

**特集：キズが治るメカニズムときれいに治す治療****細胞の死に関する上皮細胞の反応**米村 重信<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部細胞生物学分野<sup>2)</sup>理化学研究所 BDR 超微形態研究チーム

(令和3年3月19日受付) (令和3年4月8日受理)

**はじめに**

私たちの体の内外の表面は上皮細胞によって覆われている。上皮細胞はシートを作り、生体外の環境と生体内の環境とを区切っている。上皮細胞は細胞間接着装置により結合しており、それぞれの環境の維持のために上皮細胞間の隙間は自由に分子が入り出せないように制御がなされている。この制御を担う接着装置は、タイトジャンクション（密着結合）と呼ばれ、そこでは隣接する2細胞の細胞膜間距離がゼロとなっている。そして上皮細胞シートが仕切りとなってその両側の環境を保つ作用、すなわちバリア機能を発揮している。

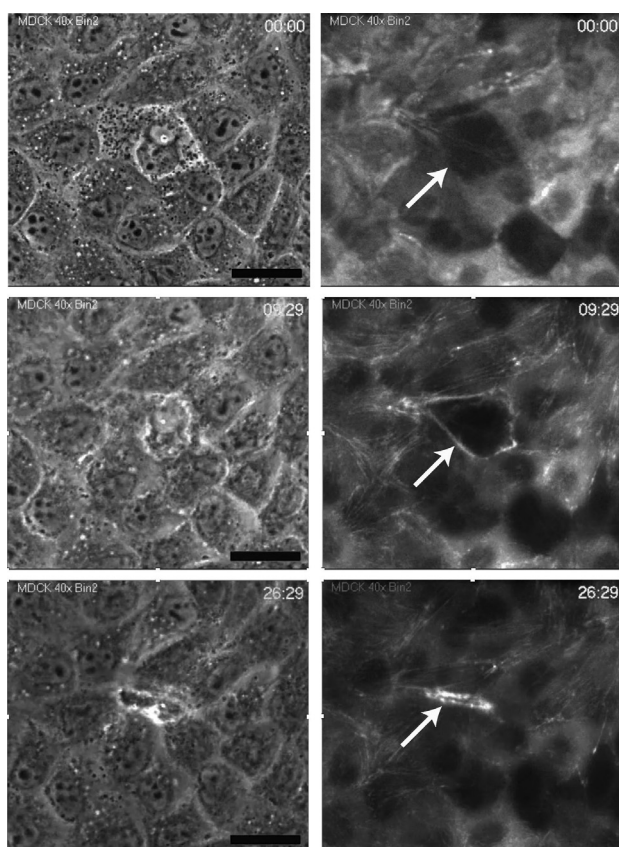
このバリア機能は傷などにより細胞が除去されたり壊れたりすればすぐに破綻して、外部からウイルス、細菌、あるいは塩類や消化酵素が体内に入ってくるということになる。傷でなくとも、ヒトでは1日に100億個以上の細胞がアポトーシスによって死ぬと言われており、例えば、腸管の上皮細胞においては、陰窩近くで増殖し、絨毛の先端でアポトーシスを起こし、排除、脱落するという、入れ替わりが見られる。生きていく以上、そのような細胞死や傷を避けることはできないが、その代わりバリア機能を素早く回復させるために、上皮細胞にはそのような傷を修復する仕組みが備わっている。

本稿ではその仕組みを細胞から分子のレベルで理解するために、光学条件がよく観察しやすい培養下の細胞を用いてわかってきたことを概説する。特に、隣の細胞が死ぬと生きている細胞がどうしてそれに気づき、素早く適切な反応を起こすのかについて注目する。

**隣の細胞が死ぬとどんな反応が起こるのか**

損傷修復、創傷治癒のモデルは培養細胞を用いても作

られてきた。通常は隙間なく増殖した培養細胞の一部を削り取ることでキズの領域を作る。大抵は細胞の大きさの数倍から数十倍の幅のキズを生じさせ、その両側から細胞が移動し、半日、一日など長時間をかけてそのキズが埋まって修復されることになる。修復自体は観察できるが、実は損傷直後は観察しにくく、単に細胞の移動のみを見ていることになる。その理由は、高倍率の対物レンズを使う狭い視野の中で細胞集団を手で削り取るということが困難な上、大抵は削り取る時に残った細胞も、強く引っ張られていてやがて死ぬなど、死細胞と生細胞の境が明瞭でないことによる。隣の細胞が死ぬと細胞はどんな反応を示すのか、それを知るためには顕微鏡下で狙った細胞を殺傷し、それ以外の細胞には一切影響を及ぼさないというやり方が要求される。そこで、私たちは集光したレーザーによる細胞の殺傷を試みた<sup>1,2)</sup>。図1の左の像はMDCKII細胞というイヌ腎臓由来の上皮細胞をシートになるように培養したものの位相差顕微鏡像であり、右はその細胞に発現させているGFP融合ミオシンタンパクの蛍光像である。上段はレーザーによる細胞殺傷の直後で、位相差像では中央の細胞に穴が開いて瞬時に死んだことがわかる。そのとき、ミオシン由来の蛍光は死細胞には見られなくなり、またその周囲には特別な変化はない。中段では約10分が経過しているが、死細胞周辺の生細胞の死細胞と接する部分に蛍光ミオシンの集積が見られる。死細胞周辺の複数の細胞にこのミオシンの集積が見られるので、ミオシンがリング状に集まっていることになる。このミオシンリングは複数の細胞に渡るので当然断続しているが、細胞間接着装置であるアドヘレンスジャンクションがそれに接続しているアクチンフィラメントを介して、ミオシン収縮の張力を伝え、このミオシンリングは全体として収縮性を持つ。このミオシンリングは細胞の殺傷直後の数分の間に現れ始



位相差像

ミオシン GFP 蛍光像

図1 上皮細胞シートのレーザーによる殺傷後の修復反応。左は位相差像, 右は蛍光像。ミオシン GFP を発現する MDCKII 細胞。中央の細胞にレーザーを集光して殺傷した (上段)。死細胞との境 (黄色矢印) にはミオシンの集積は見られない。約10分後 (中段), ミオシンの集積が見られている。約26分後にはミオシンリングの収縮がほぼ完了し, 死細胞が占めていた領域は周囲の細胞によって埋まり, 同時に死細胞が上方へ押し上げられている。スケールバーは 20 $\mu$ m。

める。ミオシンリングは収縮していき, 細胞はそれに引っ張られてキズ口中央へ向かって伸展する。この像ではミオシンリングは30分後にはほぼ閉じて, 死細胞のあった領域は生細胞によって埋まることになる (下段)。それに伴って死細胞は上方へ持ち上げられ, 排除される。また, その後このミオシンの集積は速やかになくなる。この方法では特定の狙った細胞のみを殺傷し, 全く無傷の隣接する細胞の反応を殺傷の直後から観察することが可能である。この場合の細胞の反応をわかりやすく描くと図2のようになる。このような実験を通じて, 細胞一個レベルのキズであれば, 1時間もあれば細胞の移動はほとんどなく修復可能ということが明確になり, 例えば,

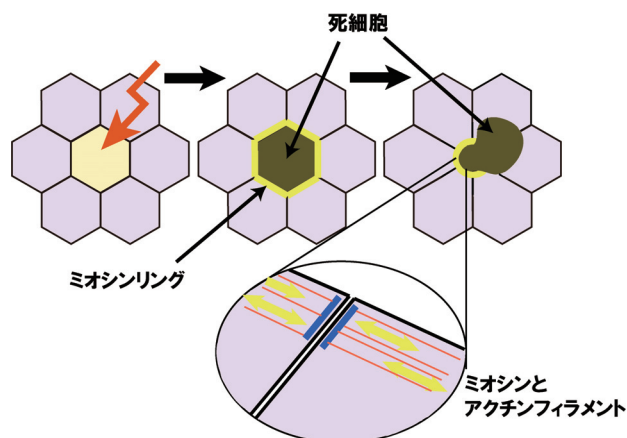


図2 タイトジャンクションを持つ上皮細胞シートの損傷修復の模式図

死細胞に接している生細胞の, 死細胞側に限局してミオシンとアクチンフィラメントが集積する。その構造は細胞間ではアドヘレンスジャンクションを介して繋がり, 死細胞を取り巻くミオシンリングを形成している。その収縮が修復を助け, 死細胞を排除する。

遺伝子発現など数時間レベルで起こることは, 大きなキズの修復の際に細胞を増殖させたり, 運動性を促進したり, あるいは炎症反応に関わるなどのことはあるかもしれないが, キズの修復そのものには必須ではないことも明らかになった。

### ミオシンリングの形成と収縮

このミオシンリングの形成であるが, 報告は1990年代からされてきている。その場合はあくまで手作業で表皮のある区画を切り取ったり, 培養上皮細胞に針でキズをつけたりして, キズに面する上皮細胞にミオシンとアクチンフィラメントの集積を見ている<sup>3,4)</sup>。またこのミオシンリングは外傷による細胞死 (ネクローシス) に特有なわけではなく, アポトーシスを起こした細胞を上皮シートから排除する際にも生じることがわかっている<sup>5)</sup>。ミオシン活性の阻害によりこのミオシンリングの収縮は止まってしまう, キズの閉鎖は抑制され, 死細胞も排除されなくなるので, 速やかな修復にこのミオシンリングが重要であることがわかる。このミオシンの集積は当初, 細胞の上部 (タイトジャンクション近く) に生じるが, リングが収縮するにつれて基底面近くに降りてくる。この動きが死細胞を上部にはじき出すことにつながると考えられる。

## 細胞の移動による覆い

確かに、ミオシンリングの形成が見られる場合があるが、必ずしもそれが見られずともキズが修復されている場合もある。線維芽細胞由来の培養細胞などはそのようなミオシンリングは作らず、キズの周囲の細胞が個々に移動することでキズを覆うようになる。この場合は、キズ口は細胞が進出しやすいフリースペースであるため、確率的にそちらに移動することが多いと考えられる。通常であれば、ミオシンリングを作る上皮細胞でも、培養液からカルシウムイオンを除くことで細胞間接着を阻害してしまうと、キズの周りに特にミオシンリングを形成することはなくなり、そのキズは個々の細胞の移動によって塞がれることになる。この場合は実際に細胞がキズ口を覆っても、特に移動が終わるわけではなくキズ口を通り過ぎてしまったりする。カルシウムがないので細胞間接着が起こらず、細胞の間を細胞が通りやすいということだろう。細胞の移動による修復の場合、特に目的地に向かっての移動ということではなく、フリースペースを確率的に埋めるということのようだ。これはどの細胞も持っている原始的な修復方法と考えられる。ミオシンリングを作るタイプの細胞でも大きなキズ口であれば、ミオシンの活性を下げても、遜色なく修復されるという報告もある<sup>6)</sup>。これはキズ口が大きいと細胞の移動の重要性が増すためだろう。一方、ミオシンリングによる修復は、それを収縮して閉じさえすれば、キズがどんな形でも大きさでも無駄な動きをすることなく最小の時間で修復することができるため、より効率の高い修復法であるように思える。

では、どんな細胞で移動による修復が行われ、どんな細胞でミオシンリングが形成されるのだろうか。多くの培養細胞を試した結果、まず、上皮でない線維芽細胞は移動による修復のみを行うこと、そして上皮であっても、タイトジャンクションを作らない状態の細胞シート（バリア機能を持たない）であれば、ミオシンリングは形成されず、移動による修復が行われることがわかった。そして、ミオシンリングが形成されるのはタイトジャンクションを持つ、バリア機能を発揮する上皮細胞であった。バリア機能の破綻を速やかに修復するという意味で、キズの周囲の細胞が協力しあってミオシンリングを形成、収縮させる方法は非常に都合の良い仕組みであると考えられる。修復の現場では両方の修復方法が関わるだろうと考えられている<sup>7)</sup>。

## 修復反応を引き起こす、「死」のシグナル

それでは、細胞は何によってキズがあることを、すなわち隣の細胞が死んだことを知るのだろうか。上記のように移動による場合は単純に、押しのけにくい生きた細胞よりも死んだ細胞の方が簡単に浮き上がるので、確率的に移動しやすい場所に行くだけで、細胞が死ぬことも、障害物が取り除かれたのも同じことである。しかし、ミオシンリングは死細胞との接触面にしか形成されない。ここでは明確に場所を決めるシグナルが働いているとしか考えられない。生きている細胞を死細胞と間違えれば、生細胞を排除してしまうことにもなり、このシグナルは上皮シートの修復のみならず、通常の維持にも厳密に制御されている必要がある。そのため、長らく興味を持たれていたが、現在まで、普遍的に分子レベルでの理解がなされたとは言えない。

キズ口から生細胞の中をカルシウムイオンの波が通っていくことも知られているが<sup>8)</sup>、細胞内のカルシウムイオン濃度を人為的に上昇させてもミオシンの集積には繋がらず、これがミオシンリング形成に重要なシグナルとは考えにくい。また、細胞質にすぐ拡散するカルシウムイオンがミオシンリングを局限させることを説明することは難しい。細胞内シグナル分子であるERKの活性化の波がキズ口から広がり、それが細胞の移動に必要という報告もあるが、やはり死細胞を認識してからかなり時間が経ってからの二次的な反応である<sup>9)</sup>。検討できることは大体やってみたが、重要と思われるシグナル分子の同定には至らなかったと述べている論文もある<sup>10)</sup>。その中で、スフィンゴシン1リン酸こそが死細胞から放出される死を知らせるシグナルであると主張している論文が目玉を引くが<sup>11)</sup>、再現性が認め難く、これが関与しているとしても極めて限られた範囲かと思われる。

## タイトジャンクションとの関係

このような状況下、ミオシンリングが形成されるのがタイトジャンクションを持つ上皮細胞だけということから、タイトジャンクションと死のシグナルとの関連性が想起はされるものの、緒が掴めなかった。タイトジャンクションの形成に必要な細胞質タンパクZO-1とZO-2のノックアウト、あるいはノックダウンがなされていたが、それはおもしろい細胞骨格上の変化を示していた。本来タイトジャンクションを形成すべき細胞にタイトジャン

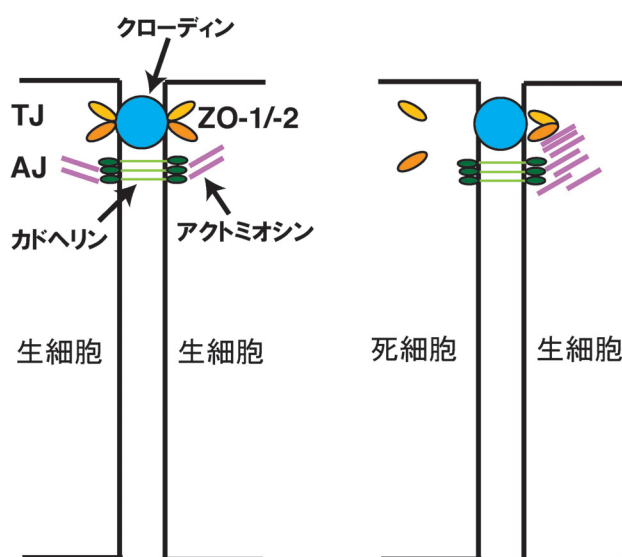


図3 ミオシンリングの形成とタイトジャンクション  
 タイトジャンクション (TJ) はアクチンフィラメントを接続するアドヘレンスジャンクション (AJ) と近接している。TJの接着分子はクローディンであり、AJではカドヘリンである。クローディンには TJ 形成に必要な ZO-1 と ZO-2 とが結合している。生細胞間では AJ に接続するアクチンフィラメントとミオシン (アクトミオシン) の量はある程度までに抑制されているが、隣接する細胞が死ぬと生細胞側でアクトミオシンが強く集積する。この時、クローディンもカドヘリンも大きな変化を見せず、ZO-1/-2も消失するわけではないが、分子の様態が変化していると想像される。

クシオンが形成されないばかりでなく、ミオシンが細胞周辺に強く集積するようになっていた<sup>12,13)</sup>。すなわち、本来タイトジャンクションを作る細胞は、隣接する細胞が生きていてもタイトジャンクションで繋がっていないと、死細胞に対するようにミオシンが集積するということである。死細胞と生細胞との間のタイトジャンクションは、仮に接着分子であるクローディンが結合した状態を続けていたとしても、生細胞間の健全なタイトジャンクションとは異なり、特に生細胞の細胞質では ZO-1/-2 に関して、何かの状態変化があるのではないだろうか(図3)。キズ口が修復され、キズ口の両側からやってきた細胞が新たにタイトジャンクションを作るタイミングで集積したミオシンも分散してしまうことも、この考えを支持する。実際の死ではなく、タイトジャンクション形成が異常であることがシグナルでありミオシン集積の引き金となるという考えに基づいて、さらなる探究が私たちの研究室においてなされつつある。

おわりに

上皮シートの欠陥、その結果のバリア機能の破綻を素早く回復するためのシグナル伝達は、隣の細胞の死を理解することから始まると考えて、研究に取り組んできたが、どうやら細胞は死そのものではなく、バリア機能の破綻自体をタイトジャンクションの構成分子の何らかの変化から察知しているようである。上皮シートが形成され維持される機構の中にすでにシートの欠陥を修復する仕組みも内包されていることに驚くとともに、分子機構を欠落なく理解するために今後さらに細胞内の現象をつぶさに見ていく必要がある。

文 献

- 1) Miyake, Y., Inoue, N., Nishimura, K., Kinoshita, N., *et al.*: Actomyosin tension is required for correct recruitment of adherens junction components and zonule occludens formation. *Exp Cell Res.*, **312**: 1637-1650, 2006
- 2) Watanabe, T., Hosoya, H., Yonemura, S.: Regulation of myosin II dynamics by phosphorylation and dephosphorylation of its light chain in epithelial cells. *Mol Biol Cell.*, **18**: 605-616, 2007
- 3) Martin, P., Lewis, J.: Actin cables and epidermal movement in embryonic wound healing. *Nature.*, **360**: 179-183, 1992
- 4) Bement, W. M., Forscher, P., Mooseker, M. S.: A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. *J Cell Biol.*, **121**: 565-578, 1993
- 5) 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.*, **11**: 1847-1857, 2001
- 6) Fenteany, G., Janmey, P. A., Stossel, T. P.: Signaling pathways and cell sheets. *Curr Biol.*, **10**: 831-838, 2000
- 7) Ravasio, A., Cheddadi, I., Chen, T., Pereira, T., *et al.*: Gap geometry dictates epithelial closure efficiency. *Nature commun.*, **6**: 7683, 2015
- 8) Hinman, L. E., Beilman, G. J., Groehler, K. E., Sammak, P. J.: Wound-induced calcium waves in alveolar type II cells. *Am J Physiol.*, **273**: L1242-1248, 1997

- 9) Matsubayashi, Y., Ebisuya, M., Honjoh, S., Nishida, E.: ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Curr Biol.*, **14** : 731-735, 2004
- 10) Farooqui, R., Fenteany, G.: Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. *J Cell Sci.*, **118** : 51-63, 2005
- 11) Gu, Y., Forostyan, T., Sabbadini, R., Rosenblatt, J.: Epithelial cell extrusion requires the sphingosine-1-phosphate receptor 2 pathway. *J Cell Biol.*, **193** : 667-676, 2011
- 12) Fanning, A. S., Van Itallie, C. M., Anderson, J. M.: Zonula occludens-1 and-2 regulates apical cell structure and the zonula adherens cytoskeleton in polarized epithelia. *Mol Biol Cell.*, **23** : 577-590, 2012
- 13) Choi, W., Acharya, B. R., Peyret, G., Fardin, M. A., *et al.*: Remodeling the zonula adherens in response to tension and the role of afadin in this process. *J. Cell Biol.*, **213** : 243-260, 2016

## *Responses evoked in epithelial cells when their neighbor is dead*

Shigenobu Yonemura<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup>*Department of Cell Biology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima, Japan*

<sup>2)</sup>*Laboratory for Ultrastructural Research, Riken Center for Biosystems Dynamics Research, Hyogo, Japan*

### SUMMARY

Epithelial cells are connected each other, cover our body and make compartments separated from surrounding environment. The tight junction, one of typical cell-to-cell junctions regulates flow of substances through cell gaps in epithelial cell sheets. This is called a barrier function of epithelial sheets. When this barrier function becomes weak due to wound, death of a part of cells constituting epithelial sheets, living cells surrounding the dead cells quickly accumulate actomyosin at the live/dead interphases within several minutes, forming an actomyosin ring surrounding dead cells. Contraction of this ring helps wound closure and extrusion of dead cells. It takes less than 1 hour to close the wound when only single cell is dead. After the completion of the closure, concentrated actomyosin quickly disappears along with formation of new tight junctions. Although cells can close the wound by migration of surrounding cells, this contraction of actomyosin ring is effective for closure and specific to epithelial cells with tight junctions. Signals stimulating the accumulation of actomyosin have been sought for decades, with no important candidate. Tight junction components, ZO-1 and ZO-2 are known to be essential for tight junction formation. Interestingly, loss of both ZO-1 and ZO-2 caused high accumulation of actomyosin at cell-cell interphases. It is possible that ZO-1/-2 in tight junctions reduce myosin activity near tight junctions. Loss of ZO-1/-2 may induce myosin activation and accumulation. Molecular analyses along this line would be essential for understanding the early signaling cascade leading to wound responses.

Key words : Epithelial cells, barrier function, tight junction, wound closure, myosin