

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：33910

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15080

研究課題名(和文) シグレックとシアル酸含有糖鎖が生成する自然免疫チェックポイントの機構解明

研究課題名(英文) Mechanisms for innate immune check-point generated by siglecs and sialic acid-containing carbohydrates

研究代表者

古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：80211530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)： 癌細胞膜上のシアル酸含有癌関連糖鎖が癌細胞の悪性形質に関与する一方で、自然免疫系のNKや単球・マクロファージの表面にはシグレック7や9等のシアル酸認識レクチンが発現し、その相互作用の意義解明と治療応用を目指した。シグレックが認識する糖鎖構造とその結合分子を解析し、シグレック7がGD3等のジシアルリル糖脂質やトリシアル化糖鎖結合タンパク質を認識することを示した。また、シグレック7を介するシグナルがNK活性を抑制することを示した。さらに、脂質セラミドの長鎖塩基4位のCが水酸化を受けたGD3はシグレック7に認識されないこと、水酸基を有するセラミド含有糖脂質は、raft局在性が低いことを示した。

研究成果の概要(英文)： Sialic acid-containing cancer-associated carbohydrates are involved in the malignant properties of tumor cells, while innate immune cells such as NK and monocyte-macrophages express sialic-acid-recognizing lectins such as siglec-7 and 9. Then, significance and application for therapeutics of their interaction have been analyzed.

Analyses of carbohydrate structures recognized by siglecs and of their carrier molecules were performed, showing that siglec-7 recognized disialyl glycolipids such as GD3, and tri-sialylated carbohydrate-conjugated proteins. It was also shown that signals mediated by siglec-7 suppressed NK activity. Furthermore, it was demonstrated that GD3 with hydroxylated long chain base at C4 was not recognized by siglec-7, and also glycolipids containing hydroxylated ceramides scarcely localized in lipid rafts.

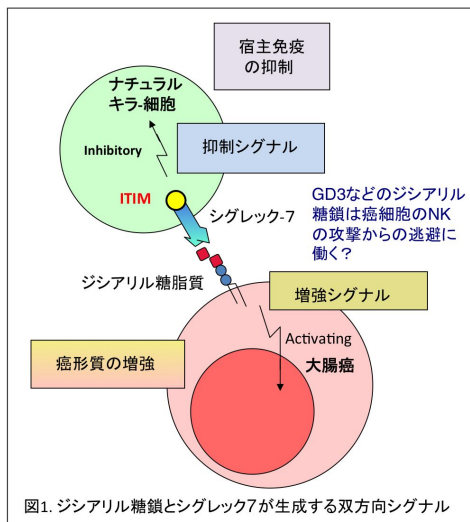
研究分野：病態生化学

キーワード：シグレック 自然免疫 シアル酸 チェックポイント 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌細胞膜表面にはシアル酸を含む癌関連糖鎖が発現し、細胞増殖、浸潤、転移などの癌細胞の悪性形質に関与することが示されてきた。一方、自然免疫系細胞であるNKや単球・マクロファージの表面には、シグレック7あるいは9という名の、シアル酸認識受容体(レクチン)が発現しており、シグレックと認識糖鎖との相互作用により生成されるシグナルが、免疫系細胞にはITIMモチーフを介した抑制性シグナルが導入されること、糖鎖を発現する癌細胞においては、その悪性シグナルが増強されることが示唆されてきた。

(2) 各々のシグレックファミリーが認識する糖鎖構造の特異性や結合メカニズム、シグレックと認識糖鎖との相互作用により生成される、免疫細胞および癌細胞内の双方向シグナルと、その意義に関して、十分な理解が得られていなかった(図1)。



2. 研究の目的

(1) 本研究では、これらのシグレック受容体と認識糖鎖との相互作用のメカニズムと意義につき、免疫細胞および癌細胞の両サイドから解明する。

(2) これらの成果をふまえて、自然免疫チェックポイントの阻害に基づく癌の治療応用

への可能性を明らかにすることを目指した(図2)。

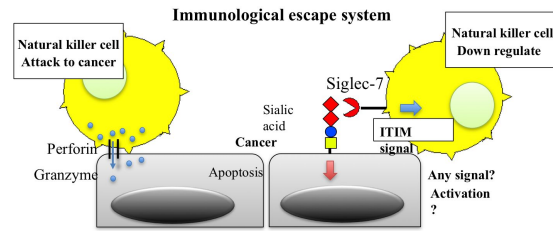


図2. シグレック7と認識糖鎖の相互作用に基づく免疫監視機構エスケープ

3. 研究の方法

(1) まず実験の対象として、ガングリオシドを発現するアストロサイトーマ細胞株AS、シグレック7の認識糖鎖を発現しない大腸癌細胞株DLD-1にシグレック7が認識する代表的糖脂質であるGD3を発現させたDLD-GD3S(合成酵素)を樹立して用いた。さらに、長鎖塩基の4Cの水酸化酵素DES2の発現制御のためにsiRNAを導入して、標準型セラミド含有GD3の発現細胞を調製した。また、安定的に、水酸化セラミド含有糖脂質を抑制するために、DES2ノックアウトを行ったトランスフェクタントを調製して用いた。

(2) NK活性は、正常人末梢血よりFicoll-Hipaqueによって単核球を調製後、GD3発現+/-細胞に対するキリングを、市販のLDH releaseアッセイkitにより測定した。

4. 研究成果

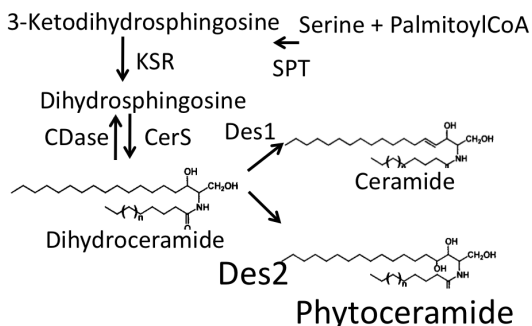
(1) 癌細胞の膜表面のシアル酸化糖鎖と、それを認識するシグレック分子との相互作用に基づく、双方向のシグナル解明のため、まず、AS細胞に対するシグレック9の作用を解析したところ、シグレック9の結合が、AS細胞内のFAKなどのシグナル分子の速やかな分解を誘導することを明らかにした。同時に、その分解が、カルパインの作用によることも示した。ところが、活性化シグナル分子について観察すると、分解を受けておらず、細胞内での分解作用の不均一性が明らかになった。結論的には、シグレック9と認識糖鎖と

の相互作用が、癌細胞の遊走性の増強に働くことが明らかになった。

(2) シグレックが認識する糖鎖構造と、その carrier 分子の同定を目指して、まずシグレック 9 により共沈する AS 細胞の膜タンパク質のプロテオミクスの解析においては、MHC 関連分子、インテグリン関連分子、細胞間接着分子等が同定された。各々の分子上に結合する糖鎖構造の解析には至っていない。

(3) シグレック 7 に関しては、GD3 などのジシアル型糖脂質とジシアル化またはトリシアル化糖鎖を結合するタンパク質が強く認識されることを明らかにした。また、NK 細胞においては、シグレック 7 を介するシグナルが NK 活性（大腸癌細胞に対する細胞傷害活性）を抑制することが示され、癌関連糖鎖が免疫監視機構からのエスケープに利用されていることが示唆された（図 2）。

(4) さらに、シグレック 7 が細胞膜に発現するガングリオシド GD3 を認識する場合に、脂質部位セラミドの化学構造が結合性に大きく関わることが明らかになった。即ち、長鎖塩基（スフィンゴシン）4 位の C が水酸化を受けている GD3 はシグレック 7 に認識されず、C4 水酸化に働く DES2 遺伝子のノックダウンあるいはノックアウト細胞で、結合性が回復することが明らかになった（図 3）。



(Omae et al., 2004)

図 3. セラミドの C4 水酸化に DES2 酵素が働く
さらに、セラミドを構成する脂肪酸において、

C2 位の水酸化が正常大腸上皮細胞の大部分に見られることが分かっているが、この水酸化の除去によっても、シグレック 7 の結合性が亢進することが分かった。これらの糖脂質のセラミド部位の化学構造がシグレック 7 の認識に関わるメカニズムを明らかにするために、種々の化学構造を有する糖脂質の細胞内局在の検討を行った。そのために、水酸基を 1 個～2 個有するセラミド含有糖脂質の、スクロース濃度勾配-超遠心法で調製したマイクロドメインへの局在性を解析したところ、水酸基を持たない糖脂質と比較して、脂質ラフト画分への局在性が乏しいことが示された。よって、シグレック 7 の糖鎖認識において糖脂質の膜上での分子クラスターの形成能が関与することが示唆された（図 4）。

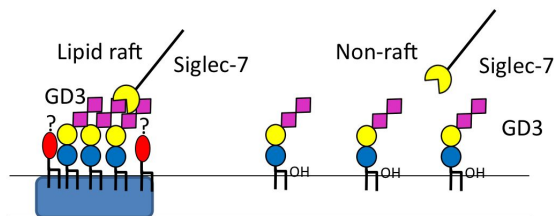


図 4. 細胞膜上での糖脂質のクラスター形成が認識に必須

(5) 結論と考察

以上の成果により、自然免疫系におけるチェックポイントのメカニズムと意義の解明が大きく進展したが、幾つかの不十分性を残している。1 点目は、自然免疫系細胞の膜表面に発現するシグレックと、癌細胞表面に発現するシアル化糖鎖糖鎖との相互作用をブロックすることで、自然免疫細胞の抗癌活性を回復させ、また癌細胞内に伝達される活性化シグナルを抑制することで、癌の免疫治療につなげることを目指してきたが、シグレックの糖鎖認識ドメイン、V-set ドメインのリコンビナントタンパク質の作成とその抗癌作用の in vitro および in vivo 実験のシステム構築がまだ途上にあることである。第 2 点は、シグレックと癌関連シアル化糖鎖との反応によって、癌細胞に導入される悪性形質

のメカニズム解析である。単球上のシグレック9が癌細胞上のジシアル化糖鎖に結合して、カルパインの活性化による癌細胞内のシグナル分子の分解誘導を示したが、カルパインの活性化メカニズムは不明のままである。今後の研究課題として：1. シグレック7の細胞外ドメインを培養細胞で発現させて、その癌細胞に対する作用を観察しつつあるので、そのタンパク質の縮小化を進めて、in vivo の実験に供しうるように展開をはかる。2. ヒト シグレックの発現マウスラインを樹立することで、in vivo におけるシグレック7と認識糖鎖の結合遮断実験系を確立して、未来の治療実験の計画に繋げたい。

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8件)

Nobutoshi Esaki, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yuhsuke Tsuda, Yuhsuke Ohmi, Robiul H. Bhuiyan, Norihiro Kotani, Koichi Honke, Atsushi Enomoto, Masahide Takahashi, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: ASCT2 defined by enzyme-mediated activation of radical sources enhances malignancy of GD2-plus small cell lung cancer. *Cancer Science* 2018 Jan;109(1):141-153. doi: 10.1111/cas.13448 査読有

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Shuting Ji, Pu Zhang, Robiul H. Bhuiyan, Yuki Ohkawa, Ori Tajima, Noboru Hashimoto, Keiko Furukawa: Glycolipids: Essential regulator of neuro-inflammation, metabolism and gliomagenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1861, 2479-2484, 2017 doi: 10.1016/j.bbagen. 2017.06.007 査読有

Yamaguchi, T., Yamauchi, Y., Furukawa, K., Ohm, Y., Ohkawa, Y., Zhang, Q., Okajima, T., Furukawa, K.: Expression of B4GALNT1, an essential glycosyltransferase for the synthesis of complex gangliosides, suppresses BACE1 degradation and modulates APP processing. *Sci. Rep.* 6:34505, 2016, doi: 10.1038/ srep34505 査読有

Matsumoto T, Takahashi N, Kojima T, Yoshioka Y, Ishikawa J, Furukawa K, Ono K, Sawada M, Ishiguro N, Yamamoto A.: Soluble Siglec-9 suppresses arthritis in a

collagen-induced arthritis mouse model and inhibits M1 activation of RAW264.7 macrophages. *Arthritis Res Ther.* 18, 133, 2016, doi: 10.1186/s13075-016-1035-9 査読有

Kaneko K, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Kotani N, Honke K, Ogawa M, Okajima T, Furukawa K, Furukawa K.: Neogenin defined as a GD3-associated molecule by enzyme-mediated activation of radical sources confers malignant properties via intra-cytoplasmic domain in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 291, 16630-16643, 2016, doi: 10.1074/jbc.M115.708834 査読有

Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishiguro N, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A.: Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. *Bone* 83:210-219 2016, doi: 10.1016/j.bone. 2015.11.012 査読有

Bhuiyan RH, Yuji Kondo, Noriyo Tokuda, Ryota Mori, Keiko Furukawa, Koichi Furukawa: Generation of monoclonal antibodies reactive with alpha-series gangliosides by immunization of complex ganglioside-deficient mice. *Glycobiology* 26, 984-998, 2016 PMID: 27102283 査読有

Furukawa K, Ohmi Y, Kondo Y, Ohkawa Y, Tajima O, Furukawa K. Regulatory function of glycosphingolipids in the inflammation and degeneration. *Arch Biochem Biophys.* 2015 571:58-65. doi: 10.1016/j.abb.2015.02.007 査読有

[学会発表](計10件)

Koichi Furukawa, Yuki Ohkawa, Kei Kaneko, Noboru Hashimoto, Zhang Pu, Robiul H. Bhuiyan, Yuhsuke Ohmi, Keiko Furukawa: Regulation of cell signaling by ganglioside GD3/GD2 in gliomas. Keynote Lecture: Glycans in Development/Signaling. GLYCO XXIV, 2017

大川祐樹, 百田洋之, 加藤彰, 橋本登, 古川圭子, 大海雄介, 夏目敦至, 若林俊彦, 古川鋼二: グリオーマにおいてガングリオシド GD3 は PDGFR の発現を誘導する. 第 35 回 日本糖質学会年会 2016 年

張 璞, 大川祐樹, Bhuiyan RH, 百田洋介, 若林俊彦, 大海雄介, 古川圭子, 岡島徹也, 古川鋼二: GD3 は炎症性サイトカインを介してグリオーマ関連ミクログリアのM1様表現型を抑制する. 第 35 回 日本糖質学会年会 2016 年

古川圭子, 神戸真理子, 大川祐樹, 大海雄介, 竹内理香, 田島織絵, 古川鋼一: 癌関連スフィンゴ糖脂質糖鎖による細胞形質の制御. 第 89 回日本生化学会大会 2016 年

大川祐樹, 野田誠也, 百田洋之, 加藤彰, 張璞, 古川圭子, 大海雄介, 夏目敦至, 若林俊彦, 古川鋼一: グリオーマにおいて GD3 発現に伴って発現する遺伝子群の同定. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年

張璞, 大川祐樹, RH. Bhuiyan, 大海雄介, 高野舞子, 古川圭子, 古川鋼一: GD3-expressing glioma reduce M1-like phenotypes of glioma-associated microglia/macrophages via inflammatory cytokines. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年

竹内理香, 宮田麻衣子, ウプル ジャヤデワ, 田島織絵, 神戸真理子, 古川鋼一, 古川圭子: TNF と cAMP はメラノサイトにおいてメラノーマ関連糖鎖合成酵素遺伝子の発現を分別的に制御する. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年

橋本 登, 伊藤静香, 池田和貴, 土田明子, Paul R. Crocker, 古川圭子, 田口良, 古川鋼一: 癌関連糖脂質 GD3 と Siglec-7 による腫瘍免疫監視逃避機構の解明. 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年

古川鋼一, 大川祐樹, 大海雄介, 橋本登, 古川圭子: 糖脂質糖鎖によるシグナル制御のメカニズム BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会 2015 年

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuji Kondo, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Orié Tajima, Keiko Furukawa: Novel functions and mechanisms of complex carbohydrates elucidated by glycosyltransferase gene knockout: *Plenary Lecture, Glyco23, 2015*

〔図書〕(計 2 件)

Koichi Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yuji Kondo, Orié Tajima, Keiko Furukawa: Roles of Glycosphingolipids in the Regulation of the Membrane Organization and Cell Signaling in Lipid Rafts. In *Lipid/rafts*, pp129-146, Nova Science Publishers, London, 2016

Koichi Furukawa, Yuki Ohkawa, Yasuyuki Matsumoto, Yuhsuke Ohmi, Noboru Hashimoto, Keiko Furukawa: Regulatory Mechanisms for Malignant Properties of Cancer Cells with Disialyl and Monosialyl Gangliosides. In *Glyco-signals in Cancer*, Eds by K. Furukawa, and M. Fukuda, pp57-76, Springer, 2016

〔その他〕

ホームページ等

<http://koichichubu.webcrow.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 鋼一 (FURUKAWA, Koichi)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号: 80211530

(2) 研究分担者

山内 祥生 (YAMAUCHI, Yoshio)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 00444878

橋本 登 (HASHIMOTO, Noboru)

名古屋大学・大学院医学系研究科・研究員

研究者番号: 90712365