

がん細胞の浸潤における運動様式の転換制御

齊藤 康二, 太田 安隆

1. はじめに

細胞運動は基本的な生命現象の一つとして、多細胞生物では胚発生、免疫応答、傷の治癒などに関与する。一方、細胞運動は病理学的現象においても重要な役割を果たしており、その異常亢進はがん細胞の浸潤、転移を引き起こす。がんによる死亡要因の大部分が原発巣から他臓器への転移であるため、その浸潤、転移の分子メカニズムの解明はがん研究の最重要課題の一つである。

上皮由来のがん細胞は上皮間葉転換 (epithelial to mesenchymal transition: EMT) と呼ばれる形態変化が起きると運動能を獲得する (図1)。これは上皮細胞が上皮としての形質を失い、間葉系の形質を獲得する現象で、細胞間接着の減少やアクチン細胞骨格の再編成などにより運動能を獲得し、間葉系遊走を行う。運動能を獲得したがん細胞は基底膜を破壊し、さらに間質の細胞外マトリクス (extracellular matrix: ECM) 内を移動して進み、血管やリンパ管内へと侵入していく。この過程を「浸潤」という。細胞は移行先の臓器で再び基底膜を破壊して組織内に侵入してECM内へと浸潤し、浸潤した先で増殖することで最終的に「転移」が成立する (図1)。

ECM内における浸潤の過程でがん細胞は、間葉系遊走から丸い形態を示すアメーバ様遊走にその運動様式を変化させることができる (図1)。多くの悪性化したがん細胞はこれら二つの運動様式を外部環境に応じて可逆的に変化させ、効率的にECM内を浸潤する手段を獲得していると考えられている¹⁻³⁾。このような個々の細胞がばらばらに運動能を発揮して移動する様式に加え、複数のがん細胞が接着を維持したまま集塊を形成してECM内を移動する様式も知られている (図1)^{4,5)}。本稿ではこれらのがん細胞の運動様式のうち、個々で運動する間葉系遊走とアメーバ

様遊走に焦点を絞り、それらの特徴と運動様式の転換の分子メカニズムについて、著者らの研究成果⁶⁾も交えて紹介する。

2. 間葉系遊走とアメーバ様遊走

がん細胞がECM内を間葉系遊走するとき、その形態は細長い紡錘状で、前方で膜突起を伸ばし、後方が収縮することで前後軸を形成して運動する (図1)¹⁾。膜突起の形成にはRhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRacが重要な役割を果たしている。Racはそのエフェクター分子であるWAVEを活性化し、活性化されたWAVEがArp2/3複合体と結合するとアクチン重合が促進され、膜突起が形成される。間葉系遊走では細胞とECMとの結合が重要であり、前方にできる膜突起は細胞接着分子であるインテグリンを介したECMとの結合で安定化される。さらにECMとの結合はインテグリンを活性化し、活性化されたインテグ

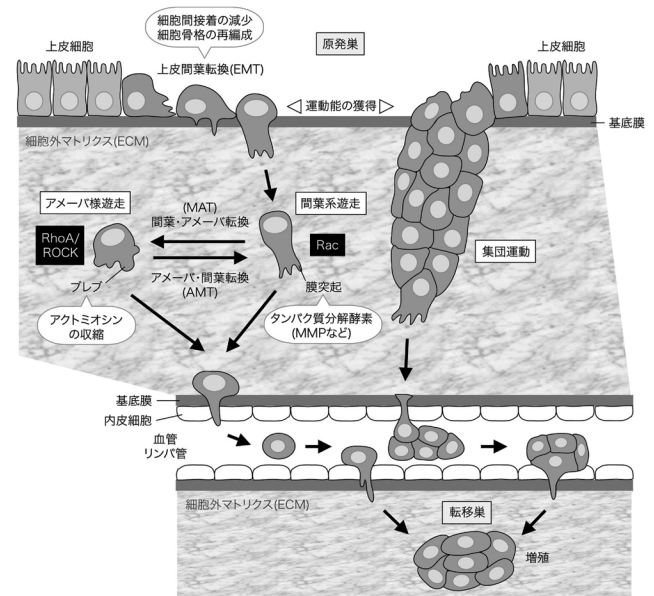


図1 上皮がん細胞の浸潤・転移の過程

個々のがん細胞が浸潤するとき、まず、上皮間葉転換が起きる。その後、Rac依存的な間葉系遊走もしくはRhoA/ROCK依存的なアメーバ様遊走をしながら浸潤し、血管やリンパ管を経て、他臓器へと転移する。浸潤の過程で、がん細胞は可逆的に運動様式を変化させて効率的に浸潤する。個々の運動に加え、集団で浸潤する運動様式も知られている。

北里大学理学部生物科学科細胞生物学講座 (〒252-0373 神奈川県相模原市南区北里1-15-1)

Control of switching between migration modes in cancer invasion
Koji Saito and Yasutaka Ohta (Division of Cell Biology, Department of Biosciences, School of Science, Kitasato University, 1-15-1 Kitasato, Sagami-hara, Minami-ku, Kanagawa 252-0373, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890090

© 2017 公益社団法人日本生化学会

リンはマトリクスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase : MMP) などのタンパク質分解酵素を膜突起に輸送し、それらが分泌されてECMの分解が促進される。このように、間葉系遊走するがん細胞は膜突起を伸ばして前方のECMを分解することで組織内を浸潤していく。

アメーバ様遊走は多くの真核生物の細胞でみられる運動様式で、単細胞生物では細胞性粘菌、多細胞生物では発生期の始原生殖細胞やリンパ球などで観察される。また、一部のがん細胞でもアメーバ様遊走することが明らかになってきた (図1)¹⁾。アメーバ様遊走の原動力は、細胞表層部で起こるアクチン-ミオシン複合体 (アクトミオシン) の収縮である。アクトミオシンが収縮することでプレブと呼ばれる細胞膜の球形の突出が出現し、突出した方に細胞は運動する。アクトミオシンの収縮にはRhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRhoAが関与し、そのエフェクター分子であるRhoキナーゼ (ROCK) 依存的なミオシン軽鎖のリン酸化がその収縮に重要である。アメーバ様遊走は間葉系遊走とは異なり、ECMとの接着やその分解は必須でなく、プレブを前方に押し出して突出させることで線維状のECMの間をすり抜けて浸潤していく。

3. 間葉系-アメーバ様遊走間の運動様式の転換

がん細胞が個々でECM内を浸潤するとき、間葉系遊走とアメーバ様遊走の二つの運動様式を可逆的に変化させて運動できることが明らかになってきた¹⁻³⁾。間葉系遊走からアメーバ様遊走への転換をMAT (mesenchymal to amoeboid transition)、その逆をAMT (amoeboid to mesenchymal transition) という (図1)。このような運動様式の転換は、がんの浸潤に関わる分子を標的とした抗がん剤が限定的にしか治療効果を示さない原因の一つとして考えられている。たとえば、アメーバ様遊走に重要なRhoA/ROCKシグナルの阻害は、間葉系遊走する細胞には影響がない⁷⁾。逆に間葉系遊走に重要なタンパク質分解酵素であるMMPの阻害剤は、アメーバ様遊走する細胞には効果がなく、さらにその阻害はアメーバ様遊走への転換 (MAT) を誘導する^{7,8)}。そこで次に、これまでに明らかになっている運動様式の転換を制御する分子メカニズムを紹介する。

間葉系遊走とアメーバ様遊走は、それぞれRacとRhoAの活性化によって誘導される。この二つの運動様式の転換は、細胞内でのRacとRhoAの活性のバランスによって決定しており、互いに拮抗的 (抑制的) に作用するメカニズムが存在する^{2,3)}。以前、悪性黒色腫 (メラノーマ) において、RacとRhoAによる運動様式の転換の制御メカニズムが報告されている^{7,9)}。まず、RhoA/ROCK経路の阻害が間葉系遊走への転換 (AMT) を誘導することが報告され、RhoA/ROCKシグナルによるアメーバ様遊走の維持機

構が明らかになった⁷⁾。さらに、RhoA/ROCKシグナルはアメーバ様遊走の維持のみならず、アメーバ様遊走への転換 (MAT) にも関与していることが示唆された⁹⁾。このときRhoA/ROCKシグナルは、Racの不活化因子 (GTPase-activating protein : GAP) であるARHGAP22を活性化し、Racを不活化することで間葉系遊走を抑制している。実際、ARHGAP22のノックダウンにより、間葉型の形態をした細胞が増加した。一方、Racの活性化因子 (guanine nucleotide exchange factor : GEF) であるDOCK3とDOCK3と相互作用するNEDD9が、間葉系遊走を維持する機構が明らかになった⁹⁾。さらに、Racのエフェクター分子であるWAVE2が、詳細は不明だがアクトミオシンの収縮とプレブ形成を阻害することでアメーバ様遊走への転換 (MAT) を抑制していることが示唆された⁹⁾。このようにメラノーマにおいて、RacとRhoAが拮抗的に作用し、運動様式の維持や転換を制御するメカニズムの一端が明らかになっているが、その詳細はいまだ不明な点が多い。また、メラノーマ以外のがん細胞における知見は多くない^{10,11)}。

4. Racの不活化因子FilGAPによる運動様式の転換制御

著者らは以前、アクチン繊維架橋タンパク質であるフィラミンAに結合する分子としてFilGAPを同定した¹²⁾。FilGAPは、前述のARHGAP22のサブファミリー分子の一つで、ARHGAP22同様、RacのGAPとしてRac依存的な葉状仮足の形成や細胞伸展の抑制に働く^{12,13)}。このとき、FilGAPはROCKによりリン酸化され、そのリン酸化はFilGAPのRacに対するGAP活性を促進する。また、ROCKによる葉状仮足形成の抑制効果は、FilGAPのノックダウンにより減少した。逆に、FilGAPの過剰発現により起こるプレブ形成の誘導は、ROCKの阻害により抑制された。したがって、FilGAPはRhoA/ROCKによるRacの拮抗作用を直接仲介する分子として機能している。ここでは著者らが明らかにしたFilGAPによるがん細胞の運動様式の転換の制御メカニズムについての結果を紹介したい⁶⁾。

著者らはまず、がんの大半を占める上皮性細胞から生じるがん腫 (カルシノーマ) のいくつかの細胞株 (MDA-MB-231ヒト乳がん由来、A549ヒト肺がん由来、PC3ヒト前立腺がん由来、SW620ヒト結腸がん由来) におけるFilGAPの役割を調べた。実験では生体内環境に近い状態で解析するため、細胞培養用シャーレに、ECMの主成分であるタイプIコラーゲンをゲル状に厚めにコートし、その上に細胞を蒔く方法を用いた⁹⁾。コラーゲンと細胞は接着しつつ、半分ゲルの中に埋まった状態で3次元環境を再現している。細胞の多くはコラーゲンゲル表面の同一焦点深度に存在するので顕微鏡観察および解析が容易なのが利点である。上記のカルシノーマをコラーゲンゲル上で培養

したとき、長いアクチン繊維に富んだ膜突起を持つ間葉型と細胞表層部にアクチン繊維が集積して丸い形態を示すアメーバ型、二つの形態が観察された。このときFilGAPをsiRNAを用いてノックダウンすると、アメーバ型から間葉型への形態の変化が生じた。いくつかのメラノーマでは、ARHGAP22をノックダウンするとアメーバ型から間葉型への変化が起きる⁹⁾。そこでFilGAPの発現が確認できたいくつかのメラノーマの細胞株でFilGAPをノックダウンしたところ、ヒトメラノーマSKMEL2細胞でARHGAP22同様⁹⁾、形態の変化が観察された。一方、上記のカルシノーマ（いずれもARHGAP22を発現している）でARHGAP22をノックダウンしても、FilGAPのような形態変化は生じなかった。なぜFilGAPとARHGAP22のノックダウンの効果ががん細胞の種類によって異なるのかは不明である。しかしこれらの結果は、FilGAPはARHGAP22に比べ、カルシノーマを含む多くのがん細胞の運動形態の制御に関与する分子であることを示唆している。

著者らはFilGAPのがん細胞の運動様式の転換における役割を、上記のMDA-MB-231ヒト乳がん由来細胞（以下MDA細胞）を用いて調べた。MDA細胞は浸潤、転移能が高いがん細胞株の一つである。まず、コラーゲンゲル上のMDA細胞が運動するようすをタイムラプス顕微鏡を用いて観察したところ、頻繁に間葉型とアメーバ型の間で運動様式の転換を行っていることがわかった。そこで、FilGAPをノックダウンしたときの運動様式の転換への影響を調べた。その結果、アメーバ様遊走への転換（MAT）を行う細胞が減少し、間葉系遊走への転換（AMT）を行う細胞が増加した。逆に、FilGAPを過剰発現すると、MATを行う細胞が増加し、AMTを行う細胞が減少した。FilGAPのノックダウンと過剰発現によって生じる形態変化は、FilGAPのGAP活性とRacの活性に依存していた。したがって、FilGAPはMDA細胞において、RacのGAPとしてRacを不活化し、Rac依存的な間葉系遊走を抑制することで、アメーバ様遊走への転換（MAT）を誘導することが示唆された（図2）。

RhoA/ROCKシグナルがアクチンミオシンの収縮とRac活性の抑制に機能し、アメーバ様遊走を誘導することがメラノーマで報告されている⁹⁾。このときRacの抑制にはARHGAP22が関与しているが、ROCKがARHGAP22を直接リン酸化するかどうかは今のところ不明である。前述のとおり、著者らはROCKがFilGAPを直接リン酸化してFilGAPを活性化し、RhoA/ROCKシグナルによるRacの拮抗作用を明らかにしている¹²⁾。そこで、MDA細胞の運動様式の転換において、FilGAPがRhoA/ROCKシグナルの下流でRacを不活化しているのかを調べた。まず、ROCKを過剰発現するとアメーバ型の細胞が増加したが、このときFilGAPをノックダウンすると間葉型の特徴を示す細胞

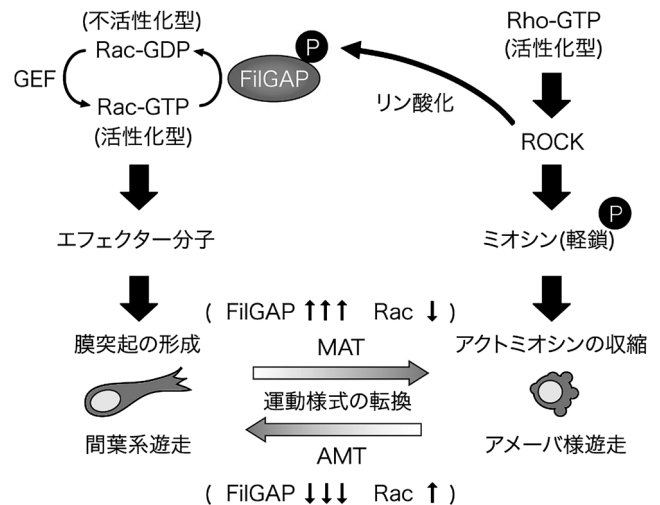


図2 がん細胞の運動様式の転換制御におけるFilGAPの役割（モデル）

FilGAPはROCKによりリン酸化されると、GAP活性が促進されてRacを不活化し、アメーバ様遊走への転換（MAT）を誘導する。逆に、FilGAPの発現が低下すると、細胞内のRacの活性が上昇して膜突起形成が促進され、間葉系遊走への転換（AMT）が誘導される。文献6)より改変。

が増加した。また、FilGAPの過剰発現によって誘導されるアメーバ型の形態は、ROCKの阻害剤であるY27632処理により減少した。これらの結果は、ROCKによるアメーバ様遊走への転換（MAT）の誘導にFilGAPが関与していることを示唆している。そこでROCKによるFilGAPのリン酸化がその誘導に関与しているのかを調べた。ROCKによってリン酸化されるセリン/トレオニンアラニンに置換した非リン酸化型FilGAP変異体を過剰発現してもアメーバ型の細胞は増加しなかったが、アスパラギン酸に置換した疑似リン酸化FilGAP変異体では、野生型のFilGAP同様、アメーバ型の細胞が増加した。疑似リン酸化FilGAP変異体のこの効果は、Y27632で処理してもみられた。さらに、FilGAPのリン酸化状態と細胞形態との関連性を調べた。コラーゲンゲル上のMDA細胞をRhoA/ROCKシグナルを活性化する因子であるリゾホスファチジン酸（LPA）で処理したとき、細胞は急速に収縮し、大部分の細胞が30分ほどでアメーバ型の形態になり、その後徐々に間葉型の形態へと変化した。この形態変化と一致して、FilGAPのリン酸化状態は30分で最大となり、その後徐々に減少した。おそらく、アメーバ型の細胞でFilGAPが高いリン酸化状態にあると推察される。これらの結果から、FilGAPがRhoA/ROCKシグナルの下流でリン酸化され、Racの不活化を促進することでアメーバ様遊走への転換（MAT）に関与していることが示唆された（図2）。

最終的に著者らは、FilGAPのがんの浸潤に対してどのような役割があるのかを調べた。まず、MDA細胞を用い

て生体外コラーゲンゲル浸潤アッセイを行った結果、FilGAPのノックダウンにより浸潤能が低下し、逆にその過剰発現により浸潤能が促進した。さらに、マウスを用いた血管外遊走アッセイにより、MDA細胞の肺における浸潤能がFilGAPのノックダウンで抑制された。このようにFilGAPはがんの浸潤に対して亢進的に働く分子であることが示唆された。

5. おわりに

本稿で紹介した間葉系遊走とアメーバ様遊走以外にも、さまざまな個々および集団での運動様式が存在し、がん細胞は浸潤するとき、それらの運動様式を可逆的に変化させる能力を有することが近年明らかになってきている^{4,5)}。このような運動様式の多様性と可逆的な変化が、浸潤に関わる分子を標的にした抗がん剤によるがん治療の効果を低下させる一因となっている可能性が示唆されている。したがって、それぞれの運動様式に重要な分子に対する抗がん剤の複合投与、もしくは運動様式の転換に関わる分子の阻害が、がん治療においてより効果を発揮するかもしれない。いずれにせよ、これらの分子メカニズムのさらなる解明が、がんの治療法の開発および改善にとって重要であろう。一方で、このような運動様式の転換がどのくらいがんの浸潤と転移に本当に貢献しているのか、いまだに不明な点は多い。著者らが報告したFilGAPによるがん細胞の運動様式の転換と浸潤との関連についてもその詳細は明らかではない。また最近では、上皮由来のがん細胞が最初にECM内に浸潤するために必要不可欠とされた形態変化であるEMTについてもその必要性が議論の的となっている

る^{14,15)}。今後、実際のがんの浸潤、転移における形態変化や運動様式の転換の意義が解明されることが期待される。

文 献

- 1) Sahai, E. (2005) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 87–96.
- 2) Sanz-Moreno, V. & Marshall, C.J. (2010) *Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 690–696.
- 3) Prarri, M. & Chiarugi, P. (2010) *Cell Commun. Signal.*, **8**, 23.
- 4) Friedl, P. & Alexander, S. (2011) *Cell*, **147**, 992–1009.
- 5) Gandolovičová, A., Vomastek, T., Rosel, D., & Brábek, J. (2016) *Oncotarget*, **7**, 25022–25049.
- 6) Saito, K., Ozawa, Y., Hibino, K., & Ohta, Y. (2012) *Mol. Biol. Cell*, **23**, 4739–4750.
- 7) Sahai, E. & Marshall, C.J. (2003) *Nat. Cell Biol.*, **5**, 711–719.
- 8) Wolf, K., Mazo, I., Leung, H., Engelke, K., von Andrian, U., Derjugin, E., Strongin, A., Brocker, E., & Friedl, P. (2003) *J. Cell Biol.*, **160**, 267–277.
- 9) Sanz-Moreno, V., Gadea, G., Ahn, J., Paterson, H., Marra, P., Pinner, S., Sahai, E., & Marshall, C.J. (2008) *Cell*, **135**, 510–523.
- 10) Sahai, E., Garcia-Medina, R., Pouyssegur, J., & Vial, E. (2007) *J. Cell Biol.*, **176**, 35–42.
- 11) Yamazaki, D., Kurisu, S., & Takenawa, T. (2009) *Oncogene*, **28**, 1570–1583.
- 12) Ohta, Y., Hartwig, J.H., & Stossel, T.P. (2006) *Nat. Cell Biol.*, **8**, 803–814.
- 13) Morishita, Y., Tsutsumi, K., & Ohta, Y. (2015) *J. Biol. Chem.*, **43**, 26328–26338.
- 14) Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., Schwabe, R.F., Vahdat, L.T., Altorki, N.K., Mittal, V., & Gao, D. (2015) *Nature*, **527**, 472–476.
- 15) Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.C., LeBleu, V.S., & Kalluri, R. (2015) *Nature*, **527**, 525–530.

著者寸描

●齊藤 康二 (さいとう こうじ)



北里大学理学部生物科学科細胞生物学講座助教。博士(医学)。

■略歴 1974年愛媛県に生る。98年北海道大学水産学部卒業。2000年同大大学院修士課程修了。00～02年(株)医学生物学研究所勤務。06年北海道大学大学院医学研究科博士課程修了。デューク大学メディカルセンター博士研究員を経て、09年より現職。

■研究テーマと抱負 細胞運動や細胞形態を制御する分子機構の解明。細胞が運動する際の極性の形成機構について、Rhoファミリー低分子量G蛋白質によるアクチン細胞骨格系の制御を中心に解明したい。

■ウェブサイト <http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/kino/Home.html>

■趣味 テニス、音楽鑑賞。

●太田 安隆 (おおた やすたか)



北里大学理学部生物科学科細胞生物学講座教授。博士(理学)。

■略歴 1958年東京都に生る。82年東京大学理学部卒業。87年同大大学院博士課程修了。87年熊本大学医学部助手。93年ハーバード大学医学部助手。99年ハーバード大学医学部助教授。2007年より現職。

■研究テーマと抱負 動物細胞の形態形成、接着、移動の分子機構を解析することで、生体の組織構築のメカニズムを明らかにしたい。

■ウェブサイト <http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/kino/Home.html>