

令和元年5月28日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09320

研究課題名(和文) PD-L1膜蛋白質輸送を制御するCUL3-BTBPの同定と作用機序解析

研究課題名(英文) Membrane trafficking of PD-L1 which is regulated by CUL3-BTBP

研究代表者

谷田 諭史(Tanida, Satoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30528782

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内膜輸送経路を可視化する系の構築を試みた。最初に胃癌細胞株(NUGC3)において細胞内膜輸送経路を可視化する系を構築した。さらに、Cullin3は、integrin 1の細胞膜への輸送制御することを見出した。integrin 1の細胞膜への輸送制御するメカニズム関わるBTB結合タンパク質の見出すため、175種のBTB結合タンパク質を欠失させ、ANKFY1がintegrin 1の細胞膜への輸送制御に関わることを見出し、細胞内でCullin3に結合し、integrin 1の細胞膜への輸送制御している。今後PD-L1細胞内膜輸送の制御にこれらの分子メカニズムが関与するかを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、PD-L1の発現に関与するCUL3-BTBPを同定し、CUL3-BTBP複合体が関与する生体機能を解析することで、ヒト消化器がん細胞ではこれまで全く明らかにされていないCUL3依存的ながん免疫制御機構が分子レベルで解明されることが可能となる。その結果PD-L1をターゲットにした新たながん免疫療法の道を開くと考えられる。CUL3-BTBPが、PD-L1発現を制御するメカニズムを細胞内小器官レベル、分子レベルで明らかにするといった報告はなく、独創的で、非常に意義深い。

研究成果の概要(英文)：An analyzed system for membrane trafficking of intracellular proteins was established based on confocal images in NUGC3 gastric cancer cells which are fixed after transfection of siRNA of 175 BTBPs and stained for integrin 1. CUL3 was critical for the cell surface level of integrin 1. After depletion of 175 BTBPs by siRNA, a family of adaptor proteins for CUL3, we discovered that ANKFY1, an early endosomal BTBP, was also critical for localization of surface integrin 1. CUL3 interacted with ANKFY1 and was required for the early endosomal localization of ANKFY1. These data suggest that CUL3/ANKFY1 regulates endosomal membrane traffic of integrin 1. Next, we examine membrane trafficking of PD-L1 during depletion of CUL3 and ANKFY1 by siRNA.

研究分野：消化器内科

キーワード：Cullin3 細胞内膜輸送メカニズム ANKFY1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、T細胞の働きを抑制することにより、免疫細胞による攻撃から逃れている。がん細胞膜蛋白質 programmed death-ligand (PD-L) 1 と T細胞膜に発現する programmed death (PD) 1 との結合が、T細胞の細胞傷害作用を抑制することにより、がんの免疫逃避機序に重要な役割を果たす。最近、この両者の結合を阻害する PD-L1 抗体薬が登場し、非小細胞肺癌や胃癌、大腸癌といった固形がんにも有効性を発揮し、臨床応用され始めている。しかしこの治療法は、制御性 T細胞の機能まで抑制することから、自己免疫様疾患を誘導する危険性ははらむ諸刃の剣である。しかし、がん細胞や細胞傷害性 T細胞での PD-L1 蛋白質産生の制御機能に新たな展開が見出すことができれば、中和抗体を用いない PD-L1 制御をターゲットとした消化器固形癌に対する新たな治療法の開発が可能となる。

申請者らはこれまでに、ZnF-BTB 蛋白質の一つである BAZF が、BTB ドメインを介して Cullin3(CUL3)と複合体を形成し、CUL3 E3 ユビキチンリガーゼとして機能することを見出してきた (Blood 2012, Angiogenesis. 2013)。図 1 に示す様に、CUL3 は BTB ドメイン蛋白質(BTBP)をリンカーとして結合し、これに基質を結合させる。すなわち、CUL3 は BTBP を組み替えることで幅広く基質を認識し、これをユビキチン化し、分解や機能変換等の制御に深く関わるプラットフォームタンパク質である。この CUL3 システムは、上皮増殖因子受容体(EGFR)の endocytosis を制御することが最近報告されているが、その分子メカニズムは不明である (Proc Natl Acad Sci USA. 2012)。

申請者らは、血管内皮細胞および消化器がん細胞において、CUL3 は EGFR のみならず、integrin β1 や PD-L1 等の細胞膜蛋白質発現を膜蛋白質輸送系により制御していることを新たに見出した。図 2 に示す様に、siRNA によって CUL3 を一

過性にノックダウンさせると、EGFR、integrin β1 や PD-L1 の細胞膜上での発現が顕著に増強される。さらに、これら BTBP 候補分子と最近報告された細胞内膜輸送系を制御する sorting nexin (SNX)ファミリー蛋白質との相互作用解析を進めたところ、これらの BTBP と結合する SNX メンバーを複数同定している。申請者らは integrin β1 や PD-L1 の細胞内膜輸送系も同様の多岐にわたった制御を受けていると考えている (図 3)。血管内皮細胞や消化器癌細胞において CUL3-BTBP の integrin β1 や PD-L1 蛋白質輸送制御に關与する機序を解明することは、血管の新生や再生、がん免疫の誘導、活性化のメカニズムを明らかにすることとなる。

2. 研究の目的

最近われわれは、Cullin3(CUL3)-BTB E3 ユビキチンリガーゼ複合体が、自身に結合する基質をユビキチン化し、分解に導くことで、PD-L1 発現を制御している新事実を見出した。本研究では、integrin β1 および PD-L1 発現に關連する BTB および CUL3 E3 ユビキチンリガーゼの基

CUL3-BTBP E3 リガーゼ複合体

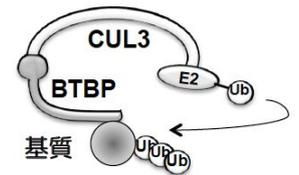


図1: CUL3-BTBP E3 リガーゼ複合体。BTBPは、ヒト遺伝子で183種が報告されている。

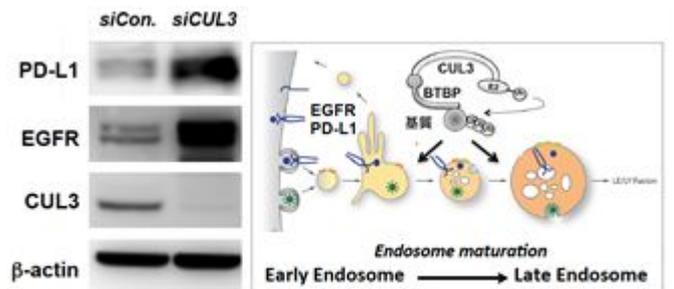


図2: 消化器がん細胞株でCUL3遺伝子ノックダウンによってもたらされるEGFR、PD-L1蛋白質量増大を示すウエスタンブロット解析(左図)。CUL3欠損はEndosomeの成熟を阻害すると考えられている(右図)(ProNAS 2012)。

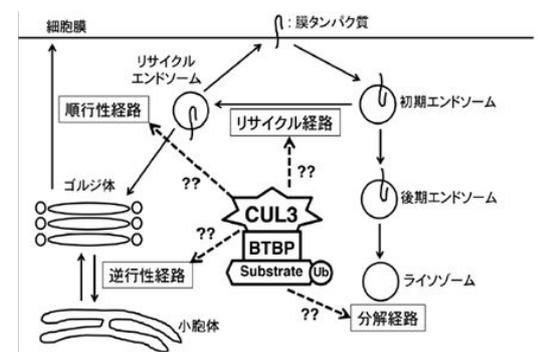


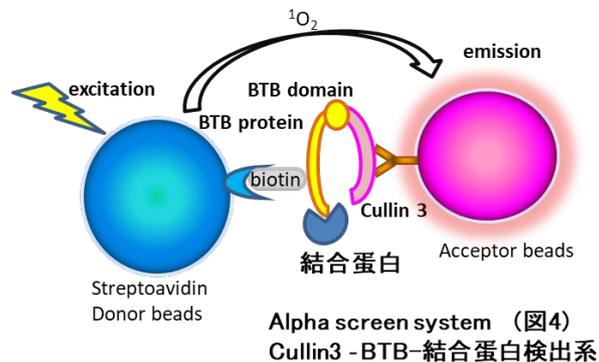
図3 CUL3は膜蛋白質の細胞内膜輸送を制御する(仮説)

質(BTB 結合蛋白質:BTBP)の探索、 BTB 結合蛋白質は、 integrin  $\beta 1$  および PD-L1 が転写後小胞体で合成され、細胞膜に移動・発現過程のどこで作用するかを解析し、 integrin  $\beta 1$  および PD-L1 発現メカニズムを解明することにより、新たな血管新生メカニズムの解明および免疫治療戦略の道を開きたい。

### 3 . 研究の方法

#### integrin $\beta 1$ および PD-L1 の転写・trafficking に関与している CUL3-BTB 結合蛋白の同定

現在、Gene Bank データベース検索から、BTB 蛋白遺伝子は、183 種存在することが明らかとなっている。しかし、このうちの何種類が、実際のところ CUL3 に結合するのか、また、結合が確認できる CUL3- BTB 複合体が標的とする基質(結合蛋白)は何か、その詳細はほとんど分かっていない。これらの難題を解決していくために、CUL3 蛋白質および 183 種の各 BTB 蛋白を用いた *in vitro* 蛋白質間相互作用検出システムが最適である。CUL3 および 183 種の各 BTB のリコンビナント蛋白質合成は容易ではないが、愛媛大学で開発されたコムギ胚芽無細胞蛋白質合成法を利用した。さらに、CUL3 と BTB のリコンビナント蛋白質合成、そしてこれらを用いての高感度蛋白質間相互作用解析法である AlphaScreen system の構築を既にスタートしている(図 4)。このシステムを利用し、CUL3 に結合する 118 個の BTB を探索した。さらに、BTB および BTB に結合する CUL3 E3 ユビキチンリガーゼの基質(BTB 結合蛋白)それぞれ Donor beads と Acceptor beads ビーズに付替え、同様な方法で integrin  $\beta 1$  および PD-L1 発現に関与する BTB 結合蛋白を 30 種の中から絞り込んでいく。



#### AlphaScreen system の構築と CUL3- BTB 蛋白および BTB-基質(結合蛋白)相互作用解析

申請者らは、合成 BTB 蛋白と CUL3 を Donor beads と Acceptor beads に付置した結合検出系を調整している。この AlphaScreen system は、すでに一部の合成 BTB 蛋白と CUL3 の結合を検出している。すなわち、1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Cullin3 5  $\mu\text{L}$  と 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  のビオチン化合成 BTB 蛋白のそれぞれ 2.5  $\mu\text{L}$  を 30 分間インキュベーションし、その後 1.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗 GST 抗体 2.5  $\mu\text{L}$  を加え、さらに 1 時間以上インキュベーションする。その後、streptavidin-coated donor beads を 5  $\mu\text{L}$  と抗 GST IgG conjugated acceptor beads を 5  $\mu\text{L}$  加え、暗所で 2 時間インキュベーションする。AlphaScreen シグナルは、buffer (25 mM HEPES, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 20 mM NaCl, pH 7.4, 0.1 % BSA) を使用し、23  $^{\circ}\text{C}$  加温下で EnVision microplate reader (Perkin-Elmer) で測定する。183 種すべての BTB 蛋白について網羅的に解析し、CUL3 に結合する BTB 蛋白を 118 種まで同定・絞り込んだ。

同様に Donor beads と Acceptor beads に合成 BTB と BTB 結合蛋白(転写抑制因子の制御蛋白や細胞内輸送関連分子)をそれぞれ付替え、上記で絞り込んだ 118 種 BTB と 30 種 (SNX 11, 17 など)BTB 結合蛋白の結合を AlphaScreen system で確認する。BTB、基質(結合蛋白)それぞれの蛋白が、CUL3- BTB-基質(結合蛋白)複合体形成の組み合わせになるかを解析する。

#### PD-L1 の細胞内輸送を制御する CUL3 パートナーBTBP の同定

ヒト BTBP 遺伝子は 183 種が報告されている。各種消化器がん細胞(大腸がん、胃がん、膵がん)および血管内皮細胞でのこれら 183 種の BTBP 遺伝子の発現情報を、公的データベース検索

から既に取得している。各種細胞株での BTBP 遺伝子発現情報をもとに、標的とする BTBP 遺伝子をウェスタン解析にて、その蛋白発現量に応じて絞り込む。次に絞り込んだ BTBP 遺伝子のオリゴ siRNA を合成し、血管内皮細胞株 (HUVEC) および胃癌細胞株 (NUGC3) を用いて、標的 BTBP 遺伝子をそれぞれノックダウンする。

#### CUL3 依存的な細胞内輸送小胞での integrin $\beta$ 1 および PD-L1 蛋白質輸送システムの解析

integrin  $\beta$ 1 および PD-L1 を蛍光 (MFP) 標識した発現プラスミドを作製し、CUL3、BTBP、基質のそれぞれの薬剤誘導型 microRNA レンチウイルスベクター感染 HUVEC および NUGC 3 細胞株に一過性発現させる。テトラサイクリン処理時と無処置時での輸送小胞を可視化する。輸送経路の可視化による解析は、マーカーとして、GFP-VSVG (順行性輸送マーカー)、蛍光標識されたコレラ毒素 (逆行性輸送マーカー)、蛍光標識された EGF (分解経路マーカー)、蛍光標識された transferrin (リサイクル経路マーカー) を用い、共焦点顕微鏡 (ニコン A1-R) にて解析する。各遺伝子発現抑制細胞で異常を示す細胞内膜輸送経路を見出した後は、microRNA 耐性の各遺伝子を発現させて、各遺伝子の依存性を証明する。また、その輸送経路の特異的な阻害剤処理を用いて、integrin  $\beta$ 1 および PD-L1 細胞内膜輸送が抑制される事を確認する。

#### 4. 研究成果

まず、CUL3 が、血管新生因子である integrin  $\beta$ 1 の細胞内膜輸送を制御しているかを調べた。integrin  $\beta$ 1 は、構成的に細胞膜上に発現していた。siRNA にて CUL3 を欠失させたあと、integrin  $\beta$ 1 の発現部位を免疫染色後共焦点顕微鏡にて確認すると、細胞質内に点状に散在性に凝集したように存在していた。しかし、integrin  $\beta$ 1 の発現量は変化なかった。CUL3 の欠失により、細胞内小器官にとどまり、細胞膜に表出しなかったことが示唆された。細胞膜透過性を変化させずに CUL3 の欠失をさせても、同様な結果を得た。FLAG 標識 siRNA 耐性 CUL3 の強発現により、つまり CUL3 の発現時には、integrin  $\beta$ 1 の細胞質内発現は減少し、細胞膜上に発現が回復することが確認できた。

PD-L1 の細胞内膜輸送を制御メカニズムについても同様に、NUGC3 細胞株において構成的に細胞膜上に発現していた。siRNA にて CUL3 を欠失させると、PD-L1 の発現部位は細胞質内に点状に散在性に凝集したように存在していた。

次に、integrin  $\beta$ 1 がエンドソームから細胞膜へのリサイクル経路について検討した。

siRNA にて CUL3 を欠失時、integrin  $\beta$ 1 がどの細胞内小器官 (Rab5, early endosomes; Rab11, recycling endosomes; Rab7, late endosomes; LAMP1, lysosomes) にとどまるかを調べた。HUVEC 細胞を Alexa488-conjugated anti-integrin  $\beta$ 1 antibody で標識し、経時的に 1 時間までインキュベーション後 integrin  $\beta$ 1 の存在部位を確認すると、early endosomes から細胞膜上に移動存在していた。siRNA にて CUL3 を欠失させると、early endosomes とどまり、細胞膜への移動は、ほとんど見られなかった。以上により、siRNA により CUL3 を欠失させることにより、integrin  $\beta$ 1 は、上記の 4 種の小器官のうち、early endosomes および recycling endosomes にとどまることを突き止めた。次に、CUL3 に結合する新しいクラスのアダプター蛋白 (BTB 結合蛋白) の同定を試みた。integrin  $\beta$ 1 の細胞膜の表出に不可欠な BTP 蛋白を同定するため、これまで報告により CUL3 の結合する BTB 結合タンパク質は、183 個が知られている。そのうちの 175 種の BTB 結合タンパク質の siRNA オリゴヌクレオチドを準備し、173 種の BTB 結合タンパク質を一つずつ欠失させ、integrin

$\beta$ 1 の細胞膜への輸送制御の直接関わる BTB 結合タンパク質をスクリーニングし、ANKFY1 が、CUL3 に結合する BTB 結合蛋白であることを明らかにした。また、ANKFY1 は、early endosomes に存在し、各種の細胞内のエンドソーム膜輸送にメカニズムを制御しているタンパク質であることが分か

っている。siRNA によるANKFY1の欠失にて、integrin  $\beta$ 1は、integrin  $\alpha$ 2と共存し、細胞質内に点状に散在性に凝集したように存在していた。さらに、ANKFY1の欠失時、細胞内小器官にとどまり、細胞膜に表出しなかったことが示された。HA標識 siRNA耐性 ANKFY1の強発現により、つまりANKFY1の発現時には、integrin  $\beta$ 1の細胞質内発現は減少し、細胞膜上に発現が回復することが確認できた。ANKFY1は、HUVECにおいて、integrin  $\beta$ 1の細胞膜上での発現に必須のタンパク質であることを発見した。また、細胞基底膜への細胞接着にも必須であることも見出した。また、PD-L1 の細胞内膜輸送制御メカニズムに関する BTB 結合タンパク質を数種までに絞り込みをしている。上記に述べた AlphaScreen system を利用し、CUL3- BTB 蛋白の蛋白を in vitro にて確認を進めている。さらに、絞り込んだ BTB 蛋白の siRNA オリゴヌクレオチドを準備し、NUGC3 細胞株において BTB 結合タンパク質を一つずつ欠失させ、PD-L1 の細胞内膜輸送制御メカニズムに関わる BTB 蛋白の同定についても進めている。integrin  $\beta$ 1 と同様な CUL3 - ANKFY1 結合メカニズムが存在しているかどうか、解析継続中である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：前川大志

ローマ字氏名：MEKAWA masashi

所属研究機関名：愛媛大学

部局名：大学院医学系研究科

職名：助教（特定教員）

研究者番号（8桁）：10771917

研究分担者氏名：城 卓志

ローマ字氏名：JOH takashi

所属研究機関名：名古屋市立大学

部局名：大学院医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：30231369

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：東山繁樹

ローマ字氏名：HIGASHIYAMA shigeki

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。