



# がんにおける型破り分泌の機序解明と制御研究

## —がんと型破り分泌の関係解明—

### 1. 研究の目的

- (1) PKC  $\delta$  型破り分泌における E-Syt 依存性
  - ①E-SytとPKC  $\delta$  の相互作用
  - ②PKC  $\delta$  型破り分泌と小胞体との関係
- (2)PKC  $\delta$  型破り分泌と腫瘍形成との関係
  - ①E-Sytと非結合性PKC  $\delta$  変異体の解析
  - ②抗体によるE-SytとPKC  $\delta$  相互作用阻害による効果

### 2. 研究の計画

- (1) PKC  $\delta$  型破り分泌における E-Syt 依存性
  - ①E-SytとPKC  $\delta$  の相互作用:近接標識法であるBioID法を利用して、PKC  $\delta$  とBioIDタンパク質 (BirA) 癒合タンパク質をドキシサイクリン誘導性に発現するプラスミドを作製した。その後、HepG2細胞に安定に発現する細胞株を樹立し、Tet-onシステムを構築した。その後、PKC  $\delta$  と相互作用する膜因子の探索を質量分析により行った。方法は2DICALと呼ばれる手法を用いた。得られた候補タンパク質との結合性は、immunoblot法や共焦点レーザー顕微鏡や3D-SIMなどによる免疫染色法で行った。またCRISPR-Cas9によるノックアウト細胞も樹立して検証作業を行った。
  - ②PKC  $\delta$  型破り分泌と小胞体との関係:今回、E-Sytと呼ばれる小胞体因子が同定されたので(3. 研究の成果を参照)、小胞体での局在をSec61  $\beta$  やERseeingをマーカーに用いて共局在解析した。近接ライゲーションアッセイ (PLA) 染色法のシステムを立ち上げ、共局在の定量を試みた。
- (2)PKC  $\delta$  型破り分泌と腫瘍形成との関係
  - ①E-Sytと非結合性PKC  $\delta$  変異体の解析:PKC  $\delta$  の変異体を用いて、BioID法でE-Sytの局在領域の同定を試みた。非結合性変異体が多量に得られた場合、その局在に関して小胞体局在の有無を蛍光染色法で検討した。また、変異体の分泌も検討した。免疫不全マウスの皮下に移植し腫瘍形成における意義を検討した。
  - ②抗体によるE-SytとPKC  $\delta$  相互作用阻害による効果:市販のPKC  $\delta$  抗体のうち、E-Sytとの相互作用を阻害する抗体を得る。このとき、抗体の細胞内送達は脂質drug delivery system (DDS) 試薬を用いて行った。その場合の細胞増殖能もWST-8を用いて評価する。また、腫瘍形成能を評価するため、3Dスフェロイド形成能を比較解析した。

### 3. 研究の成果

- (1) PKC  $\delta$  型破り分泌における E-Syt 依存性
  - ①E-SytとPKC  $\delta$  の相互作用:2種類の独立した株を用いたプロテオミクス解析により最もPKC  $\delta$  と相互作用するタンパク質としてE-Sytを得た。この相互作用の妥当性を評価するため、BioID後のimmunoblot解析や通常の共焦点レーザー顕微鏡観察、3D SIM解析により検証して、相互作用を確認した。
  - ②PKC  $\delta$  型破り分泌と小胞体との関係:E-Sytのノックアウト細胞を作製し、培養上清のimmunoblot解析を行ったところ、PKC  $\delta$  やその他importin  $\alpha$  1の分泌が抑制されることが分かった。またPLA染色を行ったところ、PKC  $\delta$  と小胞体マーカーであるSec61  $\beta$  との共局在はE-Sytノックアウト細胞で減少した。興味深いことに、PKC  $\delta$  やimportin  $\alpha$  1を細胞外分泌しない細胞 (Yamada et al., Cancer Res, 2021; Yamada et al., Sci Rep, 2016) ではPKC  $\delta$  -Sec61  $\beta$  相互作用はほとんど観察されなかった。
- (2)PKC  $\delta$  型破り分泌と腫瘍形成との関係
  - ①E-Sytと非結合性PKC  $\delta$  変異体の解析:C末端を欠損したPKC  $\delta$  はE-Sytとの相互作用能が減弱することが分かった。またimmunoblot解析から、この変異体は、培養上清中に分泌されないことも突き止めた。さらに、この変異体をマウスの皮下に移植したところ、全長のPKC  $\delta$  を発現する細胞と比べて腫瘍の大きさが明らかに小さいことが分かった。

②抗体による E-Syt と PKC  $\delta$  相互作用阻害による効果：市販の PKC  $\delta$  抗体のうち、C 末端を認識する抗体で E-Syt との結合を抑制するものを見出した。この抗体を脂質 DDS で細胞内に導入したところ、肝がん細胞の細胞増殖能を阻害することを見出した。このとき、PKC  $\delta$  を分泌しない細胞株にはこの DDS-抗体の増殖抑制効果は見られなかった。またこの傾向は 3D スフェロイド形成能についても同様の結果をもたらした。

#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) PKC $\delta$ 型破り分泌における E-Syt 依存性

①E-Syt と PKC  $\delta$  の相互作用：PKC  $\delta$  が E-Syt と相互作用していることを始めて見出した成果である。E-Syt は小胞体-細胞膜接触点（コンタクトサイト）の構成因子であり、PKC  $\delta$  との相互作用に関して、このコンタクトサイトの機能に影響しているのか、E-Syt の多機能性を意味しているのかはまだ不明であり、今後の研究が待たれる。今回、E-Syt 以外に PKC  $\delta$  と相互作用しているタンパク質のなかに小胞体タンパク質が多く見つかっており、PKC  $\delta$  の新たな多機能性が小胞体から行われている可能性が推察される。また、E-Syt との相互作用が PKC  $\delta$  のみならず、他の細胞内タンパク質の型破り分泌に関与していることが示唆されており、今後、E-Syt の作用機序が研究されることになる。

②PKC  $\delta$  型破り分泌と小胞体との関係：PKC  $\delta$  の小胞体及び E-Syt との共局在は型破り分泌に極めて重要な役割を果たしていることが本研究により分かった。特に、この小胞体局在に関しては、他の型破り分泌される細胞内タンパク質（importin  $\alpha 1$  や nucleolin）でも見られることも分かっているので、型破り分泌が小胞体から生じている可能性を示唆させる。現時点で、型破り分泌の起点となるメカニズムとして、シスゴルジに存在する TMED10 トランスポーターによる小胞侵入が知られているが、本研究では TMED10 のロックダウンで PKC  $\delta$  分泌が抑制できなかったことからこの説は否定される。本研究により小胞体での局在の重要性を提案しているので、その分子機構解明を通して、分泌機序の解析を行おうと考えている。

##### (2) PKC $\delta$ 型破り分泌と腫瘍形成との関係

①E-Syt と非結合性 PKC  $\delta$  変異体の解析：本研究成果は、PKC  $\delta$  が型破り分泌するためには C 末端配列が必須であることを強く示唆している。つまり、型破り分泌されるためには E-Syt との相互作用が担保されることが必須となる。この点、他の細胞内タンパク質での検討はまだ行われていないが、共通配列などが見つかれば大変面白いと考えている。現在のタンパク質の局在はシグナル仮説により説明されており、シグナルペプチドを有するものが分泌タンパク質となる。この概念を変えるためには、共通配列の特定と普遍性を証明する必要があるが、今後更なる検討を計画している。また、本研究により PKC  $\delta$  分泌の腫瘍形成における意義の検証も出来た。PKC  $\delta$  は細胞外に放出され、細胞膜上から増殖因子として機能している。

②抗体による E-Syt と PKC  $\delta$  相互作用阻害による効果：E-Syt と PKC  $\delta$  の相互作用について DDS を用いて抗体で阻害する実験の意義が示せた。またこの成果は、細胞外 PKC  $\delta$  の腫瘍形成能への影響も評価できるため、上記の (2)-②同様の結論が導けた。本研究は型破り分泌が腫瘍形成と関係することを様々な視点で解析され、サポートされていることから、その機構を阻害するという創薬理論に基づいた DDS-抗体創薬が今後臨床応用されることが期待される。現在、製薬業界でオルガネラ創薬が注目されていることを考えると、我々の研究は小胞体を標的とした創薬に位置付けられ、予後不良の肝がんに対する医療ニーズに応える解決策になることも期待される。

#### 5. 研究発表

##### (1) 学会誌等

①Kohji Yamada, Kiyotsugu Yoshida. Multiple subcellular localizations and functions of protein kinase C  $\delta$  in liver cancer. *World Journal of Gastroenterology* 14: 188-198 (2022)

##### (2) 口頭発表

なし

##### (3) 出版物

なし