

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06627

研究課題名(和文) 膵管癌細胞における一次繊毛消失の意義と分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism and impact of loss of primary cilia in PDAC cells

研究代表者

小林 哲夫 (Kobayashi, Tetsuo)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：80433994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膵管がん由来Panc1細胞の中心小体タンパク質CEP164に変異を入れて一次繊毛を消失させた細胞を解析したところ、細胞増殖が亢進した。一次繊毛を除く薬剤処理によってもPanc1細胞の増殖が高まったことから、一次繊毛の消失は膵管がん細胞の増殖を促進することが示唆された。また、CEP164はヘッジホッグ経路の転写因子GLI2の中心小体局在に必要であり、CEP164変異細胞ではGLI2が活性化し、Cyclin DとCDK6の発現量が増えることが分かった。さらに、がん遺伝子Kras依存的な膵管がんの増殖にCEP164が介在することも示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんの90%以上を占める膵管がんは難治性のがんである。膵管がんでは一次繊毛と呼ばれる細胞小器官が消失している。一次繊毛は多くの細胞増殖シグナルの伝達に介在し、細胞分裂とも関わることから、一次繊毛の消失が膵管がん細胞の増殖に寄与する可能性が考えられる。本研究により、膵管がん細胞における一次繊毛消失が細胞の増殖を亢進させること、さらに中心小体タンパク質CEP164はヘッジホッグシグナルに介在することが見いだされた。ヘッジホッグシグナルは膵管がんの増殖において極めて重要なシグナル経路である。これらの研究成果は、膵管がんの新たな治療法に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We established PDAC-originated Panc1 cells devoid of primary cilia by mutating a centriolar protein CEP164. CEP164-mutated cells showed enhanced proliferation in colony formation assay. This was phenocopied by cells treated with Chloral Hydrate which chemically eliminates primary cilia, suggesting that loss of primary cilia promotes PDAC cells proliferation. In addition, CEP164 was co-localized with GLI2 transcription factor of Hedgehog signaling, and required for GLI2 localization at the centriole. CEP164-mutation induced GLI2 activation and in turn, Cyclin D-CDK6 over-expression. Furthermore, it was suggested that CEP164 is involved in K-RAS-signaling-dependent PDAC proliferation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 膵管癌

1. 研究開始当初の背景

ほぼ全ての哺乳動物細胞に存在する一次繊毛は、細胞表面から外側に突出している一本の不動性の構造体であり、光、化学、機械刺激や、Hedgehog, Wnt, PDGF などを含む細胞外の様々なシグナル分子を受容し細胞内へ伝達するセンサーとして機能する。分裂期(M期)の紡錘体形成を担う中心小体が間期に細胞膜近傍へ移動し、そこから細胞膜外側へ微小管が伸展し一次繊毛が形成される。

一次繊毛の構造・機能異常は、繊毛性疾患と呼ばれる疾患群を引き起こすが、多くのがん細胞においても一次繊毛が減少・消失することが知られている。一次繊毛は細胞分裂に重要な役割を担う中心小体から形成され、シグナル伝達の間として機能することから、がん細胞における一次繊毛の消失が細胞分裂・増殖の異常やシグナル伝達の乱れを引き起こし、がんの発生・進行を促進する可能性が想定される。

膵臓がんは主要ながんの中で5年生存率が最も低い難病であり、その90%以上は膵管がんである。現在までに、膵管がんにおいて一次繊毛が消失・減少することが報告されたが、膵管がん細胞の一次繊毛消失に介在する分子メカニズム、及び一次繊毛の消失が膵管がん細胞に与える影響は殆ど分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、膵管がん細胞の一次繊毛消失に介在する分子基盤を明らかにし、さらに、一次繊毛の消失が膵管がん細胞に与える影響を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9法により、膵管がん由来Panc1細胞のCep164遺伝子に変異を入れた。また、CEP164を発現するレンチウイルスを作成した後Panc1細胞に感染させ、抗生物質に対する耐性を指標にして外来CEP164を恒常的に発現する細胞を作出した。がん細胞の増殖能は通常の培養条件下における増殖、またはコロニー形成アッセイ、細胞周期はフローサイトメトリーを用いて解析した。Cyclin-CDKの発現は、定量的PCRでmRNA発現、ウェスタンブロッティングでタンパク質発現を調べた。CEP164, GLI2の細胞内局在や動態については、免疫染色法で調べた。

4. 研究成果

(1) CEP164変異Panc1細胞の一次繊毛は著しく減少する

ヒト膵管がん由来Panc1細胞は一次繊毛を低頻度で形成する。CRISPR/Cas9法により、一次繊毛形成に必要なタンパク質であるCEP164に変異を導入したところ、CEP164変異細胞(以後、Cep164-1細胞)では著しく一次繊毛が減少することがわかった(図1)。また、この細胞株にCEP164を異所的に発現させた細胞(以後、Cep164-1レスキュー細胞)では、一次繊毛形成が回復することを確認した。

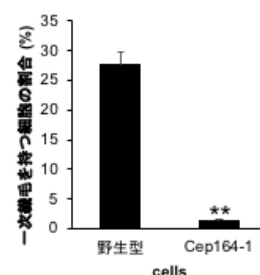


図1 CEP164変異Panc1細胞の一次繊毛は著しく減少する
一次繊毛マーカー(Arl13b抗体)を用いて各細胞を免疫染色後、一次繊毛を持つ細胞数を定量した。

(2) 一次繊毛の消失はPanc1細胞の増殖を亢進させる

がん細胞の増殖能を調べるコロニー形成アッセイを行ったところ、Cep164-1細胞は野生型

Panc1 細胞、Cep164-1 レスキュー細胞と比較して、コロニー形成能が高いことが分かった(図2)。また、野生型 Panc1 細胞に対して、一次繊毛を除去する薬剤である抱水クロラル(CIHy)を処理したところ、Cep164-1 細胞と同様にコロニー形成能が高いことが分かった。以上の結果は、一次繊毛の消失が膵管がん細胞の増殖に対して促進的に寄与することを示唆する。

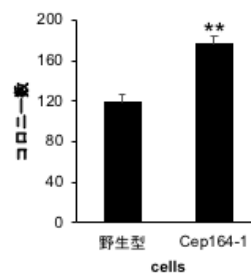


図2 CEP164変異によりPanc1細胞のコロニー形成能が亢進する各細胞を用いてコロニー形成実験を行い、コロニー数を定量した。

(3) CEP164 の変異は Cyclin D/CDK6 の発現を高める

フローサイトメトリー解析において Cep164-1 細胞は野生型 Panc1 細胞、Cep164-1 レスキュー細胞と比べて、細胞周期の G1/G0 期の割合が減少し、G2/M 期の割合が増加することが分かった。また、Cep164-1 細胞における Cyclin-CDK の発現を網羅的に調べ、G1 から S 期への移行に介在する Cyclin D-CDK6 の発現量が mRNA 及びタンパク質レベルで増加していることが分かった(図3)。一方、CIHy 処理により一次繊毛を除去した Panc1 細胞では、細胞周期の変動、及び Cyclin D-CDK6 の発現上昇は認められなかった。これらの結果は、一次繊毛の消失とは関係なく CEP164 の変異が Cyclin D-CDK6 の発現量を増加させることを示唆している。

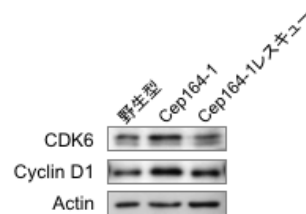


図3 CEP164変異Panc1細胞ではCyclin D-CDK6の発現が増加する各細胞の抽出液を左に示す抗体を用いてウェスタンブロットングした。

(4) GLI2 の中心小体局在に CEP164 は必要である

ヘッジホッグ経路の活性化は、Cyclin D-CDK6 の発現を高めることが知られている。免疫染色実験により、CEP164 とヘッジホッグ経路の転写因子 GLI2 が中心小体において共局在すること、さらに GLI2 の中心小体局在は CEP164-1 細胞において減弱することが分かった(図4)。これらの結果から、CEP164 は中心小体に GLI2 を繋ぎ止めることでヘッジホッグ経路に介在し、さらに下流の Cyclin D-CDK4/6 を介して細胞周期を制御することが示唆された。

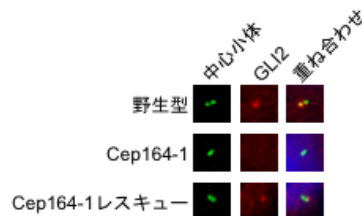


図4 CEP164変異により中心小体におけるGLI2局在が減弱する各細胞を中心小体マーカー(グルタミル化チューブリン)とGLI2抗体を用いて免疫染色した。

(5) K-RAS シグナル依存的な膵管がんの増殖に CEP164 は介在する

がん遺伝子 K-RAS の活性化は膵管がんの発生・進行において大きな役割を担うことが知られている。siRNA を用いたノックダウン実験により K-RAS の発現を抑制すると、Panc1 細胞の増殖は低下するが、Cep164-1 細胞はこの増殖低下に対して抵抗性を示すことが分かった。この結果は、K-RAS シグナル依存的な膵管がんの増殖に CEP164 が介在することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 小林 哲夫	4. 巻 87
2. 論文標題 一次繊毛の構築	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 697-700
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Dateyama I, Sugihara Y, Chiba S, Ota R, Nakagawa R, Kobayashi T, Itoh H.	4. 巻 132
2. 論文標題 RABL2 positively controls localization of GPCRs in mammalian primary cilia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs224428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.224428	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 小林 哲夫	4. 巻 36
2. 論文標題 一次繊毛構築のはじまりの制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 921-925
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 小林 哲夫、伊東 広	4. 巻 90
2. 論文標題 がん細胞における一次繊毛消失メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Biochemical Society	6. 最初と最後の頁 169-172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900169	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 Kobayashi T, Tanaka K, Mashima Y, Shoda A, Tokuda M, Itoh H.	4. 巻 8
2. 論文標題 CEP164 deficiency causes hyperproliferation of pancreatic cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 587691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2020.587691	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 Barbeito P, Tachibana Y, Martin-Morales R, Moreno P, Mykytyn K, Kobayashi T, Garcia-Gonzalo FR.	4. 巻 4
2. 論文標題 HTR6 and SSTR3 ciliary targeting relies on both IC3 loops and C-terminal tails	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000746	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 哲夫、池田 達哉、伊東 広
2. 発表標題 RABファミリー低分子量GTP結合タンパク質群による一次繊毛形成の制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田 達哉、太田 麗央、安川 貴文、小林 哲夫、伊東 広
2. 発表標題 新規低分子量Gタンパク質Rab13による一次繊毛形成制御機構の解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究科バイオサイエンス領域分子情報薬理学ホームページ
<http://bsw3.naist.jp/itoh/>

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			
スペイン	Autonomous University of Madrid			
米国	The Ohio State University			