

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07581

研究課題名(和文) 新規同定一次線毛発現制御分子KATNAL2は肺腺癌幹細胞の治療標的となり得るか？

研究課題名(英文) Assessment of the utility of KATNAL2 as a therapeutic target in lung cancer stem cells

研究代表者

佐久間 圭一郎 (Sakuma, Keiichiro)

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：90402891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、肺腺がん細胞の一次線毛発現制御分子であるKATNAL2(katanin catalytic subunit A1 like 2)に関して、がん幹細胞との関係および治療標的としての可能性を検討した。がん幹細胞との関係については、KATNAL2陽性細胞はG0期とは異なる細胞周期における静止が示唆され、幹細胞マーカー陽性細胞とも明確な一致を認めなかった。治療標的としての可能性については、KATNAL2遺伝子をノックアウトすると一次線毛の短縮ないし消失を認めると同時に、一部の抗腫瘍薬に対する感受性の増加を認めた。以上の結果から、KATNAL2標的薬と既存薬の併用療法の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果の意義は大きく分けて2つある。1つめは学術的な意義である。少なくとも肺腺がんにおいて、がん幹細胞以外に細胞周期が静止し続ける細胞分画が存在し、その静止の分子メカニズムにKATNAL2(katanin catalytic subunit A1 like 2)が関与する可能性が示唆された。2つめは実用化に関する意義である。KATNAL2を標的とする分子標的薬を開発し、既存の抗腫瘍薬と併用することで、治療効果を高められる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study for KATNAL2 (katanin catalytic subunit A1 like 2), newly identified ciliogenesis-regulating protein in lung adenocarcinoma cells, has been performed to assess its involvement in cancer stemness as well as its utility as a therapeutic target. We found that ciliated A549 cells show cell cycle arrest at a different point from quiescent cancer stem cells staying at G0-G1 arrest. Furthermore, coincidence was not observed between ciliary marker expression and cancer stem cell marker expression. Knockout of the KATNAL2 gene inhibited ciliary extension and increased the sensitivity to some anticancer agents targeting cell proliferation. These results suggest a potential effect of KATNAL2-targeted drug when used in combination with currently-used agents.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肺腺がん 一次線毛

1. 研究開始当初の背景

一次線毛は細胞膜の一部が細胞外に向けてアンテナ状に突起してできた微小構造物である。一次線毛は増殖が停止した細胞に発現することが知られており、がん細胞に一次線毛が観察されないことも矛盾しないと理解されてきた。しかし、研究代表者は、肺腺がんの細胞株や臨床検体の一部に一次線毛が発現することを見出した。さらに、一次線毛陽性細胞と陰性細胞を用いた遺伝子発現プロファイリングの結果から、*KATNAL2*(*katanin catalytic subunit A1 like 2*)が一次線毛の発現促進遺伝子であることを同定した。さらに、先述の一次線毛の特徴に変わらず、一次線毛陽性の肺腺がん細胞もまた、Ki-67 陰性で増殖が停止していることが明らかとなった。

がん細胞集団の中で増殖が停止している分画として、がん幹細胞が知られている。がん幹細胞は薬剤耐性を有し、治療後の再発の原因として注目されている。一次線毛や *KATNAL2* とがん幹細胞の関係は未だ知られておらず、治療標的探索の点からも興味深い課題であると言える。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では以下の2点を目的として検討をおこなった。

- (1)一次線毛陽性細胞とがん幹細胞の関係を明らかにする。
- (2)*KATNAL2* の治療標的分子としての有効性を明らかにする。

3. 研究の方法

上記の研究目的に対して、それぞれ以下の方法で検討をおこなった。

- (1)一次線毛陽性細胞とがん幹細胞の関係を明らかにする。

初めに、一次線毛陽性細胞の細胞増殖が本当に停止しているのかどうか、経時的な観察による検討を企画した。一次線毛陽性細胞をタイムラプス撮影で追跡可能とするために、一次線毛マーカー分子である SMO と蛍光タンパク AcGFP の融合タンパクを A549 に強制発現し、キーエンス社のオールインワン蛍光顕微鏡で一次線毛陽性細胞の追跡観察をおこなった。

次に、がん幹細胞の中でも特に増殖が停止し続けた状態にあるとされる quiescent cancer stem cell と一次線毛の関係について検討をおこなった。A549 細胞を用いて一次線毛陽性細胞の細胞周期を調べるにあたり、最も一般的な細胞周期のアッセイ法であるフローサイトメトリーは一次線毛が微小かつ細胞あたり 1 本しか発現していない点で困難が予想されるため、免疫細胞染色による検討をおこなった。さらに、がん幹細胞マーカーの発現に関しても免疫染色による検討を実施した。

- (2)*KATNAL2* の治療標的分子としての有効性を明らかにする。

以下の3つの切り口でアプローチした。

KATNAL2 のノックアウト細胞を作成し、一次線毛形成における *KATNAL2* の役割を検討する。

Crispr-Cas9 により *KATNAL2* をノックアウトした A549 細胞を作成し、免疫染色により一次線毛陽性率と一次線毛の長さを検討した。

KATNAL2 のノックアウトによる細胞傷害性抗腫瘍薬への感受性の変化を検討する。

で作成したノックアウト細胞とコントロール細胞を用いて、臨床で用いられている複数の肺腺がん治療薬への感受性を *in vitro* でテストした。

KATNAL2 と他の Katanin ファミリー分子との機能の違いを検討する。

KATNAL2 はその名の通り微小管切断酵素 katanin の酵素活性サブユニットの構成タンパクである *KATNA1* とアミノ酸配列が近く、同様のタンパクとして *KATNAL1* も存在する。*KATNAL2* を治療標的として考えるにあたり、これらのタンパクとの役割の違いを明らかにしておく必要がある。本研究ではその端緒として、これらの分子の細胞内局在の検討をおこなった。方法は、それぞれの分子と蛍光タンパクの融合タンパクの局在観察ならびに、それぞれの分子に対する特異的抗体を用いた免疫染色によりおこなった。

4. 研究成果

2 で述べた 2 つの研究目的に対する成果はそれぞれ以下に述べる通りである。

(1) 一次線毛陽性細胞とがん幹細胞の関係を明らかにする。

ヒト肺腺がん細胞株 A549 の細胞集団の 5%前後に一次線毛陽性の細胞が存在し、その大半は Ki-67 が陰性である。一次線毛構成分子の SMO と緑色蛍光タンパク AcGFP の融合タンパクを安定発現した A549 の中の一次線毛陽性細胞をタイムラプス顕微鏡で経時的に追跡したところ、少なくとも 72 時間の観察では細胞分裂しないことも確認された。以上の結果から、一次線毛陽性の A549 細胞は細胞周期が停止していることが示唆された。

次に、A549 細胞を一次線毛マーカーの ARL13B に対する抗体と複数の細胞周期マーカー分子に対する抗体で免疫染色した結果、一次線毛陽性細胞は G1-S arrest にあることが示唆された。一方で、静止状態にあるがん幹細胞 (quiescent cancer stem cell) は G0-G1 arrest により増殖が停止しているとされていることから、一次線毛陽性細胞は quiescent cancer stem cell とは異なるチェックポイントで増殖停止している可能性が示された。

一次線毛陽性細胞とがん幹細胞の関係をさらに解明するために、肺がん幹細胞マーカーとして報告のある 5 つの分子に対する抗体と ARL13B 抗体で A549 細胞の 2 重染色を実施したところ、幹細胞マーカー陽性細胞と一次線毛陽性細胞の明確な一致は観察されなかった。同様の 2 重染色を肺腺がんの臨床検体に対して実施したところ、同様の結果が得られた。

以上の結果から、肺腺がん細胞の中の一次線毛陽性細胞はいわゆる quiescent cancer stem cell とは異なる分画である可能性が示唆された。

(2) KATNAL2 の治療標的分子としての有効性を明らかにする。

KATNAL2 のノックアウト細胞を作成し、一次線毛形成における KATNAL2 の役割を検討する。

KATNAL2 をノックアウトした A549 細胞を一次線毛マーカーのアセチル化チューブリンと基底小体マーカーである γ -チューブリンに対する抗体で 2 重染色した結果、基底小体の近位にアセチル化チューブリンのシグナルを認めるものの、その伸長がコントロール細胞と比べて著しく阻害されていることを見出した (図 1)。また、KATNAL2 自身は基底小体付近に局在することが既にわかっている。これらの結果から、KATNAL2 には一次線毛の軸系の伸長を促進する機能がある可能性が示された。

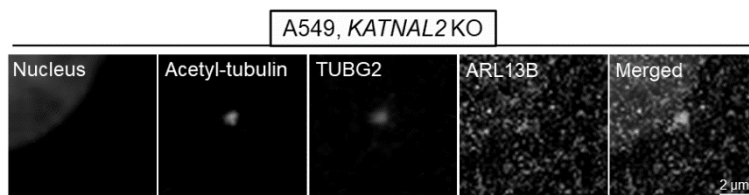


図1. KATNAL2をノックアウトしたA549細胞の免疫染色

KATNAL2 のノックアウトによる既存抗腫瘍薬への感受性の変化を検討する。

KATNAL2 をノックアウトした A549 細胞は、コントロール細胞と比較して、細胞増殖能に大きな違いは認めなかったが、Ki-67 陰性細胞の割合が有意に減少した。細胞増殖能に大きな変化を認めない理由としては、コントロール細胞中の一次線毛陽性細胞の割合がそもそも少ないためであると考えられる。

次に、両細胞に対して既存の肺腺がん治療薬 (cisplatin, paclitaxel, gefitinib) をそれぞれ複数の濃度で曝露し、細胞の生存度を MTT アッセイにて評価したところ、特に paclitaxel と gefitinib に対する感受性が増加する傾向を認めた。A549 は KRAS 遺伝子の活性化変異を有することで知られているが、20 μ M 以上の高濃度の gefitinib 曝露下ではコントロール細胞よりも高い感受性を示した。

KATNAL2 以外の Katanin ファミリー分子と KATNAL2 の機能の違いを検討する。

蛍光タンパクとの融合タンパクによる局在検討では、一次線毛陽性細胞においては、KATNA1、KATNAL1、KATNAL2 の中で KATNAL2 だけが一次線毛に局在した。一方で、一次線毛陰性で増殖中の細胞においては、3 者とも中心体付近に局在した。これらのタンパクの酵素活性ドメインのアミノ酸配列は相同性が高いため、KATNAL2 を薬剤標的とした場合の KATNA1 と KATNAL1 に対するオフターゲット効果と、正常細胞の KATNAL2 を阻害した場合の表現型については今後検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakuma K, Sasaki E, Hosada W, Komori K, Shimizu Y, Yatabe Y, and Aoki M	4. 巻 112(9)
2. 論文標題 MYB mediates downregulation of the colorectal cancer metastasis suppressor HNRNPLL during epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3846-3855
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15069	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Keiichiro Sakuma, Reiji Kannagi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 699
3. 書名 Lectin Purification and Analysis	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------