

令和元年5月31日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07138

研究課題名(和文) がん転移における一次線毛の役割の解明

研究課題名(英文) Investigation of the roles of primary cilium in cancer metastasis

研究代表者

佐久間 圭一朗 (SAKUMA, Keiichiro)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・ユニット長

研究者番号：90402891

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)：日本人の肺がんによる死亡数は年々増加傾向にあり、新しい治療標的分子の同定は喫緊の課題である。研究代表者は本研究課題に先立ち、上皮間葉転換と呼ばれる転移の準備段階にある肺がん細胞が、一次線毛という特徴的な細胞膜構造物を発現することを見出した。本研究課題では、この一次線毛の発現を促進する遺伝子Xを同定した。一方、一次線毛と肺がん細胞の増殖能などが密接に関連することを見出した。一次線毛は臨床検体中にも観察されることから、生体内でも重要な役割を果たす可能性がある。今後は、現在作出中の遺伝子改変マウスを用いて遺伝子Xの機能を精査し、最終的には一次線毛を標的とする治療法の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では肺がん細胞の一部に一次線毛を見出し、その機能解明に取り組んでいる。従来、がん細胞は一次線毛を発現しないとされてきた点で本研究は独自性があり、学術的意義が大きい。日本人の肺がんによる死亡数は年々増え続けており、新しい治療薬の開発が強く求められている。本研究はこれまでと全く異なる作用機序の分子標的治療薬の創薬を目指している点で、潜在的な社会的意義を有している。

研究成果の概要(英文)：The number of death from lung cancer is increasing in Japan. We found in our preliminary study that lung cancer cells undergoing epithelial-mesenchymal transition express a unique membranous protrusion called primary cilium. In this project, we have identified a gene (here referred to as gene X) as a candidate factor promoting ciliogenesis in lung cancer cells. We have also found that the expression of primary cilium is tightly associated with cell proliferation etc. Since primary cilium is found in clinical lung cancer tissues, it may play significant roles in vivo. We will further address the functions of gene X using a genetically engineered mouse that is currently under construction.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：一次線毛 肺がん 転移 上皮間葉転換

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

一次線毛(primary cilium)は細胞膜の一部が細胞外に向かって突起した構造物で、ヘッジホッグ(Hh)シグナル経路やWntシグナル経路などの構成分子群が局在する。一次線毛は細胞外からの機械的あるいは化学的刺激を受け取り、それらの分子群を介して細胞内にシグナル伝達するハブとして機能する。一次線毛は生体内のほとんどの細胞に発現する一方で、がん細胞は一次線毛を発現しないとされてきた。その理由として、一般的に一次線毛は細胞周期が停止した細胞に発現するため、増殖が活発ながん細胞には発現しないと解釈されてきた。

上皮間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)は上皮細胞が間葉系細胞の性質に変化する現象である。がん細胞の場合、EMTによって転移の初期ステップに必要な浸潤能を獲得するとされている。研究代表者は、EMTによってがん細胞の増殖が抑制される点に着目し、「EMTをおこしたがん細胞は一過性に一次線毛を発現する」という作業仮説を考えた。

仮説を検証するため、A549細胞(ヒト肺がん細胞株)にTGF- β (transforming growth factor- β)を添加して*in vitro*でEMTを誘導したところ、一次線毛マーカーであるARL13Bとアセチル化チューブリンが陽性の構造物が出現した。さらに、電子顕微鏡によってこの構造物が一次線毛であることを形態学的に確認した。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点である。

- (1) 肺がん細胞の一次線毛の発現制御機構の解明
- (2) 肺がん細胞の一次線毛の機能的役割の解明

3. 研究の方法

- (1) 肺がん細胞の一次線毛の発現制御機構の解明

EMT誘導下で高率に一次線毛を発現する肺がん細胞株A549とPC-14を用いて、EMT誘導下と非誘導下の網羅的遺伝子発現解析をcDNAマイクロアレイによっておこなう。発現量に差を認められた遺伝子について、遺伝学的手法で発現量を操作し、一次線毛の発現に影響を与える遺伝子を同定する。

がん細胞は不均一な細胞集団である。A549細胞の中で、EMT誘導下で一次線毛を発現する細胞としない細胞を透過型電子顕微鏡で観察する。どのステップで一次線毛の合成が停止しているかを特定し、Iで同定した遺伝子とそのステップの進行を制御するか検証する。

- (2) 肺がん細胞の一次線毛の機能的役割の解明

正常細胞において、ヘッジホッグ(Hh)シグナルは一次線毛によって制御されることが知られている。がん細胞においても一次線毛がHhシグナルの活性化を制御するか検証する。

一次線毛の発現を阻害することによる増殖や浸潤転移への影響を検証する。

4. 研究成果

- (1) 肺がん細胞の一次線毛の発現制御機構の解明

A549細胞から一次線毛発現能の高い亜株(以下A549-H)と低い株(A549-L)を樹立し、両者の遺伝子発現パターンをcDNAマイクロアレイで網羅的に比較した。EMT誘導下と非誘導下で発現量に差を示す遺伝子の中で、既知の機能を参考に10個に絞り込み検証を進めた。それぞれのcDNA発現ベクターをA549-L細胞に遺伝子導入し、一次線毛陽性率に与える影響を調べたところ、遺伝子Xは上皮間葉転換誘導時の一次線毛陽性率を著明に亢進した。現在、CRISPR-Cas9を用いて遺伝子Xのノックアウト細胞とコンディショナルノックアウトマウスの作出を進めている。今後、これらを用いて遺伝子Xの機能を細胞レベルと生体レベルで詳細に解析する予定である。

透過型電子顕微鏡による観察の結果、EMT誘導下で一次線毛を発現しない細胞は、軸系の伸長段階での停止を認めた。一方、Iで同定した遺伝子XのC末端に蛍光タンパクAcGFPを付加した融合タンパク(X-AcGFP)をA549に強制発現したところ、中心小体付近への局在を示した。以上の所見は、タンパクXが一次線毛の軸系の伸長に関与する可能性を示唆しており、現在検証を進めている。

- (2) 肺がん細胞の一次線毛の機能的役割の解明

Hhシグナル構成分子SMOのAcGFP融合タンパクと一次線毛構成分子ARL13BのmCherry融合タンパクをA549細胞に安定導入しEMTを誘導したところ、両者の一次線毛への共局在を認めた。この結果から、A549細胞に発現する一次線毛は正常細胞同様にHhシグナルに関与する可能性が示唆された。

元来、一次線毛は正常組織中の増殖が停止した細胞の大半に発現することがよく知られている。その点を踏まえ、肺腺がん細胞株を増殖マーカーKi-67と一次線毛マーカーARL13Bで二重染色したところ、一次線毛陽性細胞はKi-67陽性細胞よりも陰性細胞の中により多く存在した。一方、腫瘍組織中の一次線毛の検出については、一次線毛が微小な構造物であることに加え、細胞あたりひとつしか発現しないことから、検出が困難であることが予想されたが、肺腺がんの臨床検体を一次線毛マーカーARL13Bの抗体で染色し、共焦点顕微鏡で観察したところ、肺が

ん細胞の一部に一次線毛陽性細胞を認めた。今後は、現在作出中の遺伝子改変マウスも用いて、一次線毛の生体内における役割の解明を進める予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Aoki M: HNRNPLL stabilizes mRNAs for DNA replication proteins and promotes cell cycle progression in colorectal cancer cells. *Cancer Science* 109(8):2458-2468, 2018.

Hijioka S, Sakuma K, Aoki M, Mizuno N, Kuwahara T, Okuno N, Hara K, and Yatabe Y: Clinical and *in vitro* studies of the correlation between MGMT and the effect of streptozocin in pancreatic NET. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 83(1):43-52, 2018.

Sakuma K, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Aoki M: HNRNPLL, a newly identified colorectal cancer metastasis suppressor, modulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. *Gut* 67(6):1103-1111, 2018.

〔学会発表〕(計 8 件)

青木正博、前田亮、小島康、佐久間圭一朗: The roles of tumor microenvironment in cancer metastasis. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2018. [口演]

佐久間圭一朗、青木正博: HNRNPLL promotes cell cycle progression in colon cancer cells by stabilizing mRNAs for regulators of DNA replication. 第 77 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2018. [口演]

Aoki M and Sakuma K: HNRNPLL is a novel metastasis suppressor of colorectal cancer, and modulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. 第 70 回日本細胞生物学会, 東京, 2018. [口演]

Aoki M, Sasaki E, Kimura K, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Sakuma K: Identification of HNRNPLL as a novel metastasis suppressor of colorectal cancer. AACR Annual Meeting 2018, Chicago, USA, Apr 16, 2018. [口演]

Sakuma K and Aoki M: HNRNPLL is a novel colon cancer metastasis suppressor that regulates alternative splicing of CD44 during epithelial-mesenchymal transition. 第 10 回 NAGOYA グローバルリトリート, 大府, 2018. [ポスター]

佐久間圭一朗、青木正博: Phenotypic roles of HNRNPLL in epithelial-to-mesenchymal and mesenchymal-to-epithelial transitions of colon cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017. [ポスター]

青木正博、佐久間圭一朗: 大腸がんの新規転移抑制因子 HNRNPLL は上皮間葉転換における CD44 の選択的スプライシングを制御する. 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016. [ポスター]

佐久間圭一朗、青木正博: Identification of the genes spliced by a novel colon cancer metastasis suppressor HNRNPLL. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016. [口演]

〔図書〕(計 3 件)

佐久間圭一朗、青木正博: 新規同定大腸癌転移抑制因子 HNRNPLL は上皮間葉転換における CD44 の mRNA 前駆体の選択的スプライシングを制御する. *INTESTINE*, 日本メディカルセンター, 東京, 23(1):91-92, 2019.

Kannagi R, Cai BH, Huang HC, Chao CC, and Sakuma K: Gangliosides and tumors. In "Gangliosides" (Eds.) Sonnino S and Prinetti A, pp 143-171, Humana Press, New York, 2018.

佐久間圭一朗、青木正博: shRNA ライブラリーを用いた新規大腸癌転移抑制遺伝子の探索. *がん転移学*, 石岡千加史(編), 日本臨床社, 東京, 310-314, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

愛知県がんセンター研究所 がん病態生理学分野 ホームページ

(http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi_byotai/index.html)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 青木 正博

ローマ字氏名： (AOKI, Masahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。