

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09172

研究課題名（和文）膠芽腫の遊走能亢進における細胞質内インポータイン 1 関連ダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the dynamics related to intracellular importin-alpha1 in the acceleration of migration of glioblastoma

研究代表者

山内 貴寛 (Takahiro, Yamauchi)

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・助教

研究者番号：50598670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は、核輸送因子インポータイン 1 の微小管上での輸送を調べることで膠芽腫細胞の浸潤メカニズムを解明することを目指したものである。インポータイン 1 をノックアウト（KO）された細胞株（U87/U251）において、Wound healing assayを用いた評価では特にU251膠芽腫細胞株の遊走能の低下がみられた。遊走能低下の原因として、細胞接着因子の関与が考えられた。インポータイン 1 KO細胞株ではCADM1 の発現亢進及びインテグリン 1 の細胞内局在の変化がみられた。本研究により、インポータイン 1 による接着因子の制御機能が膠芽腫細胞の遊走に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は脳内で浸潤性に発育するために手術による全摘出は困難であり、再発時にはさらに脳の深部へと進展することも少なくない。我々が研究を行ったインポータイン 1 は多くの癌において増殖や浸潤亢進との関連が報告されている。本研究においては、インポータイン 1 のノックアウト（KO）により、膠芽腫細胞が接着能を亢進させられることで遊走能を低下させることが解明された。また、インポータイン 1 のKOは細胞増殖能も低下させることがすでに解明されており、増殖と浸潤が一つの遺伝子変異で制御されることが示された学術的にも臨床的にも意義ある研究といえる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to elucidate infiltration mechanism in glioblastoma cells to analyze transport of the nuclear transport factor importin-1 on microtubule. In the glioblastoma cell lines (U87/U251) with importin-1 gene knockout, especially U251 glioblastoma was suppressed migration in wound healing assay. Influence of adhesive factor was inferred for suppression of migration. Expression acceleration of CADM1 was observed in importin-1 gene knockout glioblastoma cells and intracellular localization of integrin-1 was changed. This study demonstrates that regulatory function of adhesive factors of importin-1 are important for migration of glioblastoma.

研究分野：細胞生物学

キーワード：核-細胞質間輸送 インポータイン 遊走 接着因子

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳内に浸潤性に発育するため全摘出は困難であり、再発の際にはさらに深部へと進展する傾向がある。膠芽腫の予後や悪性度と関連した遺伝子異常は多く報告されているが、未だ有効な治療方法はない (Bernnan et al., Cell, 2013)。膠芽腫細胞では、遺伝子異常が腫瘍の増殖や浸潤と関連するとの報告はみられるが、その詳細なメカニズムの解明には至っていない。核移行因子インポータイン 1 をコードしている遺伝子の異常においては、膠芽腫におけるがん抑制遺伝子 TP53 の核内移行、浸潤能や悪性度、予後に関係する報告がなされている (Lu et al., Autophagy, 2015; Gousias et al., J Neurooncol, 2012)。インポータイン 1 はヒトでは7種類のサブタイプが存在し、アミノ酸配列の相同性からさらに3つのサブファミリーに分けられる。特にインポータイン 1 は多くの癌で悪性度や予後との関係が報告されている。一方で、インポータイン 1 の細胞内におけるダイナミクスや細胞遊走時のダイナミクスの変化については今までに報告はない。サブタイプの一つであるインポータイン 5 は微小管上を細胞質ダイニンと共に輸送されており、中心体近傍に集積していることが明らかにされている (山田, 未発表データ)。インポータイン 5 ファミリーに属する因子は核-細胞質間物質輸送機における中心的役割を担うことは今までに報告されているが、山田の実験結果はインポータイン 5 が微小管上での輸送においても重要な役割を担っていることを示唆している。別のサブタイプであり、多くの癌に発現しているインポータイン 1 においても細胞質内をダイニンと共輸送することで、悪性化に関連した因子を運んでいる可能性も示唆される。しかしながら、膠芽腫が浸潤していくメカニズムにおいて、インポータイン 1 による細胞質内物質輸送のダイナミクスは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、核輸送因子であるインポータイン 5 が微小管上での輸送にも関わるという、新たな細胞内ダイナミクスの発見に基づいている。膠芽腫細胞の遊走能亢進がインポータイン 1 と関連してどのようなメカニズムで起こっているか解明することを目的とする。特に、インポータイン 1 に関連した因子の細胞内ダイナミクスに着目し、遊走能制御への関りを明らかにしようとする研究である。

3. 研究の方法

(1) まず、インポータイン 1 が山田のインポータイン 5 の研究結果と同様に、細胞質内をダイニンとともに輸送されているかを明らかにするため、膠芽腫細胞内に蛍光融合蛋白質としてインポータイン 1、細胞質ダイニンを発現させる。蛍光融合蛋白質の細胞内導入にはエレクトロポレーション法を用い、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1200、オリンパス) を用いた光退色後蛍光回復法およびライブセルイメージングにより分子動態を解析する。細胞株は膠芽腫に代表的な U87 および U251 を用いる。

(2) CRISPER/Cas9 法を用いて膠芽腫細胞内におけるインポータイン 1 遺伝子をノックアウトし、その効果を調べる。ノックアウト (KO) の効率はウエスタンブロットティング (WB) 法および real time (RT) -PCR 法を用いて評価し、インポータイン 1KO 細胞株を樹立する。細胞の増殖性及び移動性を、スクラッチ法 (Wound healing assay: WHA) 及び微細ファイバーを利用した細胞遊走アッセイ法を用いて解析する【Fujita, IHPB 2016; ISNF2013】。遊走状態の観察により、遊走亢進に関連する因子を推察し、その発現および細胞内ダイナミクスの変化を WB 法および RT-PCR 法、ライブセルイメージングにて解析し、インポータイン 1 による膠芽腫細胞遊走制御のメカニズムの解明を行う。

(3) インポータイン 1 遺伝子 KO 膠芽腫細胞をヌードマウスの皮下、および脳内へ移植し浸潤および生存評価を行う。さらに脳内浸潤膠芽腫の標準治療である放射線治療およびテモゾロミドを使用した治療に対する併用効果を調べる。インポータイン 1KO による膠芽腫細胞の in vivo における浸潤および個体への影響、また標準治療との併用効果を明らかとする。治療効果群には 26Gy/3fr の放射線照射に続いてテモゾロミド 25mg/kg/day の腹腔内投与を 2 日毎に 3 週間行った。

4. 研究成果

(1) 膠芽腫細胞において、インポータイン 1 は核および細胞質に多く発現がみられた。ライブセルイメージングではインポータイン 1 は細胞体および細胞突起においてダイニンと共輸送されることが観察され、インポータイン 1 が核輸送以外に細胞質内輸送に関わることが確認された。特に細胞質に多く見られ、細胞突起を順方向および逆方向にダイニンとともに共輸送されていることが観察された。

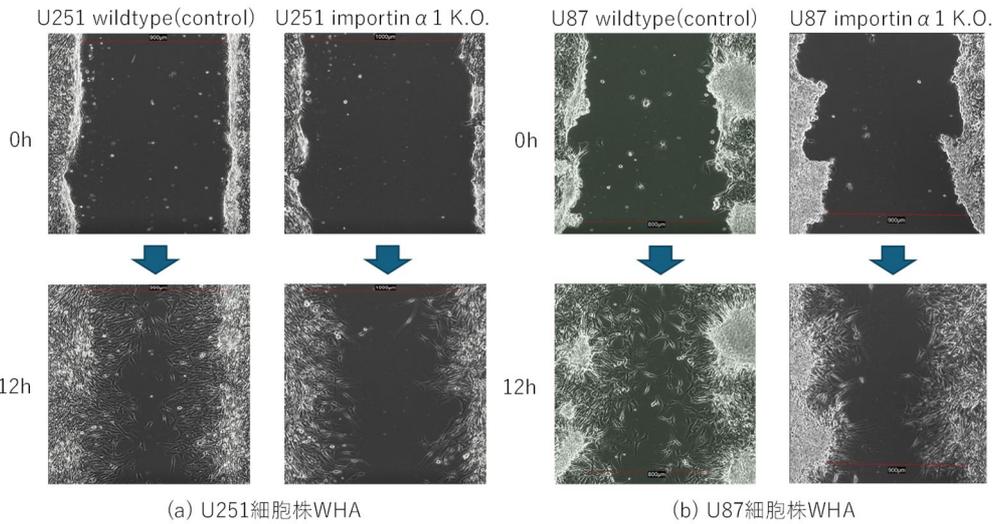


図1 膠芽腫細胞株におけるWHA実験

(2) WHA法を用いた遊走能の評価では、インポーター 1KO 膠芽腫細胞の U251 細胞株において顕著な遊走抑制が見られた (図 1a)。U87 株ではインポーター 1KO による顕著な遊走制限はみられなかったが、細胞間接着の亢進が観察された (図 1b)。しかしながら、微細ファイバーを足場として用いた遊走実験においては、シングルセルでの細胞遊走の抑制は観察されなかった。また、増殖能の評価も行い、U251 細胞株のインポーター 1 KO において有意な増殖の低下 ($P < 0.05$) がみられた (データ省略)。これらのことから、インポーター 1 に関連した膠芽腫の遊走制御には接着因子の関与が示唆された。

(3) 次に悪性腫瘍の遊走に関連した代表的接着因子である CADM1 とインテグリン 1 の関係を、免疫染色およびライブセルイメージングで細胞内ダイナミクスの解析を行った。免疫染色では CADM1 はインポーター 1KO U87 株、U251 株において発現増強がみられ、インテグリン 1 は細胞体への偏在が強く観察された。インテグリン 1 のライブセルイメージングでは細胞体および突起内を輸送されていた分子が、インポーター 1 の KO により細胞体に溜まり、輸送が低下した。WB 法および RT-PCR ではインポーター 1KO 細胞株において CADM1 の発現増加がみられ、特に U87 株において有意な増加がみられた (図 2: $P < 0.05$)。

(4) 6 週齢のヌードマウスへの移植実験において、U87 細胞株では皮下および脳内での生着がワイルドタイプ移植群およびインポーター 1 KO 株移植群ともに良好な生着が確認されたが、腫瘍増殖において、有意な浸潤の差はみられなかった。また生存においても両群で差はみられなかった。U251 細胞株では、皮下における細胞の生着は得られなかった。脳内移植において、生着にバラツキがみられたため、脳内浸潤における評価はできなかった。しかしながら、生存評価において、インポーター 1 KO 群における有意な生存延長がみられた (図 3: カプランマイヤー法; $P < 0.05$)。また、膠芽腫の標準治療へのインポーター 1 KO の影響を評価について、放射線照射およびテモゾロミドの副作用のため、U87 および U251 とともに早期死亡や著明な体重低下がみられ、結果が得られなかった。

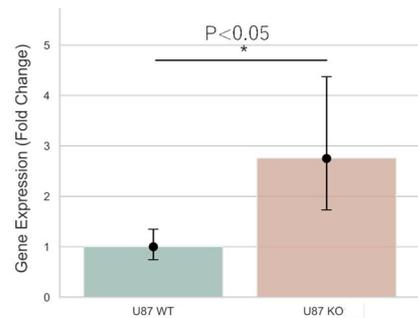


図2 U87細胞株におけるCADM1の発現

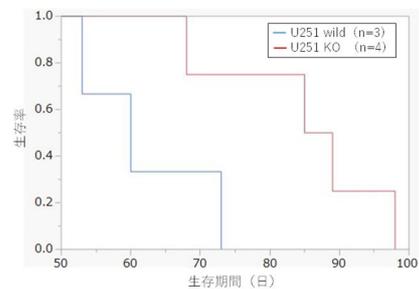


図3 U251細胞株移植マウスの生存期間

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内貴寛
2. 発表標題 膠芽腫細胞遊走におけるインポーティン 1の役割の解明
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内貴寛
2. 発表標題 膠芽腫細胞の遊走に対するインポーティン 1の役割に関する研究
3. 学会等名 第22回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山内貴寛
2. 発表標題 膠芽腫細胞浸潤におけるインポーティン 1と細胞接着因子の関係
3. 学会等名 第75回日本細胞生物学会
4. 発表年 2023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
研究分担者	山田 雅巳 (Yamada Masami) (10322851)	福井大学・学術研究院医学系部門・教授 (13401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	藤田 聡 (Fujita Satoshi) (60504652)	福井大学・学術研究院工学系部門・教授 (13401)	

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