Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

PKN2 is involved in aggregation and spheroid formation of fibroblasts in suspension culture by regulating cell motility and N-cadherin expression

Kubouchi, Koji

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2021-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8010号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008010

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

PKN2 is involved in aggregation and spheroid formation of fibroblasts in suspension culture by regulating cell motility and *N-cadherin* expression

PKN2 は、細胞運動と N-cadherin 発現を制御することによって、浮遊培養における線維芽細胞の凝集とスフェロイド形成に関与する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

放射線腫瘍学
（指導教員：佐々木良平教授）

窪内　康二

Protein kinase N の概要と研究背景

Protein kinase N (PKN)は、C 末端触媒領域において、Protein kinase C と非常に高い相同性を有するセリン/スレオニンリン酸化酵素であり、N 末端領域には特有の構造である antiparallel coiled-coil (ACC finger)ドメインを持つ[1]。哺乳類において PKN には異なる遺伝子にコードされた PKN1、PKN2、PKN3 の 3 つのアイソフォームが存在し、それぞれユビキタスに発現している [2]。PKN は低分子量 GTPase である Rho ファミリータンパク質のエフェクタータンパク質として報告されており、PKN2 も ACC ドメインにおいて RhoA、RhoB、RhoC、Rac と結合することが報告されている [3-5]。

これまで PKN2 については、哺乳類由来培養細胞を用いた *in vitro* の研究によって、細胞運動[6]、細胞接着[7]、細胞周期[8,9]、細胞増殖[10]に関与すること、マウスを用いた *in vivo* の研究では、発生に必須であることが報告されている[8,9]。近年、我々の研究室では PKN isoform のひとつである PKN1 が細胞凝集に関与することを明らかにした [11]。そこで細胞接着を制御することが知られている PKN2 でも同様に細胞凝集に関与するのでないかと考え研究を行った。以前の研究で PKN2 ノックアウト(*PKN2*$^{-/-}$)マウスから単離していた *PKN2*$^{-/-}$線維芽細胞を用いたところ、細胞増殖遅延が激しく[9]、実験に用いるのは不適切であった。そのため今回の実験では *PKN2* $^{flox/flox}$ 線維芽細胞に異

所性に Cre recombinase を発現させ PKN2 遺伝子をノックアウトさせた細胞を用いて PKN2 が細胞凝集に関与するか検証した。

不死化 *PKN2* $^{flox/flox}$ 線維芽細胞の樹立

PKN2 の機能解析を行うために、*PKN2* $^{flox/flox}$ マウス個体から単離していたマウス胎児線維芽細胞[9]に simian virus 40 large T 抗原を発現するレトロウィルスを添加し、不死化 *PKN2* $^{flox/flox}$ 線維芽細胞（以下、*PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞）の樹立を行った。この *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞の PKN2 タンパク質発現量、細胞形態、増殖速度は野生型の不死化線維芽細胞とほとんど同じであった。

Cre recombinase を発現させる adenovirus 添加と PKN2 タンパク質の検出

まず樹立した *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞に Cre recombinase を発現させる adenovirus を添加し、PKN2 遺伝子をノックアウトした。その後、細胞内の PKN2 タンパク質の減衰を Western blotting にて時間経時的に観察した。すると Cre recombinase を発現する adenovirus を添加された細胞（以下、Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞）では control adenovirus 添加細胞と比較し、48 時間経過時点で PKN2 タンパク質が検出不可能なレベルにまで減少した。

Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では浮遊培養条件下で細胞運動、スフェロイド形成が阻

害される

浮遊培養系における PKN2 の機能解析を行うため、control adenovirus を添加させた *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞、Cre recombinase を発現させる adenovirus を 48 時間反応させた Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞を Trypsin-EDTA 処理を行い培養皿から剥離し、これらの細胞を、2% agar-coated flat bottom well plate、U-bottom ultra-low attachment (PrimeSurface®) well plate に播種し浮遊状態における細胞の形態観察を行った。すると、Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞と比較し細胞運動能を調べるために測定した velocity では 80%の減少が確認され、細胞が接着し凝集からスフェロイドを形成するまでの過程が遅延し、スフェロイドの形態が球状ではなく、いびつな形になるという表現型が観察された。Velocity の低下は細胞と細胞の接触頻度の低下を引き起こし、スフェロイド形成の遅延を引き起こしたと示唆される。以上のことから、PKN2 は浮遊培養条件において細胞運動、スフェロイド形成過程（compaction）に重要な因子である可能性が示唆された。

Trypsin-EDTA 処理を行わずに剥離した Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では compaction が改善される

これまでの研究から、いくつかの細胞膜タンパク質は compaction を制御していることが知られており [12,13]、Trypsin-EDTA 処理はこれら細胞膜タンパ

ク質の分解、機能阻害を引き起こすことが知られている[14,15]。Trypsin-EDTA 処理によって剥離した Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では compaction に異常が生じたことから、PKN2 は Trypsin-EDTA 処理によって影響を受けるタンパク質の発現や機能に関与していると考えられた。

そこで、Trypsin-EDTA 処理を行わずに剥離させた Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞を U-bottom PrimeSurface® plate 培養下で観察することで細胞膜タンパク質と PKN2 の compaction における役割を検証した。細胞浮遊液は温度応答性細胞培養器 Cepallet®を 4 ºC で 1 時間インキュベートすることにより、細胞を剥離し調整した。Cepallet®から剥離した Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞は Trypsin-EDTA 処理を行い剥離した Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞と比較し、スフェロイド形成速度が上昇し、スフェロイドの形態がより球状なものに近づくなど、compaction が *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞と等しいレベルで行われることが明らかとなった。これらの結果から、細胞膜タンパク質が残っていると考えられる細胞では compaction に PKN2 が必須ではないことが明らかとなり、Trypsin-EDTA 処理によって分解または機能阻害された膜タンパク質のリカバリーに PKN2 が関与する可能性が示唆された。

Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では接着分子 N-cadherin タンパク質の発現が低下する

次に我々は Western blotting にて PKN2 の減少が compaction を制御する膜タ

ンパク質にどのような影響を与えるか検証した。細胞接着分子の 1 つである N-cadherin は Trypsin-EDTA 処理によって分解され [14]、E-cadherin の発現が低い、または無い細胞においてスフェロイド形成を制御することが知られている[13,16]。さらに、線維芽細胞では一般的に N-cadherin が優位に発現し、E-cadherin は発現していないことが報告されていることから[17]、N-cadherin に着目し実験を行った。

Western blotting の結果、Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞と比較し、Trypsin-EDTA 処理後の N-cadherin タンパク質のリカバリーが遅延し、さらに、PKN2 タンパク質が枯渇している Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞では Trypsin-EDTA 処理を行う前の、接着細胞の状態においても N-cadherin タンパク質量が約 50%に減少していることが明らかとなった。これらの実験結果から、Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞における N-cadherin の発現低下がスフェロイド形成の遅延、スフェロイドの形態異常に関わる可能性が示唆された。

PKN2 は *N-cadherin* 遺伝子発現制御に関わる

最後に、PKN2 がどのように N-cadherin タンパク質量を低下させたか明らかにするために RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative PCR)にて、*N-cadherin* mRNA の解析を行った。まず、Cre; *PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞において *N-cadherin* mRNA 量を検出したところ、*PKN2* $^{flox/flox}$ 細胞と比較し約 50%減少し

ていることが明らかとなった。次に、この *N-cadherin* mRNA の減少が mRNA の不安定性または遺伝子発現量の差に起因するものか明らかにするため、転写阻害剤である actinomycin D を用いて mRNA の安定性を検証した。すると、PKN2 は *N-cadherin* mRNA の安定性には関与しないことが明らかとなった。このことから、PKN2 は N-cadherin の遺伝子発現制御を行っている可能性が示唆された。

総括

これらの結果から、PKN2 が細胞運動と N-cadherin 発現制御を介して浮遊培養における線維芽細胞の凝集とスフェロイド形成に関与する可能性が示唆された。PKN1、PKN2、PKN3 はお互いに構造上類似性が見られるが、過去の研究から PKN2 のみが胎生致死を示すなど、非冗長的機能が示唆されている[9]。実際に、今回 PKN3 ノックアウト線維芽細胞を用いて同様の実験を行ったが、細胞凝集、スフェロイド形成、N-cadherin 発現は野生型の線維芽細胞と有意差が見られなかった。

今回の研究では PKN2 が枯渇した細胞では浮遊状態における細胞運動が顕著に抑制されることが明らかになった。浮遊状態における細胞運動は細胞同士の接触頻度を高め、細胞凝集、スフェロイド形成に貢献していると考えられるが、PKN2 がどのように細胞運動を制御しているのか、その分子メカニズム

の解明には至っていない。

また、PKN2 が N-cadherin の発現を制御していることが明らかとなった。PKN2 が N-cadherin を制御するメカニズムとして、血清応答因子[3,18]、AP-1[19,20]、Rho GTPase から上皮間葉転換関連因子[21,22]を介したシグナル伝達経路が考えられるが今回の研究ではその詳細なメカニズムを解明するには至らなかった。

PKN2 による浮遊細胞の細胞運動制御機構と N-cadherin 制御機構の解明は今後の課題である。

引用論文（引用順）

[1] H. Mukai, The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC, J. Biochem. 133 (2003) 17 - 27.

[2] H. Mukai, A. Muramatsu, R. Mashud, K. Kubouchi, S. Tsujimoto, T. Hongu, Y. Kanaho, M. Tsubaki, S. Nishida, G. Shioi, S. Danno, M. Mehruba, R. Satoh, R. Sugiura, PKN3 is the major regulator of angiogenesis and tumor metastasis in mice, Sci Rep 6:18979 (2016).

[3] L.A. Quilliam, Q.T. Lambert, L.A. Mickelson-Young, J.K. Westwick, A.B. Sparks, B.K. Kay, N.A. Jenkins, D.J. Gilbert, N.G. Copeland, C.J. Der, Isolation of a NCK‐associated kinase, PRK2, an SH3‐binding protein and potential effector of Rho protein signaling., J *. Biol. Chem.* 271 (1996) 28772 – 28776.

[4] S. Vincent, J. Settleman, The PRK2 kinase is a potential effector target of both Rho and Rac GTPases and regulates actin cytoskeletal organization., *Mol. Cell. Biol.* 17 (1997) 2247 – 2256.

[5] C.L. Hutchinson, P.N. Lowe, S.H. McLaughlin, H.R. Mott, D. Owen, Differential binding of RhoA, RhoB, and RhoC to protein kinase C‐related kinase (PRK) isoforms PRK1, PRK2, and PRK3: PRKs have the highest affinity for RhoB., *Biochemistry* 52 (2013) 7999 – 8011.

[6] S. Lachmann, A. Jevons, M.D. Rycker, A. Casamassima, S. Radtke, A. Collazos, P.J. Parker, Regulatory domain selectivity in the cell-type specific PKN-dependence of cell migration, PLoS

One 6(7):e21732 (2011).
[7] S.W. Wallace, A. Magalhaes, A. Hall, The Rho target PRK2 regulates apical junction formation in human bronchial epithelial cells, Mol Cell Biol 31(1) (2011) 81-91.
[8] I. Quétier, J.J.T. Marshall, B. Spencer-Dene, S. Lachmann, A. Casamassima, C. Franco, S. Escuin, J.T. Worrall, P. Baskaran, V. Rajeeve, M. Howell, A.J. Copp, G. Stamp, I. Rosewell, P. Cutillas, H. Gerhardt, P.J. Parker, A.J.M. Cameron, Knockout of the PKN Family of Rho Effector Kinases Reveals a Non-redundant Role for PKN2 in Developmental Mesoderm Expansion, Cell Rep 26;14(3) (2016) 440-448.
[9] S. Danno, K. Kubouchi, M. Mehruba, M. Abe, R. Natsume, K.Sakimura, S. Eguchi, M. Oka, M. Hirashima, H. Yasuda, H. Mukai, PKN2 is essential for mouse embryonic development and proliferation of mouse fibroblasts, Genes Cells 22 (2017) 220-236.
[10] A.G. O'Sullivan, E.P. Mulvaney, P.B. Hyland, B.T. Kinsella, Protein kinase C-related kinase 1 and 2 play an essential role in thromboxane-mediated neoplastic responses in prostate cancer, Oncotarget 22;6(28) (2015) 26437-26456
[11] M. Mehruba, S. M. Siddique, H. Mukai, PKN1 controls the aggregation, spheroid formation, and viability of mouse embryonic fibroblasts in suspension culture, Biochemical and Biophysical Research Communications 523 (2020) 398-404.
[12] P. Salmenperä, J. E. Kankuri, V. Bizik, I. Sirén, Virtanen, S. Takahashi, M. Leiss, R. Fässler, A. Vaheri, Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction, Exp Cell Res 15 (2008) 3444-3452.
[13] A. Ivascu, M. Kubbies, Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids., Int. J. Oncol. 31 (2007) 1403 - 1413.
[14] K. Tachibana, N-cadherin-mediated aggregate formation; cell detachment by Trypsin-EDTA loses N-cadherin and delays aggregate formation, Biochem Biophys Res Commun 516 (2019) 414-418. 10.1016/j.bbrc.2019.06.067.
[15] T L Le, A S Yap, J.L. Stow, Recycling of E-cadherin: a potential mechanism for regulating cadherin dynamics, J Cell Biol 12 (1999) 219-232.
[16] T. Shimazui, J. A. Schalken, K. Kawai, R. Kawamoto, A. V. Bockhoven, E. Oosterwijk, H. Akaza, Role of complex cadherins in cell-cell adhesion evaluated by spheroid formation in renal cell carcinoma cell lines, Oncol Rep 11 (2004) 357-360.
[17] A. T. Ho, E. B. Voura, P. D. Soloway, K. L. Watson, R. Khokha, MMP inhibitors augment fibroblast adhesion through stabilization of focal adhesion contacts and up-regulation of cadherin function, J. Biol. Chem. 276 (2001) 40215 - 40224.
[18] C.Y. Kwon, K.R. Kim, H.N. Choi, M.J. Chung, S.J. Noh, D.G. Kim, M.J. Kang, D.G. Lee, W.S. Moon, The role of serum response factor in hepatocellular carcinoma: implications for disease progression, Int J Oncol 37 (2010) 837-844. 10.3892/ijo_00000734.
[19] L.Y.W. Bourguignon, D. Bikle, Selective Hyaluronan-CD44 Signaling Promotes miRNA-

21 Expression and Interacts with Vitamin D Function during Cutaneous Squamous Cell Carcinomas Progression Following UV Irradiation, Front Immunol 13;6 (2015) 224.
[20] Y. Wang, H. Geng, L. Zhao, Z. Zhang, D. Xie, T. Zhang, J. Min, D. Yu, C. Zhong, Role of AP-1 in the tobacco smoke-induced urocystic abnormal cell differentiation and epithelial-mesenchymal transition in vivo, Int J Clin Exp Pathol 1;10(8) (2017) 8243-8252.
[21] H. Ungefroren, D. Witte, H. Lehnert, The role of small GTPases of the Rho/Rac family in TGF-β-induced EMT and cell motility in cancer, Dev Dyn 247 (2018) 451-461. 10.1002/dvdy.24505.
[22] S. Lamouille, J. Xu, R. Derynck, Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition, Nat Rev Mol Cell Biol 15 (2014) 178-196. 10.1038/nrm3758.