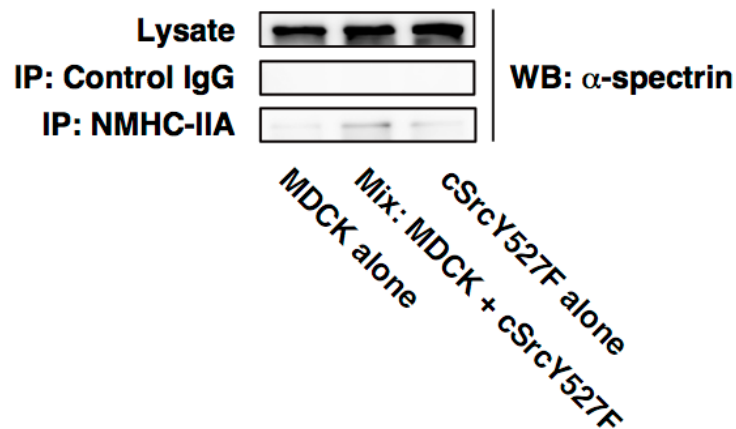


図 16 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下における NMHC-IIA と α -spectrin の共免疫沈降

細胞は三種類の異なる条件で培養した。i) MDCK 正常細胞の単独培養、ii) MDCK 正常細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の混合培養、iii) MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の単独培養。cSrcY527F の発現誘導から 16 時間後に、細胞ライセートを control IgG 及び抗 NMHC-IIA 抗体を用いて免疫沈降した。その後、抗 α -spectrin 抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法を行った。

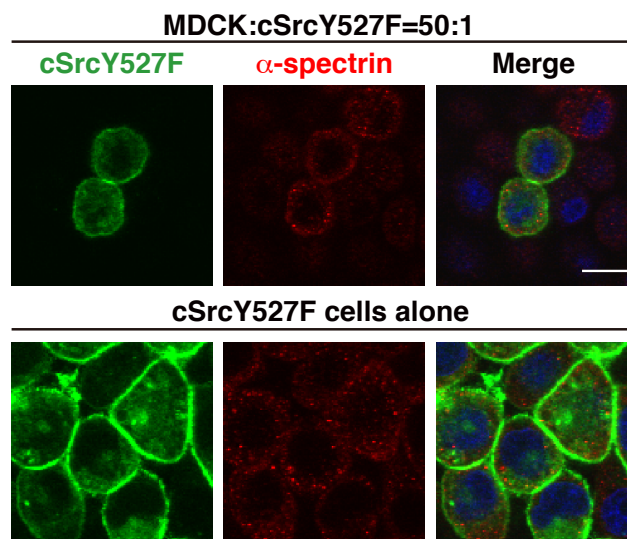


図 17 正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における α -spectrin の集積

MDCK 正常細胞と共培養もしくは単独培養させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞の免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、 α -spectrin（赤）と細胞核（青）を染色した。スケールバーは 10 μ m である。

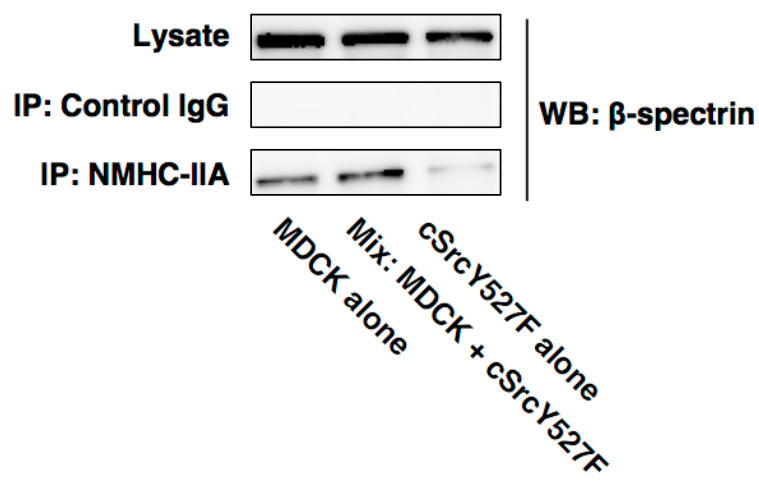


図 18 正常細胞と変異細胞の混合培養条件における NMHC-IIA と β -spectrin の共免疫沈降

細胞は 3 種類の異なる条件で培養した。i) MDCK 正常細胞の単独培養、ii) MDCK 正常細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の混合培養、iii) MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の単独培養。cSrcY527F の発現誘導から 16 時間後に、細胞ライセートを control IgG 及び抗 NMHC-IIA 抗体を用いて免疫沈降した。その後、抗 β -spectrin 抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法を行った。

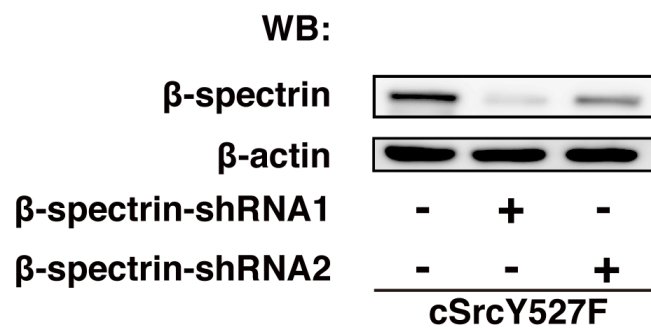


図 19 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞の樹立

β -spectrin-shRNA1 もしくは-shRNA2 を恒常的に発現させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞株の樹立。各々の β -spectrin ノックダウン細胞株のライセートを抗 β -spectrin 抗体を用いたウエスタン・ブロッティング法によって解析した。

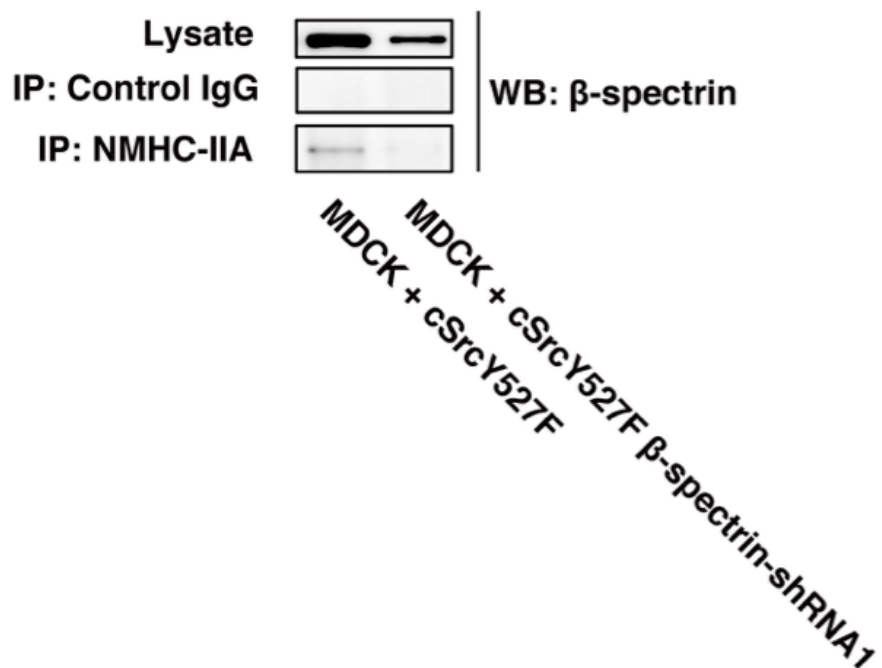


図 20 正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において NMHC-IIA と強く結合

した β -spectrin は Src 変異細胞側で結合する

NMHC-IIA と β -spectrin の共免疫沈降における Src 変異細胞内の β -spectrin のノックダウンの効果。細胞は 2 種類の異なる条件で混合培養した。i) MDCK 正常細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 変異細胞の混合培養、ii) MDCK 正常細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F β -spectrin-shRNA1 変異細胞の混合培養。混合培養した細胞をテトラサイクリン添加後、16 時間培養し、細胞ライセートを control IgG 及び抗 NMHC-IIA 抗体を用いて免疫沈降した。その後、抗 β -spectrin 抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法を行った。

4.3 正常細胞に囲まれた変異細胞において β -spectrin が細胞非自律的に

集積する

私の所属する研究室にて所有する抗 α -spectrin 抗体は、MDCK 細胞を用いた免疫蛍光染色法にて使用することができなかった。しかし、抗 β -spectrin 抗体では使用できた。そこで、抗 β -spectrin 抗体を用いて、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるスペクトリンの局在の変化について免疫蛍光染色法により調べた。すると、Src 変異細胞が正常上皮細胞によって囲まれると、 β -spectrin が Src 変異細胞の管腔側に強く集積することが分かった (図 21)。また、Src 変異細胞が単独で存在する際、 β -spectrin の局在は観察されず、免疫蛍光染色による β -spectrin の蛍光強度は正常細胞のそれと同等であった。また、正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞での β -spectrin の集積についても調べたところ、Src 変異細胞を用いた場合に比べて正常細胞に囲まれた際に強く集積しないことが示唆された (図 22)。

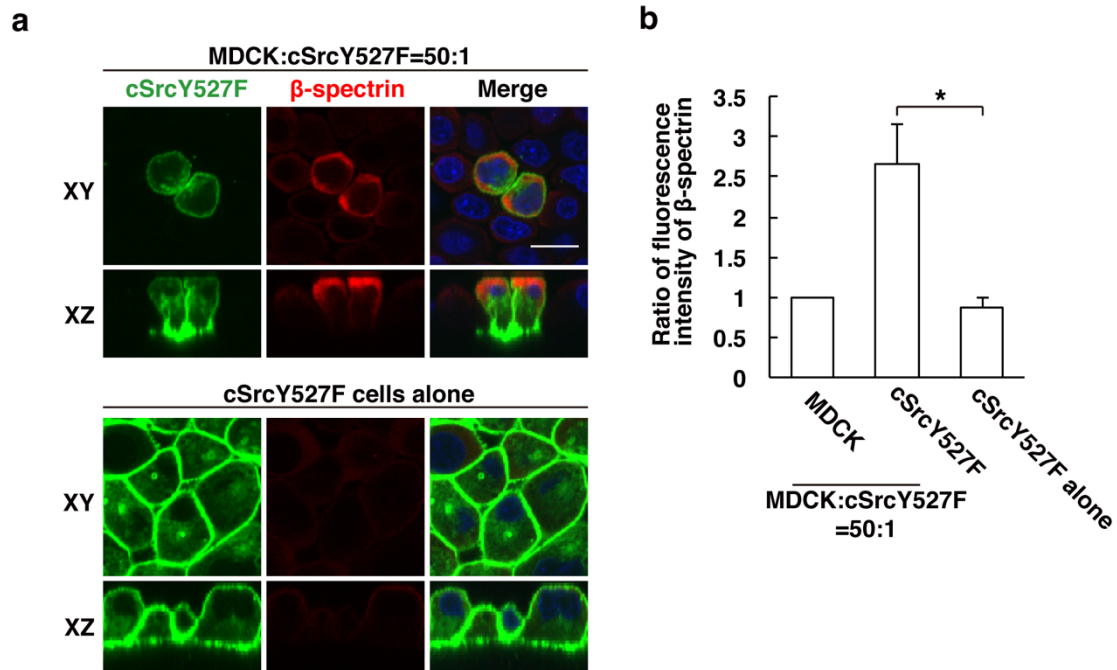


図 21 正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin の集積

(a) MDCK 細胞と共培養もしくは単独培養させた MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞の免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、 β -spectrin (赤) と細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μ m である。 (b) β -spectrin の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。* $P < 0.05$ (Student *t*-test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

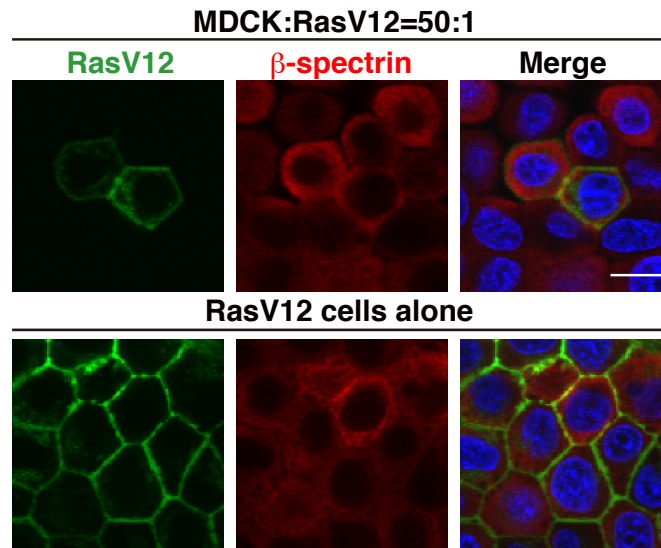


図 22 正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞における β -spectrin の集積

MDCK 細胞と共培養もしくは単独培養させた MDCK-pTR RasV12 細胞の免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、 β -spectrin（赤）と細胞核（青）を染色した。スケールバーは 10 μ m である。

4.4 変異細胞における β -spectrin の集積が正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側

への逸脱に積極的な役割を担う

変異細胞における β -spectrin が正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に重要かどうか調べるため、 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を用いて、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における Apical extrusion 効率を調べた。すると、Src 変異細胞における β -spectrin の発現を抑制することで、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion 効率が低下することが分かった (図 23) 。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対して、変異細胞内のスペクトリンの集積が重要な役割を果たしているということが明らかとなった。

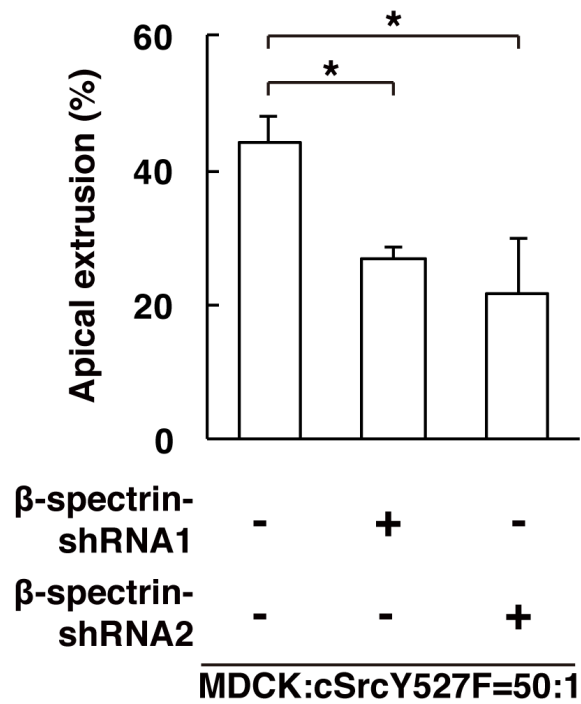


図 23 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を用いた変異細胞の逸脱

正常細胞に囲まれた変異細胞の逸脱に対する β -spectrin のノックダウンの効果。

MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞及び MDCK-pTR GFP-cSrcY527F β -spectrin-shRNA1 or-shRNA2 細胞を MDCK 正常細胞と共培養し、テトラサイクリンで 24 時間処理し、変異細胞の逸脱を解析した。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。 $*P<0.05$ (Student *t*-test) 。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

4.5 変異細胞における β -spectrin の集積は F-アクチンに非依存的である

スペクトリンも ミオシン-II と同様にアクチン結合タンパク質として一般的に知られている。しかし、第 3 章での結果で、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積が F-アクチンに対して非依存的であることが分かった。しかし、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内で集積する β -spectrin は F-アクチンに依存しているかどうか不明であり、この点も明らかにする必要がある。

そこで、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を添加することで、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において集積した β -spectrin にどのような変化が生じるのか、免疫蛍光染色法により調べた。その結果、サイトカラシン D を添加することで、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin の集積にも有意に影響を及ぼさなかった (図 24) 。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞における β -spectrin の集積も NMHC-IIA の集積と同様に、F-アクチンと非依存的であることが分かった。

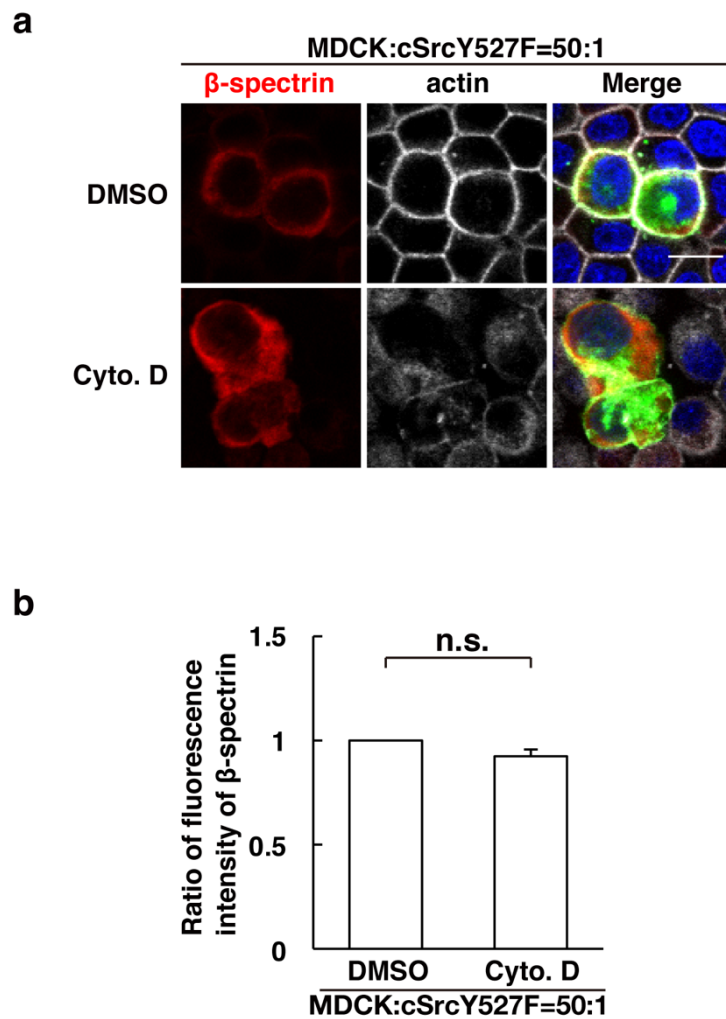


図 24 サイトカラシン D 添加時の Src 変異細胞における β - spectrin の集積
の変化

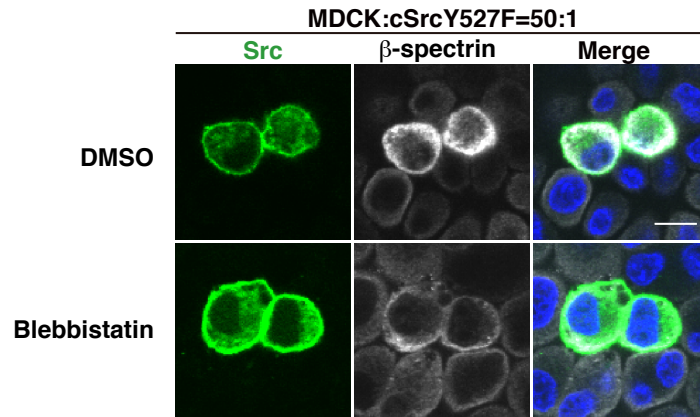
(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を混合培養させ、テトラサイクリンと、サイトカラシン D もしくは DMSO によって 16 時間処理し、 β -spectrin (赤) と細胞核 (青)、アクチン (白) を染色した。スケールバーは 10 μ m である。(b) 変異細胞内の NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。n.s.: not significant (Student *t*-test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

4.6 変異細胞における β -spectrin の集積はミオシン-II の活性に依存的である

第 3 章において、正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA の集積は、ミオシン-II の活性に依存的であった。では、正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA と強く結合する β -spectrin はミオシン-II の活性とどのような関係があるのかどうか調べる必要があると考えた。

そこで、正常細胞に囲まれた変異細胞内における NMHC-IIA と結合する β -spectrin の集積が、ミオシン-II の活性に依存しているのかどうか、ミオシン-II の活性を抑制するブレビスタチンを添加して、免疫蛍光染色法により調べた。すると、NMHC-IIA の集積と同様、ブレビスタチンの添加によって正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin の集積が有意に変化した (図 25) 。したがって、正常細胞に囲まれた変異細胞における β -spectrin の集積も、ミオシン-II の活性に依存的であることが分かった。

a



b

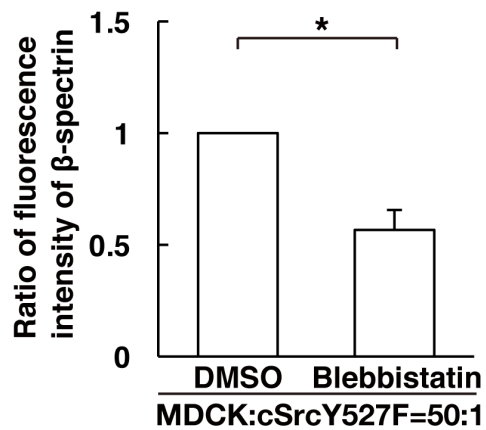


図 25 ブレビスタチン添加時の Src 変異細胞におけるβ-spectrin の集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞を混合培養させ、テトラサイクリンと、ブレビスタチンもしくは DMSO によって 16 時間処理し、β-spectrin (白) と細胞核 (青) を染色した。スケールバーは 10 μm である。 (b) 変異細胞内の NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値±SD で表した。

*P<0.05 (Student t-test)。 1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

4.7 正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA と β -spectrin

の相互作用

本研究での結果より、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において NMHC-IIA と β -spectrin は共に細胞非自律的に集積することが分かった。しかし、これらの集積したタンパク質は、正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において強く結合しているが、相互に作用しているのかどうかは不明である。そこで、正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA と β -spectrin がどのように相互に影響を及ぼすのかどうか、免疫蛍光染色法により調べた。

まず、変異細胞における NMHC-IIA の発現を低下させると、正常細胞に囲まれた変異細胞の β -spectrin の集積がどのように変化するか、NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を用いて調べた。すると、正常細胞に囲まれた NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞において、Src 変異細胞内の β -spectrin の集積は減弱した (図 26)。

次に、変異細胞の β -spectrin の発現を低下させると、正常細胞に囲まれた変異細胞において NMHC-IIA の集積がどのように変化するか、 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を用いて調べた。すると、正常細胞に囲まれた β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞において、変異細胞内の β -spectrin の集積は変化しなかった (図 27)。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、 β -spectrin の集積は NMHC-IIA の下流で制御されることが示された。

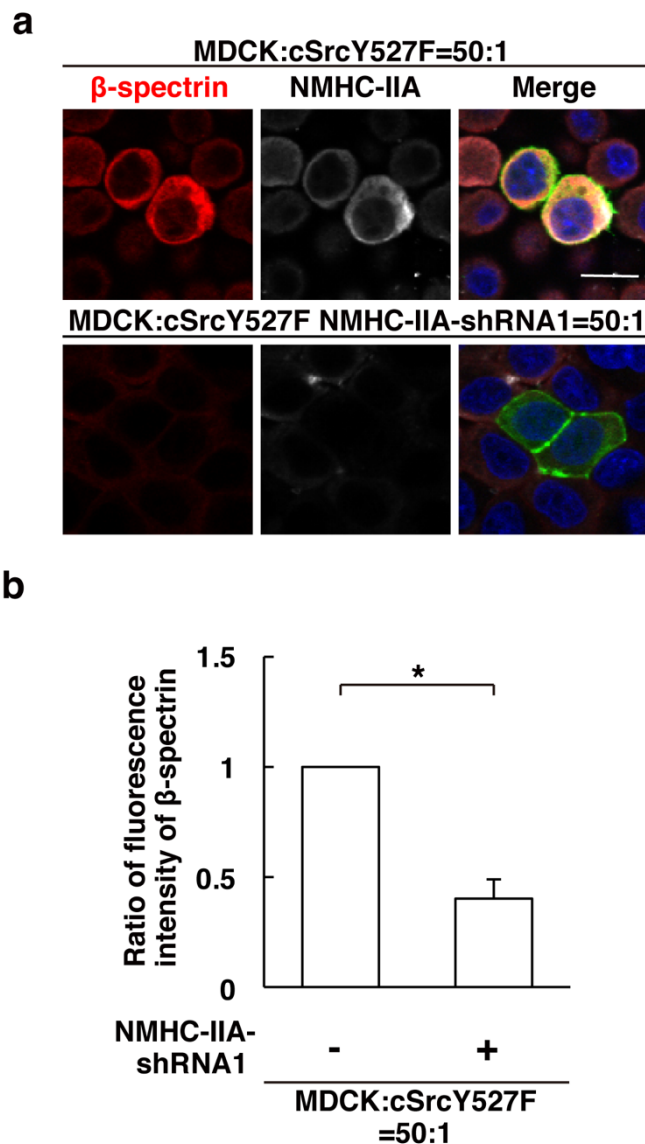


図 26 正常細胞に囲まれた NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞における

β -spectrin の集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞もしくは NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を共培養させた免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、 β -spectrin (赤) と NMHC-IIA (白) を染色した。スケールバーは 10 μ m である。(b) 変異細胞内の β -spectrin の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。* P <0.05 (Student t -test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

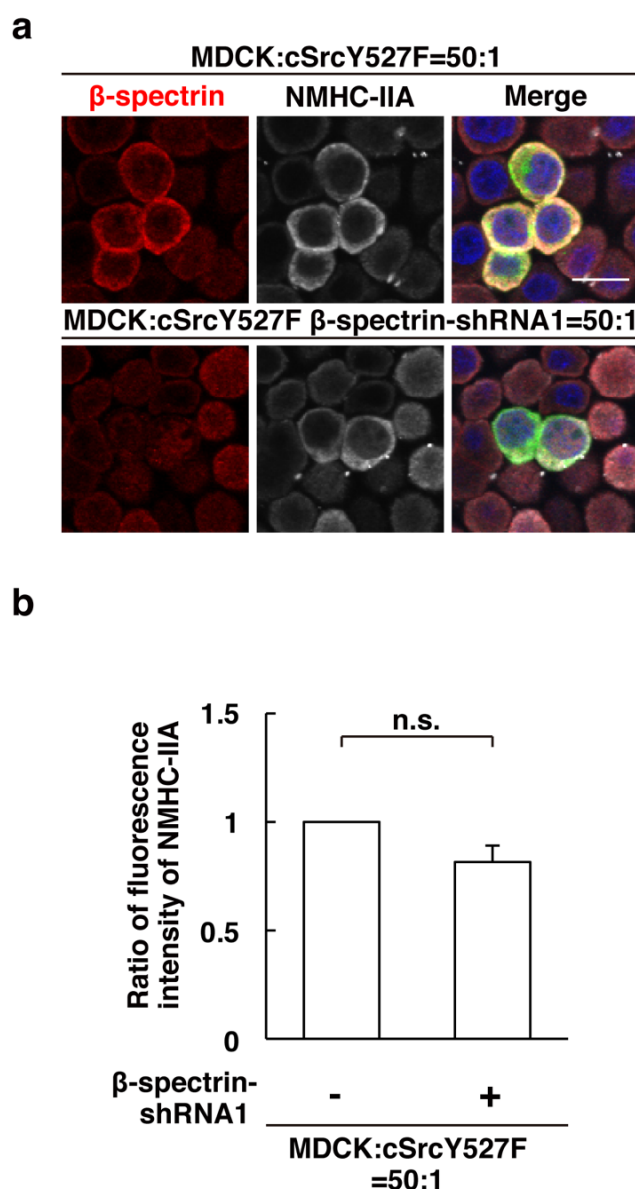


図 27 正常細胞に囲まれた β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞における

NMHC-IIA の集積の変化

(a) MDCK 細胞と MDCK-pTR GFP-cSrcY527F 細胞もしくは β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を共培養させた免疫蛍光染色画像。テトラサイクリンによって 16 時間処理し、 β -spectrin (赤) と NMHC-IIA (白) を染色した。スケールバーは 10 μ m である。(b) 変異細胞内の NMHC-IIA の蛍光強度の定量。データは 3 回の独立した実験から得られた平均値 $\pm$ SD で表した。n.s.: not significant (Student *t*-test)。1 回の実験で 30 個以上の細胞を解析した。

4.8 本章の小括

第 4 章の結果をまとめる。抗 NMHC-IIA 抗体を用いた免役沈降法によって、 α -spectrin が正常細胞と Src 変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA との結合が増加することが分かった。さらに、一般的に α -spectrin とヘテロ四量体を形成している β -spectrin も、正常細胞と変異細胞の混合条件下において、単独培養の時よりも NMHC-IIA とより強く結合することが分かった。また、混合培養条件下において NMHC-IIA と強く結合する β -spectrin は Src 変異細胞側に存在することが分かった。さらに、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin は細胞非自律的に集積することが分かった。

次に、変異細胞で集積した β -spectrin が、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に対してどのように作用しているのかどうか調べるために、 β -spectrin-shRNA を恒常的に発現させる cSrcY527F 変異細胞を樹立した。その後、 β -spectrin ノックダウン変異細胞を用いて、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における Apical extrusion 効率について調べた。すると、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion 効率は低下し、変異細胞内の β -spectrin が正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に重要な働きを及ぼすことが明らかとなった。

スペクトリンはミオシン-II と同様に、アクチン結合タンパク質として知られている。そこで、アクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D を添加することで、正常細胞に囲まれた変異細胞に集積した β -spectrin にどのような変化が生じるのかどうか調べたところ、 β -spectrin の集積に変化がなかった。したがって、 β -spectrin の集積は F-アクチンに依存的ではないということが明らかとなった。

正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、 β -spectrin と NMHC-IIA が強く結合し、第 3 章において、正常細胞に囲まれた変異細胞内の NMHC-IIA の集積がミオシ

ン-II の活性に依存することが分かっている。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内の β -spectrin の集積が、ミオシン-II の活性によってどのような変化が生じるのかどうか、ミオシン-II の活性を抑制するブレビスタチンを用いて調べた。すると、ミオシン-II の活性を抑制させることによって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内の β -spectrin の集積も NMHC-IIA と同様に有意に低下した。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin の集積は、ミオシン-II の活性に依存的であることが示された。

第 3 章にて、NMHC-IIA が β -spectrin と同様に、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において集積することが判明し、本章では正常細胞と変異細胞の混合培養条件下において、NMHC-IIA と β -spectrin が強く結合することが明らかとなった。では、正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA と β -spectrin にはどのような相互関係にあるのかどうか調べた。まず、NMHC-IIA ノックダウン Src 変異細胞を用いて正常細胞に囲ませると、Src 変異細胞における β -spectrin の集積が減弱した。逆に、 β -spectrin ノックダウン Src 変異細胞を正常細胞に囲ませたが、Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積に有意な変化は確認できなかった。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における β -spectrin の集積は、NMHC-IIA の下流にて制御されることが明らかとなった。

第 5 章 考察

5.1 本研究の総括と考察

本研究にて、NMHC-IIA と β -spectrin が正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側において細胞非自律的に集積することが明らかとなった。さらに、正常細胞にはそのような集積は確認できず、変異細胞を単独培養させた場合にも観察されなかった。また、Src 変異細胞を単独培養させた場合に NMHC-IIA と結合する α -spectrin のタンパク量が、正常細胞を単独培養した場合に比べ、より多く発現することがウエスタン・ブロッティング法により判明した。しかし、正常細胞と Src 変異細胞の混合培養条件下では、それらの単独培養条件よりもさらに多くのタンパク量を検出できた。この結果は、正常細胞と Src 変異細胞との間に生じる相互作用が、混合培養条件下で特異的に何らかの仕組みによって、スペクトリンとミオシン-II の複合体の形成を促進させることが示唆される。

さらに、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞内において集積した NMHC-IIA と β -spectrin の相互作用を、それぞれのノックダウン Src 変異細胞を用いて調べた。すると、変異細胞内の NMHC-IIA の発現を抑制すると、 β -spectrin の集積は減弱したが、 β -spectrin の発現を抑制させても NMHC-IIA の集積に変化はなかった。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion において重要な役割を担う NMHC-IIA の下流に β -spectrin の集積が存在することが明らかとなった。

ミオシン-II とスペクトリンはどちらもアクチン結合性をもつ。しかし、これまでの細胞競合に関する研究では、正常細胞に囲まれた変異細胞において F-アクチンの特異的な集積は確認されていない^{18,19}。また、本研究によってアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D の添加は、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA や

β -spectrin の集積に有意な影響を及ぼさないことが明らかとなった。これは、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、条件特異的に生じるミオシン-II とスペクトリンの相互作用は F-アクチン非依存的に挙動すると考えられる。

細胞競合の最新の研究において、パキシリンープレクチンーEPLIN 複合体はミオシン-IIースペクトリン複合体と同様、正常細胞に囲まれた変異細胞において集積し、正常上皮細胞層の管腔側への変異細胞の排除を促進させることが示された^{42, 52, 55}。しかし、本研究の結果より、Src 変異細胞における EPLIN の発現を抑制しても、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA の集積には有意な影響を及ぼさず、逆に Src 変異細胞における NMHC-IIA の発現を抑制しても、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における EPLIN の集積に変化はないことが分かった。したがって、Src 変異細胞におけるミオシン-IIースペクトリン複合体は、パキシリンープレクチンーEPLIN 複合体には依存せずに正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion を制御すると考えられる (図 28)。

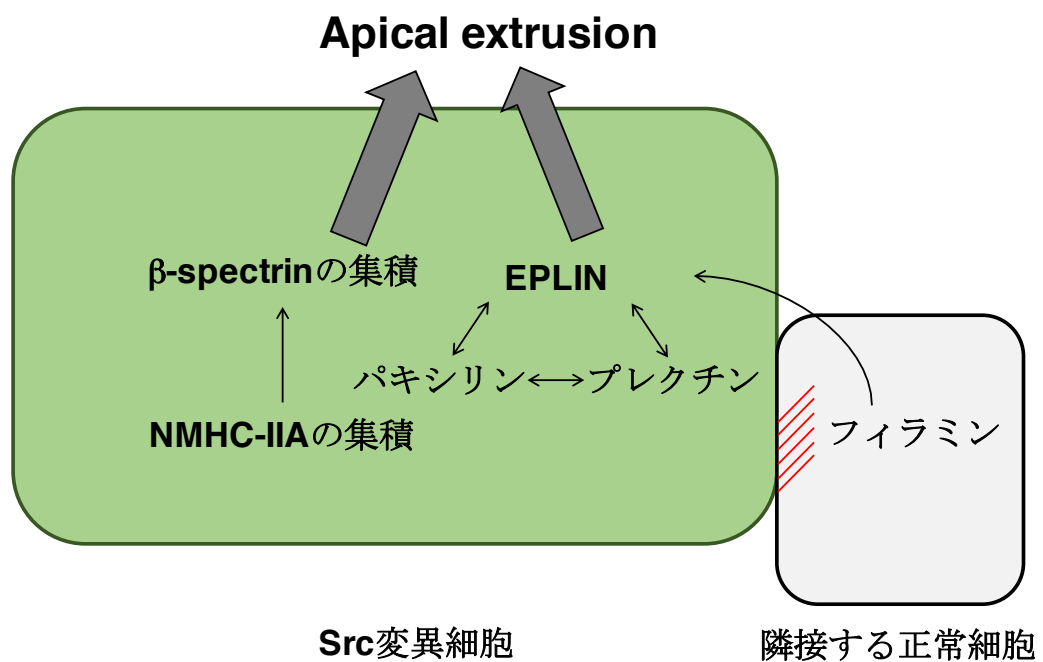


図 28 正常細胞と Src 変異細胞との間に生じる Apical extrusion を制御する

分子メカニズムの模式図

Src 変異細胞が正常細胞に囲まれた際、NMHC-IIA が変異細胞の管腔側で集積する。また、変異細胞内のβ-spectrin は NMHC-IIA と結合し、管腔側に集積する。さらに、変異細胞におけるβ-spectrin の集積は NMHC-IIA の下流で制御されている。変異細胞内で集積したこれらのタンパク質は、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞の Apical extrusion に重要な働きを及ぼす。

5.2 今後の課題

本研究の結果及び総括を踏まえて、今後行うべき研究として以下のテーマが考えられる。

- 1) 正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側に集積するミオシン-IIの機能的役割
- 2) アクチン結合タンパク質であるミオシン-II及びスペクトリンは、F-アクチン非依存的にどのような複合体を形成するのか
- 3) 正常細胞に囲まれた変異細胞の逸脱に対するミオシン-II-スペクトリン複合体とフィラミン及びプレクチン、パキシリンの相互作用について
- 4) 正常細胞に囲まれた **Ras** 変異細胞や **Scribble** ノックダウン細胞では、**Src** 変異細胞と同様にミオシン-II-スペクトリン複合体が存在するのか
- 5) 正常細胞に囲まれた変異細胞内の代謝活性とミオシン-II-スペクトリン複合体の関わりについて
- 6) 肥満や炎症反応と正常細胞に囲まれた変異細胞内のミオシン-II-スペクトリン複合体の関わりについて
- 7) 正常細胞に囲まれた変異細胞内のエンドサイトーシスとミオシン-II-スペクトリン複合体の関わりについて
- 8) *in vivo* 実験系での正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II及びスペクトリンの細胞競合への関与
- 9) ヒトの初期段階のがん細胞の排除に、ミオシン-IIやスペクトリンが関わり、この機構の解明が新たながんの予防治療に繋がるのか

1) 正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側に集積するミオシン-II の機能的役割

正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II は、変異細胞の管腔側に集積し、変異細胞の Apical extrusion に関与することが本研究で示されている。これまでにミオシン-II は、細胞移動を行うモータータンパク質としての役割や細胞分裂の収縮環の形成に関与する役割など様々な機能が明らかとなっている³²⁻³⁴。また、ミオシン軽鎖のリン酸化やミオシン-II 自身の活性が、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対して重要であることも報告されている^{19,20}。しかし、集積したミオシン-II が、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対して、具体的にどのように機能しているのか未だ判明していない。考えられるものとして、i) モータータンパク質であるミオシン-II が変異細胞を細胞層の管腔側へと移動させるのか、ii) ミオシン-II によって変異細胞を収縮させることで正常細胞層からの変異細胞の逸脱を促すのか、iii) これまでのミオシン-II の機能とは異なる正常細胞と変異細胞間で生じる細胞競合現象に特異的なミオシン-II の働きが存在するのか、といった様々な可能性が挙げられる。正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II の具体的な機能的役割は、今後明らかにしなければならない課題の一つであると考ええる。

2) アクチン結合タンパク質であるミオシン-II 及びスペクトリンは、F-アクチン非依存的にどのような複合体を形成するのか

一般的に、ミオシン-II とスペクトリンはアクチン結合タンパク質として知られている。しかし、F-アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D を添加したところ、正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA も β -spectrin もその集積に変化はなく、

F-アクチンに依存的ではないということが分かった。したがって、ミオシン-II とスペクトリンは F-アクチン非依存的な複合体を形成するのではないかと考えられる。その可能性として、変異細胞の管腔側で集積したミオシン-II とスペクトリンを結びつけるタンパク質が、F-アクチンの代わりに存在するかどうか、もしくはミオシン-II とスペクトリンが他のタンパク質を介さずに直接結合しているのか、ということが挙げられる。この課題を明らかにすることにより、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞におけるミオシン-II-スペクトリン複合体がどのような構造をするのか、さらにその複合体が変異細胞内でどのような働きをするのか、より詳しく明らかにすることができると考える。

3) 正常細胞に囲まれた変異細胞の逸脱に対するミオシン-II-スペクトリン

複合体とフィラミン及びプレクチン、パキシリンの相互作用について

細胞競合現象に関する最新の研究で、変異細胞に隣接する正常細胞におけるフィラミンや、正常細胞に囲まれた変異細胞内のプレクチン及びパキシリンといった細胞骨格タンパク質が、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に重要な働きをすることが明らかとなっている^{29,54,57}。これらのタンパク質が、NMHC-IIA や β -spectrin とどのように相互作用するのか、それぞれのタンパク質の発現を抑制させたノックダウン変異細胞を用いて、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるフィラミンやプレクチン、パキシリンの集積にどのような変化が生じるのか調べる必要があると考える。この点を明らかにすることで、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に対して重要な細胞骨格タンパク質がどのように相互作用するのか、より詳細に判明することができると考えられる。

4) 正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞や Scribble ノックダウン細胞では、Src 変

異細胞と同様にミオシン-IIースペクトリン複合体が存在するのか

本研究では、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞における NMHC-IIA 及び β -spectrin が変異細胞の Apical extrusion に重要であり、変異細胞内の β -spectrin の集積は NMHC-IIA の下流で制御され、それらが結合していることが明らかとなっている。しかし、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、NMHC-IIA は EPLIN と相互作用しないことが分かった。したがって、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、ミオシン-IIースペクトリン複合体がパキシリン-プレクチン-EPLIN 複合体と相互作用しない、各々独立したシステムとして働くのではないかと考えられる。では、Src とは異なる変異であり、細胞競合現象に関する研究において、正常上皮細胞層から排出される Ras 変異細胞や、正常細胞層に囲まれるとアポトーシスによって細胞死される Scribble ノックダウン細胞 (表 1) では、正常細胞に囲まれた時にミオシン-IIースペクトリン複合体が形成されるのか、明らかにする必要であると考ええる。また、ミオシン-IIースペクトリン複合体は正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞の Apical extrusion 及び Scribble ノックダウン細胞のアポトーシスに重要なのか、さらに Ras 変異細胞や Scribble ノックダウン細胞内でパキシリン-プレクチン-EPLIN 複合体と相互作用するのかどうか、という点も今後明らかにしていく必要があると考える。

5) 正常細胞に囲まれた変異細胞内の代謝活性とミオシン-IIースペクトリン

複合体の関わりについて

哺乳類培養細胞を用いた細胞競合現象の最新の研究で、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion はワールブルグ効果に似た代謝変化の誘導に関わることが明らか

となっている³⁰。そこで、ミトコンドリアの活性を観察できるテトラメチルローダミンメチルエステル (TMRM) を利用して、正常細胞に囲まれた NMHC-IIA もしくは β -spectrin ノックダウン変異細胞のミトコンドリア活性の変化を調べ、変異細胞の代謝活性とミオシン-IIースペクトリン複合体の関係性を明らかにすることが重要であると考ええる。この課題を明らかにすることで、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion と変異細胞内の代謝活性の関係性をより詳細に明らかにすることができる。

6) 肥満や炎症反応と正常細胞に囲まれた変異細胞内のミオシン-IIースペクトリン複合体の関わりについて

細胞競合に関する最新の研究で、肥満や炎症反応といった環境因子が、正常細胞に囲まれた変異細胞の排除の頻度に影響を及ぼすことが判明している³¹。そこで、肥満や炎症反応が、正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-IIースペクトリン複合体と何らかの関係性をもつ可能性が考えられる。その点を明らかにするために、高脂肪食品を与えたマウスのがん初期段階の変異細胞において、ミオシン-II 及びスペクトリンの集積にどのような変化があるのか調べるのが重要であると考えられる。この課題を明らかにすることで、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion と肥満及び炎症反応の関係性をより詳細に明らかにできると考える。

7) 正常細胞に囲まれた変異細胞内のエンドサイトーシスとミオシン-IIースペクトリン複合体の関わりについて

正常細胞に囲まれた変異細胞内では、エンドサイトーシスが亢進されることが報告されている⁵⁹。そこで、変異細胞内のエンドサイトーシスとミオシン-IIースペクトリ

ン複合体の関連を調べるために、NMHC-IIA ノックダウン及び β -spectrin ノックダウン変異細胞を用いて、エンドサイトーシスの重要な調節因子である Rab5 の発現がどのように変化するか調べる必要があると考えられる。また、正常細胞に囲まれた変異細胞における Rab5 の集積が PKA の活性を上昇させ、PKA 活性阻害剤である KT5720 を添加することで、正常細胞層に囲まれた変異細胞の Apical extrusion が抑制されることが報告されている⁵⁹。そこで、KT5720 を添加することで、正常細胞に囲まれた変異細胞における NMHC-IIA 及び β -spectrin の集積にどのような変化が生じるのか調べることも、この課題を明らかにする上で重要であると考ええる。この課題を明らかにすることで、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion とエンドサイトーシスの関係性をより詳細に明らかにすることができる。

8) *in vivo* 実験系での正常細胞に囲まれた変異細胞におけるミオシン-II 及びス

ペクトリンの細胞競合への関与

本研究では、*in vitro* 実験系において正常細胞に囲まれた変異細胞ではミオシン-II 及びスペクトリンが強く集積することが明らかとなった。しかし、この現象はコラーゲンゲル上における実験であり、実際の生体内ではこれらのタンパク質が正常細胞に囲まれた変異細胞内でどのように変化するか、依然として不明のままである。哺乳類における細胞競合の最新の研究において、細胞競合モデルマウス^{30,31} が確立しており、*in vivo* 実験系における哺乳類の細胞競合現象を観察することが可能である。その細胞競合モデルマウスを用いて、ミオシン-II 及びスペクトリンの発現の変化と正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion に関連性が *in vitro* 実験系と同様にあるのかどうか、今後確認する必要があると考ええる。

9) ヒトの初期段階のがん細胞の排除に、ミオシン-II やスペクトリンが関わ

り、この機構の解明が新たながんの予防的治療に繋がるのか

現在の哺乳類培養細胞における細胞競合現象の研究では、イヌ腎尿細管上皮細胞由来の MDCK 細胞を用いて、がんの初期段階の状況を模倣し、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion を観察することが可能である。この実験系を利用することで、正常細胞に囲まれた Src 変異細胞において、ミオシン-II の重鎖である NMHC-IIA とスペクトリンの β 鎖である β -spectrin が変異細胞の Apical extrusion に重要であることが明らかとなった。しかし、同じ哺乳類であるヒトの細胞を用いると、このような現象が確認できるのか、という点は未だ明らかとなっていない。さらに、本研究の最終的な目標の 1 つである新規的ながんの予防的治療法の開発を進めるには、多くの不明な点が未だ残っている。そこで、ヒトの細胞を用いた場合、正常細胞に囲まれた変異細胞の Apical extrusion が生じ、さらに変異細胞内においてミオシン-II とスペクトリンが複合体を形成し、その複合体が変異細胞の Apical extrusion にどのように寄与するのか、今後明らかにすべき重要な点であると考ええる。正常細胞に囲まれた変異細胞の管腔側への逸脱及び排除に関わる研究が、ヒトの細胞において解明されれば、がんの予防治療の新規的なアプローチにつながる研究となると考える (図 29)。

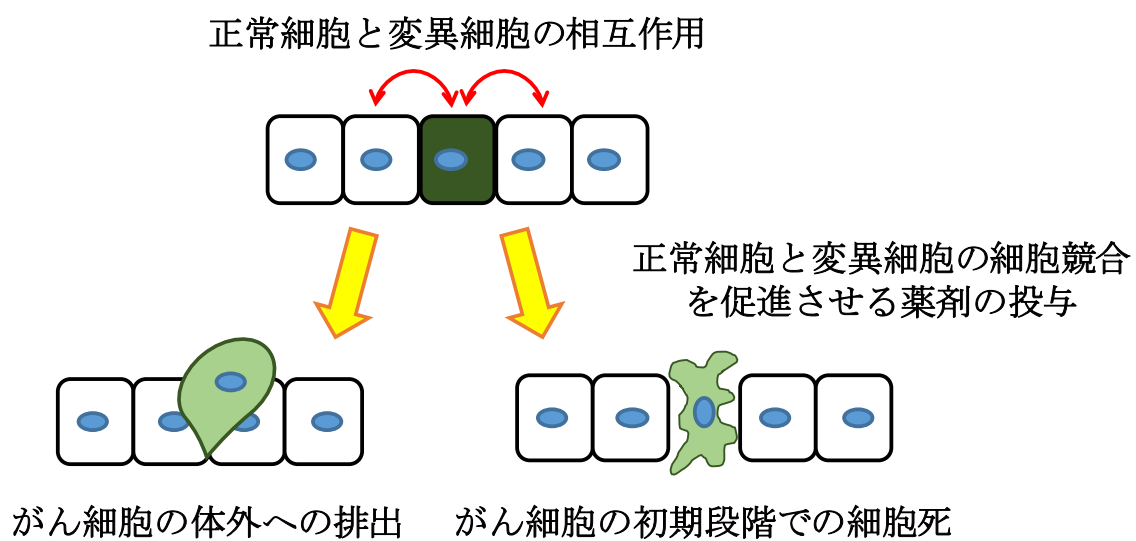


図 29 がんの新規的な予防的治療法の開発

抗がん剤など従来の内科的治療法とは異なる正常細胞による初期段階のがん細胞の排除方法の解明。正常細胞と変異細胞間の細胞競合に関わる相互作用を高める薬剤を開発することで、がん細胞を多段階変異が生じる前に対外へ排出、もしくは細胞死させ、がんの発生を予防的に治療することができる。

第 6 章 引用

1. Amoyel, M. and Bach, E.A. Cell competition: how to eliminate your neighbours. *Development* **141**, 988-1000 (2014).
2. Baker, N.E. Mechanisms of cell competition emerging from Drosophila studies. *Current Opinion in Cell Biology* **48**, 40-46 (2017).
3. Claveria, C. and Torres, M. Cell Competition: Mechanisms and Physiological Roles. *Annual review of cell and developmental biology* **32**, 411-439 (2016).
4. Di Gregorio, A., Bowling, S. and Rodriguez, T.A. Cell Competition and Its Role in the Regulation of Cell Fitness from Development to Cancer. *Developmental Cell* **38**, 621-634 (2016).
5. Johnston, L.A. Competitive interactions between cells: death, growth, and geography. *Science* **324**, 1679-1682 (2009).
6. Maruyama, T. and Fujita, Y. Cell competition in mammals - novel homeostatic machinery for embryonic development and cancer prevention. *Current Opinion in Cell Biology* **48**, 106-112 (2017).
7. Merino, M.M., Levayer, R. and Moreno, E. Survival of the Fittest: Essential Roles of Cell Competition in Development, Aging, and Cancer. *Trends in Cell Biology* **26**, 776-788 (2016).
8. Morata, G. and Ballesteros-Arias, L. Cell competition, apoptosis and tumour development. *The International Journal of Developmental Biology* **59**, 79-86 (2015).
9. Ohsawa, S., Vaughen, J. and Igaki, T. Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Developmental Cell* **44**, 532 (2018).

10. Vincent, J.P., Fletcher, A.G. and Baena-Lopez, L.A. Mechanisms and mechanics of cell competition in epithelia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 581-591 (2013).
11. Wagstaff, L., Kolahgar, G. and Piddini, E. Competitive cell interactions in cancer: a cellular tug of war. *Trends in Cell Biology* **23**, 160-167 (2013).
12. Morata, G. and Ripoll, P. Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Developmental Biology* **42**, 211-221 (1975).
13. Moreno, E., Basler, K. and Morata, G. Cells compete for Decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature* **416**, 755-759 (2002).
14. Vidal, M., Larson, D.E. and Cagan, R.L. Csk-deficient boundary cells are eliminated from normal *Drosophila* epithelia by exclusion, migration, and apoptosis. *Developmental Cell* **10**, 33-44 (2006).
15. de la Cova, C., Abril, M., Bellosta, P., Gallant, P. and Johnston, L. A. *Drosophila* myc regulates organ size by inducing cell competition. *Cell* **117**, 107-116 (2004).
16. Moreno, E. and Basler, K. dMyc transforms cells into super-competitors. *Cell* **117**, 117-129 (2004).
17. Brumby, A. M. and Richardson, H. E. Scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *The EMBO journal* **22**, 5769-5779 (2003).
18. Norman, M., Wisniewska, K. A., Lawrenson, K., Garcia-Miranda, P., Tada, M., Kajita, M., Mano, H., Ishikawa, S., Ikegawa, M., Shimada, T. and Fujita, Y. Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells. *Journal of cell science* **125**, 59-66 (2012).
19. Hogan, C., Dupre-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A.E., Piddini, E., Baena-Lopez, L.A., Vincent, J.P., Itoh, Y., Hosoya, H., Pichaud, F. and Fujita, Y.

- Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nature Cell Biology* **11**, 460-467 (2009).
20. Kajita, M., Hogan, C., Harris, A.R., Dupre-Crochet, S., Itasaki, N., Kawakami, K., Charras, G., Tada, M. and Fujita, Y. Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *Journal of Cell Science* **123**, 171-180 (2010).
 21. Leung, C.T. and Brugge, J.S. Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature* **482**, 410-413 (2012).
 22. Wu, S.K., Gomez, G.A., Michael, M., Verma, S., Cox, H.L., Lefevre, J.G., Parton, R.G., Hamilton, N.A., Neufeld, Z. and Yap, A.S. Cortical F-actin stabilization generates apical-lateral patterns of junctional contractility that integrate cells into epithelia. *Nature Cell Biology* **16**, 167-178 (2014).
 23. Watanabe, H., Ishibashi, K., Mano, H., Kitamoro, S., Sato, N., Hoshiba, K., Kato M., Matsuzawa, F., Takeuchi, Y., Shirai, T., Ishikawa, S., Morioka, Y., Imagawa, T., Sakaguchi, K., Yonezawa, S., Kon, S. and Fujita, Y. Mutant p53-Expressing Cells Undergo Necroptosis via Cell Competition with the Neighboring Normal Epithelial Cells. *Cell Reports* **23**, 3721-3729 (2018).
 24. Karnoub, A. E. and Weinberg, R. A. Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 517-531 (2008).
 25. Frame, M. C., Fincham, V. C., Carragher, N. O. and Wyke, J. A. v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nature reviews. Molecular cell biology* **3**, 233-245 (2002).
 26. Parsons, S. J. and Parsons, J. T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene* **23**, 7906-7909 (2004).

27. Hunter, T. and Sefton, B. M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 1311-1315 (1980).
28. Frame M. C. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochimica et biophysica acta* **1602**, 114-130 (2002).
29. Kajita, M., Sugimura, K., Ohoka, A., Burden, J., Suganuma, H., Ikegawa, M., Shimada, T., Kitamura, T., Shindoh, M., Ishikawa, S., Yamamoto, S., Saitoh, S., Yako, Y., Takahashi, R., Okajima, T., Kikuta, J., Maijima, Y., Ishii, M., Tada, M. and Fujita, Y. Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nature communications* **5**, 4428 (2014).
30. 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, J. I., Duchon, M. R., Nam, J., M., Onodera, Y., Yoshioka, S., Kikuta, J., Ishii, M., Imajo, M., Nishida, E., Fujioka, Y., Ohba, Y., Sato, T. and Fujita, Y. Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nature Cell Biology* **19**, 530-541 (2017).
31. Sasaki, A., Nagatake, T., Egami, R., Gu, G., Takigawa, I., Ikeda, W., Nakatani, T., Kunisawa, J. and Fujita, Y. Obesity Suppresses Cell-Competition-Mediated Apical Elimination of RasV12-Transformed Cells from Epithelial Tissues. *Cell Reports* **23**, 974-982 (2018).
32. Heissler, S.M., and Manstein, D.J. Nonmuscle myosin-2: mix and match. *Cellular and Molecular Life Sciences* **70**, 1-21 (2013).

33. Pecci, A., Ma, X., Savoia, A. and Adelstein, R.S. MYH9: Structure, functions and role of non-muscle myosin IIA in human disease. *Gene* (2018).
34. Vicente-Manzanares, M., Ma, X., Adelstein, R.S. and Horwitz, A.R. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **10**, 778-790 (2009).
35. Machnicka, B., Czogalla, A., Hryniewicz-Jankowska, A., Boguslawska, D.M., Grochowalska, R., Heger, E. and Sikorski, A.F. Spectrins: a structural platform for stabilization and activation of membrane channels, receptors and transporters. *Biochimica et biophysica acta* **1838**, 620-634 (2014).
36. Machnicka, B., Grochowalska, R., Boguslawska, D.M., Sikorski, A.F. and Lecomte, M.C. Spectrin-based skeleton as an actor in cell signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* **69**, 191-201 (2012).
37. Puszkin, S., Maimon, J. and Puszkin, E. Erythrocyte actin and spectrin. Interactions with muscle contractile and regulatory proteins. *Biochimica et biophysica acta* **513**, 205-220 (1978).
38. Smith, A.S., Nowak, R.B., Zhou, S., Giannetto, M., Gokhin, D.S., Papoin, J., Ghiran, I.C., Blanc, L., Wan, J. and Fowler, V.M. Myosin IIA interacts with the spectrin-actin membrane skeleton to control red blood cell membrane curvature and deformability. *Proc eedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, E4377-E4385 (2018).
39. Maul, R. S. and Chang, D. D. EPLIN, epithelial protein lost in neoplasm. *Oncogene* **18**, 7838-7841 (1999).

40. Jiang W. G., Martin, T. A., Lewis-Russell, J. M., Douglas-Jones, A., Ye, L. and Mansel, R. E. Eplin-alpha expression in human breast cancer, the impact on cellular migration and clinical outcome. *Molecular cancer* **7**, 71 (2008).
41. Zhang, S., Wang, X., Osunkoya, A. O., Iqbal, S., Wang, Y., Chen, Z., Muller, S., Chen, Z., Jossion, S., Coleman, I. M., Nelson, P. S., Wang, Y. A., Wang, R., Shin, D. M., Marshall, F. F., Kucuk, O., Chung, L. W., Zhau, H. E. and Wu, D. EPLIN downregulation promotes epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer cells and correlates with clinical lymph node metastasis. *Oncogene* **30**, 4941-4952 (2011).
42. Maul, R. S., Song, Y., Amann, K. J., Gerbin, S. C., Pollard, T. D. and Chang, D. D. EPLIN regulates actin dynamics by cross-linking and stabilising filaments. *The Journal of cell biology* **160**, 399-407 (2003).
43. Abe, K. and Takeichi, M. EPLIN mediates linkage of the cadherin catenin complex to F-actin and stabilizes the circumferential actin belt. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 13-19 (2008).
44. Ohoka, A., Kajita, M., Ikenouchi, J., Yako, Y., Kitamoto, S., Kon, S., Ikegawa, M., Shimada, T., Ishikawa, S. and Fujita, Y. EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells. *Journal of Cell Science* **128**, 781-789 (2015).
45. Zhou, A. X., Hartwig, J. H. and Akyurek, L. M. Filamins in cell signaling, transcription and organ development. *Trends in Cell Biology* **20**, 113–123 (2010).
46. Nakamura, F., Stossel, T. P. and Hartwig, J. H. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adhesion and Migration* **5**, 160–169 (2011).

47. Stossel, T. P. Condeelis, J., Cooley, L., Hartwig, J. H., Noegel, A., Schleicher, M. and Shapiro, S. S. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**, 138–145 (2001).
48. Kim, H. and McCulloch, C. A. Filamin A mediates interactions between cytoskeletal proteins that control cell adhesion. *FEBS Letters* **585**, 18–22 (2011).
49. Ehrlicher, A. J., Nakamura, F., Hartwig, J. H., Weitz, D. A. and Stossel, T. P. Mechanical strain in actin networks regulates FilGAP and integrin binding to filamin A. *Nature* **478**, 260–263 (2011)
50. Wiche, G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. *Journal of Cell Science* **111**, 2477–2486 (1998).
51. Wiche, G., Osmanagic-Myers, S. and Castanon, M. J. Networking and anchoring through plectin: a key to IF functionality and mechanotransduction. *Current Opinion in Cell Biology* **32**, 21–29 (2015).
52. Castanon, M. J., Walko, G., Winter, L. and Wiche, G. Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. *Histochemistry and Cell Biology* **140**, 33–53 (2013).
53. Steinbock, F. A. and Wiche, G. Plectin: A cytolinker by design. *Biological Chemistry* **380**, 151–158 (1999).
54. Kadeer, A., Maruyama, T., Kajita, M., Morita, T., Sasaki, A., Ohoka, A., Ishikawa, S., Ikegawa, M., Shimada, T. and Fujita, Y. Plectin is a novel regulator for apical extrusion of RasV12-transformed cells. *Scientific reports* **7**, 44328 (2017).
55. Deakin, N. O. and Turner, C. E. Paxillin comes of age. *Journal of Cell Science* **121**, 2435–2444 (2008).

56. Deakin, N. O. and Turner, C. E. Paxillin inhibits HDAC6 to regulate microtubule acetylation, Golgi structure, and polarized migration. *Journal of Cell Biology* **206**, 395–413 (2014).
57. Kasai, N., Kadeer, A., Kajita, M., Saitoh, S., Ishikawa, S., Maruyama, T. and Fujita, Y. The paxillin-plectin-EPLIN complex promotes apical elimination of RasV12-transformed cells by modulating HDAC6-regulated tubulin acetylation. *Scientific reports* **8**, 2097 (2018).
58. Hogan, C., Serpente, N., Cogram, P., Hosking, C.R., Bialucha, C.U., Feller, S.M., Braga, V.M., Birchmeier, W. and Fujita, Y. Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 6690-6700 (2004).
59. Saitoh, S., Maruyama, T., Yako, Y., Kajita, M., Fujioka, Y., Ohba, Y., Kasai, N., Sugama, N., Kon, S., Ishikawa, S., Hayashi, T., Yamazaki, T., Tada, M. and Fujita, Y. Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **114**, E2327-E2336 (2017).

第 7 章 謝辞

本研究にあたり、研究を行う環境を与えてくださり、粘り強く御指導をして頂きました北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野 藤田恭之 教授及び 釜崎とも子 特任助教に、心底より感謝申し上げます。また、これまでに実験指導をしていただいた東京医科歯科大学難治疾患研究所生体防御学分野 梶田美穂子 助教及び 早稲田大学高等研究所 丸山剛 講師に心底より感謝申し上げます。

さらに本研究において、共同研究をしていただいた同志社大学生命医科学部医生命システム学科 池川雅哉 教授及び島津製作所 SHIMADZU SCIENTIFIC INSTRUMENTS, INC. 嶋田崇史 博士に厚く御礼申し上げます。

最後に、北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野の皆様からの多くの助言と支援に、厚く御礼申し上げます。