

機関番号：12601  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2009～2010  
 課題番号：21890044  
 研究課題名（和文） 癌微小環境でのアシアロ糖蛋白レセプターを介した癌免疫相互作用についての研究  
 研究課題名（英文） Role of Asialoglycoprotein receptor in tumor microenvironment

研究代表者  
 早川 芳弘 (HAYAKAWA YOSHIHIRO)  
 東京大学・大学院薬学系研究科・准教授  
 研究者番号：10541956

研究成果の概要（和文）：がん細胞とそれを取り巻く細胞間相互作用において重要な役割を果たしていると考えられるものに、細胞表面糖鎖とレクチンの相互作用がある。本研究はガラクトース (Gal) 及び N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に特異性を持つ C 型レクチンであるアシアロ糖蛋白レセプター (Asialoglycoprotein receptor, ASGR) が、がん細胞に発現する相手となるレセプターと相互作用においてがん転移病態の成立に重要な役割を果たしている可能性があることを新たに示した。

研究成果の概要（英文）：The importance of the interaction between endogenous lectins and glycans on cancer cells has been explored. In this study, we demonstrated that the importance of hepatic asialoglycoprotein receptor (ASGPR), C-type lectin with the preference in the recognition of galactose or N-acetylgalactosamine residue of the counter receptor, in the formation of metastasis of cancer cells.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：がん、転移、レクチン、糖鎖、シグナル伝達

#### 1. 研究開始当初の背景

科学の進歩とともに癌の診断・治療は着実に向上しているが、一方で依然としてがんは日本における死因第一位の疾患である。その大きな要因を占める一因と考えられているのががん細胞が遠隔臓器へと転移する性質を獲得することである。実際にかん診断法の向上によって早期発見が可能となり、その結果として外科的な切除が可能となる症例であれば一般的に良好な生存率を示すことが多い。一方で、発見が遅れ多場合など遠隔臓器への

転移が既に生じている症例では予後が悪いことが知られている。従ってがんの治療向上のためには転移病態の分子機構の解明と、それに基づく新たな創薬ターゲットの発見が必要である。

がん転移は、原発組織での局所増殖、脈管内侵襲、血行性移動、血管内皮細胞への接着、血管外への浸潤、転移先臓器における生着及び増殖といった複雑なステップを経て成立する。これらの複雑な過程を制御する機構は、接着分子、ケモカイン、増殖因子、宿主免疫

応答など様々な細胞間の相互作用が含まれることが明らかにされつつある。なかでもがん細胞を取り巻く微小環境で発現している分子とがん細胞表面分子を介した細胞間相互作用において重要な役割を果たしていると考えられるものに、細胞表面糖鎖とレクチンの相互作用がある。これまでにヒトがん組織において、がんの悪性化や転移に伴ってがん細胞表面糖鎖の発現が変化することが多く知られている。アシアロ糖蛋白質レセプター (Asialoglycoprotein receptor, ASGR) はガラクトース (Gal) 及び N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に特異性を持つ C 型レクチンである。ASGR は相同性の高いメジャーサブユニット ASGR1 とマイナーサブユニット ASGR2 からなるヘテロオリゴマーを形成し、それによってリガンドに対する高い親和性を獲得する。リガンドへの結合性に関して、Gal よりも GalNAc に対してより強い結合性を示すこと、トリアンテナ型のように分岐した N-結合型糖鎖の末端に Gal/GalNAc を持つ構造に対してさらに強い結合性を示すことが報告されている。これまでにがん細胞表面の Gal/GalNAc 型糖鎖の発現と *in vivo* での転移能が正に相関することが報告されており、これらの知見はがん細胞の転移性獲得における ASGR の関与を強く示唆している。

## 2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、本研究課題ではがん細胞上の Gal/GalNAc 型糖鎖とそれを認識する ASGR を介した相互作用によってがん転移が制御される可能性について探索する事でがん細胞の転移能の獲得プロセスにおいて、腫瘍微小環境における ASGR の役割に着目をしてがん、及びがん転移病態の解明に取り組む事を目的とした。がん細胞上の糖鎖を含むカウンターレセプターと微小環境における糖鎖認識レクチンを介した相互作用が、宿主免疫細胞やその他の微小環境を構成する細胞とがん細胞との相互作用ががん細胞動態や転移病態に及ぼす影響について探索した。

## 3. 研究の方法

(1) ASGR1-Gal/GalNAc 型糖鎖相互作用を介した 3LL 細胞の各種細胞死感受性への影響について細胞培養プレートに固相化した rASGR1 を用いて *in vitro* において ASGR1-Gal/GalNAc 型糖鎖の相互作用の存在下で培養した 3LL 細胞を用い、各種細胞死を誘導してその感受性について検討した。rASGR1 と併培養後 4、24、48、72 時間後において a) 対照試験として既存各種抗がん剤 (cisplatin、doxorubicin、gemcitabine) による細胞死の誘導、b) death receptor pathway を介した

アポトーシス (FasL) を対照群 (rASGR の刺激無しでの培養群) と比較した。

(2) ASGR の宿主免疫系における重要性を探索するために ASGR<sup>-/-</sup>マウスにおける T 細胞サブセットおよび NK 細胞サブセットの分布についてフローサイトメトリーにより解析した。

(3) *in vitro* での rASGR1 による刺激後の転移巣形成能における差異について 3LL 細胞を用いた実験的転移モデルを用いて検討した。

(4) 転移評価モデルとしてマウス 3LL 細胞を肝臓内に直接移植する方法を用いて肝臓を原発巣として肺への自然転移を認めるモデルの作製に成功した。

(5) 肝原発肺自然転移モデルを用いて野生型マウスおよび ASGR1<sup>-/-</sup>マウスで原発腫瘍のサイズおよび肺転移能を比較する事で ASGR1-Gal/GalNAc 型糖鎖相互作用のがん転移病態形成における重要性を精査した。

(6) *in vitro* において rASGR1 刺激が 3LL 細胞の浸潤能に及ぼす影響について、トランスウェルチャンバーを用いた細胞浸潤、ゼラチンザイモグラフィによる MMP 産生、蛍光染色および RT-PCR による MMP 発現について検証した。

(7) シグナル伝達阻害化合物、ウェスタンブロットティングにより ASGR 刺激による MMP-9 産生促進におけるがん細胞でのシグナル伝達機構について探索を行った。

## 4. 研究成果

(1) ASGR1-Gal/GalNAc 型糖鎖相互作用を介した 3LL 細胞の各種細胞死感受性への影響について a) 既存各種抗がん剤 (cisplatin、doxorubicin、gemcitabine) による細胞死の誘導、b) death receptor pathway を介したアポトーシス (FasL) を対照群 (rASGR の刺激無しでの培養群) と比較したが、これらの感受性に差異は認められなかった。

(2) ASGR1<sup>-/-</sup>における T 細胞、NK 細胞のサブセットについて解析を行ったが野生型マウスと比較して明らかな差異は認められなかった。

(3) *in vitro* での rASGR1 による刺激後の転移巣形成能における差異について 3LL 細胞を用いた実験的転移モデルを用いて検討した。実験的肺転移モデルにおいて rASGR と培養した後に 3LL の肺転移形成能が亢進している事を示した。

(4) 転移評価モデルとしてマウス 3LL 細胞を用いた肝原発巣からの自然肺転移モデルの作製に成功した。

(5) 肝原発肺自然転移モデルを用いて、ASGR1<sup>-/-</sup>では原発巣からの肺転移が野生型マウスと比較して減少する事を示した。がん細胞上の Gal/GalNAc 型糖鎖とそれを認識する ASGPR を介した相互作用によって制御され

る転移能の獲得プロセスのがん転移病態における重要性について明らかとした。

(6) *in vitro* において rASGR1 刺激によって 3LL 細胞の浸潤能、及びマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP-9) の産生増強が認められたことから ASGR1 は 3LL 細胞と直接相互作用をする事で細胞浸潤や MMP 産生などがん転移能を制御している可能性を示した。

(7) rASGR1 により誘導される 3LL 細胞からの MMP-9 産生には EGFR および ERK 経路を介したシグナルが重要であることを示した。

以上の結果から ASGR1 はがん転移を促進し EGFR-ERK 経路を介してがん細胞を活性化し得るレクチンとして、がん転移病態の形成を含めたがん悪性化のプロセスにおいて重要な役割を担っている事を新たに示した。また ASGR-Gal/GalNAc 型糖鎖の相互作用を介したがん細胞の転移能の獲得プロセスについて本研究課題で明らかにした事によって、がん細胞上の糖鎖とがん微小環境におけるレクチンとの相互作用のがん転移における重要性を理解することで新たな創薬のシーズの発掘に結びつくと期待される。

#### 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 6 件)

1. Brady J, Carotta S, Thong RP, Chan CJ, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. The Interactions of Multiple Cytokines Control NK Cell Maturation. *The Journal of Immunology* 査読有 185: 6679-6688 (2010)

2. Takeda K, Kojima Y, Uno T, Hayakawa Y, Teng MW, Yoshizawa H, Yagita H, Gejyo F, Okumura K, Smyth MJ. Combination therapy of established tumors by antibodies targeting immune activating and suppressing molecules. *The Journal of Immunology* 査読有 184: 5439-5501 (2010)

3. Hayakawa Y, Andrews DM, Smyth MJ. Subset analysis of human and mouse mature NK cells. *Methods Mol. Biol.* 査読有 612: 27-38 (2010)

4. Fushiki H, Hayakawa Y, Gomori A, Seo T, Tewari S, Ozaki S, Yoshimoto R. *In vivo* imaging of obesity-induced inflammation in adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有 391: 674-678 (2009)

5. Fushiki H, Kanoh-Azuma T, Katoh M,

Kawabata K, Jiang J, Tsuchiya N, Satow A, Tamai Y, Hayakawa Y. Quantification of mouse pulmonary cancer models by microcomputed tomography imaging. *Cancer Sci.* 査読有 100: 1544-1559 (2009)

6. Fushiki H, Hayakawa Y. Reduction of autofluorescence of *in vivo* fluorescence imaging by using purified diet. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 査読有 134: 13-16 (2009)

[学会発表] (計 10 件)

1. Yoshihiro Hayakawa, Tatsuro Irimura. Evidences for cancer immune-escalation process and the role of inflammatory cytokines. Keystone Symposia "Cancer Control by Tumor Suppressors and Immune Effectors" 2011 年 2 月 14 日 Santa Fe Community Convention Center (Santa Fe, USA)

2. 早川芳弘、佐藤まりも、田原秀晃、入村達郎 Requirement of endogenous IFN-gamma for effective recruitment of effector NK cells into tumor microenvironment. 第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議場 (大阪)

3. Yoshihiro Hayakawa Phenotypic and functional diversity of mouse NK cells. 14th International Congress of Immunology 2010 年 8 月 23 日 神戸国際会議場 (兵庫)

4. 早川芳弘、佐藤まりも、田原秀晃、入村達郎 腫瘍微小環境への NK 細胞集積における IFN- $\gamma$  の重要性 第 14 回日本がん免疫学会 2010 年 7 月 22 日 KKR ホテル 熊本 (熊本)

5. 早川芳弘、入村達郎 腫瘍微小環境への NK 細胞集積における IFN- $\gamma$  の重要性 第 19 回日本がん転移学会総会 2010 年 6 月 16 日 金沢市文化ホール (石川)

6. Yoshihiro Hayakawa Distinct receptor repertoire formation in mouse NK cell subsets regulated by MHC class I expression and its implication in anti-tumor immune response. 39<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting, Australasian Society for Immunology 2009 年 12 月 8 日 Cornard Jupiters (Gold Coast, Australia)

7. 早川芳弘 Distinct receptor repertoire formation in mouse NK cell subsets regulated by MHC class I expression, and its implication

in anti-tumor immune response. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会 2009 年 12 月 3 日大阪国際会議場 (大阪)

8. Yoshihiro Hayakawa Distinct receptor repertoire formation in mouse NK cell subsets regulated by MHC class I expression and its implication in anti-tumor immune response. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 年 10 月 2 日 パシフィコ横浜 (横浜)

9. 早川芳弘 マウスNK細胞サブセットでの抑制性レセプターレパトア形成におけるMHC class Iの重要性和抗腫瘍免疫応答におけるその意義 第 18 回日本がん転移学会学術集会・総会 2009 年 7 月 23 日 旭川グランドホテル (旭川)

10. 早川芳弘 マウスNK細胞サブセットでの抑制性レセプターレパトア形成におけるMHC class Iの重要性和抗腫瘍免疫応答におけるその意義 第 13 回日本がん免疫学会総会 2009 年 6 月 24 日 北九州国際会議場 (北九州)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川 芳弘 (HAYAKAWA YOSHIHIRO)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：1 0 5 4 1 9 5 6

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし