

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22570131

研究課題名(和文) 癌細胞表面に発現した分枝型O-グリカンによる宿主免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文) Immune evasion mechanisms from NK immunity by cancer cell-surface O-glycans

研究代表者

坪井 滋 (Tsuboi, Shigeru)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20526727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：体内に生じた癌細胞を排除する免疫細胞の主要なものがNK細胞である。しかしながら、癌細胞がこのNK細胞の攻撃から逃避する能力を獲得すると、その癌細胞は体内で長く生存できるようになり、転移の原因になると考えられている。われわれは、ある種の癌細胞が、今までに知られていなかった新しい仕組みを使ってNK細胞の攻撃から逃避していることを発見した。これらの癌細胞では、細胞表面に付加している糖が、特殊なタイプの糖に変わっているため、NK細胞による攻撃から逃避できるようになったことを明らかにした。また、癌細胞が、転移先の臓器でどのようにして血管から脱出するのか、その機構の解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：Most cancer cells are rejected by host tumor immunosurveillance systems. NK cells are the major effector lymphocytes in tumor rejection responses. However, malignant cancer cells take various strategies to evade tumor rejection systems by NK cells. Those cancer cells survive longer in host, resulting in the promotion of metastasis. We have identified a new immune evasion strategy by cancer cells. Some cancer cells use a certain type of cell-surface carbohydrates to evade NK cell attack, thereby increasing the chance to metastasize. In addition, we discovered a novel cell biological mechanism underlying the extravasation of metastatic cancer cells from blood vessels of the metastasis target organ.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：癌転移 腫瘍免疫 NK細胞 糖鎖生物学

1. 研究開始当初の背景

癌患者の死亡の直接的原因の多くは、他臓器への転移、再発である。したがって、転移を抑制することができれば、多くの癌患者の命を救うことができる。転移を抑える薬剤、および、治療法を開発するために、癌の転移の過程をより深く理解しようとする努力が、多くの研究者によって続けられている。

われわれのグループでは、癌細胞表面にコア2 O-グリカンと呼ばれる糖鎖が発現すると、癌は宿主内で長く生存できるようになることを見出した。このような癌細胞は、やがて浸潤性を獲得し、高頻度で転移する。しかしながら、コア2 O-グリカン高発現癌細胞の宿主内生存戦略、および、浸潤・転移促進機構は不明であった。

コア2 O-グリカンの生合成の鍵となる反応段階は、ガラクトース (Gal) と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) からなる二糖 (Gal β 1-3GalNAc) の GalNAc に、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を付加させて枝分かれ構造を形成する反応である。この反応を触媒する糖転移酵素は、コア2 β -1,6-GlcNAc 転移酵素 (C2GnT) と呼ばれ、コア2 O-グリカン発現は、この酵素の発現によって調節されている。

C2GnT の発現は、癌細胞の生育速度や細胞運動には、まったく影響を与えなかった。そこで、われわれは、C2GnT 発現癌細胞は、宿主の免疫システムから逃避する能力を獲得しており、その結果として転移を起こしやすくなったのではないかと考えた。血管内への侵入を果たした癌細胞の多くは、通常、体内を循環している間に、様々な宿主の免疫システムによって排除される。この免疫システムのうち、最も主要なものがナチュラル・キラー細胞 (NK 細胞) による癌細胞への攻撃・排除である。NK 細胞は、前感作なしに、体内で出会った様々な標的細胞 (侵入した外来の細胞、癌化した細胞、ウィルス感染細胞、スト

レスを受けて変性した細胞など) を攻撃し、排除することができる。ヒト末梢血から単離した NK 細胞を用いて、C2GnT 高発現細胞と低発現細胞に対する NK 細胞の細胞傷害活性を比較してみた。すると、C2GnT の高発現と、その癌細胞の NK 細胞による攻撃から逃避する能力とが相関していることがわかった。そこで、われわれは、C2GnT を高発現する癌細胞が、どのようにして宿主 NK 細胞による攻撃から逃避しているのか、その逃避機構の解明に焦点を絞った。また、浸潤性の高い膀胱癌は、極めて高い頻度で血管から肺組織に浸潤して肺転移を成立させることから、浸潤性膀胱癌の浸潤機構の解明にもフォーカスした。

2. 研究の目的

われわれのグループは、以下2点を解明する目的で研究を行った。

- (1) コア2 O-グリカン高発現癌細胞による NK 免疫逃避機構の解明。
- (2) コア2 O-グリカン高発現浸潤性膀胱癌が血管から脱出して肺組織へ浸潤する分子機構の解明

3. 研究の方法

- (1) コア2 O-グリカン高発現癌細胞による NK 免疫逃避機構の解明のための研究方法

コア2 O-グリカンを高発現する膀胱癌細胞、および、前立腺癌細胞と発現を抑制させた膀胱癌細胞、および、前立腺癌細胞を、それぞれ調製し、両者の NK 免疫に関わる分子の生化学的解析を行った。さらに、免疫細胞に対する抵抗性、および、生化学的性状を詳細に比較した。

- (2) コア2 O-グリカン高発現浸潤性膀胱癌が血管から脱出して肺組織へ浸潤する分子機構の解明のための研究方法

低浸潤性膀胱癌細胞 KK-47 の集団のなか

から、マウスを用いた肺転移系を利用して、血管外脱出して肺に浸潤する活性の高い膀胱癌細胞亜集団 KK-47HM4 を得た。KK-47 と KK-47HM4 の性状、および、遺伝子発現を比較することによって血管外脱出過程・浸潤過程に深く関わる遺伝子を同定し、細胞生物学的解析を行うことによって浸潤性膀胱癌の浸潤過程の分子機構解明を行った。

4. 研究成果

(1) コア2-O-グリカン高発現癌細胞によるNK免疫逃避機構の解明

コア2-O-グリカンの腫瘍リガンドマスキング効果の発見

NK細胞による、重要な腫瘍排除機構は、NKレセプターと腫瘍リガンドの相互作用による癌細胞排除機構である。癌細胞の排除に最も重要な働きをするのが、NK細胞活性化レセプターの一つ、Natural Killer group 2 member D (NKG2D) である。NKG2Dと相互作用する癌細胞側のリガンドは、MHC class I-related chain A (MICA) である。C2GnT発現癌細胞は、以下に述べる機構によって、腫瘍排除システムを弱め、NK細胞の攻撃から逃れていることが明らかになった。C2GnT発現癌細胞上のMICAのNKG2D結合部位に多数のコア2-O-グリカンが付加している。そして、これらのコア2-O-グリカンは、ポリラクトサミン鎖伸長の足場となり、このポリラクトサミンにガレクチン-3が結合している。MICA分子上のNKG2D結合部位に起こったポリラクトサミンとガレクチン-3の修飾によって、腫瘍リガンドであるMICAはマスクされ、NKG2DのMICAに対する親和性が著しく低下する。このように、コア2-O-グリカンによって腫瘍リガンドがマスキングされ、NK細胞の活性化が抑制され、NK細胞による癌細胞排除機構が弱められてしまい、癌細胞は血中でより長く生存できるようになり、高頻度の転移につながる(発表論文番号7)(図1)。

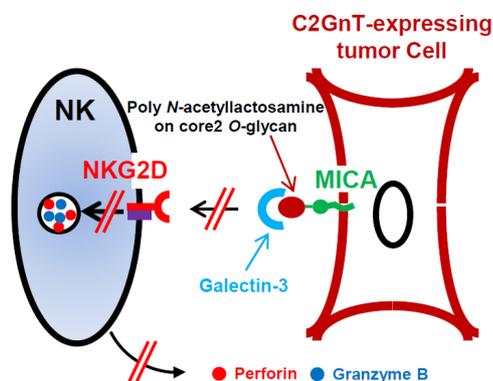


図1コア2-O-グリカンによる腫瘍リガンド・マスキング効果

コア2-O-グリカンによる分子シールド効果の発見

NK細胞が持つもう一つの腫瘍排除機構は、腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド (tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)) による癌細胞排除である。NK細胞上に発現している TRAIL は、癌細胞上に発現している death receptor (例えば DR4 など) と相互作用することによって、癌細胞に直接アポトーシスを起こさせる作用を持っている。C2GnT発現癌細胞では、細胞表面のムチン1(MUC1)は、多数のコア2-O-グリカンによって修飾されており、ポリラクトサミン鎖合成の足場を提供する。生化学的解析の結果、MUC1のコア2-O-グリカンは、ポリラクトサミンで修飾されており、さらに、β-ガラクトシド結合性動物レクチンの一つ、ガレクチン-3が、そのポリラクトサミンを介してMUC1に結合しているということがわかった。MUC1は、癌細胞表面で最も突出した分子の一つであるため、このようにポリラクトサミンとガレクチン-3で修飾された癌細胞表面でコア2-O-グリカンが分子シールドとして働き、NK細胞のTRAILを介した癌細胞排除機構を弱めている(発表論文番号5,6)(図2)。

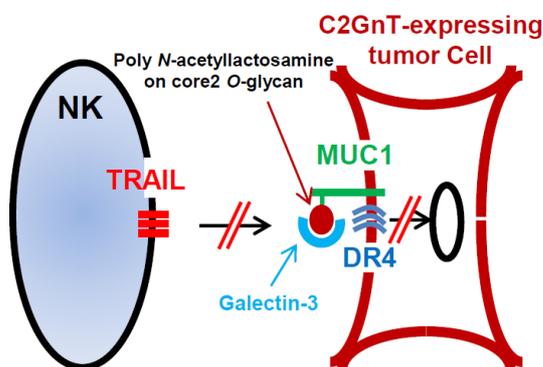


図2コア2 O-グリカンによる分子シールド効果

(2) コア2 O-グリカン高発現浸潤性膀胱癌が血管から脱出して肺組織へ浸潤する分子機構の解明低浸潤性膀胱癌細胞 KK-

浸潤性膀胱癌細胞が血管外へ脱出して肺組織に浸潤していくための分子機構に関し、以下の成果を得た。

浸潤性膀胱癌細胞は、細胞外基質を分解して浸潤していくために、浸潤突起と呼ばれる繊維状アクチンに富む膜構造を形成する(発表論文番号9)。

浸潤突起形成には FBP-17 と呼ばれる膜変形を行うタンパク質の発現が必須の役割を果たす(発表論文番号8)。

浸潤突起形成は、膀胱癌が血管外へ脱出する過程、および、膀胱から筋層へ浸潤する過程に必要であった(発表論文番号2,3)。

高浸潤膀胱癌細胞 KK-47HM4 細胞は、血管外脱出過程が亢進していた(発表論文番号4)。

高浸潤膀胱癌細胞で発現が亢進していたピメンチン、プレクチンは、浸潤突起形成のための足場を形成し、血管外脱出に必須の役割を果たしていた(発表論文番号1)。

5. 主な発表論文等
[雑誌論文](計13件)

1. Sutoh Yoneyama, M., Hatakeyama, S., Habuchi, T., Inoue, T., Nakamura, T., Funyu, T., Wiche, G., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis. **European Journal of Cell Biology** 2014 in press (査読有り)
DOI: 10.1016/j.ejcb.2014.03.002
2. Imanishi, K., Sutoh Yoneyama, M., Hatakeyama, S., Yamamoto, H., Koie, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Nakamura, T., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** Invadopodia play an essential role in transendothelial invasion during muscle invasion of bladder cancer cells. **Molecular Medicine Reports** 2014 in press (査読有り)
DOI:10.3892/mmr.2014.2113
3. Tokui, N., Sutoh Yoneyama, M., Hatakeyama, S., Yamamoto, H., Koie, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Nakamura, T., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** Extravasation during bladder cancer metastasis requires cortactin-mediated invadopodia formation. **Molecular Medicine Reports** 9: 1142-1146, 2014.(査読有り)
DOI: 10.3892/mmr.2014.1965
4. Sugiyama, N., Sutoh Yoneyama, M., Hatakeyama, S., Yamamoto, H., Okamoto, A., Koie, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Nakamura, T., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** *In vivo* selection of high-metastatic subline of bladder cancer cell and its

- characterization. **Oncology Research** 20: 289-295, 2013 (査読有り) DOI: 10.3727/096504013X13639794277644
5. Okamoto, T., Sutoh Yoneyama, M., Hatakeyama, S., Mori, K., Yamamoto, H., Koie, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Fukuda, M., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** Core2 O-glycan-expressing prostate cancer cells are resistant to NK cell immunity. **Molecular Medicine Reports** 7: 359-364, 2013. (査読有り) DOI: 10.3892/mmr.2012.1189
 6. Suzukuki, Y., Sutoh, M., Hatakeyama, S., Mori, K., Yamamoto, H., Koie, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Habuchi, T., Arai, Y., Fukuda, M., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** MUC1 carrying core 2 O-glycans functions as a molecular shield against NK cell attack, promoting bladder tumor metastasis. **International Journal of Oncology** 40: 1831-1838, 2012. (査読有り) DOI: 10.3892/ijo.2012.1411
 7. **Tsuboi, S.**, Sutoh, M., Hatakeyama, S., Hiraoka, N., Habuchi, T., Horikawa, Y., Hashimoto, Y., Yoneyama, T., Mori, K., Koie, T., Nakamura, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Fukuda, M. and **Ohyama, C.** A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumours expressing core2 O-glycans. **EMBO Journal** 30: 3173-3185, 2011 (査読有り) DOI:10.1038/emboj.2011.215
 8. Yamamoto, H., Sutoh, M., Hatakeyama, S., Hashimoto, Y., Yoneyama, T., Koie, T., Saitoh, H., Yamaya, K., Funyu, T., Nakamura, T., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** Requirement for FBP17 in invadopodia formation by invasive bladder tumor cells. **Journal of Urology** 185: 1930-1938, 2011. (査読有り) DOI: 10.1016/j.juro.2010.12.027
 9. Sutoh, M., Hashimoto, Y., Yoneyama, T., Yamamoto, H., Hatakeyama, S., Koie, T., Okamoto, A., Yamaya, K., Saitoh, H., Funyu, T., Nakamura, T., Sato, T., **Ohyama, C.** and **Tsuboi, S.** Invadopodia formation by bladder tumor cells. **Oncology Research** 19: 85-92, 2010. (査読有り) DOI: 10.3727/096504010X12875107808008
 10. **坪井 滋**, **畠山真吾**, **大山 力** O-グリカンによる膀胱癌の新規免疫逃避機構 病理と臨床 31(8): 868-874, 2013 (依頼執筆のため査読無し)
 11. **Tsuboi, S.** Immunosuppressive functions of core2 O-glycans against NK immunity. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 25(143): 117-123, 2013 (査読有り) DOI:10.4052/tigg.25.117
 12. **Tsuboi, S.** Tumor defense systems using O-glycans. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 35(10): 1633-1636, 2012. (査読有り) DOI: 10.1248/bpb.b12-00367
 13. **Tsuboi, S.**, Hatakeyama, S., **Ohyama, C.** and Fukuda, M. Two opposing roles of O-glycans in tumor metastasis.

Trends in Molecular Medicine 18:

224-232, 2012. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.molmed.2012.02.001

〔学会発表〕(計 9 件)

1. **坪井 滋** 糖鎖を利用した癌細胞自己防御システム 東北薬科大学分子生体膜研究所戦略的研究基盤形成支援事業シンポジウム 平成 24 年 11 月 3 日 東北薬科大学 仙台
2. **Tsuboi, S.** Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodium, facilitating cancer cell invasion Invadosome 2013 Cell Migration and Invasion in Physiology and Pathology 平成 25 年 10 月 15 日 Radboud University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

〔図書〕(計 1 件)

Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes

Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein

beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 1 (GCNT1) (C2GnT-L) and Beta-1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein

beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 (GCNT4) (C2GnT-T)

Shigeru Tsuboi (分担執筆)(査読有り)

Eds. by Naoyuki Taniguchi, Koichi Honke, Minoru Fukuda, Hisashi Narimatsu, Yoshiki Yamaguchi and Takashi Angata 2014 Springer

<http://www.springerreference.com/docs/html/chapterdbid/332082.html>

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:特許権

発明者:大山 力、坪井 滋

権利者:弘前大学

種類:特許権

番号:特願 2010-182641

出願年月日:平成 22 年 8 月 17 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

坪井 滋

弘前大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号: 20526727

(2)研究分担者

大山 力

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 80282135

(3)連携研究者

西村紳一郎

北海道大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 00183898