

がんにおける型破り分泌の機序解明と制御研究

ーがんと型破り分泌の関係解明ー

1. 研究の目的

- (1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築
 - ①HiBiTシステムの構築
 - ②最適時間の制定
- (2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定
 - ①オートファジー因子の関与
 - ②阻害剤を用いた検討
- (3) PKC δ の型破り分泌様式の予測
 - ①超遠心法によるプロテクションアッセイ

2. 研究の計画

- (1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築
 - ①HiBiTシステムの構築：promegaのHiBiT配列をPKC δ のC末端側に配置した融合タンパク質を発現するプラスミドを作製した。発現系はTet-on HepG2細胞を用いて、安定細胞株を作製した。クライテリアは、ドキシサイクリンで誘導され、かつ分泌抑制が過去に見つけたPMA処理により分泌が抑制させる株をスクリーニングした。
 - ②最適時間の制定：ドキシサイクリン誘導後の分泌動態の評価をHiBiTアッセイにより検討した。
- (2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定
 - ①オートファジー因子の関与：オートファジー因子に関するsiRNAを購入し、PKC δ の分泌量をHiBiT評価系で確認作業を行った。
 - ②阻害剤を用いた検討：PKC δ の分泌はオートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) やバフィロマイシンA1 (BafA1)で処理した。
- (3) PKC δ の型破り分泌様式の予測
 - ①超遠心法によるプロテクションアッセイ：3Kでの遠心操作で死細胞等を取り除いた後、100Kで超遠心したペレット成分を得た。その後、プロテアーゼKで30分処理し、再度100Kで遠心し、immunoblot解析を行った。その結果、PKC δ の貯留を確認した。このPKC δ の貯留はPMA処理した細胞からは得られなかった。このことから、PKC δ の型破り分泌は膜輸送系が関与していることが示唆された。

3. 研究の成果

- (1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築
 - ①HiBiTシステムの構築：promegaのHiBiTシステムを利用した細胞外PKC δ 測定系の構築を行った。Tet-on誘導用のHepG2細胞を用いて、安定細胞株を作製した。クライテリアは、ドキシサイクリンで誘導され、かつPMA処理により分泌が抑制させる株をスクリーニングした。
 - ②最適時間の制定：ドキシサイクリン誘導後の分泌動態の評価を行った。結果として、6時間から24時間で十分評価可能であることを確認した。
- (2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定
 - ①オートファジー因子の関与：過去にIL-1 β の型破り分泌にオートファジー因子が使用されているという報告があったので、確認実験につきHiBiTシステムを用いて行った。結果として、ATG5をはじめとする因子をノックダウンすることでPKC δ の分泌の有意な抑制が示された。
 - ②阻害剤を用いた検討：PKC δ の分泌はオートファジー阻害剤であるクロロキン (CQ) やバフィロマイシンA1 (BafA1)で処理しても変化なかった。このことから、型破り分泌はオートファジーとは別の機構を利用していることが推察された。
- (3) PKC δ の型破り分泌様式の予測
 - ①超遠心法によるプロテクションアッセイ：3Kでの遠心操作で死細胞等を取り除いた後、

100Kで超遠心したペレット成分を得た。その後、プロテアーゼKで30分処理し、再度100Kで遠心し、immunoblot解析を行った。その結果、PKC δ の貯留を確認した。このPKC δ の貯留はPMA処理した細胞からは得られなかった。このことから、PKC δ の型破り分泌は膜輸送系が関与していることが示唆された。

4. 研究の反省・考察

(1) PKC δ 型破り分泌の定量システムの構築

①HiBiTシステムの構築：immunoblot解析に比べてはるかに定量性・再現性のある簡便なデータ取得が可能となった。本HiBiT実験の結果は、当然immunoblot解析でも再現しているため、過剰発現による影響は余り無いと考えられる。加えて、ドキシサイクリンの濃度を調整することで、発現量を制御できることも分かり、システムとしては汎用性が高いものと考えられる。今後はPKC δ 以外に肝がん細胞で型破り分泌されるタンパク質（importin α 1 やヌクレオリン）についても応用展開し、現象の再現に務めていきたいと考える。また本実験は10%FBS条件下で行えるため、型破り分泌研究で度々問題視される、細胞死（ネクローシス）や物理的刺激などによる細胞膜崩壊による漏出の影響を限りなくなくすことが出来る。

②最適時間の制定：Tet-onの誘導系の動態をモニターできたので、実験の信頼性確保が可能となった。24時間を汎用したが、この理由は、分泌したPKC δ 量が安定的になる時間であることが挙げられる。今回、10%FBS条件下でのアッセイが可能であることから、時間についての配慮は比較的自由であり、24時間は最も適当とも考えられた。逆に、IL-1 β などでよく見られる刺激後2時間という時間では、培地交換の物理的刺激の影響か、分泌量の抗増進傾向がみられた。この点、6時間以上おくことで分泌量が安定することが分かった。今後の実験もなるべく6時間以上後にアッセイすることが望ましいと考えられる。

(2) PKC δ 型破り分泌に必要な因子の同定

①オートファジー因子の関与：オートファジー因子は分解のみならず分泌にも関与していることは過去の報告からも間違いのない事実かも知れない。今回同定したオートファジー因子は一連のオートファジーの初期のphaseで関係する因子である。つまり、オートファジーに関わるオートファゴソーム形成と分泌に関わる小胞とは別の局在や他の因子を利用している可能性が考えられる。今後は、その差別化を図る実験が必要になると推察される。

②阻害剤を用いた検討：本阻害剤はオートファゴソームとリソソームの融合に関する阻害なので、分泌に依存しないデータが出て矛盾がない。オートファジーとの相違を早急に見出す必要があると考えられる。また、今回試験したオートファジー因子は全てPKC δ 分泌に関与していたが、実際は関与しないものもあるかもしれない。この点で、網羅的な解析を行うことで、差別化にバイアスをかけなくても良い可能性がある。今後の検討に生かしたい。さらに重要な課題として、なぜ、型破り分泌にオートファジー因子が関わるのかを今後明確にする必要がある。共通するのは、細胞内成分を定期的に入れ替える役割があるが、型破り分泌に関しては細胞外機能が明らかに明確でありプログラムされている可能性が高く、更なる考察が必要だと考えられる。

(3) PKC δ の型破り分泌様式の予測

①超遠心法によるプロテクションアッセイ：PKC δ が小胞内に存在することが分かったがその移行機構や具体的な小胞分画の同定は今後の課題となる。スクロース等による密度勾配法を用いて、PKC δ 画存在する分画を同定し、マーカーを当てはめていくことで関連するオルガネラを決定する必要がある。この解析は今後、新規オルガネラを特定するプロテオミクス等の手法に応用する際に必須なので、早々に着手する予定である。オルガネラが特定できれば、蛍光染色法や免疫電子顕微鏡観察などの可視的な解析により、確認作業ができる。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Yamada K, Oikawa T, Kizawa R, Motohashi S, Yoshida S, Kumamoto T, Saeki C, Nakagawa C, Shimoyama Y, Aoki K, Tachibana T, Saruta M, Ono M, Yoshida K. Unconventional Secretion of PKC δ Exerts Tumorigenic Function via Stimulation of ERK1/2 Signaling in Liver Cancer. *Cancer Research* 81: 414-425 (2021)

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし