

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 14 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430123

研究課題名(和文) がん関連糖鎖と免疫細胞の相互作用によるがん微小環境調節機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of tumor microenvironment by tumor-associated sialyl-Tn antigen

研究代表者

高宮 里奈 (Takamiya, Rina)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70365419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Sialyl-Tn (sTn)糖鎖抗原の発現は腫瘍に特異的に発現し、予後の不良や転移と関連する事は知られているが、そのメカニズムは分かっていない。がん細胞移植マウスモデルを用いた検討より、sTn糖鎖抗原の発現は、腫瘍内部のHIF-1発現領域に一致し、さらにsTn糖鎖抗原発現領域には、マクロファージやT細胞が浸潤していた。また、sTn糖鎖抗原高発現細胞は単球との接着が亢進しており、この接着亢進にはインテグリン上のsTn糖鎖抗原が関与している事が分かった。以上の結果より、sTn糖鎖抗原は、マクロファージとの相互作用を亢進させる事により腫瘍免疫に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of sialyl-Tn (sTn) antigen abnormally expresses in several types of cancers, is often related to poor prognosis and tumor metastasis. However, the relevance of the sTn antigen expression to tumor progression is yet to be determined. The expression of sTn-expressing tumor cells coincided with HIF-1 expressing cells in solid tumor tissues. Furthermore, macrophages and T cells partially infiltrated into solid tumor, where specifically expressed sTn antigen. In addition, sialyl-Tn antigen on integrin induced the adhesion of tumor cells to monocytes. These results suggest that sTn antigen may trigger tumor progression by modifying of immune microenvironment, especially macrophage function.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低酸素 糖鎖抗原 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

がんは1981年以来わが国の死因第一位である。がんの予後を占う上で最も重要なのが、がん細胞の“転移能”であり、がん細胞の転移抑制が難治性がん治療の最重要課題となっている。悪性腫瘍の内部の低酸素領域のがん細胞は、一般的な抗がん剤に対して抵抗性を示し、さらに運動・遊走能を亢進させ、これががんの転移・浸潤能の亢進につながると考えられている。近年、がん細胞が転写因子 Hypoxia-inducible Factor-1(HIF-1)を活性化して、腫瘍形成に関わる遺伝子を発現させ、悪性化に寄与していることは多数報告されている。しかしながら、その詳細な分子機構は解明されていない点が多い。

一方がん化に伴って、細胞の糖鎖構造が変化することは古くから知られている。臨床の現場で用いられている腫瘍マーカーの多くががんに伴い出現する異常な糖鎖であるが、この糖鎖の生物学的機能が解明されているものは少ない。腫瘍マーカーの中でsTn抗原の発現は、がん転移や悪性度と良く相関することが報告されているが、その発現機構や生物学的機能は不明であった。

最近我々は、低酸素環境下にある腫瘍中心部で、HIF-1を介し糖転移酵素 ST6GalNAc-Iの発現が誘導され、sTn 抗原が合成される事を明らかにした。また、sTn 抗原はコラーゲン受容体である $\alpha 2\beta 1$ インテグリン上に発現しており、この発現がコラーゲンとの接着を高めることにより細胞浸潤を亢進させ、血行性転移を促進させる事を明らかとした。

近年、腫瘍内部での腫瘍随伴マクロファージ(tumor associated macrophages (TAMs))は、さまざまなサイトカイン、プロテアーゼを産生し、また T 細胞の分化調節を行ないがん微小環境で中心的な役割を担っていることが報告されている。そこで我々は、sTn 抗原のマクロファージ/単球細胞に及ぼす影響について検討を行った。sTn 抗原発現がん細胞と単球細胞株の共培養により、活性酸素種(ROS)の産生を介した単球からの IL-8、IL-10、IL-6、TNF- α などの腫瘍促進因子産生や MMP-9 活性亢進、及び分化亢進が認められた。また、sTn 抗原を特異的に認識するタンパク質である Siglec-15 を発現したマクロファージと sTn 抗原発現がん細胞との相互作用により、腫瘍形成因子の1つである TGF- β の産生の亢進が認められた(Takamiya R, et al, *Glycobiology*, 2012)。

2. 研究の目的

がん微小環境における sTn 抗原とマクロファージとの相互作用に着目し、sTn 抗原によるがん微小環境調節機構を明らかにし、それにとりもなう転移促進機能の解明を行なうことを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) **がん移植モデルを用いた in vivo での検討**
sTn 抗原の発現が、がん微小環境の免疫

系や、転移調節機構にあたる影響について、C57BL/6 系統マウス由来のがん細胞であるルイス肺がん(LLC)細胞をマウスに同種移植し、検討を行なった。sTn 高発現 LLC 細胞(LLC(sTn))を作成した。そして LLC 細胞皮下移植後の固形腫瘍内の sTn 抗原、マクロファージや T 細胞を免疫組織染色にて確認した。また、がん転移への影響をみるため、移植後マウス肺における sTn 糖鎖抗原の発現を確認した。また、腫瘍体積は、経時的に2週間目まで計測を行なった。

- (3) sTn 糖鎖抗原を発現している分子の同定
sTn 糖鎖抗原高発現 H157 細胞(H157(sTn))、及び H157(mock)の細胞可溶化画分を抗 sTn 抗体で免疫沈降後、さらに抗 sTn 抗体を用い western blot を行なった。また、得られたバンドについては、抗 sTn 抗体で免疫沈降後、各々の抗体を用い western blot を用い sTn 抗原をもったタンパクの同定を行なった。

- (3) sTn 抗原によるがん細胞-マクロファージ相互作用についての検討

2 インテグリン欠損/sTn 高発現 H157 細胞(H157($\alpha 2(-)$ /sTn))を作製し、単球細胞株 THP-1 との共培養系を用い検討した。THP-1 細胞の H157 細胞への接着の影響は、フローチャンバーを用い検討した。また THP-1 からの腫瘍形成因子の産生について、培養上清中の IL-8 の産生を ELISA 法にて、また MMP-9 の活性をザイモグラフィで確認した。

- (4) がん幹細胞マーカーCD44の発現
H157(sTn)、及び H157(mock)細胞表面の CD44 の発現について、FACSを用い検討を行った。また、CD44 スプライズバリエーションの発現は、western blot 法を用いて行なった。

- (5) sTn 糖鎖抗原発現がん細胞の酸化ストレスに対する耐性
過酸化水素負荷実験を行ない MTT assay により細胞の生存率を検討した。また、western blot にて、Nrf2、HO-1の発現を確認した。細胞内の GSH、GSSG の測定は、GSH/GSSG-Glo™ Assay (Promega)を用いた。

4. 研究成果

- (1) LLC 細胞を C57BL/6 マウス皮下に移植したところ、皮下に固形腫瘍が観察された。この固形腫瘍の免疫組織染色をおこなった。sTn 高発現領域は、HIF-1 の発現領域と一致していた。次に、sTn 高発現領域の免疫細胞の分布を検討したところ、マクロファージや T 細胞の sTn 発現領域への特異的な浸潤が認められた(図 1A)。次に、sTn 糖鎖抗原高発現 LLC 細胞(LLC (sTn))を作成し、(LLC (sTn))及び、LLC (mock)をマウス皮下に移植し検討した。移植後2週間目では LLC(sTn)

移植群は、LLC (mock)細胞移植群に比べ皮下腫瘍の体積は約半分程度であった (図1B)。しかしながら、肺への LLC 細胞の浸潤は LLC(sTn)皮下移植群では 3 週間目から認められたが、LLC(mock) では認められなかった。

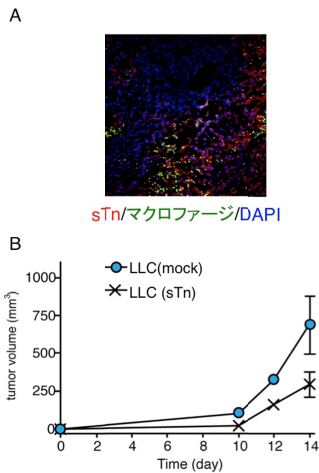


図1 LLC細胞皮下移植モデル
 A) LLC(mock)細胞皮下移植後の腫瘍内の sTn 糖鎖抗原、マクロファージの発現
 B) LLC(sTn)細胞を皮下移植時の皮下腫瘍の体積

(2) sTn 糖鎖抗原とマクロファージとの相互作用について検討をおこなうため、がん細胞上で sTn 糖鎖抗原をもったタンパクの同定を行なった。H157(sTn)の細胞可溶化画分を抗 sTn 抗体で免疫沈降後 SDS ページを行なったところ、顕著な3つのバンドが得られた。予想されるタンパクの同定は、抗 sTn 抗体で免疫沈降後、分子量から予想されるタンパクの抗体で western blot で確認を行なった。その結果、sTn 糖鎖抗原をもったタンパクは、 $\alpha 2 \beta 1$ インテグリン、CD44、ムチンであった (図2)。

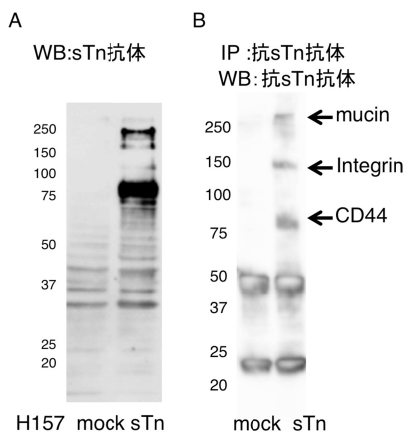


図2 sTn糖鎖抗原をもったタンパク
 A) 抗 sTn 抗体を用いた H157(mock)、H157(sTn)細胞の western blot
 B) 抗 sTn 抗体で免疫沈降後、さらに抗 sTn

抗体で、western blot

(3) がん細胞上のインテグリンは、免疫細胞との相互作用にも影響を与えることは多数報告されている。インテグリン上の sTn 糖鎖抗原の発現が、がん細胞-マクロファージ間の相互作用に影響を与えている可能性は高い。そこで、 $\alpha 2$ インテグリン欠損 / sTn 高発現 H157 細胞 (H157($\alpha 2(-)$ /sTn))を作成した。まず、細胞同士の接着をみるため、フローチャンバーを用い固定した H157 細胞上に一定の流速で、ヒト単球細胞 THP-1 を流すと、H157(mock)に比べ、H157(sTn)細胞上での THP-1 の rolling velocity が低下していた。また、H157($\alpha 2(-)$ /sTn)上では、H157(mock)と同程度であった。固定した H157(sTn)に THP-1 を添加すると、THP-1 からの IL-8 の産生が亢進することが分かっているが、H157($\alpha 2(-)$ /sTn)に THP-1 を添加しても、IL-8 の産生は H157(mock)と同程度であった (図3)。

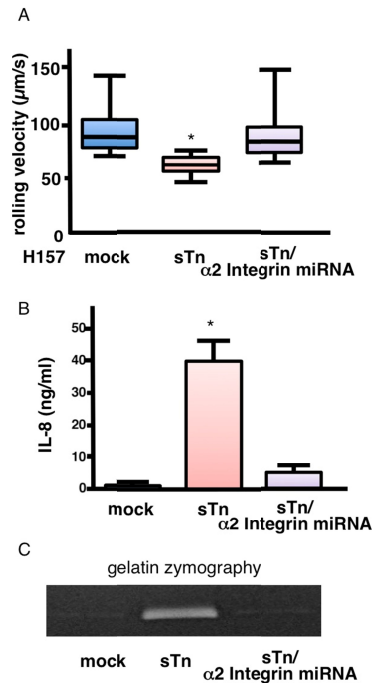


図3 $\alpha 2$ インテグリン欠損株を用いた H157 細胞と THP-1 細胞との相互作用
 A) H157 上での THP-1 の rolling velocity
 B) H157 上の THP-1 からの培養上清中への IL-8 の産生
 C) H157 上の THP-1 からの培養上清中での MMP-9 の活性

(4) がん幹細胞マーカーCD44 は、H157(sTn)細胞上で、H157(mock)と比べ、細胞表面での発現が亢進していた。しかしながら、CD44 のスプライズバリエーションの発現には差が認められなかった。

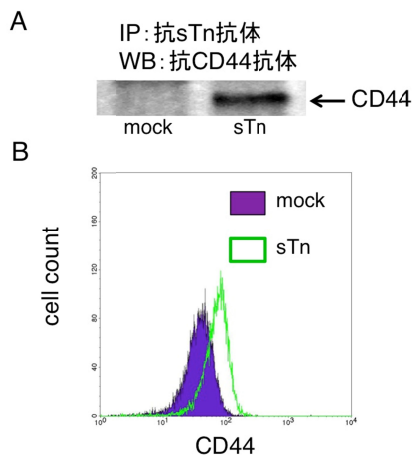


図 4 sTn 高発現がん細胞上での CD44 の発現
A) 抗 sTn 抗体で免疫沈降後、抗 CD44 抗体での western blot
B) 抗 CD44 抗体を用いた細胞表面での CD44 の発現

- (5) 過酸化水素負荷実験より、H157(sTn)は、H157(mock)に比べ、有意に生存率が亢進していた(図5)。しかしながら、H157(sTn)は、H157(mock)と同程度の総グルタチオン量、酸化還元グルタチオン比(GSH/GSSG)であった。一方、H157(sTn)は、酸化ストレス応答因子である Nrf2 の核内での発現が亢進しており、さらにその下流の抗酸化酵素 HO-1 の発現も亢進していた。

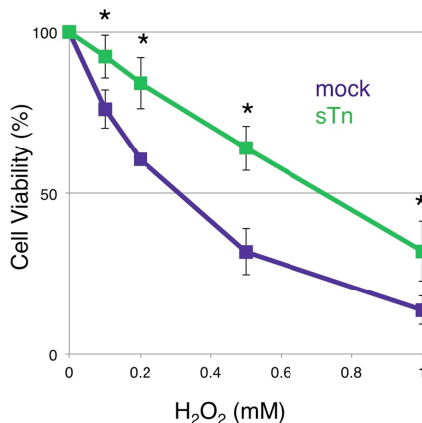


図 5 過酸化水素負荷実験による sTn 高発現がん細胞の生存率

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Yamaguchi Y, Nishitani C, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Hashimoto J, Kurimura Y, Takahashi H, Kuroki Y, *Oncogene*, 査読有り, 34, 838-845, 2015
Takamiya R, Takahashi M, Uehara Y, Ariki S, Hashimoto J, Hasegawa Y, Kuroki

Y, The single N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein attenuates heregulin β 1-induced tumor progression by blocking of the HIF-1 and Nrf2 pathway, *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有り, 454, 364-368, 2014

doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.086.

大坪和明、高宮里奈、谷口直之、低酸素による Sialyl-Tn 発現と癌転移, *The Lung Perspective*, 査読なし, 21, 290-293, 2013

Nakajima K, Ito E, Ohtsubo K, Shirato K, Takamiya R, Kitazume S, Angata T, Taniguchi N, Mass isotopomer analysis of metabolically labeled nucleotide sugars and N- and O-glycans for tracing nucleotide sugar metabolisms, *Mol Cell Proteomics*, 査読有り, 12, 2468-2480, 2013

doi: 10.1074/mcp.M112.027151.

Takahashi M, Hasegawa Y, Ikeda Y, Wada Y, Tajiri M, Ariki S, Takamiya R, Nishitani C, Araki M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kuroki Y, Suppression of heregulin β signaling by the single N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein, *J Biol Chem*, 査読有り, 288, 32910-32021, 2013
doi: 10.1074/jbc.M113.491902.

〔学会発表〕(計 5 件)

高宮里奈、ErbB シグナルを介したがんにおける酸素応答機構の解明、第 6 8 回日本酸化ストレス学会、2015 年 6 月 1 日～12 日、かごしま県民交流センター、鹿児島・鹿児島市

Takamiya R, N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein attenuates heregulin-induced tumor progression by blockade of hypoxia inducible factor-1 pathway, Society for Glycobiology & Japanese Society of Carbohydrate Research 2014 joint meeting, 2014 年 11 月 16 日～19 日、ハワイ(アメリカ合衆国)

高宮里奈、低酸素誘導がん特異的糖鎖抗原によるがん悪性化機構の解明、第 6 7 回日本酸化ストレス学会、2014 年 9 月 4 日～5 日、同志社大学今出川キャンパス、京都府・京都市

Takamiya R, Regulation of tumor microenvironment by tumor associated sialyl-Tn antigen on integrin, American Thoracic Society 2014, 2014 年 5 月 6 日～21 日、サンディエゴ(アメリカ合衆国)

高宮里奈、がん関連糖鎖シアリル Tn 糖鎖抗原発現によるインテグリンを介したがん微小環境制御機構、第 8 6 回日本生化学会、2013 年 9 月 11 日～13 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市

〔図書〕(計 1 件)

Takamiya R, Ohtsubo K, Taniguchi N,
Springer, *Glycoscience: biology and*
medicine, 2015, 1276-1280

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高宮 里奈 (Takamiya, Rina)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：70365419

(2)研究分担者

大坪 和明 (Ohtsubo, Kazuaki)
熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・
教授
研究者番号：30525457