

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590099

研究課題名(和文) 抗がん剤処理によるカルレティキュリンの細胞表面への移行とその生理的意義

研究課題名(英文) The translocation of calreticulin to cell membrane by anticancer drug and the physiological significance.

研究代表者

東 祐太郎 (AZUMA, Yutaro)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：80231918

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体タンパクカルレティキュリン(CRT)の抗がん剤処理による細胞表面への移行メカニズムを明らかにするため、抗がん剤ミトキサントロン(MIT)で処理したHT29細胞の細胞表面CRTを解析した。その結果細胞膜上のCRTが二相性の増加を示すことをタンパク質レベルで明らかにし、前期の反応は小胞体ストレス、活性酸素とcaspase8の活性化、後期の反応はアポトーシスを介したものであることを明らかにした。さらに遺伝子導入により蛍光タンパクmAG1標識CRTを持つ細胞株を作成し、MITにより小胞体のCRTが細胞内で凝集し、細胞膜へ局在化することを共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内で確認した。

研究成果の概要(英文)：To clarify the transition mechanisms of calreticulin (CRT) from ER to cell surface in anti-cancer drug-treated tumor cells, the expression levels of CRT on the plasma membranes of mitoxantrone or oxaliplatin-treated human colon cancer cell line HT29 cells were estimated. It revealed that the CRT on the cell membrane exhibits increased biphasic at the protein level, and the increase of early phase was result by ER stress, ROS and activation of caspase8, the increase of late phase was concerned with apoptosis. Furthermore, mAG1-labelled CRT transfected HLF cells (HLF-ER-mAG1-CRT-KDEL cells) were prepared, and analyzed by confocal laser microscope for localizes changes of CRT. It was confirmed that mAG1-CRT were aggregated and translocated from the ER to plasma membrane, in mitoxantrone or ER stress-inducing agents thapsigargin treated HLF-ER-mAG1-CRT-KDEL cells.

研究分野：免疫学、細胞生物学

キーワード：カルレティキュリン 小胞体ストレス アポトーシス 抗がん剤 貪食

### 1. 研究開始当初の背景

体内では健康人でも毎日多数の腫瘍細胞が発生しているが、自然免疫と獲得免疫からなる「腫瘍免疫」の働きにより腫瘍細胞を破壊して増殖を抑制している。自然免疫系の主役となるのがNK細胞であり、これまで研究代表者はその細胞傷害活性の調節について解析を行ってきた。しかしこの機構を回避して増殖し「がん」となった腫瘍細胞を排除するためには、より強力な獲得免疫系の活性化が必要となる。獲得免疫の誘導は樹状細胞やマクロファージなどの抗原提示細胞によってひきおこされ、さまざまな方法による人為的な抗原提示を介した獲得免疫の活性化は、近年「がん」患者の免疫賦活療法にも応用されてきた。獲得免疫の活性化は、抗原提示細胞が貪食した腫瘍細胞の持つ抗原ペプチドの提示により決定されることから、抗原提示細胞による腫瘍細胞の貪食は「腫瘍免疫」において特に重要であると考えられる。

細胞の貪食には貪食の目印となるいわゆる“eat-me シグナル”とよばれる正常細胞にはない分子の発現がアポトーシス誘発細胞で認められており、研究代表者はこれまでに、アシアロ糖鎖発現の増加、ガングリオシドGM3の増加、Lewis<sup>x</sup>およびLewis<sup>y</sup>型糖鎖の発現増加をアポトーシス誘発細胞上で認め報告してきた。さらに近年、抗がん剤によりアポトーシスを誘発した細胞における細胞内局在タンパク(カルレチキュリン(CRT)、カルネキシン、LAMP-1、LAMP-2)の細胞表面への移行による発現増加についても報告し、細胞内タンパクが細胞表面に表出することで“eat-me シグナル”として貪食の認識に関与する可能性を示した。

細胞内小胞体の内腔に存在するCRTはシャペロンタンパク質であり、小胞体におけるタンパク質フォールディングの制御を行っている。しかしアポトーシスを誘発した細胞では、CRTがホスファチジルセリン(PS)とともに細胞膜ラフトに移行し、“eat me signal”としてアポトーシス細胞の速やかな貪食除去に関与することが報告されている。これまでに研究代表者は、大腸がん細胞株HT-29細胞を機序の異なる2種類の抗がん剤(白金製剤オキサリプラチン(L-OHP)、アントラサイクリン系抗がん剤ミトキサントロン(MIT))で処理した実験で、細胞表面CRTにアポトーシスより早期に発現増加することを認め、この細胞表面CRTの発現増加がアポトーシスとは別の機構により起こる可能性を示している。これまで報告されてきたCRTを発現した腫瘍細胞の貪食は、PSとともにラフトに移行したCRTについてのものがほとんどであり、これは主にアポトーシスに関与するCRT発現増加についての内容と考えられた。しかしアポトーシスと異なったメカニズムで早期に起こるこのCRT発現増加については、その存在様式や貪食に対する関与など不明な点が

多かった。

### 2. 研究の目的

抗がん剤処理によりアポトーシスを誘発した腫瘍細胞では、早期に小胞体内のCRTが細胞表面に移行することが確認されている。この腫瘍細胞表面に認められるCRTの新たな発現と増加は、マクロファージや樹状細胞による貪食を介してがん特異抗原の提示、T細胞の活性化など一連の免疫応答の調節に寄与している点で重要であるが、そのメカニズムに関しては不明なことが多かった。そこで本研究では、抗がん剤処理された腫瘍細胞におけるCRTの細胞表面への移行メカニズムと細胞表面における存在様式を解析し、腫瘍細胞の貪食除去における細胞表面CRTの役割を明らかにすることを目的とする。本研究の結果は、より効率の良い免疫賦活療法の構築だけでなく、免疫賦活活性をあわせ持った新たな抗がん剤研究の発展に寄与することが期待される。

### 3. 研究の方法

(1) 抗がん剤処理により細胞表面に移行したCRTの解析

抗がん剤によるCRTの細胞表面発現の増加とその機構を明らかにするため、実験系には大腸がん細胞株HT29細胞と誘発機序の異なる抗がん剤(白金製剤オキサリプラチン(L-OHP)、アントラサイクリン系抗がん剤ミトキサントロン(MIT))を用い、細胞表面に発現するCRTを蛍光標識抗体で染色後、フローサイトメトリーにより発現変化を解析した。また反応後の各細胞から形質膜タンパクを抽出し、含まれるCRTをウェスタンブロットで解析し、細胞表面に移行したCRTをタンパクレベルで確認した。

(2) 細胞表面CRTの発現増加と小胞体ストレスの関係についての解析

抗がん剤処理早期におけるCRTの細胞表面への移行に関する機構を明らかにするため、細胞表面CRTの発現増加と小胞体ストレスの関係について解析を行った。使用した抗がん剤による小胞体ストレスを確認(各抗がん剤で処理したHT29細胞内における翻訳開始因子eIF2αのリン酸化の解析)小胞体ストレスによるCRT移行の確認(小胞体ストレス誘発剤ツニカマイシン(Tun)、タブシガルギン(Tpg)、リン酸化eIF2αの脱リン酸化を抑制することでeIF2αのリン酸化を高めるトートマイシン(Taut)による細胞表面CRT増加の解析)を行った。また、小胞体ストレスに関連する他の因子としてμ-カルパイン、小胞体膜に存在しμ-カルパインにより活性化されるカスパーゼ12、ミトコンドリアから放出される活性酸素種(ROS)にも着目し、各分子の活性阻害剤を用いることにより、抗がん剤処理による細胞表面CRT発現に対する各分子の関与について解析した。

各実験により得られた結果をもとに、抗がん剤による細胞表面 CRT の発現増加の細胞体を介したメカニズムについて考察した。

### (3) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた CRT の細胞内局在変化の解析

抗がん剤による細胞内 CRT の細胞表面への移行を共焦点レーザー顕微鏡による細胞内局在の解析から明らかにするため、その研究材料となる蛍光標識 CRT を有するがん細胞株の作成を行った。CRT の蛍光標識タンパクには赤色蛍光タンパク質 DsRed、緑色蛍光タンパク質 mAG1、がん細胞株にはヒト大腸がん細胞株 HT29 細胞のほかヒト子宮頸がん細胞株 Hela 細胞、肝細胞株 HLF 細胞を用い、遺伝子導入により蛍光標識 CRT を有する細胞の作成を行った。

作成した細胞の中から mAG1 標識 CRT をもつ HLF 細胞 (HLF-ER-mAG1-CRT-KDEL 細胞) を選び、抗がん剤処理による CRT の細胞内局在変化を解析するとともに、細胞膜脂質ラフト、TSP-1 (thrombospondin-1)、 $\alpha v\beta 3$  インテグリンなど貪食細胞の認識に関する分子との共局在について mAG1 とは蛍光波長の異なった別の蛍光色素で標識された抗体を用いて解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 抗がん剤処理されたがん細胞株における CRT の細胞表面への移行とその機構

本研究では CRT が細胞表面へ移行する機構を明らかにするため、MIT 処理による CRT の細胞表面発現量の変化と caspase および小胞体ストレスとの関係について検討した。HT29 細胞を MIT で 0~48 時間処理し、CRT の細胞表面発現量をフローサイトメトリーで解析したところ、細胞表面 CRT は処理後 4 時間 (前期) と 48 時間 (後期) で 2 相性の増加が認められた (図 1)。またこの時各細胞から抽出した細胞形質膜タンパク中の CRT をウェスタンブロットにより解析し、この CRT の変化が CRT の膜への移行であることが確認された。

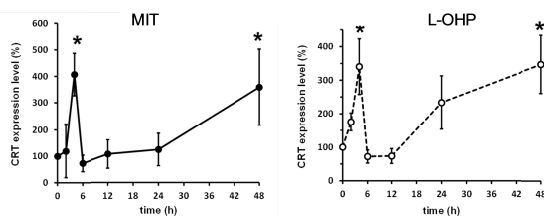


図1 抗がん剤で処理したHT29細胞表面に発現するCRTの経時的変化

この CRT の移行に対する caspase3 の関与について検討するため、抗がん剤で処理する際に caspase3 阻害剤を添加し細胞表面 CRT を解析した結果、前期の CRT 増加に影響はなかったが、後期の CRT 増加は抑制された (図 2)。さらにこの時各細胞における phosphatidylserine (PS) の露出を解析した

ところ前期には認められず、後期では CRT の増加を認めた細胞で同様に PS の増加を認めたことから、後期の CRT 増加には caspase3 を介したアポトーシス、前期の CRT 増加には アポトーシス実行機構とは別の経路による反応であることが示唆された (図 3)。

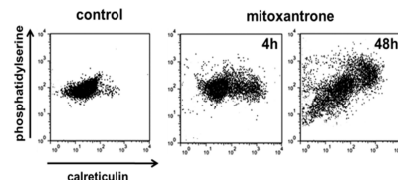


図2 MITで処理したHT29細胞表面に発現するCRTとPS

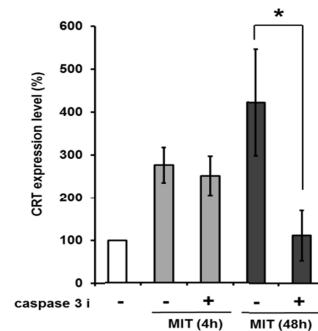


図3 抗がん剤により発現が増加する細胞表面 CRT に対する caspase3 阻害剤の影響

CRT が小胞体内タンパクであり、抗がん剤の中には小胞体ストレスを誘発するものがあることから、小胞体ストレス誘発剤 Tun、Tpg、リン酸化 eIF2 $\alpha$  の脱リン酸化を抑制することで eIF2 $\alpha$  のリン酸化を高める Taut による細胞表面 CRT 増加の解析を行った。その結果いずれも濃度に依存した細胞表面 CRT の増加を認めた (図 4)。そこで前期の CRT 増加に対して小胞体ストレスに關与する caspase12 阻害剤、活性酸素種 (ROS) 阻害剤 N-Acetyl cystein (NAC)、calpain の阻害剤 (PD150606)、さらに caspase8 阻害剤を添加しその影響を解析したところ、いずれも CRT 増加の抑制が示された (図 5)。この時前期の細胞内 caspase3、caspase8 活性に対する各阻害剤の影響を解析したところ、各阻害剤とも caspase8 の活性化に対する阻害作用が認められた。以上のことから、前期における細胞表面 CRT の増加は、小胞体ストレスと ROS による caspase8 の活性化を介したものであることが示唆された。

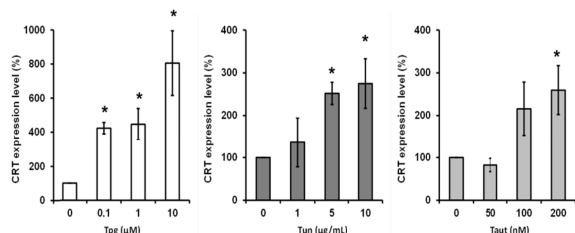


図4 小胞体ストレス誘導剤で処理したHT29細胞表面に発現するCRTの変化

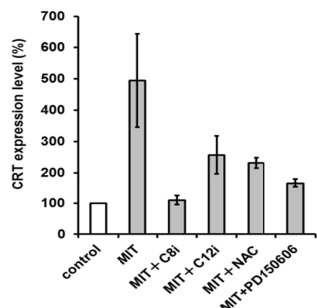


図5 抗がん剤により発現が増加する細胞表面CRTに対する小胞体ストレス関連因子阻害剤の影響

一方、細胞表面に移行した CRT の貪食反応に関する役割について検討するため、抗がん剤処理により細胞表面に移行した CRT と貪食の介在因子である TSP1 との結合についてリコンビナント TSP1 を用いて解析したところ、抗がん剤処理したがん細胞上で CRT を介した TSP1 の結合が確認された。そこ現在 TSP1 との結合による貪食反応のオプソニン効果について検討を行っている。

## (2) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた CRT の細胞内局在変化の解析

小胞体タンパクである CRT の細胞膜への移行を細胞内の局在変化として明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。まず細胞レベルでの解析を行うにあたり、研究材料として用いる蛍光標識 CRT を細胞内に持つがん細胞株の作成を試みた。がん細胞株に HT29 細胞、Hela 細胞、HLF 細胞を用い、蛍光タンパク質 DsRed または mAG1 を標識した蛍光標識 CRT を遺伝子導入により細胞内で作製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。その結果 ER-mAG1-CRT-KDEL 配列を HLF 細胞にエレクトロポレーションを用いて導入することで、蛍光標識 CRT (mAG1 標識 CRT) を持つ HLF-ER-mAG1-CRT-KDEL 細胞を作成することができた。そこでこの HLF-ER-mAG1-CRT-KDEL 細胞を抗がん剤 MIT または小胞体ストレス誘発剤 Tpg で 0~24 時間処理し、反応後の CRT の局在変化を観察したところ、小胞体 CRT の細胞内での凝集と細胞膜への局在化が経時的に確認された。さらに TSP-1、 $\alpha V\beta_3$  インテグリン、CD47 など貪食に関与する各因子を染色し、CRT との結合や共局在についてフローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡により解析した。その結果、局在化した CRT と各因子の結合はフローサイトメトリーにより示されたものの共焦点レーザー顕微鏡による結果は不鮮明であり、その詳細については検討を続けている。

## <引用文献>

Higai, K., Azuma, Y., et al. Biochim Biophys Acta. 1760:1355 (2006)

Azuma, Y., et al. Glycoconjugate J. 17: 301-306 (2000)

Azuma, Y., et al. Biol. Pharm. Bull. 30:1680-1684(2007).

Azuma Y, et al. Biochim. Biophys. Acta. 1672: 157-163 (2004)

Azuma Y, et al. Biol. Pharm. Bull. 30:655-660(2007).

Sato H, et al. Biochim Biophys Acta. 1790:1198-1205 (2009).

Gardai, S. J. et al. Cell. 123 : 321 (2005)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Ito K, Higai K, Shinoda C, Sakurai M, Yanai K, Azuma Y, Matsumoto K. Unlike natural killer (NK) p30, natural cytotoxicity receptor NKp44 binds to multimeric  $\alpha 2,3$ -NeuNAc-containing N-glycans. Biol Pharm Bull. 35, 2013, 594-600. (査読有) (<http://doi.org/10.1248/bpb.35.594>)

Taniuchi F, Higai K, Tanaka T, Azuma Y, Matsumoto K, Transcriptional regulation of Fucosyltransferase 1 gene expression in colon cancer cells. The Scientific World Journal. 2013, 105464, 1-9. (査読有) (DOI:10.1155/2013/105464)

〔学会発表〕(計8件)

東祐太郎、鈴木賢一、桧貝孝慈、抗がん剤処理による小胞体タンパク質の細胞膜への移行とその機構、第54回日本臨床化学会年次学術集会、2014年9月6日、東京大学本郷キャンパス(東京都文京区)

東祐太郎、木川富巳香、桧貝孝慈、小林芳郎、アポトーシスによるLewis型糖鎖抗原増加に關与するフコース転移酵素、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本市総合体育館(熊本県熊本市)

東祐太郎、鈴木賢一、桧貝孝慈、松本宏治郎、抗がん剤による小胞体ストレスと caspaseの活性化を介したcalreticulinの細胞表面における増加、第10回東邦大学4学部合同学術集会、2014年3月1日、東邦大学大森キャンパス(東京都大田区)

伊藤健一郎、高橋真美子、桧貝孝慈、東祐太郎、吉田直弘、松本宏治郎、Natural cytotoxicity receptors(NCRs)の糖鎖リガンド特異性、日本薬学会第133年会、2013年03月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

東祐太郎、鈴木賢一、桧貝孝慈、松本宏治郎、抗がん剤による小胞体ストレスと

caspaceの活性化を介したcalreticulinの細胞表面における増加、日本薬学会第133年会、2013年03月29日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

今泉雄三、小松由佳、桧貝孝慈、東祐太郎、松本宏治郎、KillerLectin-likeReceptors (KLRs)の糖鎖リガンド特異性、日本薬学会第133年会、2013年03月29日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

桧貝孝慈、谷内富美子、田中智美、東祐太郎、松本宏治郎、大腸癌細胞におけるFUT1遺伝子の転写調節、日本薬学会第133年会、2013年03月29日、パシフィコ横浜（神奈川県、横浜市）

伊藤健一郎、桧貝孝慈、東祐太郎、松本宏治郎、Killer Lectin-like Receptors ( KLRs ) および Natural cytotoxicity triggering receptors の糖鎖リガンド特異性、第 85 回日本生化学会、2012 年 12 月 16 日、福岡国際会議場（福岡県福岡市）

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

東 祐太郎 ( AZUMA, Yutaro )

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：80231918