

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450398

研究課題名(和文) シアル酸認識蛋白質Siglec-9可溶性分子の抗腫瘍メカニズム

研究課題名(英文) Anti-tumor mechanism of soluble form of sialic acid-recognizing protein, Siglec-9

研究代表者

富岡 幸子 (Tomioaka, Yukiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：50374674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：シアル酸認識免疫グロブリン様レクチンSiglec-9の可溶性分子(sSiglec-9)を発現するトランスジェニックマウスではMUC1発現腫瘍の増殖や悪性化が阻止されることが明らかになった。また、この抗腫瘍機構は宿主の免疫系を介して間接的に働くことが示唆された。一方、sSiglec-9はMUC16発現腫瘍では腫瘍増殖をむしろ活性化する傾向が示唆された。以上より、Siglec-9は腫瘍細胞で発現するムチン類と相互作用して腫瘍増殖や悪性化に関与することが示され、これらの知見はSiglec-9を介した癌の分子標的治療法を見いだす糸口となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：It was revealed that proliferation and malignant transformation of MUC1-positive tumor were prevented in the transgenic mice expressing a soluble form of sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 9 (sSiglec-9). In addition, it was suggested that this anti-tumor mechanism indirectly acted through the immune system of the host. On the other hand, sSiglec-9 activated a proliferation of MUC16-positive tumor rather than inhibited, surprisingly. According to the above results, it was shown Siglec-9 interacted with the mucin expressed in tumor and to participate in a tumor proliferation and malignant transformation. These knowledge make the beginning to found the molecular targeted therapy for cancers through Siglec-9.

研究分野：農学

キーワード：疾患モデルマウス 病態 腫瘍 シアル酸認識レクチン ムチン

1. 研究開始当初の背景

糖タンパク質のムチン的一种である MUC1 は、多くの上皮性悪性腫瘍で発現が増強し、腫瘍の浸潤や転移に促進的に働く予後不良因子である。また、MUC1 は癌の予後判定因子としてだけでなく、腫瘍免疫療法の標的分子としても注目されている。しかしながら、MUC1 は多様で複雑な情報伝達ネットワークを構築するため、どのような機序で腫瘍の悪性進展に関与するのかが未だ不明な点が多い。一方、近年 MUC1 が樹状細胞等の表面に発現するシアル酸認識蛋白質 Siglec-9 に結合することが報告された(Biochem Biophys Res Commun. 2010;402:663-669)。Siglec-9 はNK細胞、T細胞、樹状細胞等で発現し、免疫抑制モチーフを持つ分子であることから、腫瘍細胞で発現した MUC1 が免疫担当細胞で発現した Siglec-9 に作用することで免疫を抑制し、腫瘍を悪性進展させる可能性が推察されている(Biochem Biophys Res Commun. 2013;434:376-381)。そこで我々は、「MUC1 と Siglec-9 の相互作用を阻害する因子は免疫抑制シグナルの伝達を妨げ、腫瘍の悪性進展を阻止する」と考え、MUC1 と Siglec-9 の結合を競合阻害する可溶型 Siglec-9 (soluble Siglec-9: sSiglec-9)を発現するトランスジェニックマウス(sSiglec-9 Tg)を作出した。sSiglec-9 Tg では血清、リンパ系組織、各種臓器の腺上皮細胞等を含む全身で導入遺伝子を発現していた。また、sSiglec-9 Tg の血清と MUC1 発現腹水型乳癌細胞 (MM46-MUC1) を *in vitro* で反応させたところ、sSiglec-9 が腫瘍細胞の表面に結合する様子が観察された。次に、予備実験的に sSiglec-9 Tg の腹腔内に MM46-MUC1 を移植したところ、同腹 non-Tg マウスと比較して生存日数が延長し、腫瘍細胞の増殖がほとんど認められない個体も見られた。以上の予備実験経過から、sSiglec-9 が乳癌細胞で発現した MUC1 と相互作用すること、それにより MUC1 発現腫瘍に対して抗腫瘍効果を持つことが推察された。しかしながら、可溶型 Siglec-9 が直接的に腫瘍細胞を傷害するのか、腫瘍免疫を介して間接的に腫瘍増殖を抑制するのか、あるいはその両方なのかを含め、どのような機序で抗腫瘍効果を発揮するのかは明らかにできていない。

一方、近年、卵巣癌で高発現するムチン MUC16 (CA125) もまた、Siglec-9 と相互作用することが報告された (Mol

Cancer.2010;9:118, Am J Reprod Immunol.2012;68(1):28-37)。多くの卵巣癌が腹水貯留とそれによる腹膜播種という増殖形態をとることを考慮すると、可溶型 Siglec-9 が腹水中で抗腫瘍効果を発揮すれば非常に有効な分子標的治療薬の開発につながると考えられた。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究課題では、sSiglec-9 Tg マウスを用いて、可溶型 Siglec-9 が MUC1 あるいは MUC16 発現腫瘍の増殖や悪性化にどのような影響を及ぼすかを明らかにし、sSiglec-9 を用いた新規の分子標的治療法を検討する糸口を得ることを目的とする。本研究では、可溶型 Siglec-9 の抗腫瘍機序を明らかにし、新しい分子標的治療法を提案するために、具体的には以下の事柄を明らかにすることとする。

(1)可溶型 Siglec-9 は MUC1 発現腫瘍の増殖を直接的に抑制するか。

(2)可溶型 Siglec-9 は腫瘍免疫機構を介して間接的に MUC1 発現腫瘍の増殖を抑制するか。

(3)可溶型 Siglec-9 は MUC16 発現卵巣腫瘍の増殖も抑制するか。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するため下記の方法で研究を実施する。

(1)可溶型 Siglec-9 (sSiglec-9) が MUC1 発現腫瘍細胞の増殖活性に及ぼす影響の解析：

MUC1 発現腫瘍細胞 (MM46-MUC1) を sSiglec-9 Tg の腹腔内に移植し、同腹の non-Tg マウスに移植した場合と、腫瘍の増殖状態・悪性度・生存率を検討、確認する。また、担癌状態にした Tg マウスおよび non-Tg マウスから経時的に腹水腫瘍細胞を採取し、腫瘍細胞で発現している MUC1 と可溶型 Siglec-9 の多重蛍光染色を実施し、これらの相互局在を確認する。また、*in vitro* で MM46-MUC1 細胞に sSiglec-9 を反応させて増殖活性や生存率が変動するか検討する。

(2)sSiglec-9 Tg マウス腹水中の免疫担当細胞の同定：

担癌状態にした Tg マウスおよび non-Tg マウスから採取した腫瘍腹水・脾臓・胸腺・リンパ節といった組織を用いて、各種免疫担当細胞マーカーを用いた FACS および免疫染色を実施して、腹水中に浸潤している免疫細胞

の種類や動態の差異を検証する。

(3)sSiglec-9 Tg マウスの免疫能の検証：

担癌状態にした Tg マウスおよび non-Tg マウスから採取した腹水および血清を用いて、サイトカインおよびケモカインの産生の動態について検証する。

(4)MUC16 発現卵巣癌細胞の作製と移植実験：

MUC16 発現プラスミドをトランスフェクションし、MUC16 を安定的に発現する卵巣癌細胞 (HM-1-MUC16) を作製する。これを sSiglec-9 Tg マウスに移植し、腫瘍の増殖状態や生存率について、上記と同様に検証する。

4. 研究成果

(1)研究の主な成果

sSiglec-9のMUC1発現腫瘍に対する抗腫瘍効果：

sSiglec-9 Tg マウスの腹腔内に MM46-MUC1 を移植し、このマウスが腫瘍の増殖に対して抵抗性を有することを明示した。具体的には Tg では non-Tg と比較して、死亡開始時期が約 2 日遅れ、実験期間中に non-Tg は全個体死亡したのに対し、sSiglec-9 Tg ではおよそ 25%が生残し、腫瘍細胞がほとんど増殖しない個体も認められた。次に、担癌マウスより腹水腫瘍細胞を採取し、多重蛍光免疫染色により腫瘍細胞上の MUC1 と腹水中に分泌されたと考えられる sSiglec-9 が共局在すること (図 1) また Tg では腫瘍細胞における MUC1 の発現が抑制されていることを明らかにし、sSiglec-9がMUC1に何らかの作用を及ぼしていることを示唆した。さらに Non-Tg から採取した腫瘍細胞は大型で多形性に富むのに対し、Tg から採取した腫瘍細胞は小型で多形性に乏しく (図 2) 細胞増殖活性マーカー陽性率も低下しており (図 3) sSiglec-9 が腫瘍の悪性を抑制していることが示された。

sSiglec-9によるMUC1発現腫瘍に対する抗腫瘍効果発揮のメカニズム：

sSiglec-9 Tg マウスおよび non-Tg マウスの両方で腫瘍腹水中に T 細胞が認められたが、non-Tg の T 細胞は変性・壊死し集簇しているものが目立つのに対し、Tg では形態学的に正常な T 細胞が均質に浸潤していた (図 4) 。さらに、sSiglec-9 Tg では non-Tg と比較して、血清中の顆粒球単球コロニー刺激因子および白血病阻止因子の濃度が上昇し、顆粒球コ

ロニー刺激因子および LIX ケモカイン濃度は低くなっていた。一方、*in vitro* で sSiglec-9 を MUC1 発現腫瘍に作用させた場合には、細胞を傷害したり、細胞増殖活性や細胞生存率を変動させたりすることはなかった。以上より、sSiglec-9 は MUC1 発現腫瘍に対し、直接的な抗がん効果を持つというより、免疫系等を介して間接的に腫瘍の増殖や悪性を抑制すると考えられた。

MUC16 発現卵巣癌細胞に対する sSiglec-9 の作用の検証：

マウス卵巣癌細胞株 HM-1 にヒト MUC16 発現プラスミドをトランスフェクションし、MUC16 を安定的に発現する卵巣癌細胞 (HM-1-MUC16) を作出した。この HM-1-MUC16 に sSiglec-9 を反応させたのち、蛍光免疫染色によって sSiglec-9 が HM-1-MUC16 に結合することを確認した。次に、sSiglec-9 含有培地で HM-1-MUC16 を培養した後、細胞生存率および MTT アッセイによる細胞増殖活性の測定を行ったところ、HM-1-MUC16 の増殖を活性化することが明らかとなった。また、HM-1-MUC16 を sSiglec-9 Tg とその同腹 non-Tg マウスの腹腔内に移植したところ、驚くべきことに non-Tg と比較して sSiglec-9 Tg では死亡開始時期が早く、生存率は有意に低下するという、MUC1 発現腫瘍の場合と逆の結果が得られた。以上より、sSiglec-9 は MUC16 と相互作用して腫瘍の増殖を促進すると推察された。

その他：

sSiglec-9 の抗病性機構やその他の分子機能を検証する一環として、トランスジェニックマウスを用いた B 群レンサ球菌 (GBS) 感染実験を行い、sSiglec-9 が GBS 感染抵抗性をマウスに付与することを明らかにした。

(2)得られた成果の意義と今後の展望

sSiglec-9 が免疫系を介して間接的に MUC1 発現腫瘍の増殖や悪性を抑制することを示し、分子標的治療薬としての可能性を提示できた。しかしながら、その一方で、MUC16 発現腫瘍に対してはむしろ増殖を活性化するという全く想定外の結果が得られたことから、sSiglec-9 ないし内因性の Siglec-9 が各種ムチン発現腫瘍の増殖や悪性化に対してどのような機序で作用するのかさらに明

らかにする必要が生じてきた。腫瘍等の疾患治療に応用することを最終目的として、各種病態におけるムチン類と Siglec-9 の相互作用やシグナル伝達をさらに追究することを、今後の課題としたい。

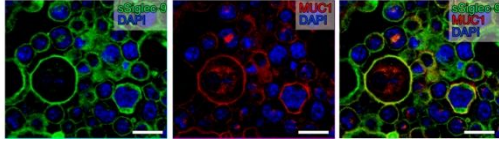


図 1：腹水腫瘍細胞において MUC1 (赤) と sSiglec-9 (緑) は共局在した。
(Biochem Biophys Res Commun. 450(1): 532-537(2014))

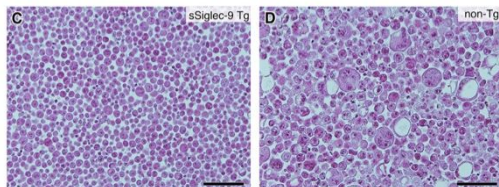


図 2：Non-Tg (右) の腫瘍細胞は大型で多形性に富むが、Tg (左) の腫瘍細胞は小型で多形性に乏しい。
(Biochem Biophys Res Commun. 450(1): 532-537(2014))

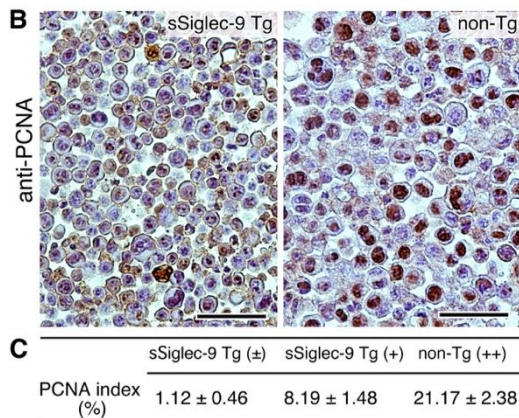


図 3：sSiglec-9 Tg (左) では non-Tg (右) と比較して、腹水腫瘍細胞における細胞増殖活性マーカー PCNA 陽性率が低下していた。
(Biochem Biophys Res Commun. 450(1): 532-537(2014))

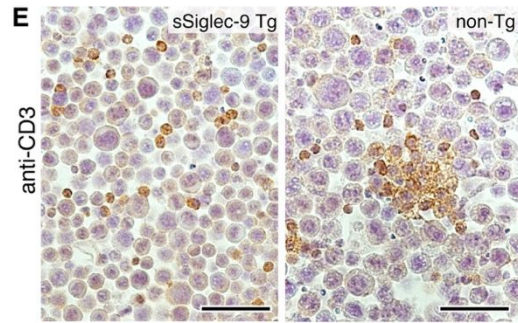


図 4：non-Tg (右) と比較して、sSiglec-9 Tg (左) では形態学的に正常な T 細胞が腫瘍腹水中に均質に浸潤していた。
(Biochem Biophys Res Commun. 450(1): 532-537(2014))

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 3 件)

Saito M, Yamamoto S, Ozaki K, Tomioka Y, Suyama H, Morimatsu M, Nishijima KI, Yoshida SI, Ono E. A soluble form of Siglec-9 provides a resistance against Group B Streptococcus (GBS) infection in transgenic mice. Microb Pathog. 99:106-110(2016)(査読有)

Tomioka Y, Fujimoto Y, Nakai K, Ozaki K, Yamamoto S, Suyama H, Morimatsu M, Ito T, Ono E. A soluble form of human nectin-2 impairs exocrine secretion of pancreas and formation of zymogen granules in transgenic mice. Biochem Biophys Rep. 5:196-202(2016)(査読有)

Tomioka Y, Morimatsu M, Nishijima K, Usui T, Yamamoto S, Suyama H, Ozaki K, Ito T, Ono E. A soluble form of Siglec-9 provides an antitumor benefit against mammary tumor cells expressing MUC1 in transgenic mice. Biochem Biophys Res Commun. 450(1): 532-537(2014)(査読有)

[学会発表](計 1 件)

富岡幸子ら：シアル酸結合レクチン Siglec-9 可溶性分子は MUC1 発現腫瘍の増殖を抑制する、第 157 回日本獣医学会学術集会、2014.9.11 北海道大学(北海道・札幌市)

[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

鳥取大学研究者総覧

http://researchers.adm.tottori-u.ac.jp/html/100001279_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富岡 幸子 (TOMIOKA, Yukiko)

鳥取大学・農学部・准教授

研究者番号：50374674

(2) 研究分担者

森松 正美 (MORIMATSU, Masami)

北海道大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70241370

小野 悦郎 (ONO, Etsuro)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：00160903

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

竹内 崇師 (TAKEUCHI, Takashi)