

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590454

研究課題名（和文） シアル化糖鎖を介した癌の免疫抑制メカニズムの解明と利用技術の開発

研究課題名（英文） Analysis of immunosuppression mechanism by sialic acids on cancer cells, and a feasible study to control immune reaction using sialylated carbohydrates.

研究代表者 池原 譲（IKEHARA YUZURI）

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（和文）：

がん細胞に出現してくるシアル酸の機能について、がんが腫瘍免疫を回避して進展する際のメカニズムに関係している可能性を検討した。動物モデルと糖鎖被覆リポソームを用いた検討により、シアル酸には腫瘍免疫の抑制・回避の機能があることを明らかにした。さらに、免疫回避のメカニズムを検討できるモデルシステムの作出するため、tsTAgが発現する *LbsL-tsTAg* マウスを用いた不死化細胞の樹立を実施した。

研究成果の概要（英文）：

This study was conducted to increase knowledge about immune evasion by cancer cells, focusing on appearing sialic acids (Sialyl Tn antigen) with development and progression of cancer. Using xenotransplantation and syngenic transplantation animal models, and sialic acid coated liposome, we demonstrated that sialic acids had regulatory function to suppress tumor immunity. Additionally, we established methods to generate a series of immortalized cells that are available to investigate further mechanism of immune evasion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：炎症、糖鎖、がん、免疫制御

1. 研究開始当初の背景

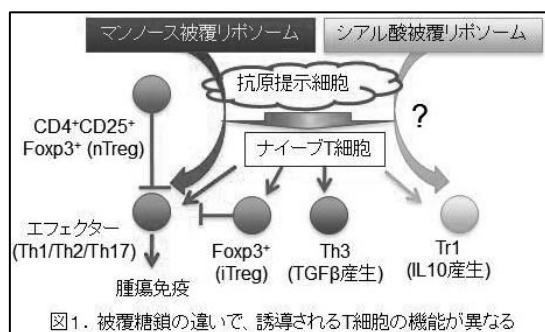
シアルル Tn (STn) 抗原等のシアル酸含有糖鎖は、がん関連糖鎖抗原と呼ばれ、がん患者の予後不良とその発現が相関する。例えば CA72.4 は、STn 抗原含有ムチンを検出する腫

瘍マーカーで、予後不良な「びまん浸潤性に増生して、腹腔内へ転移進展するタイプの胃がん症例」で上昇する事が知られている。がん由来のシアル化ムチンに関する報告を参照すると、マクロファージ(Mφ)/単核球がス

カベンジャー受容体を介してシアル化ムチンを認識し、COX2 や IL10、IL6 を産生する事によって Th2 への Skewing を促すため、抗腫瘍免疫が減弱すると考察されている (PNAS 100(5):2736-41, 2003, Clin Cancer Res., 11(17):6127-32, 2005)。しかも抗腫瘍免疫の減弱効果は、COX2 阻害剤処理による Th2 Skewing の抑制と共にキャンセルされる (Cancer Res, 66(12):6175-82, 2006)。しかしながら最近の免疫研究の進歩で、Th2 細胞と、以前より知られていた IL-10 の高産生が特徴となる抑制性 T 細胞 (Tr1)、そして CD25⁺Foxp3⁺ を特徴とする制御性 T 細胞 (nTreg と iTreg) との異同が議論されるようになった (Cell, 133:775-787)。また、抗腫瘍免疫の抑制に於いても、Tr1 や Treg の出現増加と腫瘍免疫抑制が関与する所見が多く報告されるようになり、悪性黒色腫患者では gp100 や NY-ESO-1 等の腫瘍抗原に特異的な Treg も出現すると報告されている (PNAS, 104: 20884-9, 2007)。これらを鑑みると、腫瘍免疫抑制とシアル化糖鎖の関係について、Th2 skewing の他に Tr1 や Treg の関与についても検討を要するといえる。

申請者は前任地の愛知県がんセンター研究所腫瘍病理学部で、がん関連シアル化糖鎖の病理学的意義に着目し、独自の研究を展開して来た。これまで、シアル酸合成酵素 *ST6GalNac I* 遺伝子 (Ikehara Y., Glycobiology, 9:1213-24, 1999) や *ST6GalNac V* 遺伝子 (Ikehara Y., FEBS Lett. 92-96, 1999) をクローニングして報告している。また、これらリコンビナント酵素を用いてシアル酸結合蛋白の同定を試み、シアル酸受容体であるシグレックファミリーに属する 3 種類の分子を見いだした。うち 2 つは T 細胞、Natural Killer (NK) 細胞やマクロファージ (Mφ) に発現する事が知られていたシグレック 7 と 9 で、これらの分子を T 細胞リンパ腫細胞株 Jurkat に発現させて機能解析を行った。その結果、これらのシアル酸結合蛋白は、T 細胞受容体シグナル伝達強度を減弱する負の制御能を有する事、それにはリガンドシアル酸との結合能が必要である事を報告している (Ikehara Y et al, J Biol Chem 241: 43117-25, 2004)。

2. 研究の目的



研究当初の背景と、上記図 1 に示す免疫メカニズムの想定に基づき、研究期間において以下、1-3)の研究を実施した。1)動物モデルを用いたシアル化糖鎖による免疫制御についての可能性の検討、2)シアル酸を介する免疫応答を各種糖鎖で被覆したリポソームによって再現して、技術シーズとしてその可能性を検討することである。さらに、本研究より得られる成果を臨床へトランスレートするためのモデル系を検討である。それには、3)温度感受性T抗原を組織特異的に発現させられる T26 マウスを使用して不死化細胞の作出を目標とした。

3. 研究の方法

上述 1)については、STn 抗原を発現させたヒト胃癌細胞株 GCIY をヌードマウスの腹腔内に接種するモデルを用いてその可能性を検討した。さらに免疫応答を検索するため、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 細胞について STn 抗原を発現するように改変し、B6 マウスに投与したのちの免疫応答を検討した。

上述 2)については、リポソームの糖鎖被覆技術を用いた検討を実施した。これまでの検討により、OVA を封入したオリゴマンノース被覆リポソーム (OML) をマウスの腹腔に投与すると、取り込んだ Mφ は MHC クラス I 分子とクラス II 分子に OVA 由来ペプチドを提示する。その結果、投与されたマウスの脾臓では、OVA ペプチド特異的に各種のサイトカインを産生する細胞数は変動する。このことは、ELISPOT assay によって確認できるので、オリゴマンノースに加えて、シアル酸被覆リポソームを作成して用い、これを介して誘導される免疫応答を解析した。

上述 3) では、特定のプロモーター支配下に Cre 酵素を発現するドライバーマウスとの掛け合わせで、tsTA が発現する *LbsL-tsTA*g マウスを用いた。このマウスは、ドライバーマウス (図 1 下段) との交配により、Cre が発現している細胞で *LoxP* 配列に挟まれた *βgeo-Stop* 配列が切り出され、tsTA が発現するようになる。tsTA は、p53 と Rb ファミリー分子と結合してその機能を阻害し、senescence を抑制するため、培養系に持ち込んだ際には、不死化された目的の細胞株を得ることができる。タモキシフェン存在下に Cre 酵素が活性化する CAG-CreMer マウス、腸円柱上皮特異的に Cre 酵素を発現する Villin-Cre マウス、そしてすい臓上皮特異的に Cre を発現する Pdx-1-Cre マウスを用いた。

4. 研究成果

(1) シアル化糖鎖による免疫制御についての可能性の検討

STn 抗原合成活性を有する *ST6GalNac*

I-Long form (6L) 遺伝子を導入して STn 抗原を発現させたヒト胃癌細胞株 GCIY をヌードマウスの腹腔内に接種した場合(図 2a, b)は、酵素活性を有しない *ST6GalNAc I-Short form (6S)* 遺伝子を導入した GCIY を接種した場合に比べ、腹膜播種が著しく増強されて早期に死亡することが明らかとなった(図 2c, d)。

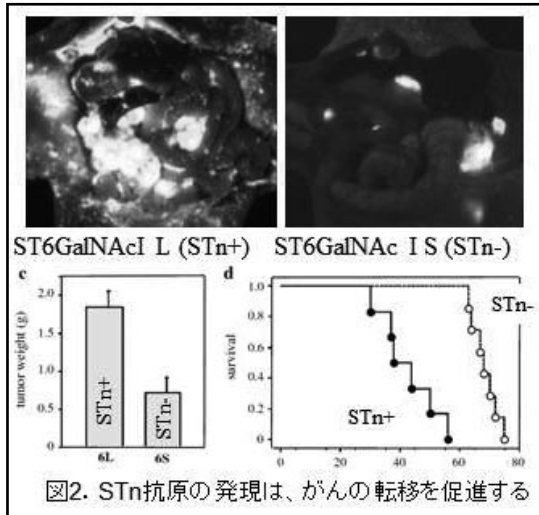


図2. STn抗原の発現は、がんの転移を促進する

in vitro 培養下では、6Lと6Sの増殖スピードに差は認められない。しかし、GFPに由来する蛍光を指標に回収した腫瘍重量は、明らかに6L>6Sであった。これらのことから、

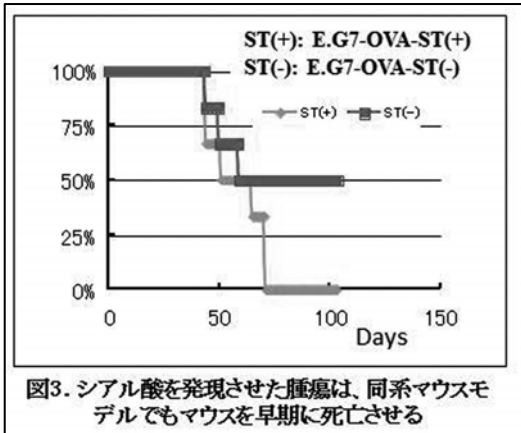


図3. シアル酸を発現させた腫瘍は、同系マウスモデルでもマウスを早期に死亡させる

発現させた STn 抗原には腫瘍免疫を抑制するなどの作用が存在し、その結果、マウスに移植した STn 陽性の腫瘍が著しく進展したと考察された。

そこで STn 抗原の作用を、免疫学的に検討できる動物モデルを作出し、その検討を行うこととした。このため、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、*ST6GalNAc I-L* 遺伝子を導入して STn 抗原を発現する様に改変した細胞を作成した。OVA をモデルがん抗原として使い、これを B6 マウスに接種して免疫応答も検出評価することを可能とするためである。

ST6GalNAc I-L 遺伝子を導入して STn 抗原

を発現するように改変した EG.7OVA を B6 マウスに接種したところ、*ST6GalNAc I-S* 遺伝子を導入した EG.7OVA (STn-) を接種した B6 マウスに比べて、より早期に死亡した(図 3)。OVA に対する腫瘍免疫が作用しているかどうかを検討する目的で、同モデルマウスの脾臓および腹腔内リンパ節を回収して ELISPOT アッセイによって解析した。OVA 抗原に反応する CTL を検出目的で OVA257-264 (H-2K^b) を、OVA に反応性で抗腫瘍免疫を活性化する Th1 細胞を検出する目的で、OVA₃₂₃₋₃₃₉ (H-2A^b) を用いた。その結果、IFN γ を産生する T 細胞数は、不活性型 *ST6GalNAc I-S* 遺伝子を導入した STn(-) 細胞を接種したマウスに比べて、STn 抗原を発現する EG.7OVA を接種したマウスでは有意に少なかったことが明らかとなった(表 1)。

表1. ELISPOTアッセイで同定されるOVApeptide に特異的な CTL (IFN γ 産生)細胞数(脾臓のT細胞20000中)

E.G7-OVA-S(STn-)	E.G7-OVAL(STn+)
243 Spots	176 Spot

このことは、H-2K^b/OVA257-264 テトラマー染色にでも、OVA 特異的細胞障害性 T 細胞数の減少が確認された(図 4)。これら一連の結果から、STn 抗原には、Tr1 細胞の誘導が示唆され、これによって CTL および Th 細胞誘導が抑制されていると考察された。

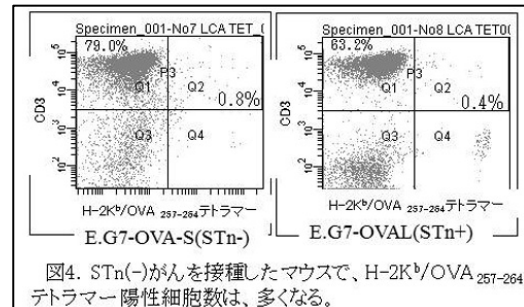


図4. STn(-)がんを接種したマウスで、H-2K^b/OVA₂₅₇₋₂₆₄ テトラマー陽性細胞数は、多くなる。

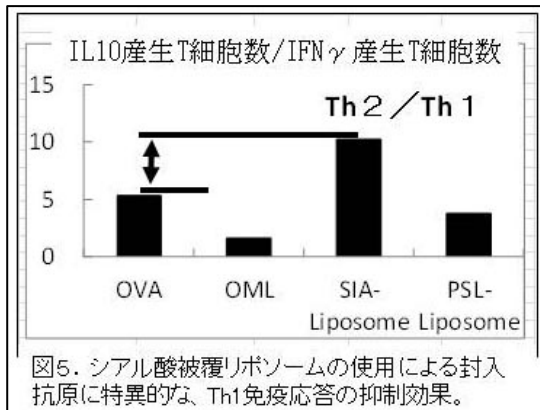
(2) シアル酸を介する免疫応答を、各種糖鎖で被覆したリポソームによって再現して整理し、技術シーズとしてその可能性を検討する。

各種糖鎖で被覆したリポソームをマウスに投与する事によって惹起される T 細胞免疫応答を、LISPOT Assay によって測定し、糖鎖構造の違いによる応答の差を検討した。

オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) に封入した抗原(卵白アルブミン OVA) 5 μ g に反応して「特異的に INF γ を産生する細胞数」は、500 μ g の OVA を直接、腹腔内へ投与した場合に相応するものであった。一方で、5 μ g の OVA をシアル酸 (Sialyl-Lactose) で被覆したリポソーム (SLL) に封入して投与した場合は、500 μ g の OVA を直接、腹腔内へ投与した場合の半分以下であった。

さらに、抗原特異的に IL-10 を産生する T 細胞数を指標として検討すると、SLL に 5 μ g

の OVA を封入した投与実験では、500 μ g の OVA を直接投与する場合と同等の IL-10 産生 T 細胞数の誘導が見られたが、OML 投与はその 25%程度であった。これらの結果は、OML は封入抗原に特異的な IFN γ 産生 T 細胞を効率良く誘導でき、SLL は封入抗原特異的な IL-10 産生 T 細胞を効率良く誘導できる事を示唆する。事実、シアル酸で被覆されたリポソームを用いた場合は、OVA に反応して IL-10、IL-4、TGF β を産生する T 細胞が、有意に誘導された。



次に、シアル酸を介する免疫抑制能を、潰瘍性大腸炎等のアレルギー疾患へ適応できるかどうかについての検討を行った。ここでは、OT2 マウスより回収した CD45RB high T 細胞の SCID マウスへの導入する事で惹起される潰瘍性大腸炎モデル、デキストラン硫酸の飲水投与で生じる潰瘍性大腸炎モデルを進めたが、有意な効果を確認することはできなかった。

(3) 温度感受性 T (tsT) 抗原を組織特異的に発現させられるマウスを使用した不死化細胞の作出。

シアル酸による直接の免疫細胞抑制に、シアル酸結合タンパク Siglec が寄与している可能性が示唆されていることから、STn 抗原を発現する EG7.OVA 細胞が T 細胞に直接作用するところを、in vitro で再現したいと考えた。このため、tsT 抗原を組織特異的に発現させられるマウスを使用し、不死化細胞を系統的に作出する方法の確立を進めた。

T26 マウスと CAG-CreMer マウスを交配し、取り出した T 細胞および中皮細胞をタモキシフェンで処理する事によって、不死化細胞株の樹立を試みたところ、不死化中皮細胞を樹立できた。しかしながら、T 細胞は、各種サイトカインや PHA-L の存在下では増殖を維持されるものの、自律的に増殖する不死化株の樹立にはいたらなかった。

一方、Villin-Cre マウス、Pdx-1-Cre マウスを用いた場合の不死化細胞株の樹立は達成できた。とくに膵管上皮に由来する複数種類の細胞株を樹立することができたので、そ

の解析を進めているところである。

(1)~(3)で行った研究成果についての総括 シアル化糖鎖とがん免疫の接点やその分子機構を解明しようとする研究は主として、「がん由来するシアル化糖鎖が、エフェクター細胞へ直接作用すること」に着目したものである。対して本研究では、シアル化糖鎖の関わる免疫活性の減弱はエフェクター細胞への直接作用だけでなく、「糖鎖による Tr1 細胞の誘導、もしくは Regulatory T 細胞 (Treg) の誘導」による可能性を明らかにするものである。また tsTA γ が発現する *LbsL-tsTA γ* マウスを用いた検討は、細胞の不死化を通じた新たな研究シーズを生み出している。以上より、ここで得られた研究成果は、更なる研究の発展が期待できると考えている。

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 12 件)

- ① Murakami H, Nakanishi H, Tanaka H, Ito S, Misawa K, Ito Y, Ikehara Y, Kondo E, Kodera Y. Establishment and characterization of novel gastric signet-ring cell and non signet-ring cell poorly differentiated adenocarcinoma cell lines with low and high malignant potential. *Gastric Cancer*. 査読有, 2012 Mar 27. [Epub ahead of print], DOI なし
- ② Sivakumar T, Tagawa M, Yoshinari T, Ybañez AP, Igarashi I, Ikehara Y, Hata H, Kondo S, Matsumoto K, Inokuma H, Yokoyama N. PCR Detection of *Babesia ovata* from Cattle Reared in Japan and Clinical Significance of Co-Infection with *Theileria orientalis*. *J Clin Microbiol.*, 査読有, 2012 Mar 21. [Epub ahead of print], DOI なし
- ③ Ozaki H, Matsuzaki H, Ando H, Kaji H, Nakanishi H, Ikehara Y, Narimatsu H. Enhancement of metastatic ability by ectopic expression of ST6GalNAcI on a gastric cancer cell line in a mouse model. *Clin Exp Metastasis.*, 査読有, 29(3), 2012, 229-238, DOI なし
- ④ Akita K, Yoshida S, Ikehara Y, Shirakawa S, Toda M, Inoue M, Kitawaki J, Nakanishi H, Narimatsu H, Nakada H. Different levels of Sialyl-Tn Antigen expressed on MUC16 in Endometriosis and Ovarian Cancer Patients. *Int J Gynecol Cancer.*, 査読有, 2012 Feb 24. [Epub ahead of print], DOI なし
- ⑤ Kashiwazaki H, Taguchi F, Ikehara Y,

- Watanabe R., Characterization of Splenic Cells during the Early Phase of Infection with Neuropathogenic Mouse Hepatitis Virus., *Jpn J Infect Dis.*, 査読有, 64(3), 2011, 256-259, DOI なし
- ⑥ Nakamura M, Tahara Y, Ikehara Y, Murakami T, Tsuchida K, Iijima S, Waga I, Yudasaka M., Single-walled carbon nanohorns as drug carriers: adsorption of prednisolone and anti-inflammatory effects on arthritis., *Nanotechnology*, 査読有, 22(46), 2011, 465102, DOI:10.1088/0957-4484/22/46/465102
- ⑦ SAKAKITA H. and IKEHARA Y. Irradiation experiments on a mouse using a mild-plasma generator for medical applications. *Plasma and Fusion Research* 査読有, 2010 S2117, 1-4, DOI なし
- ⑧ Matsui M., Shimizu Y., Kodera Y., Kondo, K. Ikehara Y., and Nakanishi H. Targeted delivery of oligomannose-coated liposome to the omental micrometastasis by peritoneal macrophages from patients with gastric cancer. *Cancer Sci.* 査読有, 2010, 101(7):1670-7, DOI なし
- ⑨ Ikehara Y., Yamaguchi T., Yamanaka M., Recent advancements in cytotoxic T lymphocyte generation methods using carbohydrate coated liposomes. *J. Biomedicine and Biotechnology*, 査読有, 2010, 242539, pp1-8 doi:10.1155/2010/242539
- ⑩ 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.*, 査読有, 2009, 16(6):792-729, DOI なし
- ⑪ Ishigame T., Takabatake N., Iseki H., Ota N., Koyama A., Igarashi I., Nishikawa Y., Ikehara Y., Kojima N., Yokoyama N., Effect of oligomannose-coated liposome-based vaccine on rodent babesiosis. *J. Protozoology Research*, 査読有, 2009, 19(1), 10-23, DOI なし
- ⑫ 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.* 査読有, 2009, 8(3):1358-67, DOI なし

[学会発表] (計 7 件)

- ① 池原 譲, グライコプロテオミクス研究に必要な実験手技、第 8 回日本病理学会カンファレンス、2011/8/5、ホテルブエナビスタ (長野県)
- ② 池原 譲, 糖鎖分析技術を取り入れた組織細胞化学研究、組織細胞化学会講習会、2011/8/4、三鷹市公会堂 (東京都)
- ③ 池原 譲, グライコプロテオミクスによる肝細胞がんに対する新規糖鎖マーカーの探索、第 100 回日本病理学会総会、2011/4/30、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ 池原 譲, 糖鎖研究の進展に基づく癌の検出と治療戦略、日本組織細胞化学会、2010 年 9 月 6 日、秋葉原コンベンショナルセンター (東京)
- ⑤ Ikehara Y., Cancer vaccine delivery system using oligomannose coated liposomes. World Congress of Vaccine -2010、2010.3.25、北京国際会議場 (Beijin)
- ⑥ 池原 譲, 成松 久: 肝線維化の進展を測定できる新しい糖鎖バイオマーカーの開発とその有用性について、日本分子腫瘍マーカー学、2009/09/30、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑦ Ikehara Y., Niwa T., Ikehara S., Biao L., Ohashi N., Kobayashi T., Shimizu Y., Kojima N., Nakanishi H.: A novel drug delivery system. Carbohydrate recognition-based and controlled release system using intra-peritoneal macrophages as a cellular vehicle., AACR 100th Annual Meeting, 2009. 4.20, Denver, CO (USA).

[図書] (計 2 件)

- ① 池原 譲, 日本組織細胞化学会出版、組織細胞化学 2011、糖鎖分析技術を取り入れた組織細胞化学研究、2011、pp155-166
- ② 池原 譲, 日本組織細胞化学会出版、組織細胞化学 2010、糖鎖・糖タンパク質の生物機能解明と医療応用、2011、pp197-207

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/rcmg/rcmg-ga/ci/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池原 譲 (IKEHARA YUZURU)

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