

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06890

研究課題名(和文) 一次線毛の動態制御によるがん治療法開発を志向したマルチオミクス解析

研究課題名(英文) Multi omics approach for the development of new cancer therapies targeting primary cilia regulator.

研究代表者

白水 崇 (Shiromizu, Takashi)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：00582678

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)：細胞膜上に生じる小さな不動性の突起物である一次線毛は、細胞増殖・停止のスイッチであることが明らかにされ、その動態制御が新たながん治療の標的となることが示唆されている。本研究ではCRISPR/Cas9システムを用いて、一次線毛制御因子のノックアウトゼブラフィッシュの作成を試みた。これらノックアウトゼブラフィッシュでは一次線毛の形成異常を示すとともに、繊毛病に関する表現系を観察することができた。今後はマルチオミクス解析により新たな標的分子を探索し、一次線毛形成に関わるメカニズムの解明や、それら分子を標的とした、新しいがん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

がん研究の進展に伴い、がん患者全体の5年生存率は上昇しているものの、依然として治療が困難ながんも残されており、新たながん治療の開発が喫緊の課題となっている。一次線毛を介した細胞増殖制御については未解明な部分が多く、その分子メカニズムを解明することで新たながん治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Primary cilia are non-motile protrusions that extend from the surface of various cells. Recent study has demonstrated an important role for primary cilia in the regulation of cell proliferation and arrest. In this study, we performed to establish a knockout zebrafish of the primary cilia regulator genes by using the CRISPR / Cas9 system. These knockout zebrafish showed primary cilia hypoplasia and were able to observe the phenotype of ciliopathy. Based on these results, we will investigate the mechanism of ciliary formation and aim to search for target molecules for cancer therapy.

研究分野：分子細胞薬理

キーワード：一次線毛 がん ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

日本のがん統計まとめでは、がんの年間罹患数は 86 万人、年間死亡数は 37 万人であり、日本人の二人に一人はがんに罹る時代となっている。様々な診断技術や治療法の開発により、がん患者全体の 5 年生存率は上昇しているものの、ステージの進展したがん患者の 5 年生存率は依然として低い。このような難治性のがんに対する治療法を開発するためには、がん細胞の増殖機構を従来とは異なる視点から解析し、がん治療の新しい標的分子を同定する必要がある。代表者らは以前の研究において、ユビキチン・プロテアソーム経路を介した一次線毛形成に関する遺伝子をいくつか発見しているが、一次線毛の形成抑制から細胞増殖制御に至る経路には未だに明らかにされていない点が多い。近年、キナーゼカスケードを対象とした分子標的薬が臨床試験で評価されているが、ユビキチン・プロテアソーム系を介した一次線毛の形成を標的とするがん治療には報告例がなく、その先端性は高い。キナーゼカスケードとユビキチン・プロテアソーム系を標的とする核酸医薬の併用など、従来とは異なる視点からのがん治療法開発において、本研究は重要な位置を占めると考えられる。

2. 研究の目的

一次線毛はさまざまな細胞の膜上に存在する不動性の小突起状構造物であり、中心小体を核とする微小管骨格を軸系とする構造をもっている。細胞周期において、一次線毛は静止期に出現し、増殖期には一次線毛の形成が抑制されることがこれまでに報告されていたが、その詳細な分子メカニズムに関しては不明であった。これまでの研究において我々は、ケラチン結合タンパク質であるトリコプレイン (TCHP) がオーロラ A キナーゼ (AURKA) を活性化することにより一次線毛の組立てを抑制すること、TCHP をノックダウンすると、細胞増殖条件下においても一次線毛が出現して細胞が静止期に移行すること、この移行は線毛除去により解除されることから、一次線毛が細胞周期の静止期と増殖期のスイッチとなることを明らかにした。さらに、TCHP の発現を制御するメカニズムの解析を進め、Cul3-RING E3 リガーゼ (CRL3) がアダプター分子である KCTD17 を介して TCHP と結合し、TCHP をユビキチン化することによりプロテアソーム系を介して TCHP の分解を促進することや、EGF 受容体の活性化により脱ユビキチン化酵素 USP8 が活性化され、TCHP を脱ユビキチン化することにより TCHP の分解を抑制することを明らかにしてきた (図 1)。

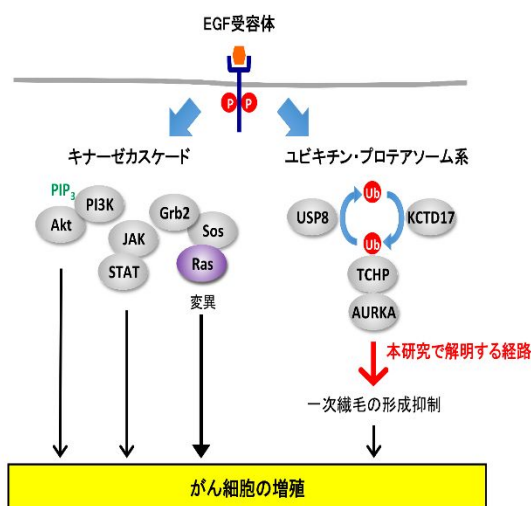


図1 EGF受容体を介したがん細胞の増殖シグナル

EGF 受容体からのシグナル伝達に関わる分子群は、がんの治療標的として注目されてきたが、その下流のシグナルとしてはキナーゼカスケードが細胞増殖制御の主流であると考えられてきた。ユビキチン・プロテアソーム系を介した一次線毛動態制御による細胞増殖調節機構は、キナーゼカスケードとは異なる経路であり、実際にいくつかのがん細胞において EGF 受容体が活性化し、一次線毛の形成が抑制されていることが報告されている。そこで、これらのがん細胞に一次線毛を持続的に形成させることにより、細胞増殖を抑制できる可能性が示唆された。しかし、TCHP の分解抑制から一次線毛形成抑制に至る分子機構は不明な点が多い。そこで本研究では、マルチオミックス解析技術を用いて、この経路での新たな治療標的分子を同定することを目的とした。

EGF 受容体からのシグナル伝達に関わる分子群は、がんの治療標的として注目されてきたが、その下流のシグナルとしてはキナーゼカスケードが細胞増殖制御の主流であると考えられてきた。ユビキチン・プロテアソーム系を介した一次線毛動態制御による細胞増殖調節機構は、キナーゼカスケードとは異なる経路であり、実際にいくつかのがん細胞において EGF 受容体が活性化し、一次線毛の形成が抑制されていることが報告されている。そこで、これらのがん細胞に一次線毛を持続的に形成させることにより、細胞増殖を抑制できる可能性が示唆された。しかし、TCHP の分解抑制から一次線毛形成抑制に至る分子機構は不明な点が多い。そこで本研究では、マルチオミックス解析技術を用いて、この経路での新たな治療標的分子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では一次線毛形成抑制に関わる経路を制御する新規標的分子を同定することを目的とする。CRISPR/Cas9 システムにより関連遺伝子をノックアウトしたゼブラフィッシュを作製し、発生における影響を評価する系を立ち上げる。具体的には、人工合成した crisper RNA および Cas9 タンパク質をゼブラフィッシュ受精卵にマイクロインジェクションし、標的遺伝子に対する

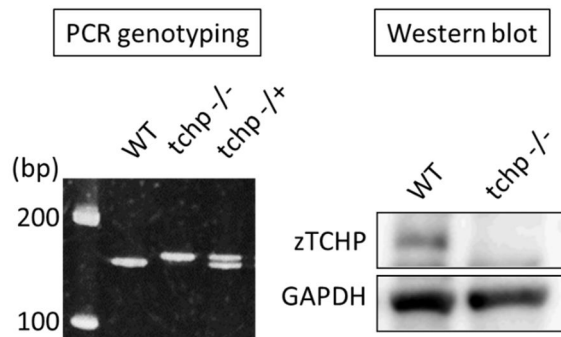


図2 ノックアウトゼブラフィッシュの作成

組み換えを抽出ゲノムDNAに対するPCRにより確認する。組み換えが起こった個体を交配し、ホモノックアウトの系を選別する。タンパク質レベルでのノックアウトの確認には、標的タンパク質に対する抗体を作成してウエスタンブロットにより評価する。また表現系の確認には、免疫組織染色による一次線毛の観察を行う。また、心臓の逆位など、一次線毛形成障害に起因する形態異常も観察する。

4. 研究成果

ゼブラフィッシュでのCRISPR/Cas9のシステムによるノックアウト個体の作成とフェノタイプ観察による評価系を立ち上げた。これらの手技を用いて、トリコプレイン制御遺伝子のノックアウトゼブラフィッシュを作成した。目的遺伝子がノックアウトされているかどうかについては、抗体を作成し、ウエスタンブロットにより評価を行った(図2)。また、受精後13時間の胚において、ゼブラフィッシュの左右非対称の配置を決める器官であるクッペル胞の免疫組織染色により、一次線毛の形成異常についてのフェノタイプが観察できた(図3)。これらのことから、一次線毛の形成異常と疾患との関連について、個体レベルで観察することができる系を立ち上げることができたと考えられる。今後はマルチオミクス解析により新たな標的分子を探索し、一次線毛形成に関わるメカニズムの解明や、それら分子を標的とした、新しいがん治療法の開発を目指す。

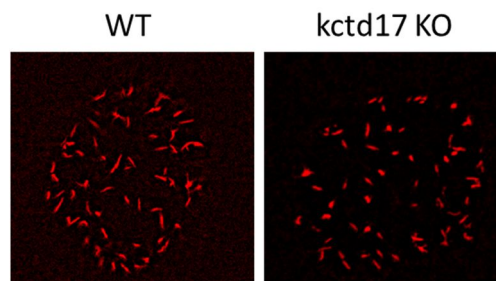


図3 クッペル胞の一次線毛の免疫組織染色

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishimura Yuhei, Kasahara Kousuke, Shiromizu Takashi, Watanabe Masatoshi, Inagaki Masaki	4. 巻 6
2. 論文標題 Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 1801138 ~ 1801138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.201801138	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 Shiromizu Takashi, Yuge Mizuki, Kasahara Kousuke, Yamakawa Daishi, Matsui Takaaki, Bessho Yasumasa, Inagaki Masaki, Nishimura Yuhei	4. 巻 21
2. 論文標題 Targeting E3 Ubiquitin Ligases and Deubiquitinases in Ciliopathy and Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5962 ~ 5962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21175962	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 Yamakawa Daishi, Katoh Daisuke, Kasahara Kousuke, Shiromizu Takashi, Matsuyama Makoto, Matsuda Chise, Maeno Yumi, Watanabe Masatoshi, Nishimura Yuhei, Inagaki Masaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Primary cilia-dependent lipid raft/caveolin dynamics regulate adipogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108817 ~ 108817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108817	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	稲垣 昌樹 (Inagaki Masaki) (30183007)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

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	西村 有平 (Nishimura Yuhei) (30303720)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	
研究分担者	中谷 中 (Nakatani Kaname) (80237304)	三重大学・医学部附属病院・教授 (14101)	

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