

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15253

研究課題名(和文)細胞外に局在する細胞内機能性キナーゼによるがん微小環境で果たす役割

研究課題名(英文) Extracellular localization of the intracellular kinase 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではこれまでにPKC δ に着目し、肝がんの特徴的に細胞外分泌が起きることを突き止めた。PKC δ の細胞外分泌はPKC活性化剤であるPMA処理することにより抑制された。また細胞外のPKC δ がグリピカン3の細胞外領域と直接結合し、増殖シグナルを活性化させ、腫瘍形成能を亢進させることを突き止めた。加えて、PKC δ のマウスモノクローナル抗体が抗腫瘍効果を有することも細胞・組織レベルで示すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、細胞内に局在するタンパク質が肝がんにおいて細胞外に分泌されることがわかった。現在、腫瘍組織においては壊死が起きることが知られているが自発的な分泌の発見は新規性がある。さらに、肝がん患者の血清で高値であるのは今後腫瘍マーカーになる可能性がある点で社会的意義が大きい。加えて、皮下移植モデルにおいてPKC δ 抗体が抗腫瘍効果を持つ発見は、今後、抗体医薬品開発につながる可能性が非常に高く、治療法が未だ乏しい肝がんにおいてその医療ニーズに沿っている。

研究成果の概要(英文)：Expression of human protein kinase C delta (PKC δ) protein has been linked to many types of cancers. Here we showed that full-length PKC δ was secreted to the extracellular space in living liver cancer cells under normal cell culture conditions and in xenograft mouse models. Patients with liver cancer showed higher levels of serum PKC δ than patients with chronic hepatitis or liver cirrhosis or healthy individuals. Furthermore, colocalization studies showed that extracellular PKC δ was anchored on the cell surface of liver cancer cells via association with glypican 3, a liver cancer-related heparan sulfate proteoglycan. Addition of exogenous PKC δ activated IGF-1 receptor (IGF1R) activation and subsequently enhanced activation of ERK1/2, which led to accelerated cell growth in liver cancer cells. Conversely, treatment with anti-PKC δ antibody reduced cell proliferation and spheroid formation of liver cancer cells and tumor growth in xenograft mouse models.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：PKC

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロテインキナーゼ C デルタ (PKC δ) は、セリン・スレオニンキナーゼの一つであり、細胞内情報伝達系を担う分子として特徴付けられている。申請者が所属する研究室では、これまで、PKC δ のリン酸化基質の同定をはじめ、その性状・機能解析に関して世界でも先駆的な成果を挙げてきた (Yoshida et al, *Cancer Lett*, 2016)。PKC δ は、細胞増殖や分化、さらに細胞死など多彩な高次生命機能に寄与することがわかっている。一方で、この PKC δ の機能は、がん形質の観点から見ると、がんを促進する働きと抑制する働き双方の特性を併せ持つことが推察される。それゆえ、肝がんなど一部のがん患者の腫瘍組織において PKC δ の過剰発現が確認されているが、PKC δ がどのように腫瘍形成に関わるかについてはほとんど解析が進んでいなかった。

最近、申請者は、肝がんを対象とした解析から、PKC δ が血清中や細胞培養上清中に存在することを新たに見出していた。これまでに細胞外液中における PKC δ の局在は報告されておらず、その機能的意義は一切わかっていなかった。

2. 研究の目的

申請者は、PKC δ の細胞外局在を新たに見出したが、その機能は全く不明であった。その一方で、これまでの解析から、細胞外 PKC δ ががん微小環境に作用しうる可能性と、肝がん細胞の増殖に関与する可能性を示唆する予備的知見を得ていた。そこで本研究では、まず、細胞外 PKC δ について機能解析を行い、肝がん病態における役割を明確にすることを目指した。さらに、その分子基盤を応用展開して、細胞外の PKC δ を標的とする新たな診断・治療理論を確立することを最大の目的に研究を推進した。

3. 研究の方法

PKC δ の細胞外放出の特性

PKC δ のリン酸化状態等を確認することで、細胞外に移行する PKC δ の特徴付けを行う。ヒト血清を用いた血中 PKC δ 濃度測定を市販の ELISA キットを用いて行った。

肝がん腫瘍形成における細胞外 PKC δ の役割の解明

PKC δ 抗体を用いて、in vitro の腫瘍形成能をスフェロイド形成観察により明らかにした。またマウスモデルを用いて、抗腫瘍活性を調べた。

PKC δ の細胞膜受容体の同定と機能解析

プロテオミクスやリン酸化アレイ等を用いて、受容体を特定し、下流シグナル活性への影響を生化学実験等で調べた。

4. 研究成果

PKC δ の細胞外分泌は PKC 活性化剤である PMA 処理することにより抑制された。このことから PKC δ の細胞外分泌は不活性型で起きていることが示唆された。また PKC δ のリン酸化抗体を用いることで、細胞外液中の PKC δ が不活性型であることも突き止めた。さらに、変異体解析の結果、細胞核に移行する PKC δ は細胞外分泌が抑制を受けたことから、PKC δ は細胞質に局在することで細胞外に移行することが推測された。

ヒト血清を利用した血中 PKC δ 値の測定を試みた。その結果、健常者や慢性肝炎・肝硬変患者に比べて、肝がん患者では血中 PKC δ 値が有意に高い値を示すことがわかった。加えて現在臨床検査で用いられている肝がんマーカー (AFP や PIVKA-II) でがん陰性と判定された肝がん症例においても血中 PKC δ 値は有意に高いことがわかった。これらの結果から、血中 PKC δ は肝がんの診断精度を現在の水準より向上させるバイオマーカーになるのではないかと推察した。

生化学解析の結果、細胞外 の PKC δ がグリピカン 3 の細胞外領域と直接結合することを突き止めた。さらに、リン酸化アレイの結果から、細胞外の PKC δ は GPC3 と結合することで、インスリン様受容体 (IGF1R) を活性化させ、増殖シグナルである ERK1/2 や STAT3 を活性化させることを見出した。細胞外 PKC δ の IGF1R シグナル活性化は GPC3 を CRYSPR ノックアウトした細胞では見られなかったことから、GPC3 は受容体活性の co-

receptor として働いていることが推測される。さらに、細胞外の PKC は細胞増殖を亢進させた。この逆に抗 PKC モノクローナル抗体は細胞増殖やスフェロイドの増大を抑制した。またマウス皮下移植モデルを用いた解析から、抗 PKC モノクローナル抗体が腫瘍の大きさを縮退させることが分かった。つまり、抗 PKC モノクローナル抗体が抗腫瘍活性をもつことを突き止めた。加えて、PKC δ のマウスモノクローナル抗体が抗腫瘍効果について、IGF1R 増殖シグナル等を組織レベルで示すことに成功した。本研究を通して、PKC δ が肝がんの抗体療法の標的になることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kumamoto T, Yamada K, Yoshida S, Aoki K, Eto K, Yanaga K, Yoshida K	4. 巻 56
2. 論文標題 Impairment of DYRK2 by DNMT1-mediated transcription augments carcinogenesis in human colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Oncol.	6. 最初と最後の頁 1529-1539
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2020.5020.	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 Hayashi M, Madokoro H, Yamada K, Morimoto C, Sakamoto M, Yanagawa H, Yamada T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Novel Antibody-Drug Conjugate with Anti-CD26 Humanized Monoclonal Antibody and Transcription Factor I1H (TFI1H) Inhibitor, Triptolide, Inhibits Tumor Growth via Impairing mRNA Synthesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers11081138.	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 K, Yoshida K. Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.	6. 最初と最後の頁 839-848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.02.009	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 K, Yoshida K	4. 巻 1866
2. 論文標題 Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res	6. 最初と最後の頁 839-848
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.02.009	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山田 幸司、米田 悦啓	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本医事新報社	5. 総ページ数 50-69
3. 書名 人体の細胞生物学	

〔出願〕 計2件

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 19)山田幸司、木澤隆 介、吉田清嗣	権利者 学校法人慈恵大 学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-168678	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 新規肝癌マーカー	発明者 山田 幸司、吉田 清 嗣	権利者 東京慈恵会医科 大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-095674	出願年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------