

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07168

研究課題名(和文) PKN3阻害によるがん転移抑制のメカニズムを解明する。

研究課題名(英文) Analysis on the suppression of cancer metastasis by PKN3 inhibition

研究代表者

向井 秀幸 (Mukai, Hideyuki)

神戸大学・バイオシグナル総合研究センター・准教授

研究者番号：80252758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管内皮細胞特異的PKN2ノックアウトマウス(血管内皮細胞において、特異的にPKN2が欠失しているマウス)を作製した。このマウスは、生殖・発育ともに明かな異常を認めなかった。このマウスにおいて、がん細胞の転移が抑制されているかどうかを検討したが、結果の確定のためにはさらに例数を重ねる必要があり、現在も実験継続中である。またこのマウスにおける血管新生能(既存の血管から新たな血管枝が伸び血管網を形成すること。がんの進展において重要な役割をもつことが知られている)についても、試験管内、および生体内で検討を行ったが、やはり結果の確定のためには、さらに例数を重ねる必要があり、現在も実験継続中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タンパク質リン酸化酵素PKN3ノックアウトマウス(PKN3を欠損したマウス)においては、がんの血行性転移が抑制されており、血管内皮細胞(血管の内表面を覆っており、腫瘍の血管への接着や浸潤に重要な働きをしている)におけるPKN3の役割に注目が集まっている。構造的に類似性の高いPKN2も、がん転移において重要な役割を持っている可能性が高いが、PKN2ノックアウトマウスは、胎児発生の段階で死んでしまうため、これまでマウス個体を用いた解析がなされていなかった。本研究の結果は、まだ確定的なものではないため公表は差し控えるが、がん転移のメカニズムの解明に知見を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Vascular endothelial cell-specific PKN2 knockout mice (mice specifically lacking PKN2 in vascular endothelial cells) were generated. The mice showed no apparent abnormalities in both reproduction and development. We examined whether metastases of mouse cancer cells are inhibited in these mice, but more examples are needed to confirm the results, which are ongoing. In addition, the angiogenic activity in these mice (the extension of new vascular branches from existing blood vessels to form a vascular network, which is known to play an important role in the development of cancer), was analyzed in vitro and in vivo, but number of cases needs to be increased to confirm the results, which are also ongoing.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：protein kinase N PKN 血管内皮細胞 がん転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、タンパク質リン酸化酵素 PKN を発見し、PKN が異なる遺伝子に由来する 3 つのアイソフォーム (構造が非常に類似したタンパク質のメンバー)、PKN1・PKN2・PKN3 からなることを明らかにしていた。そして、申請者らを含む複数の研究室から、この PKN ファミリーメンバーが、がんの増殖や転移に関わることを示唆する報告がなされていた。PKN3 については、ドイツの製薬企業が、その発現を抑制する薬 (siRNA 製剤) の投与によって、マウスで、がんの転移を抑制できると報告しており、申請者らも PKN3 ノックアウトマウス (遺伝子改変により、PKN3 を欠損したマウス) では、がんの血行性転移が抑制されることを報告していた。しかしながら、PKN3 の抑制による、がん転移抑制のメカニズムは不明であった。また、また申請者らは、PKN2 ノックアウトマウス (全身で PKN2 が欠損したマウス) は胎生致死 (胎児発生過程で死ぬこと) となることを見いだしていたが、そのため、PKN2 抑制が、がんの転移に影響するかどうかについては、検討されていなかった。

2. 研究の目的

がん細胞自体ではなく、宿主 (がんを宿す個体--マウスや人間) の細胞において PKN3 を抑制することが、なぜがんの転移を抑制できるのかを明らかにしたい。当初、PKN3 にターゲットを絞って解析を行う予定であったが、後述する研究状況の変化に応じて、これまで解析がなされてこなかった PKN2 について、そのがん転移における役割および血管新生における役割を明らかにすることに、よりフォーカスした。

3. 研究の方法

すでに行われた実験から、がん細胞の血行性転移抑制のメカニズムとしては、以下の a) - c) の 3 つのがん転移のステップ阻害の可能性が考えられた。

- a) がん細胞の血管壁 (血管内皮細胞) への接着
- b) がん細胞の血管壁を通過して転移先組織への侵入 (extravasation)
- c) がん細胞の転移先組織中での生存・増殖

そこで当初は、血管内皮細胞特異的に PKN3 をノックアウトした (PKN3 遺伝子を欠失させた) マウスを作製し、このマウスにおいて、がん細胞の血行性転移を調べることにより、血管内皮における PKN3 が、がん転移において重要であるかどうかを調べる予定であった。しかし、すでに樹立済とされていた ES 細胞が、その後の quality check により、コンディショナルノックアウト (特定の条件下で遺伝子を欠失させること) のための構築に失敗していることが示唆されたことや、血管内皮細胞特異的 PKN3 ノックアウトマウスの作製にすでに着手している他研究室がある旨の情報を入手したことから、PKN3 ではなく、近縁の PKN2 を血管内皮細胞特異的にノックアウトしたマウスを作製することとし、PKN3 については、すでに樹立済のノックアウトマウス (全身で PKN3 がノックアウトされているマウス) を用いることとした。

(1) 血管内皮細胞や血管組織における PKN2 および PKN3 ノックアウトが、細胞表面タンパク質に与える影響を調べ、がん細胞と血管内皮細胞の接着・透過に及ぼす影響を検討する。

(2) 血管内皮特異的 PKN2 ノックアウトマウスを樹立し、PKN3 ノックアウトマウスと並べて、がんの血行性転移が抑制されるかどうかを検討する。

(3) 血管新生における PKN2 の役割を検討する。

4. 研究成果

(1) PKN3 ノックアウトマウスから、大動脈・肺・肝臓といった、血管もしくは血管が豊富な組織を採取して、膜分画をとり、E-selectin, P-selectin, VCAM1, ICAM-1 等の種々の細胞間接着因子の発現量を測定した。しかし野生型と比べて有意な発現量の差を認める分子を見いだすことはできなかった。PKN3 ノックアウトマウス肺から、初代血管内皮細胞 (生体から採取した血管内皮細胞を、播種して培養したものを) を磁気ビーズにて調整したが、これについても、野生型マウスから採取したものと比較して、有意な発現量の差をしめす膜タンパク質は、いまだ見いだせていない。

マウスの初代血管内皮細胞を、十分量、コンタミなく準備することは難しく、かかるコストも大きい。そのため、HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) において、PKN3 および PKN2 を siRNA ノックダウン (特異的に発現量を低下させること) し、これらの細胞における種々の細胞間接着因子の発

現量の変化および、関連リン酸化酵素のリン酸化レベルを検討した。しかし、明かな有意差をみとめる分子はいまだ同定できていない。PKN3 をノックダウンした HUVEC 細胞シートを Boyden chamber の upper chamber 内に作製し、その血管内皮細胞シートを透過するがん細胞数を調べる実験（がん細胞が、血管壁を透過する過程のモデル実験）を繰り返し行ったが、結果の確定には、さらに例数を重ねる必要がある。

(2) 血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスを作製するために、当初は Tie2-Cre マウスを利用する予定であったが、Tie2-Cre マウスよりも、より血管内皮特異性高く Cre recombinase を発現する Cdh5-Cre マウスが利用可能であることがわかり、このマウスを導入した。このマウスと、我々が作製した PKN2 flox/flox マウス(PKN2 遺伝子が、Cre recombinase 存在下でノックアウトされるように構築したマウス)とを交配し、血管内皮細胞特異的に PKN2 をノックアウトしたマウスを得た。血管内皮細胞特異的 PKN2 ホモノックアウトマウス（血管内皮において、完全に PKN2 を欠失したマウス）は、生殖・発育ともに明かな異常を示さなかったことから、個体発生においては、血管内皮 PKN2 は必須ではないことが明らかになった（顕微鏡レベルでの異常の有無については、現在も解析を進行中である。）

上記血管内皮特異的 PKN2 ノックアウトマウス、および PKN3 ノックアウトマウスを用いて、尾静脈から、Lewis 肺がん細胞および B16 メラノーマ細胞を注入し、肺への血行性転移実験を行った。結果の確定には、さらに例数を重ねる必要があり、現在も実験継続中である。

(3) PKN3 ノックアウトマウスを用いて、aorta ring assay（大動脈リングアッセイ；大動脈片を切り出し、増殖因子を含んだ寒天中にいれて培養し、血管新生を観察する）や corneal pocket assay（角膜ポケットアッセイ；角膜に切り込みを作製し、増殖因子を添加して血管新生を観察する）を行うと、どちらにおいても増殖因子依存性の血管新生が抑制されることをすでに確認していたが、本研究においては、上述の血管内皮細胞特異的 PKN2 ノックアウトマウスについてもこれらのアッセイを行った。これらについても、結果の確定にはさらに例数を重ねる必要があり、現在も実験継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mashud Rana, Nomachi Akira, Hayakawa Akihideo, Kubouchi Koji, Danno Sally, Hirata Takako, Matsuo Kazuhiko, Nakayama Takashi, Satoh Ryosuke, Sugiura Reiko, Abe Manabu, Sakimura Kenji, Wakana Shigeharu, Ohsaki Hiroyuki, Kamoshida Shingo, Mukai Hideyuki	4. 巻 7
2. 論文標題 Impaired lymphocyte trafficking in mice deficient in the kinase activity of PKN1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-07936-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Uehara Shunsuke, Udagawa Nobuyuki, Mukai Hideyuki, Ishihara Akihiro, Maeda Kazuhiro, Yamashita Teruhito, Murakami Kohei, Nishita Michiru, Nakamura Takashi, Kato Shigeaki, Minami Yasuhiro, Takahashi Naoyuki, Kobayashi Yasuhiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Protein kinase N3 promotes bone resorption by osteoclasts in response to Wnt5a-Ror2 signaling	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.aan0023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Siddique Salman Mahmud, Kubouchi Koji, Shinmichi Yuka, Sawada Nana, Sugiura Reiko, Itoh Yasushi, Uehara Shunsuke, Nishimura Kanae, Okamura Shunsuke, Ohsaki Hiroyuki, Kamoshida Shingo, Yamashita Yusuke, Tamura Shinobu, Sonoki Takashi, Matsuoka Hiroshi, Itoh Tomoo, Mukai Hideyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 PKN1 kinase-negative knock-in mice develop splenomegaly and leukopenia at advanced age without obvious autoimmune-like phenotypes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50419-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mehruba Mona, Siddique Salman Mahmud, Mukai Hideyuki	4. 巻 523
2. 論文標題 PKN1 controls the aggregation, spheroid formation, and viability of mouse embryonic fibroblasts in suspension culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 398 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.12.069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 窪内康二、向井秀幸
2. 発表標題 アルカリ金属イオンが細胞内シグナル伝達を制御する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 窪内 康二、團野 紗莉、野町 昭、平田 多佳子、松尾 一彦、中山 隆志、佐藤 亮介、杉浦 麗子、阿部 学、崎村 建司、若菜 茂晴、大崎 博之、鴨志田 伸吾、向井 秀幸
2. 発表標題 PKN1はリンパ球の細胞運動・トラフィッキングを制御する
3. 学会等名 ConBio2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyuki Yasuda, Mona Mehruba, and Hideyuki Mukai
2. 発表標題 PKN1 normalizes dentate gyrus excitability through glutamate transporter regulation and controls anxiety
3. 学会等名 第40回 日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Mahmud Siddique Salman and Hideyuki Mukai
2. 発表標題 高齢PKN1キナーゼネガティブノックインマウスは、高齢PKN1ノックアウトマウスと異なった表現型を示す
3. 学会等名 第66回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----