

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293011

研究課題名(和文) がんの診断と治療の標的としてのMUC21グリコフォーム

研究課題名(英文) MUC21 glycoforms as the target of cancer diagnosis and therapy

研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA, Tatsuro)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：80092146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：MUC21の遺伝子発現とグリコフォームの多様性を、乳がんを対象に細胞株及び病理標本を用いて細胞の特性及び臨床病理情報との関係を追求めた。トリプルネガティブ乳がんにおいてMUC21の発現が予後不良因子であることが明らかとなったが、糖鎖構造との関連は未解明である。ヒトがん細胞において、MUC21の特定のグリコフォームと相互作用を持つことが予想されるガレクチン3の発現がMUC21発現と同様にアポトーシス耐性を増強することから、それらの相互作用を追求める実験系を確立することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Expression of MUC21 gene and its glycosylated gene products was examined with breast carcinoma cells and tissue specimens with a variety of subtypes. It was found that MUC21 expression was associated with poor therapeutic outcomes among triple negative breast carcinoma patients but whether any association with the expression of particular glycoform of MUC21 is still unknown. An experimental system to investigate the contribution of interaction between MUC21 and galectin 3 in modulating apoptotic pathways was successfully established.

研究分野：腫瘍学、免疫学、糖鎖生物学

キーワード：ムチン 乳腺がん 治療抵抗性 モノクローナル抗体 グライコフォーム MUC21

1. 研究開始当初の背景

ムチンは上皮及び上皮細胞の防御分子である一方、Cystic fibrosis などにおいては病態の直接の原因分子となることも知られている。CA15-3(MUC1)やCA125(MUC16)などのムチンは、血清バイオマーカーとして血液中及び組織に於ける検出によってがんの診断、治療効果の判定、再発のモニター、治療の個別化に用いられる。また膜型ムチンである MUC1 は特異的ながん免疫療法の標的としても用いられ、細胞質ドメインにおいて複数のアダプター分子と相互作用を持ち、細胞内シグナルの制御に関わることによつてがんの悪性挙動に係ることも知られている。また MUC4 はチロシンキナーゼ型増殖因子レセプターシグナルを修飾することから、がん遺伝子として捉えられている。悪性度の高いマウス乳がんが発現するエピグリカニンは、1960年代に発見され、1975年に命名された。免疫系を直接かく乱するという報告があったが、その分子機能は不明であった。エピグリカニンの機能の解明し、これをがんの診断と治療の標的として開発するためには、そのコアポリペプチドの遺伝子の同定が必要であった。私どもは約10年前にこれを実現し、ヒトの相同遺伝子とその産物を明らかにし、ムチン21(MUC21)と名付けた。膜型ムチンである MUC21 はこれまでにコアポリペプチドの遺伝子が同定されたあらゆるムチンの中で最もセリン/スレオニン含量が高く、それゆえ最も糖鎖の含量が高いムチンと言える。タンデムリピートを含む細胞外ドメインは1分子あたり約800個の糖鎖を含みうるが、それ以外のドメインにはよく知られている機能モチーフはほとんどない。この遺伝子を細胞に強制発現すると、細胞の接着性が低下すること、細胞のアポトーシスに対する抵抗性が高くなることが判明した。また、少なくともアポトーシス抵抗性に関しては MUC21 の糖鎖が伸張してシアル酸を含むことが重要であるという予備的な知見を得た。しかし、このような特定のグリコフォームを持つ MUC21 が実際にヒトのがんに発現し、予後や治療抵抗性と関係するかどうかを明らかにすることが重要な課題であった。さらに、これらに基づいて治療法の改善を図るためには解明しなければならない多くの疑問が残されていた。アポトーシス耐性が MUC21 自身の分子機能に基づくのか、この分子のどの部分にそのような機能が隠されているのか、あるいは MUC21 と相互作用を持つ分子が機能発現に重要なのかも重要な問題であるが不明であった。

2. 研究の目的

これまで行って来た MUC21 に関する研究を進展させ、以下を解明することを目的と

した。(1)培養ヒトがん細胞株にドメイン欠損 MUC21 を強制発現させ、抗がん剤等によって誘導されるアポトーシス耐性が特定のドメインに依存するかどうかを検証する。(2)ヒトのがん細胞においてアポトーシス耐性や治療抵抗性と MUC21 のグリコフォームとの関係を明らかにし、さらに MUC21 のグリコフォームと特異的に結合する細胞表面分子(コレセプター)を探索し、その発現、MUC21 との相互作用、アポトーシス耐性との関連を明らかにする。(3)がんの手術標本における MUC21 グリコフォームの発現を、グリコフォーム特異的なモノクローナル抗体を用いて組織学的にプロファイル解析し、異なる治療への抵抗性及び臨床病理学的なパラメーター、特にがんの進行、播種、の関係を明らかにし、治療の個別化の指標となる組織マーカーとして確立する。

3. 研究の方法

研究方法としては、以下の三つのカテゴリーの研究を行った。(1)ヒト細胞の MUC21 トランスフェクタントの作製と特性解析。(2)MUC21(ヒト及びマウス)のグリコフォーム特異的なモノクローナル抗体の作製とそれらの特性の解析。(3)モノクローナル抗体を用いた培養ヒト細胞株及び病理組織標本の染色性(細胞内外における分布・染色強度)の解析。

ヒト MUC21 の細胞外ドメインまたは細胞質ドメインを欠損する遺伝子を作製しこれを強制発現させたヒト細胞を準備した。MUC21 発現ヒト細胞がアポトーシスに耐性を獲得することは、トランスフェクタント細胞を種々の濃度のエトポシドで処理することによってアポトーシスを誘導し、その程度をアネキシン V の結合性と PI による染色性によりフローサイトメトリー法により評価した。

MUC21 グリコフォーム特異的なモノクローナル抗体の作製に関しては、ヒト MUC21 に特異的なものに関しては既に報告している。マウス Muc21 の特定のグリコフォームに特異的なモノクローナル抗体はマウス Muc21 トランスフェクタント細胞あるいは Muc21 を高発現している TA3-Ha 細胞の膜画分を免疫原として免疫したハムスターからハイブリドーマを作製し、精製 Muc21 によりスクリーニングし、クローニングすることにより得た。さらに糖鎖部分に対する特異性を抗原の酵素処理や、O-結合型糖鎖の修飾不全が起こる CHO 細胞の変異株、およびそれらによって産生される MUC21 を精製して用いて詳細に検討した。

ヒトがん細胞及び病理組織における

MUC21 グリコフォーム発現及び分布の解析は、主に乳腺がんを対象として既已取得しているモノクローナル抗体 heM21A、heM21C、及び heM21D を用いて行った。前二者は糖鎖がある程度伸長した T 抗原 (Gal-GalNAc) またはシアリル T 抗原 (Sia-Gal-GalNAc) を含むヒト MUC21 に、heM21D は糖鎖付加の全くないまたは Tn 抗原 (GalNAc) のみが結合したヒト MUC21 に特異的に結合することが既に判明している。これらの抗体の乳腺がん細胞株に対する結合性はフローサイトメトリー及び細胞染色を行い定量した。手術による切除標本から得たがん組織にはがん細胞だけでなく、正常乳管上皮、過形成乳管上皮、および良性腫瘍などが含まれるので、これらに対する結合性は酵素抗体法による組織染色を行った後、光学顕微鏡の観察を行った。

4. 研究成果

MUC21 のどの部位がアポトーシス抑制に関与するかの検討を行った。タンデムリピートを欠損させた MUC21 (Δ TR) 及び細胞外ドメインを欠損させた MUC21 (Δ CT) を HEK293 細胞に強制発現させ、タンデムリピート及び細胞内ドメインの役割を検討した。これらの強制発現細胞に対して Etoposide 処理によりアポトーシスを誘導したところ、全長 MUC21 強制発現細胞に見られていたアポトーシス抑制能は Δ TR 及び Δ CT を発現させた細胞では観察されず、タンデムリピート及び細胞内ドメインの双方が MUC21 のアポトーシス抵抗性に必須であることが示された。

糖鎖認識タンパク質 (S 型レクチン) であるガレクチン 3 はその発現によりがん細胞がアポトーシス耐性となること、MUC21 とグリコフォーム依存的に相互作用を持つ可能性があることから、アポトーシス耐性とガレクチン 3 の発現の関係を最近明らかにしたテキサス大学 MD アンダーソンがんセンターの Robert Bresalier 博士と共同で、全長 MUC21 及び上記のドメインを欠損させた MUC21 のトランスフェクタント細胞にガレクチン 3 に対応する siRNA をレンチウイルスベクターにより発現させてその発現が低下した細胞を作出した。MUC21 とガレクチン 3 共発現のアポトーシスへの影響、部分欠損 MUC21 発現のガレクチン 3 によるアポトーシス阻害への影響を検証しているが、結果の詳細はここでは公表しない。

マウス Muc21 に特異的なモノクローナル抗体 1A4-1 と 18A11 を樹立した。これらの抗体はマウス Muc21 に特異的であることが Muc21 トランスフェクタントとモックトランスフェクタントへの結合性の比較から明らかになった。さらに糖鎖の構造に要求性があることが、Muc21 を強制発現させた CHO-K1 細胞 (糖鎖が伸長している) と Lec2

細胞 (糖鎖にシアル酸を欠く) に対する結合性や、グリコシダーゼ処理の影響から判明した。すなわち、1A4-1 は CHO-K1-Muc21 細胞には結合しないが Lec2-Muc21 細胞には結合することから、糖鎖の末端がガラクトースであることを要求することが判明した。一方 18A11 は HO-K1-Muc21 細胞には結合するが Lec2-Muc21 細胞には結合しないことから、シアル酸を含む糖鎖をもつマウス Muc21 に特異的であることが明らかになった。これらの抗体は、抗 Muc21 抗体の *in vivo* における効果を査定するためにも有用であると思われた。またこれらの抗体はマウス乳がん細胞株 TA3-Ha に結合性があったが、Muc21 を欠損しており悪性度の低い TA3-St 細胞には結合しなかった。古くから言われていたように、TA3-Ha という悪性度が高い細胞のみに Muc21 が発現することが確認された。

ヒト MUC21 のグリコフォームに特異的なモノクローナル抗体 heM21A、heM21C、及び heM21D のヒト乳がん細胞株及び手術切除標本に対する結合性を比較した。細胞株においても手術標本においても一部の患者由来検体のみに結合性が見られ、腫瘍内の部位による不均一性は低かった。興味深いことに、細胞株に対しては、heM21D のみが結合性を示し、結合が見られるのは細胞内のみであり、細胞染色により検出されたがフローサイトメーターでは検出されなかった。heM21A 及び heM21C は、いずれの方法でも結合性が見られなかった。ヒト乳がん細胞株 7 種のうち、結合性が見られたもののカテゴリーは Luminal A、Luminal B、及び HER2 の一部であり、HER2 の一部及び Triple Negative で結合がみられなかった。さらに対象とする試料数を増やす必要があるが、MUC21 は細胞表面に出ておらず、糖鎖の伸長が限定的であることは明らかであった。

一方、手術標本では heM21A と heM21C のみに結合性が見られ、heM21D は結合しなかった。また、結合が細胞質に限られることは細胞株の場合と共通していた。結合性が見られるパーセンテージは細胞株の場合より低いようであるが、上記したように腫瘍内の結合性に関する不均一性は低かった。Triple Negative 症例のカテゴリー 5 例中 1 例が比較的強い陽性、1 例が陰性であったことが重要と思われた。TCGA のデータによれば、Triple Negative 乳がん 83 例を見たとき、予後不良因子として最も強い相関を有する発現遺伝子が MUC21 であることが判明し、予後の予測因子としての MUC21 の重要性が、治療抵抗性との関連という、アポトーシス耐性を付与するという機能との関連においてもさ

らに検討する必要があることが明らかになった。

乳腺がん以外のがんの病理標本におけるMUC21の分布について、テキサス大学MDアンダーソンがんセンターの藤本淳也博士と共同で組織アレイを用いる解析を開始した。現在のところheM21Dの結合性に関する結果が得られているが、グリコフォームの異なるMUC21を認識する抗体を用いてさらに比較する必要があり、また複数の組織アレイを用いた際の一貫性を検討する必要があることが判明した。予備的知見としては、heM21Dの結合性が高い腫瘍組織は重層扁平上皮由来のがんの一部であり、多種類の扁平上皮がん組織のアレイを対象とする染色結果では30%弱の陽性率があり、皮膚、歯肉、食堂、咽頭、肺、舌、陰茎、膣などを由来とするがん組織に高い陽性のものがあった。これらの組織由来のがんにおける遺伝子発現プロファイルは明らかでないが、扁平上皮由来のがんではMUC21発現による個別化が容易にできることが判明し、さらなる追求が重要と考えられた。

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 17 件)

1. Miyahara N, Shoda J, Kawamoto T, Ishida H, Ueda T, Akimoto Y, Kawakami H, Irimura T. Interaction of Muc4 and ErbB2 in a transgenic mouse model of gallbladder carcinoma: potential pathobiological implications. *Oncol Rep*. 2014 Nov;32(5):1796-802. doi: 10.3892/or.2014.3443. Epub 2014 Aug 25. PMID: 25174601
2. Higashi N, Waki M, Sue M, Kogane Y, Shida H, Tsunekawa N, Hasan A, Sato T, Kitahara A, Kasaoka T, Hayakawa Y, Nakajima M, Irimura T. Heparanase-mediated cleavage of macromolecular heparin accelerates release of granular components of mast cells from extracellular matrices. *Biochem J*. 2014 Mar 1;458(2):291-9. doi: 10.1042/BJ20131463. PMID: 24344642
3. Murakami R, Denda-Nagai K, Hashimoto S, Nagai S, Hattori M, Irimura T. A unique dermal dendritic cell subset that skews the immune response toward Th2. *PLoS One*. 2013 Sep 9;8(9):e73270. doi: 10.1371/journal.pone.0073270. eCollection 2013. Erratum in: *PLoS*

One. 2014;9(3):e93236. PMID: 24039898

4. Matsuda A, Kuno A, Nakagawa T, Ikehara Y, Irimura T, Yamamoto M, Nakanuma Y, Miyoshi E, Nakamori S, Nakanishi H, Viwatthanasittiphong C, Srivatanakul P, Miwa M, Shoda J, Narimatsu H. Lectin Microarray-Based Sero-Biomarker Verification Targeting Aberrant O-Linked Glycosylation on Mucin 1. *Anal Chem*. 2015 Jul 21;87(14):7274-81. doi: 10.1021/acs.analchem.5b01329. Epub 2015 Jul 7. PMID: 26091356
5. Sue M, Higashi N, Shida H, Kogane Y, Nishimura Y, Adachi H, Kolaczowska E, Kepka M, Nakajima M, Irimura T. An iminosugar-based heparanase inhibitor heparastatin (SF4) suppresses infiltration of neutrophils and monocytes into inflamed dorsal air pouches. *Int Immunopharmacol*. 2016 Jun;35:15-21. doi: 10.1016/j.intimp.2016.03.017. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27015605

[学会発表](国際学会のみを抜粋:計 9 件)

1. Tatsuro Irimura. A C-type lectin MGL in allergic responses. 12th International Workshop on Mucins in Health and diseases, Cambridge, UK. July 29, 2013 (Invited lecture).
2. Tatsuro Irimura. Public private partnership in Japanese pharmaceutical affairs. Aug 31-Sep 4, 2014. FIP Congress (Bangkok, Thailand: Invited lecture)
3. Kaori Denda-Nagai, Miki Noji, Kengo Saba, Ryosuke Kurashina, Tomoko Hisai, Katsuaki Usami, Haruhiko Fujihira, Airi Namba, Hiromitsu Hara, Yasuro Shinohara, Tatsuro Irimura. MGL (CD301) in infection and immunity. Mucins in Health and Disease, 13th International Mucin Workshop. Cambridge, UK. July 18-22, 2015 (Invited lecture).
4. Tatsuro Irimura. C-type lectins on dendritic cells and macrophages regulate infection and immunity. LMU-UT Symposium, Munich,

Germany. October 28-29, 2015
(Invited lecture).

5. Tatsuro Irimura. Future of glycobionics. Frontiers 2016 Symposium, Lausanne, Switzerland. Dec 5, 2016 (invited lecture).

〔図書〕なし

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6 . 研究組織

研究代表者

入村 達郎 (IRIMURA, Tatsuro)
順天堂大学・医学研究科・特任教授
研究者番号：8 0 0 9 2 1 4 6

研究分担者

伝田 香里 (DENDA-NAGAI, Kaori)
順天堂大学・医学研究科・特任助教
研究者番号：0 0 3 1 3 1 2 2