

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860320

研究課題名(和文) Siglec-7と認識糖鎖の結合による癌の悪性形質増強と免疫監視逃避機構の解析

研究課題名(英文) Sialoglycan facilitate cancer escape from immunosurveillance via sialic acid-binding Siglec-7 on NK cells

研究代表者

橋本 登 (Hashimoto, Noboru)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・研究機関研究員

研究者番号：90712365

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性受容体Siglec-7は酸性糖シアル酸を認識し、主にナチュラルキラー(NK)細胞上に発現しており、癌細胞上のリガンドに対し反応すると癌への攻撃は抑制されてしまう。Siglec-7のリガンド糖鎖は幾つか報告があるが特異性など不明瞭な点が多い。我々はリガンド糖鎖としてタンパク質上にできるO型糖鎖を新たに発見し、質量分析によりそのキャリアータンパク質及びその糖鎖構造の候補も同定した。また、Siglec-7とリガンド糖鎖の相互作用において、免疫側ではリガンド糖鎖がSiglec-7の活性化を誘導し、免疫反応の抑制に働き、癌側へは運動能の増強という双方向のシグナルが伝わることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Siglec-7 is an inhibitory receptor expressed on NK cells and monocytes and transduces inhibitory signals into immune cells by binding to its ligands. Although a few ligands have been reported, specificity of Siglec-7-recognized structures has not been clarified. To solve this issue, we established several sialyltransferase-transfectants that showed definite binding of Siglec-7-Fc using a human colon cancer cell line. By using the transfectants, we clarified o-glycan is a new ligand of Siglec-7. While NK cells showed high cytotoxic activity toward the parent cells, reduced cytotoxicity was observed for the transfectants. In addition, ITIM of Siglec-7 was strongly phosphorylated in the transfectants. As for the transfectants, Siglec-7-binding enhanced cell migration. Taken together, we suggest that interaction between Siglec-7 and O-glycan enable cancer cells to escape from immunosurveillance by suppression of immune cells and enhancement of cancer malignancy.

研究分野：生化学、糖鎖生物学

キーワード：糖鎖 癌 免疫 免疫監視機構 質量分析 シアル酸

1. 研究開始当初の背景

Siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) は、シアロ糖鎖との結合能を特徴とする免疫グロブリンスーパーファミリー受容体の一種である。その中でも Siglec-7 は CD33 サブファミリーの一つであり、NK 細胞や単球の細胞表面に発現している。Siglec-7 は I 型膜タンパク質であり、細胞外に、1つの V-set domain と、2つの C2-set domain を持つ。さらに、Siglec-7 の細胞質ドメインには、抑制性のモチーフである ITIM が存在し、リガンドが Siglec-7 に結合したとき ITIM のチロシンがリン酸化し、protein tyrosine phosphatase SHP-1 をリクルートし活性化させ、細胞に抑制性のシグナルを伝えるといわれている。NK 細胞上においては、Siglec-7 が細胞表面に発現するジシアル酸とシスに結合してマスキング効果を示す (Avril et al., 2006) が、他の細胞上にあるシアル酸とトランスに結合すると細胞間相互作用をおこす。これまでに Siglec-7 は Siglec-7 特異的な F(ab)² を使ったクロスリンク刺激による Siglec7-ITIM シグナルの解析で、U937 上で活性化させた FcγRI の下流分子 Tyrosine-protein kinase Syk が脱リン酸化すると報告されている (Yamaji et al., 2005)。また、Siglec-7 を強制発現させた Jurkat において T cell receptor シグナルにおける ZAP-70 の活性阻害も観察されている (Ikehara et al., 2004)。Siglec-7 を介したシグナル伝達の結果として、Siglec-7 のリガンド結合による Siglec-7 発現細胞の非アポトーシス性の細胞死も観察されている (Mitsuki et al., 2009)。Siglec-7 のリガンド糖鎖構造として、これまでにガングリオシド GD3 (Nicolli et al., 2003) や disialosyl globopentaosylceramide (DSGb5) (Kawasaki et al., 2010)、disialyl-Lewis^a 及び 6-sulfo Lewis^x (Miyazaki et al., 2012) などの報告があるが、一貫性がなく未知な部分が多い。本研究では、ヒト IgG1 Fc 部位と Siglec-7 の細胞外ドメインのフュージョン組換え Siglec-7-Fc タンパクを作製し、Siglec-7 とそのリガンド糖鎖との結合特異性および結合に基づく細胞シグナルの性状について検討する。

2. 研究の目的

糖鎖は核酸、アミノ酸に続く第3の生命鎖と呼ばれ、多様な生命現象において重要な調節因子として働いている。悪性腫瘍細胞上には正常組織では見られない特徴的な糖鎖構造が発現し、癌形成において重要な役割を果たしていることが分かってきた。本研究ではシアル酸含有糖鎖を認識する免疫細胞上の Siglec-7 と癌細胞上に発現する特異的リガンド糖鎖との相互作用を介する、癌細胞の宿主免疫監視システムからの回避機行を解明する。シアル酸含有糖鎖による癌悪性シグナルの増強と免疫抑制シグナル抑制による免

疫監視機構からの逃避という二方向の作用の生成メカニズムを明らかにすることで、その糖鎖構造や糖鎖のキャリアー分子をターゲットとした分子標的あるいはワクチン療法など、癌の新規治療戦略の構築の基盤情報を形成する。

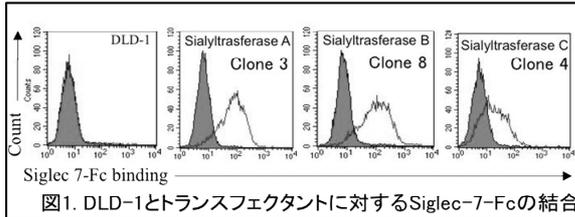
3. 研究の方法

Siglec-7 とそのリガンド糖鎖を介した免疫側、そして癌側への双方向のシグナル及びその機能を解明するために以下の検討を行う。

- (1) これまでの研究から、Siglec-7-Fc の結合性を示さないヒト大腸癌細胞株 DLD-1 に対する sialyltransferase (ST) cDNA の導入により、Siglec7-Fc 結合が陽性となる安定発現株を用い、種々の糖鎖合成阻害実験を行った結果から、O 型糖鎖が Siglec-7 のリガンド糖鎖であると示唆されている。このことから Siglec-7 結合分子の LC/MS 解析を行い、Siglec-7 結合糖鎖のキャリアータンパク分子を同定する。
- (2) (1) で同定したキャリアー分子上の糖鎖構造を明らかにするためにキャリアー分子とヒト IgG1-Fc 組換えタンパクと Siglec-7 の結合を亢進させるシアル酸転移酵素の cDNA を HEK293T へ co-transfection することにより、Siglec-7 のリガンド糖鎖を有する組換えキャリアータンパクを作成し、このタンパクと U937^{Siglec7+} 由来の Siglec-7 との糖鎖を介した結合を免疫沈降実験により確認する。
- (3) シアル酸転移酵素の有無で発現させたりガンド糖鎖キャリアー組換えタンパク質を酵素消化して、糖ペプチドの状態にし、質量分析によりそれらの糖鎖構造プロファイルを明らかにし、Siglec-7 のリガンド糖鎖構造を明らかにする。
- (4) 上記のキャリアータンパクから糖鎖を beta 脱離法により切り出し、質量分析によりその糖鎖構造を明らかにする。
- (5) Siglec7 ITIM シグナルの活性を解析するために、U937^{Siglec7+} 細胞と DLD-1 及びその ST-transfectants との co-culture をすることで ITIM のリン酸化や SHP-1 のリクルートを解析する。
- (6) ヒト NK 細胞上の Siglec-7 の機能を明らかにするために DLD 及びその ST-transfectants との co-culture をし、NK 細胞の細胞傷害活性を観察する。
- (7) Siglec-7 とそのリガンド糖鎖との相互作用による癌側へのシグナルを明らかにするために、Siglec-7 発現細胞または組み換えタンパク Siglec-7-Fc を DLD-1 及びその ST-transfectants の培養液中加入し、増殖能、浸潤能、運動能を BrdU assay や transmigration assay、RT-CES 法などを用い解析する。
- (8) また、(7) での分子シグナルを解析するため種々の抗リン酸化抗体を用い明らかにする。

4. 研究成果

Siglec-7-Fc に対し結合性陰性のヒト大腸癌細胞株 DLD-1 に対し 20 種の sialyltransferase cDNA を導入し、結合性を亢進させる遺伝子として sialyltransferase A, B, C を同定し、その安定発現株を樹立した。(図.1)



Siglec-7 が認識する糖鎖のキャリアー分子上のリガンド糖鎖の特異性及びその相互反応に基づく免疫細胞側及び癌細胞側へのシグナルを解析し、免疫監視逃避機構を明らかにするために以下の検討を行った。

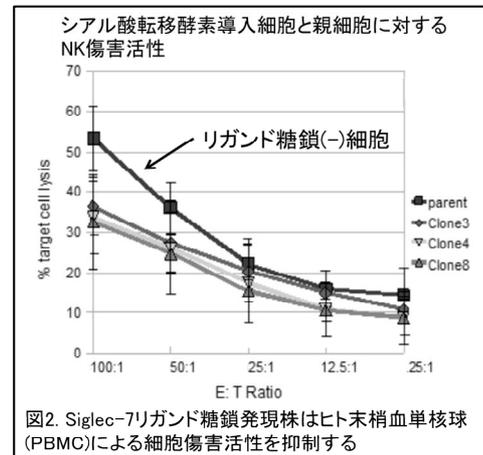
(1) リガンド糖鎖構造の解析

これまでに同定した Siglec-7 リガンド糖鎖キャリアータンパク質と Siglec-7 との結合を亢進させるシアル酸転移酵素をもとに作成したシアル酸再構成タンパク質の質量分析による糖鎖構造解析を行った。その結果、内因性の Siglec-7 との結合が非常に強く見られるタンパク質から特徴的な糖鎖構造を持つペプチド断片が同定された。また、それらタンパク質から糖鎖を切り出し、糖鎖単体での質量分析でもその特徴的な糖鎖構造が同定された。この糖鎖構造はこれまで報告されていない新規の糖鎖構造であった。また、Siglec-7 と相互作用する分子のプロテオーム解析によりさらに 2 つの分子を同定し、4 種のタンパク質が Siglec-7 のリガンド糖鎖を持つことがわかった。

(2) Siglec-7 とリガンド糖鎖の相互作用による免疫細胞側へのシグナル解析

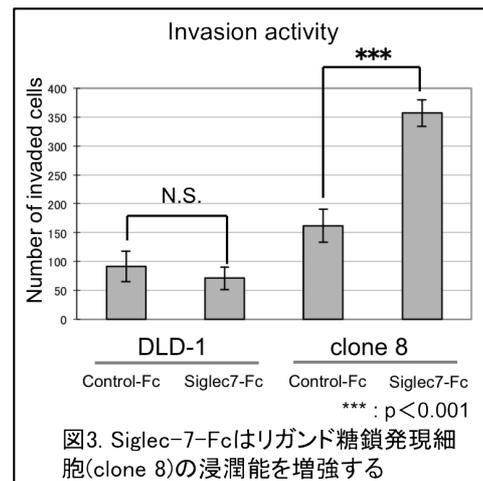
Siglec-7 発現 U937 細胞においてリガンド糖鎖発現細胞との共培養により Siglec-7 の ITIM モチーフのリン酸化レベルの亢進が見られて、さらにチロシンホスファターゼ SHP-1 を ITIM へリクルートしリン酸化レベルを亢進させ活性化させていることが見出された。このことから、癌細胞上のリガンド糖鎖が Siglec-7 を介し免疫細胞内へ抑制シグナルを伝達していることがわかった。また、ヒト末梢血由来単核球(PBMC)と DLD-1 及びそのトランスフェクタントとの共培養による細胞傷害活性の測定により、DLD-1 に比べリガンド糖鎖発現トランスフェクタントでは有意に傷害活性が抑制されていることがわかった。(図.2)

癌細胞の免疫逃避機構に寄与していることが示唆された。その時に、リガンド糖鎖の結合が Siglec-7 細胞内ドメイン ITIM を活性化させ、phosphatase 活性のある SHP-1 をリクルートし、活性化させていることがわかった。



(3) Siglec-7 とリガンド糖鎖の相互作用による癌細胞側へのシグナル解析

Siglec-7 がリガンド糖鎖に結合した時に癌側へと伝わるシグナル解析を行った。まず、表現型への影響を解析するために BrdU assay による増殖能への影響、transmigration assay による浸潤能への影響、RT-CES 法による運動能への影響を U937^{Siglec7+} 細胞または Siglec-7 組換えタンパクによる刺激実験で観察した。その結果、細胞の増殖能には変化は見られなかったが、浸潤能と運動能に有意な差が見られ、リガンド糖鎖発現細胞において亢進していることがわかった。(図.3) また、その時の分子シグナルとして Erk と ERM タンパクのリン酸化レベルがリガンド糖鎖発現細胞において亢進していることが見出された。



以上、この研究で新規に同定された Siglec-7 リガンド糖鎖は癌細胞上に発現することで免疫細胞からの攻撃を免れる機能を持つことがわかり、さらにそのキャリアー分子からの癌細胞へのシグナルで癌の悪性を増強することが示唆された。現在これらの結果をまとめ論文作成中である。

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 4 件)

1. Robiul H Bhuiyan, Yuji Kondo, Tokiaki Yamaguchi, Noriyo Tokuda, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yuhsuke Ohmi, Yoshio Yamauchi, Keiko Furukawa, Tetsuya Okajima, Koichi Furukawa. Expression analysis of O-series gangliosides in human cancer cell lines with monoclonal antibodies generated using knockout mice of ganglioside synthase genes. *Glycobiology*. 2016 Apr 21. pii: cww049, 査読あり

2. Reiko Ando, Noriyo Tokuda, Tokunori Yamamoto, Kazutaka Ikeda, Noboru Hashimoto, Ryo Taguchi, Xiaoen Fan, Keiko Furukawa, Yukio Niimura, Akemi Suzuki, Momokazu Goto, Koichi Furukawa. Immunization of A4galt-deficient mice with glycosphingolipids from renal cell cancers resulted in the generation of anti-sulfoglycolipid monoclonal antibodies. *Glycoconj J*. 2016 33(2) 169-180, 査読あり

3. Yuki Ohkawa, Hiroyuki Momota, Akira Kato, Noboru Hashimoto, Yusuke Tsuda, Noriyuki Kotani, Koichi Honke, Akio Suzumura, Keiko Furukawa, Yuhsuke Ohmi, Atsushi Natsume, Toshihiko Wakabayashi, Koichi Furukawa. Ganglioside GD3 enhances invasiveness of gliomas by forming a complex with platelet-derived growth factor receptor alpha and Yes kinase. *J Biol Chem*. 2015, 290(26) 16043-16058, 査読あり

4. Kohki Matsubara, Yoshihiko Matsushita, Kiyoshi Sakai, Fumiya Kano, Megumi Kondo, Mariko Noda, Noboru Hashimoto, Shiro Imagama, Naoki Ishiguro, Akio Suzumura, Minoru Ueda, Koichi Furukawa, Akihito Yamamoto. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J Neurosci*. 2015, 35(6) 2452-2464, 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Noboru Hashimoto, Sizuka Ito, Kazutaka Ikeda, Akiko Tsuchida, Paul R. Crocker, Keiko Furukawa, Ryo Taguchi, Koichi Furukawa. Structural specificity in molecular recognition of Siglec-7 to ganglioside GD3. *Gordon Research Conference Glycolipid & Sphingolipid Biology*. Lucca (Barga), Italy. Mar 8, 2016

2. 橋本登、伊藤静、池田和貴、土田明子、Paul R. Crocker、古川圭子、田口良、古川鋼一、TLC-LESA-QTRAP6500 による Siglec-7 特異的認識 ganglioside GD3 の構造解析、BMB2015 (2015 年 12 月 2 日神戸国際会議場、兵庫県神戸市)

3. 橋本登、土田明子、高野舞子、古川圭子、古川鋼一、Sialo-O-glycan facilitate cancer escape from immunosurveillance via sialic acid-binding Siglec-7 on NK cells 第 74 回日本癌学会学術総会(2015 年 10 月 10 日 名古屋国際会議場 愛知県名古屋市)

4. 橋本登、伊藤静、池田和貴、土田明子、Paul R. Crocker、古川圭子、田口良、古川鋼一、Siglec-7 の結合特異性におけるガングリオシド GD3 の分子種解析、第 34 回日本糖質学会年会(2015 年 7 月 31 日 東京大学 東京都文京区)

5. 橋本登、伊藤静、池田和貴、土田明子、Paul R. Crocker、古川圭子、田口良、古川鋼一、TLC-LESA-QTRAP6500 による Siglec-7 認識 ganglioside GD3 の構造解析、The 42nd Biological Mass Spectrometry Conference(2015 年 7 月 7 日 岐阜グランドホテル 岐阜県岐阜市)

6. 橋本登、伊藤静、水野顕智、池田和貴、土田明子、Paul R. Crocker、古川圭子、田口良、古川鋼一、Siglec-7 とガングリオシド GD3 の結合における分子認識の構造特異性、第 37 回日本分子生物学会年会(2014 年 11 月 25-27 日 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

7. Noboru Hashimoto, Kazunori Hamamura, Norihiro Kotani, Keiko Furukawa, Kei Kaneko, Koichi Honke, Koichi Furukawa, Proteomic analysis of ganglioside-associated microdomain in malignant melanomas. *SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting*. Honolulu, Hawaii, USA, Nov. 16-19, 2014

〔図書〕(計 3 件)

1. Koichi Furukawa, Yuki Ohkawa, Yasuyuki Matsumoto, Yuhsuke Ohmi, Noboru Hashimoto, Keiko Furukawa. Regulatory Mechanisms for Malignant Properties of Cancer Cell with Disialyl and Monosialyl Gangliosides. *Glycosignals in cancer: Mechanisms of Malignant Phenotypes*. pp. 220, 57-76, 2016 Jun.

2. Koichi Furukawa, Yusuke Ohmi, Yuji Kondo, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Ori Tajima, Keiko Furukawa. The role of glycosphingolipids in lipid rafts:

lessons from knockout mice. In Lipid Rafts: Properties, controversies and roles in signal transduction. Nova Science Publishers, pp. 262,1-20, 2014

3. Koichi Furukawa, Yusuke Ohmi, Yuki Ohkawa, Noboru Hashimoto, Yoshio Yamauchi, Oriie Tajima, Keiko Furukawa. Gangliosides, synthesis and function in nervous tissue. In Glycoscience: Biology and Medicine. Springer, pp. 1569,551-556, 2014

6 . 研究組織

(1)研究代表者

橋本 登 (HASHIMOTO, NOBORU)
名古屋大学・医学系研究科・研究機関研究員
研究者番号 : 90712365

(2)研究分担者なし