

# 「細胞脱落における細胞間接着の動態の解析」 研究経過報告

梶 田 春 奈\*  
川 根 公 樹\*

## 要 旨

上皮細胞の終焉は、「細胞脱落」と呼ばれる様式による組織からの剥離である。細胞脱落では、脱落細胞と隣接細胞の境界にアクチンとミオシンからなるアクトミオシンリングを形成し、このリングが収縮することで脱落細胞が押し出されると考えられている。脱落細胞が占めていたスペースは隣接細胞によって速やかにシールされ、上皮の恒常性は維持される。すなわち細胞脱落は、脱落細胞と隣接細胞との相互協調作用によって行われる「細胞社会における細胞終焉」と位置づけられるが、その機構についてはほとんどが未解明である。上皮組織では、上皮細胞が異なる特徴と役割を持った種々な細胞間接着によって緊密に連携した細胞社会を形成しており、脱落細胞と隣接細胞間に存在する細胞間接着が消失しなければ細胞は脱落できないと考えられるが、一方で接着の消失はバリアの破綻組織の恒常性を脅かす恐れがある。細胞はこの矛盾を解決するために洗練された機構を進化させてきたと考えられるがその詳細は明らかではない。

私達は、細胞脱落における細胞間接着の動態とその制御機構を明らかにすることを目的とし、物理的な細胞間接着を担うアドヘレンスジャンクションの動態解析を、哺乳類培養細胞株を用いたライブイメージング解析によって行ってきた。これを踏まえ、本研究ではショウジョウバエの生体上皮を用いてアドヘレンスジャンクションの動態解析を行い、同様の動態が生体内でも観察されること、及びこの動態がスムーズな細胞脱落の実行に役割を果たす可能性を強く示唆した。この研究をさらに推進することで、細胞社会においてどのように細胞は終焉を迎えるかという重要な細胞生物学の命題の理解がもたらされると期待される。

キーワード：細胞脱落，細胞死，細胞間接着，カドヘリン，上皮

## 1. はじめに

上皮細胞の一生の終わりは、多くの場合、「細胞脱落」と呼ばれる様式による組織からの剥離である（図1）。細胞脱落は、老化した細胞や、アポトーシスを起こした細胞及び、癌細胞、細胞競合の

---

\* 京都産業大学生命科学部

際に敗者となった細胞など、生体にとって過剰あるいは不要、有害な細胞を除去するための、機構である<sup>1-4</sup>。細胞脱落は哺乳類の腸上皮、魚類の胚上皮、昆虫の蛹期上皮や成虫原基などで報告されており、上皮細胞に普遍的な細胞現象と考えられる<sup>5-7</sup>。例えば哺乳類の小腸では、古くなった細胞は絨毛の頂端部で細胞脱落をおこし、管腔へ剥離して終焉を迎える。細胞脱落では、まず何らかの要因により脱落する細胞が決定され、次に脱落細胞は隣接する細胞によって認識され、続いて隣接細胞は脱落細胞との境界にアクチンとミオシンの複合体であるアクトミオシンリングを形成し、このリングが収縮することで脱落細胞は押し出されると考えられている<sup>8-10</sup>。脱落細胞が占めていたスペースは隣接細胞によって速やかにシールされ、上皮の恒常性は維持される。このように脱落細胞と隣接する細胞の相互協調作用により実行される点が細胞脱落の大きな特徴である。

上皮組織では、上皮細胞が互いに細胞間接着によって強固に接着し、細胞が緊密に連携した細胞社会を形成している。細胞間接着のひとつであるアドヘレンスジャンクションは、細胞間の物理的接着や力の伝達を担う。アドヘレンスジャンクションの接着分子である E-cadherin は膜貫通タンパク質であり、細胞外領域の 5 つの EC ドメインが、隣接細胞が持つ E-cadherin と、カルシウムイオン存在下で同種結合することで細胞間接着を形成する<sup>11</sup>。E-cadherin の細胞内ドメインには、 $\alpha$ -catenin や  $\beta$ -catenin を介してアクチンフィラメントが連結し、細胞間の張力の形成、伝達によって、個々の細胞あるいは集団での細胞運動などを始めとした様々な細胞の挙動に重要な役割を果たしている<sup>12,13</sup>。細胞脱落の局面を考えた時、これらの細胞接着が消失しなければ細胞は組織を離脱できないと考えられるが、一方で接着の消失は上皮組織のバリア破綻など、組織の恒常性維持を妨げる恐れがある<sup>14,15</sup>。よって、細胞脱落における細胞間接着の動態を明らかにすることは、細胞脱落を上皮組織の恒常性との関連で理解する上で重要であるがその詳細は明らかではない。私たちの研究室では、これまでに、哺乳類培養細胞を用いた解析を行い、細胞脱落時のアドヘレンスジャンクションの動態を明らかにすることにしてきた。すなわち、脱落細胞と隣接細胞間のアドヘレンスジャンクションは脱落完了直前に消失し、その後隣接細胞間で新たなアドヘレンスジャンクションが形成されることが明らかとなった。これらの動態によって、細胞が脱落する際に、バリア機能を維持しつつ効率よく細胞を組織から離脱することを可能にしていると考えられる。

しかし、これらの動態が生体内でも観察されるか、及び、この動態が細胞脱落や組織の恒常性に果たす役割は、まだ示されていない。本研究は、ショウジョウバエの生体上皮のライブイメージング解析を行い、これらの問題に答えを得ることを目的とした。

## 2. 方法

### 2-1. ショウジョウバエの飼育と使用系統

通常時は 25°C で飼育し、2 日に一回、新しい餌の入ったバイアルに移し替えを行った。系統は、endo-DE-Cad::GFP と ubi-DEcad::GFP (Kyoto Stock Center, ID:109007) を使用した。

## 2-2. ショウジョウバエの蛹の上皮細胞のタイムラプス撮影

蛹化してから 16 時間後に両面テープを貼ったスライドガラス（松浪硝子）に蛹を固定し、光学顕微鏡の下でピンセットを用いて殻を除去した後、ミネラルオイル（Sigma）を滴下した蛹の腹部背面上皮に接触するようにカバーガラス（松浪硝子）を置いた。蛹の殻を外さずに撮影した際は、両面テープを貼ったスライドガラス（松浪硝子）に蛹を固定した後、そのまま蛹の腹部背面上皮に接触するようにカバーガラス（松浪硝子）を置いた。その後、共焦点レーザー顕微鏡（TCS SP8, Leica）を使用し、25 °C 環境下で x 63 の対物レンズにオイル（Type F Immersion Liquid, Leica）を滴下し、1024 x 1024 pixel の解像度、AFC（Adaptive Focus Control）モードで焦点のズレを補正した上で 0.5  $\mu\text{m}$  間隔でタイムラプス撮影を行い、画像を取得した。

## 2-3. ショウジョウバエの蛹の上皮細胞の定量方法

取得した Z-stack 画像を解析用ソフトである LAS X 上で Maximum intensity projection 処理し、解析用ソフトの ImageJ を使用して解析を行った。

## 2-4. 面積の測定

Polygon selection ツールを用いて、脱落細胞と隣接細胞が接する細胞境界を E-cadherin のシグナルを基準に脱落細胞の周囲を囲んで面積を測定し、相対値を算出した。脱落開始点は、面積の相対値の減少を開始した点とした。その後、脱落開始点の輝度を 1 とした相対値を算出し、グラフに示した。

## 2-5. 輝度の標準偏差の相対値の測定

Segmented line ツールを用いて、line 幅を 3 に設定した上で脱落細胞と隣接細胞が接する細胞境界のうち、3 つの細胞の頂点が接する領域であるトリセルラージャンクションを除いた E-cadherin のシグナルを測定し、輝度の標準偏差を算出した。測定した辺は、細胞脱落完了直前まで残存する辺のうち、2 辺とした。細胞脱落開始時の輝度の標準偏差を 1 とした相対値を算出し、細胞脱落完了直前の値を基準にグラフに示した。

## 3. 結果と考察

生体内においてアドヘレンスジャンクションの動態を調べるため、ショウジョウバエ蛹上皮細胞において、細胞脱落時の E-cadherin の動態を観察した。ショウジョウバエの腹部背面上皮では、変態に伴い、幼虫の上皮細胞が体側面から移動してくる成虫の上皮細胞に数時間の間に完全に入れ替わる<sup>16</sup>。この時、幼虫細胞に囲まれた幼虫細胞および成虫細胞との境界に位置する幼虫細胞が細胞脱落によって basal 方向に脱落し、上皮組織から除去される。

この変態期のショウジョウバエの蛹の上皮において、ノックイン法によって内在性の E-cadherin の発現レベルで E-cadherin と GFP の融合タンパク質を発現するショウジョウバエ系統を用いて、解

析を行った。その結果、脱落細胞と隣接細胞の境界における E-cadherin の蛍光シグナルが、脱落開始から 30 分経過後に消失した（解析した脱落細胞 10 個中 9 個で観察された）。そして、脱落開始から 40 分後には脱落細胞の basal 側に侵入した隣接細胞間で新たな E-cadherin の形成が観察された。よって、*in vivo* においても、細胞脱落の実行過程において脱落細胞と隣接細胞間のアドヘレンスジャンクションが消失し、その後隣接細胞間で新たなアドヘレンスジャンクションが形成されることが明らかとなった。

これらの明らかになったアドヘレンスジャンクションの動態から、細胞脱落の際、E-cadherin を細胞膜から消失することが、上皮組織から細胞を除去するために重要であることが示唆された。これを検証するため、ユビキチンプロモーターを用いて E-cadherin と GFP の融合タンパク質を過剰発現させたショウジョウバエ系統を使用して同様の解析を行った。この系統の蛹上皮では、脱落開始から 100 分が経過しても細胞脱落が完了しておらず、脱落開始から 130 分後に消失が観察され、脱落開始から 150 分後に脱落細胞の apical 側に侵入した隣接細胞間で新たなジャンクションの形成が観察された（解析した脱落細胞 6 個中 5 個で観察された）。この結果を詳細に検証するため、脱落細胞と隣接細胞部の境界に存在する GFP をもとに脱落細胞の面積を定量したところ、内在性の E-cadherin のみを発現する系統において細胞脱落に要する時間が平均して 71 分となるのに対し、E-cadherin を過剰発現させた系統では脱落に要する時間が平均して 139 分と、約 2 倍延長することがわかった。この結果より、E-cadherin の発現量が増加すると細胞脱落が遅延することが明らかとなり、E-cadherin の消失が速やかな細胞脱落の実行に関与することが示唆された。

#### 4. 今後の展開

今回の結果より、「脱落細胞と隣接細胞間のアドヘレンスジャンクションは脱落完了直前に消失し、その後隣接細胞間で新たなアドヘレンスジャンクションが形成される」、細胞脱落におけるアドヘレンスジャンクションの、種を越え保存された動態が明らかとなった。さらに、この動態が、細胞脱落の実行を促進させている可能性が示せたことはこの機構の異常が生体に何らかの不都合や疾患をもたらす可能性を示唆するもので興味深く、今後も慎重に検討を進める必要がある。今回行った E-cadherin の量を増加させた実験に加え、減少させた場合にも同様の実験を行うことで検証を進めていきたい。また、E-cadherin の細胞境界からの消失の機構を明らかにすることが必要であり、エンドサイトーシスによる取り込みである可能性を中心に、解析を進めていきたい。

上皮組織は接着により上皮細胞を強固に固定し、バリア機能を担うなど、恒常性を維持している。一方でターンオーバーにおいて細胞脱落の過程は恒常性を乱す一因となる可能性がある。細胞脱落は、この問題を解決しながら細胞を組織から除去する動態であると位置付けることができる。上皮組織という細胞が緊密に連携した細胞社会からその構成細胞を除去する局面では、ただ細胞が死ぬのみでは不十分で、上皮恒常性を維持するための付加的な機構や制御が必要であり、今回明らかとなった接着分子の動態変化もその重要な一例と位置づけることができると考える。この知見は、細胞脱落の本質

である、脱落細胞と隣接細胞の相互協調作用における、重要な隣接細胞側の役割の一つを明らかにしたもので、細胞社会においてどのように細胞は終焉を迎えるかという細胞生物学の命題の理解に貢献するものである。

## 5. 謝辞

本研究は、京都産業大学特定研究課題（課題番号 E2014）の支援を受けて行った。

## 6. 参考文献

1. Gudipaty, S. A. & Rosenblatt, J. Epithelial cell extrusion: Pathways and pathologies. *Semin. Cell Dev. Biol.* **67**, 132–140 (2017).
2. Ohsawa, S., Vaughen, J. & Igaki, T. Cell Extrusion: A Stress-Responsive Force for Good or Evil in Epithelial Homeostasis. *Dev. Cell* **44**, 532 (2018).
3. Tanimura, N. & Fujita, Y. Epithelial defense against cancer (EDAC). *Semin. Cancer Biol.* (2019) doi:10.1016/j.semcancer.2019.05.011.
4. Iida, C. *et al.* JNK-mediated Slit-Robo signaling facilitates epithelial wound repair by extruding dying cells. *Sci. Rep.* **9**, 19549 (2019).
5. Eisenhoffer, G. T. & Rosenblatt, J. Bringing balance by force: live cell extrusion controls epithelial cell numbers. *Trends Cell Biol.* **23**, 185–192 (2013).
6. Marinari, E. *et al.* Live-cell delamination counterbalances epithelial growth to limit tissue overcrowding. *Nature* **484**, 542–545 (2012).
7. Vaughen, J. & Igaki, T. Slit-Robo Repulsive Signaling Extrudes Tumorigenic Cells from Epithelia. *Dev. Cell* **39**, 683–695 (2016).
8. Kuipers, D. *et al.* Epithelial repair is a two-stage process driven first by dying cells and then by their neighbours. *J Cell Sci* **127**, 1229–1241 (2014).
9. Rosenblatt, J., Raff, M. C. & Cramer, L. P. An epithelial cell destined for apoptosis signals its neighbors to extrude it by an actin- and myosin-dependent mechanism. *Curr. Biol. CB* **11**, 1847–1857 (2001).
10. Michael, M. *et al.* Coronin 1B Reorganizes the Architecture of F-Actin Networks for Contractility at Steady-State and Apoptotic Adherens Junctions. *Dev. Cell* **37**, 58–71 (2016).
11. van Roy, F. & Berx, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **65**, 3756–3788 (2008).
12. Meng, W. & Takeichi, M. Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, (2009).
13. Takeichi, M. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 397 (2014).
14. Lubkov, V. & Bar-Sagi, D. E-Cadherin-Mediated Cell Coupling Is Required for Apoptotic Cell Extrusion. *Curr. Biol.* **24**, 868–874 (2014).
15. Liang, J., Balachandra, S., Ngo, S. & O'Brien, L. E. Feedback regulation of steady-state epithelial turnover and organ size. *Nature* **548**, 588–591 (2017).
16. Ninov, N., Chiarelli, D. A. & Martín-Blanco, E. Extrinsic and intrinsic mechanisms directing epithelial cell

sheet replacement during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **134**, 367–379 (2007).

# The analysis of cell adhesion dynamics in cell extrusion

Haruna KAJITA and Kohki KAWANE

## Abstract

In epithelial tissue cells tightly adhere each other to function as a barrier separating inside and outside of body. If cells want to extrude they have to lose the cell adhesion. But the loss of adhesion can lead the destruction of the barrier. In addition, there is some report that suggests that loss of adhesion is a trigger of cell extrusion. Therefore deciphering the dynamics of cell adhesion is indispensable for understanding cell extrusion. Accordingly we have analyzed the dynamics of adherens junction which is responsible for physical adhesion by live imaging analysis using cultured cell and revealed that adherens junction between extruding cell and neighboring cells are kept intact at the cell extrusion, then it disappears just before the completion of cell extrusion, and immediately new adherens junction is formed between neighboring cells. This ordered sequence of dynamics ensure the epithelial tissue to both keep barrier function and remove a cell efficiently at the same time. Based on the background, in this study we analyze the dynamics of adherens junction *in vivo* by using *Drosophila* pupal epidermis and show that our finding in cultured cells are universal process also observed *in vivo*. Furthermore our result suggests that the dynamics of adherens junction play an important role for the execution of cell extrusion. Our results and further study will contribute to the understanding how cells undergo their demise in cellular society.

**Keywords :** Cell Extrusion, Cell Death, Cell Adhesion, Cadherin, Epithelium

