

## 研究報告書

### 「上皮のがん原性炎症が駆動する非遺伝的腫瘍悪性化の分子基盤」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 4 月～平成 28 年 3 月

研究者: 井垣 達吏

#### 1. 研究のねらい

近年、がんの発生・進展に炎症反応が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、基礎研究のみならず新たながん治療標的として臨床応用研究においても注目されている。これらの研究は、主にがんの発生・悪性化の過程で引き起こされる上皮由来がん細胞と間質細胞（炎症細胞、免疫系細胞、線維芽細胞など）の相互作用に焦点を絞って進められてきた。しかし、種々の間質細胞と同様のがん組織に含まれる上皮細胞（正常上皮細胞および変異上皮細胞）同士の相互作用に関しては、その重要性が強く示唆されているものの、分子基盤はほとんど不明である。我々は、遺伝的に不均一な多細胞コミュニティの中で引き起こされる上皮の腫瘍悪性化を生体レベルで理解するため、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを世界に先駆けて構築してきた。さらに、このショウジョウバエモデルを利用して、がん遺伝子 Ras を活性化した上皮細胞クローンに様々な突然変異を導入するパイロットスクリーニングを実施し、これら変異細胞クローン自身ではなくその周辺の上皮細胞に対して強い増殖促進や浸潤・転移能を誘発する一連の突然変異を見いだした。興味深いことに、この周辺細胞に対するがん促進作用は、変異細胞において持続的に発現誘導される炎症性サイトカイン（IL-6 ホモログ分子）によって引き起こされていることが分かった。すなわちこの現象は、がん原性の上皮細胞に引き起こされる“oncogenic inflammation（がん原性炎症）”と捉えることができ、がんの発生・進展を駆動する上皮細胞間のがん原性相互作用の生体モデルとなると考えられた。この“がん原性炎症”を誘発する因子として、ミトコンドリア呼吸鎖の機能障害とRasシグナルの活性化が協調することが重要であることが分かった。そこで本研究では、大規模なショウジョウバエ遺伝学的スクリーニングを根幹として、遺伝学的解析やイメージング解析を中心としたアプローチを展開し、がん遺伝子の活性化が様々な突然変異と協調して引き起こす“がん原性炎症”の実体を明らかにしてその概念を確立するとともに、それによって引き起こされる“非遺伝的”な腫瘍悪性化の分子基盤とその生理的役割を生体レベルで明らかにすることを目的とする。

#### 2. 研究成果

##### (1) 概要

がんの悪性化は、多段階的な突然変異の蓄積による“遺伝的”な変化のみならず、突然変異を誘発することなく細胞間相互作用を介して引き起こされる“非遺伝的”な変化がその進展に重要な役割を果たすと考えられる。このような細胞間の相互作用を介したがん制御機構を生体レベルで理解するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系として、細胞間コミュニケーションを介した腫瘍成長・悪性化に関わる因子の遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ成虫原基の上皮組織にがん原性 Ras (RasV12) を発現する体細胞クローンを誘導すると、これらの細胞群は過剰に増殖して

良性腫瘍を形成する。この良性腫瘍にさらなる突然変異を導入し、変異細胞自身ではなくその周辺の正常細胞の増殖を強く亢進する一連の突然変異体 (*non-autonomous growth*; *nag* 変異体) を探索した。単離された多数の *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、驚くべきことにミトコンドリア呼吸鎖複合体のコンポーネントをコードする一連の遺伝子群が共通して同定された。これらの結果は、Ras シグナルの活性化とミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が同時に起こるとその周辺細胞のがん化が促進する可能性を示唆している。さらに、このような Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした変異細胞が Ras 活性化を起こした良性腫瘍の近傍に出現すると、良性腫瘍は悪性化して浸潤・転移能を獲得することが分かった。この細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構を解析した結果、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は活性酸素種を大量に産生して JNK シグナルを活性化し、この JNK シグナルが Ras シグナルと協調することでがん抑制経路 Hippo 経路が不活化し、これにより炎症性サイトカイン Unpaired (Upd; IL-6 ホモログ分子) の産生が誘導されて、これを受け取る周辺細胞が JAK/STAT シグナル依存的に腫瘍悪性化を引き起こすことが明らかとなった (“がん原性炎症”)。さらに、このような “がん原性炎症” を起こした変異細胞が細胞老化を起こしていることを見だし、Upd 発現誘導による腫瘍悪性化という現象が、細胞老化に伴う SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) を介したものであることが分かった。さらなる遺伝学的解析により、細胞老化の特徴である細胞周期停止が JNK シグナル活性の増強に必須の役割を果たしていることを見だし、細胞老化と “がん原性炎症” を結ぶ分子基盤を明らかにした。現在、“がん原性炎症” の生理的役割を探索するため、ショウジョウバエ正常発生過程における細胞老化 (プログラム細胞老化) および SASP の遺伝学的解析を進めている。

## (2) 詳細

がんの発生・進展過程において、細胞間の相互作用が重要な役割を果たしていることが近年分かってきた。しかし、一つ一つの細胞間コミュニケーションがいかにしてがんの発生・進展に寄与するのか、その分子基盤についてはいまだ不明な点が多い。その原因の一つとして、生体内で引き起こされる細胞非自律的ながん促進機構をシステムティックに解析できる優れたモデル系が存在しなかったことが挙げられる。そこで本研究では、この問題を克服しうるショウジョウバエ遺伝的モザイク・クローン法を用いた腫瘍悪性化モデルを利用して、細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化機構の遺伝学的解析を行い、以下のような一連の成果を得た。

### 【1】 Ras 活性化とミトコンドリア機能障害により引き起こされる “がん原性炎症” が周辺組織のがん化を促進する分子機構

細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子基盤を解析するため、ショウジョウバエ上皮をモデル系とした遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、ショウジョウバエ3齢幼虫の複眼原基の上皮組織にがん遺伝子 Ras を活性化した細胞 (RasV12 発現細胞) のクローンを誘導すると、これらの細胞は過剰に増殖して良性腫瘍を形成する。この良性腫瘍にさ

らなる突然変異(一連の P 因子挿入変異)を導入してその表現型の変化をスクリーニングした結果、突然変異が導入された RasV12 発現細胞自身ではなく、その周辺の野生型細胞が増殖を亢進する突然変異体 (*nag* 変異体) が多数単離された。これら一連の *nag* 変異体の責任遺伝子を解析した結果、興味深いことにミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成タンパク質、あるいはその合成に関わるミトコンドリアリボソームタンパク質をコードする遺伝子群に突然変異が集中していることが明らかとなった。すなわち、Ras シグナルの活性化とミトコンドリアの機能障害が同時に起こると、その周辺の正常細胞が過剰に増殖することが分かった。

そこで、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を同時に起こした細胞 (*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞) が周辺細胞の増殖を促進するメカニズムを明らかにするため、この現象を起こすのに必要な遺伝子の遺伝学的スクリーニング(2次スクリーニング)を行った。具体的には、一連のショウジョウバエ染色体欠失系統ライブラリーを用い、*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞クローンが誘導する細胞非自律的増殖を抑制あるいは促進する遺伝子変異を探索した。その結果、ショウジョウバエ JAK/STAT 経路の下流で機能する転写因子 *stat92E* 遺伝子の機能を欠失させると、周辺細胞の増殖促進が強く抑制されることが分かった。ショウジョウバエ JAK/STAT 経路は、リガンド分子である炎症性サイトカイン Upd (IL-6 ホモログ分子) がその受容体 Domeless に結合することで活性化され、細胞増殖を促進する。解析を進めた結果、*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞では Upd の発現が強く誘導され、これを受けとった周辺細胞が JAK/STAT 経路を活性化して増殖を亢進することが分かった。さらに、この *Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞における Upd 発現誘導メカニズムを解析した結果、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害が同時に起こると細胞内で活性酸素種 (ROS) が大量に産生され、これが JNK (c-Jun N-terminal kinase) シグナルを活性化し、さらに JNK シグナルと Ras シグナルが同時に活性化することで細胞内 F-actin が高度に集積してがん抑制経路 Hippo 経路が不活化することが分かった。Hippo 経路は進化的に保存されたリン酸化カスケードで、通常、転写コアクティベーター Yokie (Yki; Yap ホモログ分子) をリン酸化して抑制することで細胞増殖を負に制御している。興味深いことに、我々が本研究を進めている過程で、*upd* が Yki の転写ターゲット遺伝子の一つであることが複数の研究グループより報告された。すなわち、*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞は Hippo 経路の不活化を介した Yki 活性化により Upd の発現誘導を引き起こしている可能性が考えられた。これを検証した結果、まさにその通りであることが遺伝学的に証明された。加えて、Yki のターゲット遺伝子の一つである分泌性増殖因子 Wingless (Wg; Wnt ホモログ分子) の発現も *Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞内で発現誘導され、周辺細胞の増殖促進に貢献していることが明らかとなった。

以上の解析により、*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞は周辺の正常細胞の増殖を ROS-JNK-Hippo 経路を介して促進することが分かったが、実際のヒトのがん組織の状況を考えると、このような *Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞の周辺には、正常細胞のみならず Ras を活性化した良性腫瘍細胞が存在すると想定される。そこで、そのような状況をショウジョウバエ複眼原基の上皮組織において再現してその表現型を解析した。その結果、驚くべきことに、Ras シグナルを組織全体で活性化した複眼原基内にミトコンドリア機能障害を起こした細胞群 (*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞群) をモザイク状に誘導すると、その周辺に存在する Ras 活性化細胞群が浸潤・転移能を獲得することが分かった。すなわち、*Ras/mito*<sup>-/-</sup> 細胞は、その周辺の良性腫瘍を悪性化する能力をもつことが明らかとなった。さらなる解析により、この周辺良性腫瘍細胞の悪性化は Ras シグナルと JAK/STAT シグナルが協調することによって引き起こされることが分かった(図1) (Ohsawa et

al., Nature, 2012)。このような“がん原性炎症”を介した非遺伝的な腫瘍悪性化機構が、ヒトのがん組織における細胞間コミュニケーションを介したがん進展に寄与している可能性が考えられる。

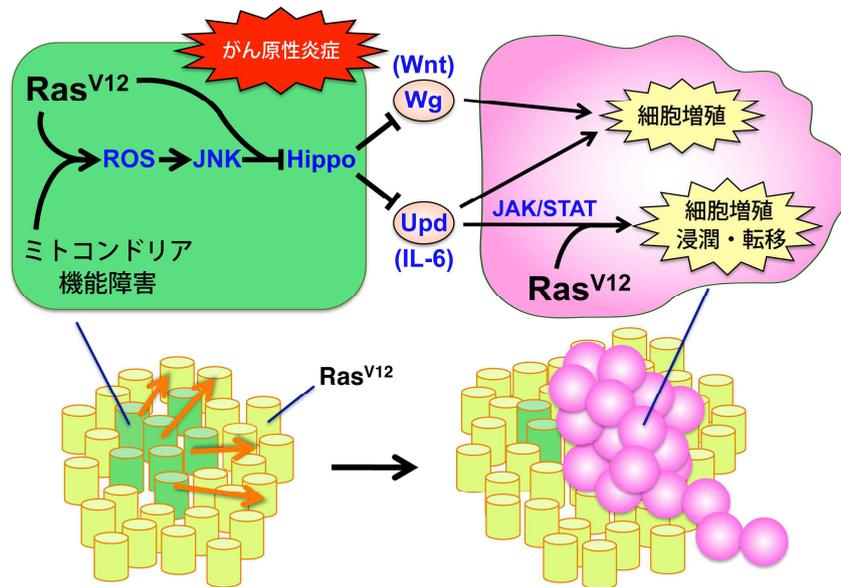


図1 Ras 活性化とミトコンドリア機能障害による周辺細胞のがん進展メカニズム

## 【2】 Ras 活性化とミトコンドリア機能障害による細胞老化および SASP 誘導の分子機構

上記の解析の過程で、 $Ras/mito^{-/-}$  細胞は周辺細胞に Upd を分泌しつつ自身も Upd を受容しているが、 $Ras/mito^{-/-}$  細胞自身はなぜか細胞増殖を亢進していないことが分かった。その原因を解析した結果、 $Ras/mito^{-/-}$  細胞は細胞周期を停止させ、SA- $\beta$ -gal 活性の上昇、CDK 阻害タンパク質 Dacapo (p21/p27 ホモログ) の発現上昇、核 DNA のヘテロクロマチン化、DNA 損傷応答(DDR)、そして SASP (炎症性サイトカイン Upd の発現誘導) といった、一連の細胞老化マーカーを発現していることを見いだした。これらは、無脊椎動物において初めて細胞老化現象を捉えたデータにもなった。興味深いことに、Ras 活性化のみを起こした細胞クローンは SA- $\beta$ -gal の活性上昇や Dacapo の発現上昇は起こるものの、細胞周期停止および SASP は誘導されないことが分かった。これらの結果は、少なくともショウジョウバエの生体内においては、Ras 活性化のみでは細胞周期停止を引き起こすのに十分な DNA 損傷等の細胞ストレスが誘導されず、これにミトコンドリア機能障害が加わることで ROS の産生やそれに伴う DNA 損傷が増強され、細胞周期停止および SASP が引き起こされるという可能性を示している。

さらに、 $Ras^{V12}/mito^{-/-}$  変異細胞の細胞老化誘発メカニズムを解析した結果、細胞周期の停止はがん抑制タンパク質 p53 および p21-CycE-Rb 経路の活性化により引き起こされていることが分かった。また、JNK シグナル活性化と細胞周期停止は互いを増強し合うポジティブフィードバックループを形成し、これにより恒常的な JNK 活性化が実現することで強い Upd 発現誘導(SASP)が引き起こされることが分かった(図2) (Nakamura et al., Nat Commun, 2014)。

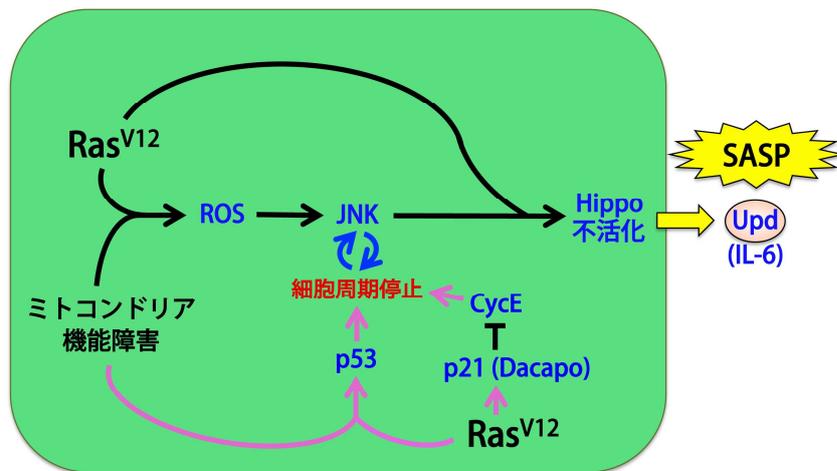


図2 Ras 活性化とミトコンドリア機能障害による SASP 誘導メカニズム

### 3. 今後の展開

ショウジョウバエを用いた本研究での一連の遺伝学的解析により、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害によって引き起こされる“がん原性炎症”に伴う細胞老化とSASP誘導、またこれを起点とした細胞間コミュニケーションを介した腫瘍悪性化の分子メカニズムの大枠が明らかとなった。このような“がん原性炎症”を起こした変異細胞は、がんの発生や進展を促す微小環境における「がんニッチ細胞」として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。一方で、このようなドラスティックな細胞増殖／悪性化を引き起こしうる“がん原性炎症”の生理的役割は不明である。現在、ショウジョウバエ正常発生過程におけるプログラム細胞老化およびSASPの解析を進めており、これにより“がん原性炎症”の生理的意義を明らかにするとともに、その人為的制御法を確立することで“がん原性炎症”に着目した新たながん制御法の基盤構築を目指す。また、ショウジョウバエで得られた知見を哺乳類培養細胞系を用いて検証していくことで、その普遍性／多様性を明らかにしていく。

### 4. 評価

#### (1) 自己評価

(研究者)

本研究期間において、がん遺伝子 Ras の活性化とミトコンドリア機能障害が協調することで上皮組織に引き起こされる“がん原性炎症”の分子メカニズムを明らかにするという当初の目的を達成することができた。また、“がん原性炎症”を起こした細胞が SASP を伴う細胞老化を起こすことでその恒常的ながん促進作用を発揮していることを見だし、そのメカニズムの大枠を明らかにすることができた。これらの成果は、今後慢性炎症を起点とした細胞間相互作用を介したがんの発生・進展メカニズムを理解していく上での重要な知見を提供するものと期待される。一方で、現時点ではまだがん原性炎症の普遍性を検証できるまでには至っておらず、今後の研究課題である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

世界に先駆けて構築した、ショウジョウバエ遺伝的モザイク法を駆使した腫瘍悪性化モデルを利用し、さがけ研究期間の前半で、がん遺伝子 Ras が活性化した上皮細胞(良性腫瘍)にさまざまな突然変異を誘導し、周囲の上皮細胞を強く増殖させる突然変異の原因遺伝子としてミトコンドリア呼吸鎖の機能に関わる遺伝子群を見いだしている。Ras が活性化した細胞でミトコンドリア呼吸鎖の機能障害が起こると、がん抑制経路(Hippo 経路)を阻害して Upd(炎症性サイトカイン IL-6 のホモログ分子)などを発現するようになり、周囲の良性腫瘍を悪性化(強い増殖促進や浸潤・転移能を獲得)することを明らかにした。

その後、細胞非自律的な腫瘍悪性化の分子機構をさらに解析し、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は活性酸素種を大量に産生して JNK シグナルを活性化し、JNK シグナルが Ras シグナルと協調して Hippo 経路が不活化した結果 Upd 産生が誘導されて、これに応答する周辺細胞が JAK/STAT シグナル依存的に腫瘍悪性化を引き起こすこと(がん原性炎症と命名)を明らかにした。また、Ras 活性化とミトコンドリア機能障害を起こした細胞は、がん抑制タンパク質 p53 などの活性化により細胞老化の特徴である細胞周期の停止を招来し、それが JNK シグナル活性の増強に必須の役割を果たして、炎症性サイトカインなどを分泌する SASP 現象を呈していることを明らかにした。

以上、がん原性炎症を起こした変異細胞が、がんの発生や進展を促す微小環境において重要な役割を果たしている可能性を実験的に示し、本研究課題の当初の目標を十分に達成する成果を取めたと評価する。そのメカニズムが哺乳類においても生ずるもので新たながん治療戦略の基盤となり得るものなのか、またその生理的役割は何なのかなど興味が尽きない。本研究者は、その成果により国内外から高く評価され、研究者としても目覚ましく成長したことは誠に嬉しい。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Enomoto M, Kizawa D, Ohsawa S, <u>Igaki T.</u> “JNK signaling is converted from anti- to pro-tumor pathway by Ras-mediated switch of Warts activity” <i>Developmental Biology</i> (2015) 403, 162-171
2. Nakamura M, Ohsawa S, <u>Igaki T.</u> “Mitochondrial defects trigger proliferation of neighbouring cells via a senescence-associated secretory phenotype in <i>Drosophila</i> ” <i>Nature Communications</i> (2014) 5, 5264
3. Takino K, Ohsawa S, <u>Igaki T.</u> “Loss of Rab5 drives non-autonomous cell proliferation through TNF and Ras signaling in <i>Drosophila</i> ” <i>Developmental Biology</i> (2014) 395, 19-28
4. Enomoto M, <u>Igaki T.</u> “Src controls tumorigenesis via JNK-dependent regulation of the Hippo pathway in <i>Drosophila</i> ”

*EMBO Rep.* (2013) 14, 65–72

5. Ohsawa S, Sato Y, Enomoto M, Nakamura M, Betsumiya A, Igaki T.  
“Mitochondrial defect drives non-autonomous tumour progression via Hippo signalling in *Drosophila*”

*Nature* (2012) 490, 547–551

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Enomoto M, Vaughen J, Igaki T.  
“Non-autonomous overgrowth by oncogenic niche cells: cellular cooperation and competition in tumorigenesis”  
*Cancer Science* (2015) in press (review)
2. Ohsawa S, Takemoto D, Igaki T.  
“Dissecting tumor heterogeneity in flies: genetic basis of interclonal oncogenic cooperation”  
*J. Biochem.* (2014) 156, 129–136 (review)
3. Igaki T., Miura M.  
“The *Drosophila* TNF ortholog Eiger: Emerging physiological roles and evolution of the TNF system”  
*Semin. Immunology* (2014) 26, 267–274 (review)
4. Kunimasa K, Ohsawa S, Igaki T.  
“Cell competition: The struggle for existence in multicellular communities”  
In: Kondoh H, Kuroiwa A, eds. *New Principles in Developmental Processes* (2014) 27–40 (Springer) (review)
5. Ohsawa S, Sugimira K, Takino K, Igaki T.  
“Imaging cell competition in *Drosophila* imaginal discs”  
*Methods in Enzymology* (2012) 506, 407–413 (review)
6. 第11回日本学術振興会賞 (2014年12月受賞)
7. ナイスステップな研究者 2014(科学技術への顕著な貢献 2014)  
(文部科学省 科学技術・学術政策研究所) (2014年12月受賞)
8. プレスリリース
  - 1) “細胞間の相互作用で良性腫瘍ががん化する仕組みを解明” (2012年10月1日)  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20121001/index.html>
  - 2) “老化した細胞ががん化を促進する仕組みをハエで解明” (2014年10月27日)  
<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20141027-2/index.html>