

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07170

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍におけるP5の機能的役割および新規分子標的としての有用性に関する研究

研究課題名(英文) Functional analysis of P5 in glioblastoma cells for new molecular targeted therapy

研究代表者

堀部 智久 (Horibe, Tomohisa)

京都大学・医学研究科・特定准教授

研究者番号：20467468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)関連タンパク質の一つであるPDI P5(P5)の悪性脳腫瘍、グリオブラストーマ細胞内における機能解析を行った。その結果、グリオブラストーマ細胞内におけるP5結合タンパク質の一つがvimentinであることを同定し、P5がグリオブラストーマ細胞において重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内で新しく作られたタンパク質の構造形成に関わる酵素の一つと考えられているP5について、細胞内における詳細な機能的役割については未だ不明である。本研究では、悪性脳腫瘍細胞内において、P5と結合するタンパク質を調べその一つがvimentinであることがわかり、また、P5が悪性脳腫瘍の増殖に重要な役割を担うと予想される研究結果を得た。本研究により、今後、悪性脳腫瘍における新しい標的分子の可能性およびその標的の有用性に関するさらなる研究が進むと予想される。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the functional analysis of protein disulfide isomerase (PDI) P5 in glioblastoma cells, we performed the screening of binding proteins to P5 by immunoprecipitation method using affinity purified anti-P5 antibody, and we identified one of the binding proteins as vimentin. It was also found that the knockdown of P5 by siRNA in glioblastoma cells could affect the cell growth and migration. It is suggested that P5 has a significant role in glioblastoma cells and might be new target for the treatment.

研究分野：生化学

キーワード：タンパク質 分子シャペロン 癌 ケミカルバイオロジー 発光イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオマ)は、悪性脳腫瘍の中で最も高頻度の悪性腫瘍であり、このうち最も悪性な膠芽腫(グリオブラストーマ: GBM)は、手術・放射線治療および化学療法による集学的治療によっても依然きわめて予後不良であり、その発症メカニズムおよび分子標的治療を含めた新規治療法の開発が急務である。

一方、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(protein disulfide isomerase; PDI) P5 は、PDI 関連タンパク質の一つであり、PDI と同様に細胞内の新生タンパク質の折りたたみに重要なジスルフィド結合(S-S 結合)の形成、還元、異性を触媒するイソメラーゼ活性および、構造形成が誤ったタンパク質を特異的に認識、結合してその構造形成を助けるシャペロン活性を有する多機能タンパク質であると考えられている。しかしながら、P5 の細胞内における詳細な機能的役割に関しては、未だ不明な点が多い。近年、P5 の機能に関して、(i)P5 は、免疫細胞ががん細胞を認識し、細胞障害活性を発揮する際に重要な MHC class I chain-related gene A (MICA)と癌細胞表面で結合し、可溶性 MICA の分泌に重要な働きをすること、(ii)P5 は、ミトコンドリア内にも局在し、ミトコンドリアに安定的に P5 を発現させた細胞は、過酸化水素あるいはロテノンで誘導される細胞死に耐性になることなど、重要かつ興味深い研究結果が報告されている。このため、P5 の癌細胞内における機能的役割の解明および、その人為的な制御は、新たな抗癌療法の標的としての可能性が期待される。そこで、これまでに、P5 の人為的な制御を目的として低分子化合物のスクリーニングを行い、活性阻害剤の候補化合物の同定に成功しこのうち、anacardic acid が PDI 関連タンパク質の中で P5 の活性を阻害すること、さらにはこの化合物が、癌細胞からの可溶性 MICA の分泌量を減少させることを見出した。これまでに、正常細胞に比べて癌細胞表面(特に悪性脳腫瘍細胞株)において P5 の発現が優位に上昇していること、P5 のノックダウンが悪性脳腫瘍細胞の分裂、増殖、生存に重要な影響を与えることを見出している。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記背景および、これまでの研究経過を元に、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)関連タンパク質の一つである PDI P5 (P5)の活性阻害剤および、一細胞レベルでの発光/蛍光同時リアルタイムイメージング法を用いて、悪性脳腫瘍細胞における P5 の機能的役割の解明を行い、悪性脳腫瘍において P5 を標的とすることの有用性を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 抗 P5 抗体を用いた免疫沈降

アフィニティー精製したウサギ抗 P5 抗体(PDI および PDI 関連タンパク質である ERp57 など他の PDI 関連タンパク質とクロス反応しないことを確認済み)および、悪性脳腫瘍細胞株である U251、正常細胞株 PE の抽出液を用いて、免疫沈降を行った。免疫沈降後、SDS サンプル buffer を用いて調整した後、12.5% SD-PAGE により結合タンパク質を分離し、銀染色によりタンパク質の検出を行った。

### (2) 質量分析による結合タンパク質の同定

免疫沈降後、SDS-PAGE および銀染色により結合タンパク質の存在を確認した後、候補バンドをゲルから切り出し、トリプシン処理を行い、LC/MS/MS によりタンパク質の同定を行った。質量分析および、結合タンパク質の同定は、京都大学 大学院医学研究科 医学研究支援センター 質量分析室で行われた。

### (3) P5 タンパク質の発現および精製

大腸菌発現システムである pET15b ベクターに P5 の cDNA を組み込んだ発現プラスミドを用いて、大腸菌に発現させた後、AKTA system を用いて Ni カラム(HisTrap)によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製後されたタンパク質は、SDS-PAGE およびウェスタンブロットングにより確認した。

### (4) 相互作用の測定

P5 と同定された結合タンパク質との相互作用の測定は、Biacore T100 system を用いて行った。(2)で同定された組み換えタンパク質をセンサーチップ上にアミンカップリングにより固定化した後、(3)で精製した、P5 を流路にインジェクションして測定した。

### (5) siRNA にノックダウン

悪性脳腫瘍細胞株に siRNA を一過性でトランスフェクションを行い、P5 のノックダウンを行った。siRNA トランスフェクション後の細胞抽出液を調整し、SDS-PAGE 後、メンブレンに転写して、抗 P5 抗体を用いたウェスタンブロットングにより、目的のタンパク質がノックダウン

されていることを確認した。

#### (6) RT-PCR

細胞抽出液から total RNAs を精製後、逆転写酵素により cDNAs を合成し、目的のプライマーを用いて、PCR を行い、アガロース電気泳動およびゲルレッドを用いた DNA の染色により、目的のバンドを確認した。

#### (7) 安定発現細胞株の樹立

ホタルルシフェラーゼ (fLuc) 遺伝子を目的のプロモーター領域の下流に挿入したレポーターベクターを構築後、目的の細胞株にトランスフェクションし、選択薬剤(ハイグロマイシン、ネオマイシン) 存在下で培養することで目的のベクターを有する細胞を選択し、安定発現細胞株を樹立した。

#### (8) 一細胞レベルでの生物発光を用いたイメージング

(7)で樹立した安定発現細胞株を用いて、ガラスボトムディッシュに播種後、基質(ルシフェリン)を加え、LV200 system を用いて、一細胞レベルでの発光イメージングを行った。x40 および x100 油浸レンズを用いて、30 sec-2 min の露光により fLuc の観察を行った。蛍光/発光同時観察には、上記安定発現細胞株に、目的のタンパク質に mOrange を融合した発現ベクターを安定発現する安定発現細胞株を樹立後、fLuc と mOrange を観察することで行った。

#### (9) 細胞生存率の評価

96 well プレートに細胞を播種した後、細胞を接地させ、時間経過ごとの生細胞の測定を各ウェルに生細胞測定試薬を添加して、生細胞数依存的な発色をプレートリーダーを用いて、吸光度 450nm で測定することにより評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 悪性脳腫瘍細胞内における P5 の結合タンパク質の検索、同定および相互作用の測定

悪性脳腫瘍細胞株の抽出液を用いて、抗 P5 抗体による免疫沈降を行い、SDS-PAGE により結合タンパク質を調べたところ、正常細胞株 (PE) と比較していくつかの候補タンパク質のバンドが確認された (図 1)。これらバンドの中で最も明らかなものに関して、質量分析を用いたタンパク質の同定を行った結果、vimentin であることが確認された。

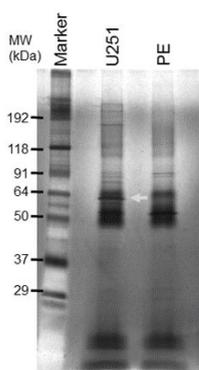


図 1 免疫沈降後の SDS-PAGE による P5 結合タンパク質。図中の矢印は、質量分析により同定されたタンパク質を示す。

抗 P5 抗体を用いた免疫沈降後、抗 vimentin 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果、目的のタンパク質のバンドが確認された (図 2)。また、悪性脳腫瘍細胞株以外のがん細胞株で同様の実験を行った、結果、vimentin との結合バンドは、悪性脳腫瘍細胞株にのみ見受けられたことから、P5 は悪性脳腫瘍細胞内において vimentin と優位に結合していることが示唆された (図 2)。

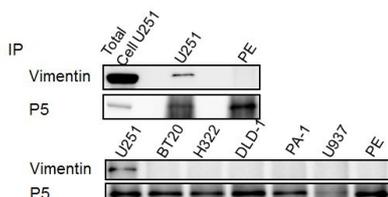
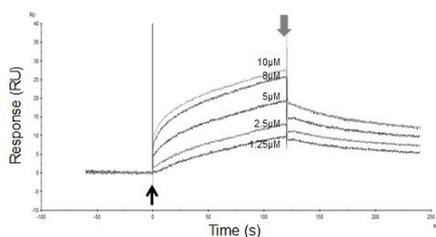


図 2 がん細胞および、正常細胞株を用いた抗 P5 抗体による免疫沈降後の抗 vimentin 抗体を用いたウェスタンブロッティング。

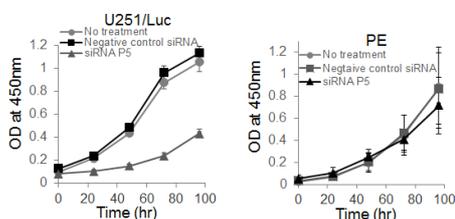
Biacore を用いた相互作用の測定を行った結果、センサーチップ上に固定化された vimentin タンパク質に対して、流路にインジェクションされた P5 タンパク質の濃度依存的なセンサーグラムの上昇（相互作用）が確認された（**図 3**）。



**図 3** Biacore を用いた vimentin と P5 との相互作用のセンサーグラム。図中の細、太矢印は、流路へのサンプルのインジェクション開始、終了をそれぞれ示す。

### (2) P5 の悪性脳腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響

悪性脳腫瘍細胞および、正常細胞株を用いて、siRNA の一過性のトランスフェクションによる P5 のノックダウン後の細胞増殖を調べたところ、悪性脳腫瘍細胞株では、P5 のノックダウンにより、細胞増殖に影響を与えることが確認された（**図 4**）。

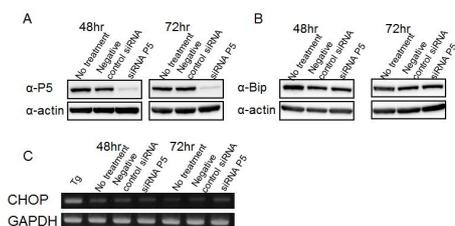


**図 4** siRNA による P5 ノックダウン後の悪性脳腫瘍細胞および正常細胞株の細胞増殖。

### (3) P5 ノックダウンによる悪性脳腫瘍細胞内の Bip promoter に及ぼす影響

Bip (Grp78)は、小胞体内に主に局在する分子シャペロンタンパク質であり、近年、悪性脳腫瘍細胞内において重要な役割を担うことが報告されている。

そこで、悪性脳腫瘍細胞において P5 ノックダウン時における Bip タンパク質の発現および、promoter の活性化に及ぼす影響を検討した。その結果、P5 ノックダウンにより、悪性脳腫瘍細胞内の Bip タンパク質の発現量には、顕著な変化は確認されなかった。また、小胞体ストレスのマーカータンパク質の一つである CHOP の発現量にも顕著な影響は見受けられなかった（**図 5**）。



**図 5** P5 ノックダウン後(A)の Bip タンパク質 (B)および、CHOP(C)の発現に及ぼす影響。siRNA トランスフェクション、48 時間、72 時間後にウェスタンブロットティング (A, B) あるいは、RT-PCR (C) により検討した。

レポーター遺伝子安定発現細胞株を用いて、一細胞レベルでの発光イメージングにより悪性脳腫瘍細胞増殖時の Bip promoter の挙動を確認したところ、ネガティブコントロール siRNA トランスフェクション後の細胞増殖時には、Bip promoter の活性化が確認されるが、P5 ノックダウン後は、この活性化が抑えられることが確認された（**図 6**）。

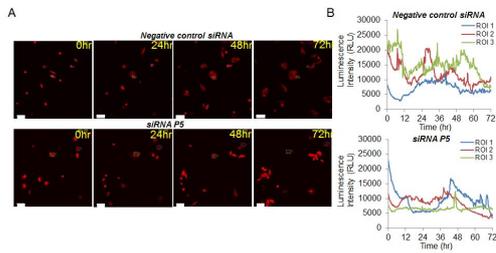


図6 一細胞レベル発光イメージングによる P5 ノックダウン後の Bip promoter の挙動。各時間ごとの発光イメージ図 (A) および、選択された細胞の時間経過ごとの発光強度の挙動 (B)。イメージ中の発光 (fLuc) は赤色で示す。

(4) P5 ノックダウンによる悪性脳腫瘍細胞内の結合タンパク質への影響

P5 と悪性脳腫瘍細胞内で結合が確認された vimentin に関して、P5 ノックダウン時における影響を調べた。その結果、siRNA のトランスフェクションによる P5 のノックダウンにより vimentin 自体への発現量には顕著な影響を及ぼさないことが確認された (図7)。

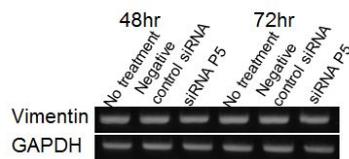


図7 RT-PCR による P5 ノックダウン後 48 時間および、72 時間後の vimentin の発現量の確認。

一細胞レベルでの蛍光/発光イメージングにより、P5 ノックダウン後の悪性脳腫瘍細胞の挙動を確認したところ、ネガティブコントロール siRNA トランスフェクション後と比較して、Bip promoter の活性を示す発光が減退するとともに、vimentin の挙動が変化する可能性が示唆された (図8)。

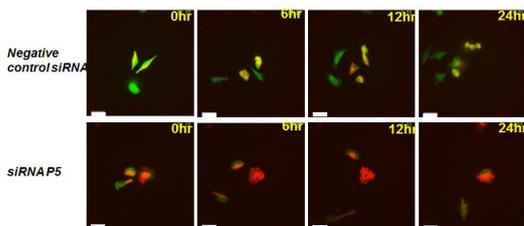


図8 蛍光/発光同時イメージングによる P5 ノックダウン後の悪性脳腫瘍細胞の挙動。蛍光 (mOrange) および、発光 (fLuc) は、それぞれ赤色、緑色で示す。

Vimentin は、がん上皮間葉転換のマーカータンパク質の一つでもあるため、悪性脳腫瘍細胞において、P5 のノックダウンによる上皮間葉転換のマーカータンパク質への影響を調べた。その結果、いくつかのマーカータンパク質での変化が確認された (図9)。

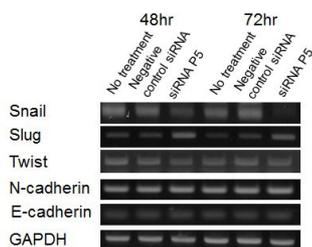


図9 悪性脳腫瘍細胞における P5 ノックダウン後上皮間葉転換のマーカータンパク質発現への影響。それぞれのタンパク質に対して、RT-PCR により検討した。

(5) P5 のバリエントに関する機能解析

シグナル配列の長さが異なる複数の P5 のバリエントの存在が確認されており (図10) これらバリエントの機能解析を行うために、RT-PCR により発現確認を行った。その結果、悪性脳腫瘍細胞株では、主に 2 種類のバリエントが発現している可能性が示唆された (図10)。

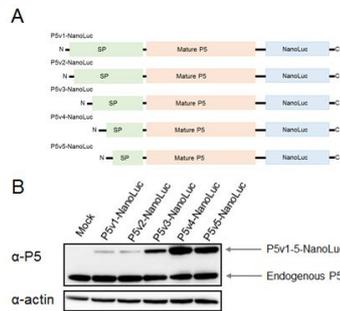


図10 P5バリエント(v1-5)のシグナル配列部分のアミノ酸配列(A)および、RT-PCRによる悪性脳腫瘍細胞株内における発現確認(B)。\*印は非特異的バンドと示唆されるバンドを示す。

また、これらバリエントと NanoLuc を融合した発現ベクターを構築し、悪性脳腫瘍細胞株に一過性にトランスフェクションを行った後、細胞抽出液を調整して、SDS-PAGE 後、抗 P5 抗体によるウェスタンブロットングを行った結果、これらバリエントの長さが異なるシグナル配列が同じ部分で切断されている可能性が示唆された(図11)。また、一細胞レベルでの発光イメージングによる可視化を試みた。その結果、これらタンパク質の発現を観察可能であることが確認された。

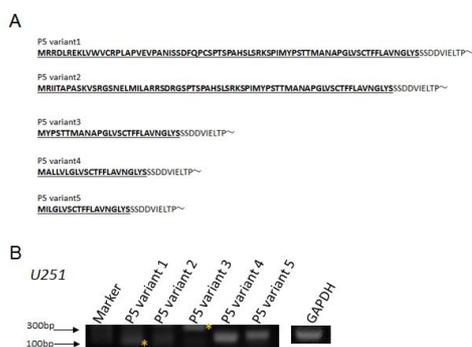


図11 P5バリエント(v1-5)と NanoLuc との融合の概略図(A)および、悪性脳腫瘍細胞株にトランスフェクション後の抗 P5 抗体によるウェスタンブロットング(B)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Horibe, T., Torisawa, A., Masuda, Y., and Kawakami, K.  
Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 in glioblastoma cells as a novel anti-cancer target.  
*Oncology Reports* 41, 961-972, 2019. 査読有り

〔学会発表〕(計3件)

1. Horibe, T.  
Real-time monitoring of Bip promoter activity in cancer cells by single-cell level bioluminescence imaging.  
第19回生物発光化学発光国際学会学術大会(2016年5月29日-6月2日 つくば国際会議場)
2. Horibe, T. and Kawakami, K.  
Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 in glioblastoma cells as a potent anti-cancer target.  
第75回日本癌学会学術集会(2016年10月6日-8日 パシフィコ横浜)
3. Horibe, T. and Kawakami, K.  
Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 in glioblastoma cells by bioluminescence imaging method at single cell level.  
COMBIO 2018(2018年9月23日-26日 Sydney Australia)

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。