

肝がんの病態解明、早期診断、治療薬開発に期待 肝がん細胞から特異的に異常分泌されるタンパク質「PKC δ」を発見

東京慈恵会医科大学生化学講座の山田幸司助教と吉田清嗣教授の研究グループは、同内科学講座消化器・肝臓内科の及川恒一講師らとの共同研究により、これまで細胞内にのみ存在すると言われていた「プロテインキナーゼ C デルタ (PKC δ)」が、肝がんで特異的に細胞外にも分泌されること等を発見し、肝がんの病態に関わる重要な分泌タンパク質であることを世界で初めて明らかにしました。

肝がんは再発率が極めて高く、がんによる死因では、世界で2番目、日本でも5番目に 多くなっていますが、肝がんの病態メカニズムは未だによくわかっておらず、有効な診 断・治療法が確立されていません。

今回の研究成果は、肝がんの病態解明、血液検査による早期診断、治療薬開発など、肝がんの新しい診断・治療に繋がっていくものと期待されます。

この研究成果は、日本時間 2020 年 12 月 14 日 17 時 05 分に、米国がん学会誌「Cancer Research」のオンライン版に掲載されます。

【研究成果のポイント】

- 1. 細胞の内部に存在するタンパク質(細胞内タンパク質)が細胞外に分泌する「型破り分泌」^{*1}と呼ばれる現象が、肝がんの細胞で起きていることを発見しました。型破り分泌の仕組みを解析することで、肝がんの病態が明らかになっていくと期待されます。
- 2. 肝がんの細胞で特徴的な型破り分泌タンパク質として、リン酸化酵素である「プロテインキナーゼ \mathbb{C} デルタ $(PKC\delta)$ 」を、世界で初めて見出しました。
- 3. 血中 $PKC \delta$ は、健常者や慢性肝炎・肝硬変患者より肝がん患者において高値で検出されることがわかりました。新しいバイオマーカー *2 として利用できる可能性があり、将来、血液検査で肝がんの早期診断ができるようになると期待されます。
- 4. $PKC\delta$ の抗体が肝がん腫瘍に対して抗腫瘍作用を示すことがわかりました。この抗体の効果は、将来、肝がんの治療薬の開発につながるものと期待されます。

【研究メンバー】

東京慈恵会医科大学 生化学講座 助教 山田幸司 (やまだ・こうじ) 東京慈恵会医科大学 生化学講座 教授 吉田清嗣 (よしだ・きよつぐ) 東京慈恵会医科大学 内科学講座消化器・肝臓内科 講師 及川恒一 (おいかわ・つねかず)

【本研究内容についてのお問い合わせ先】

東京慈恵会医科大学 医学部 生化学講座 助教 山田幸司 電話 03-3433-1111 東京慈恵会医科大学 医学部 生化学講座 教授 吉田清嗣 電話 03-3433-1111

報道関係のお問い合わせ先

学校法人 慈恵大学 経営企画部 広報課 電話 03-5400-1280 Mail: koho@jikei.ac.jp

【研究概要】

肝がんは慢性肝炎や肝硬変などを経て発がんする腫瘍性疾患ですが、病態メカニズムは 未だによくわかっていません。

一方、がんの診断・治療においては、分泌タンパク質が研究の対象となるケースは極めて多く、これまで数多くの有用なバイオマーカーや治療法が確立されてきました。

本研究チームは、最近、注目されている、細胞内タンパク質が細胞外に分泌される「型破り分泌」と呼ばれる現象に着目しました。肝がん病態との関係を探るため、肝がん細胞株の細胞外成分^{※3}を回収し、プロテオミクス解析^{※4}を行いました。

その結果、肝がん細胞では、リン酸化酵素 PKC δ を含めた数多くの細胞内タンパク質が高率に型破り分泌されていることを発見しました。肝がん患者の血中の PKC δ を測定したところ、健常者や慢性肝炎・肝硬変患者に比べて、有意に高値となることが確認されました。

また、分泌された $PKC\delta$ が、肝がん細胞の増殖を増進させることも突き止めました。この結果は、型破り分泌が肝がんの病態に深く関わっていることを示唆しており、実際にモノクローナル抗体 *5 で型破り分泌された $PKC\delta$ を阻害したところ、肝がんの腫瘍形成能が著しく抑制されました。

【社会的意義・今後の予定】

細胞内タンパク質の細胞外での検出は以前から知られていましたが、これらは細胞が受ける傷害に起因する漏出であり、細胞から積極的に分泌されているとはみなされていませんでした。

今回の研究で、肝がん細胞が通常想定される数以上のタンパク質を分泌していることが明らかになったことから、型破り分泌を標的とした新しい診断・治療法の開発につながっていくと考えられます。また今後、型破り分泌の仕組みをさらに解析することで、肝がん病態がより明確になっていくと考えられます。

本研究では、血中の $PKC\delta$ が極めて有用な診断マーカーとして応用できる可能性を示しています。現在、日本国内の肝がん検査では、3 種類のマーカー(AFP、PIVKA-II、AFP-L3)が保険適用されていますが、その感度は満足のいくレベルではなく、実際にがんが見逃されて早期発見に至らないケースが存在します。血液検査で簡便に早期発見することができれば根治治療の対象となり、予後改善に繋がります。今後は血中 $PKC\delta$ のバイオマーカーとしての有効性をより多くの症例で検証することで、実用化に向けた開発を進めます。

【研究内容】

本研究チームは、がん細胞株の培養上清(細胞外成分)を用いて、型破り分泌される細胞内タンパク質を網羅的に探索しました。

その結果、従来は細胞質や核などに存在するタンパク質が肝がん細胞株の培養上清から 数多く検出されることがわかりました。

このうち、これまで細胞内での機能のみが知られていたリン酸化酵素 PKC δ が複数の肝がん細胞株の培養上清において高頻度に検出されることを世界で初めて発見しました。この細胞外での PKC δ は、正常の肝細胞や他のがん細胞株の培養上清ではほとんど検出されませんでした。

次に、ヒトの血液試料を用いて血中の PKC δ 値を測定したところ、肝がん患者は健常者や慢性肝炎・肝硬変のような前がん病態にある患者より、有意に高い値を示すことがわかりました(図 1)。

こうした結果から、 $PKC\delta$ の型破り分泌は肝がんで極めて特異性が高いことがわかりました。

さらに、血中 $PKC\delta$ 測定は肝がん鑑別の観点で優位性を示すことがわかりました。現在臨床検査で用いられている肝がんマーカー(AFP と PIVKA-II)ではがん陰性と判定されたものの、画像診断などから肝がんと確定診断を受けた数例の血液試料において、血中 $PKC\delta$ 値を測定したところ、有意に高値を示すことがわかりました。今後、症例数を増やして検証する必要はありますが、血中 $PKC\delta$ が現行で用いられているマーカーよりも肝がんのバイオマーカーとして特異性が高く有用である可能性が示されました。

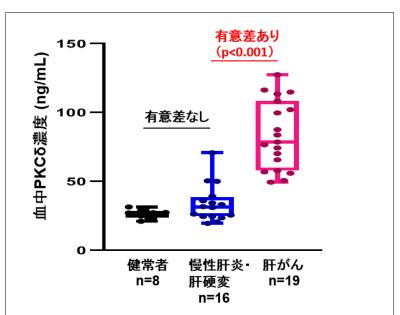
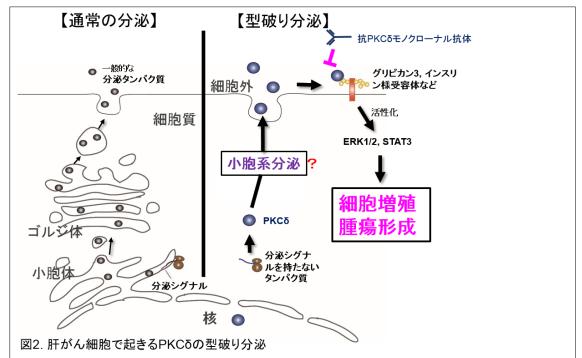


図1. 肝疾患における血中PKCδ濃度の測定 ヒト血清中のPKCδ濃度を酵素免疫吸着測定法 (ELISA)で測定したところ、肝がん患者で有意に高い値を示すことがわかった。一方で、慢性肝炎・肝硬変患者と健常者では有意差は見られなかった。

また、本研究チームは $PKC\delta$ 分泌の特徴付けも行いました。

まず細胞傷害の程度を調べる検査マーカーである乳酸脱水素酵素(LDH)を用いて解析したところ、 $PKC\delta$ の細胞外分泌は生きた細胞に由来しており、LDHの細胞外漏出とは明らかに細胞外に出ていくタイミングが異なっていることがわかりました。

次に $PKC\delta$ の細胞外分泌と肝がん病態との関係を調べるために、細胞外 $PKC\delta$ の機能解析を行いました。その結果、分泌された $PKC\delta$ がグリピカン 3 と呼ばれる肝がん細胞に発現する細胞表面タンパク質と結合し、細胞増殖に関わるシグナル伝達系 *6 を活性化させていることを突き止めました(図 2)。



ー般的な分泌タンパク質は、合成時につくられる分泌シグナルに依存して小胞体内に入ったのち細胞外に分泌される(【通常の分泌】)。一方で、 $PKC\delta$ は分泌シグナルを持たないが細胞外分泌することを見出した(【型破り分泌】)。型破り分泌される $PKC\delta$ は細胞表面のグリピカン3 (GPC3)と結合すると、細胞増殖シグナル(インスリン様受容体(IGF1R)、STAT3、ERK1/2)が活性化され、結果として腫瘍形成能が増大する。この増殖亢進の効果は $PKC\delta$ のモノクローナル抗体で処理すると阻害される。

さらに、 $PKC\delta$ のモノクローナル抗体を用いて、細胞外での $PKC\delta$ 機能を中和したとこ ろ、肝がんの腫瘍形成能が明らかに阻害されることがわかりました(図3)。

これらの結果は、PKC δ 分泌が肝腫瘍の増大に積極的に関わっていることを示唆してい るだけでなく、抗体療法の有望な標的になる可能性が示されました。

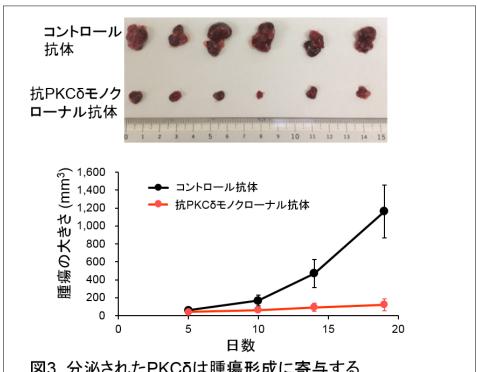


図3. 分泌されたPKCδは腫瘍形成に寄与する

肝がん細胞株をマウスの皮下に移植し、形成した腫瘍内に抗体 を投与した。抗PKCδモノクローナル抗体を投与した群ではコント ロール抗体の投与群と比べて明らかに腫瘍の大きさが小さい。

【本研究への支援】

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構(AMED)橋渡し研究戦略的推進プロ グラム・慶應拠点シーズ A (研究開発代表者: 山田幸司、B326TS)、科学研究費補助金 (課 題番号:16K18434、17H03584、18K19484、18K15253、20H03519、20K07621)、私学 振興事業学術研究振興資金の助成を受けて行われました。

【発表雑誌】

雑誌名 : Cancer Research

論文タイトル: Unconventional secretion of PKC8 exerts tumorigenic function via

stimulation of ERK1/2 signaling in liver cancer

: 山田幸司、及川恒一、木澤隆介、本橋沙耶、吉田彩舟、隈本智卓、佐伯千里、 著者

中川千夏、下山雄也、青木勝彦、立花利公、猿田雅之、尾野雅哉、吉田清嗣

DOI 番号 : 10.1158/0008-5472.CAN-20-2009

【用語解説】

※1 型破り分泌

通常、分泌タンパク質は自身が有するシグナルペプチドに依存して、小胞体やゴルジ体を通って分泌される(この分泌様式は"古典的な分泌経路"などと呼ばれている)。これに対して、シグナルペプチドを有さないタンパク質の細胞外分泌様式が知られており、総称して"型破り分泌"と呼ばれている。

※2 バイオマーカー

生体内に存在するタンパク質や核酸などの物質で、疾患の存在や進行度の指標となるもの。

※3 細胞外成分

細胞は細胞を形取る細胞膜を境にして細胞内と細胞外で分けられるが、細胞外成分とは、培養液や血清などの構成成分のことをいう。

※4 プロテオミクス解析

タンパク質を高感度に分離して同定する技術のことで、試料中のタンパク質全体 に対して系統的・包括的に捉えることができる。

※5 モノクローナル抗体

標的となるタンパク質の特定の部分のみを認識する抗体のこと。

※6 シグナル伝達系

生体が周囲の環境に対応する手段の一つで、細胞外からの情報に対してリン酸化などの翻訳後分子修飾を利用して情報の伝達を行う細胞内伝達システムのこと。

【研究に関すること】

山田 幸司(やまだ こうじ)

東京慈恵会医科大学 医学部 生化学講座 助教

TEL: 03-3433-1111 FAX: 03-3435-1922

E-mail: kyamada@jikei.ac.jp

吉田 清嗣(よしだ きよつぐ)

東京慈恵会医科大学 医学部 生化学講座 教授

TEL: 03-3433-1111 FAX: 03-3435-1922

E-mail: kyoshida@jikei.ac.jp

以上