

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07504

研究課題名(和文)小胞体シャペロン蛋白の細胞膜発現機構の解明

研究課題名(英文) Mechanism of plasma membrane expression of endoplasmic reticulum chaperone proteins

研究代表者

石垣 宏仁 (ISHIGAKI, HIROHITO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90432301

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)：GRP94は正常細胞では小胞体に存在する蛋白である。癌細胞では、GRP94が細胞膜に発現することが知られているが、膜に繋ぎとめる蛋白(アンカー蛋白)は知られていない。本研究では、GRP94のアンカー蛋白を同定しようと試みた。その結果、癌細胞はGRP94を細胞外に放出しており、放出されたGRP94は細胞膜上のRAGEと結合することが判明した。またRAGEからのシグナルはIL-6を誘導することが知られているが、癌細胞はGRP94を添加した場合のみIL-6を産生した。癌細胞において、GRP94はRAGEと結合して細胞膜に存在し、IL-6の産生を誘導する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌免疫において、RAGEのリガンドとしては、これまでHMGB1やS100等が知られていたが、今回の我々の検討で、GRP94も新規のRAGEのリガンドとして示された。またGRP94はRAGEに結合して、癌細胞からのIL-6の産生を誘導する可能性が示された。IL-6は樹状細胞の成熟障害や、癌環境下での免疫疲労に関与しており、腫瘍の分泌したGRP94がautocrineに働くことでIL-6を産生し、癌環境下での免疫疲労を誘導している可能性が示された。新規癌免疫療法のターゲットとしてGRP94やRAGE、IL-6が有望であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：GRP94 is a protein present in the endoplasmic reticulum in normal cells. In cancer cells, GRP94 is known to be expressed at the plasma membrane, but the protein that anchors it to the membrane (anchor protein) is unknown. In this study, we attempted to identify the anchor protein of GRP94. We found that a cancer cell release GRP94 to the extracellular space, and that the released GRP94 binds to RAGE on the plasma membrane. In addition, it has been reported that signals from RAGE induce IL-6, the cancer cell produced IL-6 only when GRP94 was added to the cells. In the cancer cell, GRP94 was found to be present on the plasma membrane bound to RAGE and may induce the production of IL-6.

研究分野：癌免疫学

キーワード：GRP94 RAGE IL-6 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

正常の状態において、細胞が産生する膜結合蛋白質は、mRNA から翻訳合成され、新生ポリペプチドとして小胞体 (Endoplasmic reticulum, ER) の膜に挿入される。新生ポリペプチドは、Glucose regulated protein 78 (GRP78) や GRP94 などの ER 分子シャペロン蛋白と結合することで、凝集と分解を免れ、糖鎖などを付加されて高次構造 (立体構造) が形成される。正常な高次構造が形成された蛋白質は、シャペロン蛋白から離れ、ゴルジ体を経て、細胞内や細胞外に輸送され機能を発揮する (Nature Review Immunology, 2008; 図 1A)。

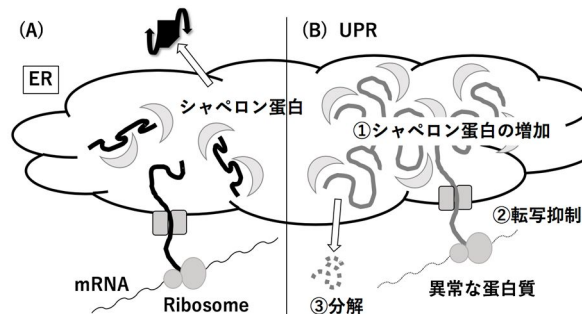


図 1: シャペロン蛋白の役割

もし細胞が、外界からのストレスやウイルス感染、遺伝子変異に伴って異常な蛋白質を産生した場合、シャペロン蛋白の産生増加、通常の蛋白質の翻訳抑制、ユビキチン-プロテアソーム系による異常蛋白質の分解が生じる (= 小胞体ストレス反応; unfolded protein response, UPR)。UPR は ER への異常蛋白質の集積を軽減し、細胞の生存に必須の機構である (Nature Review Immunology, 2008; 図 1B)。

癌は遺伝子の変異によって生じる遺伝子病であり、癌細胞は変異遺伝子から生じる多量の異常蛋白質を産生する。UPR の処理能力以上に生じる異常蛋白質を産生しながらも癌細胞が生存できる理由として、癌細胞では GRP78 や GRP94 などの ER シャペロン蛋白が過剰に産生されていることが挙げられる。これらのシャペロン蛋白は、異常蛋白質の分解を防ぎ、癌細胞の機能を維持するのを助けている。さらに近年、癌細胞表面の細胞膜上に GRP78 や GRP94 などのシャペロン蛋白が発現することが明らかとなり、これらを標的とした新しい癌治療が考案されている。申請者がこれまでにカニクイザルを用いて行った研究においても、癌遺伝子を導入して作製した癌細胞の細胞表面に GRP94 が発現し、この癌細胞をカニクイザルに移植した場合、血中に GRP94 に対する抗体が産生され、癌細胞の拒絶の一因となっていることを明らかにした (Ishigaki H. et al. Cancer Res 2017/ Nature Review Cancer, 2014)。

元来 ER 内に存在するこれらのシャペロン蛋白が、どのようにして細胞表面に留まっているかは不明である。GRP94 は ER 膜上に留まるためのアンカーモチーフであるアミノ酸配列 KEDL を有し、これらはシャペロン蛋白が ER を離れる時に切り離されることが知られている。従って、細胞表面に留まるためには、別の膜蛋白質と結合することが予想される (Biochimica et Biophysica Acta, 2012)。また近年、ネオセルフという機序が提唱されている。ネオセルフとは、自己免疫疾患において、正常な立体構造を呈しない細胞内ミスフォールド蛋白質が MHC class II 分子とともに細胞表面に輸送され、提示されることで、自己抗原として認識され、自己免疫疾患の原因となるという機構である (Advance in Immunology, 2016)。関節リウマチを含む数多くの自己免疫疾患において、この機序が働いていることが明らかとなっており、癌免疫の領域でも新規の癌抗原の提示方法として注目を集めている。GRP94 の結合するアンカー蛋白は、ミスフォールド蛋白と結合した MHC class II 分子である可能性も考えられる。

2. 研究の目的

癌細胞において GRP94 が細胞膜上に留まるために結合する蛋白質を同定する。また近年提唱されている「ネオセルフ」産生の機序により、GRP94 が MHC 分子と結合し細胞膜に留まっている可能性を検討する。また同定された GRP94 結合蛋白質が、ヒト癌細胞株や癌組織に発現していることも確認する。さらに我々がこれまで行ってきた癌細胞を移植したカニクイザルの血液サンプルを用いて、それらの蛋白質に対する免疫反応を検討し、この蛋白質を標的とした免疫療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

カニクイザル癌細胞株の細胞膜蛋白質を単離し、GRP94 抗体を用いた免疫沈降を行った。さらに GRP94 と共沈する (=結合している) 蛋白質を同定するために LC-MS/MS を行った。

GRP94 の細胞膜上への発現に、ネオセルフの機序が働いているかどうかを確かめるため、invariant HLA-I を含む各種 MHC の発現を Western blot 法にて検討した。また IFN-gamma による発現増強や Brefeldin A などの蛋白輸送阻害剤による発現阻害を行った上で、GRP94 の発現が MHC の発現とパラレルに変化するかを、flow Cytometer を用いて確かめた。

GRP94 の exocytosis を、腫瘍細胞培養液中の GRP94 を、ELISA 法を用いて測定することで確認した。さらに共焦点レーザー顕微鏡と免疫電子顕微鏡を用いて、腫瘍細胞の exocytosis を観察し、exosome と細胞膜上への GRP94 の発現を検討した。GRP94 の共染色 (蛍光免疫染色) を行い、細胞膜における局在を確かめた。また exosome maker である CD63 と GRP94 の共染色 (蛍光免疫染色) を行い、細胞膜における局在を確かめた。また exocytosis のマーカーである CD107a と CD91、GRP78 の細胞膜上のレセプターとして報告されている CD109 の発現も flow cytometer を用いて検討した。

腫瘍細胞膜上のパターン認識受容体である RAGE と GRP94 が結合している可能性を考え、GRP94 抗体を用いた免疫沈降タンパク質を用いて、RAGE 抗体にて western blot を行った。また GRP94 を含む培養液にて腫瘍の培養を行い、培養液中での IL-6 の濃度を、ELISA 法を用いて検討した。

4. 研究成果

癌細胞の膜上に存在する GRP94 が結合している膜蛋白を同定するために、カニクイザル癌細胞株の細胞膜蛋白質を単離し、GRP94 抗体を用いた免疫沈降を行った。免疫沈降された蛋白質を LC-MS/MS を用いて分析したところ、HSP75 などを含むその他のシャペロン蛋白と Cytokeratin 2 (CK2) が共沈した。そこで、CK2 の細胞表面での発現を、フローサイトメーターを用いて確かめたところ、細胞表面には発現していなかった。

また GRP94 の細胞膜上への発現に、ネオセルフの機序が働いているかどうかを確かめるため、MHC の細胞膜上での発現を IFN-gamma による発現増強や Brefeldin A などの蛋白輸送阻害剤による発現阻害を

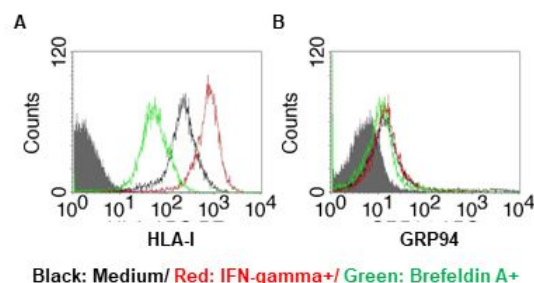


図2 : HLA-I の発現と GRP94 の発現

腫瘍細胞の HLA-I の発現を IFN-gamma と Brefeldin A を添加し増減させ、GRP94 の発現の増減をフローサイトメーターで比較した。(A)HLA-I、(B)GRP94。HLA-I と GRP94 の発現はパラレルには動かない。

行い、同時に GRP94 の発現が MHC の発現と平行に変化するかを確かめたところ、IFN-gamma や Brefeldin A の処理に伴う MHC の発現の変化と GRP94 の変化は平行ではなかった(図2)。また細胞膜上に、invariant HLA-I や HLA-DR の発現そのものも見られなかった(図3)。ネオセルフ機序を用いた GRP94 の細胞膜への発現は否定的であった。

LC-MS/MS の結果は、共沈蛋白のほとんどがヒートショック蛋白であった。アンカー蛋白が同定できないこと、ネオセルフの機序ではないことを踏まえ、GRP94 はアンカー蛋白により細胞表面に表出するのではなく、小胞体が細胞外へ蛋白を輸送する際に、分泌小胞の膜と細胞膜が融合することにより、細胞表面に表出するのではないかという仮説を立てた。

まず腫瘍細胞の培養液中に GRP94 が放出されているかを、ELISA 法を用いて調べたところ、GRP94 は培養液中に放出されていた(図4)。共焦点レーザー顕微鏡と電子顕微鏡を用いて、腫瘍細胞の分泌小胞を観察し、細胞膜上への GRP94 の発現を確かめた。正常線維芽細胞とカニクイザル癌細胞株を用いて、抗 GRP94 抗体を用いた免疫電子顕微鏡を行なったが、電子顕微鏡用試料では抗 GRP94 抗体は結合せず、GRP94 の局在を確かめることが出来なかった。また蛍光免疫染色により、exocytosis マーカーの CD63 と calnexin が腫瘍に発現していることを確認できたが、GRP94 との共存は証明できなかった。また exocytosis のマーカーである CD107a の細胞表面での発現は、flow cytometer を用いて証明できたが、GRP94 との共存は確認できなかった。さらに、GRP78 のレセプターとして CD109 が報告されている(Proc Natl Acad Sci U S A. 2018)が、我々の用いた細胞においては CD109 の細胞膜での発現は確認できなかった。

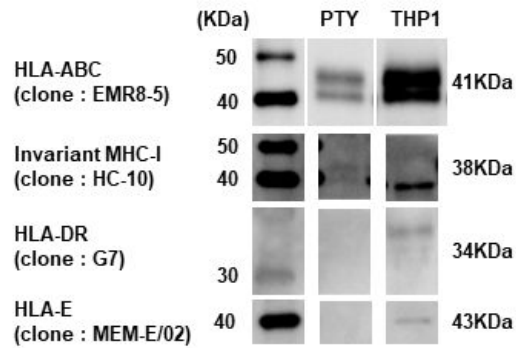


図3 : iPS 由来腫瘍細胞(PTY)とヒト単核球細胞株(THP1)の膜蛋白を用いた Western blot
PTY は GRP94 を細胞膜に発現するが、HLA-DR と invariant MHC-I は細胞膜には発現していない。

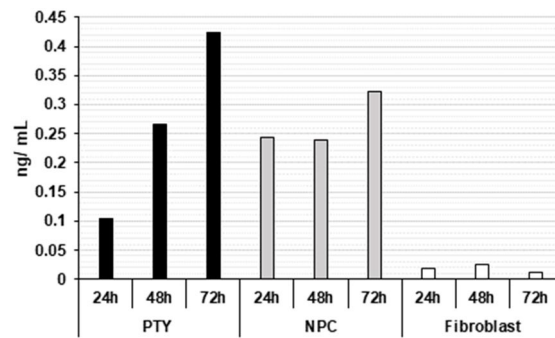


図4 : GRP94 を細胞膜に発現する iPS 由来腫瘍細胞(PTY/NPC)と GRP94 を細胞膜上に発現しない正常線維芽細胞(Fibroblast)の培養上清を用いた GRP94 の ELISA
GRP94 を細胞膜に発現する iPS 由来腫瘍細胞は培養上清中に GRP94 を放出している。

最後に、細胞外へ放出された GRP94 が、再度、細胞膜上の GRP94 受容体に結合し、細胞表面に発現しているのではないかと仮説を立てた。そこで GRP94 の受容体として可能性のある、Receptor for AGEs (RAGE) の腫瘍細胞表面での発現を Flow cytometer により確認したところ、発現が確認できた(図 5 A)。また GRP94 抗体によって免疫沈降したタンパク質を用いて、RAGE 抗体にて western blot を行ったところ、RAGE が共沈していることが確認できた(図 5 B)。

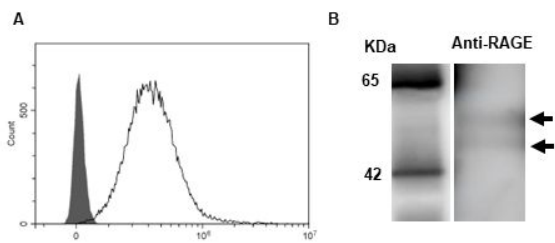


図 5 : iPS 由来腫瘍細胞 (PTY) 上の RAGE の発現 (A) Flow cytometer を用いた PTY 上の RAGE の発現 (B) 抗 GRP94 抗体により免疫沈降した PTY 膜蛋白を抗 RAGE 抗体で western blot した。GRP94 は細胞膜上で RAGE に結合している。

RAGE は終末糖化産物 (Advanced glycation end-products, AGEs) や HMGB1、S100 の受容体であり、TNF-alpha や IL-1、IL-6 などのサイトカインの発現を誘導することが報告されている (*Annu Rev Immunol. 2010*)。そこで腫瘍細胞上清中の IL-6 を ELISA 法にて測定したところ、fresh medium で 78 時間培養した場合は IL-6 の発現は見られないにも関わらず、リコンビナント GRP94 蛋白を加えた medium で培養した場合は、IL-6 の発現が確認できた(図 6)。IL-6 は樹状細胞の成熟障害や、癌環境下での免疫疲労に關与しており、腫瘍の分泌した GRP94 が autocrine に働くことで IL-6 を産生し、癌環境下での免疫疲労を誘導している可能性が示された(図 7)。

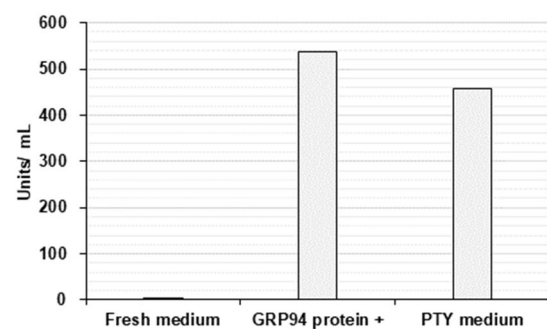


図 6 : iPS 由来腫瘍細胞 (PTY) の培養上清を用いた IL-6 の ELISA

PTY を。(1) GRP94 蛋白を添加していない培養液、(2) リコンビナント GRP94 蛋白を添加した培養液、(3) GRP94 を含むと考えられる PTY 細胞培養液で、72 時間培養した。GRP94 を含む培養液で培養した場合のみ、PTY から IL-6 の産生が認められた。

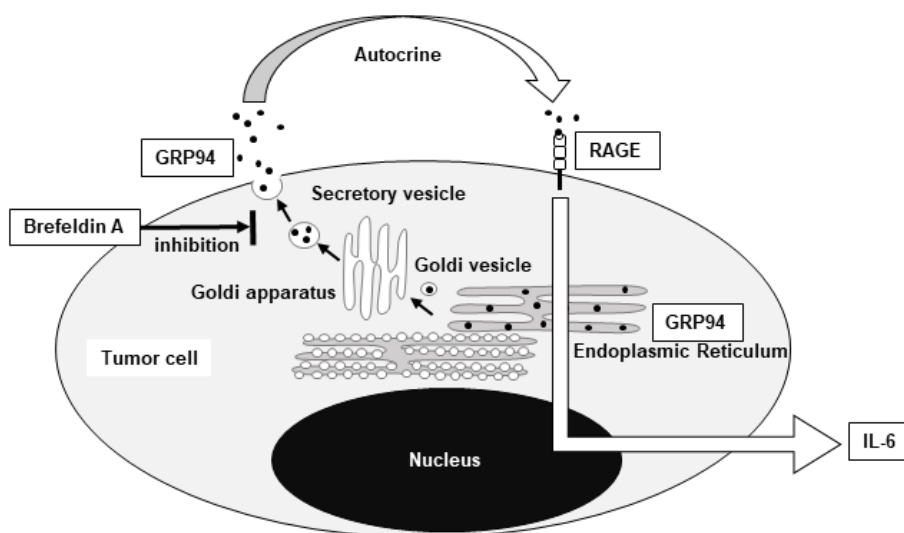


図 7 : GRP94 は分泌小胞から細胞外へ分泌され、細胞膜上の RAGE と Autocrine に結合し、IL-6 の産生を誘導する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ishigaki H, Pham VL, Terai J, Sasamura T, Nguyen CT, Ishida H, Okahara J, Kaneko S, Shiina T, Nakayama M, Itoh Y, Ogasawara K.	4. 巻 Jan-Dec;30
2. 論文標題 No Tumorigenicity of Allogeneic Induced Pluripotent Stem Cells in Major Histocompatibility Complex-matched Cynomolgus Macaques.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Transplantation	6. 最初と最後の頁 9.6369E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0963689721992066	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石垣宏仁、寺井淳、仲山美沙子、伊藤靖、小笠原一誠
2. 発表標題 カニクイザルを用いた組織適合抗原複合体一致他家iPS細胞移植においてteratomaは形成されない。
3. 学会等名 109回 日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

滋賀医科大学 病理学講座 疾患制御病態学部門 ホームページ http://www.shiga-med.ac.jp/~hqpatho2/
--

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	伊藤 靖 (Itoh Yasushi) (90324566)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	

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