

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2014～2016
課題番号：26860246
研究課題名(和文)膵がんにおけるPrimary ciliaの意義解明：シグナル伝達に着目して

研究課題名(英文)The significance of primary cilia in pancreatic cancer

研究代表者

江本 桂 (Emoto, Katsura)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40570859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、膵癌細胞が発現し得る細胞小器官、primary ciliaに注目した。我々はprimary ciliaを有する膵癌が悪性度が高いことを示したが、そのメカニズムは不明であった。我々はRNAi法を用いて、primary cilia形成に必要な分子(IFT88, KIF3A)がin vitroでのコロニー形成能やin vivoでの腫瘍形成能に寄与することを見出した。

本研究結果は、極性の乱れは少ないがリンパ節転移は多いというprimary cilia発現膵癌の特徴をよく反映したものであった。本研究結果は高悪性度の膵癌のメカニズム解明や新規治療ターゲット開拓への寄与が期待される。

研究成果の概要(英文)：The study focuses on primary cilia, which is one of the cellular organelles and can be formed in pancreatic cancer cells. Pancreatic cancer with primary cilia is recently recognized as a high-grade one, however, the mechanism is unclear. In this study, we clarify that IFT88 and KIF3A, which are necessary to form primary cilia, are related to colony formation in vitro and tumor formation in vivo.

These results reflect the character of pancreatic cancer with primary cilia; relatively well-differentiated morphology and the high ability of lymph node metastases. Our results are expected to contribute to analysis of the aggressiveness and the exploitation of novel therapeutic targets for pancreatic cancer.

研究分野：人体病理

キーワード：primary cilia 膵癌 悪性度 腫瘍形成能 細胞株 RNAi

1. 研究開始当初の背景

申請者は、浸潤性膵癌の手術例 100 例を解析し、ヒト組織切片上の膵癌細胞で Primary cilia が見出されることを初めて証明した (25 例/100 例)。更に、Primary cilia が認められた症例は単変量・多変量解析で有意に予後が悪いことを発見した (単変量解析 $p=0.002$, 多変量解析 $p=0.001$)。

線毛は運動線毛と Primary cilia の二種類に分類され、それぞれ構造が異なる。運動線毛が 1 細胞に複数個認められるのに対して、Primary cilia は 1 細胞に 1 つしか認められない。能動的に物質の移動や異物の排出を行う運動線毛に対して、Primary cilia の機能は長年不明であった。近年、Primary cilia はシグナル伝達の場合として重要な役割を果たすとともに、発生・分化・平面極性等に関与する細胞小器官であることが分かってきた。このように正常組織における Primary cilia の解析が急速に進む一方で、悪性腫瘍、特に癌腫内での Primary cilia の有無やその意義についてはほとんど分かっていなかった。

悪性腫瘍内では、特定の分子およびその受容体が存在しながら、その下流のシグナルが連動しないといった研究報告をしばしば認める。このような報告から、申請者は「シグナル伝達にはシグナル分子および受容体が存在するだけではなく、その場所も重要である」という仮説を立案した。本研究では、その場の一つとして Primary cilia に着目することで、癌内においても Primary cilia がシグナル伝達の場合として重要かどうかを解明することを目指す。本研究の結果は、シグナル伝達の理解を深めるとともに、将来的に化学療法の感受性に関する理解を深める基盤となり得ると考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、本研究は膵癌細胞において Primary cilia がシグナル伝達に関与するかどうかを解明するとともに、Primary cilia の有無が抗癌剤の感受性にもたらす影響を検討する。

申請者は Primary cilia が発現しやすくなる血清飢餓状態にて予備実験を行い、Primary cilia を発現しやすいヒト膵癌細胞株 (3 種) と、発現が確認できないヒト膵癌細胞株 (3 種) を選定している。

本研究では、研究期間内にさらに以下のことを明らかにする。

(1) Primary cilia の有無がシグナル伝達に及ぼす影響

ヒト膵癌細胞株に対し、RNAi 手法を用いて Primary cilia の発現を阻害し、シグナル伝達 (特に Shh や Wnt) の変化を検索する。

(2) Primary cilia の発現と悪性度・化学療法感受性との関連

(1) の細胞を用いて、Primary cilia の発現と増殖能・浸潤能の関連を評価する。また、抗癌剤を投与し、感受性と関連しているかを検索する。

(3) 移植マウスモデル内での in vivo 動態

Primary cilia を発現もしくは抑制した膵癌細胞株を免疫不全マウスに移植し、造腫瘍能・転移能・浸潤能を評価する。また、その際のシグナル関連分子の解析を行う。

(4) ヒト組織切片内でのシグナル伝達

膵癌手術検体の切片を用いて、化学療法の有無による Primary cilia の発現率や遺伝子・蛋白発現を検討し、in vitro やマウスモデルとの比較を行う。

3. 研究の方法

(1) Primary cilia の有無がシグナル伝達に及ぼす影響

ヒト膵癌細胞株に対する RNAi 導入
shRNA を使用し、IFT88 と KIF3a をそれぞれノックダウンした膵癌細胞株を作製する。予備実験により明らかとなった Primary cilia を発現する群、発現しない群をそれぞれノックダウンあり群とコントロール群に分け、計 4 群とした。

尚、IFT88, KIF3a はいずれも cilia 伸長に必要な輸送蛋白であり、これを阻害すると cilia の伸長が阻害される。shRNA は MISSION® shRNA (Sigma-Aldrich) を用いた。

Primary cilia 抑制膵癌細胞株の in vitro 動態観察

で作製した 4 群の増殖能・浸潤能の検討、形態学的解析を行い Primary cilia が悪性度にもたらす影響を検討した。

同細胞のシグナル伝達解析

Shh 等に関連した分子の PCR 法やウエスタンブロット法により、遺伝子や蛋白量を解析した。効果の確認が取れていない抗体に関しての確認実験を追加した。

(2) Primary cilia の発現と悪性度・化学療法感受性との関連

Primary cilia 抑制膵癌細胞株の in vitro での薬剤感受性の違いを見るため、ゲムシタピン、シスプラチン、Shh シグナルを標的とした薬剤を用意し、上記の 4 群での感受性の違いを検討した。

(3) 移植マウスモデル内での in vivo 動態

(1) の で作製した 4 群を免疫不全マウスの膵に移植し、一定の期間の後、生着率・腫瘍径・転移数とその臓器、腫瘍の組織形態学的解析した。

(4) In vitro 非接触培養および 3D 培養系を用いた検討

polyHEMA coating slide を用いた非接触培養, Nanoculture Plate® (Scivax) を用いた 3D 培養を行い, 増殖様式やコロニー形成能について検討した.

4. 研究成果

(1) RNAi 導入ヒト膵癌細胞株の樹立

Primary cilia 高発現株として PANC-1 を, ほとんど発現しない株として MIAPACA-2 を選択した. MISSION® shRNA (Sigma-Aldrich) を導入し, Primary cilia 形成に関わる IFT88 もしくは KIF3a をそれぞれノックダウンした膵癌細胞株を作製した. クローニングを行い, 以後の実験に使用する株を選別した (PANC-1; P-14, P-K3, P-V5. MIAPACA-2; M-14, M-K3, M-E5). 遺伝子抑制に関しては, real time qPCR, ウェスタンブロット法で確認した. また, Primary cilia の発現率は P-V5(empty vector) の 38% に対して, 抑制群 P-14 と P-K3 ではそれぞれ 16%, 0% と Primary cilia 形成阻害が成立していることを確認した (図 1).

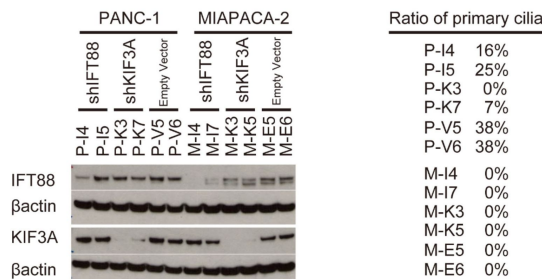


図 1 作製した細胞株の RNAi 効果確認

これらの shRNA を導入することで細胞形態には変化が見られた. Empty vector を入れたものではオリジナルの細胞群との差異は見られず, 塊をなす円形 (=上皮らしい) の細胞群と比較的バラバラに存在する紡錘形の細胞群が認められた. 一方, shRNA を導入した群では, 円形の細胞群がほとんどみられず, 全体に紡錘形を呈する傾向にあった. 増殖能を検討したところ, 一般的な細胞培養のサイクル内 (3 日間) では大きな差は得られなかった.

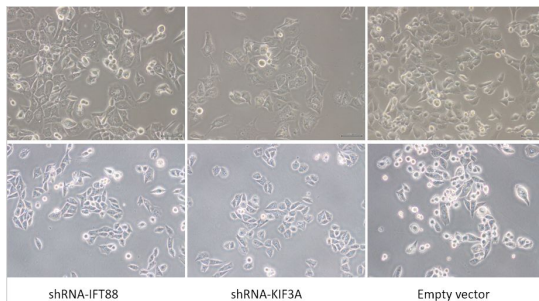


図 2 各細胞株の形態 (上段 PANC-1, 下段 MIAPACA-2)

(2) Primary cilia の発現と悪性度・化学療法感受性との関連の検討

抗がん剤 (シスプラチン, ゲムシタビン), シクロパミン, SANT-1, パルモルファミンに対する感受性を検討した. 実験は同じ条件あるいは異なった条件下に複数回施行したが, 都度結果が異なっており, 手技による誤差以外に別の要因があることが示唆された (後述). 同時に行っていた (3) の実験結果から, 本研究での RNAi 法が腫瘍形成能そのものに影響していることが示唆されたため, 抗がん剤の感受性を比較することは困難と考えられたため本検討は終了とした. 当初の予定と異なり, 抑制群と非抑制群を, シグナル伝達, 化学療法抵抗性, 転移能等の観点から比較することが困難となったため, 腫瘍形成能の差が生じる原因について検討する方針とした (= (4) での検討).

(3) 移植マウスモデル内での in vivo 動態

P-14, P-K3, P-V5, M-14, M-K3, M-E5 を NOD/SCID マウスの膵に移植した (5x10⁵ 個/匹, 各株に対してマウス 9 匹ずつ). 8 週間後に, 生着率・腫瘍径・転移数を計測した. 転移はいずれの株においてもみられなかったが, 生着率と腫瘍径には有意な差がみられた. PANC-1, MIAPACA-2 とともに, Primary cilia 関連遺伝子を抑制した群 (P-14, P-K3, M-14, M-K3) では, Empty vector 群 (P-V5, M-E5) に対して有意に生着率・腫瘍径が小さかった (図 3). Primary cilia 形成に関わる遺伝子のノックダウンは, 通常培養における増殖率には大きな影響を与えないが, in vivo における腫瘍形成能に関与することが明らかとなった.

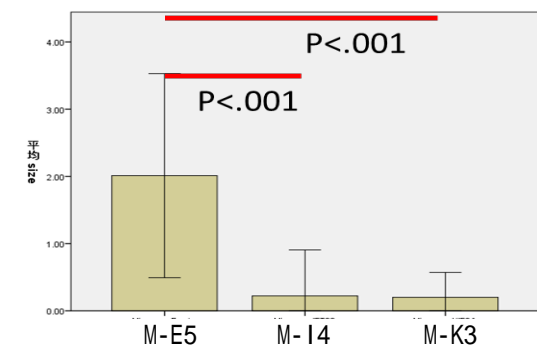
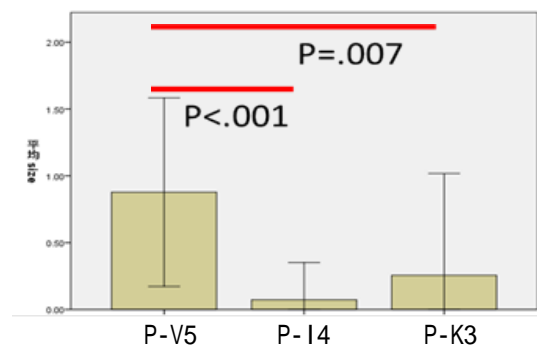


図 3 マウス内に形成された腫瘍径

(4) In vitro 非接触培養および 3D 培養系を用

いた検討

(3)の結果を受け、Primary cilia 関連遺伝子の抑制は、オリジナル細胞株の Primary cilia 形成能によらず、in vivo における腫瘍形成能に關与することが明らかとなった。本研究の目的は Primary cilia を発現する膵がんの悪性度が高い理由を明らかにすることであるため、Primary cilia 関連遺伝子を抑制した細胞株でなぜ腫瘍形成能が低下するかを明らかにすることを目的に再設定した。

polyHEMA coating slide を用いて非接触培養を行った。PANC-1 では、empty vector 導入株に比して IFT88 や KIF3A を抑制した群では colony を形成する速度が遅く、またその結合性も弱くなっていることが確認された(図 4: 上段)。一方、MIAPACA-2 は遺伝子抑制の有無にかかわらず、colony の形成がほとんどみられなかった(図 4: 下段)。この結果は Primary cilia の発現率と非常によく相関していた。

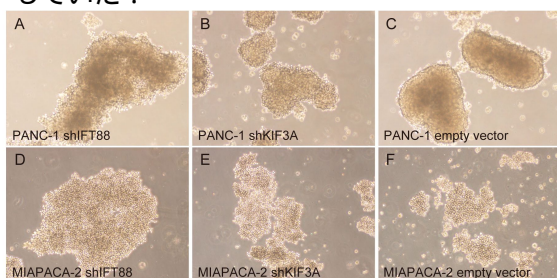


図 4 非接触培養でのコロニー形成

さらに Nanoculture Plate® (Sclvax)を用いた培養を行ったところ、やはり PANC-1 では、empty vector 導入株に比して IFT88 や KIF3A を抑制した群では colony を形成する速度が遅く、またその結合性も弱くなっていることが確認された(図 5: 上段)。非接触培養では明らかでなかったが、この系では MIAPACA-2 も非常にわずかな colony 形成能を有しており、それが IFT88 や KIF3A のノックダウンにより減弱することが確認された(図 5: 下段)。これらの colony 形成能の違いが in vivo における腫瘍形成能に關与していることが推察された。

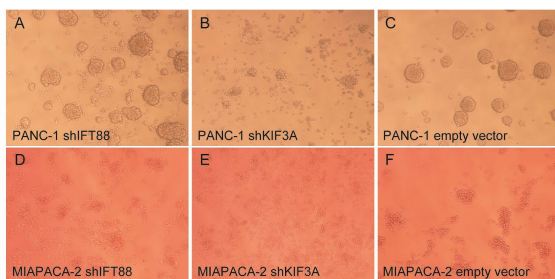


図 5 3D 培養でのコロニー形成

この結果から、細胞量だけではなく、細胞相互接着状態が影響することによって(2)の実験が安定しなかった可能性があると考えられた。

申請者は重要な細胞小器官 Primary cilia が、一部の膵癌に発現していること、Primary cilia を発現する膵癌は予後不良であることを過去に報告した。Primary cilia は単独の分子ではなく細胞小器官という高度な複合体であることから、その機能は多岐にわたることが予測される。今回の研究を通して Primary cilia 形成に關与する IFT88 と KIF3A は上皮様形態を呈することや細胞塊を形成することに關与していることが示唆された。また、これらの遺伝子の抑制は in vivo における腫瘍形成に影響していることが明らかとなった。Primary cilia の発現の有無で説明できない箇所もあるが、今回の実験結果は概ね前述の臨床データと合致するものである。引き続き検討を行い、Primary cilia とがんの悪性度についての解析を行う予定である。

今回の実験結果は下記の学会で発表した。現在論文化するために、更なる検討を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

江本 桂, 山崎 剣, 坂元 亨宇・膵がん細胞に形成される Primary cilia の臨床的意義と膵がん細胞株を用いた in vitro/in vivo での解析・第 75 回日本癌学会学術総会・2016 年 10 月 6 日 - 8 日・パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江本 桂 (Katsura Emoto)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・

助教

研究者番号：40570859

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()