

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06989

研究課題名(和文) 癌細胞のO-グリカン修飾変化によるCTL腫瘍免疫逃避機構の解明

研究課題名(英文) A novel mechanism for evasion of CTL immunity by altered O-glycosylation

研究代表者

坪井 滋 (TSUBOI, Shigeru)

弘前大学・医学研究科・客員研究員

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

研究成果の概要(和文)：われわれの体には、がん細胞の増殖、転移を抑えるための免疫(腫瘍免疫)が備わっている。ところが、がん細胞の集団の中には、この腫瘍免疫を逃避して増殖するがん細胞が存在し、そのようながん細胞が最終的にわれわれを死に至らしめる。本研究は、リンパ節に転移した膀胱癌に焦点を絞り、転移膀胱癌がどのようにして腫瘍免疫から逃避しているのか、その逃避機構明らかにすることを目的とした。研究の結果、膀胱癌細胞は、細胞表面のタンパク質に付いている糖を変化させることで、免疫細胞の攻撃から逃避していることが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：We have tumor immunity to suppress cancer cell proliferation and metastasis. However, cancer exerts the versatile immune evasion strategies to predominate over tumor immunity. A series of our studies revealed that bladder cancer cells evade each tumor immune system by different evasion strategies using altered glycosylation. A glycosyltransferase, C2GnT forms a branched structure called core 2 O-glycans on cell-surface glycoproteins. To elucidate the roles of core 2 O-glycans in bladder cancer metastasis, we analyzed C2GnT expression in lymph node, a target organ. We showed that bladder cancer cells evade tumor immune system by cytotoxic T lymphocyte (CTL) by downregulating C2GnT expression. C2GnT-negative cancer cells evade CTL attack, resulting in indefinite proliferation in lymph node.

研究分野：細胞生物学

キーワード：腫瘍免疫 細胞傷害性Tリンパ球 膀胱癌 転移

1. 研究開始当初の背景

われわれが持つ2種類の腫瘍免疫系のうち、転移した癌の増殖を抑えるために主要な働きを担うのは細胞傷害性Tリンパ球(CTL)によるCTL腫瘍免疫である。これまでに明らかにされているCTL腫瘍免疫逃避機構の主なものは、1)癌抗原の消失 2)抗原処理提示分子の消失 3)免疫抑制性サイトカイン発現などである。しかしながら、これらの逃避機構が誘導されてくるメカニズムや、新規の逃避機構については、まだよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

がんを制圧するためには、癌細胞がCTL腫瘍免疫から逃避する機構をすべて解明し、それを克服することが不可欠である。癌細胞は、様々な逃避機構を用いて、宿主のCTL腫瘍免疫反応から逃避している。CTLは、原発組織のほか、転移先臓器でがん細胞を排除したり、腫瘍が増大したりするのを防ぐ役割を担っている。がん細胞は、細胞表面に発現しているヒト白血球抗原(HLA) (MHCクラスI(ヒト主要組織適合性複合体I))上に、がん細胞自身の抗原性のペプチド(がん抗原ペプチド)を提示している。宿主体内で、このがん細胞上のHLAとペプチドの複合体を特異的に認識するT細胞レセプターを持つT細胞(CTL)が誘導される。宿主内で、このCTLががん細胞を攻撃し、排除する。私たちは、CTL腫瘍免疫とコア2 O-グリカンの関係を明らかにするために、リンパ節に転移した膀胱癌細胞のコア2 O-グリカン生合成の鍵となる糖転移酵素、C2GnTの発現を調べてみた。すると、原発組織や血中の場合とは全く逆に、C2GnT発現の陽性の膀胱癌細胞よりも、C2GnT発現の陰性の膀胱癌細胞の方が、リンパ節転移巣での増殖能が高かった。この結果は、コア2 O-グリカン発現陰性膀胱癌細胞が、CTL腫瘍免疫から逃避していることを示唆している。われわれは、癌細胞が細胞表面のO-グリカンの糖鎖修飾変化を利用してCTL腫瘍免疫を逃避していることを見出した。本研究では、この新規の腫瘍免疫逃避機構の全容を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

この新規免疫逃避機構は、O-グリカン修飾の変化が、癌細胞の抗原提示機能を低下させた結果であると考えられる。この機構の詳細を明らかにするために、以下の実験を行った。そこでわれわれは、C2GnTを高発現する膀胱癌細胞YTSと、C2GnT発現を抑制させた膀胱癌細胞YTS-C2KDを調製し、以下の実験を行った。

- (1) O-グリカン修飾の変化によるHLA-A分子の細胞表面表出量の比較
- (2) O-グリカン修飾の変化によるHLA-A分子の細胞内輸送過程の解析
- (3) O-グリカン修飾の変化によるHLA-A分子と抗原ペプチドとの親和性比較
- (4) C2GnT発現抑制膀胱癌細胞によるCTL腫瘍免疫抵抗性の*in vivo*における検討
- (5) HLA-A分子のO-グリカンの構造解析と比較

4. 研究成果

- (1) コア2 O-グリカン生合成の鍵となる糖転移酵素、C2GnTの発現を抑制すると癌抗原ペプチドを提示するHLA-A24分子の細胞表面表出量は低下した。(2) C2GnT発現を抑制するとHLA-A24分子は、速やかに細胞内に取り込まれ、エンドソーム経路でリソソームに入り、分解された。(3) HLA-A24のC末端にFLAGのタグを付け、コア2 O-グリカンで修飾されたHLA-A24-FLAG-C2と修飾されていないHLA-A24-FLAGをそれぞれ調製した。各HLA-A24の抗原ペプチドに対する親和性をBIACOREを用いて比較した結果、コア2 O-グリカン修飾は、HLA-A24とペプチドとの親和性に影響しないことが示された。
- (4) NOGマウスを用いた*in vivo*の実験の結果、YTSよりもYTS-C2KDの方が高い肺転移性を示した。(5) トマトレクチンを用いた実験の結果から、HLA-A24-FLAG-C2のコア2 O-グリカンには、Gal 1-4GlcNAcの繰り返し構造から成るポリラクトサミン鎖が付加していることがわかった。また、HLA-A24に対する生化学的解析の結果、HLA-A24の187番目のスレオニンがO-グリコシレーションのサイトであることがわかった。C2GnT陽性癌細胞では、このスレオニンにコア2

O-グリカンが付加し、それを足場としてポリラクトサミン(PLA)鎖が伸長し、そのポリラクトサミンにガレクチン-3が結合していることが明らかになった。細胞表面では、このポリラクトサミン鎖にガレクチン-3が結合し、別の細胞表面分子との間に分子格子(Molecular Lattice)を形成していた。C2GnT発現が低下した癌細胞では、この分子格子形成が起きていなかった。このため、HLA-A24の細胞表面での表出量が著しく低下していた。C2GnT陰性膀胱癌は、上記の機構でHLA-A24の細胞表面表出量、および、がん抗原ペプチドの提示量を低下させる。その結果、そのがん抗原ペプチド-HLA-A24複合体を認識するCTLの攻撃から逃避するという新しい癌の免疫逃避機構を明らかにすることができた。

さらに、本研究の成果として、がんの免疫編集に糖鎖が関わっていることを初めて明らかにしたことが挙げられる。近年、がんの免疫監視機構に関する研究が大きな進歩を遂げている。それと同時に、免疫システムが、がん細胞の集団の中から免疫原性の高いがん細胞を排除することにより、結果的に免疫原性の低いがん細胞を増殖させ、がんの進展を促進するという、「がんの免疫編集」という現象の存在が明らかになった。私たちは、膀胱癌が、O-グリカンの修飾変化を利用して免疫監視機構を逃避し、腫瘍の進展を促進させている仕組みを明らかにした。これは細胞表面糖鎖が関与するがんの免疫編集の一例であると考えられる。がん細胞の集団には、様々に変異を蓄積させたヘテロながん細胞が含まれる。原発組織や血中に広がったがん細胞に対して働くエフェクター細胞は、主としてNK細胞である。膀胱癌細胞集団の中のC2GnT陰性癌細胞は、NK細胞により排除されるが、C2GnT陽性癌細胞は、上記のメカニズムでNK細胞による攻撃から逃避して生き残り、NK腫瘍免疫による免疫編集が起きる。生き残ったC2GnT陽性癌細胞は、再び様々に変異を蓄積させた癌細胞の集団となり、他の臓器に転移し、増殖しようとする。しかしながら、転移先臓器では、宿主の免疫監視機構により、その癌細胞に対して感

作を成立させた特異的CTLが、C2GnT陽性癌細胞を攻撃する。C2GnT陽性膀胱癌細胞は、CTLにより排除されるが、ここで今度は、C2Gn陰性癌細胞がCTLの攻撃を上記のメカニズムで逃避して生き残り、CTL腫瘍免疫による免疫編集が起きる。このC2GnT陰性癌細胞は、NK細胞による免疫編集を受けた後に、再び、生き残った癌細胞集団の中に生じてきたものと考えられる。転移先臓器で盛んに増殖する癌細胞に対しては、NK腫瘍免疫は働かないと考えられている。したがって、転移先でCTLの攻撃を逃避できるようになった癌細胞(CTLによる免疫編集を受けた後の癌細胞)は、無制限に増殖し、やがて宿主を死に至らしめる。以上述べたように、膀胱癌細胞集団は、O-グリカンの糖鎖の修飾変化を利用して、異なるエフェクター細胞、NK細胞、CTLの攻撃に対し、それぞれから逃避できる免疫原性の低い細胞を常に生存させる。このようにして、がん細胞は常に免疫システムを逃避して免疫原性の低い細胞を生き残らせて腫瘍の進展を図る。

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 1件)

1. A mechanism for evasion of CTL immunity by altered O-glycosylation of HLA class I

Mihoko Sutoh Yoneyama, Yuki Tobisawa², Shingo Hatakeyama, Misaki Sato, Kiyoshi Tone, Yota Tatara, Ikuo Kakizaki, Tomihisa Funyu, Minoru Fukuda, Chikara Ohyama and Shigeru Tsuboi

Journal of Biochemistry (2017);16(6):479-492
(査読あり)

[学会発表](計 1件)

1. O-グリカン修飾変化を利用した新規 CTL腫瘍免疫逃避機構

米山 美穂子、飛澤 悠葵、畠山 真吾、佐藤 美紗季、刀禰 亀代志、多田羅 洋太、柿崎 育子、舟生 富寿、福田 穰、星 宣次、大山 力、坪井 滋

第 11 回東北糖鎖研究会・GlycoTOKYO 2017
平成 29 年 11 月 18 日群馬県桐生市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 滋 (TSUBOI, Shigeru)
弘前大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号：20526727

(2) 研究分担者

大山 力 (OHYAMA, Chikara)
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

柿崎育子 (KAKIZAKI, Ikuko)
弘前大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：80302024

(4) 研究協力者

()