

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770155

研究課題名（和文） 活性化型シグレックによる癌細胞認識

研究課題名（英文） Cancer cell recognition by an activating-type Siglec

研究代表者

安形 高志 (ANGATA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖認識研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40371017

研究成果の概要（和文）：

自然免疫細胞に発現する受容体型糖鎖認識タンパク質である Siglec のうち、細胞活性化につながるシグナル伝達能を持つ Siglec-15 について、その発現を誘導する液性因子を明らかにした。また癌細胞上の糖鎖リガンドと免疫細胞上の Siglec-15 の相互作用が免疫細胞に及ぼす影響を解析し、かかる相互作用が癌細胞の上皮-間葉転換の誘導に密接に関わる TGF- $\beta$  の免疫細胞からの産生に影響を及ぼすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Siglec-15 is one of the receptors that recognize glycans containing sialic acids, and is involved in the immune cell activation. In this study, we identified a soluble factor that induces expression of Siglec-15 on myeloid cells. We also found that the interaction between glycan ligand on tumor cells and Siglec-15 on myeloid cells induces enhanced myeloid expression of TGF- $\beta$ , which is involved in epithelial-mesenchymal transition of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、免疫、シアル酸、シアリル Tn、レクチン、シグレック、上皮間葉転換、TGF- $\beta$

## 1. 研究開始当初の背景

糖鎖付加は多細胞生物におけるタンパク質の最もユニークな翻訳後修飾であり、細胞表面あるいは細胞外に局在するタンパク質のほとんどは糖鎖付加を受けて初めて完成する。糖鎖の機能は多様であるが、「糖鎖と糖鎖認識タンパク質の相互作用を介した生体機能の制御」はその主要なものとして挙げられる。糖鎖認識に基づく生体制御機構の破綻は疾患につながると予想され、かかる制御機構の研究は将来的に疾病の診断や治療に結びつく事が期待される。

シグレックはシアル酸を認識する脊椎動物由来のタンパク質ファミリーであり、その多くは免疫系の細胞に発現している (Varki and Angata (2006), *Glycobiology* 16, 1R-27R; Crocker, Paulson, and Varki (2007), *Nat. Rev. Immunol.* 7, 255-266)。シグレックは細胞外において糖鎖リガンドと、細胞内においてシグナル伝達分子とそれぞれ会合し、免疫細胞の活性制御に関与する。

免疫細胞に発現するシグレックの多くは細胞内領域においてチロシンホスファターゼ SHP-1 と会合し、免疫細胞の活性を負に制御する。一方、本研究の研究代表者である安形らは、新規のヒト由来シグレック Siglec-14 及び Siglec-15 の存在を見出した (Angata et al. (2006), *FASEB J.* 20, 1964-1973; Angata et al. (2007), *Glycobiology* 17, 838-846)。これらの新規シグレックは膜貫通領域に存在する塩基性アミノ酸残基を介して、活性化シグナル伝達に関与するアダプタータンパク質 DAP12 と会合する。すなわち、これらのシグレックは既知のシグレックと異なり、細胞の活性化に関与する可能性が示唆された。その後、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の産生を Siglec-14 が増強する事が判明し、Siglec-14 が細胞の活性化に関与するとの予測が裏付けられた (本研究開始後に論文を公表: Yamanaka et al. (2009), *Glycobiology* 19, 841-846)。

一方、癌の進展におけるマクロファージと癌細胞の相互作用が注目されている (Pollard (2004), *Nat. Rev. Cancer* 4, 71-78)。癌細胞から分泌されるマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) は血中の単球を誘引し、マクロファージへの分化誘導を促進する。癌周辺のマクロファージからは各種の液性因子 (VEGF, FGF, TNF- $\alpha$ , EGF など) 及びプロテアーゼ (MMP9 など) が分泌され、癌組織における血管新生や血行性転移を促進する。その一方でマクロファージは自然免疫系の一員として、癌の抑制にも関わると考えられている。

研究代表者らは Siglec-15 がリンパ節マクロファージのみならず、癌組織周辺のマクロファージにも発現している事を示唆するデータを得た。またヒト末梢血由来の単球を M-CSF 存在下で培養する事により、Siglec-15 の発現が誘導される事を示唆するデータを得た。Siglec-15 が選択的に認識する糖鎖構造シアリル Tn (Neu5Ac $\alpha$ 2-6GalNAc $\alpha$ 1-) は胃癌、乳癌、肺癌等に高発現する事が知られている。これらの事実を総合すると、マクロファージ上に発現する Siglec-15 が癌細胞上のリガンドを認識し、マクロファージの機能に影響を及ぼすことによって、癌微小環境の変化に寄与し、ひいては癌の進展に影響を及ぼす可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、Siglec-15 が癌細胞上に提示される糖鎖リガンドとの相互作用を介してマクロファージ (もしくはマクロファージを含む自然免疫系細胞) の機能に及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

具体的には、細胞株を用いた *in vitro* の癌細胞-免疫細胞相互作用モデルを作成し、以下の項目の達成を目指した。

- A. 癌細胞-免疫細胞相互作用への Siglec-15 の関与を検討する。
- B. 癌細胞由来の Siglec-15 リガンドを同定する。
- C. Siglec-15 を介するシグナル伝達系を解析する。

## 3. 研究の方法

### A. 癌細胞-免疫細胞相互作用への Siglec-15 の関与の検討

#### (1) *in vitro* 実験モデルの作成

癌細胞-免疫細胞相互作用への Siglec-15 の関与を検討するための *in vitro* 実験モデルとして、癌細胞と免疫細胞の共培養系を検討する。

まず実験モデルの作成に必要な癌細胞株と免疫細胞株を検討する。必要に応じて Siglec-15 リガンドを発現する癌細胞株、Siglec-15 を発現する免疫細胞株をそれぞれ作成する。

共培養に先立って癌細胞及び免疫細胞をそれぞれいかに前処理するかなどを含め、共培養の方法を検討する。

#### (2) Siglec-15 による癌細胞リガンド認識が免疫細胞機能に及ぼす影響の検討

上記(1)の共培養系を用いて、Siglec-15 リガンドを発現する癌細胞との相互作用が免疫細胞の活性に及ぼす影響を、免疫細胞から分泌される各種因子の定量的解析により検証する。

免疫細胞として Siglec-15 発現細胞と欠損細胞、癌細胞としてリガンド発現細胞と欠損細胞を用意し、共培養を行う。免疫細胞から分泌され癌微小環境の創出に関与すると考えられている因子、特に癌細胞の増殖 (EGF)、上皮間葉転換と浸潤 (TGF- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、MMP9)、癌組織における血管新生 (IL-8、VEGF、FGF2) に関与する因子に着目し、免疫細胞におけるこれらの分子の発現・分泌を定量的な遺伝子発現解析法及びタンパク質発現解析法を用いて解析する。

Siglec-15 発現免疫細胞とリガンド発現癌細胞の組み合わせにより特異的に発現が上昇する因子を同定して下記の研究を進める。

#### (3) リガンド糖鎖の重要性の検討

シグレックが認識する糖鎖リガンドの共培養系への添加、あるいは癌細胞における糖鎖リガンド発現抑制の効果を検討し、糖鎖リガンドによる癌細胞-免疫細胞相互作用制御の可能性を探る。

### B. 癌細胞由来の Siglec-15 リガンドの同定

#### (1) プロテオミクスの手法によるリガンドの同定

プロテオミクスの手法を用い、癌細胞上の Siglec-15 リガンド (タンパク質部分) を探索・同定する。

#### (2) 候補タンパク質の発現抑制等によるリガンドの検討

上記(1)に示した方法では同定が困難であるが Siglec-15 のリガンドとなる可能性が高いムチン等の分子に関して、癌細胞での発現を解析し、RNA 干渉法を用いた発現抑制等を通じて Siglec-15 リガンドとしての可能性を探る。

### C. Siglec-15 を介するシグナル伝達系の解析

#### (1) Siglec-15 と相互作用するシグナル伝達分子のプロテオミクスの手法による同定

Siglec-15 と細胞内で会合するタンパク質を生化学的・プロテオミクスの手法を用いて同定する。

#### (2) Siglec-15 と DAP12 の相互作用の生理学的重要性の検討

上記(1)と並行して、既に報告したアダプタータンパク質 DAP12 と Siglec-15 の相互作用が生理的に有意であるか否かを、シグナル伝達系の下流の因子に対する阻害剤や RNA 干渉法等を用いて検討する。

#### (3) Siglec-15 からのシグナル伝達における細胞質チロシン残基の関与の検討

Siglec-15 の細胞質領域には高度に保存されたチロシン残基 (Tyr310) が存在するが、その機能は不明である。Tyr310 を含む配列モチーフがシグナル伝達に関与するか否かを、点変異体を発現するモデル免疫細胞を用いて検討する。

## 4. 研究成果

### A. 癌細胞-免疫細胞相互作用への Siglec-15 の関与の検討

#### (1) in vitro 実験モデルの作成

まず Siglec-15 を発現する免疫細胞株を検討したところ、定常状態においても M-CSF を用いたマクロファージへの分化誘導時においても Siglec-15 を発現する細胞株は見出せなかった、そのため、ヒト由来の単球細胞株である THP-1 細胞をベースに、これに Siglec-15 を安定発現することにより、モデル免疫細胞を調製した。また、Siglec-15 を発現する THP-1 細胞を化学的にマクロファージに分化誘導する方法を検討したが、一般的に用いられる試薬 (ホルボールエステル) を用いた場合には Siglec-15 が分解され、発現が消失することが判明した。よって、THP-1 細胞は分化誘導せずに共培養に用いることとした。

Siglec-15 リガンドを発現する癌細胞株については、ヒト肺癌細胞株である H157 細胞にシアリル Tn 構造を合成する糖転移酵素である ST6GalNAc-I を導入した細胞株 (及び親株) の供与を共同研究者から受け、これをモデル癌細胞として用いることとした。

モデル癌細胞をホルムアルデヒド固定し、その共存下でモデル免疫細胞を培養するという共培養系を確立し、これを癌細胞-免疫細胞相互作用モデルとして以下の実験に用いた。

#### (2) Siglec-15 による癌細胞リガンド認識が免疫細胞機能に及ぼす影響の検討

「研究の方法」の項に示した各種液性因子の発現を解析したところ、Siglec-15 発現免疫細胞とシアリル Tn 発現癌細胞の共培養により、上皮間葉転換に関わる TGF- $\beta$  の発現が特異的に上昇する事が判明した。よって以下の研究では TGF- $\beta$  にフォーカスすることとした。

#### (3) リガンド糖鎖の重要性の検討

共培養に供する前にシアリル Tn 発現癌細胞をシアリダーゼ処理することにより、TGF- $\beta$  の発現が抑制されることを見出した。すなわち、糖鎖は癌細胞上の Siglec-15 リガンドが Siglec-15 に認識される上で必須であることが判明した。

## B. 癌細胞由来の Siglec-15 リガンドの同定

### (1) プロテオミクス的手法によるリガンドの同定

技術的理由により実施しなかった。

### (2) 候補タンパク質の発現抑制等によるリガンドの検討

検討を開始したが、技術的理由により成果を得るに至らなかった。

## C. Siglec-15 を介するシグナル伝達系の解析

### (1) Siglec-15 と相互作用するシグナル伝達分子のプロテオミクス的手法による同定

免疫沈降に使用可能な抗 Siglec-15 抗体は存在しないため、FLAG タグを導入した Siglec-15 を発現する細胞株を調製し、共沈殿する分子を探索したが、技術的理由により成果を得るに至らなかった。

### (2) Siglec-15 と DAP12 の相互作用の生理学的重要性の検討

Siglec-15 の発現により、THP-1 細胞においてアダプタータンパク質 DAP12 が安定化されることを示す結果を得た。

また、DAP12 の直下に存在するチロシンキナーゼ Syk に対する特異的な阻害剤を用いて TGF- $\beta$  産生に及ぼす影響を検討したところ、Syk 阻害剤が TGF- $\beta$  産生を抑制することが判明した。

これらの結果より、Siglec-15 を介した TGF- $\beta$  産生には DAP12 - Syk 経路が重要であることが示された。

### (3) Siglec-15 からのシグナル伝達における細胞質チロシン残基の関与の検討

細胞質チロシン残基 (Tyr310) に変異を持つ Siglec-15 を発現する THP-1 細胞を調製し、モデル癌細胞との共培養による TGF- $\beta$  産生への影響を解析したところ、チロシン残基の変異は TGF- $\beta$  産生に影響を及ぼさないことが判明した。すなわち、Tyr310 は TGF- $\beta$  産生に繋がる DAP12 及び Syk との相互作用に関与しないことが示唆された。

以上の成果をまとめた論文の公表に向け、原稿を鋭意作成中である。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

① 「Siglec-15 による癌特異的糖鎖抗原 Sialyl-Tn 抗原の認識が免疫細胞に及ぼす影響の解析」 高宮里奈、大坪和明、高松真二、谷口直之、安形高志、GlycoTOKYO 2011、平成 23 年 12 月 9 日、理化学研究所和光キャ

ンパス (埼玉県和光市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安形 高志 (ANGATA TAKASHI)

独立行政法人理化学研究所・糖鎖認識研究チーム・チームリーダー

研究者番号：40371017