

グラントNo.: L S I 2 0 3 0 2

ライフサイエンスイノベーションセンター
「令和2年度重点プロジェクト研究および学内共同研究等研究費助成」

膠芽腫細胞の浸潤における KPNA2 の機能的役割の解明

研究代表者: 山内 貴寛 (医学系部門・助教)
共同研究者: 藤田 聡 (工学系部門・准教授)、山田 雅己 (医学系部門・教授)
盛山 哲嗣 (医学系部門・助教)、菊田 健一郎 (医学系部門・教授)

概 要	
	膠芽腫は悪性度の高い、未だ有効な治療法がない悪性脳腫瘍である。非常に高い増殖・浸潤能を有しており、そのメカニズムの解明は膠芽腫治療にとって重要である。今回我々は核・細胞質間物質輸送因子である KPNA の中で、KPNA2 による細胞質内物質輸送が膠芽腫細胞の遊走能亢進に関係しているのではないかと考え、研究を行った。KPNA2 の膠芽腫細胞におけるダイナミクスをライブセルイメージングで確認した後に、KPNA2 の knock out を行った細胞の観察、及び遊走能の評価を行った。Knock out 細胞では細胞質における KPNA2 発現の低下が見られ、遊走能の低下が Wound healing assay 及びナノファイバー上のシングルセルで観察された。KPNA2 の細胞質内物質輸送のダイナミクスを明らかにすることで、膠芽腫細胞の遊走能亢進のメカニズムの解明へとつながることが期待される。
関連キーワード	核移行因子、膠芽腫、浸潤、遊走、KPNA2 (Karyopherin- α 2)

研究の背景および目的

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。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 KPNA 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、予後に関する報告がなされている (Lu et al., *Autophagy*, 2015; Gousias et al., *J Neurooncol*, 2012)。KPNA 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 KPNA2 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、KPNA2 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 KPNA1 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)。KPNA は核・細胞質間物質輸送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 KPNA が細胞質内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。そこで膠芽腫が浸潤していくメカニズムにおいて、KPNA2 による細胞質内物質輸送が関係していると考え、膠芽腫細胞の遊走能亢進との関係に着目した。さらに膠芽腫細胞の浸潤メカニズムにおいて、KPNA2 の発現レベルが膠芽腫細胞の遊走能に与える影響を、個々の細胞を観察することにより解明できるのではないかと考えた。

本研究ではゲノム編集により KPNA2 遺伝子を Knock out し、腫瘍細胞内での KPNA2 の分子動態、および細胞遊走に対する影響をシングルセルレベルで解析することで、遊走能亢進のメカニズムを解明することを目的とする。

研究の内容および成果

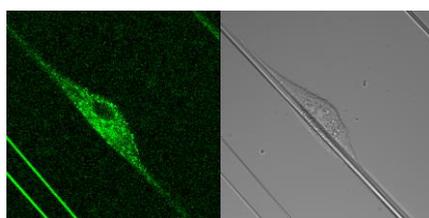
1) 細胞内器官の観察

膠芽腫 (U87、U251) 細胞内に蛍光融合蛋白質として KPNA2、ダイニンを発現させ、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

子動態を解析した (共焦点レーザー顕微鏡 FV1200、オリンパス)。KPNA2 は細胞体および突起内を順行性および逆行性に動いており、ダイニンとともに輸送されていた。

2) ナノファイバー上での細胞の観察

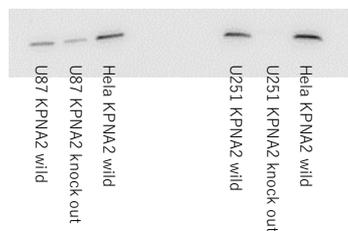
エレクトロスピニング法により作成したナノファイバー上を移動する膠芽腫細胞を(1)と同様の手法で解析した【特許 2015-104696、発明者：藤田聡ら】。膠芽腫細胞は一旦ナノファイバーに接着すると、不規則であるが2次元的な動きをしていた。細胞形態の変化も観察可能であり、ナノファイバー上においても蛍光観察が可能であった【図1】。



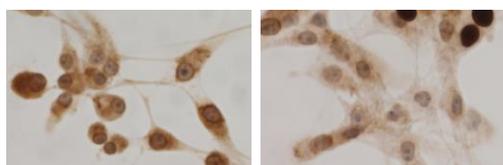
【図1】 ナノファイバー上のU87細胞

3) ゲノム編集および編集細胞における実験

CRISPER-CAS9システム(TAKARA)を用いてsgRNAの作製および切断効率の確認を行った。切断効率の高かったsgRNAを用い、エレクトロポレーション法にてU87、U251細胞のKPNA2のknock outを行った。腫瘍細胞におけるsgRNA導入効率およびKPNA2切断の評価としてWestern Blottingを行った。U87細胞ではわずかに低下がみられたのみであったが、U251細胞では明らかな発現の低下確認された【図2】。KPNA2の免疫染色では、膠芽腫細胞において核膜および細胞質内で発現が確認された。KPNA2 knock out細胞では特に細胞質での発現の低下が確認された【図3】。

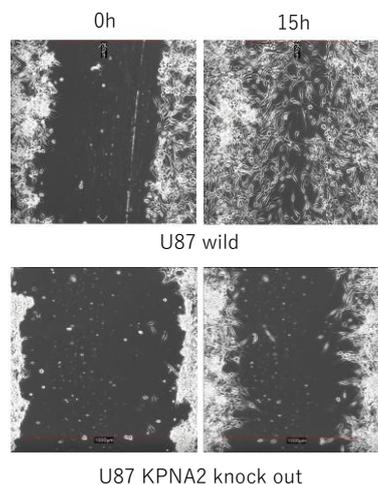


【図2】 KPNA2 Western Blotting



【図3】 KPNA2 免疫染色

遊走能の評価として、Wound healing assayを行った。U87およびU251細胞においてKPNA2 knock out細胞の遊走の低下が確認された【図4】。ナノファイバーを用いた観察では、KPNA2 knock out細胞において細胞突起を伸長するも個体として移動が制限される細胞が観察された。



【図4】 Wound healing assay

細胞の増殖能の評価のため、増殖曲線を作成したところ、KPNA2 knock out U87およびU251細胞における増殖の抑制が確認された。

以上の結果から、膠芽腫細胞(U87およびU251)においてKPNA2が細胞質内の物質輸送を亢進させることで、遊走能を亢進させている可能性が示唆された。一方で、シングルセルの観察を行うにおいて、特にU87細胞では観察している腫瘍細胞のKPNA2 knock out効率が問題であると考えられる。今後はさらにsgRNAの導入効率を上げることで、knock out効率を高めてより確実にknock out細胞の観察を行う必要があると考えられる。その上でナノファイバー上での遊走能の評価やさらなる詳細な形態学的変化の観察を行い、細胞遊走に関してKPNA2が輸送を亢進させている物質を同定していく予定である。

本助成による主な発表論文等、特記事項および競争的資金・研究助成への申請・獲得状況

「主な発表論文等」

特記すべき事項なし

「特記事項」

なし