

総 説

がん細胞の分化転換と TGF- β

齋 藤 正 夫

山梨大学医学部生化学第二教室

要 旨：低分化型や高分化型など、がん細胞の細胞分化度は悪性度の指標となっている。しかしながら、成熟した正常上皮細胞由来のがん細胞の分化度がなぜ変化するのであろうか？がん化に伴い、未分化性の形質を獲得する分化機構を上皮間葉転換 (EMT) と呼び、本来個体発生時に観察された現象である。近年、がん幹細胞仮説同様に、EMT が悪性度の規定に大きく貢献していることが示唆され、また EMT を強力に誘導する因子である TGF- β の作用も非常に注目されている。

キーワード TGF- β , 上皮間葉転換, 癌

I. はじめに

がん細胞の分化度の制御調節機構のひとつとして、また線維症の線維芽細胞発生機構として EMT (epithelial-mesenchymal transition; 上皮間葉転換) が着目されている。EMT はいくつかの転写因子により誘導され、TGF- β (transforming growth factor- β) などのサイトカインや細胞増殖因子は、これら転写因子の発現を増加させ EMT を誘導する。これまでの研究により、EMT がこれらの疾患の病態を悪化することから、EMT の検出や制御することが、診断や治療に有用であると考えられる。そこで、本稿では、EMT の概要や、TGF- β による EMT 誘導の分子機構、また今後の展望などに関して、その概略を紹介したい。

れる現象である。初期の胚形成における原腸形成では、外胚葉から離脱し胚中心に移動する細胞が EMT を獲得し、後に線維芽細胞などを形成する中胚葉を構成するようになる。また神経上皮細胞の神経堤から間葉組織への移動も EMT に伴う細胞分化が関与している。このような上皮細胞の分化転換が口蓋形成や心臓の弁形成など、多くの器官発生に関与している (図 1)。逆

II. EMT

EMT は 1980 年代はじめに、Elizabeth Hay らによって提唱され¹⁾、個体形成の初期に観察さ

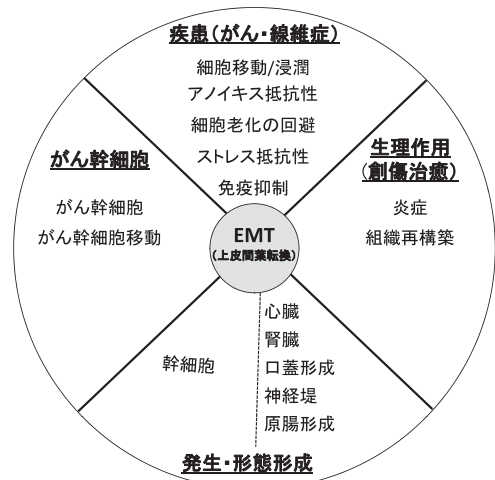


図 1. 上皮間葉転換

〒 409-3898 山梨県中央市下河東 1110 番地
 受付：2012 年 9 月 25 日
 受理：2012 年 11 月 16 日

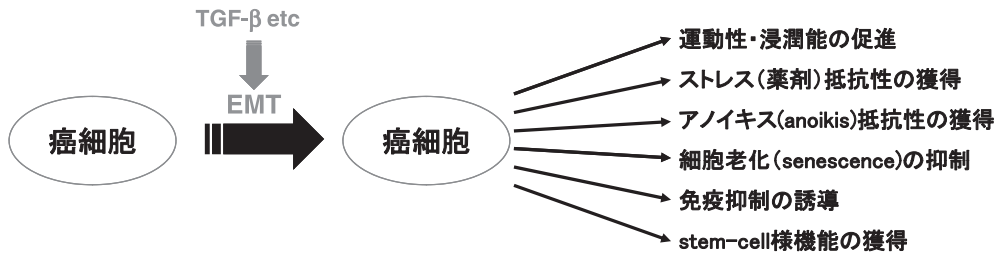


図2. 癌細胞における EMT と形質変化

EMT を誘導された癌細胞は、運動性などの細胞機能が変化し、癌の悪性化の亢進に関与している。

に一部尿管上皮細胞は周囲の間質細胞から、間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: MET) により発生する。これらの発生過程における EMT を I 型 EMT と呼ぶこともある²⁾。一方、成体では、創傷治癒や線維性病変において観察され、II 型 EMT と呼ばれる。創傷治癒では血餅中の血小板や炎症細胞などから放出された増殖因子やサイトカインが、創傷近傍の上皮細胞に作用して EMT のプロセスを ON にする。EMT を獲得した上皮細胞は間葉系細胞様の形質をもち、血餅を囲い込むように間質内を移動し、最終的に、治癒過程が終了すると、MET により元の上皮細胞に戻ると考えられている。また線維性病変においては、モデルマウスによる研究から、増殖した線維芽細胞の約 20-30% が EMT による上皮細胞由来であることも示されている。

III. 癌の悪化促進機構としての EMT

創傷治癒と類似した、癌組織でも EMT が同様に起こると考えられている³⁾。創傷治癒の場合は、血餅中の液性因子により周囲上皮細胞が EMT を獲得するのに対し、癌組織では、主に癌細胞が産生する因子より、癌細胞自身が EMT を獲得する (III 型 EMT)。癌細胞の浸潤・転移における EMT 役割は多岐にわたる (図2)。転移は原発巣で増殖した癌細胞が基底膜を破壊して間質へと浸潤することから始まる。EMT により細胞極性が喪失した癌細胞では、アクチンストレスファイバー (アクチンフィラメント

の再構築) が形成され、運動能力が亢進する。また、MMPs (matrix metalloproteinases) などの細胞外プロテアーゼの分泌が促進されることにより基底膜のタイプ IV コラーゲンが分解され、癌細胞は間質へと浸潤していく。間質へと浸潤した癌細胞は脈管系に侵入し、circulating tumor cells (CTC) となって血流を循環し、標的臓器へと到達する。近年、EMT を起こした癌細胞が、血管新生因子である VEGF-A の発現を誘導することにより血管新生を促進することや、VE-cadherin や N-cadherin の発現を介し血管内皮細胞との接着を強め、血管侵入することも報告されている。こうして血管内へと侵入した癌細胞はアノイクスや血流圧など物理的、化学的なストレスに晒され、EMT 獲得細胞がアポトーシスシグナルを抑制することで、細胞死を回避し血管内での生存が可能となる。また、近年では EMT を起こした細胞が、抗癌剤耐性や放射線耐性の獲得や、幹細胞マーカーを発現することから、癌幹細胞の形成にも寄与していることが明らかとなっている。したがって、EMT は癌の転移・浸潤だけでなく、癌の発生などさまざまな局面で関与し、悪性度の亢進において重要な役割を果たしている⁴⁾。

免疫組織学的には、癌組織の胞巣中心部ではなく間質近傍の癌細胞や浸潤端の癌細胞に E-cadherin の発現低下が、古くより観察されている。このことは、癌組織の癌細胞に一樣に EMT が起こるのではなく、偏りをもって発生し、癌自身が産生する因子以外に、間質から

のシグナルによる協調作用が EMT 誘導に必要な可能性を示している。EMT を獲得した癌細胞は、癌周囲の間質細胞や reactive stroma (反応性間質) からの細胞が産生する液性因子により悪性形質を持続しながら、間質内の様々なストレスに耐え、浸潤や血管内での移動を容易にする。一方、転移巣では異質な微小環境のため、MET により原発巣の形質に戻ると考えられている。また、創傷治癒同様に、癌周囲の正常上皮細胞にも EMT がおこり、CAF (cancer-associated fibroblast; 癌関連線維芽細胞) の発生の要因としても考えられているほか、血中循環腫瘍細胞や癌幹細胞の発生にも密接な関与が報告されており、EMT は癌の悪性度を亢進させる重要なステップのひとつである³⁾。

IV. TGF- β シグナルによる EMT 誘導の分子機構

これまでに、生体内で EMT を引き起こす因子を探るため、主に培養細胞を用いた EMT 誘導因子の研究が広く行われてきた。TGF- β 、FGFs (fibroblast growth factors; 線維芽細胞増殖因子)、HGF (hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子)、EGF (epidermal growth factor; 上皮細胞増殖因子)、PDGF (platelet-derived growth factor; 血小板由来増殖因子)

などの増殖因子の EMT 誘導作用が報告されているが、中でも TGF- β は最も代表的な EMT 誘導因子として知られている。TGF- β は上皮細胞の細胞増殖を抑制することから、当初、癌抑制因子として認識された。実際、TGF- β 受容体やシグナル分子の遺伝子変異が多くの癌細胞で認められ、また遺伝子改変マウスの解析から TGF- β シグナルからの逸脱が癌化発症の重要な過程の一つであることが明らかとなっている。その一方で、TGF- β 受容体の特異的阻害剤などを用いたマウスの解析から、TGF- β は進行した癌においては細胞外基質の蓄積や抗アポトーシス作用、癌微小環境に対する血管新生、免疫抑制作用など、癌の進展を促進する作用も持つ事が明らかとなっている。EMT の誘導はそうした TGF- β の悪性化促進作用の一端であると考えられている。われわれは、癌細胞の中で、ras 遺伝子に恒常活性化型変異を持つ細胞株でのみ TGF- β による Snail (後述) の発現が顕著に上昇することを見出した⁵⁾。そこで、K-ras に恒常活性化型変異を持つ膀胱癌細胞の K-ras をノックダウンすると TGF- β による Snail の発現上昇と E-cadherin の発現抑制が阻害された。さらに ras 遺伝子に異常を持たない癌細胞に ras を過剰発現させると TGF- β による Snail の発現上昇が認められるようになった

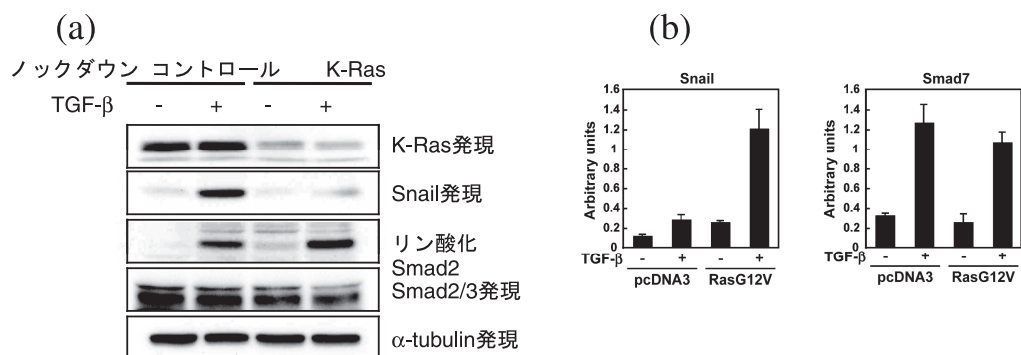


図3. 癌細胞における K-ras の TGF- β シグナルにおよぼす影響

(a) K-ras に遺伝子変異のある膀胱癌細胞を siRNA で k-ras をノックダウンすると TGF- β による Snail の発現が減弱したが、リン酸化 Smad2 は顕著な差を認めなかった。(b) ras 遺伝子に異常をもたない癌細胞に、活性化型 ras (RASG12V) を遺伝子導入すると、TGF- β によって内在性 Snail の発現が増加した。しかし、一般的な TGF- β 標的遺伝子の Smad7 の発現は対照細胞と顕著な差を認めなかった。

た。しかしこの条件下では TGF- β シグナルの一般的な標的遺伝子である Smad7 や PAI1 などの発現には影響が見られなかったことから、TGF- β シグナルと ras シグナルの協調作用は Snail に特異的であることがわかり、EMT 誘導に重要なメカニズムであることが示唆された (図 3)。このことは非常に興味深い新規なメカニズムである。これまでに ras シグナルは Smad のリンカー領域を間接的にリン酸化し、Smad の核移行を阻害するばかりでなく、分解を亢進させることが知られていた。これは、癌遺伝子産物である ras が、癌抑制因子である TGF- β シグナルを遮断することで、癌化を誘導することを意味し、受け入れやすい概念である。実際、我々もこれらの作用を確認しているが、Snail の発現はこれらに依存しない。したがって、癌の発生においては TGF- β シグナルの抑制は必須なプロセスのひとつである一方、TGF- β シグナルの再活性化は、進行した癌の悪性度をさらに亢進させるために必要であることが示唆される。したがって、この TGF- β シグナルの再活性化の分子機構を解明することにより、癌の悪化を予防できることが期待され、また TGF- β の癌に対する双方向性の作用の理解につながると思われる。

V. EMT 獲得細胞の検出

前述したように EMT を誘導するサイトカインとして、EGF, Wnt, TGF- β などがある。TGF- β は癌細胞が自ら産生し EMT を誘導する⁶⁾。また近年、TGF- β は TNF- α や他の増殖因子 (FGF や EGF) と協調して EMT を効果的に増強することが報告されている⁷⁻⁹⁾。癌間質内の腫瘍関連マクロファージ (TAM: Tumor-associated macrophage) が TNF- α を分泌することから、癌細胞自身の TGF- β と間質からの TNF- α の協調作用の結果 EMT が強力に誘導され、間質近傍の癌細胞で E-cadherin の減弱が観察されている結果と一

致する。EMT は一群の EMT 誘導転写因子によって制御されている。これら転写因子には、E-cadherin を直接抑制する zinc finger 型転写因子の Snai ファミリー (Snail, Slug Smuc) や ZEB ファミリー (ZEB1, ZEB2), そして間接的に調節する bHLH 型転写因子の twist などがある。TGF- β 誘導性 EMT では、膵癌細胞 Panc-1 では Snail が、乳癌細胞では ZEB1/ZEB2 が必要十分であるが、これら細胞・組織依存的な EMT 誘導転写因子の巧みな発現調節機構に関する意義や分子機序に関してはわかっていない。また、EMT 誘導転写因子は発現調節以外にもリン酸化やユビキチン化など翻訳後修飾によりタンパク質安定性が制御され活性を調節しながら、EMT を制御している。

EMT が癌の悪化を促進することから、EMT 獲得癌細胞を生体内で評価することは診断や治療の観点上非常に重要であると思われる。しかしながら、EMT を獲得した癌細胞は間葉細胞様の形質を獲得するため、Snail や ZEB などの EMT 誘導転写因子を恒常的に発現している間質内線維芽細胞との鑑別が非常に困難である。それ故、現在、上皮マーカー低発現で癌細胞の形態学的特徴 (核の異形性や細胞の形態など) を維持し、間葉系マーカー陽性の細胞を EMT と評価しているのが現状である。同様に、EMT を介して発生した癌幹細胞や正常上皮細胞由来の CAF も、その特有な分子マーカーがなく、生体内での評価は十分ではない。今後、EMT 誘導の分子機構をもとにした新たな EMT マーカーの開発と、それを応用した癌の悪性度の評価が期待される。

VI. EMT と若返り

成熟した線維芽細胞に、山中 4 因子を外来性に遺伝子導入すると、多分化能をもった未分化細胞 (IPS; Induced Pluripotent Stem cells) ができる。これは、人工的ではあるが mature な細胞から immature な細胞への分化転換であり、「若返り」が起こる。一方、がんの診断の

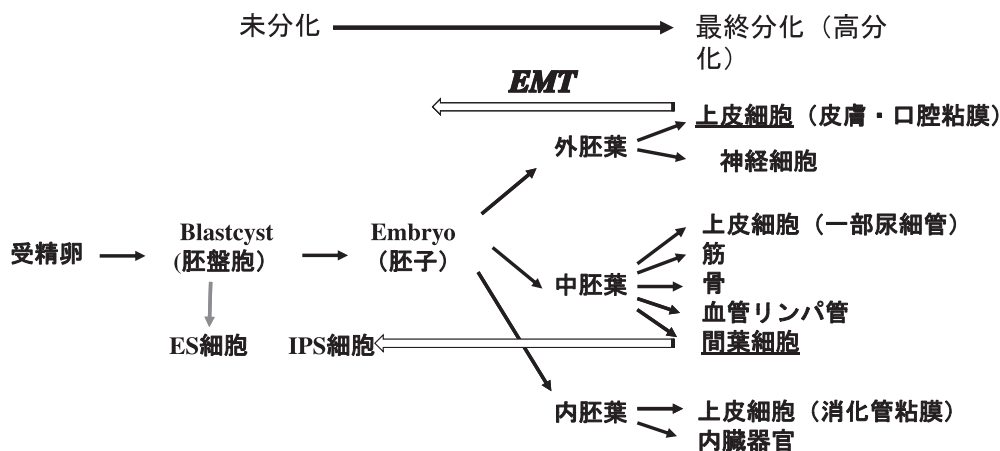


図4. 細胞分化と EMT

生体の細胞はすべて1つの受精卵から発生し、三胚葉を介し、最終分化した成熟細胞と至る一方方向性 (forward-directional) である。山中4因子の導入により、人工的ではあるが、成熟細胞から未分化性のIPS細胞を作ることができることは、逆方向性 (reverse-directional) の素質を内在していることを意味し、EMTは逆方向性のスイッチをいれる生理・病理的なステップである。ただし、EMTを獲得した細胞は、未分化性を獲得した後、間葉細胞様の形質を獲得する。

ひとつに癌胎児性抗原の検出がある。この胎児の血清タンパク質は、本来成熟した上皮細胞では産生していないが、癌化や慢性炎症により、腫瘍細胞や炎症に晒された上皮細胞 (?) が産生するようになり、あたかも、胎児性の形質を獲得したごとくである。この分化転換に EMT が非常に重要であると考えられている。実際、上皮細胞やがん細胞に Snail や Twist を過剰発現させると未分化細胞マーカーの発現が誘導される¹⁰⁾ (図4)。したがって、人工的に IPS 細胞を形成する過程の一部は、本来生体に備わった EMT を駆使している可能性もあるとともに、これまで未分化から最終分化への一方方向性 (forward direction) だった分化過程が、最終分化から未分化性への逆方向性 (reverse direction) の「若返り」過程も存在することが明らかとなり、今後非常に研究が発展する領域であろう。

VII. おわりに

転移にいたる過程は非常に多段階であるが、最初のステップである浸潤を開始する「きっかけ」は、EMTの獲得に起因するかもしれない。また、EMTは血中循環腫瘍細胞や癌幹細胞の発生、そして再発癌にも深く関与していることから、癌の悪化に密接に関与している EMT を標的とした診断や治療への応用も将来有効であると考えられる。

最近、正常細胞が異常な細胞と接している環境では、細胞競合 (cell competition) として知られる概念が話題となっている。これは、個体の中で、近接する細胞同士は「適応性」競合しており、その勝者のみが生き残り、敗者は消え去るという概念であり、ショウジョウバエの実験により明らかとなった。この適応性は環境によりことなり、それらが巧みに制御されることで個体発生や疾患に関連している。癌細胞と正常細胞間でも、細胞競合が示唆されており、今後、細胞競合や EMT による新規な上皮細胞

間相互作用の解明により，癌の新たな悪性化の促進機構が明らかになるかもしれない。

文 献

- 1) Greenburg G, Hay ED.: Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* 95: 333–339, 1982.
- 2) Kalluri R, Weinberg RA.: The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119: 1420–1428, 2009.
- 3) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA.: Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871–890, 2009.
- 4) 宮澤恵二・伊東進 編『がん増殖と悪性化の分子機構』2012 印刷中.
- 5) Horiguchi K, Shirakihara T, Nakano A, Imamura T, Miyazono K, Saitoh M.: Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.* 284: 245–253, 2009.
- 6) Saitoh M. and Miyazawa K.: Transcriptional and post-transcriptional regulation in TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. *J. Biochem.* 151: 563–571, 2012.
- 7) Shirakihara T, Saitoh M, Miyazono K.: Differential regulation of epithelial and mesenchymal markers by δ EF1 proteins in epithelial mesenchymal transition induced by TGF- β . *Mol. Biol. Cell* 18: 3533–3544, 2007.
- 8) Shirakihara T, Horiguchi K, Miyazawa K, Ehata S, Shibata T, *et al.*: TGF- β regulates isoform switching of FGF receptors and epithelial-mesenchymal transition. *EMBO J.* 30: 783–795, 2011.
- 9) Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, *et al.*: TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* 3: 3190–3201, 2012.
- 10) Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, *et al.*: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* 133: 704–715, 2008.