



Title	正常上皮細胞とp53変異細胞間に生じる細胞競合を制御する分子メカニズムの研究
Author(s)	渡邊, 裕貴
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14911号
Issue Date	2022-03-24
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k14911">https://doi.org/10.14943/doctoral.k14911</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85282">https://hdl.handle.net/2115/85282</a>
Type	doctoral thesis
File Information	WATANABE_Hirotaka.pdf



正常上皮細胞と p53 変異細胞間に生じる  
細胞競合を制御する分子メカニズムの研究

渡邊 裕貴

北海道大学大学院総合化学院

2022

正常上皮細胞と p53 変異細胞間に生じる  
細胞競合を制御する分子メカニズムの研究

渡邊 裕貴

生物化学研究室

北海道大学大学院総合化学院

2022

1

# 目次

図のリスト	5
表のリスト	7
略語	8
<b>1 章：緒言</b>	<b>10</b>
1.1. 本研究のコンセプト	11
1.2. 本学位論文中にて論ずるがん化に関連する遺伝子の概要	11
1.2.1. <i>TP53</i>	12
1.2.2. <i>Ras</i>	13
1.2.3. 多段階発癌モデル	13
1.3. 細胞競合	14
1.3.1. ショウジョウバエでの細胞競合	15
1.3.1.1. Minute	15
1.3.1.2. dMyc	15
1.3.1.3. Scribble	16
1.3.2. 脊椎動物での細胞競合	16
1.3.2.1. Ras	17
1.3.2.2. Src	18
1.3.2.3. Scribble / Mahjong	18
1.3.2.4. Epithelial defense against cancer (EDAC)	19
1.4. 細胞死	19
1.4.1. アポトーシス	19
1.4.2. ネクローシス	20
1.4.3. ネクロプトーシス	21
1.4.1. その他細胞死	22
1.5. 本学位論文での目的	22
1.6. 参考文献	23
<b>2 章：細胞競合における正常細胞に囲まれた p53 変異細胞の表現型</b>	<b>29</b>
2.1. 要旨	30
2.2. 緒言	30
2.3. 実験手法	31

2.3.1. 抗体と材料	31
2.3.2. 細胞培養	31
2.3.3. オルガノイドのウイルス感染	33
2.3.4. 蛍光免疫染色とウェスタンブロット	33
2.3.5. データ解析	34
2.4. 結果	34
2.4.1. 正常細胞に囲まれた p53 変異細胞は細胞非自律的に上皮層から基底膜側へ逸脱する。	34
2.4.2. 正常細胞に囲まれた p53 変異細胞はネクロプトーシスにより細胞死する。	45
2.4.3. マウス腸管上皮層に誘導された p53 変異細胞は基底側へ排除される。	45
2.5. 考察	56
2.6. 参考文献	59
<b>3 章：正常細胞と p53 変異細胞間に生じる細胞競合のより詳細な分子メカニズムの解明と多段階発癌の関わり</b>	<b>62</b>
3.1. 要旨	63
3.2. 緒言	63
3.3. 実験手法	63
3.3.1. 抗体と材料	63
3.3.2. 細胞培養	64
3.3.3. 蛍光免疫染色	64
3.3.4. タイムラプスイメージング	65
3.3.5. データ解析	65
3.4. 結果	66
3.4.1. 細胞競合による p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱を制御する分子メカニズムの解明	66
3.4.2. 多段階発癌の遺伝子変異の規則性と細胞競合との関連	77
3.5. 考察	80
3.6. 参考文献	82
<b>4 章：総括</b>	<b>84</b>
4.1. 結論	85
<b>謝辞</b>	<b>88</b>

## 図のリスト

<b>Figure 2-1.</b>	p53R273H 細胞はテトラサイクリン添加により GFP でタグした p53R273H を発現する。 .....	37
<b>Figure 2-2.</b>	p53R175H 細胞はテトラサイクリン添加により GFP でタグした p53R175H を発現する。 .....	38
<b>Figure 2-3.</b>	ドキシソルビシンが誘導する p21 の発現に対する p53R273H または p53R175H の効果。 .....	39
<b>Figure 2-4.</b>	正常細胞に囲まれた p53R273H 細胞は細胞死し、基底側へ逸脱する。 .....	40
<b>Figure 2-5.</b>	正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R175H 細胞は上皮層に留まる。 .....	41
<b>Figure 2-6.</b>	一過性に p53 変異体を発現した MDCK 細胞の挙動。 .....	42
<b>Figure 2-7.</b>	p53 ノックアウトした細胞層においても p53R273H 細胞は細胞死し、基底側へ逸脱する。 .....	43
<b>Figure 2-8.</b>	HPDE6 細胞では、p53R175H 変異細胞の方が顕著に基底膜側へ逸脱する。 .....	44
<b>Figure 2-9.</b>	基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞はカスパーゼ-3 陰性である。 .....	47
<b>Figure 2-10.</b>	p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱に対する Z-VAD-FMK の効果。 .....	48
<b>Figure 2-11.</b>	正常細胞に囲まれた p53R273H 細胞が基底膜側へ排除されるのにネクロプトーシスが関与している。 .....	49
<b>Figure 2-12.</b>	p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱に対する RIPK3 ノックダウンの効果。 .....	50
<b>Figure 2-13.</b>	正常な上皮細胞に囲まれた変異型 p53 発現細胞は、マウス腸管オルガノイドにおいても基底膜側に逸脱する。 .....	51
<b>Figure 2-14.</b>	正常細胞に囲まれた p53R270H 細胞の挙動。 .....	52
<b>Figure 2-15.</b>	正常細胞に囲まれた p53R172H 細胞の挙動。 .....	53

<b>Figure 2-16.</b>	正常細胞に囲まれた GFP 細胞の挙動。 .....	54
<b>Figure 2-17.</b>	<i>ex vivo</i> システムでの p53R270H 細胞の基底膜側への逸脱は Necrostatin-1 により有意に抑制される。 .....	55
<b>Figure 3-1.</b>	Blebbistatin は p53R273H 細胞が基底膜側へ逸脱するのを有意に抑 制する。 .....	68
<b>Figure 3-2.</b>	p53R273H 細胞が基底膜側へ逸脱するまでのタイムラプスイメージ ング。 .....	69
<b>Figure 3-3.</b>	p53R273H 細胞が頂端側へ逸脱するまでのタイムラプスイメージ ング。 .....	70
<b>Figure 3-4.</b>	p53R273H 細胞には 2 つの細胞死様式が見られる。 .....	71
<b>Figure 3-5.</b>	カスパーゼ-3 陽性と陰性の 2 つの表現型を定量した結果。 .....	72
<b>Figure 3-6.</b>	TNF- $\alpha$ 阻害剤では細胞競合により生じるネクロプトーシスを抑制 しない。 .....	73
<b>Figure 3-7.</b>	MMP 阻害剤は細胞競合によって起こる基底膜側への逸脱を抑制す る。 .....	75
<b>Figure 3-8.</b>	MMP-9 は p53R273H 細胞の周辺の正常細胞で局在する。 ...	76
<b>Figure 3-9.</b>	RasV12 の変異を既に有している細胞層に p53 変異が発生すると、 p53 変異細胞は上皮層に留まる。 .....	78
<b>Figure 3-10.</b>	p53 変異を既に有している細胞層に RasV12 変異が生じても、 RasV12 細胞は頂端側へ逸脱する。 .....	79
<b>Figure 4-1.</b>	p53 変異細胞と隣接する正常細胞との細胞競合時の分子メカニズム の概略モデル。 .....	87

## 表のリスト

<b>Figure 3-1.</b> 正常細胞に囲まれた p53 変異細胞が基底膜側へ逸脱することに対する各阻害剤が及ぼす効果。 .....	74
--	----

## 略語

<b>ATAM</b>	ataxia telangiectasia mutated
<b>APC</b>	adenomatous polyposis coli
<b>CAPE</b>	caffeic acid phenethyl ester
<b>cFLIP</b>	cellular FLICE-inhibitory protein
<b>DAPMs</b>	Danger-associated molecular patterns
<b>DIC</b>	Differential interference contrast
<b>DISC</b>	Death Inducing Signaling Complex
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>DN</b>	dominant negative
<b>DNA</b>	deoxyribonucleic acid
<b>EDAC</b>	epithelial defense against cancer
<b>F-actin</b>	filamentous actin
<b>FADD</b>	Fas-associated death domain
<b>FBS</b>	fetal bovine serum
<b>GAP</b>	GTPase-activating protein
<b>GFP</b>	green fluorescent protein
<b>HPDE</b>	Human Pancreatic Duct Epithelial
<b>MAP</b>	mitogen-activated protein
<b>MDCK</b>	Madin-Darby canine kidney
<b>MLC</b>	Myosin light chain
<b>MLKL</b>	mixed lineage kinase domain-like
<b>MMP</b>	Matrix metalloproteinase
<b>NA</b>	numerical aperture
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PFA</b>	paraformaldehyde
<b>Ras</b>	Rat sarcoma
<b>RFP</b>	red fluorescent protein
<b>RHIM</b>	RIP homotypic interaction motif
<b>RIPK</b>	receptor interacting protein kinase
<b>SD</b>	standard deviation
<b>shRNA</b>	small hairpin RNA
<b>Tam</b>	tamoxifen
<b>Tet</b>	tetracycline

<b>TNF</b>	tumor necrosis factor
<b>TRADD</b>	TNF receptor 1-associated death domain protein
<b>TRAIL</b>	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
<b>WT</b>	wild type
<b>P53</b>	protein 53
<b>PanIN</b>	pancreatic intraepithelial neoplasia

1 章 :  
緒言

## 1. 1. 本研究のコンセプト

癌は日本においては、2人に1人が癌と診断されるくらいメジャーな病気となっている<sup>1</sup>。世界的に見ても、癌は主要な死因であり、2020年には約1,000万人が死亡しており、アメリカでは2021年に推定190万人が新たに癌として診断されており、約60万人が癌で死亡している<sup>2</sup>。これらの事実から、効果的な治療法の確立が望まれており、予防的アプローチもまた必要である。

今までの癌研究の成果により、臨床にて発見される癌細胞の多くは、正常細胞と異なり、複数のがん遺伝子やがん抑制遺伝子に変異が起こっていることが知られている<sup>3</sup>。ヒトの体内で生じる癌の80%以上は上皮細胞由来であり、癌化の最初期のステージでは正常な上皮層の中の1つの細胞に変異が起こることで発癌が始まる。その後、その変異細胞が異常に増殖してゆき、さらなる変異が蓄積することで悪性腫瘍へと変化する。また、先行研究により、いくつかの遺伝子変異に関して、正常細胞が変異を起こした細胞を囲むと排除することが報告されてきた<sup>4,9</sup>。しかしながら、ヒトの癌で頻繁に変異が見られているがん抑制タンパク質 p53 の変異を有する細胞が正常細胞に囲まれた時にどのような現象が起こるのかは不明であった。本研究では、MDCK 細胞による *in vitro* モデルとマウスの腸管上皮細胞のオルガノイドによる *ex vivo* モデルを用いて、発癌初期に p53 変異が生じた際に何が起こるのかに焦点を当てる。

## 1. 2. 本学位論文中にて論ずるがん化に関連する遺伝子の概要

癌化の過程において、がん遺伝子は、異常増殖能、足場非依存性や細胞死への耐性のような癌の一般的な特徴を促す。一方で、がん抑制遺伝子は細胞の増殖抑制、DNA 修復や細胞死の誘導により、癌化を抑える働きをする。

### 1.2.1. TP53

TP53 はがん抑制遺伝子の一種であり、393 アミノ酸からなる核内タンパク質 p53 をコードしている。p53 は、塩基配列特異的 DNA 結合に重要である中心部第 100-300 残基からなるコア・ドメインである DNA 結合ドメインとその N 末端及び C 末端側に転写活性ドメイン、四量体形成ドメイン等を持つ転写活性因子である<sup>10,11</sup>。定常状態において、ユビキチン-プロテアソーム経路によって p53 は恒常的に分解されることで、細胞内の p53 の量が非常に低く保たれている。DNA 損傷や活性酸素種 (ROS) の過剰生産等の様々なストレスを受けると、p53 の分解が抑制され、安定化した p53 が四量体を形成して DNA に結合し、細胞周期の停止、アポトーシスや DNA 修復などの抗ストレス応答に関与する下流の調節因子の転写を活性化させる<sup>12,13</sup>。

p53 の機能を失うと、損傷した細胞もしくは DNA が不完全に修復された細胞が生存することや増殖亢進を誘引し、最終的には腫瘍が形成される。ヒトの癌の半数で p53 は、変異を起こしていることが知られている<sup>14-16</sup>。ヒトの癌において、p53 変異は世界中で様々な癌検体で調べられ、ミスセンス変異が大部分を占めていることが知られている。蓄積する p53 遺伝子異常のほとんどは、DNA 結合ドメイン部分であり、特に 175、273 番目のアルギニンがヒスチジンに置換された R175H と R273H のミスセンス変異である<sup>14</sup>。p53R175H または p53R273H は、野生型 p53 とヘテロ四量体を形成することで、p53 の転写活性を阻害する<sup>17,18</sup>。加えて、p53R175H または p53R273H は、gain-of-function (GOF) 型変異でもあり、p53 ファミリーである p63 および p73 との相互作用を抑制することや、直接的に特定の遺伝子の転写調節をするという機能を得ることで発がん性を持つようになる<sup>19,20</sup>。

多段階発がんの過程において、p53 変異は一般的に中期もしくは後期に蓄積するが<sup>21-27</sup>、なぜ初期に蓄積しないのか、このメカニズムは不明である。

### 1.2.2. Ras

Ras タンパク質は、低分子量 GTPase の Ras スーパーファミリーの初期に見されたタンパク質であり、非常に複雑なシグナル伝達ネットワークの重要な役割を果たす<sup>28</sup>。RAS タンパク質には、活性化シグナル伝達の共通のコアメカニズムを持つ。コアメカニズムは 4 つの主要な領域から構成され、リン酸結合ループ (P ループ、10-17 残基)、スイッチ I (30-38 残基)、スイッチ II (60-76 残基) および塩基結合ループ (116-120 残基および 145-147 残基) である。RAS タンパク質の発癌性変異として頻繁に見られる変異部位としては、P ループの 12 残基と 13 残基がある。Ras 遺伝子の 12 番目のコドンであるグリシンが他のアミノ酸に変異しているが、特に、プロリンに変異した時は細胞の形質転換をもたらし、GTP の加水分解速度の低下と GAPs による Ras タンパク質の生理学的な不活性化を阻害し、MAP キナーゼシグナル伝達の活性化が促される<sup>29-31</sup>。標準的な RAF-MEK-ERK 経路に加えて、活性化した RAS タンパク質は PI3K-AKT-mTOR キナーゼカスケード反応にもシグナルを伝達することで、細胞の分化、生存、増殖などの正常な細胞の基本的なプロセスの多くを制御している。ヒトの発癌過程において、突然変異により Ras タンパク質は活性化され、全てのヒトの癌の約 30% で変異が認められる重要な発癌におけるドライバー遺伝子である<sup>32</sup>。

### 1.2.3. 多段階発癌モデル

癌細胞は、正常な細胞の遺伝子に 2 個から 10 個程度の変異が蓄積することで、発生する。これらの遺伝子変異の蓄積は一度に起こらず、時間をかけて徐々に蓄積していく。1953 年に Nordling は、欧米 4 か国における年齢と癌死亡率の関係を調査し、癌の死亡率が年齢に依存して指数関数的に増大していたという結果から、1 個の細胞に生じた DNA の突然変異は段階的に蓄積していき、癌の発生率を高めていたのだという考えに至り、多段階発癌説を提唱した<sup>33</sup>。その後、1990 年に Vogelstein らにより、家族

性大腸癌を発症した患者を調べた結果、以下のような多段階発癌説が報告された<sup>26</sup>。まず、形態学的には、正常な大腸上皮に異常増殖する細胞の集団(ポリープ)が現れ、ポリープが大きくなるにつれて細胞集団中に突然変異やDNAのメチル化異常が蓄積していった。さらにその後、近くの組織に浸潤したり、一部が血管やリンパ管を通して別の臓器に転移するといった悪性化が見られた。この時、最初の小さなポリープの時にはがん抑制遺伝子である APC 遺伝子の不活性化が、大きなポリープの時にはがん原遺伝子である K-ras 遺伝子の活性化が、悪性化した時にはがん抑制遺伝子である p53 遺伝子の不活性化が見られた。このように、正常な細胞にひとつの変異が起これば、その細胞は増殖していく。そこに第二の変異が起これば、さらに早く増殖するようになり、変異が蓄積していくことでより悪性度の高い癌細胞へと変化すると考えられる。他にも、例として膵癌になるまでの過程を示す<sup>34</sup>。膵癌は膵管上皮の過形成から異型病変を経て腫瘍性病変へ変わっていくことが知られており、異形成度に合わせて順に PanIN-1A、PanIN-1B、PanIN-2、PanIN-3 と進行し、浸潤癌へ進展することが知られている。まず、K-ras 遺伝子の変異することで PanIN-1A となり、次いで、p16 に、その後 p53 や Smad4 などのがん抑制遺伝子の変異していくことで進行していく。このように、一般的に Ras 変異は癌化の初期に、p53 変異は中期から後期にかけて蓄積することが知られている。

### 1.3. 細胞競合

癌化の初期におけるメカニズムの解明を考えるのであれば、一つの遺伝子変異を有する変異細胞と正常細胞が隣り合っており、相互作用が起きている。近年の研究成果より、変異細胞と正常細胞との間で互いに生存を争う「細胞競合」という現象が生じることが明らかとなってきた。細胞競合とは組織において適応度の異なる 2 種類の細胞が近接すると、適応度のより高い細胞が生き残り、より低い細胞が排除されるという現象のことである。細胞競合は 1975 年に Gines Morata と Pedro Ripoll によるショウジョウバエの翅成虫原基

におけるリボソームタンパク質遺伝子の変異体を用いた実験により、はじめて報告された。また、最近では哺乳動物においても細胞競合が生じることが数多く報告されたことから、細胞競合は普遍的な恒常性維持機構だと考えられている<sup>5,9</sup>。

### 1.3.1. ショウジョウバエでの細胞競合

#### 1.3.1.1. Minute

1975年にMorataらによって、リボソームタンパク質遺伝子の機能欠失変異を持つショウジョウバエのMinute変異体を用いた研究により細胞競合現象が報告された<sup>35</sup>。Minuteをホモに持つショウジョウバエはタンパク質合成が起こらず致死となるが、ヘテロに持つと個体の発生の遅延および感覚毛の微細化をひき起こすが、正常なサイズの個体に発育する。しかしながら、発生期の翅においてMinuteヘテロ変異細胞と正常な細胞とが混在する状況を作るとMinuteヘテロ変異細胞が排除され、最終的に正常な細胞のみからなる翅がつくられることが報告された。また、この現象は正常な細胞に隣接したMinuteヘテロ変異細胞でのみ起こり、Minuteヘテロ変異細胞同士が隣接した場合は排除されなかった。このことから、適応度の低いMinute変異細胞が細胞非自律的に組織より排除されることが示唆された。この細胞競合現象の発見から30年後、正常な細胞に隣接したMinuteヘテロ変異細胞は細胞競合によりアポトーシスを起こして排除されることが明らかとなり、細胞間の相互作用を介した変異細胞の排除が明らかにされた<sup>36</sup>。

#### 1.3.1.2. Myc

Mycはマウスやヒトの癌でも過剰発現していることが知られるがん遺伝子である。2004年にBaslerとJohnstonのグループはショウジョウバエ翅成虫原基におい

て Myc の発現量の違いにより細胞競合が起こることを報告し、相対的に Myc の発現が多い細胞が低い細胞を駆逐する現象が見られた<sup>37, 38</sup>。このように Myc の発現量が高い細胞は細胞競合において優位であるため、**super-competitor** と呼ばれる。興味深いことに、Myc の発現量の少ない細胞と正常細胞が隣接すると、Myc の発現量の少ない細胞がアポトーシスを起こし排除される。一方、Myc の発現量が多い細胞と正常な細胞が隣接すると、逆に正常な細胞がアポトーシスを起こし排除される。このように、正常細胞が敗者となり、変異細胞が勝者となって増殖していく **super-competitor** となる場合もあることを明らかとした。

### 1.3.1.3. Scribble

Scribble は 2000 年に Bilder らによってショウジョウバエでがん抑制遺伝子として機能していることが報告された<sup>39</sup>。癌のほとんどは上皮由来であるが、上皮細胞の恒常性の維持には頂底軸方向の極性（apico-basal 極性）を保つことが重要であり、この極性を失うと異常増殖能を獲得する。そのため、apico-basal 極性遺伝子である Scribble が欠損すると、上皮細胞は過剰に増殖を始める。正常細胞に囲まれた Scribble 欠損細胞は MAP キナーゼの一つである JNK 活性化が亢進することで、アポトーシスが誘導され、排除されることが知られている<sup>40, 41</sup>。

### 1.3.2. 脊椎動物での細胞競合

ショウジョウバエで発見された細胞競合が脊椎動物、特に哺乳類でも起こるのかという疑問は大変興味深い。1960 年代から 1970 年代にかけて、哺乳類の細胞培養システムを用いた研究により、変異細胞と隣接する正常細胞との相互作用により細胞競合が起こることが明らかとなり、シグナル伝達経路や細胞の挙動も調べられ、多くの場合、

さまざまな変異を起こした細胞が排除されることが明らかとなってきている。

### 1.3.2.1. Ras

Hogan らは、テトラサイクリンにより GFP-RasV12 (活性化型 Ras) の発現が誘導される MDCK 細胞 (以下、RasV12 細胞と呼ぶ) を用いて、正常上皮層における発癌過程の最初期を模倣する MDCK *in vitro* システムを樹立した。まず、RasV12 細胞と正常 MDCK 細胞を 1 : 100 の比率でコラーゲンゲル上に混合播種し、テトラサイクリンを含まない条件下で培養した。混合した細胞が一層の上皮細胞シートを形成した後、テトラサイクリン含有培地に置換することで、発がん性タンパク質である GFP-RasV12 の発現を誘導した。これにより、正常な上皮細胞層中に少数の細胞で Ras 変異が起こった状態を模倣した。このシステムを用いて、RasV12 細胞が正常な上皮細胞に囲まれると、RasV12 細胞の大部分が正常上皮細胞層から頂端側へ排除されることを明らかにした<sup>4</sup>。ショウジョウバエでの細胞競合と同様に、RasV12 細胞を単独培養した場合には頂端側への逸脱は起こらないことから、RasV12 細胞の頂端側への逸脱には RasV12 の発現のみならず、隣接する正常細胞の存在が必要であることを示唆している。一方で、頂端側へ逸脱しなかった RasV12 細胞は、隣接する正常細胞の基底膜側のマトリックスとの間に突起を伸長させていることが見られた (basal protrusion)。この basal protrusion も、頂端側への逸脱の現象と同様に細胞非自律的に起こる現象である。また、basal protrusion は、癌細胞の基底膜浸潤を促進する構造変化である。

RasV12 細胞の頂端側への逸脱に関しては、いくつかの研究によって分子メカニズムが報告されている。Hogan らは、正常細胞に囲まれた RasV12 細胞の細胞間接着部位では F-actin が集積し、RasV12 細胞内ではミオシン活性も亢進していた<sup>4</sup>。また、RasV12 の頂端側への逸脱には Cdc42、ROCK (Rho キナーゼ) のシグナル伝達経路の活性が重要な役割を果たすことも見出されている。ROCK の下流のターゲットで

ある MLC のリン酸化の上昇が正常細胞に囲まれた RasV12 細胞で観察されている。他にも、逸脱に関係する分子メカニズムが報告されている<sup>42,43</sup>。

### 1.3.2.2. Src

RasV12 細胞と同様に、Src 活性化細胞は、正常上皮細胞に囲まれると、頂端側へ逸脱する<sup>9</sup>。温度依存で v-Src の活性化をスイッチできる MDCK 細胞を用いて、RasV12 細胞を用いた実験と同様の手法により明らかにした。ゼブラフィッシュの enveloping layer においても、Src を形質転換した細胞が頂端側へ押し出される現象を観察し、このプロセスが進化的に保存されていることを示した。正常細胞に囲まれた Src 活性化細胞はミオシン-II やフォーカルアドヒージョンキナーゼの活性が亢進し、下流の ERK の活性化も見られた。

### 1.3.2.3. Scribble / Mahjong

Scribble は、哺乳類でも極性調節と腫瘍抑制に重要な役割を果たす。Scribble ノックダウン細胞が正常上皮細胞に囲まれている場合、Scribble ノックダウン細胞はアポトーシスを起こし、上皮単層から逸脱する<sup>8</sup>。ショウジョウバエにおける Scribble を介した細胞競合とは異なり、HNK 経路ではなく、p38/MAPK 活性化が Scribble ノックダウン細胞のアポトーシスに必要であり、ショウジョウバエとは異なる他の分子メカニズムを示唆している。

Scribble 同様、癌抑制遺伝子として知られる lgl に、哺乳類細胞において結合する分子として同定されたのが Mahjong である<sup>7</sup>。MDCK 細胞を用いて Mahjong をノックダウンした細胞は、正常細胞に囲まれるとアポトーシスにより細胞層の頂端側へ押し出されて排除されることを発見した。Mahjong ノックダウン細胞のアポトーシス

には JNK シグナル伝達系が関与している。

#### **1.3.2.4. Epithelial defense against cancer (EDAC)**

今までの研究成果により、RasV12 や v-Src などの発癌性変異を持つ細胞が正常な上皮細胞に囲まれた時、変異細胞が細胞層から頂端側に押し出されることが報告されている<sup>4,9</sup>。この現象は、変異細胞のみが存在する場合には起こらず、周囲の正常細胞が細胞競合を介して変異細胞を排除することを示している。梶田らは、頂端側への押し出しの過程で、正常な細胞が細胞骨格タンパク質であるフィラミンを動的に調節することで、隣接する変異細胞を認識し、積極的に排除することを報告した<sup>44</sup>。この現象を、EDAC (Epithelial Defense Against Cancer) と名付けた。

### **1.4. 細胞死**

細胞死とは、その名の通りであり、我々の体内では、日々多くの細胞が細胞死により排除されている。役目を終えた細胞や、ウイルスに感染した細胞、がん細胞といった有害な細胞の排除のためのみならず、成長の過程等の生命活動において能動的に遺伝子発現によって起こる場合もある。一般的に細胞死はアポトーシスとネクローシスの二つに分類される。前者は細胞内のプログラム機構によって制御される細胞死であるが、後者は外部刺激や環境によって誘導される受動的な細胞死である。近年では、プログラムにより制御される細胞死としてアポトーシス以外にも数多くの種類が存在することが知られている<sup>45</sup>。

#### **1.4.1. アポトーシス**

発生過程における不要な細胞の排除や癌細胞などの生体に有害な細胞の排除の際

に起こる細胞死の多くはアポトーシスである。生体の恒常性維持に重要な役割を果たす、巧妙に制御された細胞死であり、形態学的な特徴としては細胞の収縮、DNA凝縮および断片化や細胞質の断片化や膜ブレブ（小胞）の形成等が見られる。また、アポトーシスが進んでいくと、免疫調節活性をもつアポトーシス小体と呼ばれる小胞ができる。

アポトーシスは分子によって制御された細胞死であり、アポトーシスによる細胞死を誘導する3つのシグナル伝達経路が知られている<sup>45</sup>。外因性（death receptors）経路、内因性（ミトコンドリアを介した）経路およびパーフォリン/グランザイム経路である。内因性経路では、細胞死刺激が伝わると、ミトコンドリアから細胞質へ Cytochrome C が放出され、誘導型カスパーゼであるカスパーゼ-9 が活性化されていき、さらに下流の実行型カスパーゼであるカスパーゼ-3 が活性化される<sup>46</sup>。また、外因性経路では、デスレセプターである TNFR ファミリーに TNF- $\alpha$ 、FasL、TRAIL 等のリガンドが結合することで受容体が活性化することで起こる。受容体が活性化すると DISC が形成され、この複合体にはアダプタータンパク質である FADD や TRADD が含まれ、これらが誘導型であるカスパーゼ-8 と複合体を形成し活性化させる。活性化したカスパーゼ-8 が下流のカスパーゼ-3 が活性化される。このように、どの経路であっても、最終的にアポトーシスは活性化カスパーゼによって実行される。DNA 損傷を受けると p53 は細胞にアポトーシスを誘導し、発がんを抑制する。p53 は外因性経路における TRAIL およびその受容体 DR5<sup>47, 48</sup> や内因経路 Bax や Bim などの発現を促進することで、アポトーシスを誘導する<sup>49</sup>。

#### 1.4.2. ネクローシス

ネクローシスは予期せぬ受動的な細胞死であり、極端な物理的な温度や圧力、化学的ストレス、外傷あるいは感染症、毒素、外傷などの細胞質が膨らむことなどの形態学的な変化に繋がる多くの外的要因によって起こる細胞死である<sup>45</sup>。形態学的な特徴としては、細胞が徐々に膨らんでいき、膜が破裂し、オルガネラが視覚化できるように

なる。細胞は膨潤破裂を起こすと、細胞の内容物が流出し、炎症細胞が浸潤してくる。細胞の破裂によりダメージ関連分子パターン (DAMPs) と呼ばれる核内あるいは細胞質内に存在するタンパク質や DNA などが放出される。DAMPs が放出されると隣接する細胞に損傷を与えることや、DAMPs を免疫細胞が認識し炎症反応を引き起こす。

### 1.4.3. ネクロプトーシス

ネクロプトーシスは制御されたネクローシスであり、アポトーシスが阻害された時に起こる細胞死である。ネクロプトーシスはカスパーゼ非依存性であり、RIPK1、RIPK3、MLKL が実行因子であることが知られている<sup>45</sup>。炎症性サイトカインの1つである TNF $\alpha$ により誘導されるネクローシス様の細胞死の存在が知られていた<sup>50</sup>。この細胞死はカスパーゼを阻害することで促進することが明らかとなった。2005年に TNF $\alpha$ により誘導されるネクロプトーシスを抑制する化合物としてネクロスタチン-1が同定され<sup>51</sup>、その標的分子として RIPK1 であることが明らかとなった<sup>52</sup>。2009年に、TNF $\alpha$ により誘導されるネクロプトーシスの実行因子の一つとして RIPK3 と呼ばれる RIPK1 と同じ RIP キナーゼファミリーに属する分子が報告された<sup>53</sup>。RIPK1 および RIPK3 はセリン/スレオニンキナーゼであり、N 末端側にキナーゼドメイン、C 末端側に RHIM ドメインをもち、RIPK1 と RIPK3 は RHIM ドメインを介して結合し、RIPK1 と RIPK3 との相互リン酸化が起こる。その後、RIPK3 の下流分子として MLKL が見つかかり、リン酸化し、活性化した RIPK3 は MLKL の Thr357 および Ser358 をリン酸化し、活性化する<sup>54</sup>。活性化した MLKL は多量体を形成し、細胞膜やミトコンドリアなどの細胞内小器官の膜資質に移行し、孔を形成し、ネクロプトーシスが起こる。ネクロプトーシスもネクローシス同様、細胞膜の孔より、DAMPs が放出され、周囲に炎症反応を誘発する。これら RIPK の活性化は、アポトーシスが阻害された条件下で、デス受容体や Toll 様受容体や T 細胞受容体といったさまざまな細胞表面受容体か

ら成る高分子複合体によって誘導されることで活性化する<sup>55,56</sup>。しかしながら、いまだ不明な点の多い細胞死である。

ネクロプトーシスは、抗がん剤をがん細胞に投与した時にも見られる<sup>57</sup>。癌細胞は一般的にアポトーシス耐性を持つことが知られるが、ネクロプトーシスが新たな癌治療として有用である可能性もある。一方で、ネクロプトーシスは炎症反応を引き起こすが、慢性的に炎症が起こると癌化を促進することは知られているため<sup>58</sup>、ネクロプトーシスは癌化を促進する可能性も持ち合わせている。

#### 1.4.4. その他細胞死

他にも分子により制御される細胞死として、パイロトーシス、フェロトーシス、オートファジー細胞死、ネトーシス等がある。例えば、パイロトーシスはサルモネラや赤痢菌の感染により誘導される炎症誘導性の細胞死であり、カスパーゼ-1 依存で起こるネクローシス用の形態を示し、炎症を誘導する<sup>45, 59</sup>。フェロトーシスは変異 **Ras** を有する癌細胞を特異的に殺す抗がん剤 **Erastin** や **Sulfasalazine** による細胞死のメカニズムの解析により発見された、カスパーゼ非依存であり、鉄を介した細胞内で生じる脂質酸化が原因で起こる細胞死であり、形態学的にミトコンドリアが小さく、クリステが減少し、膜が崩壊して破裂している<sup>45, 60</sup>。

### 1.5. 本学位論文での目的

本研究では、ほ乳類培養細胞と *ex vivo* のマウス腸管上皮オルガノイドを用いて、上皮内に **p53** 変異(ヒトの癌で好発する **p53R175H** または **p53R273H**)が生じた細胞の運命を明らかにする。加えて、多段階発がんの遺伝子変異の規則性と細胞競合との関連についても検討する。

## 1.6. 参考文献

1. Cancer Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (National Cancer Registry, Ministry of Health, Labour and Welfare)
2. Cancer Facts & Figures 2021, American Cancer Society journal
3. Hanahan D and Weinberg R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
4. Hogan C, et al. (2009). Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 11(4):460-467.
5. Kajita M, et al. (2010). Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *J. Cell Sci.* 123(Pt 2):171-180.
6. Cheuk T. L and Joan S. B (2012). Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature* 482:410-413.
7. Tamori Y, et al. (2010). Involvement of Lgl and Mahjong/VprBP in cell competition. *PLoS Biol.* 8, e1000422.
8. Norman M, et al. (2012). Loss of Scribble causes cell competition in mammalian cells. *J. Cell Sci.* 125(1):59-66.
9. Kon S, et al. (2017). Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.* 19(5):530-541.
10. Vogelstein B and Kinzler K. (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70(4):523-526.
11. Biegging K.T, Mello S.S and Attardi L.D (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 14(5):359-370.
12. Che`ne P (2001). The role of tetramerization in p53 function. *Oncogene* 20:2611-

2617.

13. Kruiswijk F, Labuschagne C.F and Vousden, K.H (2015). p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16(7):393-405.
14. Hussain, S.P. and Harris, C.C. (1998). Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 58(18):4023-4037.
15. Magali O, et al. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum. Mutat.* 19(6):607-614.
16. Soussi, T., Dehouche, K. and Be'roud, C. (2000). p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum. Mutat.* 15(1):105-113.
17. Patricia A.J. M and Karen H. V (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25(3):304-317.
18. Amy W, et al. (2004). Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. *Oncogene* 23:2330-2338.
19. Moshe O and Varda R (2010). Mutant p53 gain-of-function in cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(2):a001107.
20. Weisz, L., Oren, M., and Rotter, V. (2007). Transcription regulation by mutant p53. *Oncogene* 26:2202–2211.
21. Hezel A.F, et al. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 20(10):1218-1249.
22. Kinzler, K.W and Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-170.

23. Maitra A, et al. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod. Pathol.* 16(9):902-912.
24. Murakami Y, et al. (1991). Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 51(20):5520-5525.
25. Schlomm T, et al. (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod. Pathol.* 21:1371-1378.
26. Vogelstein B, et al. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319:525-532.
27. Walther, A, et al. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9:489-499.
28. K.Wennerberg, K.L. Rossman, C.J. Der (2005). The Ras superfamily at a glance, *J. Cell Sci.* 118 (Pt 5):843-846.
29. Schweins T, et al. (1995). Substrate-assisted catalysis as a mechanism for GTP hydrolysis of p21ras and other GTP-binding proteins. *Nat. Struct. Biol.* ;2(1):36-44.
30. Scheffzek K, et al. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science.* 18;277(5324):333-338.
31. Klockow B, et al. (2000). Oncogenic insertional mutations in the P-loop of Ras are overactive in MAP kinase signaling. *Oncogene.* 9;19(47):5367-76.
32. A.D. Cox, et al. (2014). Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* 12(11):828-851.
33. C.O.Nordling, *British journal of cancer* 7.1 (1953) 68-72
34. 佐藤賢一, 下瀬川徹 : 膀胱における遺伝子異常. *最新医学* 61 : 1805-1812, 2006.

35. Morata G and Ripoll P (1975) Minutes: mutants of drosophila autonomously affecting cell division rate. *Dev. Biol.*, 42(2):211-221.
36. Moreno E, Basler K and Morata G. (2002) Cells compete for Decapentaplegic survival factor to prevent apoptosis in *Drosophila* wing development. *Nature*, 416:755-759.
37. Jhonston LA, et al. (1999). *Drosophila myc* regulates cellular growth during development. *Cell*. 17;98(6):779-90.
38. de la Cova C, et al. (2006). *Myc* in model organisms: a view from the flyroom. *Semin Cancer Biol*. 16(4):303-12.
39. Bilder D, Li M and Perrimon N (2000). Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science*, 289(5476):113-116.
40. Brumby, A.M. and Richardson, H.E. (2003) scribble mutants cooperate with oncogenic Ras or Notch to cause neoplastic overgrowth in *Drosophila*. *EMBO J* 22(21):5769-5779.
41. Vaughen J and Igaki T (2016). Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia. *Dev. Cell*. 19;39(6):683-695.
42. Ohoka A, et al. (2015). EPLIN is a crucial regulator for extrusion of RasV12-transformed cells. *J Cell Sci*. 128:781-789.
43. Saitoh S, et al. (2017). Rab5-regulated endocytosis plays a crucial role in apical extrusion of transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 114(12): E2327-E2336.
44. Kajita M, et al. (2014). Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nat. Commun*. 5:4428.
45. Yan Ge, Elbadawi M. and Efferth T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal* 2: 39-48.
46. P Li, et al. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-

- 9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91(4):479-489.
47. Kuribayashi K, et al. (2008). TNFSF10 (TRAIL) , a p53 target gene that mediates p53-dependent cell death. *Cancer Biol Ther.* 7(12):2034-2038.
  48. G S Wu, et al. (1997) KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat Genet.* 17(2):141-143.
  49. Schuler M and Green DR. (2001) Mechanisms of p53-dependent apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 6):684-688.
  50. S M Laster, J G Wood and L R Gooding (1988). Tumor necrosis factor can induce both apoptic and necrotic forms of cell lysis. *J Immunol.* 141(8):2629-2634.
  51. Alexei D, et al. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1(2):112-119.
  52. Alexei D, et al. (2008). Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol.* 4(5):313-321.
  53. Sudan He, et al. (2009). Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137(6):1100-1111.
  54. Lorenzo G, Oliver K and Guido K (2014). MLKL regulates necrotic plasma membrane permeabilization. *Cell Res.* 24(2):139-40.
  55. William J K, et al. (2013). Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem.* 288(43):31268-79.
  56. Ricardo W, et al. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 18(2):127-136.
  57. Simone Fulda (2014). Therapeutic exploitation of necroptosis for cancer therapy. *Semin Cell Dev Biol.* 35:51-56.
  58. Glauben L, et al. (2014) Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J Immunol Res.* 2014:149185.

59. Susan L F and Brad T C (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 73(4):1907-16.
60. Scott J D, et al. (2012). Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell* 149(5):1060-1072.

## 2 章 :

細胞競合における正常細胞に囲まれた p53 変異細胞の表現型

## 2.1. 要旨

上皮細胞に出現した変異細胞は、細胞競合によって上皮層より排除される。近年の研究によって、この癌予防として働くプロセスには周囲の正常な上皮細胞との相互作用が関与していることが明らかになっているが、この現象を制御する分子メカニズムには不明な点が多い。本研究では、ほ乳類の細胞培養システムを用いて、正常細胞に囲まれた際に p53 変異細胞は細胞死を起こし、基底膜側へ排除されるという表現型を明らかにした。また、ネクロプトーシスを誘導する中心的因子である RIPK1、RIPK3 の阻害薬を用いると正常細胞に囲まれた p53 変異細胞が上皮層で生存したことから、p53 変異細胞が起こしていた細胞死がネクロプトーシスによるものであることを明らかにした。これは、細胞非自律的にネクロプトーシスが生じることを初めて報告する結果である。さらに、マウス腸管オルガノイドの *ex vivo* システムを用いた場合でも、正常細胞に囲まれた p53 変異細胞が同様に基底膜側へ主に排除されることを示した。これらの結果より、正常な上皮細胞層上に p53 の形質転換が起こると細胞競合により p53 変異細胞はネクロプトーシスし、基底膜側へと逸脱することを明らかとした。

## 2.2. 緒言

今までの研究成果より、発癌過程において p53 変異が起こるのは中期から後期であることは知られている。しかし、p53 変異が初期に起こることの報告はなく、p53 変異の蓄積は発癌過程の後半に起こることが重要であると考えられる。では、いったい発癌初期に p53 変異が起こらない理由や初期に生じた p53 変異細胞がどのようになるのか論じられた論文はない。そこで、上皮細胞層に p53 変異細胞が出現した際の変異細胞の細胞運命を検討するため、私はテトラサイクリン投与により、GFP でタグ付きしたがん抑制タンパク質 p53 の変異体が恒常的に発現する Madin-Darby canine kidney (MDCK) 細胞を樹立した。

## 2.3. 実験手法

### 2.3.1. 抗体と材料

Roche Diagnostics 社の mouse anti-GFP (11814460001) 抗体、Santa Cruz 社の anti-p53 (DO-1)抗体、Cell Signaling 社の rabbit anti-cleaved caspase 3 (9661S)並びに rabbit anti-p21 (SC397) 抗体、Millipore 社の anti-GAPDH (clone 6C5)抗体を用いた。Alexa-Fluor-568 と -647 と共役したファロイジン (Life Technologies) は 1.0 U/ml で用いた。Alexa-Fluor-568 と -647 の 2 次抗体は Life Technologies 社のものを用いた。Hoechst 33342 (Life Technologies) は 1 : 5,000 の濃度で用いた。蛍光免疫染色において、すべての一次抗体は 1 : 100 の濃度で用い、2 次抗体は 1 : 200 の濃度で用いた。

阻害剤は以下のものを用いた。Calbiochem 社の Z-VAD-FMK は 100  $\mu$ M で、GSK'872 は 5  $\mu$ M で用いた。Sigma-Aldrich 社の Necrostatin-1 は 40  $\mu$ M で用いた。

### 2.3.2. 細胞培養

MDCK 細胞は Dr. Walter Birchmeier から供与され、10%ウシ胎児の血清 (FBS) と抗生物質であるペニシリン/ストレプトマイシンを含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培地とし、5%二酸化炭素含んだ空気中で 37°Cにて培養した<sup>1</sup>。p53-knockout MDCK 細胞は Dr. Eugenia Piddini から提供していただいた<sup>2</sup>。不死化したヒト膵管正常上皮細胞株である HPED6-E6E7-c7 (H6c7) 細胞株<sup>3,4</sup>は、トロントにある Health Network 大学の Dr. Ming-Sound Tsao から提供され、10%FBS とペニシリン/ストレプトマイシンと GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific) を含んだ DMEM を培地とし、5%二酸化炭素含んだ空気中で 37°Cにて培養した。MDCK-pTR GFP-p53R175H 細胞株もしくは-p53R273H 細胞株を樹立するために、p53R175H と p53R273H の cDNA を pCMV-Neo-Bam p53R175H (Addgene) と QTO4X bleo-

p53R273H<sup>5</sup>から PCR で増幅し、pcDNA4/TO/GFP の XhoI/PstI の位置に挿入しクローニングした。MDCK-pTR 細胞<sup>1</sup>に pcDNA4/TO/GFP-p53R175H もしくは-p53R273H を遺伝子導入した後、ブラストサイジン (Invitrogen) を 5  $\mu$  g/mL とゼオシン (Invivogen) を 400  $\mu$  g/mL 加えた培地中でセレクションした。恒常的に RIPK3-short hairpin RNA (shRNA)を発現している MDCK-pTR GFP-p53R273H cells を樹立するために、RIPK3-shRNA オリゴヌクレオチド (RIPK3-shRNA-1 5'-GATCCCCTTAGCAGGGCTACCTTCTGTTCAAGAGACAGAAGGTAGCCCTGCTAATTTTTC-3' と 5'-TCGAGAAAAATTAGCAGGGCTACCTTCTGTCTCTTGAACAG AAGGTAGCCCTGCTAAGGG-3' もしくは RIPK3-shRNA-2 5'-GATCCCCAAGAG GACCACAAGAACCATTCAAGAGATGGTTCTTGTGGTCCTCTT-3' と 5'-TCGAG AAAAAAGAGGACCACAAGAACCATCTCTTGAATGGTTCTTGTGGTCCTC TTGGG-3')を pSUPER.neo+gfp (Oligoengine)の BglIII と XhoI の位置に挿入しクローニングした。MDCK-pTR GFP-p53R273H 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて pSUPER.neo+gfp RIPK3-shRNA を遺伝子導入し、ブラストサイジンを 5 mg/mL、ゼオシンを 400 mg/mL、G418 (Calbiochem)を 800 mg/mL 加えた培地中でセレクションした。マイコプラズマの混入は簡易的な残存キット (MycoAlert, Lonza) を用いて全ての細胞株を定期的に検査した。テトラサイクリン誘導型 MDCK 細胞株では、テトラサイクリン (Sigma-Aldrich) を培地中に 2  $\mu$  g/ml を加えることで目的のタンパク質を発現させた。ドキソルビシン添加実験では、細胞にドキソルビシン(アドリアマイシン) (Sigma-Aldrich) 250 ng/ml を培地に加え、6 もしくは 12 時間培養した。阻害剤は全てテトラサイクリン添加と同時に加えた。蛍光免疫染色では、細胞をコラーゲンゲルコートしたカバーガラス上に播種した。Type- I コラーゲン (Cellmatrix Type- I -A) は Nitta Gelatin から購入し、製造元の取扱説明書に沿って 最終濃度が 2 mg/ml となるように氷上で中和させて用いた。

### 2.3.3. オルガノイドのウイルス感染

全ての動物実験は北海道大学の動物実験委員会の定める国立大学法人北海道大学実験動物に関する規定に従い行った。動物実験の実施計画書は北海道大学動物実験委員会に審査され承認された（承認番号：12-0116）。レンチウイルスの作製は、今までの研究と同様に HEK293T 細胞に pLV-CAG1.1-lxzeolx-p53R270H-IRES-GFP、pLV-CAG1.1-lxzeolx-p53R172H-IRES-GFP、もしくは pLV-CAG1.1-GFP とパッケージングプラスミド（pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV であり、これらは Dr. Hiroyuki Miyoshi よりいただいた）とを一緒に遺伝子導入することで作製した<sup>6</sup>。遺伝子導入後 24-48 時間後のウイルスの懸濁液を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルター（Corning）を通し、PEG 溶液（25.5% PEG と 1.2 M の NaCl の入った混合溶液）と混合した後、遠心分離（7,519  $\times g$ 、10 分、4°C）することで沈殿させた。上清を廃棄後、沈殿物に培地を加え、ウイルス液を回収した。Villin-Cre-ERT2 マウス<sup>7</sup>の腸管上皮細胞のオルガノイドは既に論文上で報告されている通りに作製し、培養した<sup>8</sup>。オルガノイドにポリブレン（Sigma-Aldrich）8  $\mu\text{g/ml}$  と Y-27632（Calbiochem）10  $\mu\text{M}$  を加えたレンチウイルス液を用いてウイルス感染させた。ウイルス感染後、オルガノイドはタモキシフェン（Sigma-Aldrich）1  $\mu\text{g/ml}$  を含んだ培地で 24 時間培養し、導入した遺伝子を発現させた。その後、タモキシフェンは培地から取り除き、解析するまでの間培養した。

### 2.3.4. 蛍光免疫染色とウェスタンブロット

蛍光免疫染色に関して、これまでの研究と同様の手法を用いた<sup>1</sup>。MDCK-pTR GFP-p53R175H 細胞もしくは-p53R273H 細胞と MDCK 細胞を 1 : 50 の割合で混合し、コラーゲンコートしたカバーガラスの上に播種した。混合し播種した細胞は 8-12 時間培養した後、テトラサイクリンを加え 48 時間処理した。これまでの研究同様、細胞をパラホルムアルデヒド（PFA）が 4% 含有した PBS で固定し、透過処理を行った<sup>9</sup>。

一過性発現系の実験において、MDCK 細胞、MDCK-pTR GFP-p53R273H 細胞と HPDE6 細胞に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて既に述べたコンストラクトを遺伝子導入した。腸管オルガノイドを用いた蛍光免疫染色では、細胞をマトリゲル上で培養した後 4%PFA で固定した。固定後、細胞を 0.5%Triton X-100/PBS で 1 時間透徹化処理後、1 時間 1%BSA/PBS でブロッキングし、既に論文上で報告されている通りに、免疫染色を行った<sup>8</sup>。蛍光免疫染色画像は Olympus FV1000 もしくは FV1200 システムとソフトウェアとして Olympus FV10-ASW を用いて解析した。ウェスタンブロットは以前に既知の方法に従って行った<sup>10</sup>。1 次抗体は 1 : 1000 の濃度で用いた。ウェスタンブロットのデータは ImageQuant™ LAS4010 (GE Healthcare) を用いて解析した。

### 2.3.5. データ解析

両側スチューデントの t 検定、カイ二乗検定及び一元配置分散分析を用いてデータを解析することで、P 値を判定した。P 値が 0.05 未満の場合は有意差ありと判断した。全ての結果は少なくとも 2 つの独立した実験より再現された。

## 2.4. 結果

### 2.4.1. 正常細胞に囲まれた p53 変異細胞は細胞非自律的に上皮層から基底膜側へ逸脱する。

正常上皮細胞と p53 変異体を発現する上皮細胞との間で細胞競合が生じるのかを調べるために、まず、テトラサイクリンにより誘導され、恒常的に GFP でタグした

p53R273H もしくは p53R175H を発現する細胞株 (MDCK-pTR GFP-p53R273H もしくは p53R175H 細胞。以降、それぞれ p53R273H 細胞、p53R175H 細胞と呼称する。) を樹立した (Figure 2-1、2-2)。テトラサイクリンにより p53R273H もしくは p53R175H が発現していることを確認した。ドキソルビシンは抗がん剤の 1 種であり、ドキソルビシン添加により、ATM 活性化により p53 を安定化させる<sup>11</sup>。続いて、p53 変異体が、ドキソルビシンによる p53 の安定化、並びに下流因子である p21 の発現誘導に及ぼす影響を検討した (Figure 2-3)。その結果、p53R273H および p53R175H はドキソルビシンによる p21 の発現誘導を阻害したことから、p53 変異体は内在性 p53 の機能をドミナントネガティブに阻害することが示された。正常細胞と変異型 p53 発現細胞の相互作用を調べるために、p53R273H 細胞と正常 MDCK 細胞を 1:50 の比率で混合し、コラーゲンマトリックス上に播種し、混合した細胞が単層を形成するまで、テトラサイクリンフリーの状態 で培養した。続いて、テトラサイクリンで GFP-p53R273H の発現を誘導し、正常細胞に囲まれた p53R273H 細胞の挙動を観察した。その結果、p53R273H 細胞が上皮層から基底膜側へと逸脱し、核と細胞体の断片化を伴うことを見出した (Figure 2-4)。p53R273H 細胞が細胞死を起こし頂端側へ排除される細胞も確認されたが、細胞死を起こし基底膜側へ逸脱する方が高頻度で観察された。また、p53R273H 細胞を単独で培養した場合や、GFP 発現細胞を正常細胞と 1:50 の比率で共培養した場合には、細胞死は起こらなかった。同様に、単独培養した、もしくは p53R273H 細胞と共培養した正常細胞では細胞死は見られなかった (Figure 2-4)。一方で、正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R175H 細胞では、基底膜側への逸脱はほとんど見られなかった (Figure 2-5)。p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱するという現象は、モザイク状に変異したタンパク質 p53 の発現を一過性発現した場合にも認められた (Figure 2-6)。p53 をノックアウトした細胞層に p53R273H の発現を誘導した場合、基底膜側への逸脱は正常な上皮内と同程度に生じた (Figure 2-7)。さらに HPDE6 細胞を用いて、正常細胞と変異した p53 を発現した細胞との間の相互作用を調べた。その

結果、正常細胞に囲まれた p53R273H もしくは p53R175H を発現した HPDE6 細胞では共に基底膜側への逸脱が観察された (Figure 2-8)。一方で、正常細胞に囲まれた GFP を発現した HPDE6 細胞は、上皮層上に残っていた。これらの結果より、変異した p53 を発現した細胞は正常細胞に囲まれると異なる細胞同士の接触によって細胞競合が生じ、上皮層から基底膜側へ排除されることが示唆された。

**A**

MDCK-pTR GFP-p53R273H (Tet +)

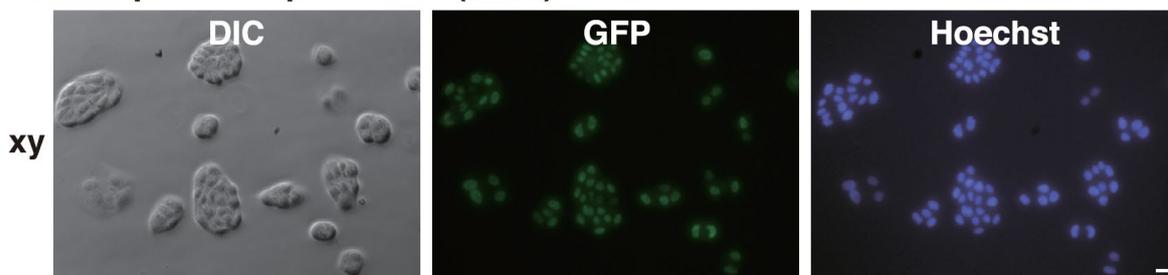
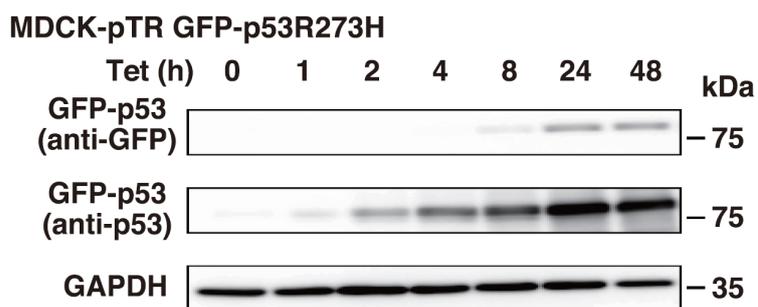
**B**

Figure 2-1. p53R273H 細胞はテトラサイクリン添加により GFP でタグした p53R273H を発現する。(A) テトラサイクリンを添加し、低密度で播種した p53R273H 細胞の DIC と蛍光画像。(B) GFP-p53R273H の発現に対するテトラサイクリンの効果。p53R273H 細胞をテトラサイクリンと指定した時間培養し、細胞溶解物を anti-GFP、anti-p53 および anti-GAPDH 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

**A**

MDCK-pTR GFP-p53R175H (Tet +)

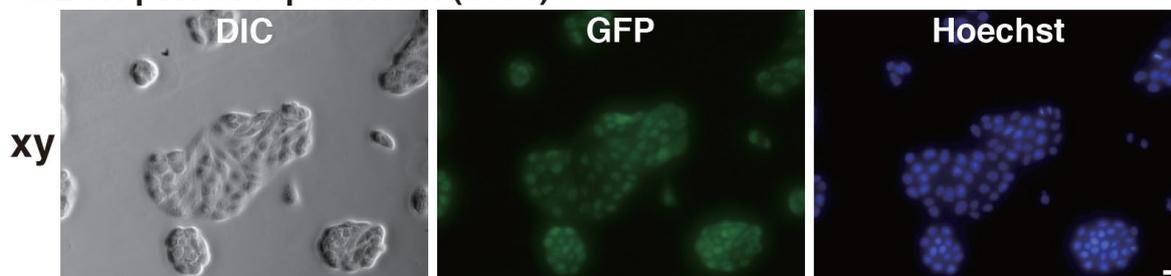
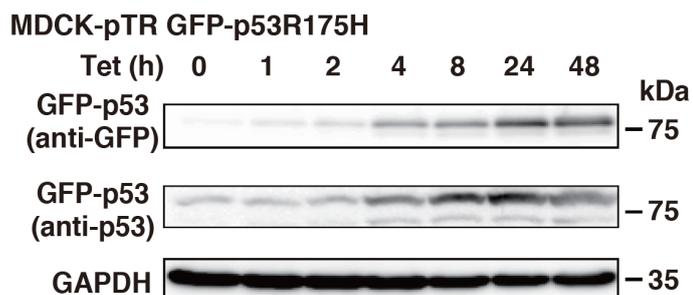
**B**

Figure 2-2. p53R175H 細胞はテトラサイクリン添加により GFP でタグした p53R175H を発現する。(A) テトラサイクリンを添加し、低密度で播種した p53R175H 細胞の DIC と蛍光画像。(B) GFP-p53R175H の発現に対するテトラサイクリンの効果。p53R175H 細胞をテトラサイクリンと指定した時間培養し、細胞溶解物を anti-GFP、anti-p53 および anti-GAPDH 抗体を用いたウエスタンブロッティングの結果。スケールバーは 10  $\mu$ m。

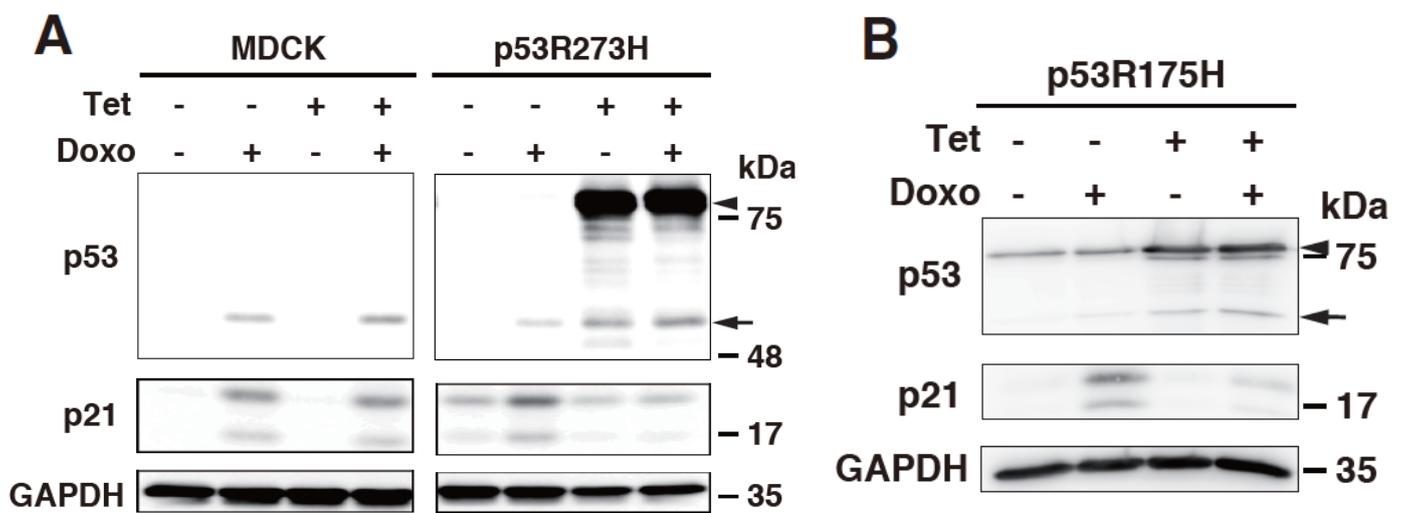


Figure 2-3. ドキソルビシンが誘導する p21 の発現に対する p53R273H または p53R175H の効果。(A) MDCK、p53R273H 細胞、(B) p53R175H 細胞をテトラサイクリンまたはドキソルビシンの非存在下または存在下で培養し、細胞溶解物を anti-p53、anti-p21 および anti-GAPDH を用いてウエスタンブロッティングで調べた結果を示す。矢頭と矢印は、それぞれ外因性と内因性の p53 タンパク質を示している。

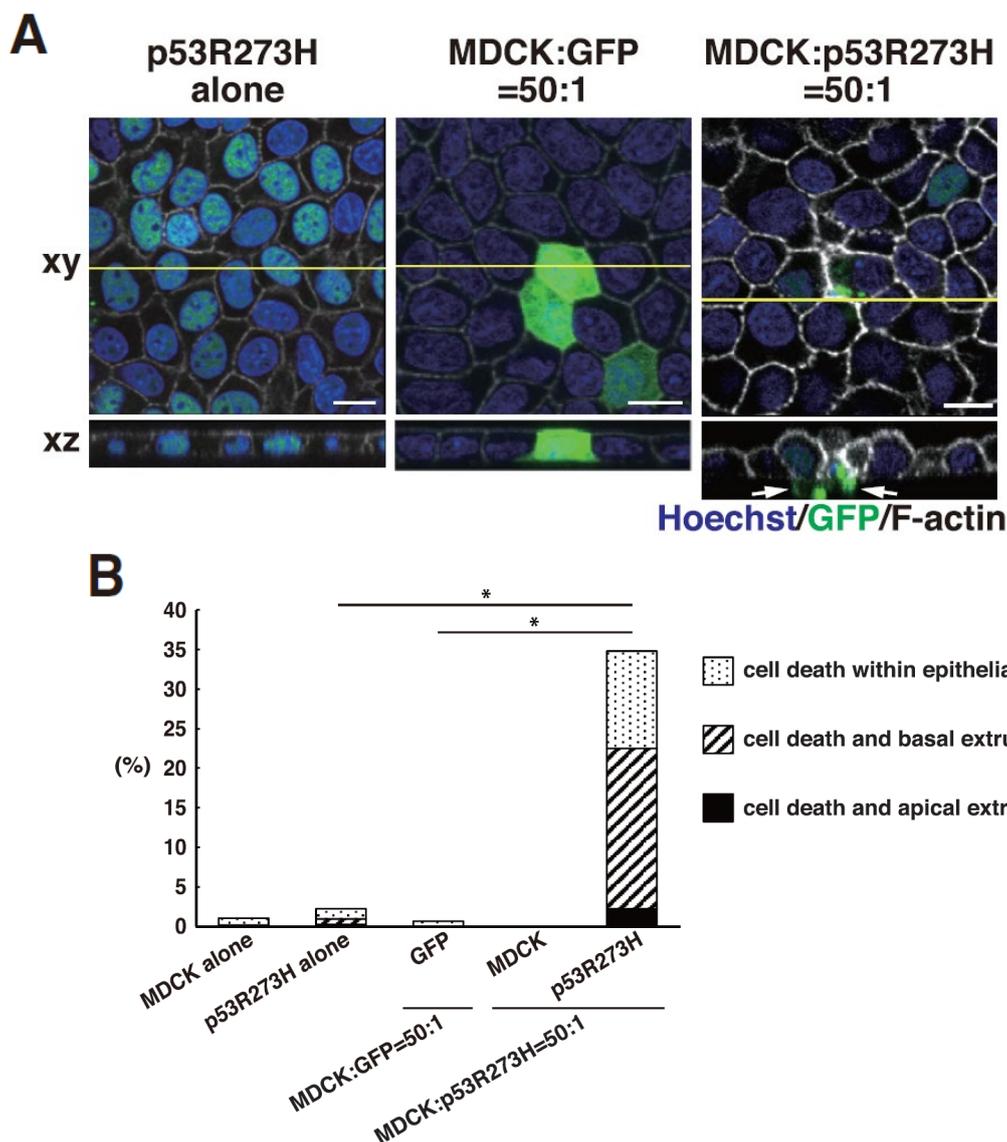


Figure 2-4. 正常細胞に囲まれた p53R273H 細胞は細胞死し、基底側へ逸脱する。(A) p53R273H 細胞単独培養、MDCK-pTR GFP 細胞と正常な MDCK 細胞とを混合培養、p53R273H 細胞と正常な MDCK 細胞とを混合培養した蛍光免疫染色画像。テトラサイクリン投与し 48 時間後の画像であり、Alexa Fluor 647 結合ファロイジン（灰色）および Hoechst（青色）で染色した。矢印は、基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞を示している。(B) 正常な MDCK 細胞と混合した p53R273H 細胞の運命を定量化した結果を示す。MDCK、MDCK-pTR GFP または p53R273H 細胞を単独、もしくは記載通りに混合培養し、死んだ細胞の運命を定量化した。\* $p < 0.0001$  (chi-square test)であり、カウントした細胞数は左から 1,885、1,418、931、909、310 細胞である。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

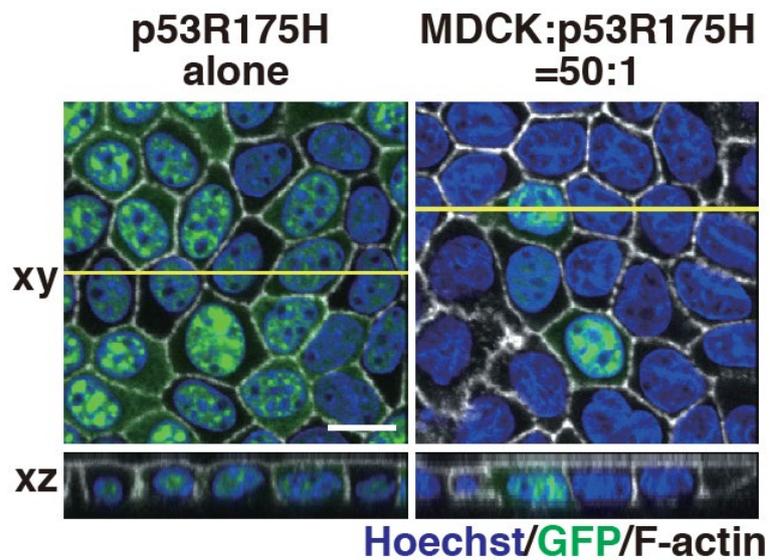


Figure 2-5. 正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R175H 細胞は上皮層に留まる。  
 p53R175H 細胞を単独もしくは、正常な MDCK 細胞と混合培養した際の蛍光免疫染色  
 画像。テトラサイクリン投与し 48 時間後の画像であり、Alexa Fluor 647 結合ファロ  
 イジン（灰色）および Hoechst（青色）で染色した。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

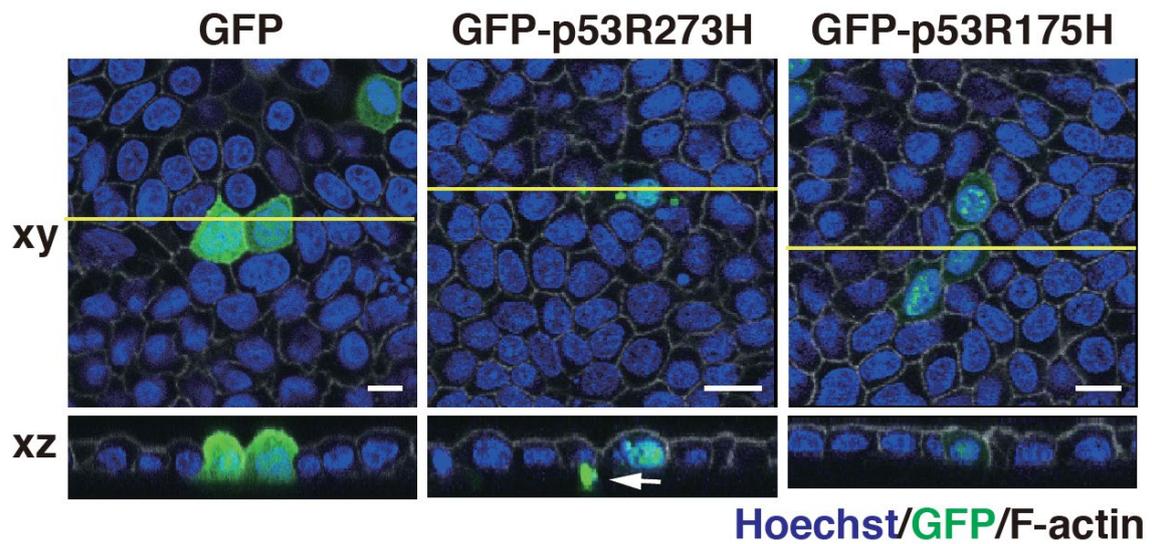


Figure 2-6. 一過性に p53 変異体を発現した MDCK 細胞の挙動。MDCK 細胞に GFP、GFP-p53R273H または GFP-p53R175H を一過性発現させた蛍光免疫染色画像。Alexa-Fluor-647 結合ファロイジン（灰色）および Hoechst（青色）で染色した。矢印は、核が断片化された、基底膜側へ逸脱した p53R273H 発現細胞を示している。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

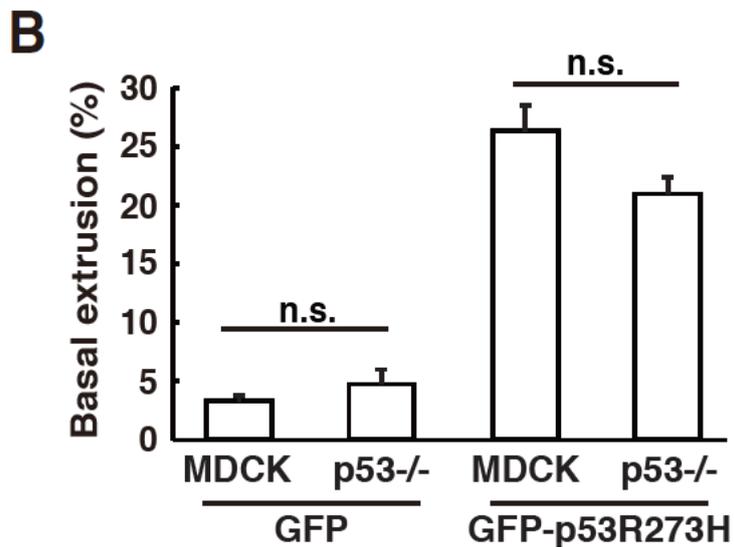
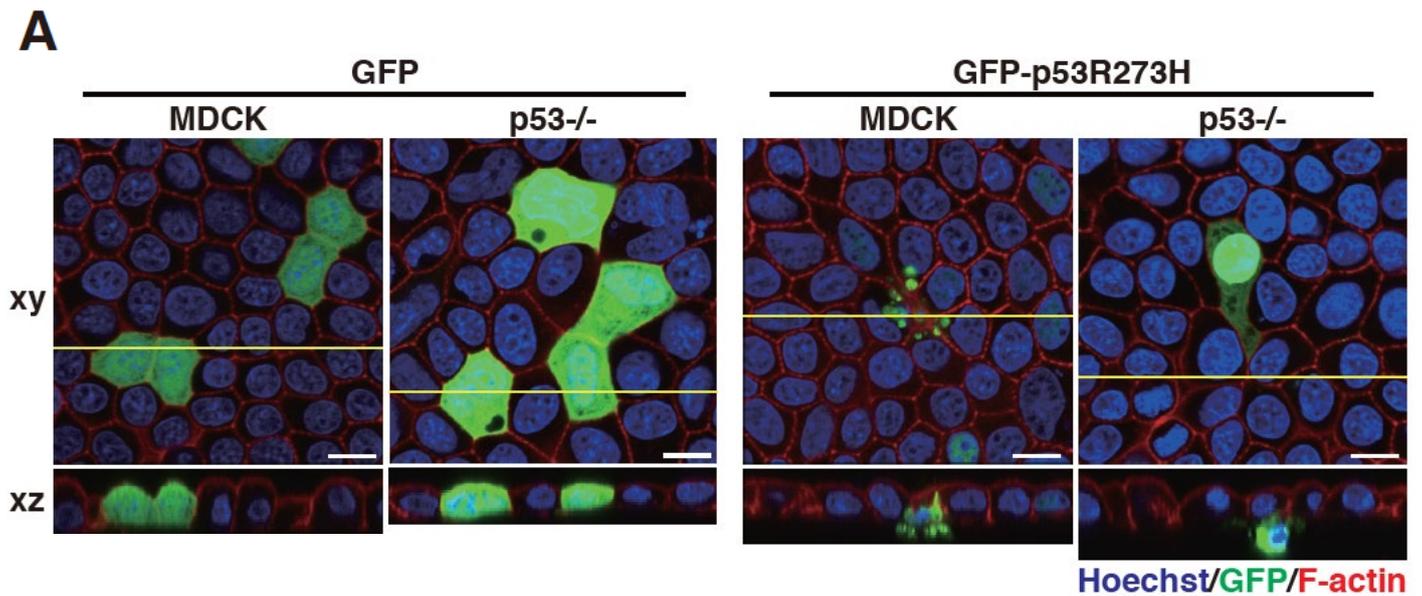


Figure 2-7. p53 ノックアウトした細胞層においても p53R273H 細胞は細胞死し、基底側へ逸脱する。(A) GFP または GFP-p53R273H を一過性発現させた正常または p53 ノックアウト MDCK 細胞の蛍光免疫染色画像。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B) 基底膜側への逸脱を定量した結果を示す。データは各 3 回の独立した試験から算出し、 $\text{平均値} \pm \text{標準誤差}$  で表示している。n.s.は有意差なしを表す。カウントした細胞数は左から 243、250、222、227 細胞である。

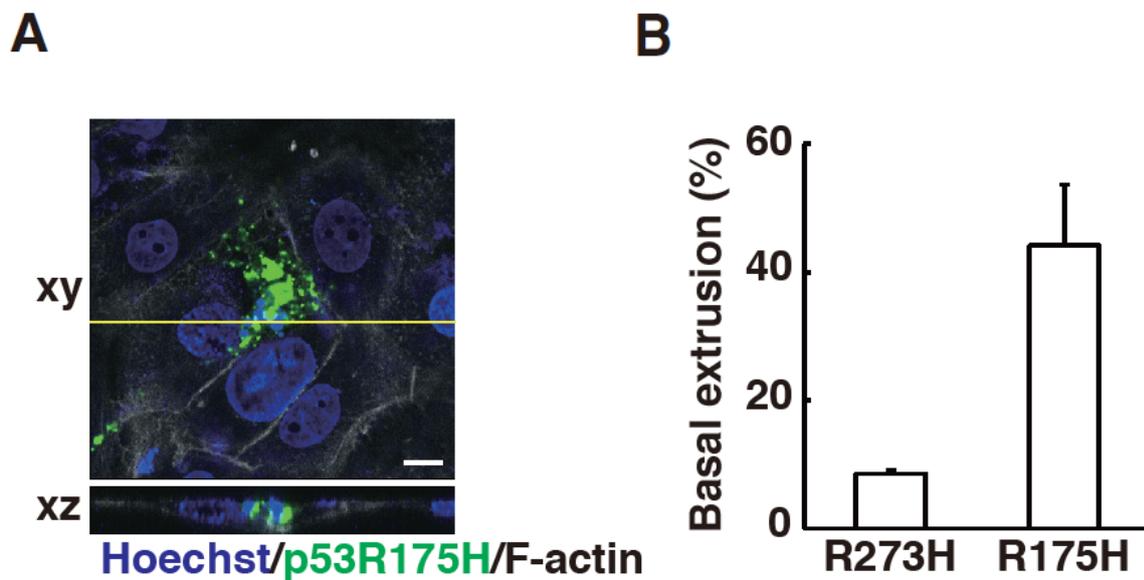


Figure 2-8. HPDE6 細胞では、p53R175H 変異細胞の方が顕著に基底膜側へ逸脱する。(A) GFP-p53R175H を一過性発現させた HPDE6 細胞の蛍光免疫染色画像。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。(B) p53 変異体を一過性発現させた HPDE6 細胞の基底膜側への逸脱を定量した結果を示す。データは 2 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。カウントした細胞数は左から 72、116 細胞である。

#### 2.4.2. 正常細胞に囲まれた p53 変異細胞はネクロトーシスにより細胞死する。

細胞競合下で基底側へ逸脱した細胞のほとんどは核が断片化していたため、細胞死していることが推察された。そこで、基底膜側への逸脱時に起こる細胞死の特徴について詳細に検討した。蛍光免疫染色画像から、基底膜側に排除された p53R273H 細胞は anti-cleaved caspase 3 抗体に陰性であった (Figure 2-9)。さらに、カスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK を用いても基底膜側への逸脱は抑えられなかった (Figure 2-10)。すなわち、p53 変異細胞で生じる細胞死にカスパーゼの関与はなく、アポトーシスではないことが判明した。対照的に、ネクロトーシスの実行因子である RIPK1 および RIPK3 のそれぞれの阻害剤である Necrostatin-1 および N-(6-(Isopropylsulfonyl)quinolin-4-yl)benzo[d]thiazol-5-amine (GSK' 872) を添加すると、p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱が顕著に抑制された (Figure 2-11)。さらに、p53R273H 細胞の RIPK3 をロックダウンすると、細胞競合による p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱が有意に減少した (Figure 2-12)。これらの結果から、細胞競合により p53 R273H 細胞が基底膜側へ逸脱する際に生じる細胞死は、アポトーシスではなく、ネクロトーシスが関与していることを示した。

#### 2.4.3. マウス腸管上皮層に誘導された p53 変異細胞は基底側へ排除される。

これまでに見出してきた事象に一般性があるのか確かめるために、マウス腸管オルガノイドにて、p53R270H または p53R172H 発現細胞 (それぞれヒト p53R273H または p53R175H に相当) がどのような挙動を示すのか検討した。まず、Villin-Cre-ERT2 マウスの小腸陰窩を収集し、マトリゲル上で培養することで、腸管上皮オルガノイドを作製した。次に、作製したオルガノイドに Lenti-CAG-LSL-p53R270H-IRES-GFP または p53R172H-IRES-GFP を感染させた。感染させたオルガノイドの培地中にタモキ

シフエンを添加することで、ウイルスに感染した上皮細胞でのみ Cre/loxP システムによって loxP 配列間の遺伝子が切り出され、p53R270H-IRES-GFP または p53R172H-IRES-GFP が発現するようになる。タモキシフェン投与から 48 時間後、p53R270H 発現細胞の 60%以上で核が断片化しており、そのほとんどは上皮層から基底膜側へ逸脱していた (Figure 2-13 および 2-14)。同様に、タモキシフェン投与から 48 時間後の p53R172H 発現細胞の半数以上が死んでおり、基底膜側へ逸脱していた (Figure 2-13 および 2-15)。対照的に、同様の実験において、GFP のみを発現している細胞のほとんどは上皮層内に残っていた (Figure 2-13 および 2-16)。さらに、培養細胞システムの時と同様に、基底膜側への逸脱がネクロプトーシスによるものかを調べた。RIPK1 の inhibitor である Necrostatin-1 を加えると、p53R270H 発現細胞の基底膜側への逸脱は有意に抑えられた (Figure 2-17)。したがって、細胞競合によって誘導されるネクロプトーシスによる p53 変異細胞の基底膜側への排除は、マウス腸管でも同様に生じることが分かり、普遍的な p53 変異細胞の排除機構であることが示唆された。

MDCK:p53R273H=50:1

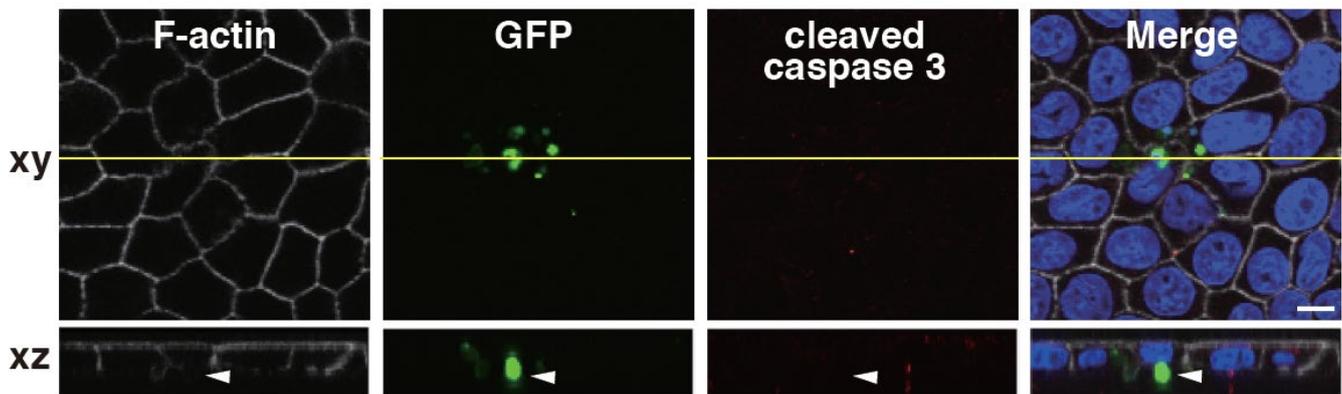


Figure 2-9. 基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞はカスパーゼ-3 陰性である。基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞のカスパーゼ-3 の蛍光免疫染色画像。矢印は、基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

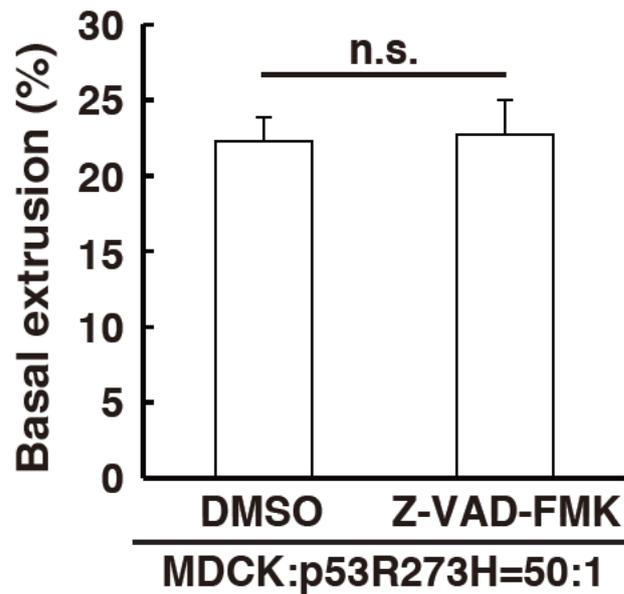


Figure 2-10. p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱に対する Z-VAD-FMK の効果。正常な MDCK 細胞と p53R273H 細胞とを 50:1 の割合で混合培養した際に、Z-VAD-FMK を添加した時としていない時の p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱の割合を定量した結果を示す。データは 3 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。n.s.は有意差なしを表す。カウントした細胞数は左から 336、321 細胞である。

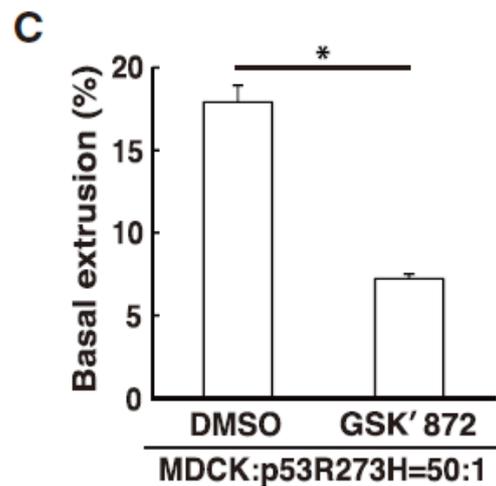
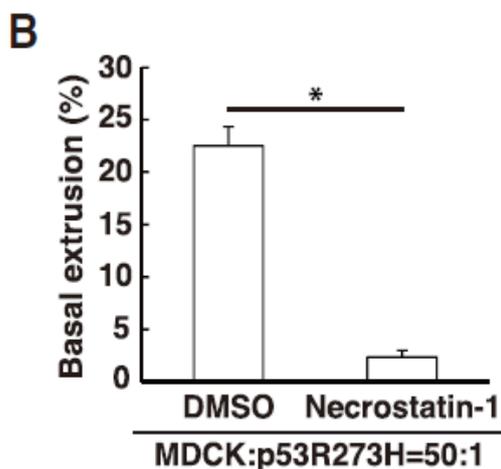
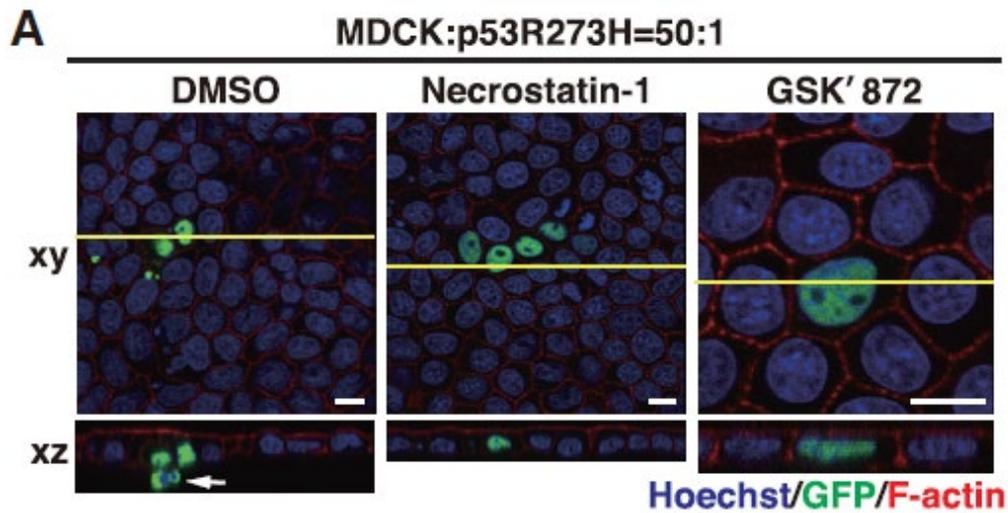


Figure 2-11. 正常細胞に囲まれた p53R273H 細胞が基底膜側へ排除されるのにネクロトーシスが関与している。(A) Necrostatin-1 または GSK'872 の非存在下または存在下での正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R273H 細胞の蛍光免疫染色画像。矢印は、細胞層から基底膜側へ逸脱し、断片化した p53R273H 細胞を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B および C) Necrostatin-1 (B) もしくは GSK'872 (C) の非存在下および存在下での基底膜側への逸脱を定量した結果を示す。データは(B) 3 回および(C) 2 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。\* $p < 0.05$  (Student's t test)であり、カウントした細胞数は左から(B) 303、336 細胞、(C) 402、402 細胞である。

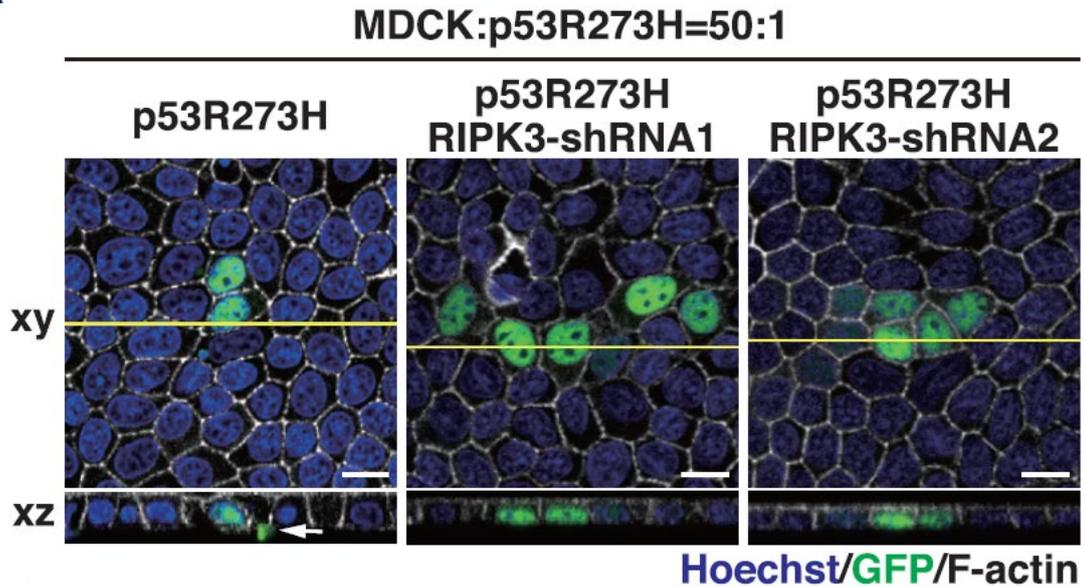
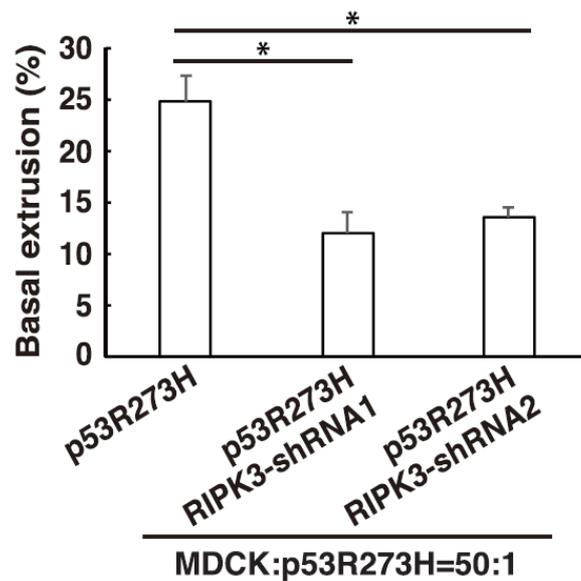
**A****B**

Figure 2-12. p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱に対する RIPK3 ノックダウンの効果。

(A) 正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R273H、p53R273H RIPK3-shRNA1 または shRNA2 細胞の蛍光免疫染色画像。スケールバーは 10  $\mu$ m。 (B) 基底膜側への逸脱の定量の結果を示す。データは 3 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。\* $p < 0.05$  (Student's t test)であり、カウントした細胞数は左から 349、315、315 細胞である。

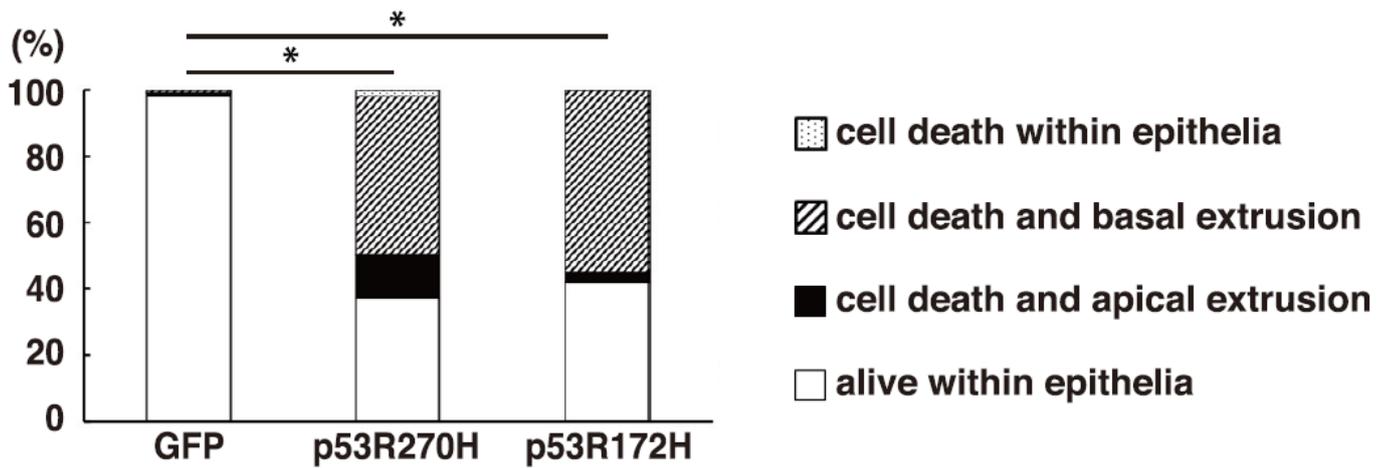


Figure 2-13. 正常な上皮細胞に囲まれた変異型 p53 発現細胞は、マウス腸管オルガノイドにおいても基底膜側に逸脱する。マウス腸管オルガノイドでの変異型 p53 発現細胞の細胞死を定量した結果を示す。上皮層内に生存し留まっていたもの、細胞死を起こし頂端側へ逸脱したもの、細胞死を起こし、基底膜側へ逸脱したもの、細胞死を起こしたが上皮層内に留まっていたものが観察され、それぞれを定量化した結果を示す。\* $p < 0.0001$  (chisquare test)であり、カウントした細胞数は左から 222、266、316 細胞である。

Lenti-CAG-LSL-p53R270H-IRES-GFP

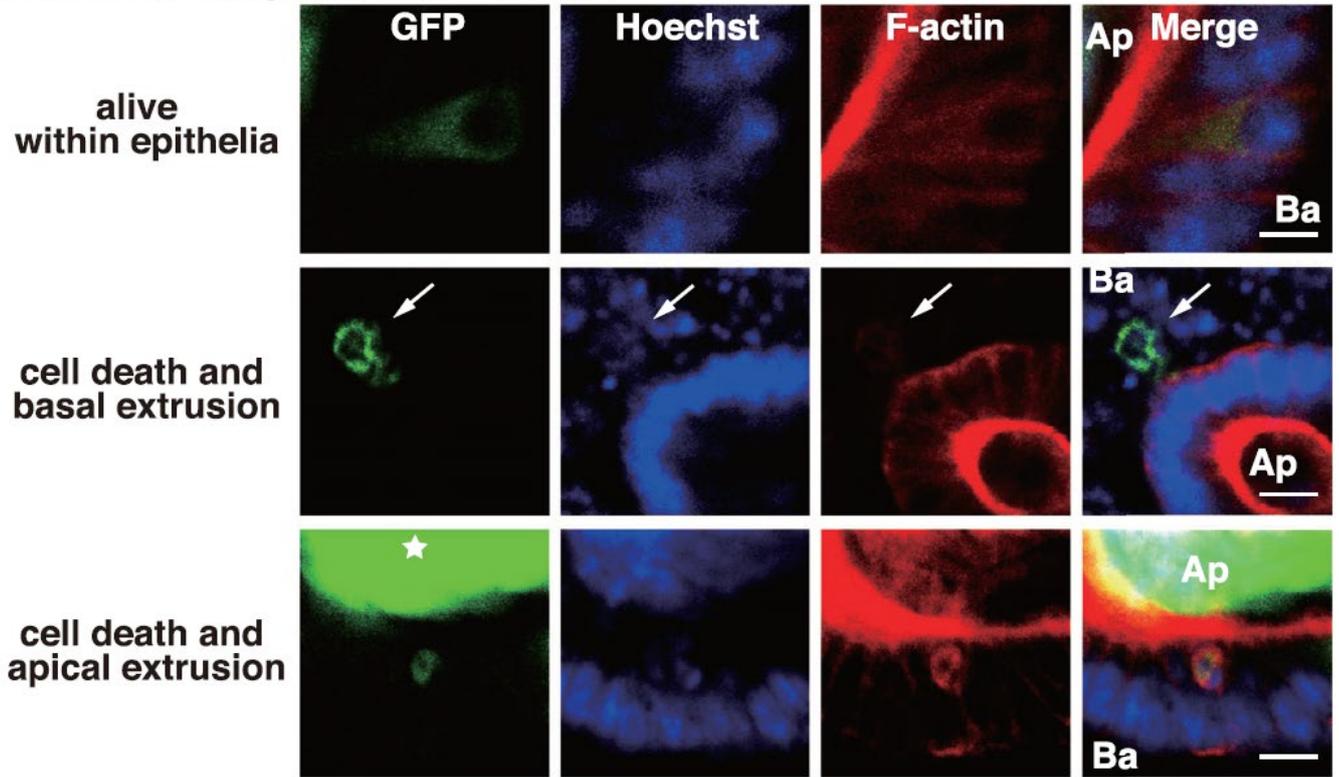


Figure 2-14. 正常細胞に囲まれた p53R270H 細胞の挙動。LSL-p53R270H-IRES-GFP をコードするウイルスに感染した Villin-Cre-ERT2 マウスの腸オルガノイドの蛍光免疫染色画像。矢印は基底膜側へ逸脱した変異型 p53 発現細胞を示す。画像のアスタリスクは、頂端内腔にムチンが豊富な自家蛍光物質があることを示す。Ba と Ap は、それぞれ基底膜側と頂端側を表す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

### Lenti-CAG-LSL-p53R172H-IRES-GFP

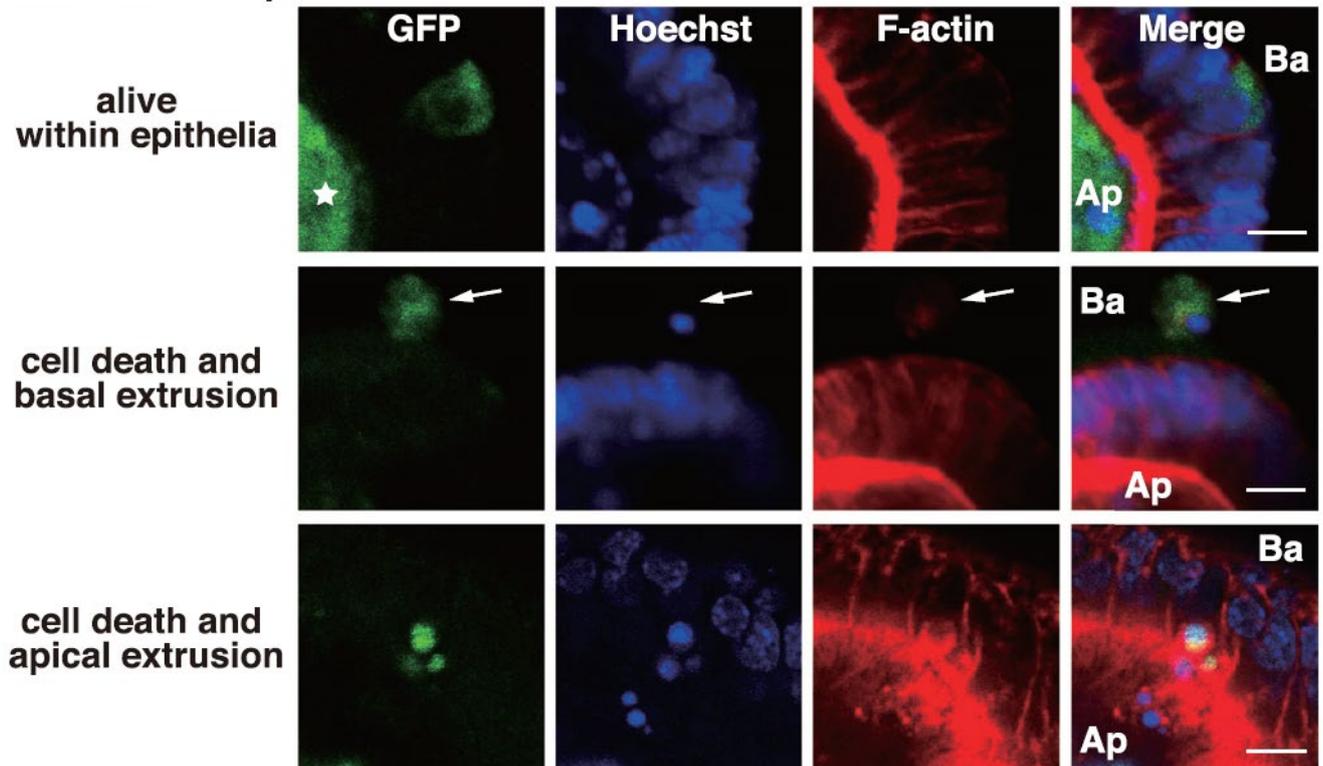


Figure 2-15. 正常細胞に囲まれた p53R172H 細胞の挙動。LSL-p53R172H-IRES-GFP をコードするウイルスに感染した Villin-Cre-ERT2 マウスの腸オルガノイドの蛍光免疫染色画像。矢印は基底膜側へ逸脱した変異型 p53 発現細胞を示す。画像のアスタリスクは、頂端内腔にムチンが豊富な自家蛍光物質があることを示す。Ba と Ap は、それぞれ基底膜側と頂端側を表す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

## Lenti-CAG-GFP

alive  
within epithelia

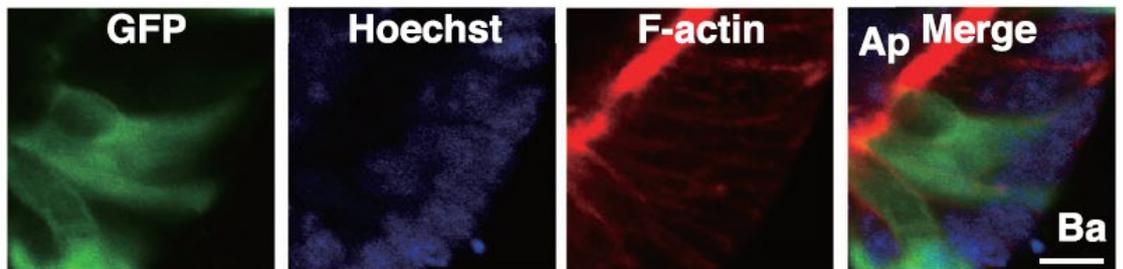


Figure 2-16. 正常細胞に囲まれた GFP 細胞の挙動。GFP をコードするウイルスに感染した Villin-Cre-ERT2 マウスの腸オルガノイドの蛍光免疫染色画像。Ba と Ap は、それぞれ基底膜側と頂端側を表す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

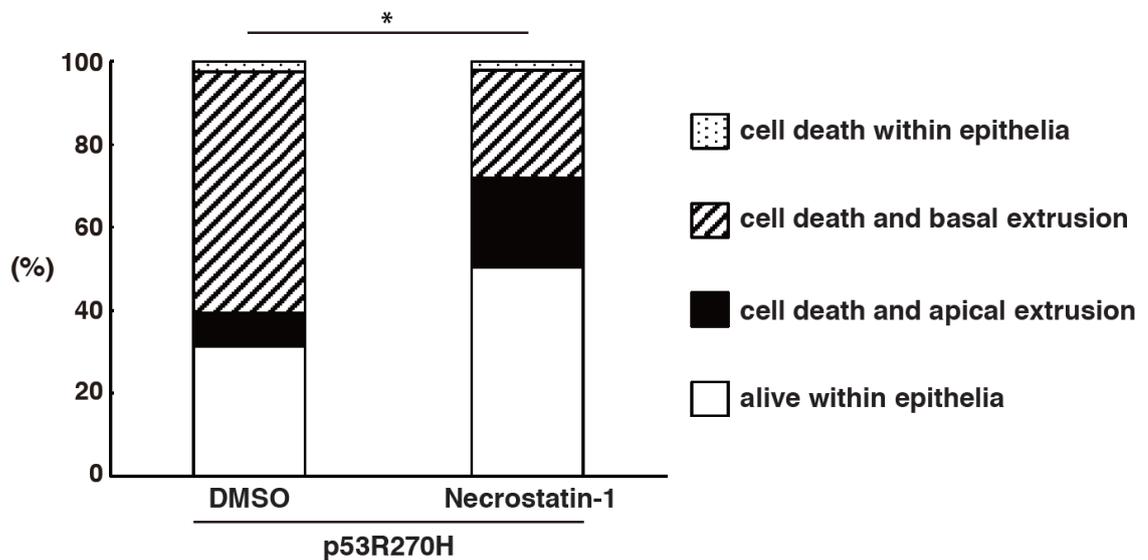


Figure 2-17. *ex vivo* システムでの p53R270H 細胞の基底膜側への逸脱は Necrostatin-1 により有意に抑制される。Necrostatin-1 (20  $\mu$  M) の非存在下または存在下での *ex vivo* システムでの p53R270H 発現細胞の運命を定量した結果を示す。上皮層内に生存し留まっていたもの、細胞死を起こし頂端側へ逸脱したもの、細胞死を起こし、基底膜側へ逸脱したもの、細胞死を起こしたが上皮層内に留まっていたものを観察し、定量した。\*P<0.0001 (chi-square test)であり、カウントした細胞数は左から 234、139 細胞である。

## 2.5. 考察

本研究では、p53 変異細胞が上皮層内で産生すると、隣接する正常細胞との間で細胞競合が生じ、p53 変異細胞は敗者となり、上皮層から排除されることを明らかにした。この過程で、p53 変異細胞はネクロプトーシスを起こし、基底膜側へ逸脱した。この現象は、*ex vivo* の系においても同様に生じ、種を超えて保存された現象であることが示唆された。この p53 変異細胞が排除される機能は周りに正常細胞が存在する時にのみ生じる細胞非自律的な現象である。これまでの先行研究において、p53 が他の組織の細胞競合にも関与していることが報告されている。Bondar と Medzhitov は、幹細胞と前駆細胞からなるマウス造血幹細胞群 (HSPCs) に、マイルドな放射線照射下において、p53R172H を発現している HSPC が野生型 HSPC を排除することを示した<sup>12</sup>。その結果、勝者である p53 変異細胞が骨髄を優位に占め、一方、老化のような表現型が野生型細胞で誘導される。さらに、Zhang らは p53 が高発現している Mdm2<sup>+/+</sup>Mdm4<sup>+/+</sup> 細胞はマウスの胚や生体の造血組織において、成長遅延を起こし、細胞競合によって正常な細胞に打ち負かされるということを報告したが、分子メカニズムは不明なままである<sup>13</sup>。これらの結果は、p53 変異細胞の出現や p53 活性の異常が様々な組織における細胞競合を起こすトリガーとなりえ、勝者と敗者の細胞は細胞の p53 のステータスに依存して決定されるということを示している。p53R175H や p53R273H などの p53 変異体の発現は、内因性 p53 タンパク質の機能を抑制するだけでなく (ドミナントネガティブ効果)、p63 機能の抑制や一連の遺伝子の転写制御などのさまざまな gain-of-function 効果も引き起こす<sup>14</sup>。p53R273H 発現細胞は、p53 ノックアウト上皮層内においてもネクロプトーシスを起こしていたことから、p53 変異による loss-of-function の効果ではなく、gain-of-function の効果が細胞競合の誘導に重要な役割を担っていることが本研究成果より推察される。MDCK 細胞においては、p53R273H は p53R175H よりも細胞競合によるネクロプトーシスの誘導が顕著に見られたが、HPDE6 細胞では相反する結果であった。これは、細胞腫の違いによって p53 変異体によって発現誘導される遺伝子

群の違いに起因するのかもしれない。

最近の研究から、細胞競合によって、敗者の細胞はさまざまな表現型を示すことが明らかになっている。表現型としては、アポトーシスだけでなく、細胞老化、オートファジー、エントーシス、および細胞死に依存しない逸脱である<sup>1, 12, 15-18</sup>。本研究では、敗者の細胞の新たな表現型としてネクロプトーシスを示した。私を知る限り、本研究は細胞非自律的に細胞間相互作用によってネクロプトーシスが誘導されることを初めて報告したものである。ネクロプトーシスはプログラムにより制御された細胞死の一種であり、アポトーシスとネクローシスの両方の性質を併せ持ち、様々な病理学的プロセスに関与している<sup>19-22</sup>。ネクロプトーシスは特にアポトーシスが阻害された条件下で、TNF, FasL, TRAIL などのデスリガンドによって誘導されることが知られている<sup>23</sup>。TNF に関しては次章で触れ、正常細胞に囲まれた p53 変異細胞がネクロプトーシスを起こす際の分子メカニズムについてももう少し検討していく。

p53 変異細胞がネクロプトーシスを起こしていたことはわかったが、ネクロプトーシスの一般的な特徴のひとつに、核がほぼ変化しないことがあげられる。染色体が凝集し、DNA の断片化が起こるのはアポトーシスの特徴である<sup>23</sup>。アポトーシスの実行因子はカスパーゼであり、ネクロプトーシスの実行因子が RIPK1、RIPK3、MLKL であることは知られている。本研究においても、アポトーシスの実行因子のカスパーゼの阻害剤では細胞死が抑えられず、ネクロプトーシスの制御因子の RIPK1、RIPK3 の阻害剤では細胞死が有意に抑えられた。しかし、核が凝集して見えることは、少し表現型が異なっているように考えられるが、これは p53 変異によってもたらされた結果であると考えられる。核が凝集しているということは何かしらカスパーゼの働きはあったのかもしれない。蛍光免疫染色画像からカスパーゼ-3 は作用していないことがすでに分かっているので、カスパーゼ 6 もしくは 7 が関与している可能性が考えられ、今後詳細に

検討する必要がある。

生体内においては、ネクロプトーシスを起こすと、周囲に炎症系サイトカインが放出されるため、免疫細胞が集まる。本研究では、培養細胞システムおよび *ex vivo* システムを用いており、単層での条件下での表現型を調べた結果であり、周囲に免疫細胞等は存在しない。我々の体内でも p53 変異を起こした細胞が産生された時に、周囲の正常細胞の存在によりネクロプトーシスが誘導され、p53 変異細胞が排除されるのか、またネクロプトーシスによる排除を受けたのち周囲でなにが起こるのかを調べるためには、モデルマウスを確立し、検証していく必要がある。本研究で発見した現象が生体内でも起こっていると期待したいが、Shindo らの報告によると *in vitro* の実験系ではネクロプトーシスを選択的に誘導する遺伝子が、*in vivo* ではアポトーシスを誘導していたことを報告している<sup>24</sup>。TNF などにより転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化すると、NF- $\kappa$ B の下流で cFLIP が働き、細胞死を抑制する<sup>25</sup>。ヒト cFLIP をコードする遺伝子は 2 種類の cFLIP<sub>L</sub> と cFLIP<sub>S</sub> の 2 種類のたんぱく質を作る。このうち *in vitro* での実験系において、cFLIP<sub>S</sub> に関しては、アポトーシスは抑えるものの、ネクロプトーシスは促進する性質を持つことを報告した。さらに、面白いことに、Shindo らは cFLIP<sub>S</sub> を過剰発現させたマウスではネクロプトーシスではなく、アポトーシスによる細胞死が観察されたことを報告した<sup>24</sup>。これは、ネクロプトーシスにより放出される DAMPs により、免疫細胞が反応し、分泌された IL-22 によってアポトーシスが誘導されるというものであった。このように生体においては、免疫細胞の働きにより異なった表現型が見られるかもしれない。すなわち、本研究により発見した現象も生体内では、逆にアポトーシスを起こし排除されるような現象がメインで見られるように変わっているかもしれない。ただし、生体内においては、アポトーシスによる体外への排除の方が体への負荷が少ないと考えるため、可能性としてはあるのではないだろうか。

## 2.6. 参考文献

1. Hogan C, et al. (2009). Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 11(4):460-467.
2. Laura W, et al. (2016). Mechanical cell competition kills cells via induction of lethal p53 levels. *Nat. Commun.* 7:11373.
3. Furukawa T, et al. (1996). Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am. J. Pathol.* 148(6):1763-1770.
4. Hong O, et al. (2000). Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am. J. Pathol.* 157(5):1623-1631.
5. Imagawa T, et al. (2009). Evaluation of transcriptional activity of p53 in individual living mammalian cells. *Anal. Biochem.* 387(2):249-256.
6. Miyoshi H, et al. (1998). Development of a self-inactivating lentivirus vector. *J. Virol.* 72(10):8150-8157.
7. Fatima el M, et al. (2004). Tissue-specific and inducible Cre-mediated recombination in the gut epithelium. *Genesis* 39(3):186-193.
8. Kon S, et al. (2017). Cell competition with normal epithelial cells promotes apical extrusion of transformed cells through metabolic changes. *Nat. Cell Biol.* 19(5):530-541.
9. Kajita M, et al. (2010). Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *J. Cell Sci.* 123(Pt 2):171-180.
10. Hogan C, et al. (2004). Rap1 regulates the formation of E-cadherin-based cell-cell contacts. *Mol. Cell. Biol.* 24(15):6690-6700.
11. Huang J, et al. (2011). Regulator of G Protein Signaling 6 Mediates Doxorubicin-

Induced ATM and p53 Activation by a Reactive Oxygen Species-Dependent Mechanism. *Cancer Research*. 10.1158/0008-5472

12. Bondar T and Medzhitov R (2010). p53-mediated hematopoietic stem and progenitor cell competition. *Cell Stem Cell* 6(4): 309-322.
13. Guoxin Z, et al. (2017). p53 pathway is involved in cell competition during mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114(3):498-503.
14. Patricia A.J.M and Karen H.V. (2014). Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. *Cancer Cell* 25(3):304–317.
15. Wei Li and Nicholas E.B. (2007). Engulfment is required for cell competition. *Cell* 129(6):1215-1225.
16. Ohsawa S, et al. (2011). Elimination of oncogenic neighbors by JNK-mediated engulfment in *Drosophila*. *Dev. Cell* 20(3)315-328.
17. Sun Q, et al. (2014). Competition between human cells by entosis. *Cell Res.* 24, 1299-1310.
18. Villa Del Campo C, et al. (2014). Cell competition promotes phenotypically silent cardiomyocyte replacement in the mammalian heart. *Cell Rep.* 8(6):1741-1751.
19. Kaczmarek, A, Vandenabeele P and Krysko D.V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity* 38(2):209-223.
20. Pasparakis M and Vandenabeele P (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* 517:311-320.
21. Vandenabeele P, et al. (2010). Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:700–714.
22. Weinlich R, et al. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18:127–136.

23. Yan Ge, Elbadawi M. and Efferth T. (2020). Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal* 2: 39-48.
24. Shindo R, et al. (2019). Necroptosis of intestinal epithelial cells induces type 3 innate lymphoid cell-dependent lethal ileitis. *iScience* 15:536-551.
25. Nakajima A, et al. (2006). An antiapoptotic protein, c-FLIP<sub>L</sub>, directly binds to MKK7 and inhibits the JNK pathway. *The EMBO J.* 25:5549-5559.

### 3 章 :

正常細胞と p53 変異細胞間に生じる細胞競合のより詳細な  
分子メカニズムの解明と多段階発癌の関わり

### 3.1. 要旨

さまざまな阻害剤による検討の結果、p53 変異細胞の排除にはミオシンが関与していることを発見した。さらに、タイムラプスイメージングによって、p53 変異細胞に隣接する正常細胞がミオシンを上端側に集積させ (myosin-ring の形成)、p53 変異細胞を基底膜側へ押し出していることも発見した。また、MMP が p53 変異細胞の排除に関与する可能性も示唆した。さらには、多段階発癌の遺伝子変異の規則性と細胞競合との関連の解明を目指し、Ras 変異を有した細胞層に p53 変異を少数誘導すると、p53 変異細胞は細胞競合による排除効率が減少した。これらの結果より、遺伝子変異の規則性が細胞競合の排除効率と関連することが示唆された。

### 3.2. 緒言

前章で、p53 変異細胞は正常細胞に囲まれた時に、ネクロプトーシスを起こし基底膜側へ逸脱することを示した。次に、正常細胞と p53 変異細胞間に生じる細胞競合のより詳細な分子メカニズムの解明ため、さまざまな阻害剤による細胞競合への影響を調べた。加えて、多段階発癌の遺伝子変異の規則性と細胞競合との関連についても検討した。

### 3.3. 実験手法

#### 3.3.1. 抗体と材料

Abcam 社の rabbit anti-MMP9 (ab38898) を用いた。Cell Signaling 社の rabbit anti-cleaved caspase 3 (9661S) を用いた。Alexa-Fluor-568 と -647 と共役したファロイジン (Life Technologies) は 1.0 U/mL で用いた。Alexa-Fluor-568 と -647 の 2 次抗体は Life Technologies 社のものを用いた。Hoechst 33342 (Life Technologies)

は 1 : 5,000 の濃度で用いた。蛍光免疫染色において、すべての一次抗体は 1 : 100 の濃度で用い、2 次抗体は 1 : 200 の濃度で用いた。

阻害剤は以下のものを用いた。Abcam 社の Batimastat は 10  $\mu$  M で用いた。Calbiochem 社の (S)-(-)-blebbistatin は 30  $\mu$  M、MMP9 inhibitor は 10  $\mu$  M で用いた。Sigma-Aldrich 社の SP600125 は 5  $\mu$  M で用いた。Santa Cruz 社の sc-356160 は 40  $\mu$  M で、CAPE は 10  $\mu$  g/ml で用いた。Promega 社の U0126 は 40  $\mu$  M で用いた。

### 3.3.2. 細胞培養

主要で用いる細胞は前章で説明した。MDCK-pTR mCherry-RasV12 細胞株は、MDCK-pTR 細胞に pcDNA4/TO/ mCherry-RasV12 を遺伝子導入した後、ブラストサイジン を 5  $\mu$  g/ml とゼオシンを 400  $\mu$  g/ml 加えた培地中でセレクションすることで樹立した。恒常的に MLC-mCherry を発現している MDCK 細胞株は、MDCK 細胞に PB-EF1-MCS-IRES-Neo-hMLC2-mCherry を遺伝子導入し、G418 (Calbiochem) を 800  $\mu$  g/ml 加えた培地中でセレクションすることで樹立した。テトラサイクリン誘導型 MDCK 細胞株では、テトラサイクリン (Sigma-Aldrich) を培地中に 2  $\mu$  g/ml を加えることで目的のタンパク質を発現させた。阻害剤は blebbistatin のみテトラサイクリン添加後 24 時間経過後に、その他はテトラサイクリン添加と同時に加えた。蛍光免疫染色の方法は、前章で説明した。

### 3.3.3. 蛍光免疫染色

蛍光免疫染色では、今までの方法と同様に<sup>1</sup>、p53R273H 細胞と MDCK 細胞を 1 : 50 の割合で混合し、コラーゲンコートしたカバーガラスの上に播種した。混合し播種した細胞は 8-12 時間培養した後、テトラサイクリンを加え 48 時間処理した。細胞は

パラホルムアルデヒド (PFA) が 4%含有した PBS で固定し、透徹処理は以前説明したように行った<sup>2)</sup>。一過性発現系において、MDCK-pTR mCherry-RasV12 細胞もしくは p53R273H 細胞に、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いて既に述べたコンストラクトを遺伝子導入した。蛍光免疫染色画像は Olympus FV1000 もしくは FV1200 システムとソフトウェアとして Olympus FV10-ASW を用いて解析した。

#### 3.3.4. タイムラプスイメージング

タイムラプスイメージを用いた解析では、ガラスボトムディッシュ上にコラーゲンコートした後、p53R273H 細胞を MDCK 細胞もしくは恒常的に MLC-mCherry を発現している MDCK 細胞と 1 : 50 の割合で混合播種した。そして、培地中にテトラサイクリン 2  $\mu\text{g/ml}$  を加え、24 時間培養した。その後、テトラサイクリン 2  $\mu\text{g/ml}$  を含んだ L-15 培地に置換し、IX81-ZDC 顕微鏡 (Olympus) を用いて 24 時間タイムラプスイメージングを行った。蛍光画像 (画像は  $1391 \times 1038$  ピクセルかつ  $0.325 \mu\text{m}$  の分解能) は露光時間 0.2 s にて取得した。

#### 3.3.5. データ解析

両側スチューデントの t 検定、カイ二乗検定及び一元配置分散分析を用いてデータを解析することで、P 値を判定した。P 値が 0.05 未満の場合は有意差ありと判断した。解析したデータの全ての結果は少なくとも 2 つの独立した実験より再現された。

## 3.4. 結果

### 3.4.1. 細胞競合による p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱を制御する分子メカニズムの解明

まず、基底膜側へ逸脱する際の分子メカニズムを解明するために、さまざまな阻害剤の効果を調べた。ミオシン II 阻害薬である blebbistatin を投与することで、p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱を有意に抑制することを見出した (Figure 3-1)。また、p53R273H 細胞は、核が断片化した状態で細胞層に留まっていることがよく観察された (Figure 3-1)。これらの結果は、ネクロプトーシスを起こした細胞がミオシン依存的に基底膜側へ排除されていたことを示唆している。実際に、タイムラプスイメージングを行うことで、p53R273H 細胞が基底膜側への逸脱する際に、ミオシン軽鎖 (MLC) が周囲の正常細胞で集積し、p53R273H 細胞の周りにリングを形成し、最終的に上皮層から押し出している様子を観察することができた (Figure 3-2)。さらに、ライブイメージングにより、p53R273H 細胞が頂端側へ押し出される様子も観察した (Figure 3-3)。しかし、頂端側への逸脱は、基底膜側への逸脱よりも頻度は低かった。以前の研究成果において、アポトーシスを起こした細胞がミオシンの収縮を介して頂端側に逸脱することが報告されている<sup>3</sup>。本研究においても同様に、死細胞の排除の過程で、周囲の細胞にミオシンが集積するという現象が観察された。また、ライブイメージングによって観察された p53R273H 細胞の頂端側への逸脱もミオシン依存的に行われており、アポトーシスによって排除されている可能性が考えられる。blebbistatin を添加することで、細胞層中に caspase-3 陰性だけでなく、caspase-3 陽性である p53R273H 細胞も観察された (Figure 3-4)。細胞死した p53R273H 細胞を定量した結果、約 10% が caspase-3 陽性であり、アポトーシスを起こしていたことが明らかとなった (Figure 3-5)。これらのデータは、正常細胞に囲まれた p53 変異細胞がネクロプトーシスかアポトーシスを起こすことを示唆している。ただし、ネクロプトーシスはアポトーシスよりも頻繁に起こっており、ネクロプトーシスを起こした細胞とアポトーシスを起こした

細胞はそれぞれ基底膜側と頂端側に押し出される。しかしながら、ネクロプトーシスを起こした細胞の断片の一部が頂端側にも排除されている可能性は否定できない。他に用いた阻害剤としては sc-356160、SP600125、U0126、CAPE、Batimastat、MMP-9 inhibitor がある。sc-356160 は TNF- $\alpha$ 、SP600125 は JNK、U0126 は MAPK、CAPE は NF- $\kappa$ B の阻害剤であり、全て p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱に影響しなかった (Table 3-1)。特に、TNF- $\alpha$  は細胞死を誘導する上流因子として知られているが、細胞競合時に起こる p53R273H 細胞のネクロプトーシスに影響しなかった (Figure 3-6)。一方、preliminary data であるが、Batimastat、MMP-9 inhibitor を添加すると、p53R273H 細胞の基底膜側への逸脱を有意に阻害した (Figure 3-7)。また、蛍光免疫染色画像より、MMP-9 が排除される p53 変異細胞の周囲の正常細胞に集積することが観察された (Figure 3-8)。

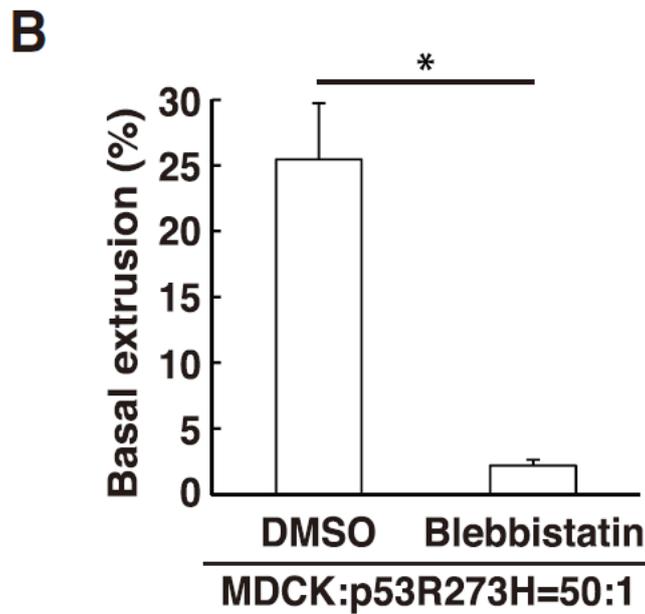
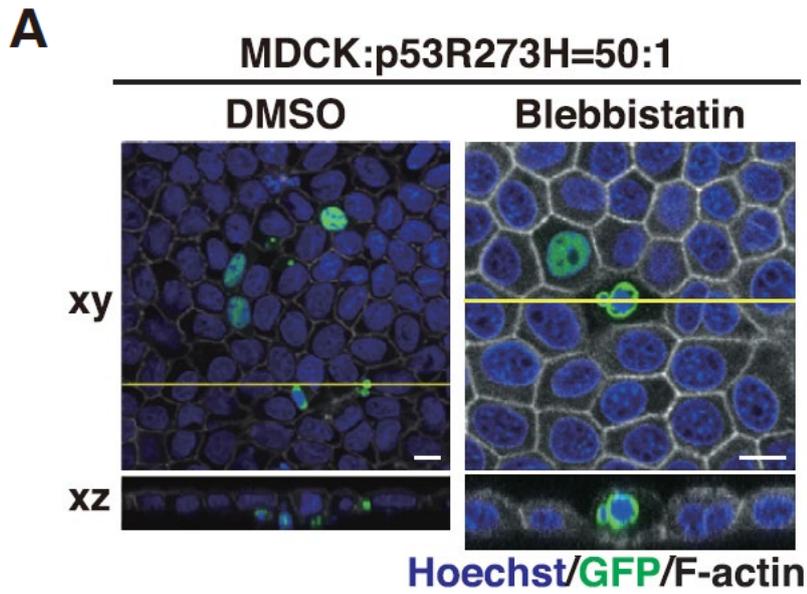


Figure 3-1. Blebbistatin は p53R273H 細胞が基底膜側へ逸脱するのを有意に抑制する。(A) Blebbistatin の非存在下または存在下での正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R273H 細胞の蛍光免疫染色画像。Scale bars, 10  $\mu$ m. (B) Blebbistatin の非存在下または存在下での基底膜側への逸脱を定量した結果を示す。データは 3 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。\* $p < 0.05$  (Student's t test)であり、カウントした細胞数は左から 324、330 細胞である。

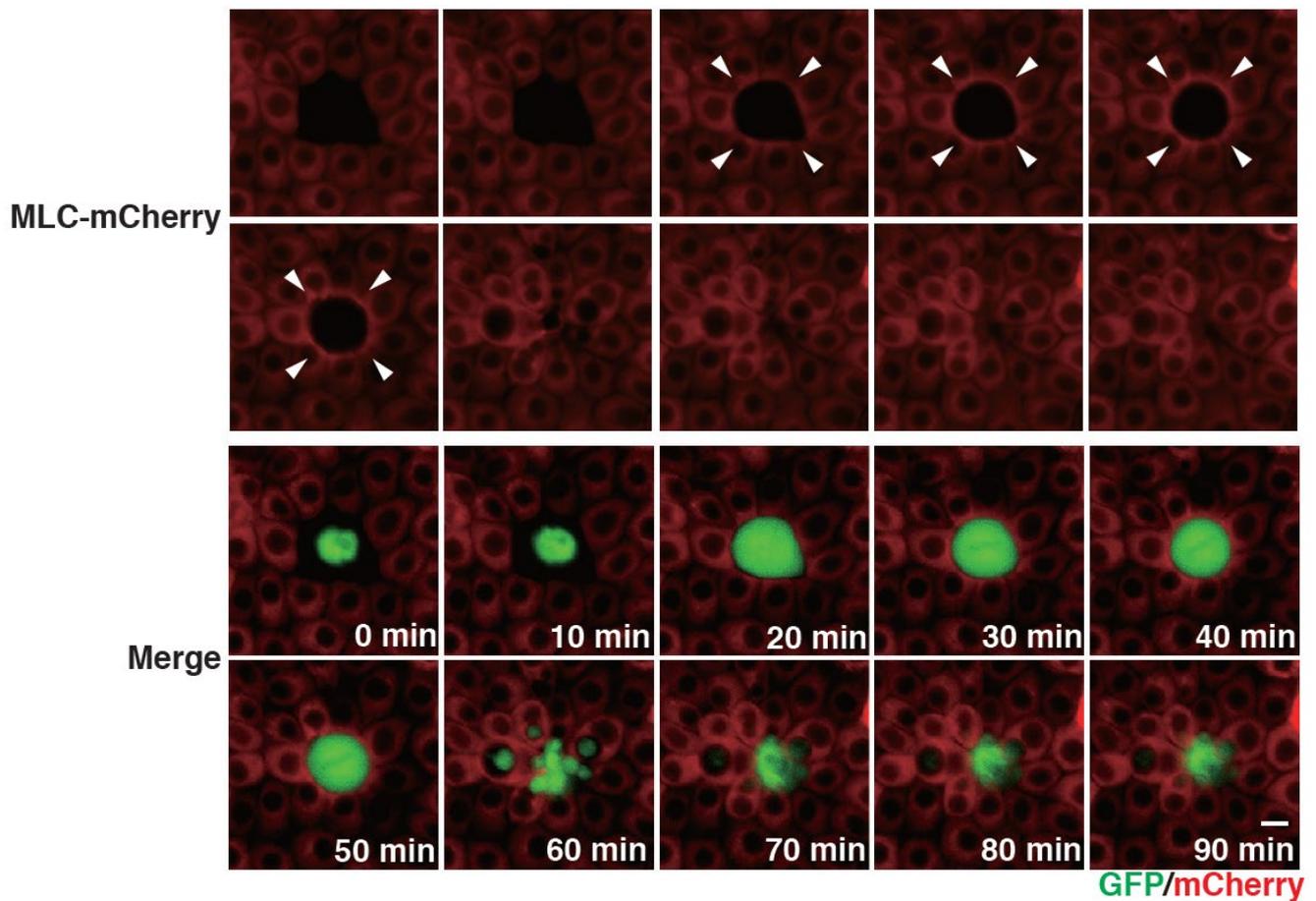


Figure 3-2. p53R273H 細胞が基底膜側へ逸脱するまでのタイムラプスイメージング。  
MLC-mCherry を発現している MDCK 細胞に囲まれた p53R273H 細胞のタイムラプ  
スイメージングの中で代表的な連続した画像を示す。矢頭は myosin-ring 状の構造を示  
す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

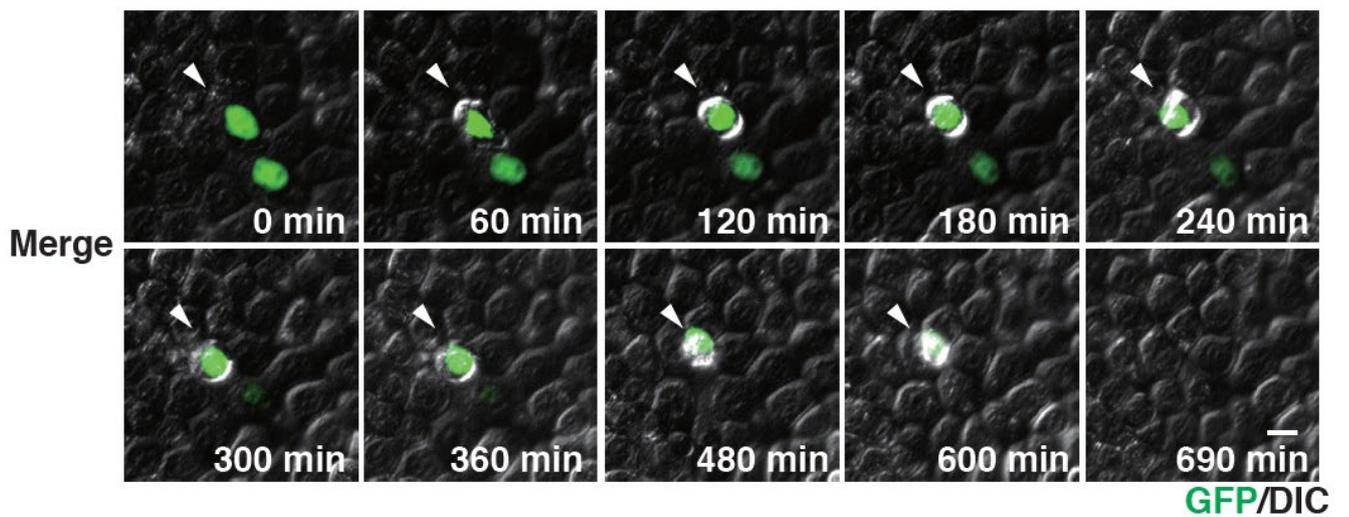


Figure 3-3. p53R273H 細胞が頂端側へ逸脱するまでのタイムラプスイメージング。正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R273H 細胞のタイムラプスイメージングの中で代表的な連続した画像を示す。矢頭は頂端側へ逸脱した p53R273H 細胞を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

**MDCK:p53R273H=50:1  
+ Blebbistatin**

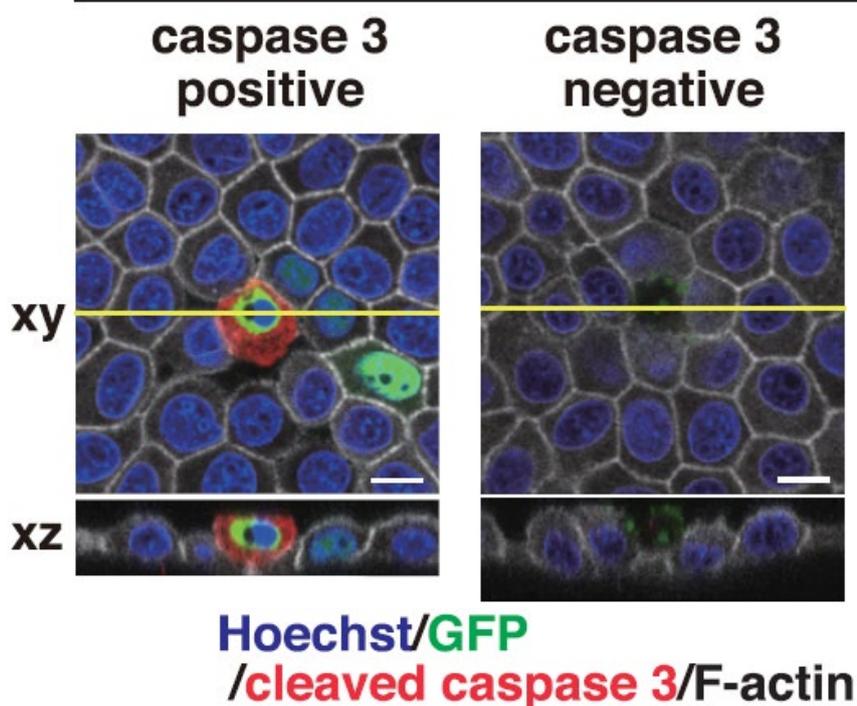


Figure 3-4. p53R273H 細胞には 2 つの細胞死様式が見られる。Blebbistatin の存在下での正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R273H 細胞の蛍光免疫染色画像。カスパーゼ-3 陽性と陰性な p53R273H 細胞が観察された。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

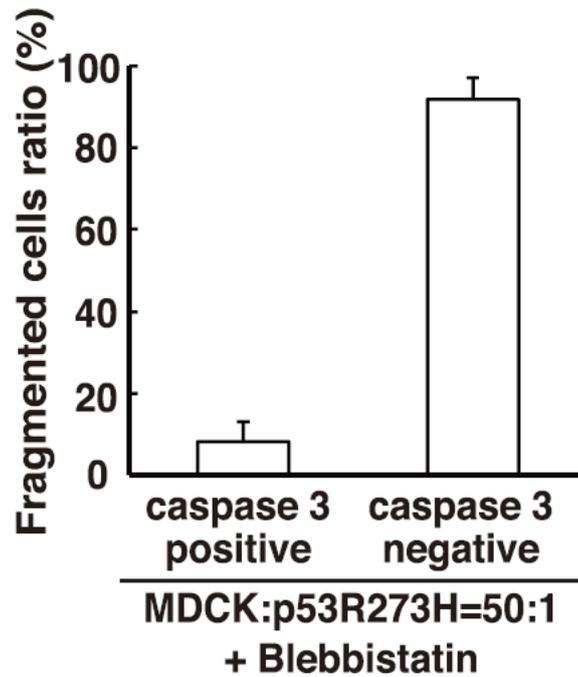
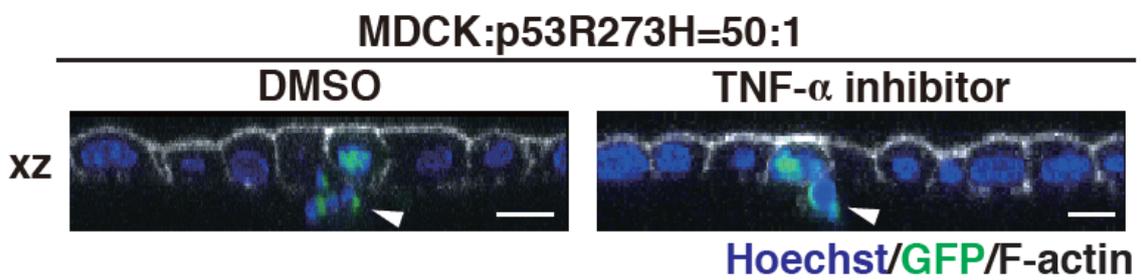


Figure 3-5. カスパーゼ-3 陽性と陰性の 2 つの表現型を定量した結果。Blebbistatin の非存在下または存在下での基底膜側への逸脱を定量した結果を示す。データは 2 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。カウントした細胞数は合計 200 細胞である。



**Figure 3-6.** TNF- $\alpha$  阻害剤では細胞競合により生じるネクロプトーシスを抑制しない。TNF- $\alpha$  の阻害剤である sc-356160 の非存在下と存在下における正常な MDCK 細胞に囲まれた p53R273H 細胞の蛍光免疫染色画像。矢頭は基底膜側に逸脱した p53R273H 細胞を示す。スケールバーは 10  $\mu$ m。

		p53R273H
Inhibitors	Target	Basal extrusion
sc-356160	TNF- $\alpha$	no effect
Blebbistatin	Myosin-II	↓
SP600125	JNK	no effect
U0126	MAPK	no effect
CAPE	NF- $\kappa$ B	no effect

Table 3-1. 正常細胞に囲まれた p53 変異細胞が基底膜側へ逸脱することに対する各阻害剤が及ぼす効果。↓は有意に阻害した結果を示す。

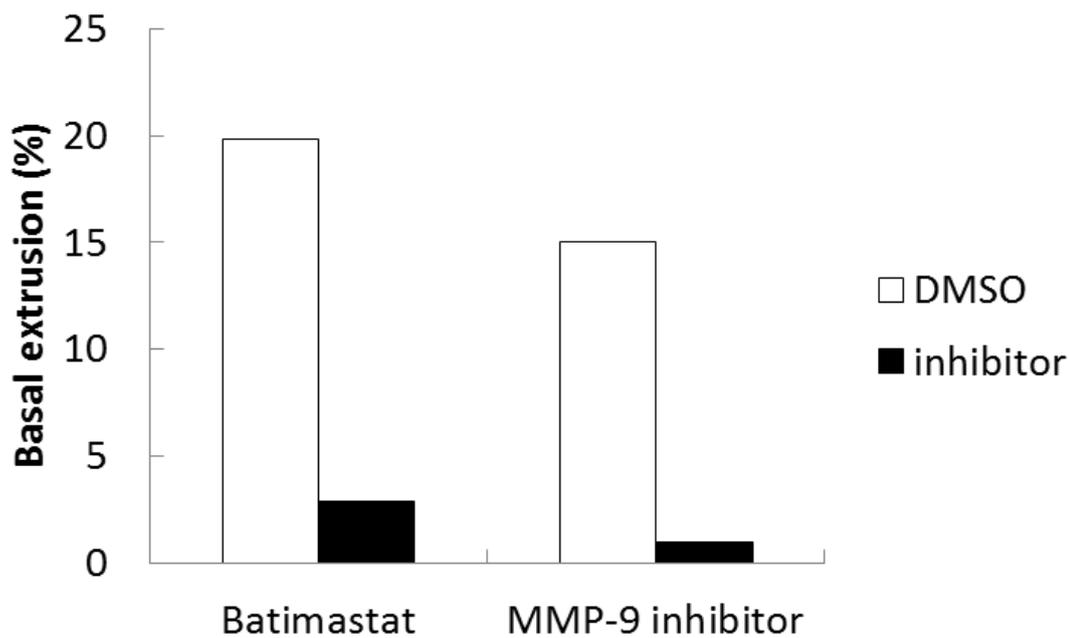
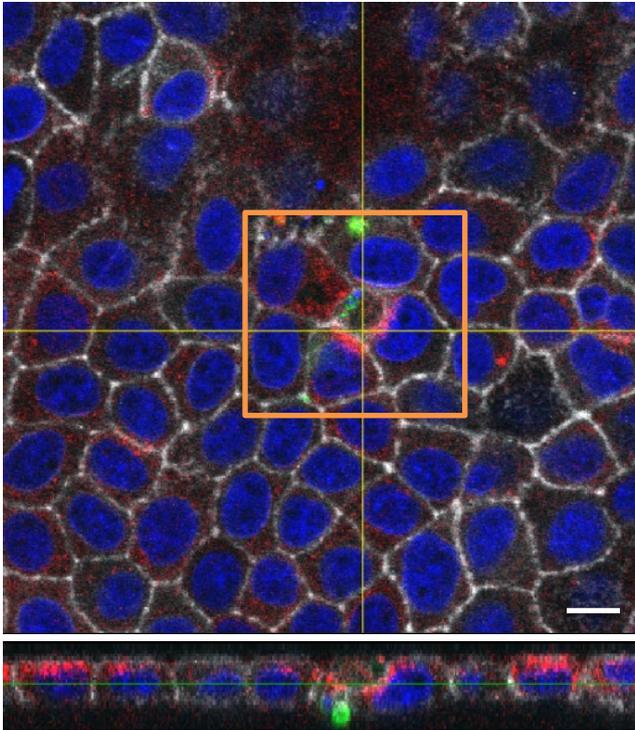
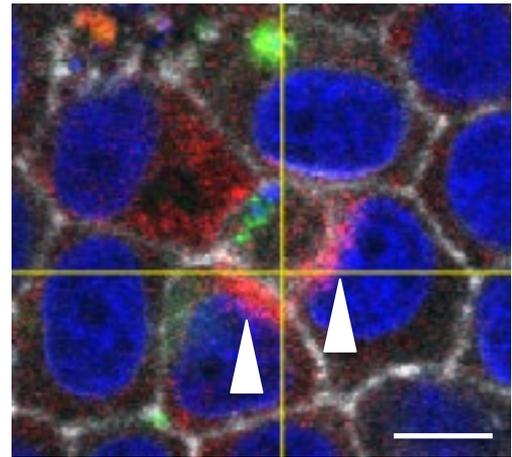


Figure 3-7. MMP 阻害剤は細胞競合によって起こる基底膜側への逸脱を抑制する。

MMP 阻害剤である Batimastat および MMP-9 inhibitor のそれぞれ非存在下または存在下での基底膜側への逸脱を定量した結果を示す。データは preliminary data であり、カウントした細胞数は全て 100 細胞である。

**A****B**

Hoechst/GFP/MMP-9/F-actin

Figure 3-8. MMP-9 は p53R273H 細胞の周辺の正常細胞で局在する。(A および B) 基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞の MMP-9 の蛍光免疫染色画像。(B) A のオレンジの枠で囲った範囲の拡大画像。矢頭は、基底膜側へ逸脱した p53R273H 細胞周辺の正常な MDCK 細胞で MMP-9 が局在している様子を示す。スケールバーは 10  $\mu\text{m}$ 。

### 3.4.2. 多段階発癌の遺伝子変異の規則性と細胞競合との関連

ここまでは、発癌初期に p53 に変異が生じた際の p53 変異細胞と正常細胞との相互作用について研究を行ってきた。一方で、発がんの過程において、p53 の変異は一般的に中期または後期に好発することは知られている<sup>4,10</sup>。そこで、癌関連遺伝子の変異下の条件下で、p53 変異細胞の排除効率がどのように変化するかを検討した。Ras 遺伝子の活性化変異 (RasV12) は、大腸癌や膵臓癌などのさまざまな悪性腫瘍において p53 変異よりも初期段階で生じることが知られている<sup>4,9</sup>。そこで、テトラサイクリン依存的に mCherry-RasV12 を安定して発現する MDCK 細胞株 (MDCK-pTR RasV12) を樹立した。MDCK-pTR RasV12 細胞層に p53R273H をモザイク状に一過性発現させ、p53R273H 細胞の運命を調べた。テトラサイクリン非存在下により RasV12 の発現が誘導されなかった場合、p53R273H 細胞の大部分は、細胞が断片化し、基底膜側へ逸脱していた (Figure 3-9)。一方で、テトラサイクリン添加により RasV12 の変異を有する上皮層中に p53R273H をモザイク状に発現させた場合、細胞死の誘導は強く抑えられ、p53R273H 細胞のほとんど細胞層に留まっていた (Figure 3-9)。このことは、RasV12 変異を有した状態では、新たに p53 変異を得た細胞との間での細胞競合が大幅に抑制されることを示唆している。一方で、これまでの研究同様、正常な細胞層中に RasV12 がモザイク状に発現すると、RasV12 を発現する細胞が頂端側へ逸脱されることが分かった<sup>1</sup> (Figure 3-10)。さらに、p53R273H を発現している細胞層中に RasV12 の発現を誘導した場合、頂端側への逸脱は正常な細胞層の時と同程度の頻度で発生した (Figure 3-10)。対照的に、Ras に近縁な GTPase である RapV12 を発現させた場合、正常または p53R273H を発現する上皮層中で頂端側への逸脱は起こらなかった<sup>1</sup> (Figure 3-10)。

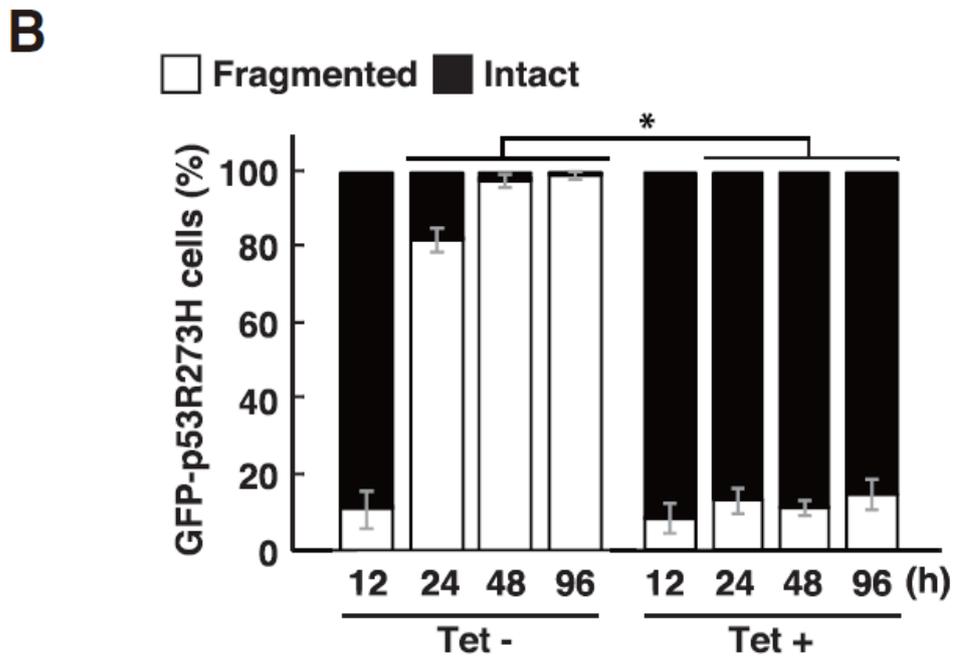
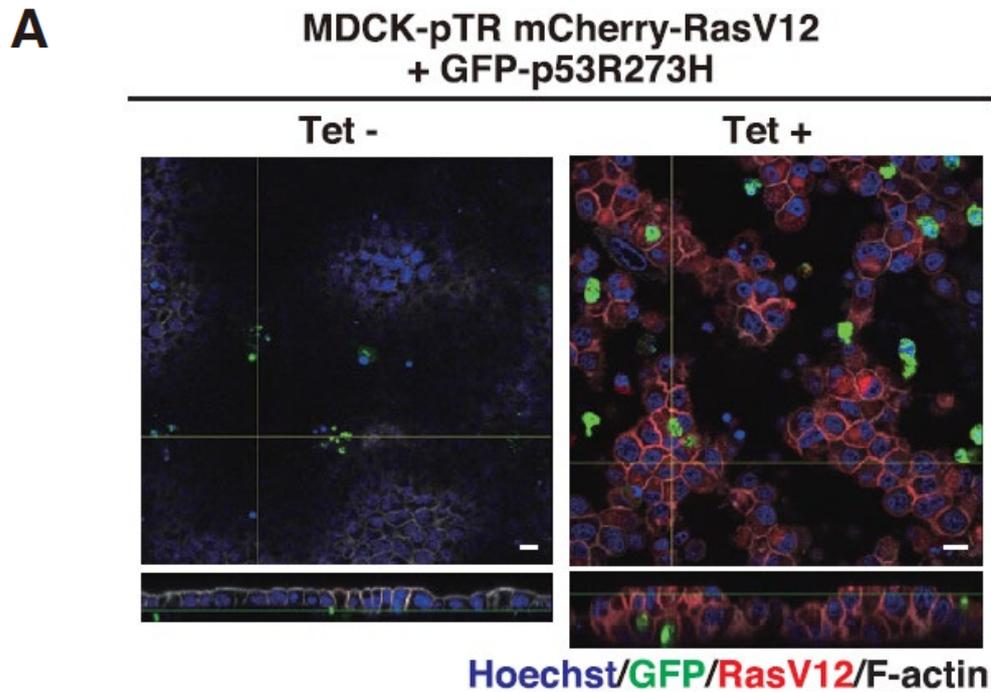


Figure 3-9. RasV12 の変異細胞層に p53 変異を少数誘導すると、p53 変異細胞は上皮層に留まる。(A) テトラサイクリン非存在下または存在下で GFP-p53R273H を一過性発現させた MDCK-pTR mCherry-RasV12 細胞の蛍光免疫染色画像。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B) 断片化もしくは無傷の p53R273H 細胞を定量した結果を示す。データは各 3 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。\* $p < 0.05$  (ANOVA test)であり、カウントした細胞数は各 150 細胞ずつである。

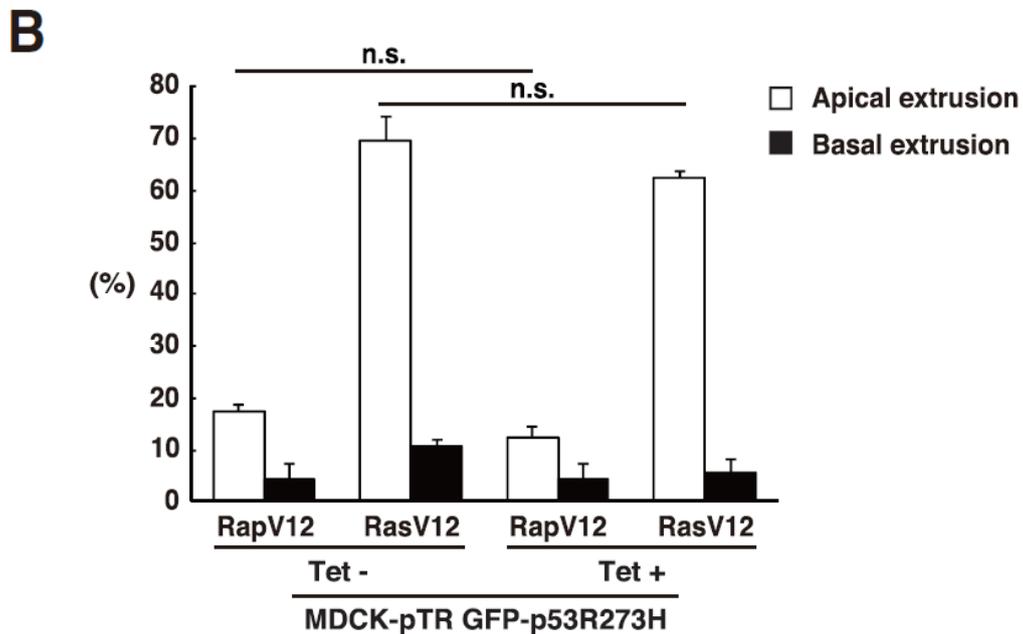
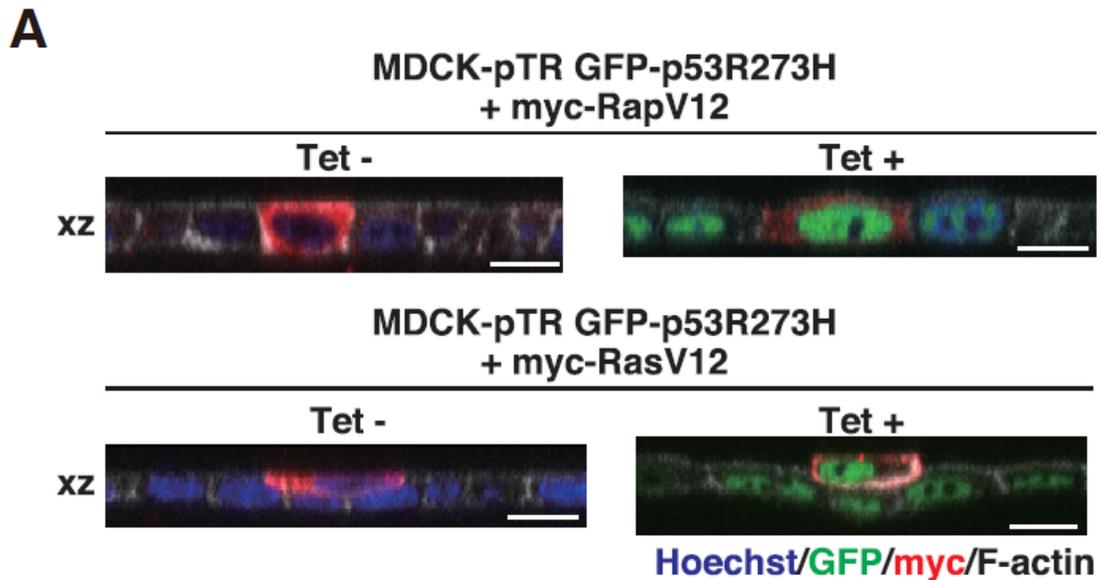


Figure 3-10. p53 変異を既に有している細胞層に RasV12 変異が生じてても、RasV12 細胞は頂端側へ逸脱する。(A) テトラサイクリン非存在下または存在下で myc-RasV12 もしくは myc-RapV12 を一過性発現させた p53R273H 細胞の蛍光免疫染色画像。スケールバーは 10  $\mu$ m。(B) RasV12 もしくは RapV12 を発現する細胞が頂端側または基底膜側へ逸脱する割合を定量した結果を示す。データは各 3 回の独立した試験から算出し、平均値  $\pm$  標準誤差で表示している。n.s.は有意差なしであり、カウントした細胞数は左から 92、93、90、91 細胞である。

### 3.5. 考察

本章での結果、細胞非自律的にネクロトーシスを起こし、排除される p53 変異細胞の分子メカニズムミオシンと MMP-9 が関与することが分かった。p53 変異細胞が頂端側、基底膜側ともに押し出されるためには、周囲の正常細胞にミオシンが集積することでリング状の構造を作った後、リングが収縮することによる物理的な力が必要となる。これは、ミオシン-IIの阻害剤である Blebbistatin により、細胞層に死んだ p53 変異細胞が留まっていることから明らかである。興味深いことは、Blebbistatin 添加によって、カスパーゼ-3 陰性のネクロトーシスが起る割合が抑制されなかったことである。すなわち、上皮層から押し出しことに正常細胞側のアクチン収縮は作用するが、p53 変異細胞自体が細胞死を起こすことには関与していない可能性が考えられる。また、TNF- $\alpha$  はネクロトーシスを起こす上流因子の一つであることは知られていたが、TNF- $\alpha$  阻害剤 sc-356160 によって p53 変異細胞のネクロトーシスを抑えられず、p53 変異細胞は基底膜側へ逸脱していた。したがって、FASL、TRAIL、Toll 様受容体などの他のネクロトーシスを誘導する上流因子もしくはまだ同定されていないシグナル伝達経路が、この p53 変異によって生じる細胞競合現象に関与していることが考えられる。MMP は細胞外基質の分解酵素であり、基底膜の主要成分である IV 型コラーゲンの分解酵素として MMP-2 や MMP-9 は癌の浸潤や転移や主要血管新生に関与していることが知られている<sup>11</sup>。本論文の結果では、正常細胞と変異細胞どちらが MMP を産生しているのかもわからないが、変異細胞側が MMP を産生している可能性は考えられる。もし、p53 変異細胞が MMP-9 等を産生している場合、周囲の正常細胞が MMP に反応し、p53 変異細胞の排除行動を開始しているとすれば、興味深いと考える。自身の仮説を証明するためには、p53R273H 細胞に恒常的に MMP-9 をノックダウンした細胞株を作り、同様の細胞培養モデルの実験を行った際に p53R273H 細胞が基底膜側への逸脱を起こさないことを確認するとよいだろう。一方で、免疫染色の結果より、正常細胞側で MMP9 の発現が増加する可能性が考えられ、正常細胞が MMP を発現、分

泌し、これがコラーゲンを分解することにより p53 変異細胞の基底膜への逸脱を促していることが十分に考えられる。分子メカニズムに関しては、まだまだ分からないことが多く残っており、今後の研究が進むことで明らかになっていくと考える。

また、Vogelstein らが多段階発癌モデルを提案してから、多段階発癌モデルは癌発生過程において、複数の発癌性の変異が特定の順序で連続的に蓄積していくと一般的に信じられている<sup>9</sup>。たとえば、大腸癌では、連続的に APC、Ras、Smad4 および p53 の変異が入ることにより、腺腫から腺癌へ遷移していく<sup>10</sup>。ほとんどの固形腫瘍では、p53 変異は一般に中期から後期に発生するが、発がんの初期段階では発生しない。しかし、突然変異の順序ががん化していく過程にどのように影響するのかは明らかになっていない。前章にて、p53 変異細胞が正常な上皮層に出現した際に、p53 変異細胞はネクロトーシスを起こし、排除されることを示した。対照的に、RasV12 変異を有している上皮層中に p53 変異が起こると、p53 変異細胞のほとんどは生存し、上皮層内にとどまることが分かった。さらに、RasV12 発現細胞は、正常上皮層または p53 変異を有する上皮層のいずれかからも頂端側への逸脱によって排除されることが判明した。これらの結果から、発癌性の変異が起こる順序は細胞競合が起こるか否かに大きく影響する可能性があることを示唆しており、それによって発がんの進行を調節していると考えられる。p53 変異細胞の挙動と運命が、Ras や他の発癌性変異が既に起こっている状況下でどのように変化していくのかは今後も検討が必要であろう。

### 3.6. 参考文献

1. Hogan C, et al. (2009). Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* 11(4):460-467.
2. Kajita M, et al. (2010). Interaction with surrounding normal epithelial cells influences signalling pathways and behaviour of Src-transformed cells. *J. Cell Sci.* 123(Pt 2):171-180.
3. Jody R, Martin C.R and Louise P.C (2001). An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-independent mechanism. *Curr. Biol.* 11(23):1847-1857.
4. Hezel A.F, et al. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 20(10):1218-1249.
5. Kinzler, K.W and Vogelstein B (1996). Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-170.
6. Maitra A, et al. (2003). Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod. Pathol.* 16(9):902-912.
7. Murakami Y, et al. (1991). Aberrations of the tumor suppressor p53 and retinoblastoma genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Res.* 51(20):5520-5525.
8. Schlomm T, et al. (2008). Clinical significance of p53 alterations in surgically treated prostate cancers. *Mod. Pathol.* 21:1371-1378.
9. Vogelstein B, et al. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319:525-532.
10. Walther, A, et al. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9:489-499.

11. Kunz-Schughart L.A and Knuechel R. (2002). Tumor-associated fibroblasts (Part I): active stromal participants in tumor development and progression? *Histol Histopathol* 17:599-621.

第 4 章：  
総括

## 4.1. 結論

本研究において、我々は発癌の過程において、p53 変異ががん初期では希少な要因と多段階発癌における遺伝子変異の規則性に関して細胞競合の観点から興味深い知見を得た。第一に、正常細胞層に p53 変異が生じると、細胞競合により p53 変異細胞は細胞死により細胞層から基底膜側へ排除された。第二に、RIPK1 と RIPK3 の阻害剤の添加による効果により、p53 変異細胞はネクロプトーシスにより基底膜側へ排除された。第三に、マウス腸管オルガノイドにおいても、同様に正常上皮細胞に囲まれた p53 変異細胞が基底膜側へ排除され、RIPK1 の阻害剤によりネクロプトーシスによる排除が有意に抑えられた。第四に、ミオシンをラベルした MDCK 細胞を用いたタイムラプスイメージングと Blebbistatin の添加により、p53 変異細胞が排除される際には、周囲の正常細胞でミオシンが集積し、ミオシンリング状の構造を形成し、物理的な力で排除されていた。第五に、MMP の阻害剤により p53 変異細胞のネクロプトーシスは抑えられた。第六に、RasV12 変異を有する細胞層に p53 変異を誘導すると、細胞競合によって RasV12 と p53 変異の両方を有する細胞が排除されず、細胞層に留まっていた。第七に、変異の入る順番を逆にし、p53 変異を有する細胞層に RasV12 変異を誘導すると、細胞競合により p53 変異と RasV12 を両方有する細胞は頂端側へ排除された。これらの結果をまとめると、正常な上皮層に p53 変異が生じると細胞競合によりネクロプトーシスにより排除されることが普遍的に起こることで、発癌初期に変異が見られず、多段階発癌と言われる変異の順番に変異が誘導されると細胞競合が起こらず、癌化していくということが示された。

ただし、詳しい分子メカニズムは不明のままである。本研究で明らかとなった分子メカニズムは以下の点である(Fig. 4-1)。(1) 正常細胞と隣接している時にのみ、p53 変異細胞がネクロプトーシスをするが、ネクロプトーシスを誘導する上流因子は TNF- $\alpha$  以外である。(2) p53 変異細胞が基底膜側へ逸脱するのは正常細胞側のミオシンの集積により起こり、MMP の存在が p53 変異細胞のネクロプトーシスによる基底膜側への逸脱に寄与している可能性がある。

本研究による発見は、細胞競合が発癌過程の変異の順番の制御に寄与しているという新しい知見を提供し、発癌の初期段階における未知の現象にも光を当てた。そのため、本研究は、腫瘍学、細胞生物学、および発生生物学の研究に貢献している。p53変異を介したネクロトーシスの機能的意義と分子メカニズムの解明を進めることで、新しいタイプのがん予防薬や治療薬の開発が期待される。さらに、p53変異細胞の挙動と運命が、Rasや他の発癌性変異が既に起こっている状況下でどのように変化していくのかを検討していくことで発癌過程の解明に繋がることが期待される。

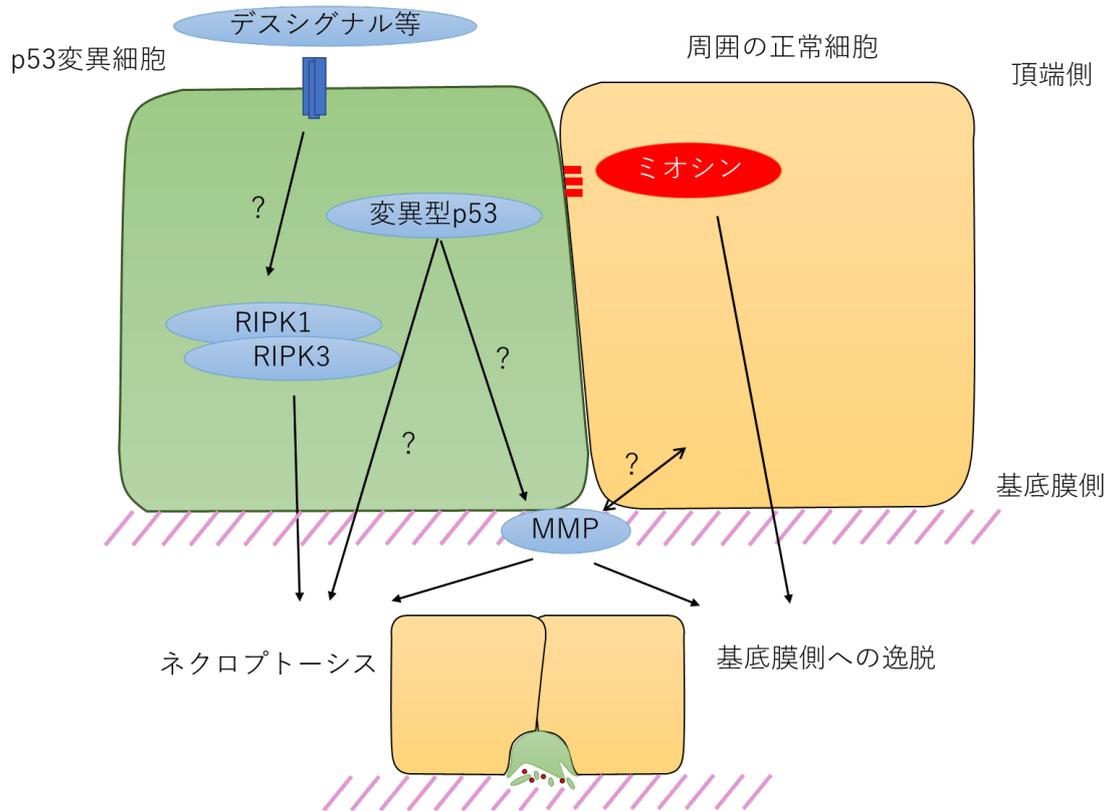


Figure 4-1. p53 変異細胞と隣接する正常細胞との細胞競合時の分子メカニズムの概略モデル。p53 変異細胞が正常細胞に囲まれると、RIPK1、RIPK3 が活性化し、ネクロプトーシスを誘導し、正常細胞中にミオシンが集積することで、p53 変異細胞の基底膜側へ逸脱が誘導される。

## 謝辞

本研究に当たり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました藤田恭之教授（現 京都大学 教授）、昆俊亮先生（現 東京理科大学 講師）には深く感謝いたします。先生方のご指導のおかげで、大いに成長することができたと感じています。

また、私の論文の主査と副査の先生である坂口和靖教授、村上洋太教授、大利徹教授、石森浩一郎教授にも深く感謝いたします。

また、本論文は研究の遂行に当たりご助力いただいた石橋公二郎博士、HPDE6 細胞の提供していただいた Dr. Ming-Sound Tsao (University Health Network)、p53 ノックアウト MDCK 細胞の提供していただいた Dr. Eugenia Piddini (University of Bristol)にも感謝いたします。

正常上皮細胞と p53 変異細胞間に生じる  
細胞競合を制御する分子メカニズムの研究

渡邊 裕貴

北海道大学大学院総合化学院

2022