

UBL3 overexpression enhances EV-mediated Achilles protein secretion in conditioned media of MDA-MB-231 cells

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2024-10-15 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Mst. Afsana, Mimi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/0002000250

論文審査の結果の要旨

がん細胞は細胞外小胞 (EVs) を通してがんの進行を促進する生体分子を輸送することで、腫瘍微小環境におけるコミュニケーションを行う。ユビキチン様タンパク質 UBL3 は EVs へのタンパク質の輸送を促進することが知られているが、EVs を介したタンパク質分泌におけるその役割は未だ十分には解明されていない。そこで今回、ヒト乳がん細胞株で EVs を介した Achilles タンパク質の分泌における UBL3 の役割を調べた。Achilles は、近年開発された早熟蛍光レポーターであり、その高い追従性が期待されるため、今回用いられた。

最初に、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 (MM)にて、Ubiquitin-Akaluc-P2A-Achilles の安定発現株 (MM-Ubi-Aka/Achi) を作成し、条件培地 (CM) 中の Ubiquitin-Akaluc (Ubi-Aka) および Achilles の発現を生物発光および蛍光アッセイで検討した。また、CM 中から抽出した EVs を、ナノ粒子トラッキング解析 (NTA) と透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察にて調べた。さらに、ルシフェラーゼアッセイおよび蛍光イメージングにより、EVs への取り込みおよび分泌の様子を観察した。

また、UBL3 過剰発現株を作成し、蛍光タンパク質 Achilles の EVs への取り込みと分泌への影響を調べた。最後に MM-Ubi-Aka/Achi 細胞の移植マウスモデルを作製し、生体内における両タンパク質の発現を検討した。本研究は、浜松医科大学動物実験委員会の承認 (2020062) を得て行われた。

Ubi-Aka/Achi の安定発現 MM 細胞株が作製され、本細胞中および CM 中において、Ubi-Aka の生物発光と Achilles の蛍光が観察された。CM 中の Ubi-Aka 発現レベルは元の細胞の 1/30 倍、Achilles は 1/4 倍であった。CM から EVs を抽出し NTA と TEM で解析すると、粒子のサイズと形状からは EVs に矛盾しないと判断された。また、CM 中の EVs を別の細胞に取り込ませると高い Ubi-Aka の生物発光が観察され、Achilles と EVs マーカー CD63 は共局在を示したことから、EVs を介した両タンパク質の分泌が示唆された。さらに、UBL3 過剰発現株では、EVs を介した Achilles 分泌の促進が示された。

以上のことから、UBL3 の過剰発現は、MM 細胞の CM において EVs を介した Achilles タンパク質の分泌を促進することが結論づけられた。最後に MM-Ubi-Aka/Achi 細胞の移植マウスモデルで両タンパク質の発現が *in vivo* で示され、本システムが今後のがん研究に有用であることが示唆された。

審査委員会では、本研究により、ヒトがん細胞株における系で UBL3 の過剰発現が CM における EVs を介した Achilles 分泌を促進することが示された点、およびこれが UBL3 研究を促進させる可能性がある点を高く評価した。

以上により、本論文は博士 (医学) の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者

主査 新村 和也

副査 間賀田 泰寛 副査 本藏 直樹