

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07621

研究課題名(和文) 腫瘍形成における型破り分泌の役割解明

研究課題名(英文) Study of unconventional protein secretion in cancer

研究代表者

山田 幸司 (YAMADA, Kohji)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90570979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、私どもはインポーティン 1やプロテインキナーゼCデルタ(PKC)が増殖期のがん細胞から放出されることを見出してきた。本期間内に、私どもは以下2つの大きな発見をした。一つ目はその臨床的意義である。PKCは肝がん患者の血清中で高く検出され、健常者や慢性肝炎患者の血清中では低値であることがわかった。特に超早期がん患者で検出されることから新規バイオマーカーになる可能性が示唆される。二つ目は、分泌機構の解明である。肝がんで見られるこの細胞質タンパク質の型破り分泌の特性として、1)通常培養条件下で起きること、2)小胞体を起点として起きること、3)造腫瘍性に寄与するなどが挙げられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常、腫瘍組織の外液成分における細胞質タンパク質のほとんどは細胞膜破壊による漏出と考えられてきた。一方で本研究により、細胞質タンパク質の一部は分泌され、肝がん特異性が高く、腫瘍形成に積極的に寄与することを突き止めた。特に、プロテインキナーゼCデルタ(PKC)に関しては早期診断用の血液バイオマーカーになる可能性があるのみならず、細胞外PKC またはその分泌機構が治療標的になる可能性が高く、肝がん医療における臨床的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have previously found that importin 1 and protein kinase C delta (PKC) are released from proliferating cancer cells. In this period, we have made two major discoveries. First, we found that PKC is highly detected in the serum of patients with hepatocellular carcinoma, while it is low in the serum of healthy subjects and patients with chronic hepatitis. In particular, it is detected in patients with very early-stage cancer, suggesting that it may be a novel biomarker. Second is the elucidation of the secretion mechanism. Using PKC as a model, we used the proximity labeling method to analyze the secretory pathway of PKC and found a vesicular trafficking pathway originating from the endoplasmic reticulum. The characteristics of the unconventional secretion of this cytoplasmic protein found in liver cancer include: 1) it occurs under normal culture conditions, 2) it originates from the endoplasmic reticulum, and 3) it contributes to tumorigenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：タンパク質の多機能性 型破り分泌

1. 研究開始当初の背景

肝がんは、ウイルス感染や生活習慣に起因して慢性肝炎および肝硬変を経て多段階で発がんする疾患である。肝がんは再発率が高く根治後も高頻度で再発するため、5年後の生存率が約30%と他のがん種と比べて予後が極めて悪い。現在までに肝がんの病態機構の理解は充分とはいえず、臨床現場でも満足のいく治療成績を達成できていない。こうした疾患対策上の課題に対して、有用な診断・治療法の創出、延いては予後改善の達成が目標となるが、これらの社会ニーズを実現するためには、肝腫瘍形成の機構解明が緊要であるといえる。

タンパク質が細胞外に分泌されるためにはリン脂質二重層からなる内膜を通過する必要がある。一般的に細胞外に分泌されるタンパク質は、合成時に持つ分泌シグナルに依存して内膜を通過し分泌される。しかし細胞外液中には分泌シグナルを持たないタンパク質も存在し、近年、様々なタンパク質が型破り分泌されることが報告されはじめている。特に免疫系の研究では、型破り分泌が炎症応答機構の一つとして示されている (Schekman et al., *eLIFE*, 2015)。一方で型破り分泌とがん細胞との直接的な関係を示す報告は現在までに皆無である。

これまでに申請者は、型破り分泌が生きた肝がん細胞で観測されることを世界で初めて見出し、その機能解析を先駆的に進めてきた (Yamada et al., *Sci Rep*, 2016)。このうち肝がんの診断や治療に活用できる候補として PKC の同定に成功した。実際に細胞株を用いた解析から、PKC の細胞外分泌が肝がんでは特異的に高検出されることを見出した。ヒト血清を用いた解析では、血中 PKC が現在臨床検査で使われている腫瘍マーカー (AFP や PIVKA-II) より慢性肝炎・肝硬変と肝がんを鑑別する診断精度が高く優れていることが判明した。また機能解析の成果、細胞外の PKC が IGF 受容体と結合して、肝がんの細胞増殖能を亢進させる作用を持つことを突き止めた。細胞外の PKC を標的とする抗体の作出にも成功し、抗腫瘍効果が確認できたため、現在抗体医薬品シーズとして実用化研究を進めている。これらの成果を総括すると、PKC の型破り分泌は肝がんにて特化しており、増殖機構にも直接寄与することから、本研究では PKC の型破り分泌が肝腫瘍形成を規定する病態機構を担っているのではないかと考え、その機序を問う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がんにおける型破り分泌の役割を明らかにすることである。具体的には、肝がんにおける PKC の型破り分泌に着目して、PKC の型破り分泌の『機構』および肝がんにおける『意義』を明らかにする。

3. 研究の方法

PKC の型破り分泌に必要な分子領域を明らかにする。相互作用タンパク質の探索は近位依存性ビオチン標識 (BioID) 法を用いる。探索されたタンパク質に対して RNAi 法によるノックダウン実験や CRISPR/Cas9 法で発現欠損株を作製し、PKC の型破り分泌との関係を生化学的手法や細胞染色等で解析する。

また肝がん患者組織を用いて PKC の型破り分泌に必須な因子の発現量を免疫組織化学染色で解析し、肝発がんや悪性化進展との相関性を統計学的に解析する。

4. 研究成果

PKC -BioID をドキシサイクリン応答性に発現する肝がん細胞株を樹立し、BioID によりインタラクトーム解析を行った結果、小胞体タンパク質である E-Syt1 を同定した。E-Syt1 を RNAi や CRISPR ノックアウトしたところ PKC の分泌は抑制された。また PKC の型破り分泌とオートファジーとの関係を明らかにするため、ATG5 や LC3B などを siRNA でノックダウンしたところ、PKC の分泌は抑制された。このことから、PKC の分泌にはオートファジー因子が関与していることが示唆された。

さらに PKC 分泌に小胞輸送が関与するかを明らかにするために免疫電子顕微鏡観察した結果、PKC は SEC22B 陽性の小胞内に存在することも観測された。実際、臨床検体においても SEC22B と PLKC の共局在はがん部でのみ見られた。SEC22B と細胞膜で結合する SNARE である STX3, STX4, SNAP23 が PKC 分泌に関わるかを調べるために RNAi 実験を試みたところ、ノックダウンにより PKC 分泌は抑制を受けた。このことから、PKC の分泌は小胞体から SEC22B 小胞を介して分泌していることがわかった。本研究は、がんにおける型破り分泌の機構の存在が明らかにしたもので、今後は発がんやがん細胞維持、進展等への影響を解明する足がかりとなる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Kohji, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 28
2. 論文標題 Multiple subcellular localizations and functions of protein kinase C in liver cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 188 ~ 198
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3748/wjg.v28.i2.188	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada Kohji, Oikawa Tsunekazu, Kizawa Ryusuke, Motohashi Saya, Yoshida Saishu, Kumamoto Tomotaka, Saeki Chisato, Nakagawa Chika, Shimoyama Yuya, Aoki Katsuhiko, Tachibana Toshiaki, Saruta Masayuki, Ono Masaya, Yoshida Kiyotsugu	4. 巻 81
2. 論文標題 Unconventional Secretion of PKC Exerts Tumorigenic Function via Stimulation of ERK1/2 Signaling in Liver Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 414 ~ 425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-20-2009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田幸司、及川恒一、本橋沙耶、吉田彩乃、小泉麗、吉田清嗣
2. 発表標題 Extracellular localization of PKC and its function as a growth factor to activate ERK signaling in liver cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 PKC と E - S y t 1 との相互作用阻害剤を含む新規肝癌治療薬	発明者 山田幸司、本橋沙耶、吉田清嗣	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2022-024602	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 細胞外のPKC を標的とする肝癌細胞増殖抑制剤及びそれを含む新規肝癌治療薬	発明者 山田幸司、木澤隆介、吉田清嗣	権利者 慈恵大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-168678	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 彩舟 (Yoshida Saishu) (40772744)	東京慈恵会医科大学・医学部・講師 (32651)	
研究分担者	立花 利公 (Tachibana Toshiaki) (80163476)	東京慈恵会医科大学・医学部・教授 (32651)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------