

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07210

研究課題名(和文)糖鎖とNK細胞の相互作用を用いた切除不能腎癌に対する新規免疫療法の確立

研究課題名(英文)A novel immunotherapy for advanced renal cell carcinoma by glyco-biological interaction with natural killer cells

研究代表者

川崎 芳英 (Kawasaki, Yoshihide)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：80722256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：腎癌細胞上のDSGb5糖鎖抗原の制御による、NK細胞の細胞傷害活性賦活化を用いた新規免疫治療を報告した。しかし、腫瘍全体のDSGb5糖鎖抗原の発現量が小さい場合、NK細胞の抗腫瘍効果は限定的であった。DSGb5糖鎖抗原の定量という課題に直面し、質量分析器による糖鎖抗原の定量測定に着手した。糖脂質のDSGb5糖鎖に含まれるスフィンゴ糖脂質は脂肪酸の配列部分に多様性を有する。炭素数16から26までの異なる脂肪酸鎖8種を測定対象にし、理論値からDSGb5糖鎖の発現量を推測できた。しかし、精密定量測定には、やはり標準物質が不可欠であり、DSGb5糖脂質を生合成する実験系を構築し、その生合成に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖生物学的な観点からNK細胞におけるimmune check point阻害を解析する点に、学術的な特色・特徴があるものとする。また、*in vitro*ではすでにDSGb5とSiglec-7とのinteractionの抑制により、NK細胞の殺細胞効率の上昇が得られていることから、われわれが提案する新規治療薬が臨床の場において、これまでの治療薬に加え、さらなる抗腫瘍効果が得られる予想している。この研究の結果が切除不能腎癌患者のQOLの向上と、予後のさらなる延長をもたらす可能性があることに意義があるものとする。

研究成果の概要(英文)：We reported new immunotherapy with activated NK cells therapy by regulating glycoantigen DSGb5 on renal cancer cells. However, when there was small expression of DSGb5 of tumor we found that anticancer effect by activated NK cells was so restricted. We faced difficult task to quantify DSGb5 expressing on renal cancer cells to select the patients adaptable to activated NK cells therapy. Therefore, we needed to quantify glycoantigen DSGb5 on renal cancer cells. DSGb5 consists of carbohydrate chain and sphingolipid which have variety of fatty acids. First of all, we estimated expression level of DSGb5 by calculating 8 fatty acids with 16 carbons to 26 carbons. However, standard substance of DSGb5 were necessary to accurately quantify DSGb5 of tumor. And then we established experimental system of chemical synthesis of DSGb5, at last we were able to synthesize DSGb5 chemically to accurately quantify by mass spectrometer.

研究分野：腎細胞癌診断治療

キーワード：腎細胞癌 DSGb5 NK細胞 精密定量測定 免疫治療

1. 研究開始当初の背景

本研究は糖鎖生物学的観点から、がん免疫の活性化による泌尿器癌に対する新規治療薬の構築を目指した基礎研究である。これまでの泌尿器癌における糖鎖抗原の研究から、腎癌細胞において長鎖のガングリオシド(シアル酸を有する糖脂質)の発現増加は、予後悪化の因子であると報告してきた(Saito S, et al. Jpn J Cancer Res. 1997)。Disialosyl Globopentaosylceramide (DSGb5) 糖鎖は、新規に同定した長鎖のガングリオシドのひとつである。この DSGb5 糖鎖は7つの単糖より構成され、うちふたつはシアル酸という特異な役割をもつ単糖が含まれている。

一方、Sialic acid-binding immunoglobulin-type lectin (Siglec) は、シアル酸を認識し結合する分子として知られている。Siglec は1型膜貫通タンパク質であり、N末端の免疫グロブリン様領域がシアル酸の認識に最も重要であることもわかってきた。さらに、Siglec は十数種類のサブタイプが存在し、そのいくつかは他の免疫担当細胞の細胞膜上に発現していることがわかってきている。そこで、われわれはこれまでの研究から、Siglec-7 がNK細胞表面に発現する ligand として DSGb5 と結合することを明らかにした。また、DSGb5 と Siglec-7 との結合を介して、NK細胞の細胞傷害活性が抑制されることを報告し(Kawasaki Y, et al. Glycobiology. 2010)、さらに、腎癌細胞に発現する DSGb5 を knockdown することにより、DSGb5 と Siglec-7 との interaction を低減させることで、NK細胞のがん免疫を活性化させ、腎癌細胞に対する細胞傷害能を有意に増強できることを確認している(Kawasaki Y, et al. Glycobiology. 2010)。腎癌細胞上の DSGb5 の発現を knockdown することにより、NK細胞の殺細胞効率が有意に増強することを明らかにした(図2)。

2. 研究の目的

DSGb5 と Siglec-7 の interaction を制御する、NK細胞における免疫チェックポイント阻害薬(immune check point inhibitor)となりえる新規分子標的薬を構築することで、切除不能腎癌患者の予後を改善することがこの研究の最終的な目的である。

3. 研究の方法

NK細胞の免疫チェックポイント阻害薬となり得る抗 DSGb5 抗体の絞り込みが必要である。すでに、モノクローナル抗体を確立しているが、構造解析等により DSGb5 の親和性について更なる検証を予定している。いくつかの候補となる抗 DSGb5 抗体が絞り込み、*in vitro* における腎癌細胞およびNK細胞に対する抗 DSGb5 抗体の影響を解析する。

また、同時に *in vivo* における実験系を計画し、動物実験モデルを作成する。*in vitro* の実験結果を基に最適な実験系を確立したのち、*in vivo* における抗 DSGb5 抗体の抗腫瘍効果および有害事象等を評価する。*in vivo* において、安定した効果が確認できれば、臨床研究に向けた研究計画の作成を予定する。

4. 研究成果

これまでの研究で、腎腫瘍全体として、DSGb5 糖鎖抗原の発現量が小さい場合は、NK細胞を賦活化させた効果が非常に限定的なものとなってしまうと予想された。発現量の多い症例を新規免疫療法の適応とするため、腎細胞癌の DSGb5 糖鎖抗原の定量という課題に直面した。そこで、質量分析器による試料中の糖鎖抗原の定量に着手した。

DSGb5 糖鎖は糖脂質であり、これに含まれるスフィンゴ糖脂質はセラミド部分の脂肪酸および糖鎖の配列部分に多様性を有する。これまでの抗体は糖鎖をエピトープとして認識するため、脂肪酸配列については不明である。こうした分子種を識別して精密に同定しつつ、定量的に解析する手法として液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法(LC/MS/MS)を用いることにした。試行錯誤の結果、腎癌細胞株培養上清において、炭素数16から26までの異なる脂肪酸鎖8種を測定対象に設定することで、DSGb5 糖鎖を理論値からほぼ定量できると推測された。しかし、定量測定には標準物質が不可欠であり、標品としての DSGb5 糖脂質を入手する必要があった。

上述のように、DSGb5 糖鎖は7つの単糖より構成され、その生合成は複雑であり、現時点で市販されていない。よって、化学合成により DSGb5 糖鎖を生合成する実験系を構築した。DSGb5 糖脂質の生合成に成功し、さらに、合成過程で中間生成物である MSGb5 糖鎖などい

くつかの有用な糖脂質も合成することができた。

以上により、多くの試料および検体において、DSGb5 糖脂質の定量測定が可能となっている。また、ファージディスプレイ法を用いた、抗 DSGb5 抗体の作成にも取り掛かっており、今後、患者検体の測定による臨床研究への応用が期待でき、NK 細胞による新規免疫治療の適応症例を検索しうると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Tomonori, Kawasaki Yoshihide, Maekawa Masamitsu, Takasaki Shinya, Saigusa Daisuke, Ota Hideki, Shimada Shuichi, Yamashita Shinichi, Mitsuzuka Koji, Yamaguchi Hiroaki, Ito Akihiro, Kinoshita Kengo, Koshiba Seizo, Mano Nariyasu, Arai Yoichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Value of global metabolomics in association with diagnosis and clinicopathological factors of renal cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Tomonori, Kawasaki Yoshihide, Maekawa Masamitsu, Takasaki Shinya, Shimada Shuichi, Sato Masahiko, Naoki Kawasmorita, Yamashita Shinichi, Mitsuzuka Koji, Mano Nariyasu, Ito Akihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Accurate quantification of urinary metabolites for predictive models manifest clinicopathology of renal cell carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14440	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤友紀
2. 発表標題 Value of global metabolomics in association with diagnosis and clinicopathological factors of renal cell carcinoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤友紀
2. 発表標題 メタボロミクスを用いた腎癌細胞のSunitinib耐性獲得機構の解明
3. 学会等名 第28回泌尿器分子細胞研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荒井 陽一 (Arai Yoichi) (50193058)	東北大学・医学系研究科・名誉教授 (11301)	
研究分担者	佐藤 信 (Sato Makoto) (70282134)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	伊藤 明宏 (Ito Akihiro) (70344661)	東北大学・医学系研究科・教授 (11301)	
研究分担者	三塚 浩二 (Mitsuzuka Koji) (80568171)	東北大学・医学系研究科・准教授 (11301)	
研究分担者	泉 秀明 (Izumi Hideaki) (80722545)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	
研究分担者	嶋田 修一 (Shimada Shuichi) (80749218)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	
研究分担者	佐藤 琢磨 (Sato Takuma) (80804856)	東北大学・医学系研究科・助教 (11301)	