

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07638

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍とマイクログリアが織りなす微小環境におけるP5の機能的役割に関する研究

研究課題名(英文) Study on functional roles of P5 in cancer microenvironment based on the interaction of glioblastoma with microglia cells

研究代表者

堀部 智久 (Horibe, Tomohisa)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：20467468

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)：本研究では、悪性脳腫瘍、グリオブラストーマとマイクログリア細胞との相互作用に基づいたがん微小環境におけるプロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)P5のマイクログリア細胞内での機能解析を行った。その結果、マイクログリア細胞内においてP5の発現制御は悪性脳腫瘍細胞からの細胞外ベシクル(EVs)の刺激によるサイトカインIL-6の産生に影響を与えることが確認され、P5が、がん微小環境下でのマイクログリア細胞内において重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞内で新しく作られたタンパク質の構造形成に関わる酵素の一つと考えられているが未だ詳細な機能に関して不明な点が多いP5について、悪性脳腫瘍と脳内の免疫担当細胞であるマイクログリアとの相互作用に基づいたがん微小環境における機能解析を行った。この微小環境下において悪性脳腫瘍細胞からさまざまな影響を受けることが知られているマイクログリア細胞内でP5は、炎症性サイトカインIL-6の産生に重要な役割を担うと予想される研究結果を得た。本研究により、今後悪性脳腫瘍における新たな標的分子や治療薬開発のための微小環境を標的にしたさらなる研究が進むと予想される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we performed the functional analysis of protein disulfide isomerase (PDI) P5 in microglia cells in the cancer environment based on the interaction of glioblastoma with microglia cells. It was found that the knockdown of P5 expression in microglia cells by siRNA affected the production of cytokine IL-6 by stimulation using extracellular vesicles (EVs) purified from glioblastoma cells. It is suggested that P5 has a significant role in microglia cells in the cancer microenvironment, and might be attractive new target for the treatment against malignant brain tumor.

研究分野：生化学

キーワード：癌 分子シャペロン 発光イメージング

1. 研究開始当初の背景

難治性がんの一つである神経膠腫(グリオマ)は、脳腫瘍の中で最も高頻度の悪性腫瘍であり、全原発性脳腫瘍の約25%を占める。このうち約半数は高悪性度であり、最も悪性な膠芽腫(グリオブラストーマ、GBM)においては、手術・放射線照射・標準治療薬であるテモゾロミドによる化学療法を併用した集学的治療によっても、5年生存率は10%未満と依然としてきわめて予後不良であり、その発症までのメカニズム、腫瘍部位の周辺環境(がん微小環境)に関する研究、新たな治療薬のための分子標的候補の探索および新規治療法の開発が急務となっている()。マイクログリアは、中枢神経系グリア細胞の一つで、中枢の免疫担当細胞として知られている。近年、GBMの微小環境におけるマイクログリアの機能が注目されており、GBMからのエクソソームを含む細胞外小胞(EVs)により刺激を受け、マイクログリアからインターロイキン6(IL-6)を含むサイトカインの産生量が増えることが報告されている。しかしながら、GBMのがん微小環境におけるマイクログリアの機能に関しては、未だ不明な点が多い。

一方、分泌タンパク質や膜タンパク質は、細胞質において転写、翻訳後、小胞体内において、正しい構造形成されたタンパク質のみ、ゴルジ体へと移行して分泌、細胞膜へと移行する。小胞体内腔には、正しい構造形成を手助けする様々な分子シャペロンが存在することが知られている。P5は、プロテインディスルフィドイソメラーゼ(PDI)関連タンパク質の一つであり、PDIと同様に細胞内の新生タンパク質の正しい折りたたみに重要なジスルフィド結合(S-S結合)の形成、還元、異性化を触媒するイソメラーゼ活性および、構造形成を助けるシャペロン活性を有する多機能タンパク質であると考えられている。近年、このP5の機能に関しては、(i)P5は、免疫細胞ががん細胞を認識し、細胞障害活性を発揮する際に重要なMHC class I chain-related gene A (MICA)と癌細胞表面で結合し、可溶性MICAの分泌に重要な働きをすること() (ii)P5は、ミトコンドリア内にも局在し、ミトコンドリアに安定的にP5を発現させた細胞は、過酸化水素あるいはロテノンで誘導される細胞死に耐性になること()など、いくつかの興味深い研究結果が報告されている。このため、P5のがん細胞内における機能的役割の解明および、その人為的な制御は、新たな抗癌療法の標的としての可能性が期待されるが、P5の細胞内における詳細な機能的役割に関しても、未だ不明な点が多い。これまでに我々は、がん細胞においてP5のノックダウンがGBM細胞株の増殖、分裂に重要な影響を与えるが正常脳細胞株には影響しないなど、GBM細胞内において新たな分子標的候補としての有用性をいくつか見出してきている。

2. 研究の目的

本研究では、上記背景および、これまでの研究経過を元に、近年その機能的役割に関して注目されているマイクログリア細胞において、GBMとマイクログリアとの相互作用に基づく、がん微小環境におけるPDI関連タンパク質の一つであるPDI P5 (P5)の機能的解明を行い、GBM微小環境においてP5を標的とすることの有用性さらには、新たな抗がん標的療法につながる可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) siRNAによるノックダウン

ヒトマイクログリア細胞株(HMC3)および、マウスマイクログリア細胞株(SIM-A9)にsiRNAを一過性でトランスフェクションを行い、P5の一過性でのノックダウンを行った。siRNAのトランスフェクションによるノックダウン後、細胞抽出液を調整し、SDS-PAGEおよびメンブレンへの転写後、抗P5抗体を用いたウェスタンブロットティングを行い、P5がノックダウンされていることを確認した。

(2) ELISA

各種細胞を処理後、培養液中に産生されたサイトカインは、目的の抗体を用いたELISAにより検出を行った。

(3) RT-PCR

各種細胞を処理後、細胞抽出液からtotal RNAsを精製し、逆転写酵素によりcDNAsを合成して、目的のプライマーを用いて、PCRを行った。PCR後、ゲルレッド含有アガロース電気泳動により目的のバンドを確認した。

(4) 安定発現細胞株の樹立

ホタルルシフェラーゼ(fLuc)、ナノルックルシフェラーゼ(NanoLuc)を含む各種レポーターベクターを構築後、目的の細胞株にリポフェクタミンを用いて一過性でトランスフェクションを

行い、選択薬剤（ハイグロマイシン）存在下で培養することで、目的ベクターを有する細胞を選択して、安定発現細胞株を樹立した。

(5) 細胞生存率の評価

96 ウェルプレートに目的の細胞を播種した後、目的の時間ごとに生細胞の測定を各ウェルに生細胞測定試薬を添加し、生細胞数依存的な発色をプレートリーダーにより、吸光度 450nm で測定することで評価した。

(6) ゼブラフィッシュ幼魚を用いた異種移植モデルによる評価

ゼブラフィッシュ RIKEN WT の幼魚(48hrpf)のYolk Sacに目的の細胞をマイクロインジェクションにより移植した後、LV200 system を用いて、発光イメージングを行い、目的の細胞が移植されたことを確認した。移植が確認された個体に対して、移植後、ホモジナイズを行い、可溶性画分を調整して、ルミノメーターにより生物発光の測定を行った。

4. 研究成果

(1) マイクログリア細胞からのサイトカイン産生における P5 の影響

GBM 細胞株の培養上清から精製された EVs を HMC3 細胞に添加することでサイトカイン IL-6 の産生が増加することを ELISA で確認した後、siRNA による HMC3 細胞における P5 のノックダウンを行い、IL-6 の産生量増加への影響を調べた。その結果、EVs 添加あり、なしどちらの状況下においても P5 のノックダウンにより IL-6 の産生量に影響を与えることが確認された(図 1)。また、EVs 添加によるマイクログリア細胞内における P5 の発現への影響は見受けられなかった(図 1)。

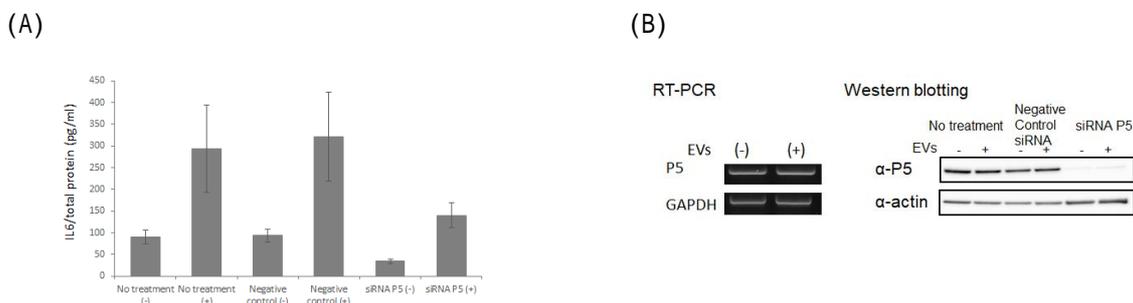


図 1 siRNA による P5 ノックダウン後の EVs 刺激による IL-6 産生(A)および P5 の発現への影響。(A) ノックダウン後 EVs 添加後の HMC3 細胞から分泌される IL-6 を ELISA により測定した。(B) EVs 添加後の HMC3 細胞内の P5 の発現を RT-PCR およびノックダウン後の EVs 添加による P5 発現への影響をウェスタンブロッティングにより確認した。

(2) P5 のマイクログリア細胞の増殖に及ぼす影響

siRNA による P5 のノックダウン後、GBM 細胞からの EVs 存在、非存在下における HMC3 の細胞増殖を調べた結果、いずれにおいても顕著な影響は、見受けられなかった(図 2)。

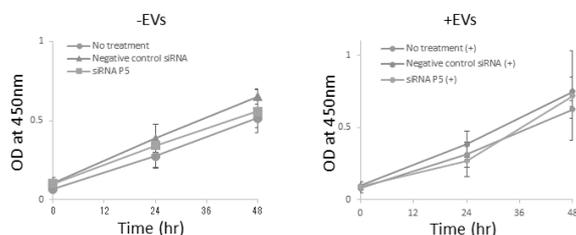


図 2 siRNA による P5 ノックダウン後の EVs 存在、非存在下における HMC3 の細胞増殖。

(3) IL-6 レポーターアッセイ用ベクターの構築

生物発光を用いた検出を行うために、IL-6 プロモーター領域をホタルルシフェラーゼ(fLuc)と組み合わせたレポーターベクターを構築し、マイクログリア細胞に一過性でトランスフェクション後、LPS および EVs 刺激により誘導されることを確認した。また、構築されたレポーターベクターを SIM-A9 に一過性でトランスフェクション後、安定発現細胞株(SIM/IL6p-fLuc)を樹立した。樹立された安定発現細胞株に対して、siRNA による P5 のノックダウンを行い、IL-6 プロモーター活性への影響を確認したところ、顕著な影響は確認されなかった。

(4) 分泌型 IL-6 の生物発光による検出のためのレポーターベクターの構築

生物発光を用いた分泌型 IL-6 の検出を行うために、NanoLuc 融合用ベクター (pNLF1C) の CMV プロモーターを切り出し後、(3) で構築したレポーターアッセイ用ベクターの IL-6 プロモーター領域の下流に IL-6 および、NanoLuc を融合した発現ベクターを構築した。構築された発現ベクターを HMC3 細胞に一過性でトランスフェクションを行った後、培養上清中の IL-6 を ELISA を用いて検出すると共に luminometer によるレポーターアッセイを行い、分泌された IL-6 が NanoLuc 融合タンパク質であることを確認した(図 3)。

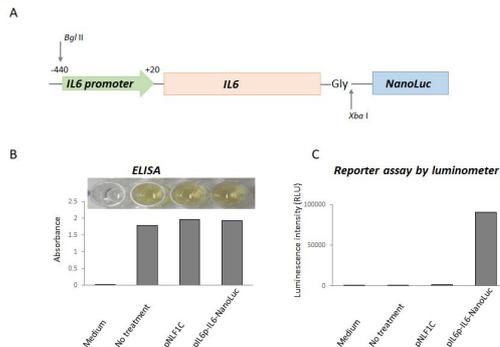


図 3 分泌型 IL-6 検出用レポーターベクターの概略図(A)およびマイクログリア細胞を用いた一過性でのトランスフェクション後の培養上清液中の ELISA による検出およびルミノメーターによる発光の検出(B)。

(5) 生物発光を用いた P5 ノックダウン後の IL-6 産生への影響に対する確認

(4) で構築された発現ベクターを HMC3 細胞に一過性でトランスフェクションを行い、LPS および GBM 細胞株の培養上清からの EVs の添加による IL-6 産生への影響を調べた。その結果、LPS および EVs 添加により上昇した IL-6 の産生量は、P5 のノックダウンにより影響を受けることが確認された(図 4)。

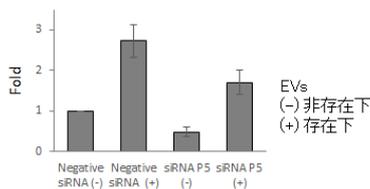


図 4 分泌型 IL-6 検出用レポーターベクターの一過性でのトランスフェクション後の EVs 存在、非存在下におけるレポーターアッセイ

また、SIM-A9 細胞に(4)で構築された発現ベクターを一過性でトランスフェクション後、安定発現細胞株 (SIM/IL6p-IL6-NanoLuc) を樹立した。この安定発現細胞株に対して siRNA により P5 をノックダウン後、マウス悪性脳腫瘍細胞株 GL261 と共培養を行った結果、発光強度の減少が見受けられた(図 5)。

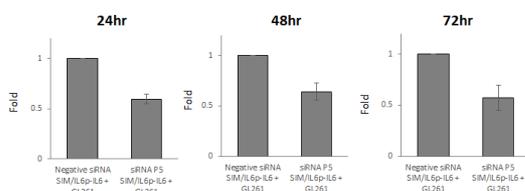


図 5 P5 ノックダウン後の安定発現細胞株 SIM/IL6p-IL6-NanoLuc と GL261 との共培養下における IL-6 産生への影響。

(6) ゼブラ異種移植モデルによる P5 ノックダウン後の IL-6 産生への影響

SIM/IL6p-IL6-NanoLuc 安定発現細胞株を用いて siRNA により P5 ノックダウン後、GL261 細胞と共にゼブラフィッシュ仔魚にマイクロインジェクションを行った。インジェクション 24hr 後ホモジナイズを行い、ルミノメーターにより可溶性画分の全発光量を検出することで、P5 ノックダウン後の影響を確認した。その結果、個体間での発光のパラツキはあるが、P5 ノックダウンにより発光量の減少傾向が見受けられた(図 6)。

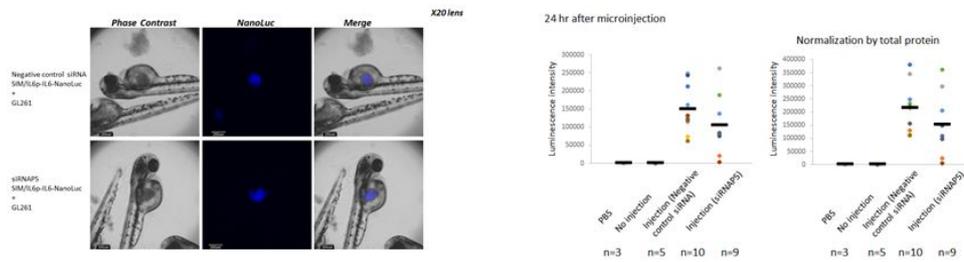


図 6 ゼブラ異種移植後の発光イメージングによる確認(左図)およびホモジナイズ後のルミノメーターによるレポーターアッセイ(右図)

<引用文献>

- 永根基雄 日本臨牀, 63, 460-471, 2005
- Kaiser, et al. Nature 447, 482-486, 2007
- Shitara, et al. J Biochem 152, 73-85, 2012

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 2件）

1. 著者名 Murakami, Y., Futamata, R., Horibe, T., Ueda, K., and Kinoshita, M.	4. 巻 62
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 nickase-mediated efficient and seamless knock-in of lethal genes in the medaka fish <i>Oryzias latipes</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Dev Growth Differ	6. 最初と最後の頁 554-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12700.	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 Kohno, M., Musashi, K., Ikeda, O., H., Horibe, T., Matsumoto, A., and Kawakami, K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Oral administration of ferulic acid or ethyl ferulate attenuates retinal damage in sodium iodate-induced retinal degeneration mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65673-y.	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 Horibe, T. and Kawakami, K.
2. 発表標題 Functional analysis of novel interleukin-13 receptor 2-targeted hybrid peptide for potent glioblastoma therapy
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------	---------