

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16845

研究課題名(和文)がん微小環境の免疫因子解明に基づく難治性絨毛癌の新規治療戦略

研究課題名(英文)analysis of immune factor in choriocarcinoma microenvironment

研究代表者

新美 薫(Niimi, Kaoru)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：20571334

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):絨毛癌ではC2GnTは強発現していた。C2GnTノックアウト(KO)により、絨毛癌細胞株のNK細胞傷害性が有意に上昇した。MICA上のC2GnTが付加する糖鎖はC2GnT-KOにより抑制された。C2GnT-KO細胞ではTRAIL容量依存的に細胞生存率が低下した。C2GnT-KO細胞では、MUC1に付加された糖鎖が減少していた。C2GnT-KO細胞移植群ではControl細胞移植群に比較して有意に腫瘍サイズが小さく、生存期間も延長した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖転移酵素C2GnTは、絨毛癌細胞で高発現しており、MICA及びMUC1の糖鎖修飾を介して、NK細胞の免疫システムから逃避し、高い悪性能を有する可能性が示唆された。本研究は、絨毛性腫瘍患者を対象とした新規治療法として、C2GnTの発現抑制にNK細胞に関連した免疫治療を加えることの有効性を、細胞生物学的に解析したものである。今後in vivoでの解析をさらに進めることで、臨床応用の可能性が期待できると考える。

研究成果の概要(英文):We investigated C2GnT expression in gestational trophoblastic diseases. We established C2GnT knockout (KO) cells with Jar and BeWo cells and investigated cytotoxicity of NK cells against those cells. MICA and MUC1 glycosylation were analyzed by immunoprecipitation. We incubated C2GnT-KO and control with TRAIL and cell viability were analyzed. We inoculated the C2GnT-KO and control cells subcutaneously into nude mice. C2GnT was highly expressed in trophoblasts of choriocarcinoma but not in hydatidiform mole and normal placenta. C2GnT-KO cells were more efficiently killed by NK cells than controls. Sugar chains attached by C2GnT on MICA and MUC1 in C2GnT-KO cells were significantly decreased. The cell viability of C2GnT-KO cells were lower than controls depending on TRAIL amount. C2GnT-KO promoted longer survival as compared with the controls. Choriocarcinoma cells may acquire a high malignant potential by expressing C2GnT with glycosylation to MICA and MUC1.

研究分野：絨毛性疾患

キーワード：絨毛癌 絨毛性腫瘍 C2GnT 糖転移酵素 hCG NK細胞

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

絨毛癌患者は、20歳～40歳の比較的若い成人女性に多く、あらゆる妊娠後に発症しうる悪性腫瘍である。肺、肝臓、脳などに遠隔転移を来しやすく、発見時に多発遠隔転移を伴う場合、予後は不良である。絨毛癌は化学療法が奏功しやすいが、抗癌剤耐性の場合は手術療法や放射線療法で集学的に治療しても治療困難なことが多い。抗癌剤耐性の絨毛癌を治癒させることができれば100%の寛解が望める疾患であるため、新規治療の開発が必要である。

絨毛性腫瘍は半異物であり母体には免疫学的な許容と同時に異物を排除する機構が存在すると考えられる。がんの自然寛解症例が報告されているが、その約10%が絨毛性腫瘍であり、我々も治療せずに肺転移が消失した侵入胎奇胎の症例を経験している。このことから絨毛性疾患は他種のがんとは違うがん微小環境の免疫病態が備わっていると考えられる。絨毛細胞には一般的に古典的HLA class I抗原が発現しておらず、これにより細胞傷害性T細胞の攻撃を回避している。しかしclass I抗原を発現していない絨毛細胞はNK細胞により非自己と認識され攻撃を受けることとなりうるが、絨毛細胞ではNK細胞の攻撃から回避するための機構も備わっていると考えられ、それが妊娠成立・維持だけでなく絨毛癌の悪性度と大きく関与している。NK細胞の活性化は、がん細胞に発現する活性化リガンド及び抑制性リガンドのバランスと、NK細胞に発現するその受容体やTRAIL発現、そしてNK細胞内でのSTAT3やPTENなどの分子によって調整されている。それらを制御してNK細胞のがん細胞への攻撃を促進する、NK細胞をターゲットとしたがん免疫療法が、絨毛性腫瘍においては効果的と考える。絨毛性腫瘍特有の免疫環境を理解し、抗癌剤耐性や悪性度に関与する因子を解明することが、難治性絨毛癌患者への新規治療法の実現への第一歩となると考えた。

絨毛性疾患は、胎状奇胎から侵入奇胎を経て絨毛癌へと悪性化するが、それに伴いアスパラギン結合糖転移酵素であるGnT-IVaの発現が増加することをこれまで我々は明らかにした¹⁾。また同様に、セリン結合糖転移酵素であるC2GnTが絨毛癌で強発現しており、絨毛癌細胞の遊走、浸潤、細胞外基質への接着能を促進していることを明らかにした。このことからC2GnTの発現抑制は、絨毛性腫瘍において分子標的治療としての可能性を秘めている。C2GnTに関しては、大腸癌、前立腺癌などの他の癌種において臨床的な予後や転移能と関連する報告がある。その機序として、NK細胞のリガンドであるMICAの糖鎖にC2GnTがPolylactosamine鎖を付加することによって、NK細胞からの細胞傷害性を回避し転移能を増強させることが報告されている。本研究では、絨毛性腫瘍における、C2GnTの微小環境における役割を免疫学的な側面から明らかにし、C2GnTをターゲットとした免疫治療の実現性を検討する。

2. 研究の目的

絨毛性腫瘍における抗癌剤耐性や悪性度に関与する因子を解明する。C2GnTの微小環境における役割を免疫学的な側面から明らかにし、難治性絨毛癌におけるC2GnTをターゲットとした免疫治療の実現性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 化学療法耐性株の作成

絨毛癌細胞株のJar細胞にメトトレキサート(MTX)を少量含む培養液で培養し、徐々にMTXの量を増やしてMTX耐性株を作成する。別の絨毛癌細胞株のBeWo細胞に対しても同様の手技を用いてMTX耐性株を作成した。

(2) 絨毛癌組織における免疫細胞と腫瘍における免疫関連分子の発現の検討

絨毛性疾患(胎状奇胎と絨毛癌)および胎盤組織を用いて、パラフィン包埋ブロックより組織切片を作成した。T細胞表面マーカーのCD8抗体、NK細胞表面マーカーのCD57の抗体を用いて免疫組織染色を施行した。NKG2DリガンドのMICAとULBPの抗体を用いて免疫組織染色を施行した。

(3) C2GnTノックアウト細胞の作製とNK細胞傷害性の検討

C2GnTの機能解析を行うために発現抑制モデルが必要である。絨毛癌細胞株JarとBewoに、CRISPR cas9システムを利用してC2GnTノックアウト細胞を作製した。C2GnTノックアウト細胞とコントロール細胞を用いてNK細胞傷害性を比較した。さらに、C2GnTとNK細胞傷害性の関連性について、NK細胞傷害の2つの経路に着目して検討した。

(4) C2GnTノックアウト絨毛癌細胞を使用した皮下移植モデルマウスの作成とその解析

C2GnTノックアウト細胞株とコントロール細胞株をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍サイズと生存率、また生着した腫瘍とその周囲の組織を摘出し、免疫組織染色を行った。

4. 研究成果

(1) 絨毛癌細胞株のJar細胞、Bewo細胞のメトトレキサート耐性株を作成し、その評価を行った。Jar細胞のMTX耐性株ではIC50: 3.35×10^{-3} M、Wild: 8.88×10^{-7} Mであり、Bewo細胞のMTX耐性株ではIC50: 2.0×10^{-4} M、Wild: 4.55×10^{-7} Mであり、MTX耐性を確認できた(図1)。

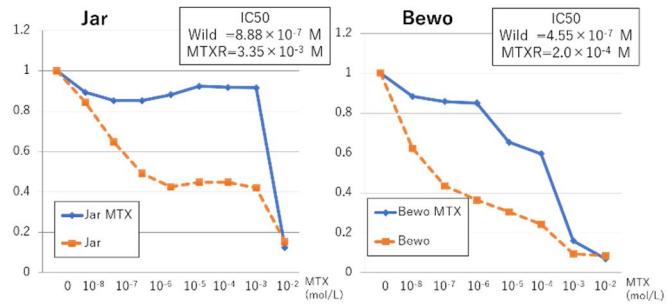


図1 MTX耐性株の評価

(2) 絨毛性疾患組織、胎盤組織ではCD8陽性リンパ球が少なく、NK細胞が多い傾向にあった。

NKG2DリガンドのMICAとULBPの抗体を用いて免疫組織染色を施行した。絨毛癌の再発ではMICA、ULBPともに高発現していた。絨毛癌における免疫環境では、NK細胞が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(3) Jar細胞、Bewo細胞を用いてCRISPR cas9システムを用いて遺伝子導入を施行し、C2GnTノックアウト細胞を作製した。C2GnTの発現量をウエスタンブロットで解析し、発現抑制の確認を行ったところ、これらの遺伝子編集細胞においてC2GnTの発現抑制を確認できた。NK細胞傷害性をLDH cytotoxicity detection kitを用いて測定した。Jar細胞、Bewo細胞ともにC2GnTノックアウト細胞でコントロール細胞と比較して、NK細胞傷害性が有意に高かった(図2)。

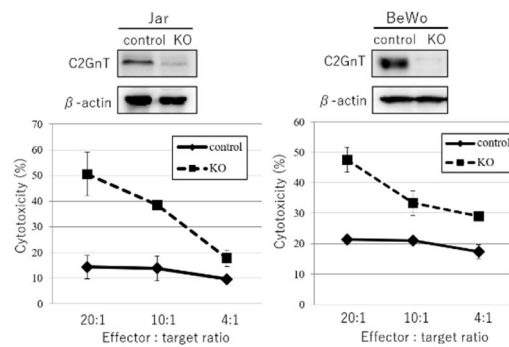


図2 C2GnTノックアウト細胞の作製とNK細胞傷害性

また、C2GnT発現が低い絨毛癌細胞JEG3ではNK細胞傷害性が高く、C2GnT高発現のJar、Bewo細胞はNK細胞傷害性が低い結果であった。C2GnT発現とNK細胞傷害性の関連が示唆され、その機序としてNKG2D-MICA経路とTRAIL-DR4経路に着目した。

C2GnTが付加する糖鎖を認識するレクチンであるLELの抗体を用いて免疫沈降を行い、ノックアウト細胞とコントロール細胞を用いてMICAの糖鎖を確認したところ、ノックアウト細胞でMICAの糖鎖が低下していた。C2GnTはMICAに糖鎖を付加することで、NK細胞傷害性を回避している可能性が示唆された。

NK細胞にはTRAILが発現している。C2GnTノックアウト細胞とコントロール細胞にTRAILを投与して細胞増殖アッセイを行ったところ、ノックアウト細胞では有意に細胞増殖が抑制された。また、癌細胞側にはDR4の発現が見られた。LEL抗体を用いた免疫沈降で、MUC1の糖鎖を解析したところ、ノックアウト細胞でMUC1の糖鎖が減少していた。NK細胞のTRAIL-DR4経路による癌細胞のアポトーシスが、C2GnTによるMUC1への糖鎖付加により誘導されにくくなると考えられた。

(4) C2GnTノックアウト細胞株を移植したヌードマウスでは、コントロール細胞株を移植した群に比較して、有意に腫瘍サイズが抑制され、また有意に生存率が延長した(図3)。マウスのNK細胞を同定するNK1.1抗体を用いた免疫染色では、両群ともに腫瘍周囲、内部にはNK細胞の浸潤がみられた。In vivoモデルにおいてC2GnTは絨毛癌の増殖とマウスの生存率に関与することが明らかとなった。

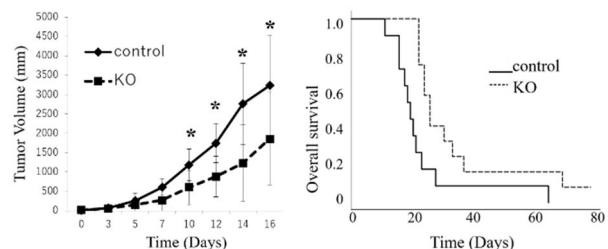


図3 ノックアウト細胞移植マウスの増殖と生存解析

<引用文献>

1) Niimi K, Yamamoto E, Fujiwara S, Shinjo K, Kotani T, Umezu T, Kajiyama H, Shibata K, Ino K, Kikkawa F. High expression of N-acetylglucosaminyltransferase IVa promotes invasion of choriocarcinoma. British Journal of Cancer. 2012;107(12):1969-1977

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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）

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 3件）

1. 発表者名 中村謙一, 池田芳紀, 西野公博, 新美 薫, 山本英子, 吉川史隆
2. 発表標題 絨毛癌細胞におけるNK 細胞を介した免疫避機構に対する糖転移酵素C2GnT の役割
3. 学会等名 第70 回日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Niimi K, Yamamoto E, Nakamura L, Nishino K, Kikkawa F
2. 発表標題 Glycosyltransferase regulate of malignant potential of trophoblast
3. 学会等名 IFPA 2018 Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nakamura K, Niimi K, Ikeda Y, Nishino K, Yamamoto E, Kikkawa F
2. 発表標題 Role of core 2 1, 6-N acetylglucosaminyl transferase in evasion mechanism through NK cell
3. 学会等名 IFPA 2018 Tokyo (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新美薫, 山本英子, 中村謙一, 田口結加里, 渡邊絵里, 西野公博, 吉川史隆
2. 発表標題 絨毛癌細胞のNK細胞免疫逃避機構における糖転移酵素C2GnTの役割
3. 学会等名 第27回日本胎盤学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 日本胎盤学会	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 448
3. 書名 基礎と臨床の両側面からみた胎盤学, 15絨毛性腫瘍とhCGの糖鎖修飾	

〔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
研究協力者	中村 謙一 (NAKAMURA Kenichi)	名古屋大学・産婦人科・大学院生 (13901)	