

平成 21 年 6 月 22 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590420

研究課題名（和文）シアリルTn抗原による腫瘍免疫抑制機序の解明

研究課題名（英文）Suppression mechanism for anti-tumor immune response through sialyl Tn antigen

研究代表者 池原 譲 YUZURU IKEHARA

独立行政法人産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：10311440

研究成果の概要：

STn 抗原を発現するヒト胃がんは、腹腔内に播種性に進展しやすく、有為に予後不良となる事が知られている。本研究では、STn 抗原を産生する様に改変した細胞を用い、OVA をモデルがん抗原として検討した。STn 抗原を産生する様に改変した細胞を接種したマウスのリンパ組織では、不活性型 *ST6GalNAc I* 遺伝子を導入した STn 抗原発現の無い細胞を接種したマウスに比べて、免疫抑制をする細胞がより多く誘導され、OVA 抗原に特異的な細胞障害性 T 細胞数も抑制される事を見いだした。また、シアル酸被覆リボソームに OVA を封入して投与するモデル実験でも、同様の結果を得る事ができた。これらの事は、STn 抗原等シアル酸を有為に高発現する細胞は、腫瘍免疫による排除を効率良く回避できるメカニズムの存在を示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2600000	780000	3380000
2008 年度	1000000	300000	1300000
年度			
年度			
年度			
総計	3600000	1080000	4680000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：シアル酸、がん、腹腔内転移、腫瘍免疫

1. 研究開始当初の背景

消化器癌に発現してくるシアリル Tn(STn) 抗原、シアリルルイス a(sLa) 抗原やシアリルルイス x(sLx) 抗原等のシアル酸含有糖鎖は、癌関連糖鎖抗原と呼ばれ、その発現は予後不良と相関することが良く知られている。STn 抗原含有ムチンを検出する腫瘍マーカー CA72.4 は、びまん浸潤性に増生して

腹腔へ転移進展する胃癌で上昇する事が知られており、胃癌の臨床で使用されている腫瘍マーカーである。一方 STn 抗原の発現は、病理検体を用いた免疫組織化学的検討によって、胃癌だけでなく、大腸癌、乳癌などでも患者の予後不良に相関して発現する事が示されている。申請者が STn 抗原合成酵素であるヒト *ST6GalNAc I* をクローニン

グして報告 (Ikehara Y et al *Glycobiology*,9:1213-24, 1999) したのを機に、STn 抗原と癌の生物学的特性に関する研究は、ST6GalNAc I 酵素による STn 抗原合成を出発点として考察される様になった (*Cancer Res*,64(19):7050-57, 2004)。例えば、ST6GalNAc I 酵素によって Integrin β 1 上に発現する様になった STn 抗原が、癌細胞の特性を変えうる事 (*J. Cell Sci.*,117(21):5059-69,2004) や、MUC1 上に癌関連糖鎖として STn 抗原が合成される発現メカニズム (*J. Biol. Chem.*,281(6):3586-94,2006)について研究が行われている。

胃癌患者の予後不良と STn 抗原の出現が相関する事について、申請者は抗腫瘍免疫系の活性化低下に STn 抗原が寄与しているのではないかと考えていた。というのも、京産大の中田らによる最近のシアル化ムチンに関する研究では、マクロファージ(M ϕ)/単核球に発現しているスカベンジャー受容体がシアル化ムチンを認識し、COX2、Th2 サイトカイン IL10 や IL6 産生を齎し (*Clin Cancer Res.*,11(17):6127-32,2005)、その結果として抗腫瘍免疫の減弱と、腫瘍の進展を促進している事が明らかにされていたからである (PNAS 100(5):2736-41,2003)。さらに COX2 阻害剤処理は、腫瘍の進展を抑制するので (*Cancer Res*, 66(12):6175-82, 2006)、スカベンジャー受容体が Th2 skewing をもたらす原因となり、その事が患者の予後不良に関与すると指摘されていた。しかしながら、1)STn 抗原が疑われているものの、免疫抑制に関与するシアル酸が未特定である事、2)この事象にシアル酸受容体が寄与しているか未確定である事など、そのメカニズムは依然として不明であった。

一方で申請者は、腹腔内に進展する胃癌治療を目指して、糖鎖機能を活用した全く異なるタイプのドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術基盤の開発を行っている。既に、リポソームをオリゴマンノースで被覆したオリゴマンノース被覆リポソーム (OML) を用いて、封入した薬剤を M ϕ へ特異的に送達することを可能とした。M ϕ は、リポソーム表面糖鎖の認識により OML をすみやかに取り込み、引き続いて起こる活性化によって、領域リンパ組織へ遊走する。腹腔内へ投与した場合には、この遊走先は節外性リンパ組織乳斑であり、腹腔内に生じる癌転移の足がかりとなっている事が知られている部位となる。抗癌剤を封入して投与した場合には、特異的に抗癌剤を当該領域に集積する事ができる。申請者は胃癌腹腔内転移マウスモデルを用いて、OML の薬剤送達効果を検討し腫瘍の

進展を評価した。このアプローチによって腹腔内転移による腫瘍の進展は十分コントロールでき、胃癌の新しい治療法として有望である事を明らかにしている (Ikehara Y et al., *Cancer Res* 66(17):8740-52,2006)。

2. 研究の目的

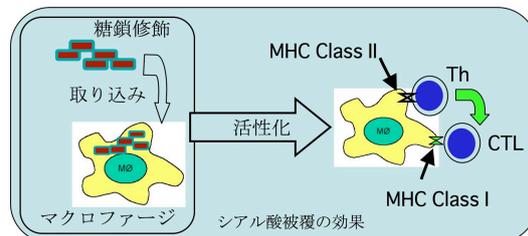
これまでの準備状況を踏まえて、STn 抗原発現腫瘍は生体内で如何にして growth advantage を得ているのか、そのメカニズムを明らかにする事を目的とした。具体的には、STn 抗原を発現するように改変したマウス由来の腫瘍細胞と、糖鎖被覆リポソームによる特異的免疫誘導技術を使用することで、STn 抗原の作用する局面を、A) Induction Phase、B) Effector Phase に分けて解析し、どの種類の細胞が影響を受けているのかを同定するとともに、得られた所見をモデル化して説明する事を試みる。

3. 研究の方法

STn 抗原認識に始まる、「免疫監視機構の破綻」が存在するかどうか明らかにする事、そしてその分子機構の解明をおこなう事を目的とした。それゆえ、モデル細胞株を用いた「糖鎖異常による免疫監視機構の破綻」について検証し、OML ワクチンによる抗腫瘍免疫の誘導が果たして有効かどうか、そして糖鎖被覆リポソームを用いたモデル検討を合わせて行った。

4. 研究成果

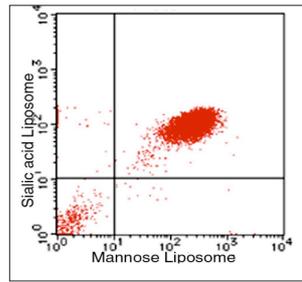
OML の取り込みを起点とする一連の免疫応答は、生体内での抗原の取込みから提示、そして、抗腫瘍免疫の活性化に至るモデルとなる。まずこれに関する一連のプロセスをモデル化し、その背景メカニズムを明らかにした。さらに、シアルラクトース等の種々のシアル酸被覆リポ



ソーム (SCL) も、OML と同じ効率で M ϕ に取り込まれ、T 細胞の活性化に繋がるのかどうかを明らかにするため (図 1)、以下の手順で検討を進めた。

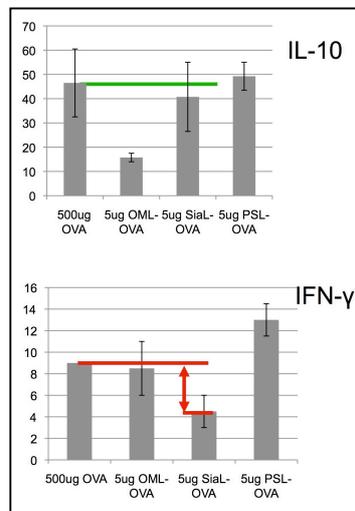
リポソームの腹腔内 M ϕ への取り込み効果については、FITC ラベルした BSA を封入した OML と、ローダミンでラベルした BSA を封入した SCL を作成し、それぞれを混合してマウスの腹腔内へ投与し、取り込み効率を、FACS によって評価した

(図2)。この結果は、OMLに混合して投与されたSCLは、Mφの抗原取込みから免疫活性化の過程において、Mφの反応にシアル酸が存在して介入する状況を作り出すことができると考えられた。すなわち、STn抗原等のシアル酸を細胞表面に発現している癌をMφが認識して処理する際の反応過程を模倣したモデルとなると考えられた。



次にSCLによって誘導される免疫応答を評価した。比較対象として、PSリポソーム(PS-Liposome)とOMLを、生理食塩水の腹腔への投与を無処置コントロールとして検討した。生理食塩水に溶解したOVA、OVA封入OML、OVA封入SCL、OVA封入PS-Liposomeをマウスの腹腔内へ週1回、2度

投与した後、採取した脾臓細胞を回収し、ELISPOT AssayやELISAによってOVA刺激による各種サイトカイン産生細胞数や産生量を定量した。

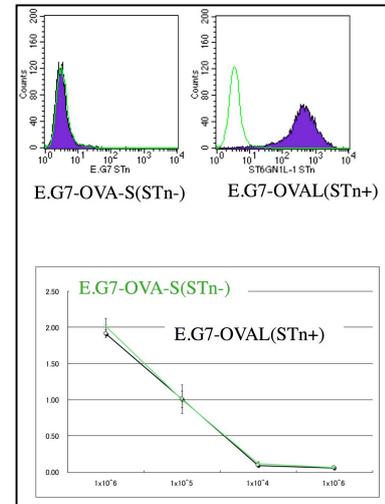


その結果、OMLに比較して、SCL投与マウスでは高いIL-10/IFN γ 産生細胞数比を示し、封入抗原特異的なTh1免疫応答の抑制が観察され、PS-Liposome投与マウスではTreg細胞増加に有利なIL-10及びTGF- β の産生亢進と、封入抗原特異的なTh2免疫応答の促進が観察された(Fig. 3)。

次に、B6マウス由来EL4細胞に卵白アルブミン(OVA)遺伝子を導入したEG.7OVA細胞に、さらにシアル酸転移酵素ST6GalNAc I遺伝子を導入したE. G7-OVA-STn(+)細胞、ST6GalNAc I遺伝子の不活性型ショートフォームであるST6GalNAc I-S遺伝子を導入した

E. G7-OVA- (STn-) 細胞、そしてコントロールとなるE. G7-OVA-mock細胞の作製した。これらの細胞は、表面に発現するMHCクラスI分子量の変化は認めず、OT1マウス由来T細胞と混合培養することで産生されるIFN γ 量にも、有為な差を認めなかった。

しかしながら、STn抗原を産生する様に改変した細胞を接種したB6マウスは、腹膜播種が増強され早期に死亡する。STn(+)細胞を接種したマウスを解析したところ、不活性型



性型ST6GalNAc I遺伝子を導入したSTn(-)細胞を接種したマウスに比べてTr1細胞がより多く誘導されており、ELISPOTアッセイやH-2K^b/OVA257-264テトラマー染色による検討からは、OVA特異的細胞障害性T細胞数の減少が背景に存在する事を見いだした。

これらの事実から、細胞の侵入除去を目的として生じる免疫応答は、シアル酸転移酵素を導入してシアル酸を発現するように改変した細胞を接種した場合には、シアル酸転移酵素を導入していない細胞に比べて抑制されることが明らかとなった。これらの事実から、シアル酸を有意に発現する細胞は免疫による排除エフェクターを効率良く回避できる新知見を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計14件)

- ①. Nishikawa Y, Zhang H, Ikehara Y, Kojima N, Xuan X, Yokoyama N. Immunization of oligomannose-coated liposome-entrapped NcGRA7 protects dams and offspring from Neospora caninum infection in mice. Clin

- Vaccine Immunol. 2009 Apr 8. [Epub ahead of print]
- ②. Takabatake N., Iseki H., Ikehara Y., Kanuka H., Yokoyama N., Sekimizu K., Igarashi I. Isolation and pathogenic characterization of an OB1 variant of *Babesia rodhaini* which has a glycoprotein A independent invasion pathway to murine red blood cells. **Veterinary Parasitology**, 2009 Feb 5;159(2):97-104
 - ③. Ito H, Kuno A, Sawaki H, Sogabe M, Ozaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Shoda JI, Angata T, Sato T, Hirabayashi J, Ikehara Y., Narimatsu H. Strategy for Glycoproteomics: Identification of Glyco-Alteration Using Multiple Glycan Profiling Tool. **J Proteome Res.** 2009 Jan 29 [Epub ahead of print]
 - ④. Ikehara Y.*, Shiuchi N., Kabata-Ikehara S., Nakanishi H., Yokoyama N., Takagi H., Nagata T., Koide Y., Kuzushima K., Takahashi T., Tsujimura K. and Kojima N.: Effective induction of anti-tumor immune responses with Oligomannose-Coated Liposome targeting to intraperitoneal phagocytic cells. **Cancer Letters**, 260(1-2):137-145, 2008.
 - ⑤. Namangala B, Yokoyama N, Ikehara Y., Taguchi O, Tsujimura K, Sugimoto C, Inoue N. Effect of CD4+CD25+ T cell-depletion on acute lethal infection of mice with *Trypanosoma congolense*. **Journal of Veterinary Medical Science**, Aug;70(8):751-9, 2008.
 - ⑥. Kojima N, Biao L, Nakayama T, Ishii M, Ikehara Y., Tsujimura K. Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of in vivo tumor immunity. **J Control Release.** Jul 2;129(1):26-32, 2008
 - ⑦. Narimatsu Y., Ikehara Y., Iwasaki H., Nonomura C., Sato T., Nakanishi H., and Narimatsu H.: Immunocytochemical for intracellular dynamics of C1GalT associated with molecular chaperone, Cosmc. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 366(1):199-205, 2008.
 - ⑧. Okamura M., Yokoyama N., Takabatake N., Okubo K., Ikehara Y., Igarashi I.: Babesia bovis: Subcellular localization of host erythrocyte membrane components during their asexual growth. **Experimental Parasitology**, 116(1):91-94, 2007.
 - ⑨. Kudo T., Fujii T., Ikegami S., Inokuchi K., Takayama Y., Ikehara Y., Nishihara S., Togayachi A., Takahashi S., Tachibana K., Yuasa S., Narimatsu H.: Mice lacking α 1,3-fucosyltransferase IX demonstrate disappearance of Lewis x structure in brain and increased anxiety-like behaviors. **Glycobiology** 17(1):1-9, 2007.
 - ⑩. Okamura M., Yokoyama N., Takabatake N., Okubo K., Ikehara Y., Igarashi I.: Modification of host erythrocyte membranes by trypsin and chymotrypsin treatments and effects on the *in vitro* growth of bovine and equine *babesia* parasites. **Journal of Parasitology** 93(1):208-211, 2007.
 - ⑪. Takabatake N., Okamura M., Yokoyama N., Okubo K., Ikehara Y., Igarashi I.: Involvement of A Host Erythrocyte Sialic Acid Content In Babesia Bovis Infection. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 69(10):999-1004, 2007.
 - ⑫. Togayachi A., Kozono Y, Ishida H., Abe S., Suzuki N., Tsunoda Y., Hagiwara K., Kuno A., Ohkura T., Sato N., Sato T., Hirabayashi J., Ikehara Y., Tachibana K., and Narimatsu H.: Polylactosamine on glycoproteins influences basal levels of lymphocyte and macrophage activation. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 104(40):15829-34.2007.
 - ⑬. Takabatake N., Okamura M., Yokoyama N., Ikehara Y., Akimitsu N., Arimitsu N, Hamamoto H., Sekimizu K., Suzuki H., and Igarashi I.: Glycophorin A knockout mice, which lost sialoglycoproteins from the red blood cell membrane, are resistant to

lethal infection of Babesia rodhaini.
Veterinary Parasitology
148(2):93-101, 2007.

- ⑭. Yamada K, Ikehara Y., Nakanishi H, Kozawa E, Tatematsu M, Sugiura H. Solitary bone metastasis as the first clinical manifestation in a patient with small bowel adenocarcinoma. **J Orthop Sci.** Nov;12(6):606-10 2007.

[学会発表] (計 5 件)

- ①. Ikehara Y., et al. A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using intraperitoneal macrophages as a cellular vehicle American Association of Cancer Research, Annual meeting 2008 (San Diego, USA)
- ②. 池原 譲 New treatment method for intra-abdominal metastasis, using carbohydrate recognition of macrophage. 第7回日本癌学会 学術集会 (名古屋) 2008年10月
- ③. 池原 譲 糖鎖認識を介した感染メカニズムの解明と治療への利用の試み 第97回日本病理学会総会 (金沢) 2008年4月
- ④. Ikehara Y., et al Cancer vaccine delivery system using oligomannose coated liposomes. American Society of Glycobiology 2007 (Boston, USA)
- ⑤. Ikehara Y., et al A novel carbohydrate recognition-based drug delivery system to intraperitoneal metastases. Digestive Disease Week 2007. (Washington D.C, USA)

[図書] (計 2 件)

- ①. 池原 譲 がん転移研究の実験手法 済木 育夫 (編さん) 金芳堂 p318-323, 2008
- ②. 池原 譲、中西速夫、遺伝子医学 MOOK11 号「臨床糖鎖バイオマーカーの開発 - 糖鎖機能の解明とその応用」メディカルドゥ p226-233
- ③. 中西速夫、池原 譲、遺伝子医学 MOOK11 号「臨床糖鎖バイオマーカーの開発 - 糖鎖機能の解明とその応用」メディカルドゥ p278-284

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池原 譲 (IKEHARA YUZURU)

産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：10311440

(2) 研究分担者

辻村 邦夫 (TSUJIMURA KUNIO)

浜松医科大学・感染症学講座・准教授

研究者番号：10227407