

膵管癌細胞の
一次繊毛消失の機構及び影響の解析

馬島 友
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 分子情報薬理学研究室
(伊東 広 教授)

令和2年1月20日提出

目次

要旨	4
第1章 序論	
1.1 繊毛の構造と機能	6
1.2 中心小体による紡錘体形成と一次繊毛形成	7
1.3 正常細胞における一次繊毛形成と退縮機構	8
1.4 膵管癌細胞と一次繊毛	11
1.5 膵管癌細胞における一次繊毛消失	12
1.6 本研究の目的	14
第2章 材料と方法	
2.1 細胞培養	15
2.2 プラスミド	15
2.3 試薬	15
2.4 プラスミド作成	15
2.5 siRNA の導入	17
2.6 PANC1 細胞のレスキュー実験	18
2.7 恒常的 Kif24 ノックダウン細胞(Kif24-3 細胞) の樹立	18
2.8 ウィルス作成	19
2.9 レスキュー細胞の作成	19
2.10 免疫染色法	19
2.11 RNA 抽出	20
2.12 逆転写反応	20
2.13 定量的 PCR	20
2.14 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析	21
2.15 ウェスタンブロッティング	21
2.16 リン酸化の検出	23
2.17 細胞増殖アッセイ	23

2.18 異種移植実験	23
2.19 組織切片の作成	23
2.20 組織免疫染色	24
第3章 結果	
3.1 膵管癌細胞における一次繊毛消失に介在する分子の同定	25
3.1.1 PANC1 細胞の一次繊毛消失に介在する分子の探索	25
3.1.2 PANC1 細胞における Kif24 の一次繊毛消失に対する効果の検証	27
3.1.3 CFPAC1 細胞における Kif24 発現抑制による影響	29
3.1.4 CRISPR/CAS9 システムによる Kif24 発現抑制 PANC1 細胞の樹立	30
3.1.5 PANC1 細胞の一次繊毛消失における NEK2 関与の検証	31
3.2 膵管癌細胞における一次繊毛消失機構の解析	34
3.2.1 PANC1 細胞における AURA-NEK2-Kif24 経路の検証	34
3.2.2 AURA 及び NEK2 による KIF24 のリン酸化の検証	36
3.2.3 PANC1 細胞における AURA 及び NEK2 を介した一次繊毛消失経路の検証	38
3.2.4 PANC1 細胞における HDAC2、KRAS による NEK2、Kif24 発現制御の検証	39
3.3 恒常的 KIF24 発現抑制細胞の解析	40
3.3.1 <i>In vitro</i> における Kif24-3 細胞の増殖と細胞周期	40
3.3.2 マウス体内での Kif24-3 細胞の腫瘍形成(異種移植実験)	41
3.3.3 腫瘍組織における一次繊毛形成及び細胞周期の解析	44
第4章 考察	
4.1 膵管癌細胞における一次繊毛形成機構	46
4.2 恒常的 Kif24 の発現抑制が芽細胞に与える影響	49
第5章 引用文献	
謝辞	57

所属 (主指導教員)	分子情報薬理学研究室 (伊東 広 教授)		
氏名	馬島 友	提出	令和 元年 12 月 12 日
題目	膵管癌細胞の一次繊毛消失の機構及び影響の解析		

要旨

●背景

ほとんど全ての動物細胞に存在する一次繊毛は、細胞表面から外部に突出した毛のような構造体であり、細胞外部のシグナル因子や光、化学、機械刺激を受容し細胞内部へ伝達する。正常な培養動物細胞においては、細胞の静止期 (G0 期) への移行に伴って、分裂期 (M 期) に紡錘体形成を担う中心小体が細胞膜の内側に接着し、そこから微小管が伸長することで一次繊毛が形成される。一次繊毛の機能や構造の異常は網膜変性、内臓逆位、肥満などの症状を呈する疾患群 (繊毛性疾患と総称) を惹起することが知られている。また多くの癌で一次繊毛の消失が確認されている。一次繊毛は細胞分裂に重要な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、癌細胞における一次繊毛の消失が細胞増殖異常やシグナル伝達の異常を引き起こし、癌に対して促進的に寄与することが予想される。

膵臓癌の 90%以上を占める膵管癌は、5 年生存率が著しく低い癌として知られている。先に、膵管癌病変部位、及び膵管癌細胞において一次繊毛が消失していることが報告されたが、その分子機構は殆ど不明であった。本研究室では、膵管癌細胞において転写調節因子であるヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 や癌原遺伝子 Kras の下流でセリン・スレオニンキナーゼである Aurora A (AurA) が一次繊毛消失に寄与することを見出したが、AurA の下流でどのような分子が介在するかは分かっていない。そこで本研究では、膵管癌細胞における AurA を介した一次繊毛消失の分子機構を明らかにし、さらに、得られた知見を基に形成誘導した一次繊毛が膵管癌細胞に及ぼす影響を検証することを目的とした。

●研究結果

1. 膵管癌細胞における一次繊毛消失関連分子の同定

AurA の下流で一次繊毛消失を担う分子として、微小管分解活性を有するキネシン Kif2A, Kif24 に着目した。ヒト膵管癌由来 PANC1 細胞において、siRNA を用いて Kif2A, Kif24 を発現抑制したところ、Kif24 発現抑制細胞においてのみ一次繊毛の増加が認められた。また、Kif24 発現抑制細胞における野生型 Kif24 の異所性発現は一次繊毛誘導を抑制(レスキュー)したが、Kif24 微小管分解活性消失変異体は野生型ほど抑制しなかった。これらの結

果から、膵管癌細胞において Kif24 は微小管分解活性依存的に一次繊毛消失に寄与することが示唆された。次に、Kif24 をリン酸化し活性化するキナーゼとして報告されている NEK2 が膵管癌細胞において一次繊毛消失に寄与する可能性を検証した。その結果、NEK2 の発現抑制により一次繊毛形成率が有意に増加したことから、NEK2 も膵管癌細胞の一次繊毛消失に寄与することが示唆された。

2. AurA-NEK2-Kif24 経路の検証

膵管癌細胞において、AurA, NEK2, Kif24 が同一経路で働く可能性を検証した。その結果、PANC1 細胞における AurA 阻害剤 Alisertib 添加及び Kif24 発現抑制の二重処理は、それぞれの単独処理細胞と同程度の一次繊毛形成率を示した。この結果から、AurA と Kif24 は同一経路で一次繊毛消失に寄与する可能性が示唆された。同様に、AurA-NEK2 経路および NEK2-Kif24 経路を検証した結果、二重処理細胞と単独処理細胞の一次繊毛形成に有意な差は認められなかった。これらの結果から、AurA, NEK2, Kif24 が同経路で膵管癌の一次繊毛消失を制御する可能性が示唆された。

次に、Kif24 が細胞内で AurA や NEK2 によりリン酸化が亢進される可能性を検証した。AurA, NEK2, Kif24 を異所性発現させた HEK293T 細胞の抽出液を電気泳動し、ウエスタンブロッティングにより Kif24 を検出した結果、AurA 及び NEK2 の単独、または共発現細胞において Kif24 の高分子側へのバンドシフトが観察された。また、このバンドシフトは脱リン酸化酵素処理により消失した。これらの結果から、Kif24 は AurA および NEK2 によって、直接または間接的にリン酸化される可能性が示唆された。

3. Kif24 発現抑制膵管癌細胞の性状解析

Kif24 の発現抑制によって誘導された一次繊毛の影響を調べるため、CRISPR/CAS9 法により Kif24 発現抑制 PANC1 細胞 (Kif24-3 細胞) を作出し、一次繊毛形成率が増加することを確認した。この細胞の細胞周期を調べたところ、M期マーカーであるリン酸化ヒストン H3 (pHH3) 抗体陽性細胞の割合が低下していることが分かった。次に Kif24-3 細胞の生体内における腫瘍形成能を調べるために、Kif24-3 細胞をヌードマウスへ異種移植した。その結果、Kif24-3 細胞を移植したマウスにおいて腫瘍重量が低下する傾向が認められ、Kif24-3 細胞由来の腫瘍において一次繊毛形成率の増加が確認された。これらの結果から、Kif24 の発現抑制は腫瘍内の一次繊毛を増加させ増殖を抑制する可能性が示唆された。

●総括

本研究により、膵管癌細胞において AurA, NEK2, Kif24 が同経路で一次繊毛消失に働く可能性が示され、さらに AurA が Kif24 のリン酸化を亢進する結果を得た。これらの結果から、新規の AurA-NEK2-Kif24 リン酸化カスケードが膵管癌細胞の一次繊毛消失に寄与することが示唆された。さらに、膵管癌細胞における Kif24 の発現抑制は、*in vitro* において細胞増殖の指標である pHH3 陽性細胞の割合を低下させ、*in vivo* において腫瘍重量を減少させた。以上の結果から、Kif24 依存的な一次繊毛消失は膵管癌の増殖を促進する可能性が示唆された。今後、上記のリン酸化カスケードの詳細な分子機構、及び Kif24 発現抑制により誘導される一次繊毛がどのように腫瘍形成に影響を与えているかを検証する必要がある。

第1章 序論

1.1 繊毛の構造と機能

繊毛は、1~10 μm までの様々な長さの細胞から突出した毛のような微小管を軸とする構造体である。繊毛はテトラヒメナなどの小さく単純な単細胞生物からヒトやゾウなどの大きく高等な多細胞生物に至る多種多様な生物に存在する。繊毛は、構造及び機能的な違いから「運動性繊毛」と「一次繊毛(非運動性繊毛)」に分けられる。運動性繊毛は、ヒトでは精子や気管の細胞などに存在し、細胞の運動や異物の除去などを担っている。運動性繊毛は構造的に9つのダブルレット微小管が円形状にならび、その中心にシングレットの微小管が2つ存在することで構造を支える軸糸となる。運動性繊毛はこれらの微小管に結合した「ダイニンアーム」と呼ばれる構造体が動くことで繊毛全体に運動性を与えている(図1a)。一方で、運動性を持たない一次繊毛は、ほぼすべての動物細胞に一本のみ存在する。一次繊毛の軸糸は運動性繊毛に存在する中心2本のシングレット微小管を欠き、ダイニンアームも存在しないため運動性を有しない(図1a)。一次繊毛には特有の様々なタンパク質が局在するがこれらのタンパク質を選別しているのが、Transition zone と呼ばれる基底小体の上部に位置する区画である(図1b)。一次繊毛の膜表面にはカリウムチャンネルなどのイオンチャンネルやソマトスタチン受容体などのGPCR、またPDGF受容体などのチロシンキナーゼ型受容体など多数のチャンネルや受容体の局在する【Sanches wt al., 2016; Schmid et al., 2018; Dateyama et al., 2019】。また、一次繊毛は受容体やチャンネルによる化学的刺激の受容だけでなく、生体内で起こる液体の流れも機械的な刺激として受容することが知られ、一次繊毛は細胞外部からのシグナルを様々な情報を受容する細胞の「アンテナ」としての機能を果たす(図1b)【Ishikawa & Marshall, 2011; Kobayashi & Dynlacht, 2011; Sanchez & Dynlacht, 2016; Nishimura et al, 2019】。

繊毛の機能異常や構造異常は、多発性腎嚢胞、網膜変性、肥満、多指症など多岐にわたる症状を呈する【Pazour et al., 2000; Ansley et al., 2003】。これら繊毛の異常によって引き起こされる疾患を総称し「繊毛性疾患(Ciliopathy)」と呼ぶ。

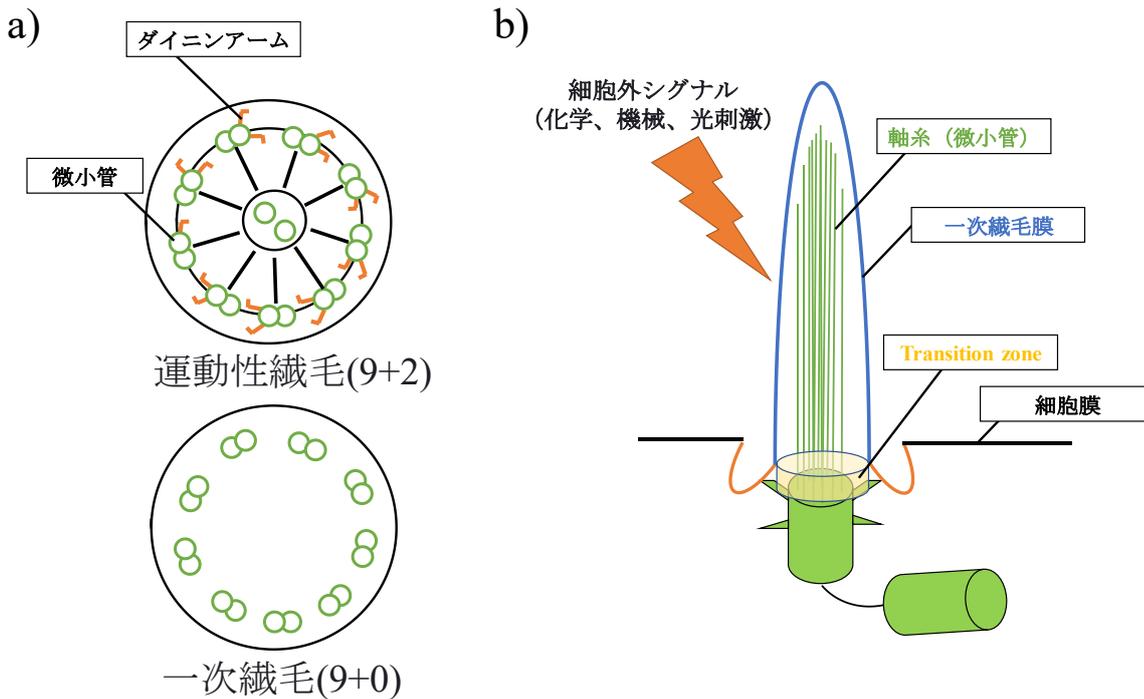


図1 繊毛の構造と機能

a) 運動性繊毛と一次繊毛の微小管の構造的違いを示す。b)一次繊毛の構造である軸糸、Tranzition zone を示す。

1.2 中心小体による紡錘体形成と一次繊毛形成

中心小体は有糸分裂と一次繊毛の形成という二つの場面で重要な働きをする。中心体は **Distal appendage** と呼ばれる構造を持つ母中心小体とそれを持たない娘中心小体、さらにはその周辺に存在する中心小体周辺物質(**Pericentriolar Material: PCM**) によって構成されている。中心小体は、M期において紡錘体極として働き有糸分裂において重要な役割を果たす(図2)。一方で一次繊毛形成において中心小体は以下の動きをする。細胞がG0期に移行すると中心小体は細胞膜近傍へと移行する。この時、ゴルジ体由来と考えられている **Preciliary vesicle(PCV)** と呼ばれる小胞が母中心小体の先端に存在する **Distal appendage** に結合する【Chein et al., 2018】。その後、さらに小胞が集積するとPCVは **Ciliary vesicle(CV)** と呼ばれる構造体を形成する【Lu et al., 2015】。繊毛小胞が形成された後、繊毛膜と微小管伸長が起こり一次繊毛は形成される。こうして形成された一次繊毛は先述したように細胞のアンテナとして機能する。このように中心小体は正常細胞において細胞分裂のための紡錘体極と細胞のアンテナである一次繊毛という2つの構造体形成のために重要である。

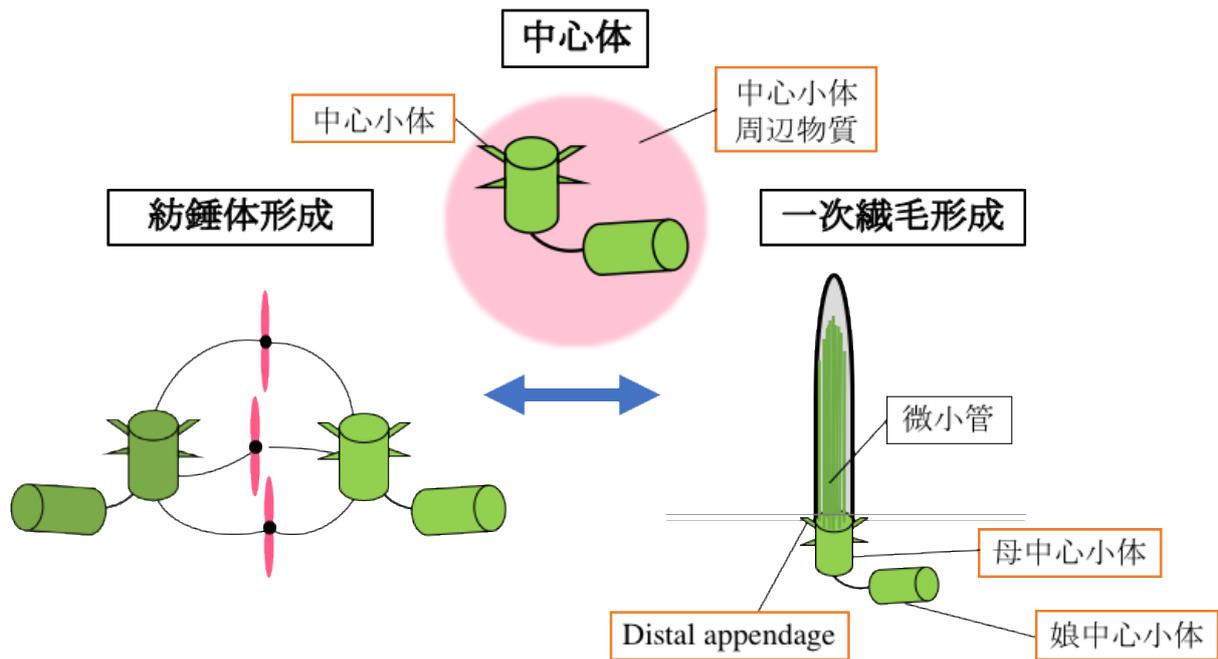


図2 中心小体の役割

中心小体は紡錘体形成と一次繊毛形成を担うことを示す。

1.3 正常細胞における一次繊毛の形成と退縮機構

一次繊毛形成には、①一次繊毛形成を抑制している CP110 の除去と②Distal appendage への小胞の輸送という 2 つの過程が存在する。まず、①に関して、細胞周期中には中心小体タンパク質 CP110 が母中心小体を蓋で覆うように局在し一次繊毛の形成を抑制している【Spector et al., 2007】。キネシン 13 ファミリーに属し微小管分解活性を持つ Kif24 は CP110 と結合し、中心小体からの微小管伸長を抑制することで一次繊毛形成を抑制している【Kobayashi et al., 2011】。CP110 は母中心小体タンパク質 Cep164 と Tau tubulin kinase 2 (TTBK2) の複合体が中心小体にリクルートされると除去される【Ajánek & Nigg, 2014】。この過程により、一次繊毛形成を抑制していた機構が消失する。また②では、まず一次繊毛形成の初期において PCV の Distal appendage への集積と、それに続く CV の形成が行われる。モータータンパク質である Myo-5a はゴルジ体から微小管に沿って PCV を Distal appendage に輸送する【Chein et al., 2018】。続いて、膜結合蛋白である EHD1 及び SNAP29 は繊毛小胞を形成する【Lu et al., 2015】。さらに、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab11 はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF) である Rabin8 と協調し低分子量 GTP 結合タンパク質 Rab8 を活性化することによって、繊毛小胞形成に寄与する【Schmidt et al., 2012】。また、Cep290, Talpid3 などの分子群も Rab8 を介した繊毛小胞形成に働く【Kobayashi et al., 2014】(図 3)。現在、一次繊毛は以上のような過程によって形成されると考えられている。

形成された一次繊毛を退縮させる分子機構についても研究が進んでいる。細胞は細胞周期の中で唯一 M 期では一次繊毛が観察されないことから、細胞が M 期に移行し分裂を開始するためには一次繊毛の消失が必要であることが予想される【Ford et al., 2018】。一次繊毛消失は

G1 期中には完了せずに S/G2 期まで続き、一次繊毛が維持される場合がある【Paridaen et al., 2013; Pugacheva et al., 2007; Ford et al., 2018】。そのため細胞が M 期において細胞分裂を開始するまでに複数の一次繊毛退縮機構が一次繊毛を完全に退縮させる(図 4a)。これまでに一次繊毛を直接的に分解する機構として NIMA-related kinase 2 (NEK2) -Kif24 経路、Polo-like kinase 1(PLK1)-Kif2A 経路そして Aurora A (AurA) - Histone deacetylase 6 (HDAC6)経路の 3 つの機構が知られている【Sanchez & Dynlacht, 2016】。先述した Kif24 は CP110 との一次繊毛抑制機構だけでなく NEK2-Kif24 経路という有糸分裂直前で最も強く機能する機構にも重要である。Kif24 は細胞周期中の一次繊毛形成を抑制するだけでなく、中心小体に局在するキナーゼである NEK2 によりリン酸化されることで活性化し、一次繊毛退縮に働くことが報告されている【Kim et al., 2015】。また Kif24 の発現は S 期と G2 期においてピークに達すると同時に NEK2 と Kif24 の中心小体での共局在も同時期に最も強くなる【Kim et al., 2015; Kobayashi et al., 2011】。従って、Kif24 分解系はM期直前の G2 後期に強く一次繊毛を退縮させる機構である(図 4b)。PLK1-Kif2A 経路は NEK2-Kif24 経路とほぼ同時期に強く機能する機構である。Kif2A は Kif24 と同様にキネシン 13 ファミリーに属し微小管分解活性を持つ分子として知られる。Kif2A は中心小体キナーゼ PLK1 によりリン酸化され、そのリン酸化状態はM期において最も強くなることで一次繊毛退縮に寄与することも報告されている【Miyamoto et al., 2015】(図 4b)。AurA-HDAC6 経路は G1 期に強く機能し一次繊毛を退縮させる機構である。正常な哺乳動物細胞の一次繊毛退縮に働く分子として最初に同定されたのが分裂キナーゼである AurA と、微小管の脱アセチル化酵素 HDAC6 である【Pugacheva et al., 2007】。HDAC6 は AurA によってリン酸化されて一次繊毛微小管のアセチル化修飾を除くことで一次繊毛微小管の不安定化を誘導し分解に導く。この AurA-HDAC6 経路による一次繊毛退縮は細胞が再び増殖を開始する G1 期で機能する機構であり、3 つ存在する一次繊毛退縮機構の中で AurA-HDAC6 経路は最初に働く機構である(図 4b)。以上のように、正常細胞においては G1 期に機能する AurA-HDAC6 機構と G2 後期に機能する NEK2-Kif24 機構及び PLK1-Kif2A 機構の二回に分かれ一次繊毛退縮を担うことが分かっている。

AurA は分裂キナーゼと呼ばれ、有糸分裂において紡錘体形成に重要な働きをすることでよく知られる分子である。しかしながら、近年有糸分裂以外にも一次繊毛の退縮における様々な機構に関与することが報告されている【Korobeynikov., 2017】。AurA は非常に多くの分子をリン酸化する可能性があり、Kif2A や Kif24 のキナーゼである PLK1 や NEK2 も基質となる可能性が示唆されている【Sardon et al., 2010; Joukov et al., 2014; Seki., 2008; DeVaul et al., 2017】。このような報告からも AurA は一次繊毛消失において非常に重要となる分子であることが想定される。

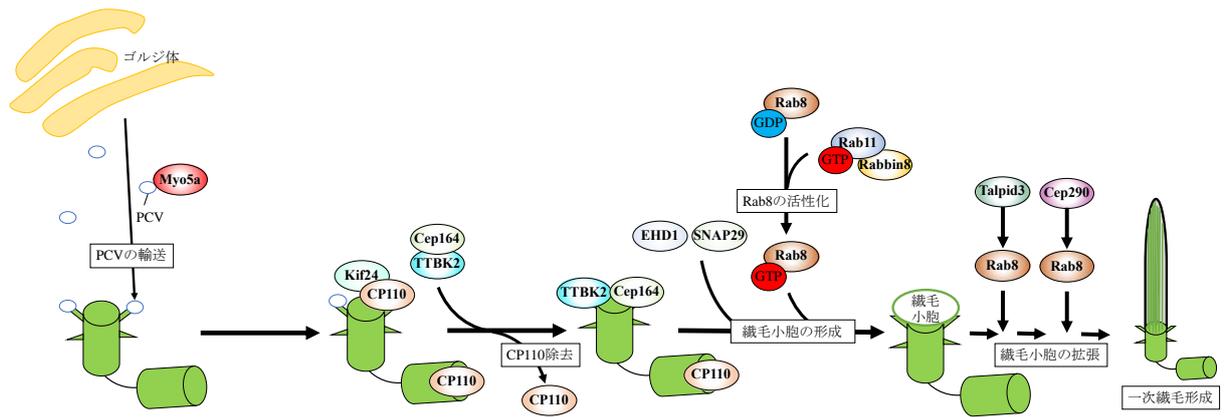
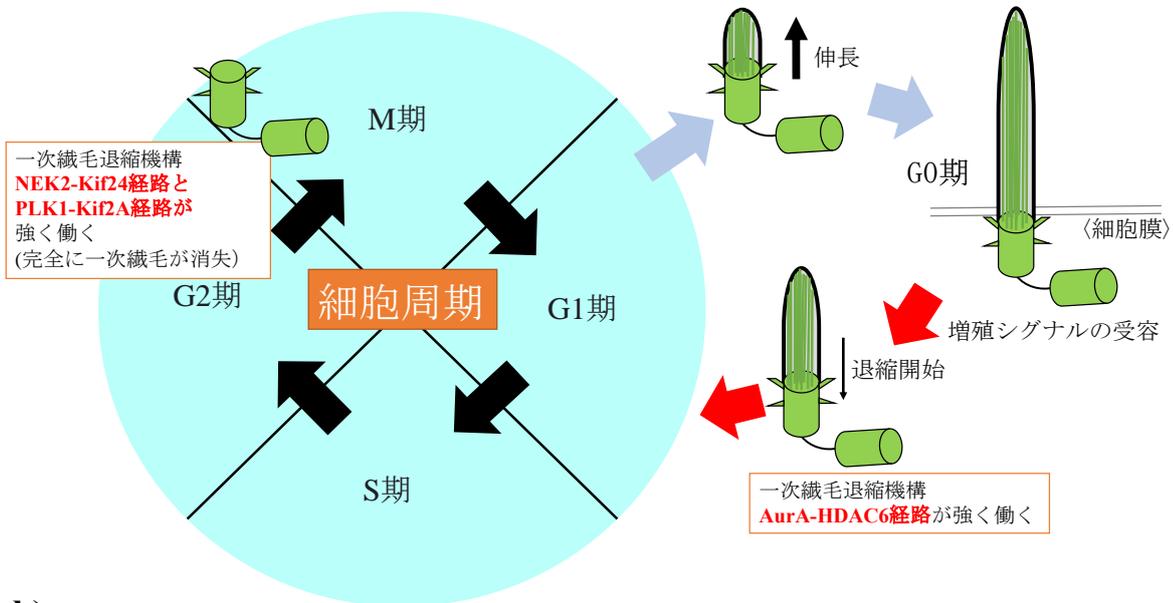


図3 一次繊毛形成機構

一次繊毛形成に関わる分子と機構を示す。

a)



b)

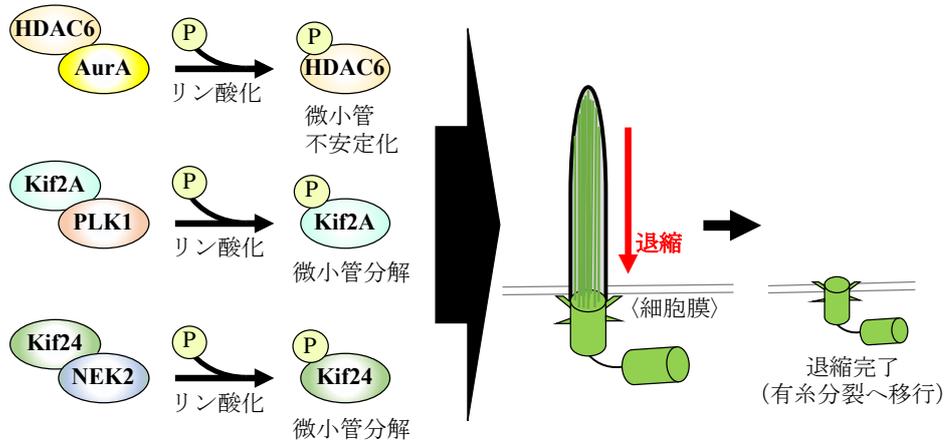


図4 正常細胞における一次繊毛退縮機構と細胞周期の関係

(a) AurA-HDAC6 経路が G1 期で働き、NEK2-Kif24 経路及び PLK1-Kif2A 経路が G2 後期で働くことを示す。(b) 直接的な一次繊毛退縮機構を示す。AurA、PLK1、NEK2 はキナーゼであり、HDAC6、Kif2A、Kif24 はリン酸化を受け一次繊毛微小管に直接的に働くことを示す。

1.4 癌と一次繊毛

近年、一次繊毛が癌細胞のシグナル伝達に影響を与え、癌の特性に影響を与えていることが報告されている。膵管癌細胞においてコレステロール合成に必要なメバロン酸経路が一次繊毛消失によって異常に活性化しており、癌の増殖を亢進させていることが報告されている【Deng et al., 2018】。また、乳癌モデルマウスにおいて一次繊毛を消失させるとヘッジホッグシグナルが増強され発癌と転移が亢進することが報告されている【Hassounah et al., 2017】。これらのように一次繊毛消失が癌に対し促進的に働く場合もあるが、逆に一次繊毛形成が腫瘍形成に有利に働く例も報告されている。基底細胞癌は一次繊毛の増加が報告されている癌である【Yan et al., 2017】。この基底細胞癌ではヘッジホッグシグナルの活性化に必要である Smoothened(SMO) の活性化型変異体が発現することで腫瘍形成に有利に働くことが報告されている【Wong et al., 2009; Yan et al., 2017】。また、髄芽腫でも同様に一次繊毛存在時に SMO の活性化型変異体が発現することで腫瘍形成を促進することが報告されている【Han et al., 2009】。以上のように一次繊毛は癌種によってその必要性は異なるが、一次繊毛が何らかの形で癌形成や癌の進行に影響を与えていることが想定される。

膵管癌細胞は一次繊毛の消失が確認されている【Bailey et al., 2009. Seeley et al., 2009】。膵管癌以外にも腎臓癌細胞【Schraml et al., 2008】、乳癌【Yuan et al., 2010., Nobutani et al., 2013., Menzl et al., 2014】、卵巣癌【Egeberg et al., 2012】、前立腺癌【Hassounah et al., 2013】、髄芽腫【Han et al., 2009】、胆管癌【Gradilone et al., 2013】、神経膠芽腫【Yang et al., 2013】、黒色腫【Kim et al., 2011】などの多くの癌で、一次繊毛の消失または減少が確認されている。これらの癌のように一次繊毛の消失が確認されている癌の中には、一次繊毛の形成が癌を抑制する可能性を示唆している報告も存在する。軟骨肉腫や胆管癌細胞において HDAC6 の特異的阻害剤 Tubastatin-A を用いると一次繊毛が増加し、さらにマウスへの異種移植実験から Tubastatin-A 処理により腫瘍の重量が減少することが報告されている【Xiang et al., 2017; Gradilone et al., 2013】。

このように、多くの癌細胞では一次繊毛消失が癌の増殖や腫瘍形成などに影響を与えることが報告されている。従って、膵管癌細胞でも一次繊毛の消失が発癌や癌の進行に影響していることが予想される(図 5)。

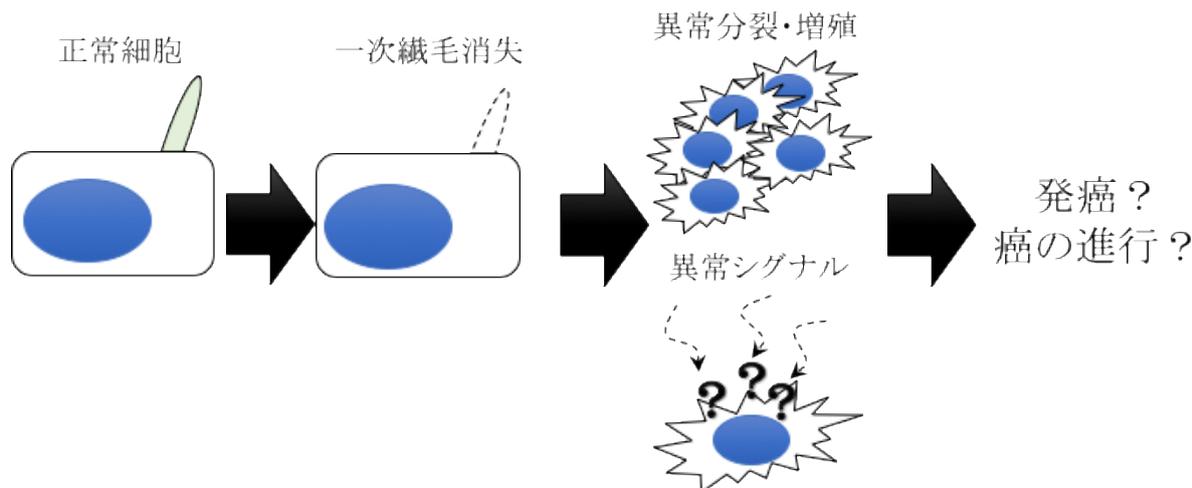


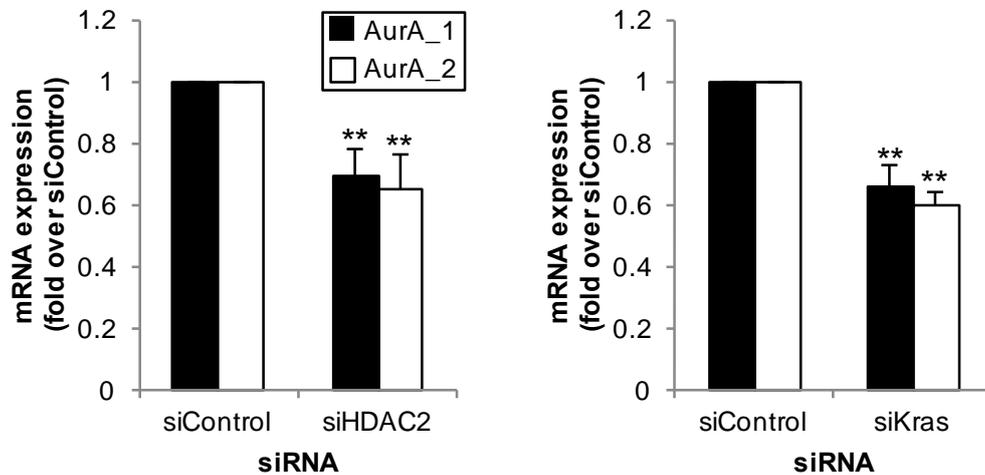
図5 一次繊毛消失が膵管癌に及ぼす影響

1.5 膵管癌における一次繊毛消失

膵臓癌は、日本における癌死亡者数の第5位の癌である。膵臓癌患者の生存率は著しく低く、日本における5年後生存率は10%以下、アメリカ合衆国では5%以下と治療の困難な難治性の癌として知られる。また、癌の治療において早期発見は非常に重要であるが、膵臓癌の早期症状は顕在化しにくいため、発見時には治療困難なレベルまで進行していることが多い。膵臓癌と総称される癌病変の中で約90%を占めるのが膵管癌である。膵管癌において癌現遺伝子である *Kras* は90%以上の確率で恒常活性型の変異が見つまっている。*Kras* 変異確率は、患者数の多い大腸がんでは約40%程度、肝臓癌では数%と他の癌と比較しても膵管癌における *Kras* 変異確率が著しく高いことから、膵管癌は *Kras* への依存性の高い癌と言える。膵管癌は膵炎から前癌細胞を経て膵管癌へと進行するが、この過程の中で一次繊毛は徐々に減少していることが報告されている【Schimmack et al., 2016】。

先に、ヒト膵管癌組織、及びマウス膵管癌モデル細胞において多くの細胞で一次繊毛が消失していることが報告された【Seeley et al., 2009】。また、*Kras* シグナルが下流の MEK や PI3K を介して一次繊毛を消失させていることが示された。さらに、膵管癌細胞は、増殖マーカーである *Ki67* が陰性である細胞において一次繊毛が形成されないことから、膵管癌細胞には *Ki67* と相関しない一次繊毛抑制機構が存在すると想定された【Seeley et al., 2009】。

我々は、膵管癌細胞における細胞周期非依存的な一次繊毛抑制機構に寄与する分子として、転写調節因子として働くヒストン脱アセチル化酵素 HDAC2 を見出した【Kobayashi et al., 2017】。また、HDAC2 は *AurA* の転写量を調節することで一次繊毛形成を抑制すること、*Kras* も *AurA* の転写量を制御することが分かった【Kobayashi et al., 2017】(参考図1)。一方、正常細胞において *AurA* の下流で働くことが報告されている HDAC6 は、膵管癌細胞の一次繊毛消失に寄与しないことも示された。これらの結果から、膵管癌細胞においては、現在までの正常細胞を用いた解析から得られたモデルとは異なる分子メカニズムで一次繊毛が抑制されることが示唆された(図6)。



参考図1 HDAC2 と Kras は AurA の mRNA 発現を正に制御する

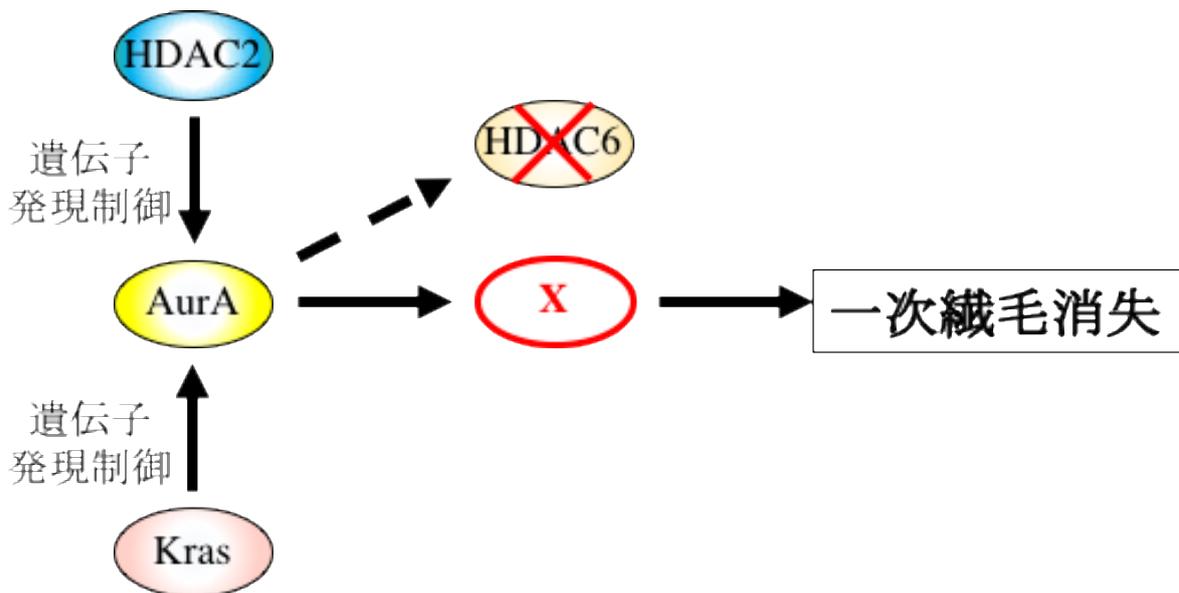


図6 現在までの膵管癌細胞における一次繊毛消失のモデル図

膵臓癌細胞において予想される一次繊毛消失モデルを示す。AurA-HDAC6 経路は膵臓癌細胞においては機能せず、タンパク質 X が AurA の下流で働くことで一次繊毛が消失する。

1.6 本研究の目的

本研究では、膵管癌細胞における一次繊毛消失の機構と影響の解明を目指し研究を進めた。

AurA は自身のキナーゼ活性によって膵管癌細胞の一次繊毛消失に寄与することが想定されるが AurA の下流シグナル経路は同定されていない。そこで現在までに一次繊毛退縮に直接的に働くことが報告されている Kif24 と Kif2A に焦点を当て、これらの分子が AurA の下流で機能する可能性を想定し解析を進めた。

また、膵管癌細胞において一次繊毛の有無が癌の増殖に影響を与えているかは不明である。そこで、膵管癌細胞において一次繊毛を形成誘導させることで一次繊毛が膵管癌に対し抑制的に働くか検証を試みた。

第2章 材料と方法

2.1 細胞の培養

ヒト膵管癌由来である PANC1 細胞は、10%のウシ胎児血清(FBS; Biosera) 及び、ペニシリン(100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 µg/ml) を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Nacalai) で、37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。ヒト膵管癌由来である CFPAC1 細胞は、10% のウシ胎児血清、及びペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 µg/ml) を含む Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Nacalai) で 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。ヒト胎児腎臓由来である Lenti-X HEK293T 細胞は、10% のウシ胎児血清、及びペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 µg/ml) を含む Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM; Nacalai) で 37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。各細胞はコンフルエントに達する前に 0.25% Trypsin/EDTA 溶液で細胞を剥がし、細胞を希釈して新しい培養皿に継代した。

2.2 プラスミド

- pEGFP-C1-Kif24, pEGFP-C1-Kif24/VD, pEGFP-C1-Kif24/KEC (当研究室小林哲夫博士が作製【Kobayashi et al., 2011】)
- pCMV5-Flag-Kif24 (作成方法はプラスミドの作成参照)
- pLVX-GFP-hNEK2-IRES-puro (Dynlacht Lab から譲渡)
- pLVX-GFP-hNEK2 K37R-IRES-puro (作成方法はプラスミドの作成参照)
- pEGFP-C1-hAurA (作成方法はプラスミドの作成参照)
- pEGFP-C1-hAurA D274N (作成方法はプラスミドの作成参照)
- pLVX-hKif24-IRES-Puro (作成方法はプラスミドの作成参照)
- pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-hKif24 (作成方法はプラスミドの作成参照)
- pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) hKif24 (作成方法はプラスミドの作成参照)

2.3 試薬

AurA に対する特異的な阻害剤として Alisertib (ChemScene) を用いた。

2.4 プラスミドの作成

pCMV5-Flag-Kif24、

インサート DNA は pEGFP-C1-Kif24 から Sal I 及び Sma I 処理により得た。ベクターとなる pEGFP-C1 も同様に制限酵素処理し、インサートおよびベクターは FastGene Gel/PCR

Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA を精製した。精製したインサートとベクターに Ligation High ver2 (TOYOBO) を加えて 16°C で 1 時間反応させた。その後、大腸菌コンピテントセルに形質転換を行い、液体培養した大腸菌から目的のプラスミドを得た。

pEGFP-C1-hAurA、pEGFP-C1-hAurA D274N

インサート DNA は pCMV5-Flag-AurA、pCMV5-Flag-hAurA D274N(当研究室小林哲夫博士が作製【Kobayashi et al., 2017】) から BamH I 及び Sal I 処理により得た。ベクターとなる pEGFP-C1 も同様に制限酵素処理し、インサートおよびベクターは FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA を精製した。精製したインサートとベクターに Ligation High ver2 (TOYOBO) を加えて 16°C で 1 時間反応させた。その後、大腸菌コンピテントセルに形質転換を行い、液体培養した大腸菌から目的のプラスミドを得た。

pLVX-GFP-hNEK2 K37R -IRES-puro

テンプレート DNA として pLVX-GFP-hNEK2-IRES-puro (10 ng/μl) を 1 μl に対し、各プライマー(10 μM)を 0.6 μl、KOD ONE Master mix(TOYOBO)を 10 μl、滅菌水を 7.8 μl 加え混合した。これを Reaction mix として 94°C で 2 分間加熱した。その後、98°C で 10 秒、74°C で 5 秒、68°C で 50 秒を 3 サイクル、98°C で 10 秒、70 °C で 5 秒、68 °C で 50 秒を 3 サイクル、98°C で 10 秒、66 °C で 5 秒、68°C で 50 秒を 3 サイクル、98°C で 10 秒、62°C で 5 秒、68°C で 50 秒を 3 サイクル、98°C で 10 秒、60°C で 5 秒、68°C で 50 秒を 20 サイクルの条件で PCR 反応を行った。その後、PCR 産物に Dpn1 を 1 μl 加え 37 °C で 1 時間反応させた。FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA を精製し、T4 Polynucleotide kinase (TOYOBO)と Ligation high ver.2 (TOYOBO)を加え 16°C で 1 時間、反応させた。その後、大腸菌コンピテントセルに形質転換を行い、液体培養した大腸菌から目的のプラスミドを得た。得たプラスミドからインサートを Not1 及び BamH1 処理により得た。ベクターとなる pLVX-GFP-IRES-Puro も同様に制限酵素処理した。インサート及びベクターを FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA を精製し、Ligation high ver.2 (TOYOBO)を加え 16°C で 1 時間、反応させた。大腸菌コンピテントセルに形質転換を行い、液体培養した大腸菌から目的のプラスミドを得た。その後、シーケンサーを用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を確認した。

以下に使用したプライマーを示す。

変異導入に用いたプライマー

Fw. Primer: 5'- AGAGAACTTGACTATGGCTC

Rev Primer: 5'- CCAAATAATATCTTGCCAT

シーケンスプライマー

Fw. Primer: 5'- TTGACGCAAATGGGCGGTAG

Fw. Primer: 5'- TACAAAGGGAACCAAGGAAA

Fw. Primer: 5'- TTGAGAACCCTTTAATAGCA

CRISPR/Cas9 プラスミド

以下に示すオリゴ DNA (100 μ M)をそれぞれ 4 μ l、10 x M Buffer を 2 μ l 混合し 95°C で 4 分間静置した後、70 °Cの水浴で室温になるまで徐々に冷却した。これをアニールド DNA としてベクター (pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)または pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX458)) と混合し、そこに Ligation high ver.2 を加え 16°C で 1 時間反応させた。その後、大腸菌コンピテントセルに形質転換を行い、液体培養した大腸菌から目的のプラスミドを得た。

以下に使用したオリゴ DNA を示す。

オリゴ DNA

Fw. Oligo: 5'- CACCGTTGTCTGAAGATGACGCTCT-3'

Rev. Oligo: 5'- AAACAGAGCGTCATCTTCAGACAAC-3'

pLVX-hKif24-IRES-Puro

インサート DNA は pCMV5-Flag-hKif24 から Sal I 及び Sma I で処理した。ベクターは pLVX-hKif24-IRES-Puro を EcoR1 で処理し、バッファー置換のため FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA 断片を 30 μ l で溶出した。その後、DNA 溶液 28.5 μ l に対し Klenow Buffer を 8 μ l、dNTP mix(2mM) を 2 μ l、Klenow Fragment を 1.5 μ l 加え 37°C で 30 分、反応させた。この反応溶液を再度バッファー置換し溶出液を Xho1 で処理した。その後、インサート DNA およびベクターは FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Ltd)を用いて DNA を精製した。インサート DNA とベクターの溶液に Ligation high ver.2 を加え 16°C で 1 時間反応させた。その後、大腸菌コンピテントセルに形質転換を行い、液体培養した大腸菌から目的のプラスミドを得た。

2.5 siRNA の導入

PANC1 細胞への siRNA の導入は Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies) を用いた。24 well プレートに PANC1 細胞を 10 % FBS を含む DMEM 培地に 1.0×10^5 Cells /well となるよう播き、翌日、siRNA を添付の説明書に従い Lipofectamine RNAiMAX で導入した。siRNA 導入から 5 時間後に 10% FBS 及び、ペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 μ g/ml) を含む DMEM 培地に培地交換した。翌日、ペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 μ g/ml) を含む DMEM 培地に培地交換して血清飢餓条件下で 48 時間培養した。siRNA 導入 72 時間後 (血清飢餓条件下で培養 48 時間後) に細胞を回収した。CFPAC1 細胞については、DMEM の代わりに IMDM を用いて、以下同様に行った。

使用した siRNA(SIGMA) の配列を以下に示す。siLuciferase, siKras, siHDAC2 については先の論文で用いたものを使用した。【Kobayashi et al., 2017】

sihKif24_3UTR: GGAAGAAAGCUCCGAAAUAuu

sihKif2A_1: CUGACCUUGUCCUGAUGAAGaa
sihKif2A_3UTR: GUCAGCUGUAAGGGCCAUUUGaa
sihNEK2 # 1: GAUGCAAUUUGGUCAUUAAtt
sihNEK2 # 2: GAAAGGCAAUACUUAGAUGtt

2.6 PANC1 細胞のレスキュー実験

24 well plate に PANC1 細胞を 10% FBS を含む DMEM 培地に 1.0×10^5 cells / well となるよう播種し、翌日、Lipofectamine 2000 を用いて添付の説明書に従い siRNA と Plasmid を同時に導入した。5 時間後に 10% FBS 及び、ペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 µg/ml) を含む DMEM 培地に培地交換した。翌日、ペニシリン (100 U/ml) / ストレプトマイシン(100 µg/ml) を含む DMEM 培地に培地交換して血清飢餓条件下で 48 時間培養した。siRNA 導入 72 時間後(血清飢餓条件下で培養 48 時間後) に細胞を回収した。

2.7 恒常的 Kif24 ノックダウン細胞 (Kif24-3 細胞) の樹立

6-well plate に PANC1 細胞を 2×10^5 Cells を播種し、翌日 pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459)-hKif24 プラスミドを LipofectAMINE2000 (Invitrogen) で遺伝子導入し、5 時間後に培地交換、翌日に 5 µg/ml Puromycin、10% FBS、P/S を含む DMEM に培地交換し 3 日間培養した。その後、限界希釈法により 96-well plate に 1 cell/ well になるように播種し、約 4 週間培養した。生存した細胞を適宜 24-well plate、6-well plate、100 mm ディッシュにスケールアップし、Kif24 ノックダウン細胞候補株とした。候補細胞株のゲノム変異を検討するために、Quick Extract Solution (epicentre)を用いてゲノム DNA 抽出を行った。抽出した DNA を鋳型として以下に示すプライマーと Ex taq polymerase (Takara)を用いて 2 度 PCR 反応を行い、Kif24 ターゲット領域を含むゲノム DNA 断片を増幅した。その後シークエンサーを用いて増幅した PCR 産物の塩基配列を解読した。ゲノムへの変異が確認された細胞株の一部は Cell Lysis Buffer を用いて細胞抽出液を調製後、Kif24 タンパク質量を anti-Kif24 抗体 (当研究室小林哲夫博士により作成【Kobayashi., 2011】) を用いたウエスタンブロットにより Kif24 タンパク質量の減少を確認した。

以下にプラスミド作成に用いたプライマーを示す。

hKif24 genome nested PCR (1st PCR)

FW. Primer: 5'- ATGGCATCCTGGTTATATGAATG -3'

Rev. Primer: 5'- AATCCCCCAGTATTGCAGAAAGG -3'

hKif24 genome nested PCR (2nd PCR)

FW. Primer: 5'- GTGAAGCTGAACTTGCACAGTA -3'

Rev. Primer: 5'- GGTGAAAAGAGTGAAGTGCTGA -3'

hKif24 シーケンスプライマー

FW. Primer: 5'- TTCACTGCCCTTGGCCTTCA-3'

2.8 ウィルス作成

Lenti-X 293T 細胞を 100 mm dish に 40%では播種し 24 時間培養した。PBS を 930 μ l に対し pLVX-hKif24-IRES-Puro または pLVX-3Flag-IRES-Puro を 4.2 μ l、 Δ 8.9 を 3.2 μ l、VSVG を 2.2 μ l、pcRev を 0.4 μ l、PEI (1mg/ml) を 60 μ l 加え混合し、室温で 15 分間インキュベートした。その後、混合液を培養した Lenti-X 293T 細胞に加え、12 時間後培養液を交換し、さらに 60 時間培養した。培養液 9 ml を回収し、Lenti-X Concentrator (Clontech) 3 ml を加え 4°C で 30 分インキュベートし 1500 x g、4 °C で 45 分間遠心した。上清を除きペレットに PBS を 300 μ l 加え溶解した。

2.9 レスキュー細胞の作成

Kif24-3 細胞を 12 well plate に 30%の割合で播種し培養した。24 時間後、培地を除き新たに 5 μ g/ml Polybrene (Nacalai)になるように調整した培地に交換した。そこにレンチウイルス溶液 100 μ l を加え、72 時間培養した。その後、3 μ g/ml Puromycin になるように調整した培地に交換し、これを 4 日間ごと繰り返す、生存した細胞を Kif24-3 rescue 細胞とした。

2.10 免疫染色法

免疫染色に用いる細胞は 24 well plate で 12 mm カバーガラス上に接着させて培養した。培養液を除去し、PBS で 2 回洗浄した後、3.75% formalin/PBS に 10 分間浸して固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.2% TritonX-100/PBS に 10 分間浸して膜透過処理を行った。膜透過処理後、PBS で 2 回洗浄し 5% BSA/PBS に 30 分間浸してブロッキングを行い、5% BSA/PBS で希釈した一次抗体に室温で 2 時間浸した。その後、10 分間ごとに PBS での洗浄を 3 回行い、5% BSA/PBS で希釈した二次抗体に遮光しながら室温で 1 時間浸した。10 分ごとに遮光しながら PBS での洗浄を 3 回行い、マウント剤を用いて封入した。その後、蛍光顕微鏡 (Axio Observer: Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

使用した一次抗体と二次抗体および希釈倍率を以下に示す。

一次抗体

- Anti-Arl13b Rabbit Ab (Proteintech) : 1/2,000
- Anti-Arl13b Mouse Ab (NeuroMab) : 1/1,000
- Anti-Glutamylated tubulin Mouse Ab (GT335) (AdipoGen) : 1/1,000
- Anti-Ki67 Rabbit Ab (Abcam) : 1/2,000
- Anti-phospho histone H3 Mouse Ab (MAB institute) : 1/1,000
- Anti-IFT88 Rabbit Ab (Proteintech) : 1/1,000

二次抗体

- Alexa 488 labeled goat anti-mouse IgG (Molecular Probe) : 1/500
- Alexa 594 labeled goat anti-rabbit IgG (Molecular Probe) : 1/500

核染色試薬

- 10 mg/ml Hoechst: 1/2,000

2.11 RNA 抽出

12 well plate で細胞を培養し、Sepasol (Nacalai) を 1 ml 加えた。1.5 mL チューブへ移し、vortex で混和した後、室温で 5 分静置した。Chloroform を 0.2 ml 加え転倒混和した。室温で 2~3 分間、静置した後 15,000 rpm、4°C で 15 分間遠心した。水相を新しい 1.5 mL チューブへ移し、Isopropyl alcohol を 0.5 ml 加え、室温で 10 分間静置した後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を取り除いて 75%エタノールを 1 ml 加え、vortex で混和した。15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、上清を完全に除去し、2 分間程度室温で沈殿を乾かした。Nuclease-free water を 50 μ l 加えた後、RNA 濃度を Nanodrop による紫外吸光度の測定により求めた。

2.12 逆転写反応

ReverTraAce qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて、説明書に従い反応を行った。500 ng/7 μ l となるように調製した RNA を 65°C で 5 分間置いた後、氷上で 1 分間静置し、5 \times RT Buffer 2 μ l、RT Enzyme Mix 0.5 μ l、Primer Mix 0.5 μ l を加え、37°C で 15 分、98°C で 5 分という条件で逆転写反応を行った。

2.13 定量的 PCR

逆転写反応により得られた cDNA 0.5 μ l に対し、10 μ M Fw Primer 0.3 μ l、10 μ M Rev Primer 0.3 μ l、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) 5 μ l、MilliQ 水 3.9 μ l 加え Reaction mix を調製し、95 $^{\circ}$ C で 60 秒反応させた後、95 $^{\circ}$ C で 10 秒、56 $^{\circ}$ C で 30 秒を 40 サイクルの条件で PCR を行った。プライマーの配列を以下に示す。

GAPDH

qhGAPDH_1_F: 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTG-3'

qhGAPDH_1_R: 5'-ACTCCACGACGTACTCAGCG-3'

Kif24

qhKif24_1_F: 5'-GACGGCATTGTCTTCTCCTC-3'

qhKif24_1_R: 5'-AGGATGCCATTTTGGTGAAT-3'

qhKif24_2_F: 5'-ACCTTTCTGCAATACTGGGG-3'

qhKif24_2_R: 5'-TCTCCATCTCAGTCCAAGGA-3'

qhKif24_3_F: 5'-GGAGGTACGTTCGTGGAGAAA-3'

qhKif24_3_R: 5'-CGCCTCACCAAAGACTTCAT-3'

qhKif24_4_F: 5'-CTTGGCTGGCAGTGAAAGAG-3'

qhKif24_4_R: 5'-TGTGTTCTGATCCAGTGCT-3'

Kif2A

qhKif2A_1_F: 5'-TCCAGAAACACCTCCACCTC-3'

qhKif2A_1_R: 5'-GGAAATTGACTGGGCCGTG-3'

qhKif2A_2_F: 5'-TGA CTCAGCTCCTAATGAAATGG-3'

qhKif2A_2_R: 5'-CCACTTCCAGTCTGCCATA-3'

NEK2

qhNEK2_1_F: 5'-TTGGAGACTTTGGGCTAGCT-3'

qhNEK2_1_R: 5'-AGCAGCCCAATGACCAGATA-3'

qhNEK2_2_F: 5'-AGCCCTGTATTGAGTGAGCT-3'

qhNEK2_2_R: 5'-CACGAACACAAAGCTCCTGT-3'

2.14 フローサイトメトリーによる細胞周期の解析

培養皿中の培養液を PBS に置換して、0.25% Trypsin/EDTA 溶液で細胞を剥離させた後、15 ml チューブに移し 1,000 rpm、4°C で 3 分遠心した。PBS を 1 ml 加え再度 1,000 rpm、4°C で 3 分遠心した。上清を取り除き PBS を 200 μ l 加え懸濁した後、ボルテックスをしながら -20°C のエタノールを 500 μ l 加え氷上で 30 分間静置した。再び 1,000 rpm、4°C で 3 分遠心した。その後上清を捨て、再び遠心した後上清を捨てた。1 mM EDTA/PBS を 90 μ l、100 μ g/mL Propidium Iodide (PI) を 5 μ l、10 mM TE-RNase を 5 μ l 加え氷上で 45 分間静置した。その後 0.5 ml の 1 mM EDTA/PBS を加えた後フローサイトメトリー(FACS Calibur、Becton Dickinson) で PI の蛍光強度を測定した。得られたデータは解析ソフトウェア Flowjo (FLOWJO, LLC) を用いて解析した。

2.15 ウェスタンブロッティング

遠心分離により回収した細胞を Cell lysis buffer にて懸濁し、on ice で 30 分インキュベートした。その後 15,000 rpm、4°C、15 分間遠心分離し、上清を回収した。CBB G-250 溶液(5 倍濃縮、Nacalai tesque)を用いた Bradford 法により上清のタンパク質量を測定し任意の濃度に希釈後、sample buffer (5x)を加え 95°C で 5 分間インキュベートしたものをサンプルとした。アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により分離し、その後 polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜: Millipore)もしくは Nitrocellulose membrane に転写した。転写したメンブレンを Blocking buffer 中で 1 時間振盪させ、ブロッキングを行った後、Blocking buffer で希釈した一次抗体で 4°C でオーバーナイトし一次抗体反応を行った。その後メンブレンを PBS-T で 10

分毎に3回洗浄し、Blocking bufferで希釈したHRP標識二次抗体にメンブレンを浸し、1時間静置し二次抗体反応を行った。再びメンブレンをPBS-Tで10分毎に3回洗浄し、Chemi-Lumi One (Nacalai tesque)もしくはChemi-Lumi One Ultra (Nacal tesque)を用いて化学発光を検出した。

一次抗体

- Anti-Kif24 Rabbit Ab (当研究室小林哲夫博士により作成【Kobayashi., 2011】): 1/1,000
- Anti-NEK2 mouse Ab (BD): 1/2,000
- Anti-AurA Rabbit Ab (Cell signaling): 1/1,000
- Anti- β -actin mouse Ab (Santa Cruz Biotechnology): 1/2000

二次抗体

- Anti-Mouse-IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment (GE Healthcare): 1/5,000
- Anti-Rabbit-IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment (GE Healthcare): 1/5,000

Cell lysis buffer

50 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)

150 mM NaCl

5 mM EDTA

0.5% (v/v) NP-40

10% (w/v) Glycerol

1 mM DTT

2 μ g/ml Leupeptin

0.5 mM PMSF

5 mM NaF

10 mM β -Glycerol phosphate

1 mM Na₃VO₄

PBS-T

137 mM NaCl

8 mM NaHPO₄

1.5 mM KH₂PO₄

0.05% (W/V) Tween-20

TBS-T

50 mM Tris (pH=7.4)

138 mM NaCl,

2.7 mM KCl,
0.05% Tween 20

2.16 リン酸化の検出

発現プラスミドを導入した HEK293T 細胞を Cell lysis buffer で溶解しウェスタンブロッティングと同様の方法で細胞抽出液を作成した。タンパク質量 500 μg に対し Anti-FLAG M2 affinity Gel (Sigma Aldrich #A2220)を 10 μl 加え、サンプルの溶液量が 500 μl になるように調整した。このサンプルを 4°C で 3 時間穏やかに攪拌させ反応させた。反応後、レジンを Cell lysis buffer で 3 回洗浄した。さらに CIAP Buffer で洗浄し、上清を取り除き CIAP Buffer を 10 μl と CIAP を 1 μl 加え 37°C で 1 時間反応させた。上清を除去し sample buffer (2 x)を加え 95°C で 5 分間インキュベートしたものをサンプルとした。SDS-PAGE 用ゲルは 8%で作成し電気泳動は 100 V で 20 分泳動した後、150 V で 3 時間泳動した。さらに、PVDF 膜への転写は 50 V で 2 時間行い、これを検出した。

2.17 細胞増殖アッセイ

24-well plate に PANC1 細胞を 1 x 10⁴ cells/well で播種し 72 時間または 144 時間、培養した。72 時間または 144 時間経過後 0.25 % Trypsin/EDTA 溶液 100 μl で細胞を剥がし、そこに 100 μl の DMEM 培地を加え細胞を懸濁した。200 μl の細胞懸濁液に 10 μl の Trypan blue を加え血球計算盤を用いて生細胞数をカウントした。

2.18 異種移植実験

培養皿に 3 x 10⁷ cells/well の細胞を培養し、0.25% Trypsin/EDTA 溶液で細胞を剥離し PBS 0.5 ml に懸濁し細胞懸濁液を作成した。細胞懸濁液をセルストレーナー付ラウンドボトムチューブ(FALCON)を用いフィルトレーションした溶液から 2 x 10⁷ Cells の細胞懸濁液を調整した。細胞懸濁液 100 μl をマウス(系統: BALB/c nu/nu、性別: メス、週齢: 7 週齢)1 匹に対し 2 箇所皮下にインジェクションした。その後、14 週間マウスを飼育すると共に観察し腫瘍の大きさを縦、横、高さを測定し腫瘍の体積を算出した。14 週経過した後マウスから腫瘍を摘出し腫瘍重量を測定した。

腫瘍体積=縦 x 横 x 高さ x 0.5

2.19 組織切片作成

摘出した腫瘍を 10% Sucrose/PBS, °C で腫瘍が液内で沈降するまで静置し、20% Sucrose/PBS に入れ替え、一晩 4°C に静置した。その後、30% Sucrose/PBS に置換し、さらに一晩 4°C に静置した。30% Sucrose/PBS で置換させた腫瘍を OTC Compound を充填したケースに入れ

-80°C で凍結した。その後、マイクロトームを用い 7 μm の厚さで切片を切り出しシランコートされたスライドガラスに吸着させた。

2.20 組織免疫染色

組織切片を Acetone 中で 15 分間浸し固定した。PBS で 4 回洗浄した後、10 mM EDTA 溶液に入れた組織切片を 15 分間、電子レンジで沸騰させた。その後、完全に乾燥させ、0.2% TritonX-100/PBS に 10 分間浸して膜透過処理を行った。膜透過処理後、PBS で 2 回洗浄し 5% BSA/PBS に 30 分間浸してブロッキングを行い、5% BSA/PBS で希釈した一次抗体に室温で 2 時間浸した。その後、10 分間ごとに PBS での洗浄を 3 回行い、5% BSA/PBS で希釈した二次抗体に遮光しながら室温で 1 時間浸した。10 分ごとに遮光しながら PBS での洗浄を 3 回行い、マウント剤を用いて封入した。その後、蛍光顕微鏡(Axio Observer: Carl Zeiss) を用いて観察を行った。

使用した一次抗体と二次抗体および希釈倍率を以下に示す。

- Anti-Arl13b Rabbit Ab (Proteintech) : 1/1,000
- Anti-Acetylated tubulin Mouse Ab (AdipoGen) : 1/1,000
- Anti-Ki67 Rabbit Ab (Abcam) : 1/1,000
- Anti-phospho histone H3 Mouse Ab (MAB institute) : 1/1,000

第3章 結果

3.1 膵管癌細胞における一次繊毛消失に介在する分子の同定

膵管癌細胞において AurA の下流で一次繊毛消失に関与する分子は同定されていないため、以下に探索した。

3.1.1 PANC1 細胞の一次繊毛消失に介在する分子の探索

当研究室において、正常細胞の一次繊毛退縮に働く HDAC6 が膵管癌細胞では一次繊毛消失に寄与しないことが示された(図 6)。そこで、膵管癌では HDAC6 以外の分子が一次繊毛の消失に働くと考え、現在までに一次繊毛退縮に関与する分子として報告されている Kif24 と Kif2A に注目し、これらの分子が膵管癌細胞の一次繊毛消失に関与するかを検証した。膵管癌細胞株である PANC1 細胞は、血清飢餓培養条件下において低頻度(15-25%)で一次繊毛を形成することがわかっている。そこで、Kif24 及び Kif2A に対する siRNA を用いてこれらの分子を発現抑制した PANC1 細胞を血清飢餓培地で培養し一次繊毛形成を調べた。それぞれに対する siRNA を導入した細胞において 2 種類のプライマーを用いて mRNA レベルを qPCR によって測定した。その結果、Kif24 に対する siRNA を導入した細胞の Kif24 の mRNA レベルにおいて 40%程度の減少が観察された。一方、Kif2A siRNA 導入細胞の Kif2A の mRNA レベルは 2 つの異なる siRNA(siKif2A_1 及び SiKif2A-3UTR)いずれの場合も 75%程度の減少が認められた(図 7a)。次に、免疫染色法により各サンプルの一次繊毛形成(Arl13b: cilia) と増殖マーカーである Ki67 陽性細胞の割合を評価した。その結果、siKif24_3UTR を導入した細胞においてコントロール(siLuc) と比較し一次繊毛形成率の有意な増加が確認された。一方、Kif2A に対する 2 本の siRNA を導入した細胞ではいずれの場合も一次繊毛形成率の有意な増加は見られなかった(図 7b)。また、一次繊毛形成率の上昇が見られた Kif24 に対する siRNA を用い場合の Ki67 陽性細胞の割合には変化が見られなかった。同様に、Kif2A に関しても Ki67 の割合に影響は見られなかった。これらの結果から、膵管癌細胞において血清飢餓条件下で Kif24 を発現抑制すると Ki67 陽性細胞の割合に関係なく一次繊毛を誘導することが示唆された。

また、siKif24 の導入によって増加する一次繊毛様の構造体が真に一次繊毛であるかを確認するため、複数の一次繊毛のマーカー(グルタミン酸化チューブリン、Arl13b、アセチル化チューブリン、IFT88) を用いて免疫染色を行った。その結果、siKif24 の導入によりすべての一次繊毛マーカー陽性の構造体が増加したことから、Kif24 の発現抑制は構造的に正常な一次繊毛形成を誘導することが示唆された(図 8)。

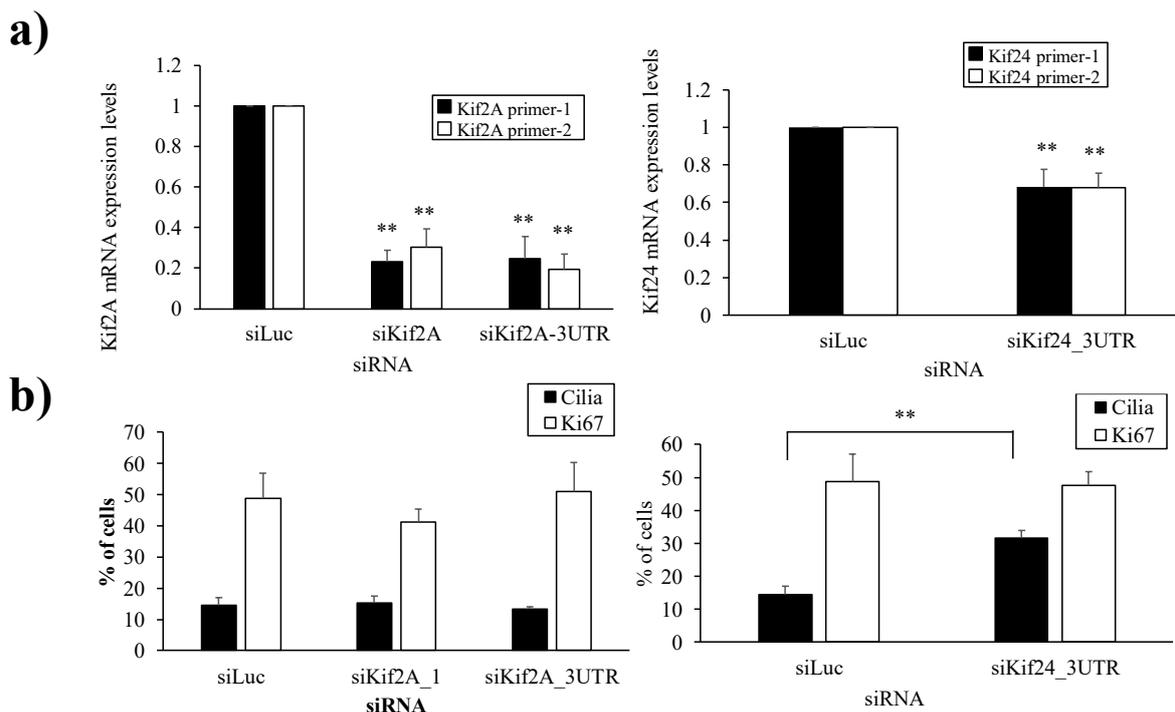


図7 PANC細胞における siRNA を用いた Kif24, Kif2A の発現抑制と一次繊毛形成

(a) PANC1 細胞においてコントロール siRNA (siLuc) と Kif2A に対する siRNA (siKif2A_1、siKif2A_3UTR) 及び Kif24 に対する siRNA (siKif24_3UTR) を導入し定量的 PCR を用いてそれぞれ 2 本のプライマーでノックダウン効率を求めた。白と黒のカラムはそれぞれ異なるプライマーを示す。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3) (b) PANC1 細胞において Kif24 と Kif2A を発現抑制し、血清飢餓条件下で 48 時間培養した。その後、一次繊毛マーカーである Arl13b と細胞周期マーカーである Ki67 で免疫染色し、核を Hoechst で染色した。その後、一次繊毛形成率と Ki67 陽性細胞の割合を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3-5)

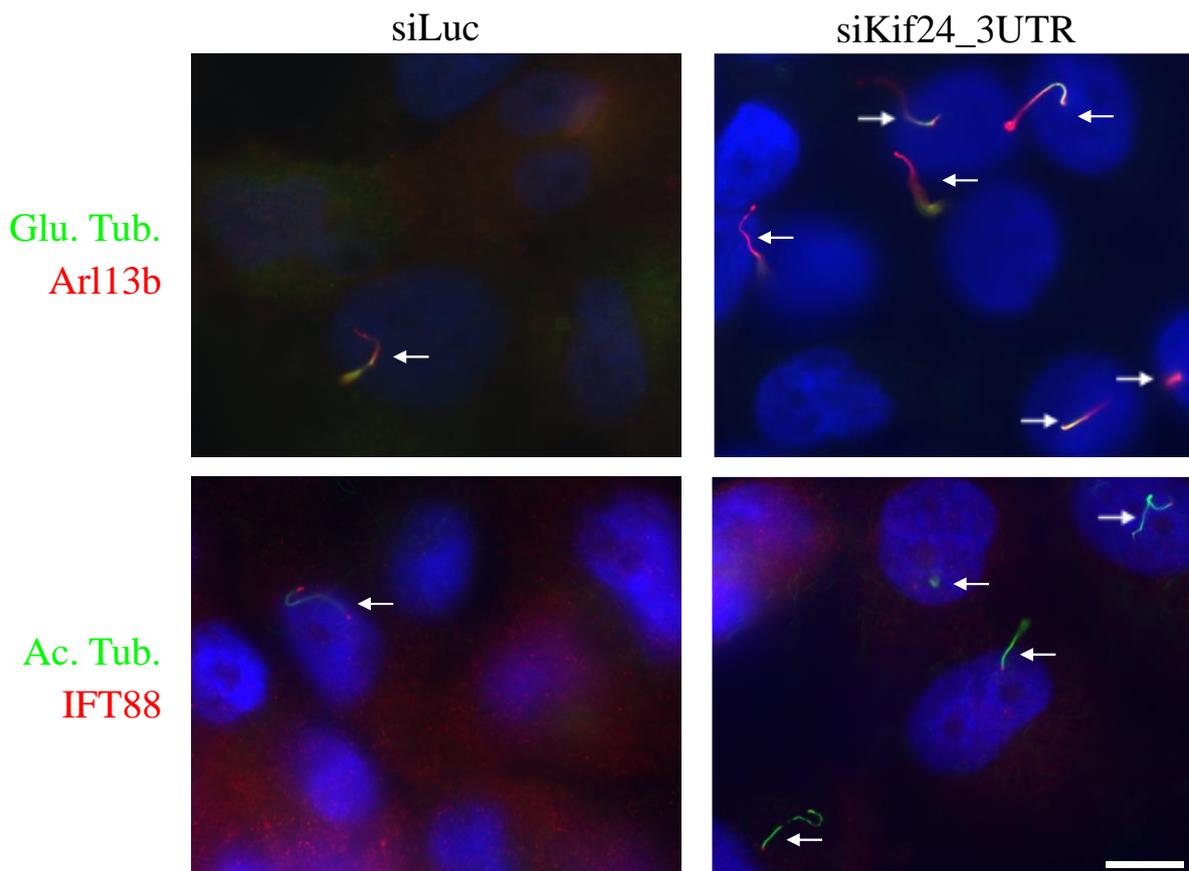


図8 siRNAによるKif24発現抑制 PANC1細胞における各種抗体を用いた免疫染色

PANC1細胞において図7と同様の方法でコントロールsiRNA(siLuc)とKif24に対するsiRNA(siKif24_3UTR)を導入、(上図)グルタミン酸化チューブリン(緑)とArl13b(赤)、(下図)アセチル化チューブリン(緑)とIFT88(赤)に対する抗体で免疫染色した。核はHoechstで染色した(青)。白矢印：一次繊毛(Scale bar: 10µm)

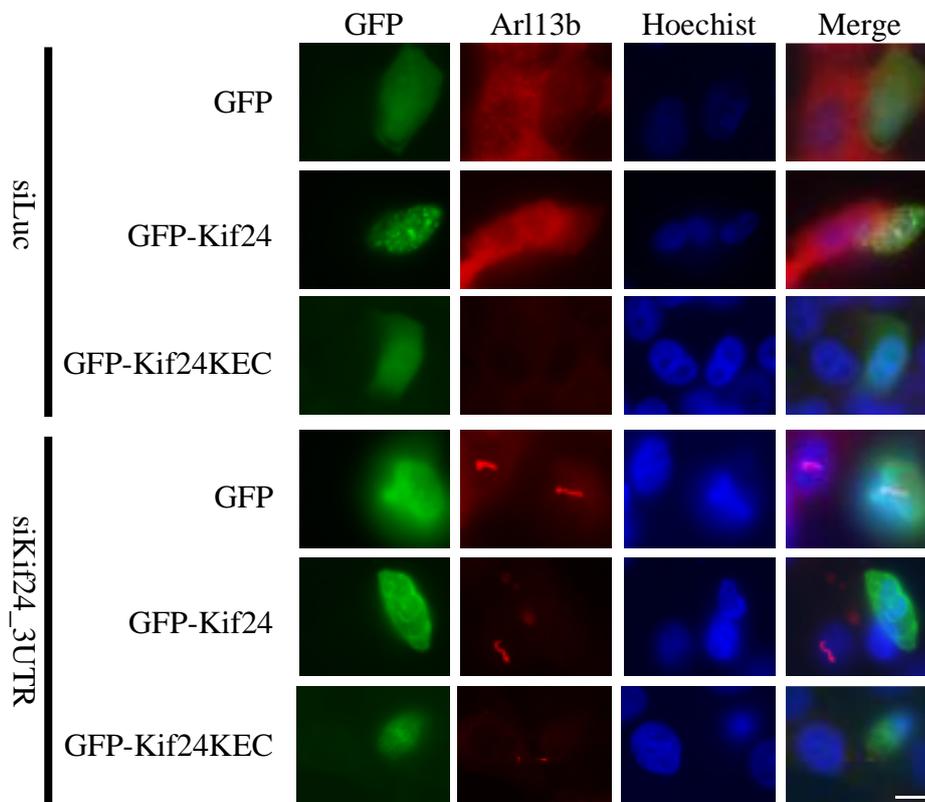
3.1.2 PANC1細胞におけるKif24の一次繊毛消失に対する効果の検証

Kif24の過剰発現が膵管癌細胞の一次繊毛形成を抑制するか確かめるため、PANC1細胞にGFP融合Kif24を異所性発現し一次繊毛形成を調べた。その結果、siLucを導入した細胞においてGFP-Kif24を異所性発現させるとコントロール細胞よりも一次繊毛が有意に減少した(図9 siLuc & GFP vs siLuc & GFP-Kif24)。Kif24/KEC変異体はKif24の微小管分解活性を失った変異体である【Kim et al., 2015】。この変異体を用い、Kif24の微小管分解活性が膵管癌細胞の一次繊毛消失に寄与するか調べた。その結果、KEC変異体を発現させた細胞では一次繊毛の有意な減少は確認されなかった(図9, siLuc & GFP vs siLuc & GFP-Kif24/KEC)。

次に、Kif24の発現抑制によって増加した一次繊毛がKif24の異所性発現によってレスキューされるか検証した。siKif24-3UTRによってKif24を発現抑制しGFPを導入した細胞では一次繊毛が増加したのに対しKif24発現抑制下でGFP-Kif24を異所性発現させると、Kif24の発現抑制による一次繊毛の増加がGFP-Kif24の異所性発現によって抑制された(図9, siKif24 & GFP vs siKif24-3UTR & GFP-Kif24)。一方、Kif24発現抑制下でGFP-Kif24/KECを異所性発現させた細胞でも同様に一次繊毛形成が抑制されたが、野生型を発現させた細胞より抑制効果は低かった(図9, siKif24 & GFP vs siKif24-3UTR & GFP-Kif24/KEC)。

これらの結果から、Kif24 は PANC1 細胞において一次繊毛消失に寄与する分子であることが示唆された。さらに、Kif24 による一次繊毛消失は Kif24 の微小管分解活性に依存することも示唆された。

a)



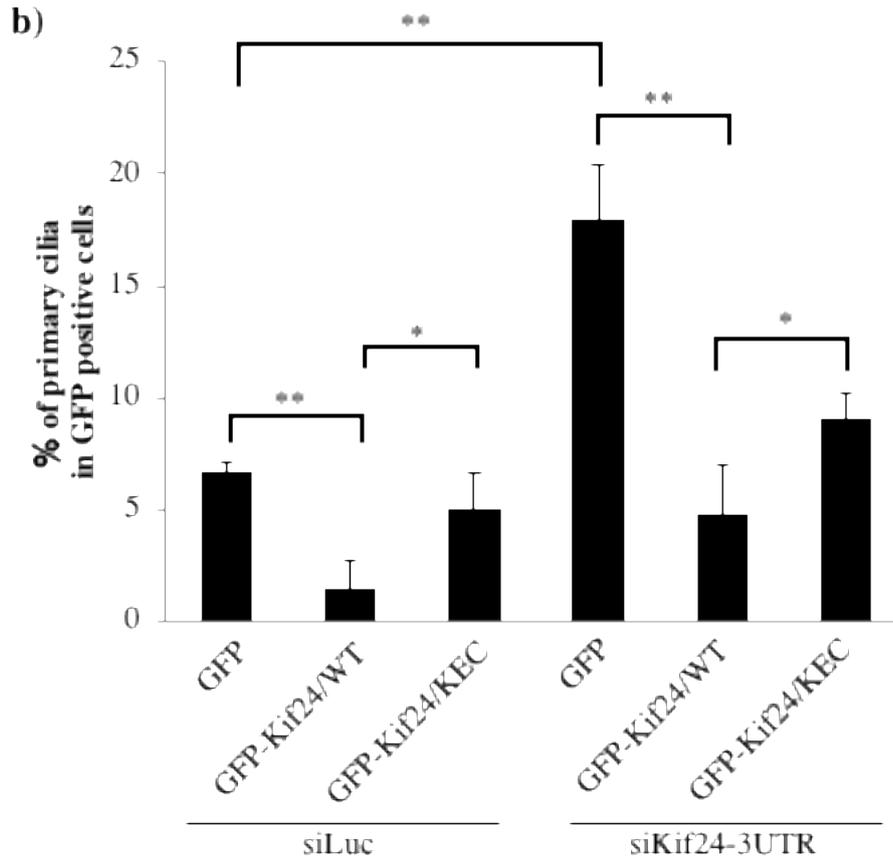


図9 PANC1細胞におけるKif24レスキュー実験

(a) PANC1細胞においてコントロール(siLuc)またはsiKif24_3UTR (siKif24)のsiRNAを、GFP、GFP-Kif24、GFP-Kif24/VD、GFP-Kif24/KECと共に導入し、48時間培養した。その後一次繊毛マーカーであるArl13b(赤)で免疫染色し、核をHoechstで染色した(青)。(Scale bar=10 μ m) (b) GFP陽性細胞における一次繊毛形成率を算出した。グラフは平均値 \pm 標準偏差を示す>(* P<0.05, ** P<0.01, n=3-4)

3.1.3 CFPAC1細胞におけるKif24発現抑制による影響

PANC1細胞においてKif24が一次繊毛消失に寄与することが示唆された。そこで、同様の効果が他の膵管癌細胞においても見られるかを検討するために、低頻度で一次繊毛を形成することが既知である膵管癌細胞株CFPAC1細胞を用いてKif24の発現抑制を行った。その結果、PANC1細胞と同様に、Kif24発現抑制により細胞周期中の細胞数の割合に変化は見られなかったが、一次繊毛形成率の有意な増加が確認された(図10)。この結果から、膵管癌細胞において普遍的にKif24が一次繊毛消失に寄与していることが示唆された。

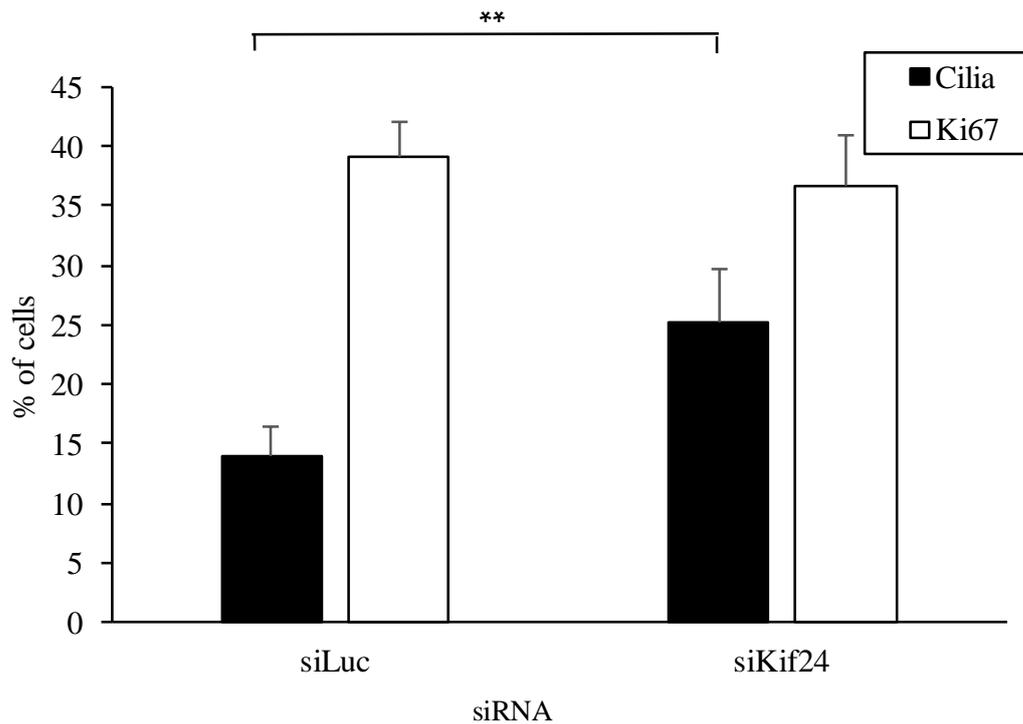


図 10 CFPAC1 細胞における siRNA による Kif24 の発現抑制実験

CFPAC1 細胞においてコントロール(siLuc) または siKif24_3UTR (siKif24) の siRNA を導入し、血清飢餓条件下で 48 時間培養後、図 7 と同様に細胞を染色した。その後一次繊毛と Ki67 陽性細胞の割合を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(** P<0.01, n=3)

3.1.4 CRISPR/CAS9 システムによる Kif24 発現抑制 PANC1 細胞の樹立

恒常的に一次繊毛が増加した細胞となることが期待される Kif24 ノックアウト細胞の樹立を試みた。PANC1 細胞において CRISPR/CAS9 システムを用いて Kif24 遺伝子の翻訳領域に変異を導入し Kif24 ノックアウト PANC1 細胞の候補として Kif24-3 を得た。Kif24-3 細胞における Kif24 遺伝子の変異をゲノムシーケンス法によって調べた。その結果、Kif24-3 細胞は Kif24 遺伝子に異なる 4 つの変異を持つことが確認された(図 11, a)。しかしながら、変異の確認された遺伝子配列の中にフレームシフトの起こらない 3 塩基欠失の変異を持つことも確認された。この結果から、Kif24-3 細胞は Kif24 ノックアウト細胞ではないと判断したが、今後の実験において一次繊毛が恒常的に増加した細胞であることが重要であるため、変異の確認された Kif24-3 細胞において Kif24 タンパク質発現量と一次繊毛形成率を評価した。まず、Kif24-3 細胞においてタンパク質発現量を調べた。その結果、Kif24-3 細胞において野生型の PANC1 細胞と比較し明らかな Kif24 タンパク質量の減少が確認された(図 11, b)。次に、血清飢餓条件下での一次繊毛形成率を調べた。その結果、siRNA による発現抑制よりも顕著な一次繊毛形成率の増加が有意に確認された(図 11, c)。次に、Kif24-3 細胞で見られる一次繊毛の増加が Kif24 発現抑制による効果であることを検証するために、Kif24 一過性発現によるレス

キュー実験を行った。その結果、Kif24-3 細胞において見られる一次繊毛増加は Kif24/WT 異所性発現によってレスキューされた(図 11, d)。一方、微小管分解活性を失った Kif24 変異体である Kif24/KEC の異所性発現ではレスキューされなかった(図 11, d)。この結果は siRNA による実験と同様の結果であった(図 9b)。次に、細胞の増殖条件下において Kif24-3 細胞が一次繊毛を形成するか検証したところ、Kif24-3 細胞において有意に一次繊毛が増加した(図 11, e)。また、レンチウイルスを用いて Kif24 を恒常的に異所性発現する細胞(Kif24-3rescue)を作成し、増加した一次繊毛形成がキャンセルされるか調べた。その結果、Kif24-3rescue 細胞において一次繊毛形成はほぼ野生型と同様まで抑えられた(図 11, e)。これらの結果から、Kif24-3 細胞は一次繊毛が増加した恒常的な Kif24 ノックダウン細胞であることが示唆された。

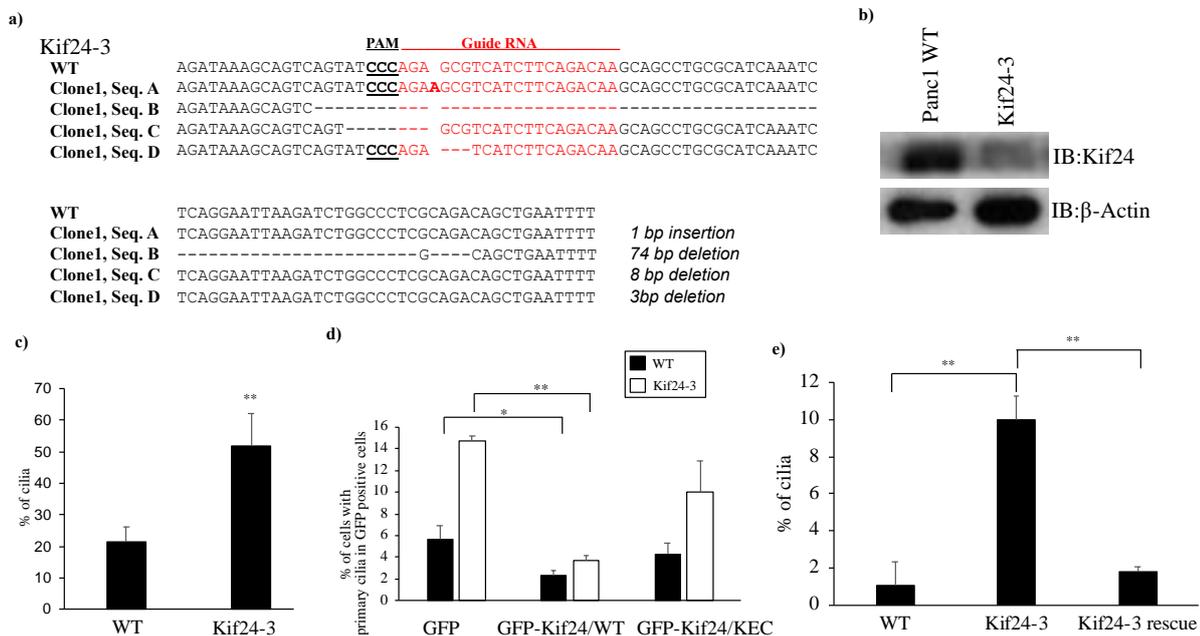


図 11 CRISPR-CAS9 システムによる Kif24 遺伝子変異細胞の樹立

(a)CRISPR/Cas9 と hKif24 に対する gRNA を PANC1 細胞に導入し Clone1 及び Clone2 細胞を樹立した。樹立 PANC1 細胞からゲノムを抽出し、ターゲット領域の配列を解析した。-は欠損箇所を表している。また、PAM 配列と gRNA を示している。(b) PANC1 細胞と恒常的 Kif24 ノックダウン細胞の Kif24-3 細胞における Kif24 の発現量をウェスタンブロットにて解析した。(c) PANC1 細胞と恒常的 Kif24 発現抑制細胞を血清飢餓条件下で 48 時間培養した。(d) PANC1 細胞と恒常的 Kif24 発現抑制細胞に GFP, GFP-Kif24, GFP-Kif24/KEC と共に導入し、血清飢餓条件下で 48 時間培養した。その後、一次繊毛マーカーで染色し一次繊毛の割合を算出した。(e)血清存在下で 48 時間培養し一次繊毛形成率を調べた。(c, e) 図 7 と同様に細胞を染色し、一次繊毛形成率を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3)

3.1.5 PANC1 細胞の一次繊毛消失における NEK2 関与の検証

NEK2 は乳癌細胞及び正常細胞であるヒト網膜由来 RPE-1 細胞において Kif24 をリン酸化し一次繊毛の消失を促進していることが報告されている【Kim et al., 2015】。また *In silico* による網羅的な AurA の基質の探索により NEK2 が AurA の基質になり得ることが示唆されている【Sardon et al., 2010】。これらの報告から膵管癌細胞の一次繊毛消失において NEK2 が介

在している事を想定した。そこで PANC1 細胞において NEK2 に対する 2 種類の異なる siRNA を用いて発現抑制した際に一次繊毛が誘導されるかを検証した。2 種類の siRNA による NEK2 の発現抑制は同程度に NEK2 の mRNA を減少させ、どちらも PANC1 細胞において一次繊毛の形成を誘導した (図 12a-c)。しかしながら、siNEK2#1 と比較し siNEK2#2 では一次繊毛形成率が高くなる傾向が観察された(図 12a-c)。さらに、siNEK2#1 を用いた場合 Ki67 陽性細胞の割合に影響は確認されなかったが、siNEK2#2 では Ki67 の割合の減少が確認された(図 12a-c)。この結果から、siNEK2#1 に比べ siNEK2#2 の高い一次繊毛形成率はこの siRNA による増殖抑制によって引き起こされた分が加味されている可能性が想定された。しかしながら、2 種類の異なる siRNA によって一次繊毛形成の増加が確認されたことから、NEK2 の発現抑制は膵管癌細胞において一次繊毛形成を誘導することが示唆された。

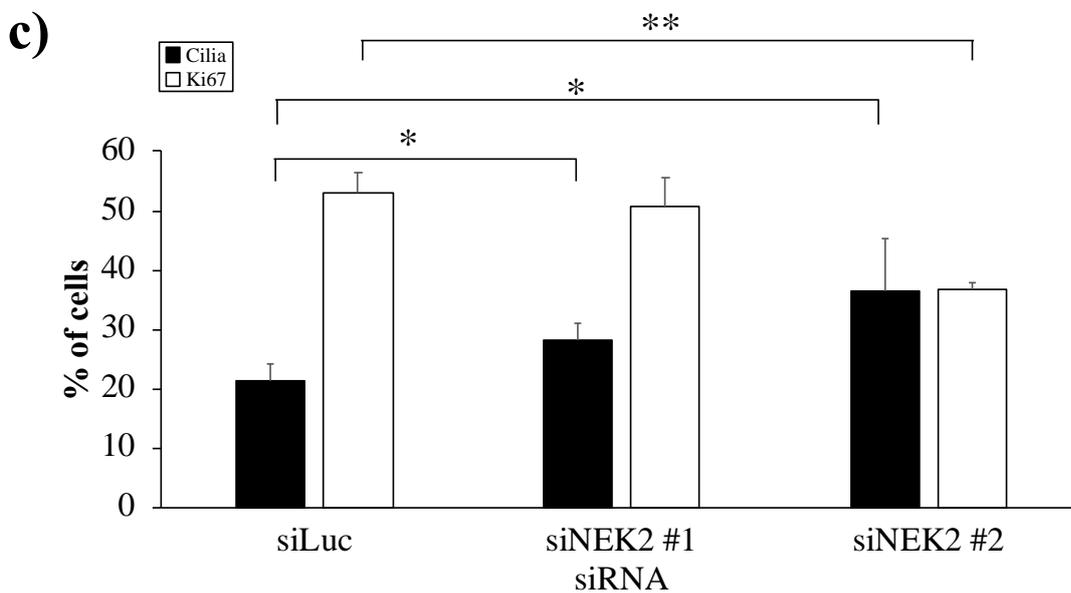
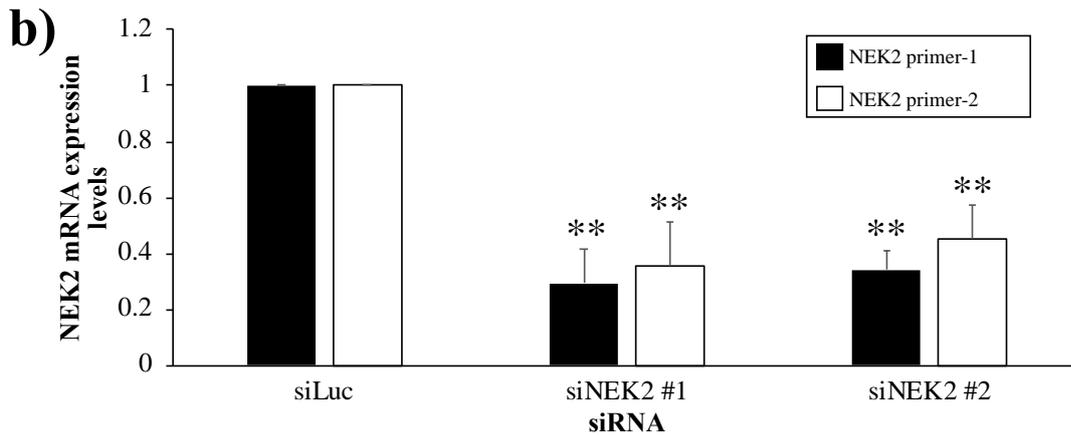
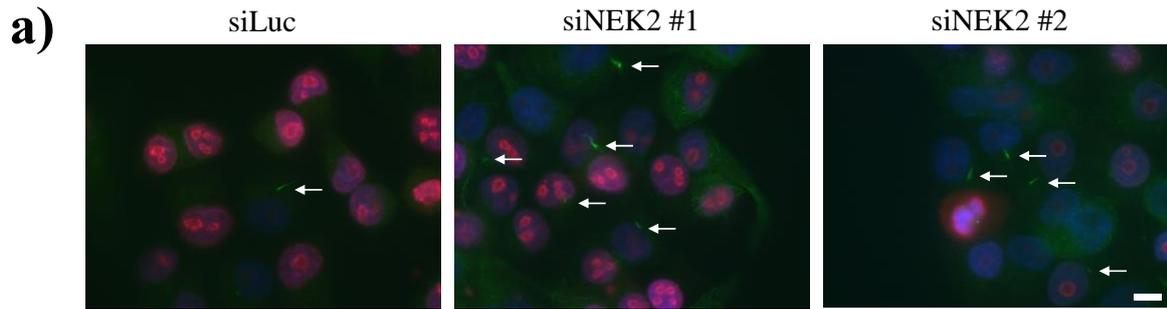


図 12 PANC1 細胞における siRNA による NEK2 の発現抑制実験

(a) PANC1 細胞においてコントロール (siLuc) または NEK2 に対する siRNA (siNEK2#1、siNEK2#2) を導入し、血清飢餓条件下で 48 時間培養後、図 7 と同様に細胞を染色した。その後一次繊毛マーカーである GT335 (緑) と細胞周期マーカーである Ki67 (赤) で免疫染色し、核を Hoechst で染色した (青)。白矢印：一次繊毛 (Scale bar=10 μ m) (b) PANC1 細胞においてコントロール (siLuc) または NEK2 に対する siRNA (siNEK2#1、siNEK2#2) を導入し定量的 PCR を用いてそれぞれ 2 本のプライマーでノックダウン効率を求めた。白と黒のカラムはそれ

それぞれ異なるプライマーを示す。グラフは平均値±標準偏差を示す。(** P<0.01, n=3) (c)NEK2 を発現抑制した PANC1 細胞において一次繊毛形成率を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3)

3.2 膵管癌細胞における一次繊毛消失機構の解析

AurA 阻害剤である Alisertib 処理による AurA の単独阻害は一次繊毛を誘導することが報告されている【Kobayashi et al., 2017】。また NEK2 や Kif24 に対する siRNA を用いた発現抑制は膵管癌細胞に一次繊毛形成を誘導すること明らかとなった(図 7-12)。。さらに、AurA は NEK2 の基質となる可能性が示唆されている【Sardon et al., 2010】。また AurA と NEK2 は細胞内において複合体を形成していることが報告されている【DeVaul et al., 2017., . Jeong et al., 2018】。これらの結果から、膵管癌細胞において AurA の下流で NEK2 及び Kif24 が介在し一次繊毛を消失させている可能性を想定し検証した。

3.2.1 PANC1 細胞における AurA-NEK2-Kif24 経路の検証

これまでの結果と以前の報告から AurA、NEK2 及び Kif24 が膵管癌細胞において協調的に一次繊毛消失に寄与する可能性を想定した。そこで、まず PANC1 細胞において AurA 阻害剤である Alisertib 処理および Kif24 発現抑制の併用の効果が、それぞれ単独処理の効果と比較し、どのような効果を示すか調べた。その結果、Alisertib 処理、Kif24 発現抑制によりそれぞれコントロールと比べて一次繊毛形成率の上昇が観察されたが、Alisertib の処理と Kif24 発現抑制を併用した細胞の一次繊毛形成率は単独処理細胞と比べて差が見られなかった(図 13a)。また、Ki67 の割合に変化はなかった(図 13a)。更に、同様の条件下で AurA 阻害と NEK2 の発現抑制や NEK2 発現抑制と Kif24 の発現抑制の組み合わせで実験を行った。その結果、図 13a と同様に相加的な効果を示さないという結果が得られた(図 13b, c)。これらの結果から、AurA 及び NEK2、Kif24 という 3 分子はそれぞれ独立して一次繊毛消失に寄与するのではなく、同一経路上に存在し PANC1 細胞で一次繊毛消失を促進する可能性が示唆された。

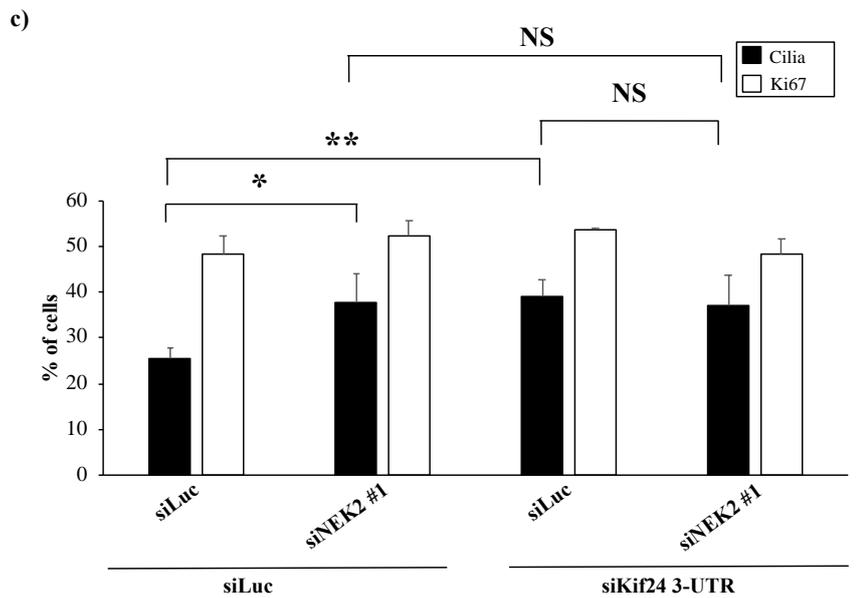
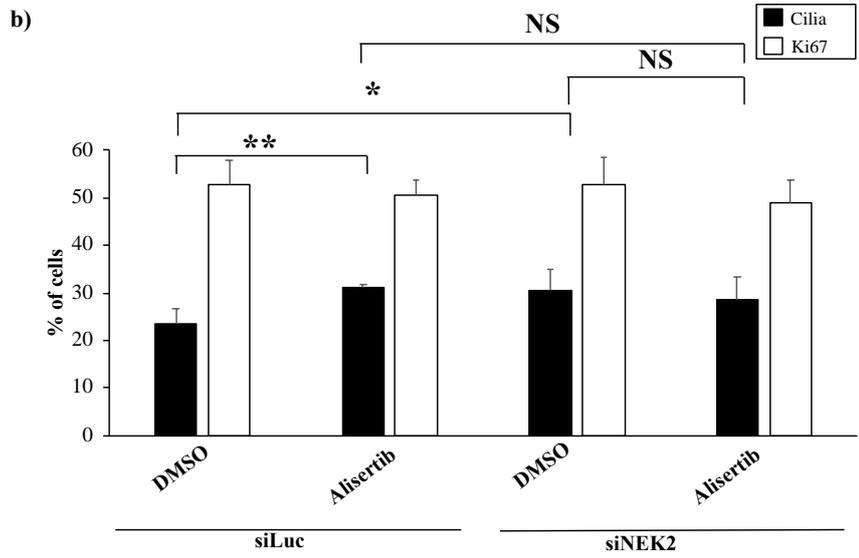
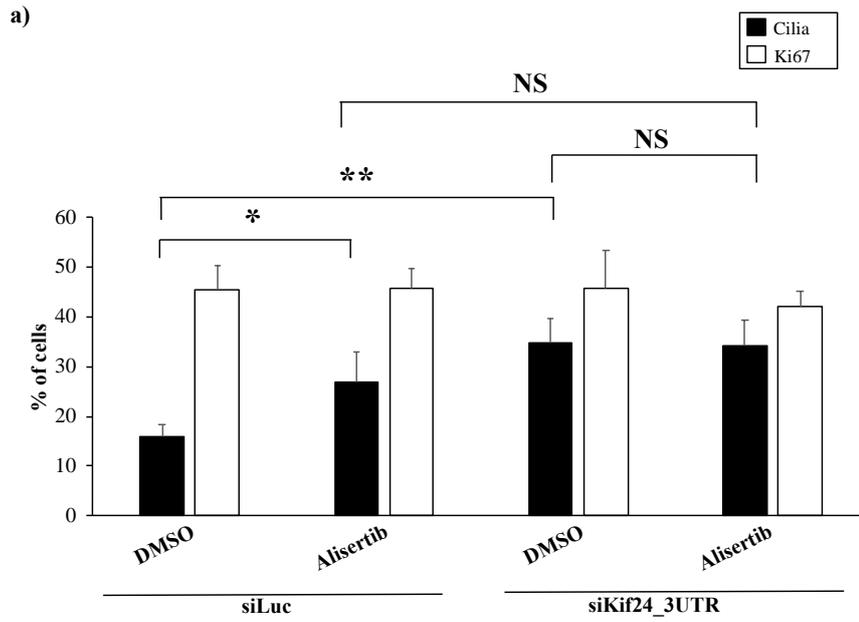


図 13 PANC1 細胞における AurA 阻害剤、NEK2 発現抑制及び Kif24 発現抑制効果の検討

(a-c)PANC1 細胞において図 7 と同様の方法で siRNA (siLuc、siKif24_3UTR、siNEK2#1) を導入した。その後、血清飢餓条件下で 48 時間培養した。(a, b)siRNA 導入後、AurA 阻害剤である Alisertib を終濃度 30 nM になるように処理し、血清飢餓条件下で 48 時間培養した。その後図 7 と同様に細胞を染色し、一次繊毛形成率と Ki67 陽性細胞数の割合を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3-5)

3.2.2 AurA 及び NEK2 による Kif24 のリン酸化の検証

膵管癌細胞内で AurA、NEK2 及び Kif24 は同一経路で一次繊毛消失を制御している可能性が考えられた。そこで次に細胞内における Kif24 のリン酸化状態が AurA 及び NEK2 によって制御を受けるか調べた。HEK293T 細胞を用いて Kif24 と AurA 及び NEK2 を共発現させたときの Kif24 のリン酸化状態をウェスタンブロット法によるバンドのシフトにより検出した。その結果、Kif24 のバンドが AurA および NEK2 との共発現によって高分子量側にシフトすることが確認された(図 14a 右図)。一方で AurA、NEK2、Kif24 の三者を共発現させた時に、二者(AurA と Kif24 または NEK2 と Kif24) を発現させた時と比較し顕著なリン酸化の亢進は確認できなかった(図 14a 右図)。次に、この Kif24 のバンドシフトがリン酸化によるものかを検証するために CIAP を用いて脱リン酸化処理することによりバンドシフトが消失するか検証した。その結果、AurA 及び NEK2 との共発現によって起こった Kif24 バンドのシフトが CIAP 処理によって消失した(図 14a 右図)。また、AurA、NEK2、Kif24 の三者を発現させた細胞においても同様にバンドシフトの消失が確認された(図 14a 右図レーン 3、5 VS レーン 7)。この結果から、細胞内において Kif24 は AurA 及び NEK2 によってリン酸化状態に影響を受けることが判明した。

次に、AurA 及び NEK2 発現細胞で確認されたバンドシフトがそれぞれのキナーゼ活性によるものかを、それぞれ AurA 及び NEK2 のキナーゼ活性を失った変異体を用い調べた【Kobayashi et al., 2017; Kim et al., 2015】。その結果、野生型 AurA において見られたバンドシフトは AurA の変異体によって減弱した(図 14b レーン 2 vs レーン 3)。同様の効果が NEK2 の変異体においても確認された(図 14b レーン 4 vs レーン 5)。次に、AurA、NEK2 の野生型、変異型を組み合わせ発現させた。野生型の AurA 及び NEK2 の共発現によって観察されたバンドシフトは変異体 AurA 及び野生型 NEK2 の発現では顕著な減弱は観察できなかった(図 14c レーン 6 vs レーン 7)。一方で、野生型 AurA と変異体 NEK2 の共発現ではバンドシフトが抑制された(図 14b レーン 6 vs レーン 8)。更に 2 つの不活性型変異体を用いた場合には、最も強く Kif24 のバンドシフトが抑制された(図 14b レーン 6 vs レーン 9)。これらの結果から、AurA や NEK2 のキナーゼ活性は Kif24 のリン酸化状態に影響することが示唆された。さらに Kif24 のリン酸化は AurA よりも NEK2 によるリン酸化の影響が強いことから、AurA の下流で NEK2 が機能する可能性が考えられる。

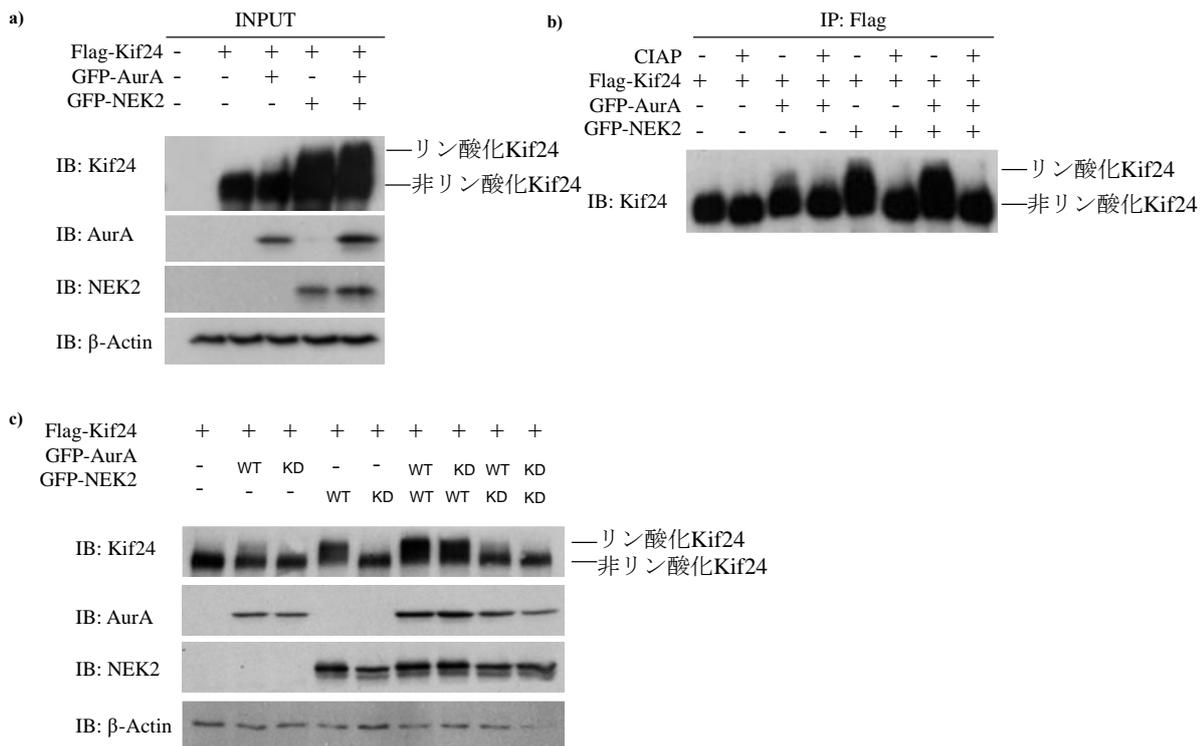


図 14 HEK293T 細胞を用いた AurA 及びNEK2 による Kif24 リン酸化の検証

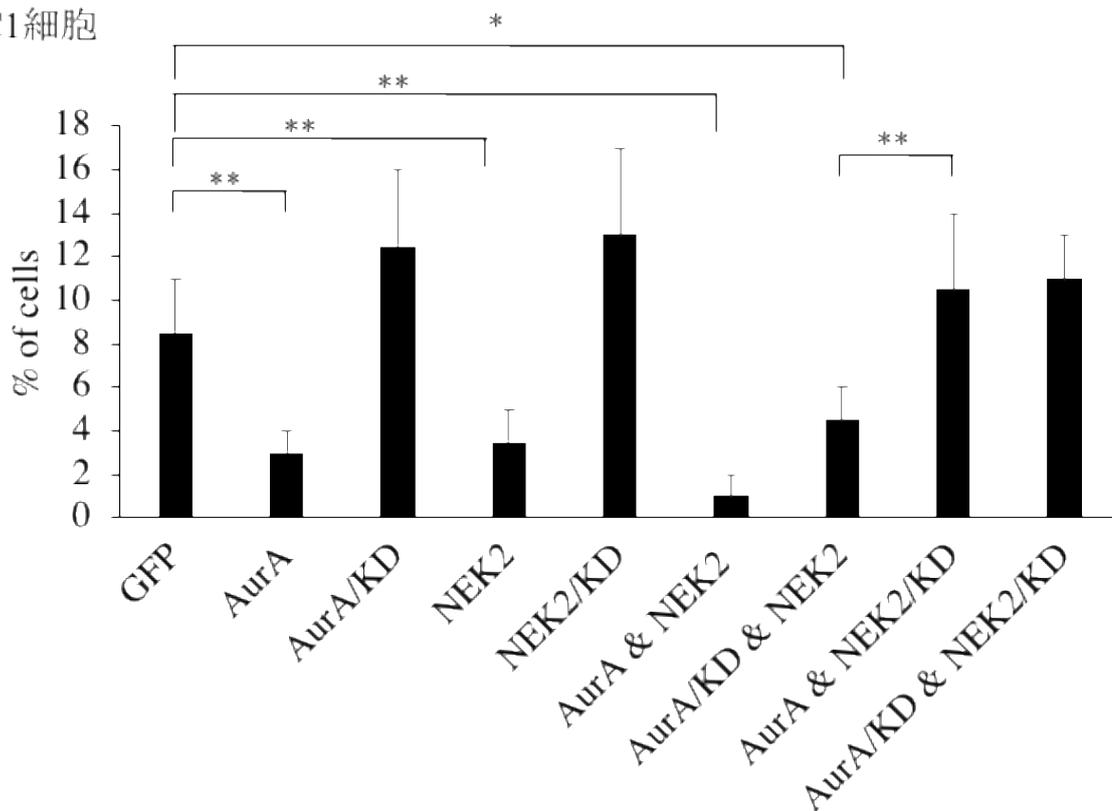
(a)HEK293T 細胞に Flag-Kif24、GFP-AurA、GFP-NEK2 を組み合わせて導入し、細胞抽出液を作成した。ウエスタンブロットにより Kif24、AurA、NEK2、 β -アクチンに対する抗体を用いて検出した。(b)細胞抽出液を Flag タグを用いた免疫沈降させ得たサンプルを CIAP で 2 時間処理した。その後ウエスタンブロットにて Kif24 抗体を用いて検出した。(c) HEK293T 細胞に Flag-Kif24、GFP-AurA、GFP-AurA KD、GFP-NEK2、GFP-NEK2KD を組み合わせて導入し、細胞抽出液を作成した。ウエスタンブロットにより Kif24、AurA、NEK2、 β -アクチンに対する抗体を用いて検出した。KD: Kinase dead (不活性変異)体

3.2.3 PANC1 細胞における AurA 及び NEK2 を介した一次繊毛消失経路の検証

先に示したように、細胞内において Kif24 のリン酸化状態は AurA 及び NEK2 のキナーゼ活性によって制御されることを示唆した。そこで、これらのキナーゼが PANC1 細胞において一次繊毛消失に与える影響を検証した。それぞれ GFP 融合タンパク質を PANC1 細胞に発現させた細胞において、一次繊毛形成率を調べた。その結果、コントロール細胞と比較し野生型 AurA を発現させた細胞において一次繊毛形成率の低下が確認された(図 15a, GFP-AurA)。一方で、AurA の不活性変異体では一次繊毛形成率が増加した(図 15a, GFP-AurA KD)。同様の効果は NEK2 の野生型及び変異体でも確認された(図 15a, GFP vs GFP-NEK2, GFP vs GFP-NEK2 KD)。更に、変異体 AurA と野生型 NEK2 を発現させた細胞においては一次繊毛形成率が低下したのに対し、野生型 AurA と変異体 NEK2 の共発現ではコントロールと同程度の一次繊毛形成率を示した(図 15a, GFP-AurA KD & GFP-NEK2, GFP-AurA & GFP-NEK2 KD)。また、変異体の AurA 及び NEK2 の共発現細胞では一次繊毛形成率が増加した(図 15a, GFP-AurA KD & GFP-NEK2 KD)。これらの結果から、PANC1 細胞において AurA 及び NEK2 はキナーゼ活性に依存し一次繊毛形成を抑制していることが示唆された。また、AurA や NEK2 の変異体の単独発現で一次繊毛形成率が増加することから、これらの変異体には内在性の AurA や NEK2 を阻害するドミナントネガティブな効果があることが示唆された。さらに、AurA の単独発現の効果が AurA と NEK2 の変異体の共発現によってキャンセルされることから、膵管癌細胞において AurA は NEK2 を介して一次繊毛形成を制御していると考えられる。

次に Kif24 発現抑制 PANC1 細胞である Kif24-3 細胞を用い同様の実験を行った。その結果、いずれの組み合わせにおいても一次繊毛形成率に変化はなかった(図 15b)。この結果から、AurA 及び NEK2 は PANC1 細胞において Kif24 を介して一次繊毛消失を制御していることが示唆された。

a) PANC1細胞



b) Kif24-3細胞

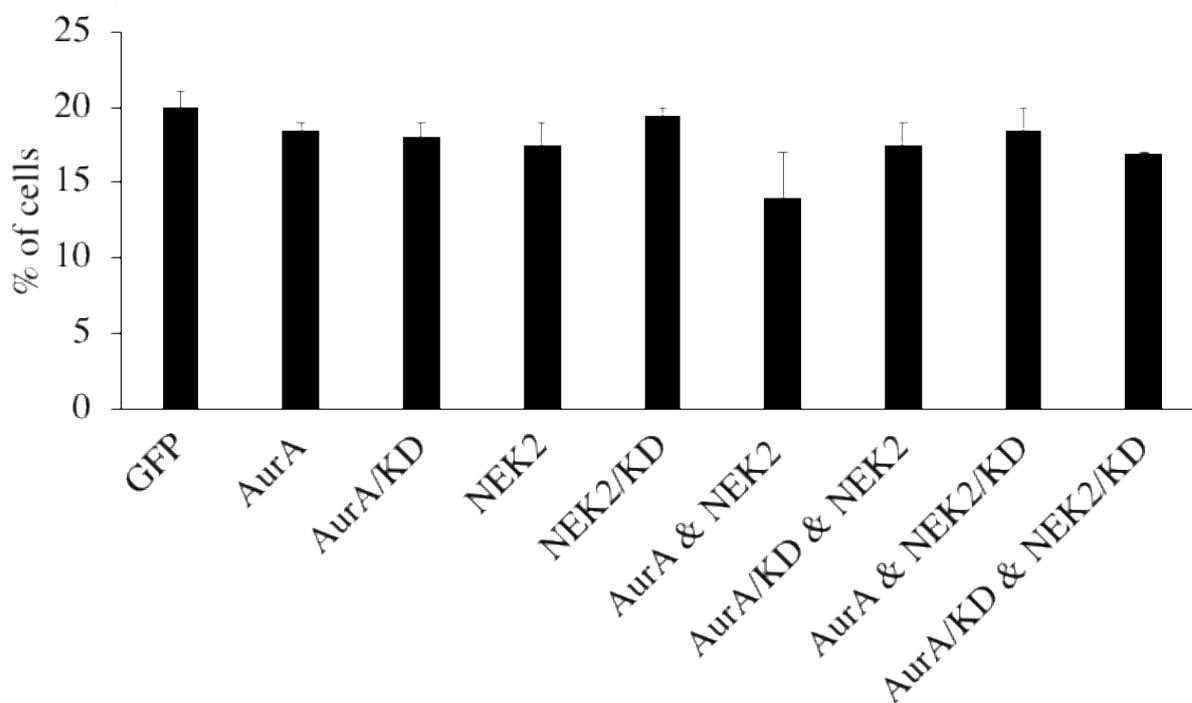


図 15 PANC 細胞及び Kif24-3 細胞を用いた AurA 及び NEK2 による一次繊毛形成抑制経路の検証

(a) PANC1 細胞に対し GFP, GFP-AurA, GFP-AurA, KD, GFP-NEK2, GFP-NEK2 KD を共に導入し、血清飢餓条件下で 48 時間培養した。(b) Kif24-3 細胞に対し GFP, GFP-AurA, GFP-AurA, KD, GFP-NEK2, GFP-NEK2 KD を共に導入し、血清飢餓条件下で 48 時間培養した。(a, b)一次繊毛マーカーである Arl13b で免疫染色し、核を Hoechst

で染色した。GFP 陽性細胞における一次繊毛形成率を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3-4)

3.2.4 PANC1 細胞における HDAC2、Kras による NEK2、Kif24 発現制御の検証

上述したように HDAC2 や Kras は膵管癌細胞において一次繊毛消失に寄与している。これらの分子は、AurA の mRNA 発現量を制御していることが見出されている【Kobayashi et al., 2017】。これまでの結果から、Kif24 や NEK2 は膵管癌細胞において一次繊毛消失に寄与していることが示唆される。そこで、HDAC2 や Kras が Kif24 や NEK2 の発現量を制御する可能性を想定し、Kras または HDAC2 発現抑制による Kif24 及び NEK2 の mRNA 発現量の変化を定量的 PCR 法により検証した。その結果、Kras 発現抑制では Kif24 mRNA 発現量に変化が見られなかったが、HDAC2 発現抑制により Kif24 mRNA 発現量が有意に減少した(図 16a)。また、NEK2 についても同様に評価したところ、Kras と HDAC2 の発現抑制により NEK2 mRNA 量が減少した(図 16b)。これらの結果から、Kras は NEK2 の発現量を正に制御し、HDAC2 は Kif24 及び NEK2 の両方の発現量を正に制御することが示唆された。

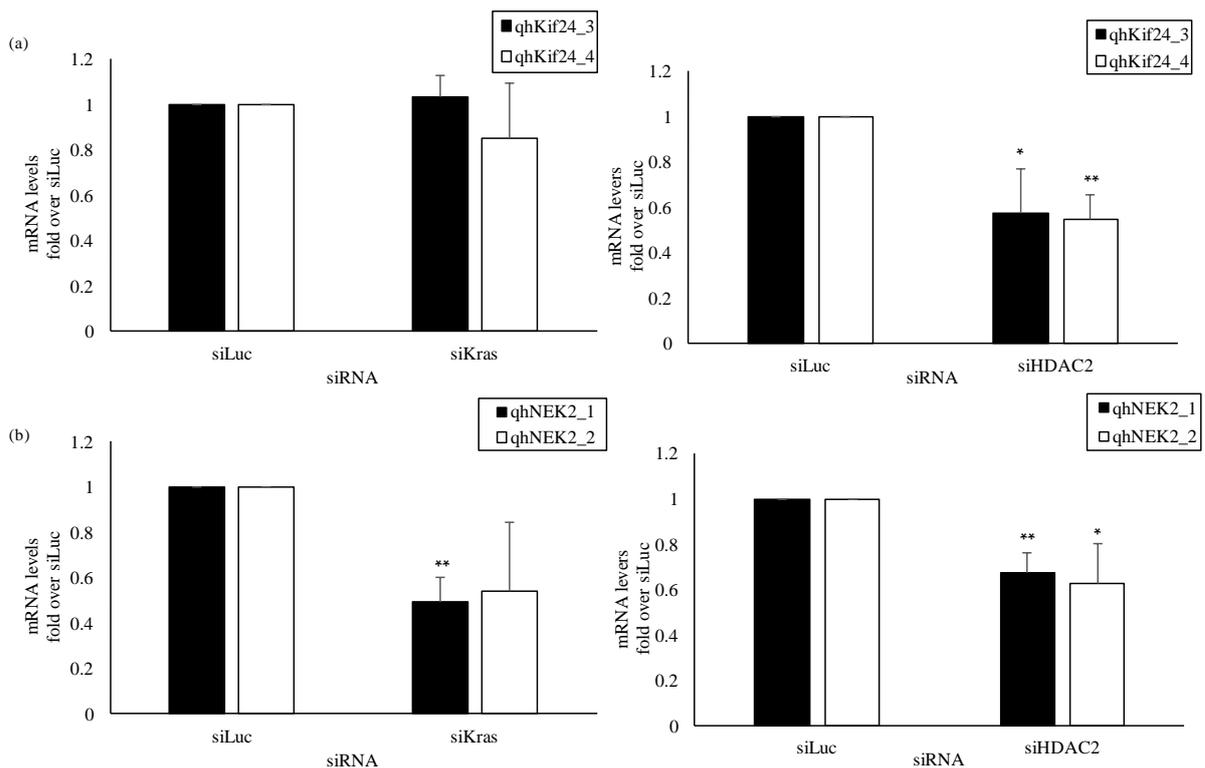


図 16 Kras、HDAC2 発現抑制 PANC1 細胞における Kif24、NEK2 mRNA 発現量の検討

(a, b) PANC1 細胞においてコントロール(siLuc)、siKras または siHDAC2 の siRNA を導入し、定量的 PCR でそれぞれ異なる 2 本のプライマーを用いて、Kif24(左)と NEK2(右)の発現量を調べた。白と黒のカラムは異なるプライマーを示す。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, ** P<0.01, n=3)

3.3 恒常的 Kif24 発現抑制細胞の解析

PANC1 細胞において Kif24 を発現抑制した細胞である Kif24-3 の増殖と細胞周期に対する影響を検証した。

3.3.1 *in vitro* における Kif24-3 細胞の増殖と細胞周期

はじめに、先に樹立した Kif24-3 細胞の細胞数の増加を検証した。その結果、通常培養条件下で Kif24-3 細胞を 72 時間または 144 時間培養したときの細胞数に変化はなかった(図 17a)。次に血清存在下において Kif24-3 細胞を培養した際の Ki67 陽性細胞の割合に対する影響を調べた。その結果、Ki67 陽性細胞の割合には影響がなかった(図 17b)。更に、フローサイトメーターを用い PI 染色によって細胞周期の各期の割合を調べたところ、G1 期及び G0 期、S 期、G2 期及び M 期のいずれの周期の割合にも影響がなかった(図 17c)。PI 染色では解析することのできない M 期の割合を解析するために、M 期マーカーである pHH3 陽性細胞の割合を調べた。その結果、Kif24-3 細胞において pHH3 陽性細胞の割合が有意に低下することが確認された(図 17d)。更に、この変化は Kif24-3 のレスキュー細胞において回復した(図 17d)。この結果から、膵管癌細胞における恒常的な Kif24 の発現抑制は *in vitro* において細胞増殖には強く影響しないが、M 期にある細胞の割合を低下させることが示唆された。

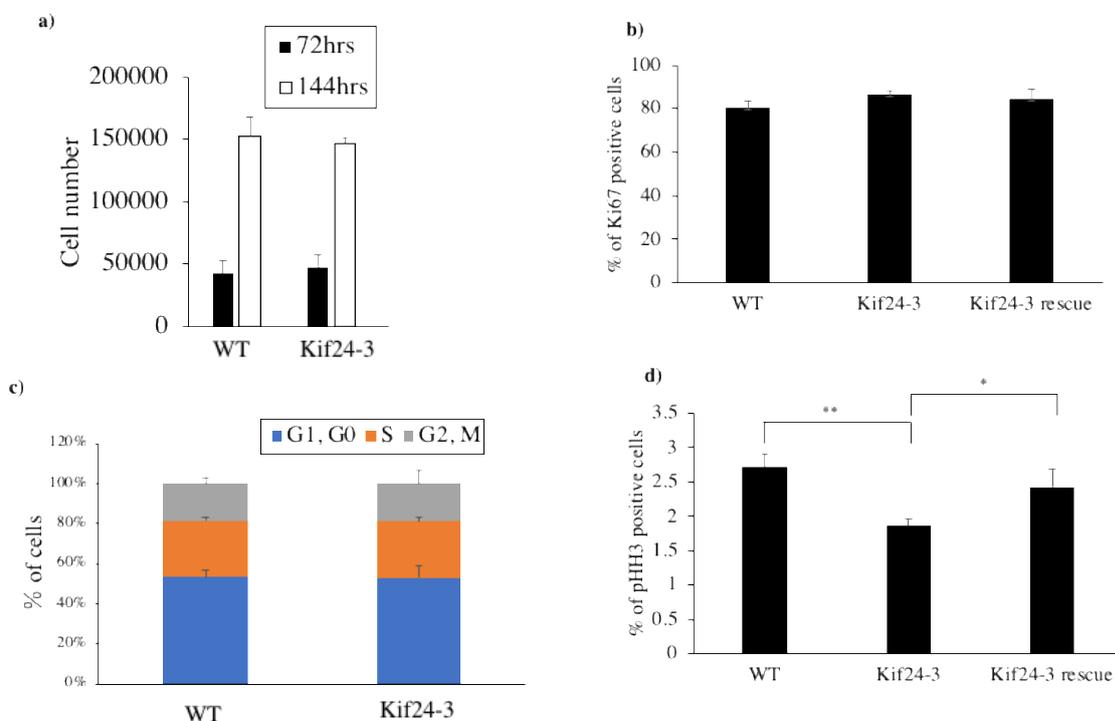


図 17 恒常的 Kif24 発現抑制が PANC1 細胞に与える影響

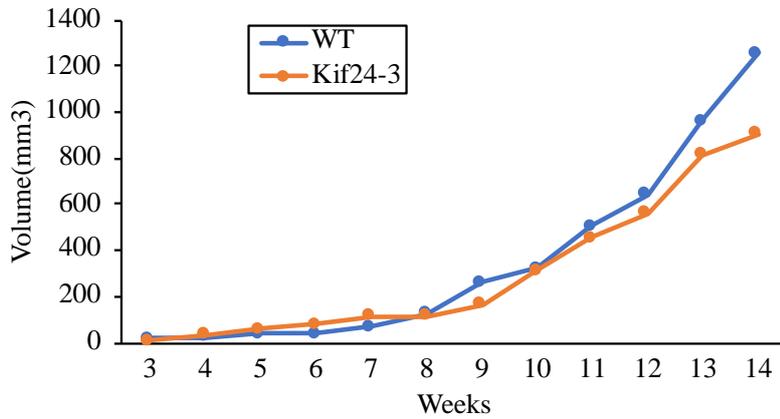
(a)PANC1 細胞と Kif24-3 細胞を血清存在下で 72 時間及び 144 時間培養し、各時点での細胞数を算出した。(b-d) PANC1 細胞と Kif24-3 細胞を血清存在下で 48 時間培養した。(b)免疫染色により Ki67 及び核を染色し、Ki67

陽性細胞の割合を算出した。(c) PANC1 細胞と Kif24-3 細胞を PI で染色し、フローサイトメトリーを用いて各細胞周期の割合を算出した。(d) 免疫染色により pHH3 に対する抗体で M 期の細胞、Hoechst で核を染色し、pHH3 陽性細胞の割合を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。(n=3)

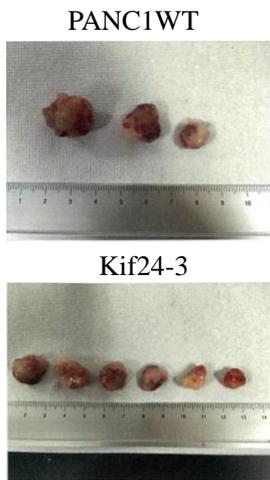
3.3.2 マウス体内での Kif24-3 細胞の腫瘍形成(異種移植実験)

PANC1 細胞及び Kif24-3 細胞をマウス体内へ移植し、その後の腫瘍の体積を経時的に観察した。その結果、移植後 7 週までは野生型 PANC1 細胞よりも Kif24-3 細胞を移植したマウスの腫瘍の体積が大きくなる傾向を示したが、8 週以降は逆に野生型 PANC1 細胞が Kif24-3 細胞を移植したマウスの腫瘍堆積よりも体積が大きくなる傾向を示した(図 18a)。14 週後、腫瘍を摘出し重量を測定した結果、Kif24-3 細胞において腫瘍重量の僅かな減少が確認された(図 18b, c)。これらの結果から、Kif24 の発現抑制は生体内において腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆された。

a)



b)



c)

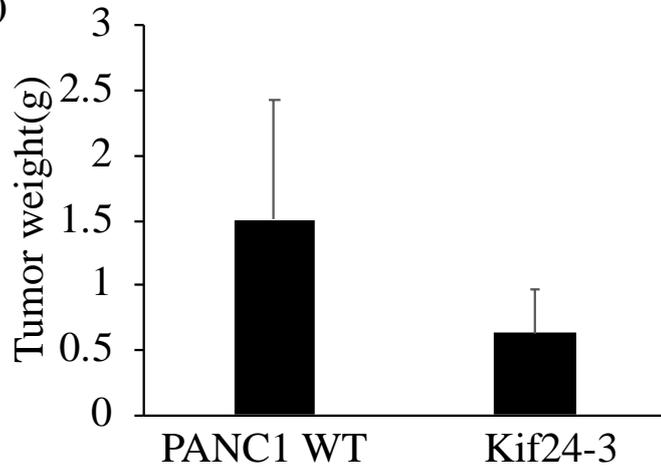


図 18 生体内において一次繊毛が膵臓癌細胞に与える影響の解析
(a-c)PANC1 細胞と恒常的 Kif24 発現抑制細胞をマウスに異種移植し、15 週間飼育した後、解剖した。(a)腫瘍の体積を算出し、経時的な変化を示した。(b)解剖した腫瘍の写真を示した。(c)腫瘍重量を示した。グラフは平均値±標準偏差を示す。

3.3.3 腫瘍組織における一次繊毛形成及び細胞周期の解析

マウス体内で形成させた腫瘍組織において Kif24 発現抑制が一次繊毛形成や細胞周期に影響するか検証した。摘出した腫瘍を用いて組織切片を作成し、組織免疫染色法により一次繊毛形成率を算出した。その結果、Kif24-3 細胞由来の腫瘍では一次繊毛が増加していることが観察された(図 19a, b)。この結果から、Kif24 の発現抑制は生体内においても一次繊毛形成を誘導することが示唆された。更に、Kif24 発現抑制における M 期及び増殖中細胞の割合を調べるため、pHH3 及び Ki67 陽性細胞の割合を算出した。その結果、M 期マーカーである pHH3 は *in vitro* の結果と同様に Kif24-3 細胞由来の腫瘍において pHH3 陽性細胞の割合が減少していることがわかった(図 19c)。一方で、*in vitro* の結果とは異なり、Ki67 の割合は Kif24-3 細胞由来の腫瘍で減少していることが観察された(図 19d)。これらの結果から、Kif24 の発現抑制は生体内において一次繊毛を誘導し、増殖する細胞の割合を低下させていることが示唆された。

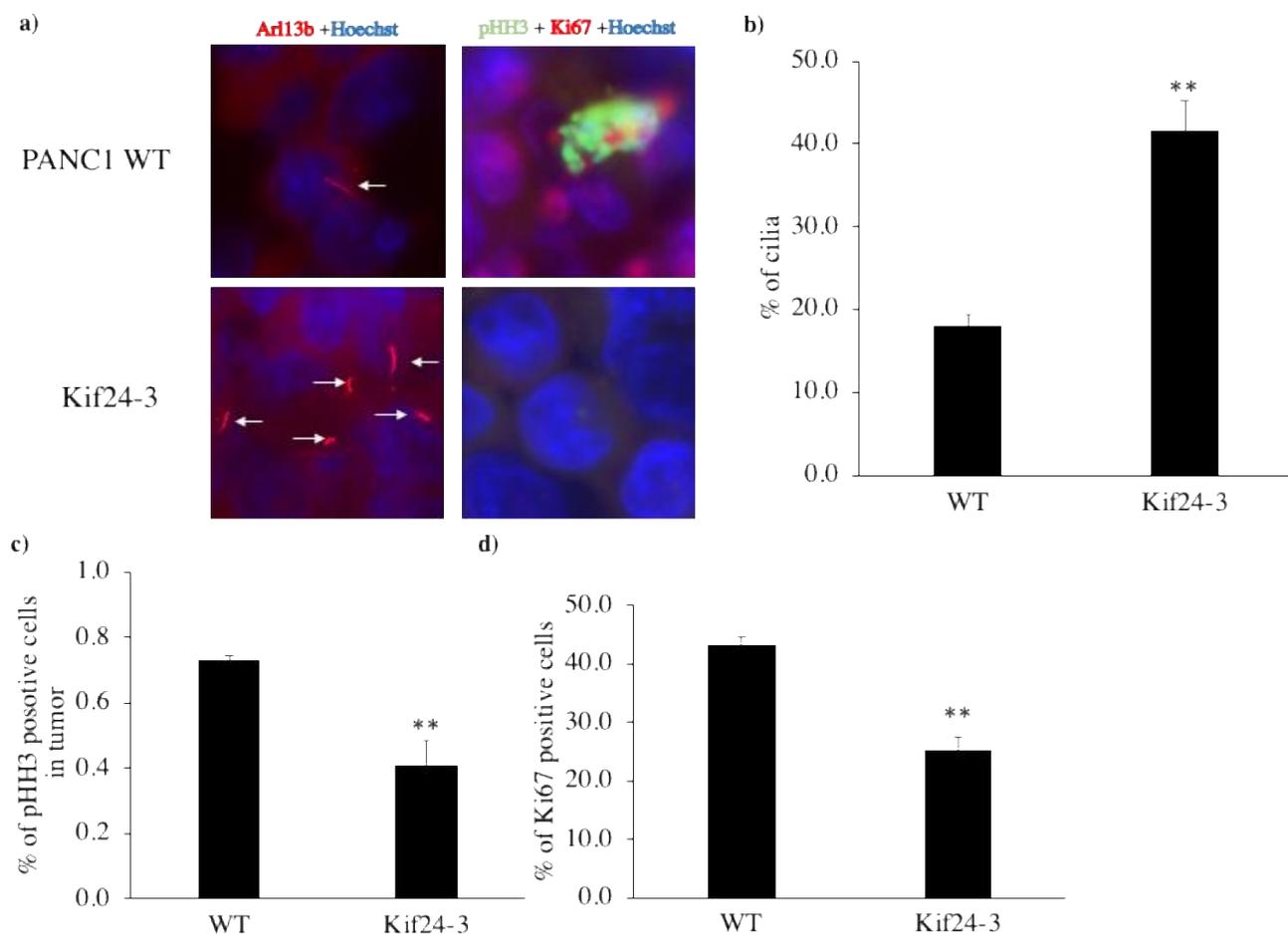


図 19 生体内において一次繊毛が膵臓癌細胞に与える影響の解析

(a-d)PANC1 細胞と Kif24-3 細胞を用いマウスへの異種移植により形成させた、腫瘍を用い組織切片を作成した。(a, b)作成した組織切片を用い組織免疫染色により Arl13b(赤)に対する抗体で一次繊毛、Hoechst (青)で核を染色した(左図)。Phospho-histone H3 (緑) および Ki67(赤)に対する抗体で腫瘍組織切片を、Hoechst (青)で核を染色した(左図)。(Scale bar: 10 μ m) (c) (a)と同様の方法で組織免疫染色を行い、pHH3 に対する抗体で M 期の細胞、Hoechst で核を染色した。(d) (a)と同様の方法で組織免疫染色を行い、Ki67 に対

する抗体で細胞周期中の細胞、Hoechst で核を染色した。その後、一次繊毛形成率、pHH3 陽性細胞及び Ki67 陽性細胞の割合を算出した。グラフは平均値±標準偏差を示す。n=3

第4章 考察

膵管癌細胞の一次繊毛消失において新たに同定した AurA 下流分子に関して、及び膵管癌細胞において一次繊毛形成がどのように膵管癌の増殖に関係するかに関して、以下に考察した。

4.1 膵管癌細胞における一次繊毛消失機構

本研究において、新たに膵管癌細胞における AurA の下流分子として NEK2 と Kif24 を同定した。また、AurA は NEK2 を介し Kif24 をリン酸化することで膵管癌細胞の一次繊毛を消失させる可能性が示唆された。このような、一次繊毛消失機構は、これまでに報告されていない全く新しい一次繊毛消失機構である。AurA、NEK2 及び Kif24 はすべて中心小体に局在する分子であり、細胞周期依存的な発現や活性化の時期には重なりがある【Kobayashi et al., 2011; Kim et al., 2015; Willems et al., 2018】。さらには、AurA と NEK2 は細胞内で複合体を形成することが報告されている【DeVaul et al., 2017., . Jeong et al., 2018】。これらの報告は、本研究で示した AurA の下流に NEK2 を介した Kif24 による一次繊毛分解機構が存在することを強く支持している。この仮説を、さらに強く示唆するには今後、AurA による NEK2 のリン酸化を検出する必要がある。また AurA による NEK2 のリン酸化部位を特定し、その部位を置換した非リン酸化変異体を作成し、PANC1 細胞で発現させた際の一次繊毛形成率がどのように変化するかを検証する必要がある。

AurA や NEK2 はそれぞれ単独過剰発現でも細胞内で Kif24 をリン酸化した。また AurA は弱く、NEK2 は AurA よりも強く Kif24 をリン酸化した(図 14)。さらに、AurA による Kif24 のリン酸化は NEK2 の変異体で抑制されなかった(図 14)。これらのことから、AurA は別の分子を介して Kif24 をリン酸化し、NEK2 は AurA とは別の経路として Kif24 をリン酸化する可能性も残されている。しかし膵管癌細胞において AurA と NEK2 変異体の共発現では一次繊毛形成率が抑えられないことから(図 15a)、この AurA による NEK2 を介さない Kif24 のリン酸化は（仮にあるとしても）一次繊毛消失には重要でない可能性が考えられる。NEK2 を介した一次繊毛の退縮に重要な Kif24 のリン酸化は 621 番目のスレオニンと 622 番目のセリンであることが報告されている【Kim et al., 2015】。しかしながら、NEK2 による Kif24 のリン酸化において、これらのアミノ酸以外にも多くのリン酸化部位が Kif24 上に存在していることが示唆されている【Kim et al., 2015】。これらの報告は Kif24 のリン酸化部位には、一次繊毛の退縮に影響しない部位があることを示唆している。これを確かめるためには、AurA による Kif24 のリン酸化部位を特定し、その Kif24 の非リン酸化変異体が膵管癌細胞での AurA の発現によって一次繊毛を退縮させないことを検証する必要がある。

本研究において AurA-NEK2-Kif24 経路の存在を示唆した。しかしながら、正常細胞では NEK2-Kif24 経路は AurA を介する経路とは別の経路であることが示されている。これは一次繊毛消失の機構が細胞ごとに異なる可能性が考えられる。膵管癌細胞において、AurA-NEK2-Kif24 経路が成り立つ理由として、膵管癌細胞における NEK2 の過剰な発現が関

係すると考えられる。Oncomine のデータベースから正常膵管細胞と膵管癌細胞での関連遺伝子群の mRNA 発現量の差を算出したところ、膵管癌細胞において全ての遺伝子が高発現するが、特に NEK2 の過剰な発現が確認された (図 20)。このことから、正常細胞では NEK2 発現が低いため、AurA による NEK2 のリン酸化が起こらないが、膵管癌細胞では AurA が過剰に存在する NEK2 を介して一次繊毛退縮を制御する機構が働く可能性が考えられる。さらに、AurA は Kras と HDAC2 によって発現量が正に制御されているが、AurA 自身の活性も膵管癌細胞における一次繊毛退縮に重要であることが示唆されている【Kobayashi., 2017】。従って、AurA の高発現と強い活性化が膵管癌細胞において過剰発現している NEK2 のさらなる過剰な活性化を引き起こし、一次繊毛を消失させていると考える。この仮説を検証するためには、正常膵管細胞と膵管癌細胞を比較した際に AurA の強い活性化が膵管癌細胞で起こっていることを検出する必要がある。さらに、正常細胞と比較し膵管癌細胞において NEK2 の過剰な活性化が起こっているか調べ、膵管癌細胞において AurA の過剰な活性化と発現が NEK2 の活性化状態に影響を与えていることを検証する必要がある。

以上、これまでの結果から想定される膵管癌細胞における一次繊毛消失機構を示す (図 21)。

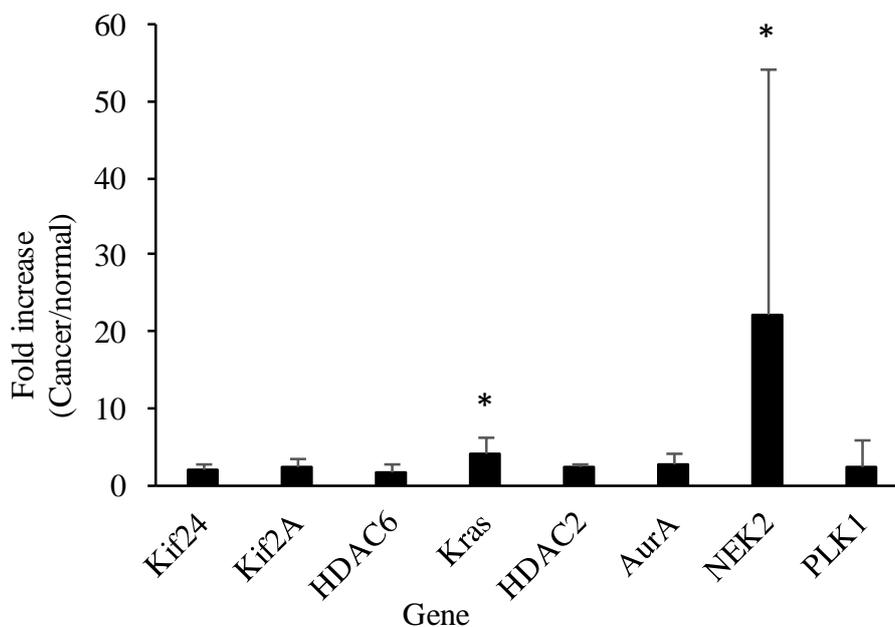


図 20 膵管細胞と膵管癌細胞における一次繊毛消失関連分子の発現

Oncomine データベースから、膵管細胞(Normal) と膵管癌細胞(Cancer) における遺伝子発現をマイクロアレイにより評価した論文のデータを元に作成。グラフは平均値±標準偏差を示す。(* P<0.05, n=8) 【Badea et al., 2008; Buchholz et al., 2005; Grutzmann et al., 2004; Iacolobuzio et al., 2003; Ishikawa et al., 2005; Logsdon et al., 2003; Pei et al., 2009; Segara et al., 2005】

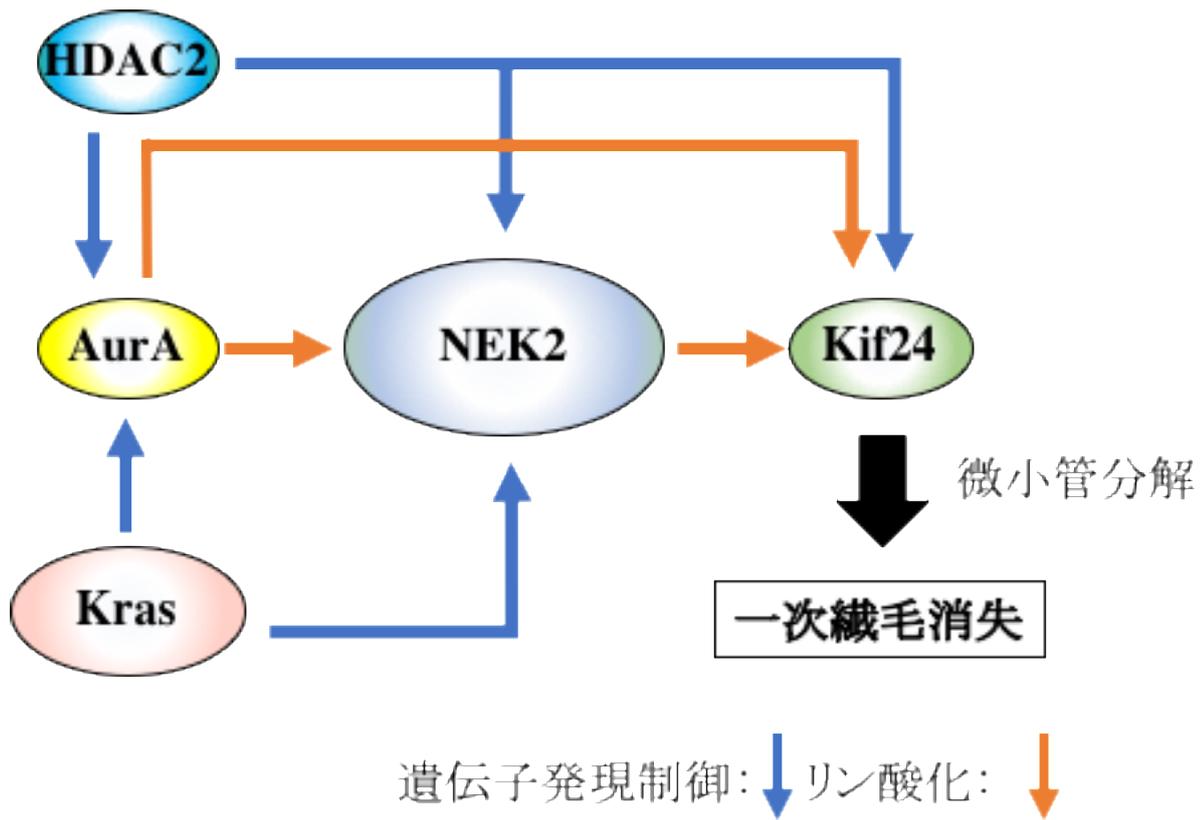


図 21 膵管癌細胞における一次繊毛消失機構のモデル

楕円の大きさはタンパク質の発現量を示した。NEK2 は HDAC2 と Kras の両方から制御され、Kif24 は HDAC2 から遺伝子発現を制御されることを示す。AurA は NEK2 を介し Kif24 をリン酸化する経路と NEK2 を介さずに Kif24 をリン酸化する経路があることを示す。

4.2 恒常的 Kif24 の発現抑制が癌細胞に与える影響

本研究において新たに一次繊毛形成が膵管癌細胞の生体内での増殖を抑制する可能性が示唆された。さらに Kif24 の発現抑制は一次繊毛を誘導することも強く示唆された。これまでに、乳癌細胞において Kif24 の発現抑制により一次繊毛の形成誘導と増殖マーカーの減少が引き起こされることが報告されている【Kim et al., 2015】。また膵管癌細胞において、阻害剤処理により一次繊毛を誘導すると細胞のスフェロイド形成が抑制される【Niamat et al., 2016】。さらに阻害剤により一次繊毛を誘導した状態から、一次繊毛を消失させると増殖マーカーが増加する【Niamat et al., 2016】。一次繊毛はこれまでの観察結果から M 期のみ形成が見られないことから【Ford et al., 2018】、細胞が分裂するためには一次繊毛消失が必要であることが考えられる。Kif24 の活性化機構は G2 後期において NEK2 によるリン酸化を Kif24 が受け活性化し一次繊毛を退縮させることが報告されている【Kim et al., 2015】。さらに、これまでに報告されている一次繊毛微小管を分解し、一次繊毛を直接的に退縮させる分子の中で、膵管癌細胞では Kif24 のみ一次繊毛退縮を担うことが本研究から示唆された。従って、膵管癌細胞における一次繊毛消失は G2 後期の Kif24 の活性に強く依存していると考えられる。これらこのことから、Kif24 の発現抑制により一次繊毛が形成誘導され M 期に移行することができず、膵管癌細胞の細胞周期が停止してしまい増殖が抑制されると考えられる。本研究では *in vitro* 及び *in vivo* の両条件下で Kif24-3 細胞において一次繊毛の誘導と M 期細胞の割合の減少が確認された。さらに *in vivo* では増殖マーカーである Ki67 割合や腫瘍重量が Kif24-3 細胞において減少する傾向も観察された。今後の *in vitro* 研究において、Kif24 発現抑制細胞で観察される M 期細胞の減少が Kif24 発現抑制によって誘導された一次繊毛による効果であることを調べる必要がある。そのためには、Kif24-3 細胞において形成した一次繊毛を薬剤処理等により消失させた時、Kif24 発現抑制により観察される M 期細胞の減少が回復するか検証するという実験が考えられる。また、*in vivo* においても、一次繊毛によって Ki67 陽性細胞の割合や腫瘍重量が減少することを検証するため、Kif24-3 細胞において繊毛形成に必要な遺伝子のノックアウトにより一次繊毛を形成しない Kif24 発現抑制細胞を作成し、Kif24-3 細胞において観察される効果が回復するか検証する必要がある。

本研究において *in vitro* では Kif24-3 細胞は野生型 PANC1 細胞と同様に増殖した(図 17a)。一方で、*in vivo* ではマウスへの異種移植実験において Kif24-3 細胞を移植したマウスの腫瘍重量の減少傾向が確認された。この *in vitro* と *in vivo* の実験結果の違いに関しては、*in vitro* の条件下では M 期減少が Kif24-3 細胞が 0.5%程度しか見らず (図 17d)、さらに *in vitro* における増殖アッセイでは最大で 144 時間と短期間の培養時間であるため、この差が検出できなかったものと考えられる (図 17a)。一方、*in vivo* では M 期の減少に加え Ki67 陽性細胞の割合に減少がみられた(図 19)。生体内における細胞の増殖環境と生体外での生育環境が異なるため、これらの相違が起きている可能性も考えられる。

生体内環境が膵管癌や一次繊毛と関係がある可能性を示唆した例がある。膵管癌患者の組織において上皮細胞 (膵管癌細胞) では一次繊毛の消失が確認できる。一方、同一組織中の上皮細胞の周囲にある間質系の細胞では正常な組織と比較し、一次繊毛が増加していることが確認されている【Schimmack et al., 2016】。また、当研究室において一次繊毛を減少させた膵管癌細胞において Hedgehog シグナル関連因子である Ptch1 や Gli1 の発現量が増加する傾向

が観察されている【徳田修士論文., 2016】。さらに、膵管癌組織由来の線維芽細胞においてリガンドである Sonic hedgehog を添加すると一次繊毛依存的なシグナルである Hedgehog シグナルを活性化することが報告されている【Tian et al., 2009】。これらのことから膵管癌細胞やその周りに存在する線維芽細胞などの間質系細胞などの生体特有の環境が膵管癌には重要である可能性があると考えられる。従って、本研究で確認された *in vitro* と *in vivo* の実験結果の相違は、生体環境と一次繊毛との関係性が関与している可能性があると考えられる。従って、*in vivo* の環境とより近い環境での *in vitro* 実験が必要である。今後は、間質系の細胞との共培養系などの実験が有効と思われる。この実験方法を用い、より生体内に近い環境で Kif24-3 細胞を培養した際に増殖や Ki67 の割合に影響があるか調べることで、*in vivo* で見られた腫瘍重量の減少を生体環境との関わりで説明できるかもしれない。さらに、Kif24-3 細胞に一次繊毛を消失させた細胞を用い異種移植実験を行い、形成した腫瘍における一次繊毛依存的なシグナル関連因子の発現量を調べることで Kif24 発現抑制による効果が一次繊毛と生体環境との関わりによって起こる可能性を示唆できるかもしれない。

本研究から、膵管癌細胞において新たな AurA の下流分子として NEK2 と Kif24 を見出し、新規の AurA-NEK2-Kif24 という一次繊毛抑制経路の存在が示唆された。また、Kif24 発現抑制膵管癌細胞の解析から、Kif24 の発現抑制により誘導される一次繊毛が膵管癌細胞の分裂期への移行を抑制し、結果として腫瘍形成を抑える可能性が示唆された。膵管癌は死亡率が非常に高く、有力な治療法が存在しない。今後、一次繊毛が膵管癌に対して抑制的に寄与するというデータが集積すれば、Kif24 は治療薬のターゲットとして有力な候補となる可能性があり、本研究は膵管癌治療において新たな治療戦略を提唱した先駆けとして評価されることが期待される。

第5章 引用文献

- Ajanek, L. & Nigg, E. (2014). Cep164 triggers ciliogenesis by recruiting Tau tubulin kinase 2 to the mother centriole. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111, E2841-E2850.
- Ansley, S.J., Badano, J.L., Blacque, O.E., Hill, J., Hoskins, B.E., Leitch C.C., et al. (2003). Basal body dysfunction is a likely cause of pleiotropic Bardet–Biedl syndrome. *Nature* 425, 628-633.
- Bailey, J., Mohr, A. & Hollingsworth, M. (2009). Sonic hedgehog paracrine signaling regulates metastasis and lymphangiogenesis in pancreatic cancer. *Oncogene* 28, 3513-3525.
- Badea, L., Herlea, V., Dima, S.O., Dumitrascu, T., Popescu, I., et al. (2008). Combined gene expression analysis of whole-tissue and microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma identifies genes specifically overexpressed in tumor epithelia. *Hepatology*, 55(88), pp.2016-2027 .
- Buchholz M., Braun, M., Heidenblut, A., Kestler, H.A., Klöppel, G., Schmiegel, W., et al. (2005). Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. *Oncogene* 24, 6626-6636.
- Dateyama I., Sugihara Y., Chiba S., Ota R., Nakagawa R., Kobayashi T., and Itoh H. (2019). RABL2 positively controls localization of GPCRs in mammalian primary cilia. *J Cell Sci.* 132, jcs224428
- Deng, Y., Cai, Z., Shi, S., Jiang, H., Shang, Y., Ma, N., et al. (2015). Cilia loss sensitizes cells to transformation by activating the mevalonate pathway. *Journal of Experimental Medicine* 215, 177-195.
- Egeberg, D.L., Lethan, M., Manguso, R., Schneider, L., Awan, A., Jørgensen T.S., et al. (2012). Primary cilia and aberrant cell signaling in epithelial ovarian cancer. *Cilia* 1, 15.
- Ford, M.J., Yeyati, P.L., Mali, G.R., Keighren, M.A., Waddell, S.H., Mjoseng, H.K. Et al.(2018). A Cell/Cilia Cycle Biosensor for Single-Cell Kinetics Reveals Persistence of Cilia after G1/S Transition Is a General Property in Cells and Mice. *Developmental cell* 47. 509-523.
- Grützmann, R., Pilarsky, C., Ammerpohl, O., Lüttges, J., Böhme, A., Sipos, B., et al. (2004). Gene expression profiling of microdissected pancreatic ductal carcinomas using high-density DNA microarrays. *Neoplasia* 6, 611-622 .

Gradilone SA., Radtke, BN., Bogert, PS., Huang, BQ., Gajdos, GB., LaRusso, NF. (2013). HDAC6 Inhibition restores ciliary expression and decreases tumor growth. *Cancer Research* 73, 2259-2270.

Hassounah, NB., Nagle, R., Saboda, K., Roe, DJ., Dalkin, BL., McDermott, KM. (2013). Primary cilia are lost in preinvasive and invasive prostate cancer. *PLoS ONE* 8, e68521.

Hassounah, N., Nunez, M., Fordyce, C., Roe, D., Nagle, R., Bunch, T., et al. (2017). Inhibition of Ciliogenesis Promotes Hedgehog Signaling, Tumorigenesis, and Metastasis in Breast Cancer. *Molecular Cancer Research* 10, 1421-1430.

Han, YG., Kim, HJ., Dlugosz, AA., Ellison, DW., Gilbertson, RJ., Alvarez-Buylla, A. (2009).

DeVaul, N., Koloustroubis, K., Wang, R., Sperry, A. (2017). A novel interaction between kinase activities in regulation of cilia formation. *BMC Molecular and Cell Biology* 18. doi: 10.1186/s12860-017-0149-5.

Han, YG., Kim, HJ., Dlugosz, AA., Ellison, DW., Gilbertson, RJ., Alvarez-Buylla, A. (2009). Dual and opposing roles of primary cilia in medulloblastoma development. *Nature Medicine* 15, 1062-1065.

Huang, N., Zhang, D., Li, F., Chai, P., Wang, S., Teng, J., Chen, J., et al. (2018). M-Phase Phosphoprotein 9 regulates ciliogenesis by modulating CP110-CEP97 complex localization at the mother centriole. *Nature Communications* 9, 4511.

Iacobuzio-Donahue, CA., Maitra, A., Olsen, M., Lowe, AW., van Heek, NT., Rosty, C., et al. (2003). Exploration of global gene expression patterns in pancreatic adenocarcinoma using cDNA microarrays. *The American Journal of Pathology* 162, 1151-1162 .

Ishikawa, M., Yoshida, K., Yamashita, Y., Ota, J., Takada, S., Kisanuki, H., et al. (2005). Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. *Cancer Science* 96, 387-393 .

Ishikawa, H. & Marshall, W. (2011). Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12, 222-234 .

Jeong, A., Ka, H., Han, S., Lee, S., Lee, E., Soh, S., et al. (2018). Oncoprotein CIP2A promotes the disassembly of primary cilia and inhibits glycolytic metabolism. *EMBO Reports* e45144. doi: 10.15252/embr.201745144.

- Kobayashi, T. & Dynlacht, B. (2011). Regulating the transition from centriole to basal body. *The Journal of Cell Biology* 193, 435-444 .
- Kobayashi, T., Tsang, W., Li, J., Lane, W. & Dynlacht, B. (2011). Centriolar Kinesin Kif24 Interacts with CP110 to Remodel Microtubules and Regulate Ciliogenesis. *Cell* 145, 914-925 .
- Kobayashi, T., Nakazono, K., Tokuda, M., Mashima, Y., Dynlacht, B.D., Itoh, H. (2017). HDAC2 promotes loss of primary cilia in pancreatic ductal adenocarcinoma. *EMBO reports* e201541922, doi:10.15252/embr.201541922.
- Kobayashi, T., Kim, S., Lin, Y., Inoue, T. & Dynlacht, B. (2014). The CP110-interacting proteins Talpid3 and Cep290 play overlapping and distinct roles in cilia assembly. *The Journal of Cell Biology* 204, 215-229 .
- Korobeynikov, V., Deneka, A. & Golemism, E. (2017). Mechanisms for nonmitotic activation of Aurora-A at cilia. *Biochemical Society Transactions* 45, 37-49.
- Kim, J., Krishnaswami, S. and Gleeson, J. (2008). CEP290 interacts with the centriolar satellite component PCM-1 and is required for Rab8 localization to the primary cilium. *Human Molecular Genetics*, 17(23), pp.3796-3805 .
- Kim J, Dabiri., S, Seeley ES. (2011). Primary cilium depletion typifies cutaneous melanoma in situ and malignant melanoma. *PLoS One* 6: e27410.
- Kim, S., Lee, K., Choi, J., Ringstad, N. & Dynlacht, B. (2015). Nek2 activation of Kif24 ensures cilium disassembly during the cell cycle. *Nature Communications* 6, 8087.
- Lee, J., Yi, S., Won, M., Song, Y., Yi, H., Park, Y., et al. (2018). Loss-of-function of IFT88 determines metabolic phenotypes in thyroid cancer. *Oncogene* 37, 4455-4474.
- Logsdon, CD., Simeone, DM., Binkley, C., Arumugam, T., Greenson, JK., Giordano, TJ., et al. (2003). Molecular profiling of pancreatic adenocarcinoma and chronic pancreatitis identifies multiple genes differentially regulated in pancreatic cancer. *Cancer Reserch.* 2, 2649-57.
- Miyamoto, T., Hosoba, K., Ochiai, H., Royba, E., Izumi, H., Sakuma, T., et al. (2015). The microtubule-depolymerizing activity of a mitotic kinesin protein KIF2A drives primary cilia disassembly coupled with cell proliferation. *Cell Reports* 10, 664-673.

- Menzl, I., Lebeau, L., Pandey, R., Hassounah, NB., Li, FW., Nagle, R., et al. (2014). Loss of primary cilia occurs early in breast cancer development. *Cilia* 3, 7.
- Niamat, K., Willemarck, N., Talebi, A., Marchand, A., Binda, MM., Dehairs, J., et al. (2016). Identification of drugs that restore primary cilium expression in cancer cells. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.7198.
- Nishimura, Y., Kasahara, K., Shiromizu, T., Watanabe, M., and Inagaki, M. (2019). Primary Cilia as Signaling Hubs in Health and Disease. *Advanced science* 6, doi: 10.1002/adv.201801138.
- Nobutani, K., Shimono, Y., Yoshida, M., Mizutani, K., Minami, A., Kono, S., et al. (2013). Absence of primary cilia in cell cycle-arrested human breast cancer cells. *Genes to Cells* 19, 141-152.
- Paridaen, J., Wilsch-Bräuninger, M. & Huttner, W. (2013). Asymmetric Inheritance of Centrosome-Associated Primary Cilium Membrane Directs Ciliogenesis after Cell Division. *Cell* 155, 333-344.
- Pei, H., Li, L., Fridley, BL., Jenkins, GD., Kalari, KR., Lingle, W., et al. (2009). FKBP51 affects cancer cell response to chemotherapy by negatively regulating Akt. *Cancer Cell* 16, 259-266.
- Pazour, GJ., Dickert, BL., Vucica, Y., Seeley, ES., Rosenbaum, JL., Witman, GB., et al. (2000). Chlamydomonas IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene Tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *The Journal of Cell Biology* 151, 709-718.
- Pugacheva, E., Jablonski, S., Hartman, T., Henske, E. & Golemis, E. (2007). HEF1-dependent Aurora A activation induces disassembly of the primary cilium. *Cell* 129, 1351-1363.
- Sánchez, I. & Dynlacht, B. (2016). Cilium assembly and disassembly. *Nature Cell Biology* 18, 711-717.
- Seeley, E., Carriere, C., Goetze, T., Longnecker, D. & Korc, M. (2009). Pancreatic cancer and precursor pancreatic intraepithelial neoplasia lesions are devoid of primary cilia. *Cancer Research* 69, 422-430.
- Sardon, T., Pache, RA., Stein, A., Molina, H., Vernos, I., Aloy, P. (2010). Uncovering new substrates for Aurora A kinase. *EMBO reports* 11, 977-984.

Segara, D., Biankin, AV., Kench, JG., Langusch, CC., Dawson, AC., Skalicky, DA., et al. (2005). Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. *Clinical Cancer Research* 11, 3587-3596.

Schimmack, S., Kneller, S., Dadabaeva, N., Bergmann, F., Taylor, A., Hackert, T., et al. (2016). Epithelial to Stromal Re-Distribution of Primary Cilia during Pancreatic Carcinogenesis. *PLoS One* 11, e0164231.

Schmidt, KN., Kuhns, S., Neuner, A., Hub B., Zentgraf, H., Pereira, G. (2012). Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis. *The Journal of Cell Biology* 199, 1083-1101.

Schraml, P., Frew, IJ., Thoma, CR., Boysen, G., Struckmann, K., Krek, W., et al. (2008). Sporadic clear cell renal cell carcinoma but not the papillary type is characterized by severely reduced frequency of primary cilia. *Modern Pathology* 22, 31-36.

Spektor, A., Tsang, W., Khoo, D. & Dynlacht, B. (2007). Cep97 and CP110 Suppress a Cilia Assembly Program. *Cell* 130, 678-690.

Tian, H., Callahan, CA., DuPree, KJ., Darbonne, WC., Ahn, CP., Scales, SJ., de. & Sauvage, FJ. (2009). Hedgehog signaling is restricted to the stromal compartment during pancreatic carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106. 4254-42549.

Willems , E., Dedobbeleer, M., Digregorio, M., Lombard, A., Lumapat PN. & Rogister, B. (2018). The functional diversity of Aurora kinases: a comprehensive review. *Cell Division* 13, doi: 10.1186/s13008-018-0040-6.

Wong, S., Seol, A., So, P., Ermilov, A., Bichakjian, C., Epstein, E., et al. (2009). Primary cilia can both mediate and suppress Hedgehog pathway–dependent tumorigenesis. *Nature Medicine*, 15(9), pp.1055-1061.

Xiang, W., Guo, F., Cheng, W., Zhang, J., Huang, J., Wang, R., et al. (2017). HDAC6 inhibition suppresses chondrosarcoma by restoring the expression of primary cilia. *Oncology Reports* 1, 229-236.

Yang, N., Leung, E., Liu, C., Li, L., Eguether, T., Jun, Y., et al. (2017). INTU is essential for oncogenic Hh signaling through regulating primary cilia formation in basal cell carcinoma. *Oncogene* 36, 4997-5005.

Yang, Y., Roine, N. & Mäkelä, T. (2013). CCRK depletion inhibits glioblastoma cell proliferation in a cilium-dependent manner. *EMBO reports* 14, 741-747.

Yuan, K., Frolova, N., Xie, Y., Wang, D., Cook, L., Kwon, YJ., et al. (2010). Primary cilia are decreased in breast cancer: analysis of a collection of human breast cancer cell lines and tissues. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 58, 857-870.

徳田滯 本学修士論文(2016)

謝辞

本論文は、著者が奈良先端化学技術大学院大学・バイサイエンス研究科・バイオサイエンス専攻・分子情報薬理学研究室において行った研究成果を求めたものである。

同研究室教授である伊東広先生には研究環境を提供して頂き、さらに様々な点での確なご指摘をして頂きました。同研究室での5年間の間に、研究の進め方や考え方、論文の執筆の仕方など非常に丁寧にご指導賜りました。先生に掛けていただいた言葉を胸に今後も歩んでいきたいと思えます。小林哲夫先生には、生物学研究のことを何も知らなかった私にわかりやすく丁寧に教えて頂き、新たなことを発見することの大切や研究の楽しさを教えていただく事ができました。さらに、5年間の間に落ち込んだときにも、的確なアドバイスや進むべき方向などを示して下さい。公私に渡り多くのご助言を頂き私を導いて下さいました。私にとって、この研究室での5年間はこれまでの人生でも最も多くのことを学び、習得することのできた5年間でした。この5年間、私を様々な角度から支えて下さいました先生方には心より感謝申し上げます。

同専攻の教授である加藤順也先生、石田靖雅先生に副査として5年間もの間、的確なご助言、ご指摘またご指導をいただき、厚く感謝申し上げます。

同研究室の鳥山真奈美先生には、1年間という短い期間ではありましたが、その期間に十分すぎるほど多くの励ましを頂きました。秘書の平野育子さんには優しく声をかけてくださり、本当に数え切れないほど助けて頂きました。これまでの研究生生活で関わった、先輩方や後輩、留学生には共に笑い、助け合い、研究だけでなく私にとって5年間過ごすために重要なものを非常に多く私に与えてくれました。また先に修了した同期は、その後も私を気にかけてくれ、ときには辛いこともあった5年間でしたが、それを乗り得るための力を分けてくれました。5年間の研究生生活を支えてくださった研究室の皆様に、この場をお借りし感謝申し上げます。

最後に、大学院への進学とその生活を送るために経済的な援助やその機会を与えてくれた家族にも心から感謝申し上げます。