

三次元培養法を用いた活性型 **Ras** が
誘導する上皮構造破綻メカニズムの解析

櫻井 敦朗

目次

要 旨	2
第一章 序論	3
1-1 Ras	4
1-2 タンパク質の発現誘導システム	4
1-3 三次元培養	5
第二章 材料と方法	6
2-1 プラスミドと抗体	7
2-2 細胞培養	7
2-3 安定発現株の樹立	9
2-4 ウエスタンブロットティング	9
2-5 免疫染色	9
2-6 FACS	10
2-7 MDCK の三次元培養	10
2-8 核の染色	10
2-9 共焦点 FRET イメージング	10
2-10 共焦点蛍光イメージング	11
第三章 結果	12
3-1 TIR1 と AID-KRasV12 を発現する MDCK 細胞株の樹立	13
3-2 KRasV12 によるシスト形成阻害	16
3-3 Ras の活性化による内腔への細胞運動	17
3-4 KRasV12 の発現による均一な ERK の活性化	19
3-5 活性型 Ras が誘導する形態変化を引き起こすシグナル経路	21
3-6 形態変化における PI3K 経路の役割	23
3-7 Ras の活性化による細胞周期の亢進	25
第四章 考察とまとめ	27
4-1 管腔内で細胞が充満する機構	28
4-2 ERK と AKT のクロストーク	28
4-3 三次元環境における細胞周期の制御	29
4-4 三次元環境における Raf の役割	29
4-5 まとめ	30
参考文献	31
謝辞	36

要旨

癌遺伝子 **KRas** の恒常活性型変異は膵臓癌をはじめとする多くのヒトの癌で観察される。そして、**KRas** の恒常活性型変異は癌の無限増殖と単層上皮の重層化という形態変化の原因と考えられている。しかしながら、**KRas** が **ERK** 経路を介して細胞増殖を誘導するという事はよく調べられているが、どのようにして形態変化を誘導するかはいまだ不明なことが多い。本研究では、恒常活性型の **KRas** が誘導する癌における形態変化がどのようにして生じるのかを調べた。極性を有する単層上皮組織のモデルとして、三次元環境下で培養された MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) 細胞の管腔構造を用いた。オーキシン依存的な恒常活性型 **KRas** タンパク質発現システムを MDCK 細胞に導入し、恒常活性型 **KRas** の有無による形態変化を観察した。**KRas** の恒常活性型変異である **KRasV12** を発現する MDCK 細胞は、プラスチック培養皿の二次元環境においては、正常細胞と比べて形態的に変化はなかった。しかしながら、細胞外基質のゲル内という三次元環境下では **KRasV12** 発現細胞は、正常細胞とは異なり管腔構造を形成しなかった。さらに、管腔構造が形成された後に、**KRasV12** の発現を誘導すると、管腔を構成していた細胞が内腔へ移動し、内腔が細胞で満たされることが分かった。この過程において、内腔へ移動する細胞の細胞極性が崩壊することを見出した。また、細胞周期をモニターする蛍光プローブを用いたライブイメージングによって、**KRasV12** の発現が細胞周期を亢進させることを見出した。阻害剤実験の結果から、内腔での細胞の充満と細胞周期の亢進には、**ERK** 経路と **PI3** キナーゼ(**PI3K**)経路の両方が必要であることが分かった。さらに変異体を用いた実験により、**ERK** 経路の活性化が内腔への移動の最初の段階を誘導しており、**PI3K** 経路は内腔へ移動した細胞の細胞死を抑制していることが明らかとなった。これらの結果から、**ERK** 経路と **PI3K** 経路は共に細胞周期の亢進を誘導しており、さらに細胞の内腔への移動と生存という異なる働きをそれぞれが担うことで、活性型 **KRas** が上皮構造の形態変化を誘導することが明らかとなった。

第一章

序論

1-1 Ras

癌遺伝子 Ras は KRas、HRas、NRas の 3 つの遺伝子からなる。その中でも KRas はヒトの癌で最も高頻度に変異が観察され、この活性型変異は癌発生に大きな役割を負っていると考えられる。KRas 変異の中で、12 番目のコドンのグリシンがアスパラギン酸あるいはバリンに置換される変異は最も数が多いものの一つで、この変異により KRas は恒常活性型になり、下流にある情報伝達因子群に信号を伝え続ける(1)。

KRas の変異は様々な臓器において生じている。例えば、KRas の恒常活性型変異は膵臓癌の 90%以上、大腸癌の 50%以上、肺癌の 25%以上で観察される。一方、卵巣癌や、乳癌では基本的には KRas の変異が見られない(2)。これらに対応して、ノックインマウスを用いた研究では、KRas の変異による腫瘍性細胞増殖は、細胞の環境に依存するということが示されている(3)。

KRas 遺伝子の癌化における役割は膵管腺癌(PDAC)でよく研究されている(4)。現在、PDAC には PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia)と呼ばれる多段階的な前駆病変があることがわかっている。PDAC に進行する過程におけるそれぞれの PanIN の段階で、癌遺伝子や腫瘍抑制遺伝子に高頻度に変異が生じる。例えば、KRas (90%-100%)、p16INK4a (90-95%)、p53 (50-85%)、DPC4/SMAD4 (50%)、BRCA2 (10%)の変異が観察される。これらの変異の中で、KRas の変異はもっとも初期の段階で生じる変異である。同様の多段階的な遺伝子変異の蓄積は大腸癌でも見られる(5)。これらの知見は、上皮組織の癌化に KRas は非常に重要な役割を果たすことを示唆している。

1-2 タンパク質の発現誘導システム

大部分のヒトの癌においては、KRas の変異は遺伝ではなく、後天的に生じるものである。そのため、KRas の恒常活性型変異が癌形成に与える影響を調べるためには、恒常活性型変異体の KRas を発現誘導するか、もしくは KRas を誘導的に活性化させる必要がある。例えば、エストロゲン受容体(ER)と Ras の融合タンパク質を用いたシステムが知られている(6)。このシステムでは ER と Ras の融合タンパク質を作成し、エストロゲンのアナログである 4-hydroxytamoxifen (4-HT)を加えることで、Ras が活性化されるようになっている。この系においては、KRas の 3 つの主要なエフェクター分子のうち Raf は活性化できるが、PI3K および RalGDS は活性化できず、KRas のすべての効果を反映できない。

タンパク質発現をコントロールする系としては、テトラサイクリン依存的に転写を活性化する誘導システムや植物ホルモンのオーキシンを介したユビキチン化によるタンパク質の分解を誘導するシステムなどが知られている。本研究では後者のシステムを用いるので、簡単に紹介する。植物細胞内で、AID (Auxin inducible degron)タンパク質はオーキシン依存的に F-box タンパク質である TIR1 と結合し、ユビキチン化される(7)。その後、ユビキチン化された AID タンパク質はプロテアソームによる分解を受ける。

そのため、目的とするタンパク質を AID との融合タンパク質として動物細胞内で発現させると、オーキシン依存的に目的とするタンパク質の分解が誘導される。

1-3 三次元培養

これまでの癌研究の多くはプラスチック培養皿上の非常に硬い基質の上で行われてきた。しかし、生体内では、細胞は柔らかな基質で囲まれ、立体的な組織を形成するため、細胞の周りの環境が培養細胞と生体内では大きく異なる。その環境の違いにより、培養皿上と生体内では癌細胞の動態が大きく異なることが指摘されている(8)。このギャップを埋めるために、近年、より生体内の環境に近いゲル中で細胞を培養する三次元培養法が頻用されるようになった。三次元培養法においては、特に、上皮細胞が管腔構造を形成するメカニズムに注目が集まっている。代表的モデルとしては、イヌ尿細管由来の MDCK 細胞がマトリゲル中で構成する管腔構造(シスト)が知られている(9, 10)。この三次元培養条件において、MDCK 細胞はエキソサイトーシスと膜分離による”hollowing”という仕組みで内腔を形成する。一方、コラーゲンゲル中の MDCK 細胞や、ヒトの乳腺由来の MCF10A 細胞(11)では、管腔の内腔は細胞の脱落によって生じる。つまり、細胞集塊の中心部において細胞が細胞死を起こすことにより内腔が形成されるという違いがある。さらに、ヒトの大腸癌由来の Caco-2 細胞や、ゼブラフィッシュの消化管、神経管では、複数の内腔が癒合し、一つの内腔が生じる(12, 13)。また、膵臓の正常組織と癌組織由来の細胞株をゲル中で培養すると、スフェロイドが形成されることなども分かっているが(14-16)、その構造がどうやってできるのかは十分には分かっていない。すなわち、管腔構造を始めとする立体構造を形成するメカニズムは細胞の種類や条件により様々である。

第二章

材料と方法

2-1 プラスミドと抗体

AID システムで用いるベクターは BioROIS 株式会社から購入した。TIR-9myc 配列を表 1 に示すプライマーを用いて PCR で増幅し、pCX4puro、pCX4neoDX レトロウイルス発現用ベクターに組み込んだ(17)。同様に AID 配列を表 1 に示すプライマーを用いて PCR で増幅し、pCX4bsr ベクターに組み込み、pCX4bsr-3HA-AID-AID を作成した。本研究で使用した KRas、Ral、MEK の変異体は表 1 に示すプライマーを用い、PCR で変異を導入し、増幅したのちに、このベクターに組み込んだ。ERK 活性をモニターする FRET バイオセンサーは(18)で使用したプラスミドを用いた。Caspase-3 の活性をモニターする FRET バイオセンサー(19)の CFP と Venus はそれぞれ Venus と mCherry に置換し、pCX4neoDX ベクターに組み込んだ(SCAT3)。頂端部及び基底側部マーカーの GPI-mCherry と GFP-Syntaxin4 は pCX4neoDX ベクターに組み込んだ(20)。Fucci に用いたプラスミド、CSII-EF-MCS-mCherry-hCdt と CSII-EF-MCS-Venus-hGem は理研の宮脇敦博士から供与された(21)。

本研究で用いた抗体を以下に示す。1 次抗体として、anti-myc (Santa Cruz 社)、anti-HA (Roche 社)、anti-pan-Ras (Calbiochem 社)を用いた。2 次抗体として、IRDye 800CW あるいは IRDye 680 (Li-COR 社)をウエスタンブロッティングに用い、Alexa488 で標識した anti-rat IgG 抗体(Molecular Probe 社)を免疫染色に用いた。

2-2 細胞培養

イヌ腎臓上皮細胞・MDCK 細胞 (RCB0995、理化学研究所バイオリソースセンターより入手) は、10%FBS、100 unit/ml ペニシリン/ 100 µg/ml ストレプトマイシン (ナカライテスク社)、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウムを含んだ Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO 社) により、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。レトロウイルス産生細胞・BOSC23 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FBS)、100 unit/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (ナカライテスク社) を含んだ Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose (Sigma-Aldrich 社) により、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。

表 1 使用したプライマー

Primer name	
TIR forward	GAATTCATGACGTA CT TCCCGGAGGAGGTG
TIR reverse	CTCGAGGCTCTCGTCGGACACCACCATCCG
EcoRI-AID forward primer	GAATTCATGGGCAGTGTCGAGCTGAATCTG
XhoI-AID reverse primer	CTCGAGAGCTCTGCTCTTGCACTTCTCCAT
XhoI-AID forward primer	CTCGAGATGGGCAGTGTCGAGCTGAATCTG
NotI-AID reverse primer	GCGGCCGCTCAAGCTCTGCTCTTGCACTTC
KRas forward primer	GCCCGGGCTCGAGATGACTGAATATAAAC
KRas reverse primer	GCGGCCGCTTACATAATTAC
KRasV12 mutation forward primer	GTGGTAGTTGGCGCCGTTGGCGTAGGCAAG
KRasV12 mutation reverse primer	GCCTACGCCAACGGCGCCA ACT ACCACAAG
T35S forward primer	CGAATATGATCCATCAATAGAGGATTCC
T35S reverse primer	GGAATCCTCTATTGATGGATCATATTCG
E37G forward primer	GATCCAACAATAGGGGATTCCTACAGG
E37G reverse primer	CCTGTAGGAATCCCCTATTGTTGGATC
Y40C forward primer	CAATAGAGGATTCCTGCAGGAAGCAAG
Y40C reverse primer	CTTGCTTCCTGCAGGAATCCTCTATTG
MEK1 forward primer	CTCGAGATGCCCAAGAAGAAGCCGAC
MEK1 reverse primer	GCGGCCGCCGACGCCAGCAGCATGGG
MEK1 mutation forward primer	CTCATAGACGACATGGCAAATGAGTTTGTGGGAC
MEK1 mutation reverse primer	GTCCCAACAAACTCATTTGCCATGTCGTCTATGAG
RalA forward primer	CTCGAGATGGCTGCAAATAAGCCCAAG
RalA reverse primer	GCGGCCGCTTATAAAATGCAGCATC
RalA mutation forward primer	GATACAGCAGGTCTAGAAGACTACGC
RalA mutation reverse primer	GCGTAGTCTTCTAGACCTGCTGTATC

2-3 外来遺伝子安定発現細胞株の樹立

レトロウイルス発現用ベクター、白血病ウイルスの構造蛋白質 gag-pol をコードする pGP、および水泡性口内炎ウイルス Vesicular stomatitis virus (VSV)のエンベロープタンパク質 VSV-G をコードするプラスミド[pMD-G(22)または pCMV-VSV-G-RSV-Rev(それぞれジュネーブ大学 Trono 博士と理研宮脇敦博士より供与)]を 293 fectin (Invitrogen 社)を用いて BOSC23 細胞にトランスフェクションした。産生されたレトロウイルスを用いて、まず、TIR1-9myc 遺伝子を MDCK 細胞に導入し、ピューロマイシンあるいはネオマイシンによる薬剤選択後に高発現株をクローニングした。この細胞を以下 MDCK-TIR1 細胞と呼ぶ。次に、各種 3HA-AID 付加タンパク質遺伝子を MDCK-TIR1 細胞にレトロウイルスで同様に導入した。また、細胞極性マーカー遺伝子および細胞死バイオセンサー—SCAT3 も同様にレトロウイルスを用いて導入した。

細胞周期を可視化するプローブ Fucci の遺伝子は、レンチウイルスを用いて以下のように導入した。CSII-EF-MCS-mCherry-hCdt あるいは CSII-EF-MCS-Venus-hGem を、pCAG-HIVgp と pCMV-VSV-G-RSV-Rev とともに BOSC23 細胞にトランスフェクションし、ウイルスを作成した。実験によっては、RetroX (Clontech 社)を用いてウイルスを濃縮した。これらのウイルスを MDCK-TIR1 細胞に感染後、FACS により蛍光タンパク質発現細胞を選別した。

ERK バイオセンサーを安定発現する MDCK 細胞を樹立するために、発現ベクターを Tol2 システムによって導入した(23)。数日後、蛍光を発する細胞を FACS で選別した。

2-4 ウェスタンブロットティング

細胞を 1x SDS バッファー[62.5 mM Tris-HCl (pH6.8), 12% グリセロール、2% SDS、0.004% BPB、10% 2-メルカプトエタノール]で溶解した。溶解したサンプルを超音波で破碎したのちに、5-20%のポリアクリルアミドゲル (オリエンタルインスツルメンツ社)による SDS-PAGE に供してタンパク質を分離した。PVDF 膜 (Immobilion-FL, Millipore 社)に分離したタンパク質をトランスファーした後に、PVDF 膜を Odyssey blocking buffer (LI-COR 社)で 1 時間ブロッキングした。その後、PVDF 膜を Odyssey blocking buffer と PBS の混合液で 1:2000 の割合で希釈した一次抗体で処理し、続いて二次抗体で処理した。メンブレンを Odyssey IR scanner を用いてスキャンし、Odyssey イメージングソフトウェアで解析した。

2-5 免疫染色

35 mm 径のガラスボトムディッシュ上に細胞を撒き、NAA 含有、あるいは非含有の培地中で 48 時間培養した。細胞を 4% パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて 20 分

間室温で固定し、10 分間室温で 0.1% TritonX-100 処理をした。5% ウシ血清アルブミンでブロッキングした後に、サンプルを 4°C で 30 分間、1:500 で希釈した抗 HA 抗体と 1:1000 で希釈した Alexa Fluor 568 phalloidin (Molecular probes 社) で処理した。続いてサンプルを Alexa488 が結合した抗ラット IgG 抗体と共にインキュベートした。細胞の画像を FV1000 共焦点顕微鏡 (Olympus 社) で取得した。切断型 caspase3 の染色のために、4% PFA を用いて MDCK 細胞を 4°C で一晩固定した後に、30 分間室温で 0.25% TritonX-100 処理をした。PBS で細胞を洗浄し、0.025% サポニンを含む 0.7% フィッシュゼラチンで 20 分間ブロッキングを行い、1:100 に希釈した抗切断型 caspase3 抗体で一晩インキュベートした。二次抗体反応として Alexa fluor488 が結合した抗ウサギ IgG と共に 4 時間インキュベートした。これと同時に 1:500 に希釈した Hoechst33258 (Invitrogen 社) を加え、核を染色した。

2-6 FACS

蛍光タンパク質を発現する MDCK 細胞をトリプシン処理し、3% FBS を含む PBS で再懸濁したのちに FACS Aria II (BD BioScience 社) でソーティングした。青色レーザー (488 nm) と FITC チャンネルを FRET プローブと GFP、Venus の検出に用いた。緑色レーザー (561 nm) と PE チャンネルを mCherry の検出に用いた。

2-7 MDCK 細胞の三次元培養

MDCK のシストは以前の報告通りに作成した (20, 24, 25)。80 μ l のマトリゲル (BD Bioscience 社) を 13 mm 径のカバーガラス上で重合させ、7500 個の MDCK 細胞を加えた。細胞は 2% のマトリゲルを含む培地中で培養した。タイムラプス観察のために、5 日から 7 日培養したシストを PBS で洗浄し、1.25 mM EDTA/PBS 溶液を用いて氷上で一時間マトリゲルの脱重合を行った。シストを遠心して回収し、66% のコラーゲン (Cellmatrix Type I-A; 新田ゼラチン)、10% 再構成バッファー (新田ゼラチン)、24% の培地で構成されるコラーゲン溶液で懸濁した。35 mm ガラスボトムディッシュに懸濁液を乗せ、20 分間 37°C でインキュベートすることで、コラーゲンを重合化した。

2-8 核の染色

1:10000 で希釈した DyeCycle Green (Invitrogen) と 30 分間インキュベートすることで、マトリゲル上で培養した細胞の核を染色した。PBS で洗ったのちに、FV1000 共焦点顕微鏡を用いて細胞の画像を取得した。

2-9 共焦点 FRET イメージング

上述のようにシストをコラーゲンゲルに懸濁し、10% FBS、100 unit/ml ペニシリン

ン/100 µg/ml ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウムを含む CO₂-independent medium (Invitrogen 社)に培地を置き換えて、シストのタイムラプス観察を行った。画像は FV1000 共焦点イメージングシステム (Olympus 社)を備えた倒立型顕微鏡 IX81(Olympus 社)で取得し、レンズは UPlanSApo 20X 0.75 を用いた。共焦点絞りは 80 µm、解像度は 512x512 ピクセル、zoom factor は 2.0 とした。励起光は 440 nm、励起ダイクロイックミラーは 405-440/515、CFP チャンネル用の PMT (photomultiplier)のダイクロイックミラーは SDM510、分光範囲は 460-500 nm、FRET チャンネル用の PMT のダイクロイックミラーは mirror、分光範囲は 515-615 nm とした。SCAT3 イメージングには以下の条件を用いた。励起光は 488nm、励起ダイクロイックミラーは DM405/488/559、Venus チャンネル用 PMT ダイクロイックミラーは SDM560、分光範囲は 500-545nm、FRET チャンネル用 PMT ダイクロイックミラーは mirror、分光範囲は 570-670nm。

2-10 共焦点蛍光イメージング

GFP、mCherry、Venus、dKeima をイメージングするために共焦点スキャニングユニット FV1000 を備えた倒立型顕微鏡 IX81 を用い、レンズは UPlanSApo 20X 0.75 を使用した。共焦点絞りは 80 µm、解像度は 512x512 ピクセル、zoom factor は 2.0 とした。用いた励起光と蛍光フィルターは以下に示す。dKeima は 440 nm、GFP と DyeCycle Green は 488 nm、Venus は 515 nm、mCherry は 559 nm の励起光を用いた。励起ダイクロイックミラーは、DM405-440/515 を dKeima、DM405/488/559 を GFP、DyeCycle Green、Venus、mCherry のために用いた。GFP と Venus のための PMT ダイクロイックミラーは SDM560、mCherry と dKeima のための PMT ダイクロイックミラーは mirror を用いた。GFP チャンネルの分光範囲は 500-545 nm、Venus チャンネルの分光範囲は 530-545 nm、mCherry チャンネルの分光範囲は 570-670 nm、dKeima チャンネルの分光範囲は 515-615 nm とした。

第三章

結果

3-1 TIR1 と AID-KRasV12 を発現する MDCK 細胞株の樹立

成熟したシストで恒常活性型の KRas を発現させるために、AID (Auxin Inducible Degron) システムを用いた(7)。すでに述べたように AID システムでは、オーキシシンが、植物由来 F-box タンパク質の TIR1 に結合することで、AID 融合タンパク質のユビキチン化とそれに引き続くプロテアソームによる分解を誘導する(図 1)。まず、MDCK 細胞に TIR1 遺伝子発現レトロウイルスを感染させ、抗生物質で選択した。複数のクローンを作成し、ウエスタンブロッティングで TIR1 の発現量を調べ、最も発現量が高いクローンを MDCK-TIR1 細胞と命名し、以下の実験に用いた。同様に、AID-KRasV12 発現レトロウイルスを MDCK-TIR1 細胞に感染させ、薬剤で選択した。この細胞を MDCK-KRasV12 細胞と呼ぶ。

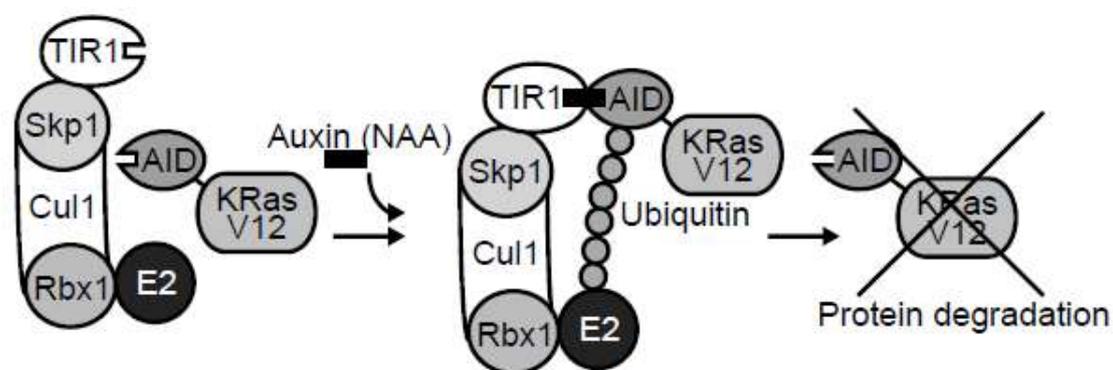


図 1. AID システムの概略図

AID タンパク質は植物ホルモンであるオーキシシン存在下で植物細胞に存在する F-box タンパク質 TIR1 と結合する。TIR1 と結合した AID タンパク質はユビキチン化され、プロテアソームによる分解を受ける。TIR1 と AID タンパク質に KRasV12 を付加したタンパク質を発現させることで、動物細胞内でオーキシシン依存的な KRasV12 発現システムを構築できる。

MDCK-KRasV12 細胞において、オーキシシン依存的に Ras タンパク質が分解されるか確かめた。オーキシシンとしては、1-naphthaleneacetic acid (NAA)を用いた(7)。MDCK-KRasV12 細胞を 50 μ M の NAA 存在下、あるいは非存在下で 24 時間培養した。NAA を含む培地から NAA を除去したのちに、NAA を含まない培地でさらに培養を続けた。その後、AID-KRasV12 の発現量をウエスタンブロッティングで定量した(図 2A)。解析する細胞の量は、TIR1 で標準化した。NAA で処理していないサンプルを基準として、NAA を除去したサンプルにおける AID-KRasV12 の発現量を求めた。3回の独立した実験を行った結果、NAA を含む培地で 24 時間培養することで、AID-KRasV12 タンパク質の発現量は平均して 7.5%となることがわかった。NAA を除去してから 1 時間後には発現量は 38%、3 時間後には 60%まで回復した。これらの結果は MDCK 細胞内で AID-KRasV12 の発現を NAA 依存的に操作することがで

きることを示している。AID 付加タンパク質の発現に最適な NAA の濃度を調べ、以下の研究では 50 μ M NAA を加えることにした(図 3)。

外因性と内因性の Ras タンパク質の発現量を比べるために、MDCK-KRasV12 細胞を抗 pan-Ras 抗体によるウエスタンブロッティングに供した(図 2B)。3 回の独立した実験を行い、AID-KRasV12 の発現量は平均で内因性の 2.0 ± 0.53 (平均 \pm 標準偏差)倍となった。従って、ほぼ生理的な発現量で活性型 KRas の効果を見ることができるといえる。さらに KRasV12 の局在場所と KRasV12 が及ぼす細胞形態への影響を調べた。MDCK-KRasV12 細胞を NAA 存在下あるいは非存在下で 2 日間培養し、ほぼ密集した状態で F-アクチンと結合するファロイジンで染色した(図 2C)。予想された通り、AID-KRasV12 は形質膜に局在した。しかし、KRasV12 の発現によって、アクチン細胞骨格の形態的な変化は観察されなかった。この結果は、細胞を高密度で培養したときには、KRasV12 の発現が細胞間接着の消失を誘導しないという以前の報告(26)と合致する。

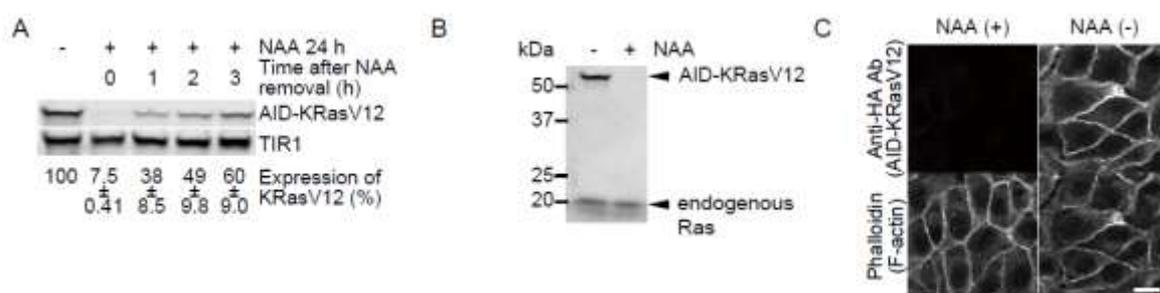


図 2. AID-KRasV12 を発現する MDCK 細胞株の樹立

(A) AID-KRasV12 遺伝子を導入した MDCK 細胞を 50 μ M の NAA 含有あるいは非含有の培地で 24 時間培養した。その後 NAA を除去し、細胞を図に示す時間、さらに培養し、SDS-PAGE とウエスタンブロッティングに供した。ウエスタンブロッティングでは AID-KRasV12 と TIR1 を検出するために、それぞれ抗 HA 抗体と抗 myc 抗体を用いた。細胞数は TIR1 で標準化した。NAA を除去したサンプルを基準として NAA 処理していないサンプルにおける AID-KRasV12 の発現量を求めた。下に示す数値は 3 回の独立した実験の平均値と標準偏差である。(B) MDCK-KRasV12 細胞を 24 時間 NAA 処理し、SDS-PAGE と抗 pan-Ras 抗体によるウエスタンブロッティングに供した。(C) MDCK-KRasV12 細胞を NAA 存在下、非存在下で 48 時間培養した。その後、4% PFA で固定し、抗 HA-抗体による免疫染色を行った。2 次抗体は Alexa488 が結合した抗ラット IgG 抗体を用い、同時に Alexa568 が結合したファロイジンを用い、アクチン細胞骨格を可視化した。画像は共焦点顕微鏡で取得し、スケールバーは 20 μ m を示す。

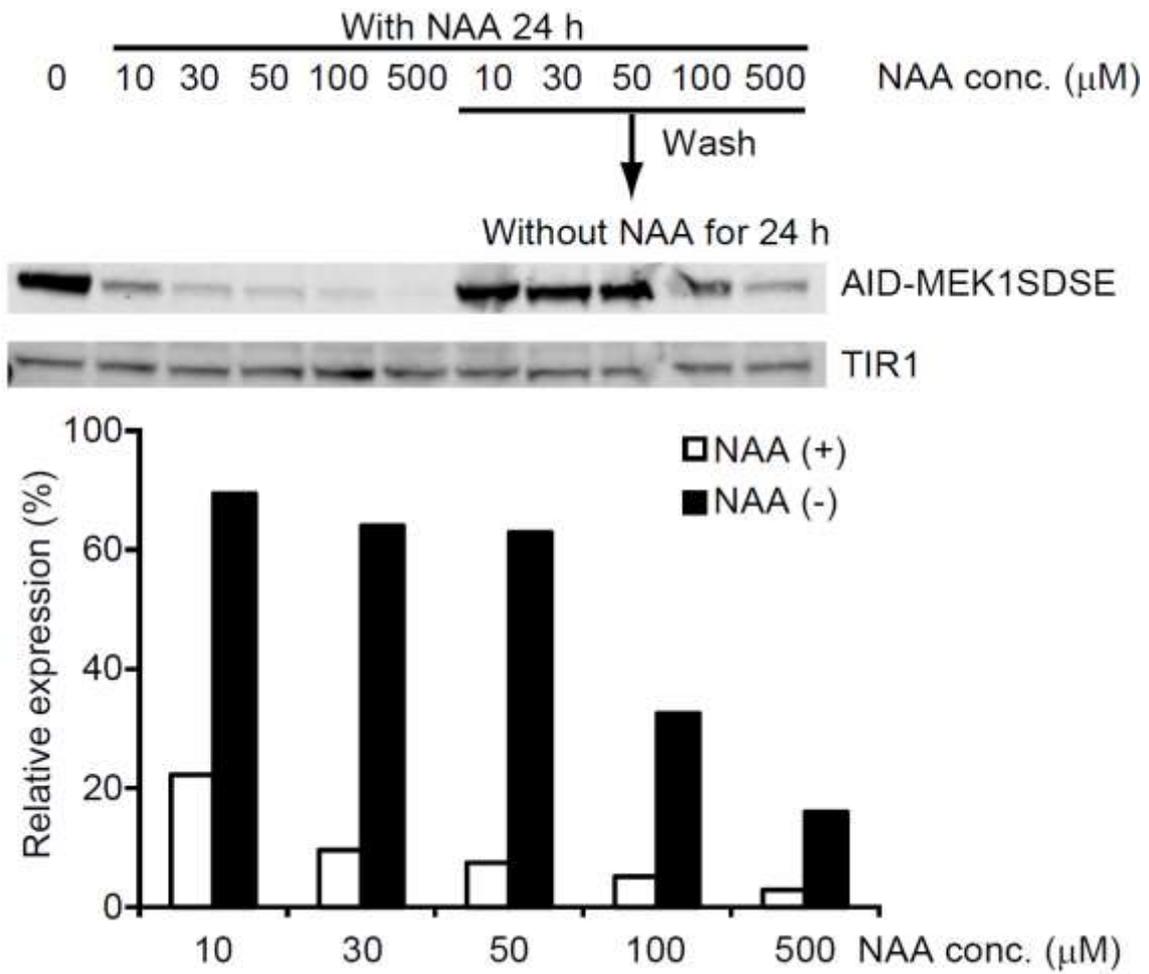


図 3. AID-MEK1SDSE の NAA 濃度依存的誘導発現

3HA-AID-MEK1SDSE を発現する MDCK 細胞を図に示す NAA の濃度で 24 時間培養した後に、NAA を除去し、NAA 非存在下でさらに 24 時間培養した。その後、ウエスタンブロッティングに供し、MEK1SDSE の発現量を定量した。

3-2 KRasV12 によるシスト形成阻害

次に KRasV12 がシスト形成に与える影響を調べた。MDCK-KRasV12 細胞を NAA 存在下あるいは非存在下で、7 日間マトリゲル上で培養を行い、生細胞の核を DyeCycle Green で染色した。図 4A 左で示すように、NAA 存在下で MDCK-KRasV12 細胞を培養すると、以前の報告通り(20)に中心に内腔を持つ球状のシストができた。一定の割合のシストで、内腔に少数の細胞が観察されたが、この細胞は核が DyeCycle で染色されなかったため、死細胞であると判定された。対照的に MDCK-KRasV12 細胞を NAA 非存在下(図 4A 右)で培養すると、多くの細胞が内腔を充満させた構造を形成した。内腔の細胞は DyeCycle で染まったことから生きた細胞であると判定された。このことは KRasV12 の発現が正常な内腔形成を妨げていることを示唆している。

上記のような生きた細胞が多数内側に存在するシストを異常なシストとして定量化した。NAA 存在下あるいは非存在下でマトリゲル上での培養を 7 日間行い、正常なシストと異常なシストの数を DIC 画像から求めた。図 4B に示すように、NAA 存在下では 30.3%が異常なシストを形成したのに対し、NAA 非存在下では 95.4%ものシストが異常なシストであった。生体内の癌では、すでに極性を有する上皮細胞に

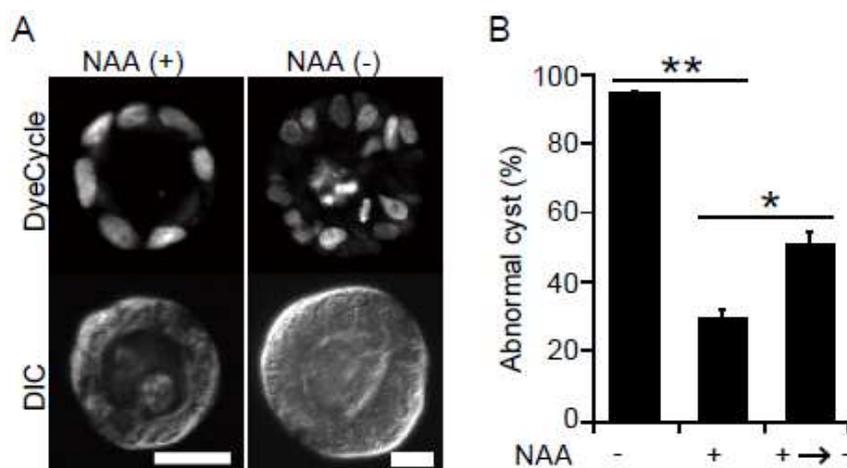


図 4. KRasV12 の発現によるシスト形成阻害

(A) MDCK-KRasV12 細胞をマトリゲル上で NAA 存在下、非存在下で 7 日間培養し、核を DyeCycle Green で染色した。スケールバーは 20 μm を示す。(B) MDCK-KRasV12 細胞を NAA 存在下、非存在下でマトリゲル上で 7 日間培養した。NAA 存在下で形成したシストは PBS で洗ったのちに、NAA 非存在下でさらに 2 日間培養した(+ → -)。シストを微分干渉顕微鏡で観察し、異常なシストの割合を求めた。グラフは 3 回の独立した実験の平均値を標準偏差と共に記したものである。スチューデントの等分散の 2 標本を対象とする t 検定により算出した P 値が 0.05 より低い場合に*、0.01 より低い場合に**を示した。

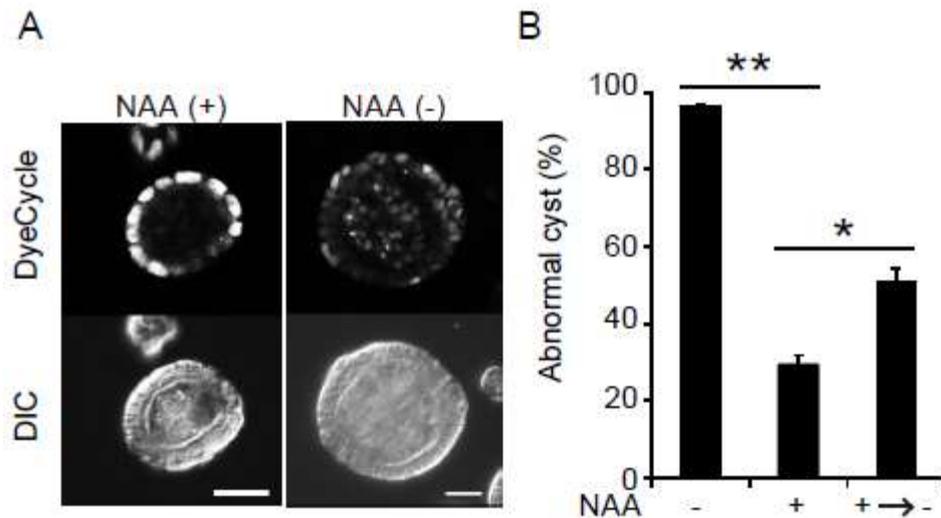


図 5. HRasV12 の発現によるシスト形成阻害

(A) MDCK-HRasV12 細胞をマトリゲル上で NAA 存在下、非存在下で 7 日間培養し、核を DyeCycle Green で染色した。スケールバーは 20 μm を示す。(B) MDCK-HRasV12 細胞を NAA 存在下、非存在下でマトリゲル上で 7 日間培養した。NAA 存在下で形成したシストは PBS で洗ったのちに、NAA 非存在下でさらに 2 日間培養した(+→-)。シストを微分干渉顕微鏡で観察し、異常なシストの割合を求めた。グラフは 3 回の独立した実験の平均値を標準偏差と共に記したものである。スチューデントの等分散の 2 標本を対象とする t 検定により算出した P 値が 0.05 より低い場合に*、0.01 より低い場合に**を示した。

Ras の変異が生じ、Ras が活性化する。この過程を模倣するために、シストが形成されたのちに KRasV12 の発現誘導を行った。NAA 存在下で MDCK-KRasV12 細胞を 7 日間マトリゲル上で培養し、シストを形成させた。その後 KRasV12 を発現させるために、NAA 非存在下で更に 2 日培養した。NAA を除去することで、51.4%のシストが異常なシストになった。これらの結果から、Ras の活性化は成熟した上皮構造の乱れも誘導できるということが分かった。他の活性型 Ras タンパク質である HRasV12 を発現させても KRasV12 と同様の結果を得られた(図 5)。

3-3 Ras の活性化による内腔への細胞運動

所属研究室では以前に頂端部での Rac1 の活性化が細胞極性を消失させて細胞分裂軸の異常を誘導し、内腔が細胞で埋まるという報告をした(20)。Ras の活性化が Rac1 の活性化と同様の様式で内腔での細胞の蓄積を誘導するのかを調べた。赤色蛍光タンパク質である Keima と HistonH1 の融合蛋白質(H1-Keima)を MDCK-KRasV12 細胞に導入し、共焦点顕微鏡を用いてタイムラプス観察した(図 6A)。観察の結果、成

熟したシストで **KRasV12** が発現すると、**Rac1** の活性化による形態変化とは異なり、細胞分裂軸の異常を伴わずに細胞が内腔へ移動することが分かった。次に、シストの上皮極性を頂端部マーカーの **GPI-mCherry** と基底側部マーカーの **GFP-Syntaxin4** で調べたところ、頂端部が壊れた箇所から細胞が内腔へ移動する様子が観察できた (図 6B)。また、内腔へ移動する細胞では、頂端部マーカーが消失し、基底側部マーカーが形質膜全体に局在した。このことは内腔へ移動する細胞では極性が消失しているということを示唆している。以上の結果から、**KRasV12** の発現による内腔への細胞移動は **Rac1** の活性化の場合と異なり、細胞分裂軸の異常が生じず、極性が崩壊したことによる異常な細胞運動が原因だと考えられる。

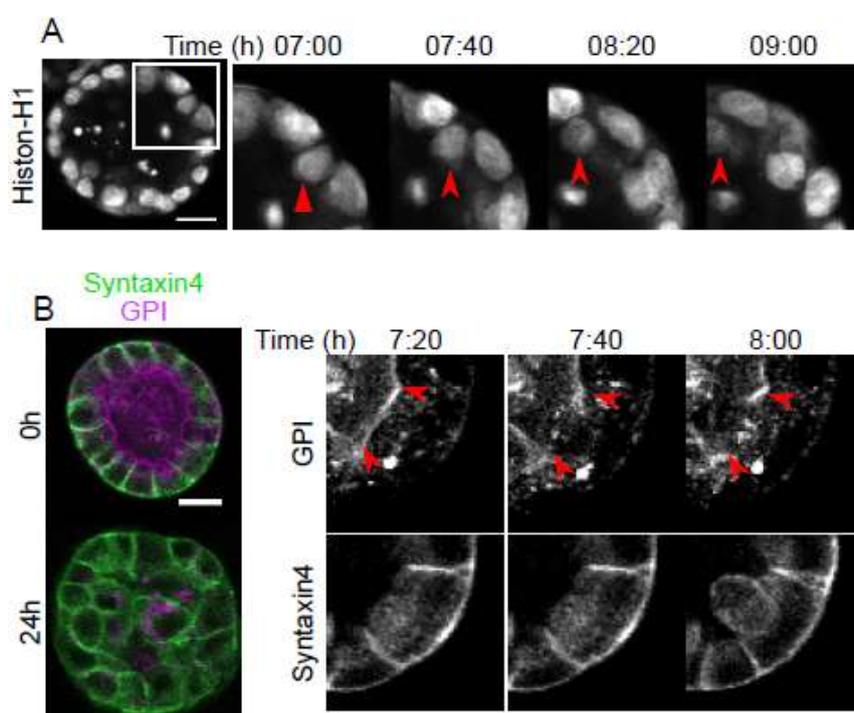


図 6. 内腔が埋まる過程のライブイメージング

(A) H1-Keima を発現する MDCK-KRasV12 細胞を NAA 存在下でマトリゲル上で 5 日間培養し、シストを形成させた。NAA 非存在下で、シストを、共焦点顕微鏡を用いて 24 時間タイムラプス観察した。矢頭は内腔へ移動する細胞を示す。スケールバーは 20 μm を示す。(B) 頂端部、基底側部マーカーはそれぞれ GPI-mCherry (マゼンタ) と GFP-Syntaxin4 (緑) を用いた。これらのマーカーを発現する MDCK-KRasV12 細胞のシストを、NAA 非存在下で共焦点顕微鏡を用いて 24 時間観察した。2 つの矢頭の間は頂端部が壊れた箇所を示す。スケールバーは 20 μm を示す。

3-4 KRasV12 の発現による均一な ERK の活性化

ERK は Ras の主な下流分子で、Ras-Raf 経路に位置しており、細胞増殖や分化を制御している(27)。内腔へ移動する細胞で ERK 活性が変化しているか調べるために、ERK の FRET バイオセンサーである EKAREV を用いた (図 7A)(18)。まず MDCK-TIR1 細胞に EKAREV バイオセンサーを導入し、続いて AID-KRasV12 を導入した。EKAREV バイオセンサーを発現する MDCK-KRasV12 細胞を NAA と共にマトリゲル上で培養し、7 日後に共焦点顕微鏡による 24 時間のタイムラプス観察を行った(図 7B)。NAA を除去する前は、ERK 活性はシストを構成する細胞間で不均一であるが(図 7B 左)、数時間後には内腔の細胞やシストを構成している細胞の両方で均一な ERK 活性の上昇が見られた。定量的な解析を行うと、ERK 活性が徐々に上昇するということが分かった(図 7C)。これらの結果は、ERK 活性は成熟したシストでは不均一であり、Ras の活性化がシスト全体で起こることで ERK の不均一な活性が崩れるということを示唆している。また、内腔の細胞の ERK 活性はシストを構成する細胞の ERK 活性と同等であった。このことは上皮構造における不均一な ERK 活性が正常構造を保つために必要であり、ERK 活性の不均一性の崩壊が形態変化の一端を担うことを示唆している。

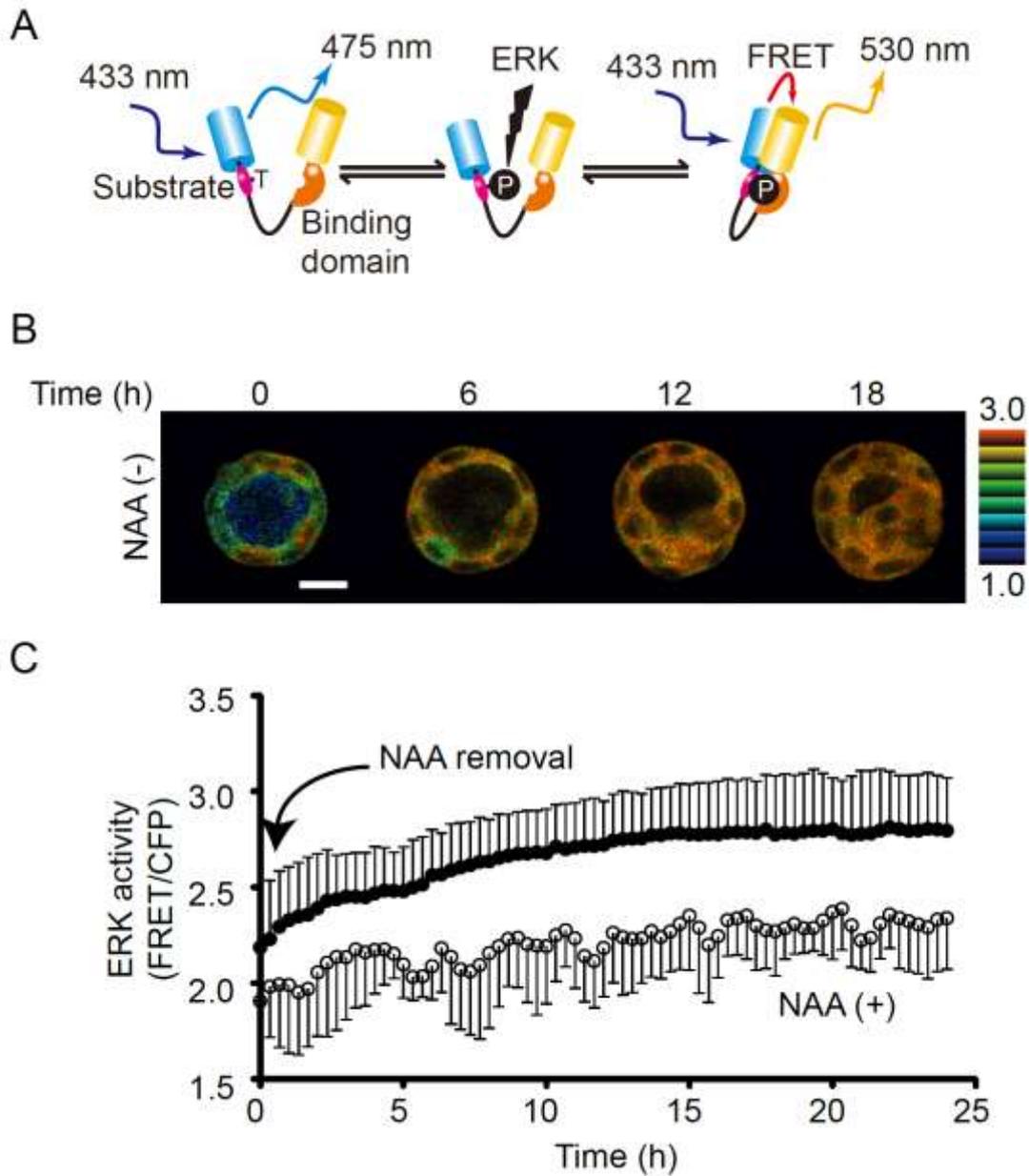


図 7. EKAREV を発現するシストのライブイメージング

(A)EKAREV バイオセンサーの概略図(B)EKAREV を発現する MDCK-KRasV12 細胞のシストを NAA 非存在下で共焦点顕微鏡を用いて 24 時間タイムラプス観察した。バックグラウンドを引いたのちに、FRET/CFP 画像を MetaMorph ソフトウェアで作製した。算出された FRET 効率を IMD (Intensity-modulated display)モードで表した。スケールバーは 20 μm を示す。(C)シスト全体の FRET/CFP ratio を、メタモルフソフトウェアを用いて計算した。○は NAA を加えたシスト(n=8)、●は NAA を除去したシスト(n=13)の FRET/CFP を示す。

3-5 活性型 Ras が誘導する形態変化を引き起こすシグナル経路

次に、KRasV12 が誘導する形態変化の責任経路を調べた。細胞の癌化に關与する Ras の下流分子として、Raf、RalGEF、PI3K が明らかになっている。このうち Raf の下流の MEK の阻害剤、そして PI3K 阻害剤を用いることで、内腔での細胞の蓄積に対する Ras の下流分子の必要性を調べた。MDCK-KRasV12 細胞のシストができた後に、NAA 含有、非含有の培地に MEK 阻害剤あるいは PI3K 阻害剤を加えてさらに培養した。PD184352 は MEK、LY294002 は PI3K の阻害剤である(図 8A)。図 8B に示すようにいずれの阻害剤でも内腔での細胞の蓄積が抑えられた。この結果から、内腔での細胞の蓄積には ERK 経路と PI3K の経路の両方が必要であるということが結論づけられた。

KRasV12 のエフェクターループにアミノ酸置換を有する KRasV12-T35S、-E37G、-Y40C 変異体はそれぞれ Raf、RalGEF、PI3K を特異的に活性化することが知られている(図 8A)(28)。これらの変異体に AID を付加したコンストラクトを作成し、Ras 下流因子をそれぞれ特異的に活性化した場合の変化を解析することとした。これら変異体を含むレトロウイルス液をまず 10 倍濃縮した後に、4 倍、16 倍希釈して MDCK-TIR1 細胞に感染させた。薬剤選択後にウエスタンブロッティングで発現量を確認した(図 9)。最も濃いウイルス液を感染させた細胞を、マトリゲル上で 7 日間培養してシストを形成させた。形成したシストをコラーゲンゲルに移し替えた。NAA を除去して 2 日後に微分干渉顕微鏡でシストの画像を取得した KRasV12 に比べると効果は弱い、KRasV12-T35S が発現することによって内腔が細胞で充満したシストの数が増加した。しかし、E37G と Y40C は内腔での細胞の蓄積を誘導できなかった(図 8C)。これらに対応して、MEK と RalA の活性型変異体である MEK1SDSE と RalAQ72L をそれぞれ発現させたところ、MEK1SDSE では KRasV12-T35S と同様に形態変化を誘導し(図 8C 第 7 カラム)、RalAQ72L は KRasV12-E37G と同様に形態変化を誘導できなかった(図 8C 第 8 カラム)。ERK 経路の活性化により形態変化を誘導できたものの、その効果は KRasV12 の効果に比べると小さい。そこで、ERK 経路だけではなく PI3K 経路の活性化も必要ではないかと考え、T35S と Y40C の共発現を行ったところ T35S 単独よりも異常なシストの数が増加した(図 8C 第 6 カラム)。以上の結果から PI3K 経路は ERK 経路による形態変化を増強するために必要であることが明らかとなった。

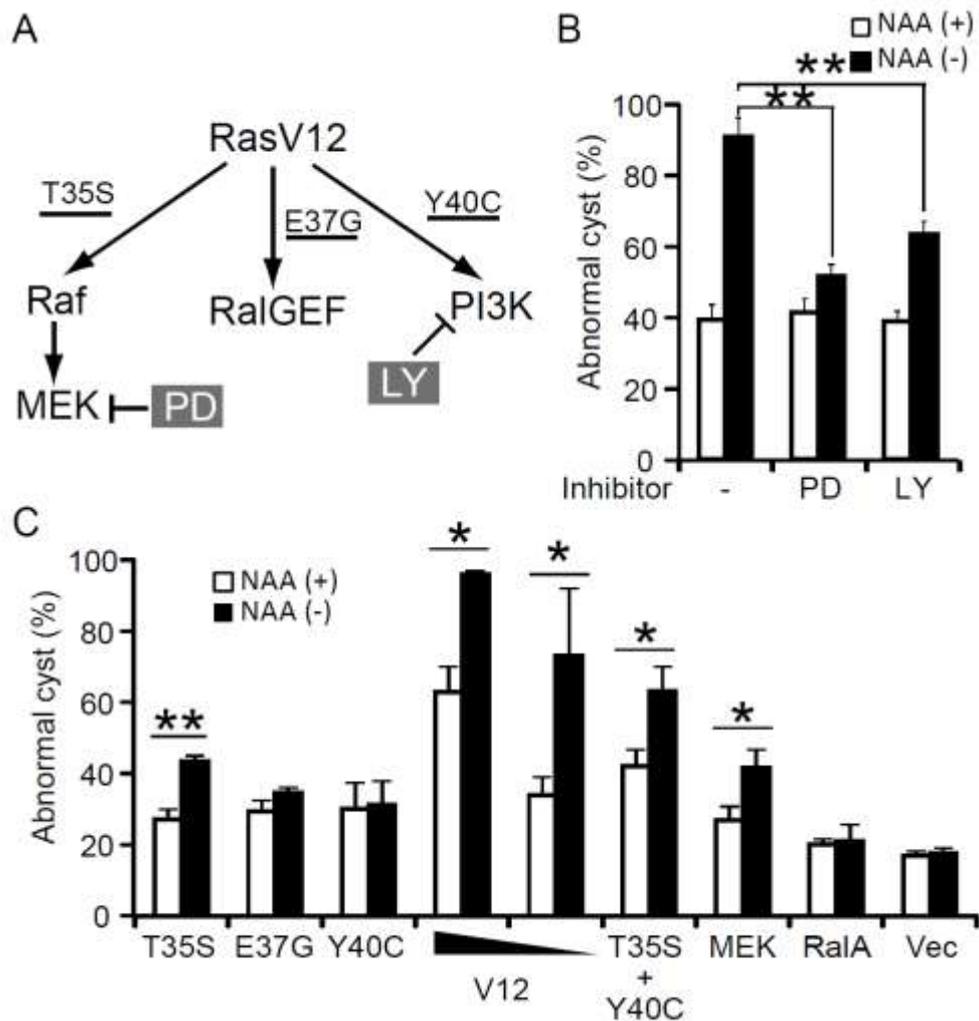


図 8. KRasV12 の下流分子

(A) Ras シグナルの概略図。KRasV12-T35S は Raf、KRasV12-E37G は RalGEF、KRasV12-Y40C は PI3K を特異的に活性化する。(B) MDCK-KRasV12 細胞のシストをコラーゲンゲルに移し替えた後に、2.5 μ M の PD184352 あるいは 50 μ M の LY294002 を含む NAA 含有、非含有の培地で 2 日間培養し、微分干涉顕微鏡でシストを観察して異常なシストの数を数えた。グラフは三回の独立実験の平均値 \pm 標準偏差で表す。(C) AID を付加した KRasV12 の下流分子特異的な変異体あるいは MEK と RalA の恒常活性型である MEK1SDSE と RalAQ72L を MDCK-TIR 細胞に導入し、マトリゲル上で NAA 存在のもと、7 日間培養した。シストをコラーゲンゲルに移し替え、NAA 存在、あるいは非存在下で更に 2 日間培養し微分干涉顕微鏡でシストの画像を取得し、異常なシストの割合を求めた。スチューデントの等分散の 2 標本を対象とする t 検定により算出した P 値が 0.05 より低い場合に*、0.01 より低い場合に**を示した。

3-6 形態変化における PI3K 経路の役割

PI3K/AKT 経路は細胞の生存に関係する因子として知られている(29)。そこで活性型 Ras が引き起こす形態変化において、PI3K 経路は細胞死に関わっているのはいかと考え、アポトーシスを引き起こす細胞を識別するために切断型 caspase3 の検出を行った。MDCK-KRasV12 細胞を NAA 存在下で培養してシストを形成させた後に、NAA を除去し、PI3K 阻害剤である LY294002 を加えて 2 日培養した。その後細胞を固定し、抗切断型 caspase3 抗体で染色した。その結果、LY294002 で処理したシストにおいて、管腔内に切断型 caspase3 陽性細胞を持つシストが増加していた(図 10A)。さらに caspase-3 の活性を生体内で可視化できる FRET バイオセンサー SCAT3(19)を安定発現する MDCK 細胞株を樹立した。このバイオセンサーは、正常状態では Venus から mCherry への FRET が観察されるが、caspase3 が活性化すると Venus と mCherry との間に存在する切断配列が切断され、Venus から mCherry への FRET が起こらない。すなわち、caspase3 が活性化すると FRET 効率が減少する。SCAT3 を発現する MDCK-KRasV12 細胞のシストを LY294002 で処理すると、内腔の細胞で FRET 効率の減少、すなわち caspase3 活性の上昇が見られた(図 10B)。これらの結果から PI3K 経路は内腔におけるアポトーシスを抑制する働きを持つことが示唆される。

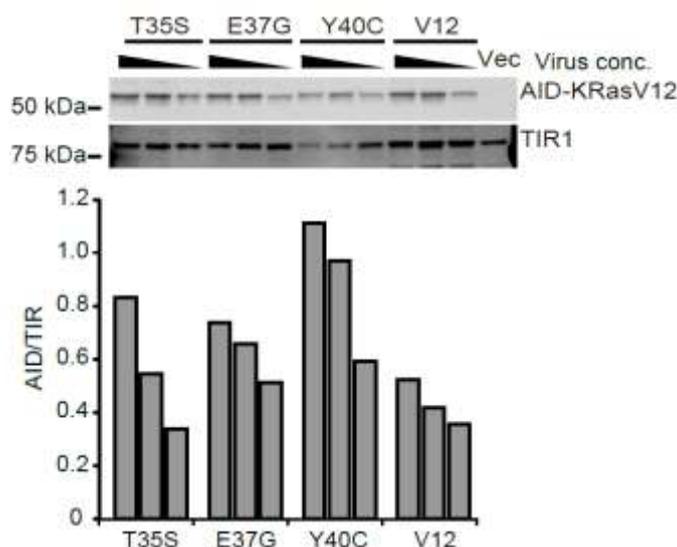


図 9. KRasV12 選択的変異体の発現量

AID-KRasV12T35S, E37G, Y40C を発現するレトロウイルス液を RetroX でまず 10 倍に濃縮し、そこから 4 倍ずつ希釈して、MDCK-TIR1 細胞に感染させた。薬剤選択した後に、細胞をウェスタンブロッティングに供し、抗 HA 抗体で AID タンパク質を、抗 myc 抗体で TIR1 を検出した。

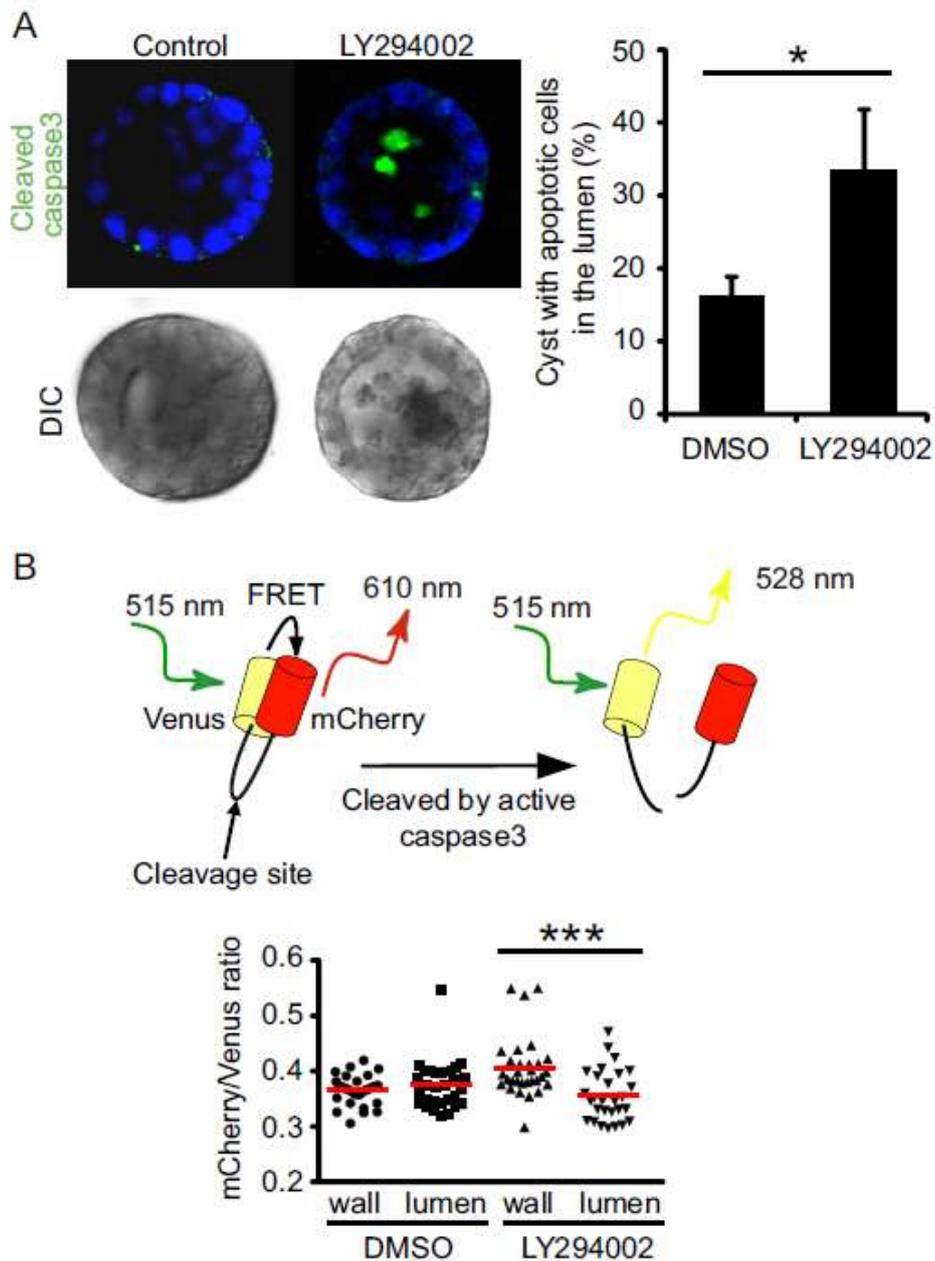


図 10. PI3K 阻害剤による内腔細胞のアポトーシス誘導

(A) 50 μM NAA を加えてマトリゲル上で MDCK 細胞を 5 日間培養した後に、NAA を除去し、それと同時に DMSO あるいは 50 μM LY294002 を加えて更に 2 日培養した。その後、細胞を固定し、抗切断型 caspase3 抗体(緑)と Hoechst 33258(青)で染色した(左図)。右図に内腔にアポトーシスを起こしている細胞を持つシストの割合を示すグラフを示す。3 回の独立実験の平均 \pm 標準偏差で表す。(B) A と同様に SCAT3(上図)を発現する MDCK-KRasV12 細胞を PI3K 阻害剤で処理した。共焦点顕微鏡により画像取得後、mCherry/Venus 比を算出した。***は $p < 0.001$ を示す。

3-7 Ras の活性化による細胞周期の亢進

以前に、線維芽細胞では Raf/MEK/ERK 経路と PI3K/PDK/AKT 経路が協調して G0→G1→S 期の細胞周期の亢進を促進するということが報告されている(30)。また、同じ論文内で、Raf と AKT のどちらも単独では S 期への進行を促進できないと報告されている。本研究では、ERK 経路と PI3K 経路を同時に活性化すると、細胞が内腔に蓄積するという(図 8C)、ERK と PI3K 経路のどちらか一方を阻害することで、内腔での細胞の蓄積が阻害される(図 8B)ということを示した。これらの結果を考慮すると、ERK 経路と PI3K 経路が協調して細胞周期の亢進を誘導し、内腔での細胞の蓄積を引き起こしていると考えられる。このことを証明するために、細胞周期をモニターする Fucci(21)を使用した。Fucci は mCherry-hCdt1 と Venus-hGeminin で構成され、それぞれ S/G2/M 期、G1 期に分解されるタンパク質である。それゆえ、Venus-hGeminin を発現する緑色の細胞は S/G2/M 期の細胞、mCherry-hCdt1 を発現する赤色の細胞は G1 期の細胞を表す(図 11A)。まず MDCK-TIR1 細胞に Fucci を発現させ、続いて AID-KRasV12 を導入した。NAA 存在下でシストを形成させ、NAA 存在下、あるいは非存在下で共焦点顕微鏡によるタイムラプス観察を行った(図 11A)。0 時間の段階では G1 期を示す赤色の細胞が優勢であるが、6 時間から 12 時間後に NAA を除去したサンプルで緑色、すなわち S/G2/M 期の細胞が表れ始めた。そして 18 時間後には NAA 存在下のシストでは緑色の細胞が数個であるのに対し、NAA 非存在下のシストでは大部分の細胞が緑色になった。NAA を除去してから 0 時間、12 時間、24 時間後の S/G2/M 期にある細胞の割合を定量すると、0 時間の段階では 20% 以下であったが、12 時間後には 30%、そして 24 時間後にはおよそ 45%まで増加した。このことは KRasV12 が細胞周期を亢進させていることを示している。予想した通り、PD184352 あるいは LY294002 で処理をすると、どちらのサンプルにおいても細胞周期の亢進が妨げられた(図 11B)。この結果は、ERK 経路と PI3K 経路が協調して働くことで細胞周期を亢進していることを示す。

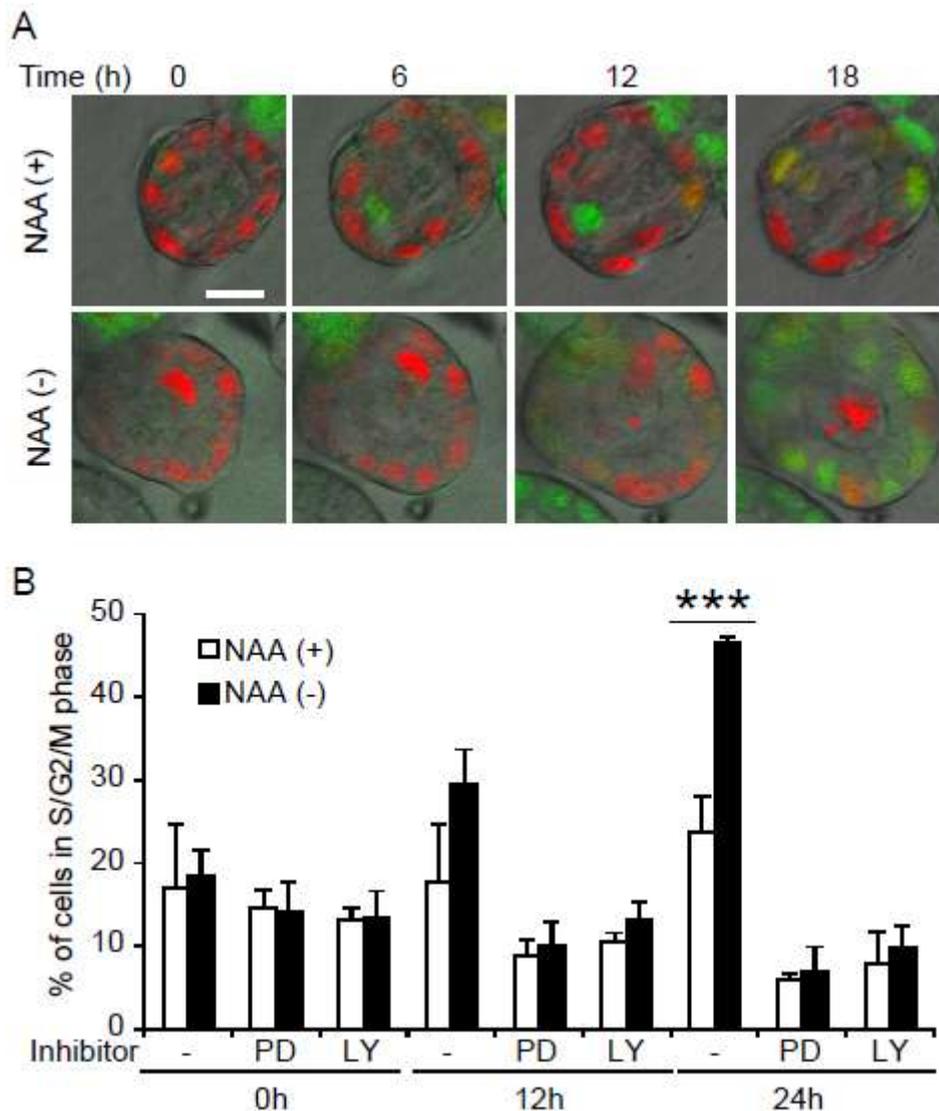


図 11. KRasV12 による細胞周期の亢進

(A) 細胞周期をモニターする Fucci を発現する MDCK-KRasV12 細胞の培養 7 日後のシストをコラーゲンゲルに移し換え、共焦点顕微鏡で 24 時間観察した。赤色が G1 期マーカーの mCherry-Cdt、緑色が S/G2/M 期マーカーの Venus-hGem を示す。(B) Fucci を発現する MDCK-KRasV12 細胞の培養 7 日目のシストに 2.5 μ M の PD184352 あるいは 50 μ M の LY294002 を加え、NAA 存在下、あるいは非存在下でさらに 24 時間培養を続けた。各サンプルにつき 30 個のシストの画像を共焦点顕微鏡で取得し、各タイムポイントで S/G2/M 期の細胞の割合を求めた。グラフは 3 回の独立実験の平均と標準偏差を表したものである。スチューデントの等分散の 2 標本を対象とする t 検定により算出した P 値が 0.001 より低い場合に ***を示した。

第四章

考察とまとめ

4-1 管腔内で細胞が充満する機構

従来の研究の多くは培養皿上での活性化型 KRas の意義を観察しており、より生体に近い三次元での KRas の意義は明らかではなかった。一旦、正常な三次元構造を構築した後に KRas 活性化の意義を解析するために、本研究では AID を用いたタンパク質発現制御系を用いた。その結果、3次元培地内で MDCK 細胞がシストを形成した後に活性化型 KRasV12 変異体が発現すると、細胞周期の亢進が起こり、内腔が細胞で埋まるということを見出した。さらに KRasV12 変異体の下流で Raf と PI3K が協同的に働き、内腔が埋まるということが分かった。

では、どのようにして、細胞増殖が亢進することによって内腔が細胞で埋まるのだろうか？異常な細胞周期の亢進がこの形態変化を誘導するに十分であるのか？これらの疑問に答える手がかりが3つある。まず初めに、成熟したシストを含む培地に EGF を加えると、細胞数とシストの直径は増加するものの、細胞が内腔に蓄積する現象は見られない(所属研究室、未発表データ)。それゆえ、少なくとも EGF 刺激下においては、細胞周期の亢進は形態変化を誘導せず、細胞周期の亢進は内腔が細胞で埋まるという形態変化を起こす十分条件ではない。一方、ERK 経路を活性化することで形態変化を誘導することができたという結果を考慮する必要がある(図 8C)。シストを構成する KRasV12 発現細胞の全てにおいて ERK が活性化されているが、極僅かの細胞だけが内腔へ移動する(図 7)。そして、その内腔へ移動する細胞では細胞極性が崩壊していることが明らかになったが(図 6B)、それにも拘らず、ERK 活性は内腔の細胞と周囲の細胞で違いがなかった。これらのことから ERK 経路の活性が形態変化を誘引するが、更なる経路が形態変化に関係していることが示唆される。そして3つ目として、内腔への移動だけではなく、PI3K 経路による内腔でのアノキスの抑制が形態変化に重要な働きを担っていることが挙げられる(図 10)。以上の3点から、ERK 経路の異常な活性が内腔への細胞移動を促進し、PI3K 経路が内腔での増殖を支持していると考えられる。

ヒトの生体内における癌を見てみると、今回見られたような頂端側への浸潤は新しい癌の転移機構として認識されている。もし細胞が腸などの上皮組織から内腔へ押し出されると、その細胞は対外へ排出されてしまう。しかし、その細胞が体内の循環系に乗ってしまえば、転移の原因となってしまう。そのような転移した癌細胞は転移先でも単層上皮あるいは重層上皮構造を形成している。それゆえ、本研究で見られた内腔への浸潤は転移の原因の一つであると考えられる内腔転移のモデルとして考えることができる。

4-2 ERK と AKT のクロストーク

今回の研究の結果(図 8B, C)と同様に、いくつかの報告で、Ras の主な下流因子である Raf と PI3K が細胞増殖に必要であるということが示されている。しかし、マウスの胎児線維芽細胞では、ERK 経路の活性化が正常の細胞増殖を維持するために十分であるが、PI3K/AKT 経路は不十分であるという報告もある(31)。しかし、この報告では、

PI3K 経路は ERK 経路と協調して働き、Ras によって引き起こされる反応を再現するとも言及している。これと同様に、Raf か AKT のどちらか一方のみが活性化しても、S 期への進行を促進しない。しかし、これら両キナーゼの活性化が、NIH3T3 細胞の細胞増殖を誘発するという報告もなされている(30)。また、MCF10A のシストでは、PI3K の活性化が、ERK1/2 によって引き起こされる細胞増殖に必要であると報告されている(32)。これらの報告は Raf と PI3K の協調効果の重要性を示唆しているが、細胞種によってその寄与の程度はさまざまであることもおのずと明らかである。さらに、PI3K/AKT 経路はアノキスやアポトーシスの抑制に重要な役割を果たすことがすでに知られている(33)。本研究では、PI3K 阻害剤の投与が内腔の細胞のアポトーシスを誘導することを明らかにした(図 10)。内腔への移動の際には細胞と足場となる基質との接着が失われると考えられるため、PI3K がアノキスを防ぐことで内腔での増殖の初期段階に関与していると考えられる。以前の研究からホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸を基底膜に加えることで基底膜の突出が誘導されることが分かっている(34)。PI3K の活性化だけでは形態変化を誘導しなかったこと(図 8B)、そして PI3K 阻害剤が細胞周期を抑制し、形態変化を阻害することから(図 11B)、Ras の下流で PI3K は細胞周期の亢進を誘導するために別の経路と協調して働いていることが予想できる。また、内腔での生存や細胞周期に関する働きの他に、内腔へ移動した細胞は細胞極性を消失しているため、PI3K 経路が細胞骨格のリモデリングを介して内腔への浸潤を誘導する働きを有する可能性も考えられる。

4-3 三次元環境における細胞周期の制御

成熟した MDCK 細胞のシストにおいては、活性化 Ras が G1 期から S 期への進行を誘導した(図 11)。これまでの研究から、細胞周期の亢進はサイクリン D1 の発現量と p21^{Cip1} や p27^{Kip1} といったサイクリン依存性キナーゼ阻害因子によって制御されており、これらの因子は Raf と PI3K の協調的な働きによって制御されていることが明らかとなっている(30, 35)。AKT はこれらの因子の発現量だけではなくリン酸化による p27 の不活性化も誘導するため、乳がん細胞の MCF7 では細胞が細胞周期の停止から免れている(36)。本研究で用いた実験系では ERK 経路と PI3K 経路の両方が G1 期から S 期への進行に必要であったので、活性化 Ras が p21^{Cip1} や p27^{Kip1} の制御を解して細胞周期を制御していると考えられる。

4-4 三次元環境における Raf の役割

MDCK 細胞のシストにおける Raf 活性化の役割は、活性型変異体を持つ Raf-1 のキナーゼドメインをエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインと融合させた Raf-ER 融合タンパク質を用いて調べられている(35)。Raf-1 の活性化により MDCK 細胞は帯状構造を形成する(37, 38)。本研究では PI3K の阻害により Ras の活性化の効果を抑制し

たため、Rafの活性化単独ではMDCK細胞の形態変化を誘導することはできない。この違いはタンパク質の発現量から来るものであると考えられる。本研究では活性型Rasの発現量は内在性Rasの2倍程度であった(図2)。それに対し、以前の研究においてRaf-ERの発現量の記載はなかったが、Raf-ERが大過剰に発現している可能性がある。なぜなら、1細胞内におけるRaf-1あるいはB-Rafの分子数はRasの分子数に比べて極めて少ないからである(39)。この可能性とは別に、活性化Raf-ERがKRasV12によって活性化されたRafとは異なる振る舞いを示す可能性もある。その一方で、本研究で観察されたRasが誘導するフェノタイプ、すなわち内腔が細胞で充満された大きなシストはMCF10Aで活性型Rafを発現させた誘導されるフェノタイプと似ている(32, 40)。そのため、MCF10AにおいてPI3Kの活性化は必要ではない、あるいはPI3Kが恒常的に活性化されていると考えている。

4-5 まとめ

本研究では、活性型Rasが誘導する生体内の癌を再現するシステムを試験管内で構築した。以前に所属研究室では頂端膜でRac1を活性化させると本研究と同様に極性の崩壊と内腔での細胞の蓄積が誘導されることを見出ししていた(20)。しかし、ライブイメージングにより、Rac1の活性化とRasの活性化では異なるメカニズムで形態変化を誘導することが明らかになった。Rac1の活性化の場合には細胞分裂軸の異常が誘導されるのに対し、Rasの活性化では細胞周期の亢進が誘導された。Rasの変異は腎癌では稀だが、このシステムはRasの変異が良く見られる膵臓や大腸、肺といった臓器の発癌過程を調べるためにも使用することができると考えている。上皮細胞は組織特異的な遺伝子を発現しているため、異なる機能を有してはいるが、それと同時に組織の維持機能には共通しているものが多いのも事実である(10, 41)。そのような組織だった構造が壊れることは良性あるいは悪性腫瘍が発生する際に共通している現象である。そのため、AIDと癌遺伝子の融合タンパク質を用いた本研究の実験系は様々な発癌過程を再現できるので、病理モデルの再現、分類などに有用であると考えている。また、この系を用いて様々な発癌過程を再現することで、薬剤スクリーニング系にも応用することができると考えている。例えば、本研究では阻害剤の投与により異常な細胞周期の抑制(図11B)や形態変化の抑制(図8B)が観察できた。近年では複数の薬剤投与によるRasが誘導する癌の治療が報告されており(42)、RafとPI3Kを狙った抗がん剤開発が進んでいる(43)。本研究のようにFRETイメージングを始めとする蛍光イメージングを三次元培養系と組み合わせることで新規のスクリーニング系の確立、そしてより効果的で副作用の少ない抗がん剤開発につながると考えている。

参考文献

1. Santos, E., Nebreda, A. R. (1989) Structural and functional properties of Ras proteins. *FASEB J.* **3**, 2151–2163
2. Bos, J. L. (1989) *Ras* oncogenes in Human Cancer: a review. *Cancer Res.* **49**, 4682–4689
3. Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003) Tumor induction by an endogenous KRas oncogene is highly dependent on cellular context. *Cell* **4**, 111–120
4. Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H., and Goggins, M. (2011) Pancreatic cancer. *Lancet* **378**, 607–20
5. Leslie, a, Carey, F. a, Pratt, N. R., and Steele, R. J. C. (2002) The colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Br. J. Surg.* **89**, 845–60
6. Tarutani, M., Cai, T., and Dajee, M. (2003) Inducible Activation of Ras and Raf in Adult Epidermis. *Cancer Res.* **63**, 319–323
7. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T., and Kanemaki, M. (2009) An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat. Methods* **6**, 917–22
8. Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., Reinhart-King, C. a, Margulies, S. S., Dembo, M., Boettiger, D., Hammer, D. a, and Weaver, V. M. (2005) Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell* **8**, 241–54
9. Hall, H. G., Farson, D. A., and Bissell, M. J. (1982) Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: A morphogenetic model in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 4672–4676
10. O'Brien, L. E., Zegers, M. M. P., and Mostov, K. E. (2002) Building epithelial architecture: insights from three-dimensional culture models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 531–537

11. Debnath, J., Muthuswamy, S. K., and Brugge, J. S. (2003) Morphogenesis and oncogenesis of MCF-10A mammary epithelial acini grown in three-dimensional basement membrane cultures. *Methods* **30**, 256–268
12. Jaffe, A. B., Kaji, N., Durgan, J., and Hall, A. (2008) Cdc42 controls spindle orientation to position the apical surface during epithelial morphogenesis. *J. Cell Biol.* **183**, 625–33
13. Bagnat, M., Cheung, I. D., Mostov, K. E., and Stainier, D. Y. (2007) Genetic control of single lumen formation in the zebrafish gut. *Nat. Cell Biol.* **9**, 954–960
14. Brinkmann, V., Sachs, M., Weidner, K. M., and Birchmeier, W. (1995) Hepatocyte growth factor / scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J. Cell Biol* **131**, 1573-1586
15. Lehnert, L., Lerch, M. M., Hirai, Y., Kruse, M.-L., Schmiegel, W., and Kalthoff, H. (2001) Autocrine stimulation of human pancreatic duct-like development by soluble isoforms of epimorphin in vitro. *J. Cell Biol.* **152**, 911–922
16. Gutierrez-Barrera, A. M., Menter, D. G., Abbruzzese, J. L., and Reddy, S. A. (2007) Establishment of three-dimensional cultures of human pancreatic duct epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 698–703
17. Akagi, T., Shishido, T., Murata, K., and Hanafusa, H. (2000) v-Crk activates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway in transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 7290-7295
18. Komatsu, N., Aoki, K., Yamada, M., Yukinaga, H., Fujita, Y., Kamioka, Y., and Matsuda, M. (2011) Development of an optimized backbone of FRET biosensors for kinases and GTPases. *Mol. Biol. Cell* **22**, 4647–56
19. Takemoto, K., Nagai, T., Miyawaki, A., and Miura, M. (2003) Spatio-temporal activation of caspase revealed by indicator that is insensitive to environmental effects. *J. Cell Biol.* **160**, 235–43

20. Yagi, S., Matsuda, M., and Kiyokawa, E. (2012) Suppression of Rac1 activity at the apical membrane of MDCK cells is essential for cyst structure maintenance. *EMBO Rep.* **13**, 237–43
21. Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., and Miyawaki, A. (2008) Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression. *Cell* **132**, 487–98
22. Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997) Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* **15**, 871–875
23. Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009) Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Methods* **6**, 363–9
24. Martin-Belmonte, F., Gassama, A., Datta, A., Yu, W., Rescher, U., Gerke, V., and Mostov, K. (2007) PTEN-mediated apical segregation of phosphoinositides controls epithelial morphogenesis through Cdc42. *Cell* **128**, 383–97
25. Pollack, a L., Runyan, R. B., and Mostov, K. E. (1998) Morphogenetic mechanisms of epithelial tubulogenesis: MDCK cell polarity is transiently rearranged without loss of cell-cell contact during scatter factor/hepatocyte growth factor-induced tubulogenesis. *Dev. Biol.* **204**, 64–79
26. Hogan, C., Dupré-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A. E., Piddini, E., Baena-López, L. A., Vincent, J.-P., Itoh, Y., Hosoya, H., Pichaud, F., and Fujita, Y. (2009) Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **11**, 460–7
27. Torii, S., Nakayama, K., Yamamoto, T., and Nishida, E. (2004) Regulatory mechanisms and function of ERK MAP kinases. *J. Biochem.* **136**, 557–61
28. Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A., and Downward, J. (1997) Role of

- phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**, 457–467
29. Castellano, E., and Downward, J. (2011) RAS interaction with PI3K: more than just another effector pathway. *Genes Cancer* **2**, 261–74
 30. Mirza, A. M., Gysin, S., Malek, N., Roberts, J. M., McMahon, M., and Nakayama, K. (2004) Cooperative Regulation of the Cell Division Cycle by the Protein Kinases RAF and AKT Cooperative Regulation of the Cell Division Cycle by the Protein Kinases RAF and AKT. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 10868-10881
 31. Drosten, M., Dhawahir, A., Sum, E. Y. M., Urosevic, J., Lechuga, C. G., Esteban, L. M., Castellano, E., Guerra, C., Santos, E., and Barbacid, M. (2010) Genetic analysis of Ras signalling pathways in cell proliferation , migration and survival. *EMBO J.* **29**, 1091–1104
 32. Pearson, G. W., and Hunter, T. (2009) Research article PI-3 kinase activity is necessary for ERK1 / 2-induced disruption of mammary epithelial architecture. *Breast Cancer Res.* **11**, R29
 33. Reddig, P. J., and Juliano, R. L. (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev.* **24**, 425–39
 34. Gassama-Diagne, A., Yu, W., ter Beest, M., Martin-Belmonte, F., Kierbel, A., Engel, J., and Mostov, K. (2006) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate regulates the formation of the basolateral plasma membrane in epithelial cells. *Nat. Cell Biol.* **8**, 963–70
 35. Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., Woods, D., Parry, D., Cherwinski, H., Bosch, E., Lees, E., and Mahon, M. M. C. (1997) Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1 . *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5598-5611
 36. Universitario, C., Angelo, M. S., and Chase, F. (2002) Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin- dependent kinase inhibitor p27 Kip1 by PKB / Akt-mediated phosphorylation in breast cancer. *Nat. Med.* **8**, 1136-1144

37. O'Brien, L. E., Tang, K., Kats, E. S., Schutz-geschwender, A., Lipschutz, J. H., Mostov, K. E., and Francisco, S. (2004) ERK and MMPs Sequentially Regulate Distinct Stages of Epithelial Tubule Development. *Dev. Cell* **7**, 21–32
38. Lehmann, K., Janda, E., Pierreux, C. E., Ryto, M., Schulze, A., McMahon, M., Hill, C. S., Beug, H., and Downward, J. (2000) Raf induces TGF β production while blocking its apoptotic but not invasive responses : a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Gene Dev.* **14**, 2610-2622
39. Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R. E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., Nishida, E., and Matsuda, M. (2006) Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *J. Biol. Chem.* **281**, 8917–26
40. Pearson, G. W., and Hunter, T. (2007) Real-time imaging reveals that noninvasive mammary epithelial acini can contain motile cells. *J. Cell Biol.* **179**, 1555–1567
41. Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 285-293
42. Blum, R., and Kloog, Y. (2005) Tailoring Ras-pathway-inhibitor combinations for cancer therapy. *Drug Resist. Updat.* **8**, 369–80
43. Chappell, W. H., Steelman, L. S., Long, J. M., Kempf, R. C., Abrams, S. L., Franklin, R. A., Bäsecke, J., Stivala, F., Fagone, P., Malaponte, G., Mazzarino, M. C., Libra, M., Maksimovic-ivanic, D., and Mijatovic, S. (2011) Ras/Raf/MEK/ERK and Pi3K/PTEN/Akt/mTOR inhibitors: rationale and importance to inhibiting these pathways in human health. *Oncotarget* **2**, 135–164

謝辞

本研究並びに、論文作成に当たりご指導いただいた松田道行教授、実際の研究を進める上でご指導いただいた清川悦子元医学研究科講師(現金沢医科大学教授)、MDCK 細胞の三次元培養法から共焦点顕微鏡の使い方まで丁寧に教えてくださった八木俊輔氏、並びに、研究に対する助言やディスカッションを通してサポートしてくださった諸先生方、先輩方、技術員の方には深く感謝いたします。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Atsuro Sakurai, Michiyuki Matsuda, and Etsuko Kiyokawa

Activated Ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby Canine Kidney cystogenesis

The Journal of Biological Chemistry, 287, 31703-31711, 2012

This research was originally published in The Journal of Biological chemistry. Atsuro Sakurai, Michiyuki Matsuda, and Etsuko Kiyokawa. Activated Ras protein accelerates cell cycle progression to perturb Madin-Darby Canine Kidney cystogenesis. 2012. 287, 31703-31711. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology