

ドリアの蓄積とそこから発生する高いレベルの ROS を介して、がんの増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たす可能性がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照のこと。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nakamura Y, Kitamura N, Shinogi D, Yoshida M, Goda O, Murai R, Kamino H, Arakawa H. BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. PLoS ONE 7: e30767, 2012

2. 学会発表

1. 荒川博文、シンポジウム・疾患に関するミトコンドリア研究の新展開

演題「修復と排除：p53誘導性タンパク質 Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構」

平成23年9月24日、第84回日本生化学会大会（京都）

2. 荒川博文、2011JCA-Mauverney Award 受賞講演

演題「がんのアキレス腱を知る～p53標的遺伝子研究からのアプローチ」

平成23年10月4日、第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

3. 吉田将紀、喜多村憲章、中村康之、宮本嵩史、加美野宏樹、村井竜也、尾野雅哉、荒川博文

口演発表、演題「リソソーム様オルガネラがミトコンドリア内に存在する可能性とミトコンドリア品質管理におけるその役

割について」、平成23年10月4日、第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

4. 中村康之、喜多村憲章、宮本嵩史、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文 ポスター発表、演題「修復と排除：p53誘導性タンパク質 Mieap による新規ミトコン

平成23年10月3日、第70回日本癌学会学術総会（名古屋市）

5. 中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文 口演発表、演題「Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality

by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」、平成23年12月14日、第34回日本分子生物学会年会（横浜市）

6. 喜多村憲章、中村康之、吉田将紀、加美野宏樹、村井竜也、荒川博文

口演発表、演題「Possible existence of lysosome-like organelle within mitochondria and its role in mitochondrial quality control」、平成23年12月15日、第34回日本分子生物学会年会（横浜市）

7. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、村井竜也、加美野宏樹、荒川博文

口演発表、演題「BNIP3 and NIX mediate Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria」、平成23年12月15日、第34回日本分子生物学会年会（横浜市）

H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

がん間質の免疫微小環境に関する研究

分担研究者 平岡 伸介 国立がん研究センター研究所

分子病理分野 ユニット長

研究要旨：本研究では、ヒト膵がん間質の免疫微小環境の理解を深めるために、それに関わる形態学的変化、腫瘍間質に浸潤する免疫担当細胞、腫瘍間質で発現される分子の免疫微小環境における意義を検討し、さらに抗腫瘍性の免疫微小環境の形成に関わる分子機序に迫ることで、効果的な免疫療法の開発や分子標的治療の開発、がんの予後予想に資する知見を得ることを目指している。平成23年度の具体的な成果は、1) ヒト膵がん組織におけるサイトカイン・サイトカインリセプター遺伝子発現と患者予後とを比較検討し、抗腫瘍性免疫微小環境(患者長期生存)と深く関連するサイトカイン遺伝子候補を複数同定したこと、2) T細胞反応に必須なアルギニンの量を調節し、免疫微小環境を特徴付ける分子候補であるアルギナーゼ II (ARG2)の膵がんにおける臨床病理学的な意義を検討し、膵がんにおいて ARG2 はがん細胞に殆ど発現しないが、壊死組織内や周囲のがん関連線維芽細胞(CAF)に特徴的に発現し、また ARG2 発現が低酸素により誘導されることから、ARG2 発現が低酸素環境の指標になることを明らかにし、ARG2 を発現する CAF の存在が独立した予後不良因子になることを見出した。さらに ARG2 が一般的にがん微小環境の T 細胞機能低下を直接的にもたらす分子ではなく、前立腺がんのような特定のがん種で抗腫瘍免疫抑制効果を及ぼすことを示した。これらの知見を元に、今後さらに免疫微小環境の遺伝子発現の特徴付けを行うことで、免疫微小環境形成の分子機序に迫っていきけるものと期待される。

A. 研究目的

浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性は、がん細胞、がん間質、また両者の相互作用によって規定されている。免疫担当細胞はがん間質を構成する一員であり、がんの微小環境に与える影響は大きい。未だ有効な治療法として確立されていないがんに対する免疫療法にとって、その問題点を克服し、効果的な治療を確立することは急務である。それにはヒトがんで実際に起こっている、がんとヒト免疫系を含めたがん間質との相互作用を深く理解することは不可欠である。本研究では、厚生労働行政上にも緊急の課題である難治性膵がんに注目して、ヒトがん間質の免疫微小環境の理解を深めることを目指し、それに関わる形態学的変化、腫瘍間質に浸潤する免疫担当細胞、腫瘍間質で発現される分子について臨床病理学的検討を元に、それら分子発現や免疫細胞浸潤様式の内の何が、抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)といった免疫微小環境を特徴付けているのかを検討し、次いでそれらの分子発現や細胞浸潤がどのような分子機序で各微小環境の形成に寄与しているのかを、*in vitro* 解析や動物モデルを用いて解析する。

本年度は、1) 免疫微小環境を特徴付

けるサイトカインあるいはサイトカインリセプター遺伝子発現の同定を試み、2) 免疫微小環境を特徴付ける分子候補であるアルギナーゼ II (ARG2)の膵がんにおける臨床病理学的意義について明らかにすることを目的に研究を実施した。アルギニンは T 細胞の増殖・活性化に必須なアミノ酸であり、組織中のアルギニン量を適切に維持することは免疫微小環境の維持に重要である。アルギニン量はその分解酵素、アルギナーゼ(ARG)によって調節されるが、それら酵素の発現には細胞・組織種により特異性がある。ARG2 は、アルギニンをオルニチンと尿素に分解するアミノ酸代謝酵素で、前立腺がんが発現すると、組織微小環境のアルギニン消費と窒素酸化物合成酵素 2(NOS2)同時発現による peroxynitrite 産生に伴う細胞傷害活性により、抗腫瘍性 T 細胞の増殖・活性化抑制とアポトーシスを引き起こし、がんの免疫逃避に関わることが知られている。

本研究により、がん間質において抗腫瘍免疫を惹起し、宿主免疫に対する抑制を解除する分子機構が見出され、効果的な免疫療法の開発や分子標的治療の開発、がんの予後予想に資する知見を得ることが期待される。膵がんの治療選択肢が広がるようになれば、国民

の保険・医療に寄与するところが大変に大きい。

B. 研究方法

免疫微小環境は、抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)に大別でき、がん間質ではそれらが種々の程度に混在した状況と考えられる。また好腫瘍性環境の中には、がんの浸潤・転移等に有意な関係を示す亜環境もあると推測される。そこで、まず抗腫瘍性と好腫瘍性の免疫微小環境がどのような形態学的変化、免疫担当細胞の浸潤様式や分子の発現により特徴付けられるのかを検討し、次いでそれらの分子発現や細胞浸潤がどのような分子機序で各微小環境の形成に寄与しているのかを解析する。以下に本年度に実施した研究の方法を記す。

1. 免疫微小環境を特徴付けるサイトカイン遺伝子あるいはサイトカインリセプター遺伝子発現の同定に関する研究

2003-2005年に国立がん研究センター中央病院肝胆膵外科で切除された膵がん約120症例の凍結組織から全RNAを抽出し、それを元に免疫微小環境に関わる可能性のあるサイトカインファミリーに属するサイトカイン遺伝子およびそれらサイトカインのリセプター遺伝子の発現を定量的RT-PCR法により解析し、患者予後情報を含めた臨床病理学的情報と比較検討した。患者予後良好・不良との有意な関連性を以てその発現が抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)の微小環境を特徴付けるものとして、目的遺伝子の同定を試みた。

2. 膵がん組織におけるARG2発現の臨床病理学的意義に関する研究

1990-2005年に国立がん研究センター中央病院肝胆膵外科で切除された膵がん214症例について、ARG2発現を免疫組織化学により解析し、臨床病理学的情報と比較検討した。ARG2発現細胞の細胞種特定のために免疫組織化学による3重染色を実施した。新鮮な膵がん組織から線維芽細胞を抽出、培養し、低酸素刺激による遺伝子発現の変化を定量的RT-PCR法により解析した。

倫理面への配慮

平成19年8月16日改正文部科学省・厚生労働省「疫学研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に十分配慮して研究をすすめる。手術材料の残余の組織などの研究利用につき、患者に対して予め説明し文書で包括的同意を得る。患者の治療方針決定のための病理組織標本を迅速に作成して残余の組織を採取することにより、患者への不利益を生じさせない。患者の臨床情報のうち本研究に必要なものは、別に診療録より調査しておき、解析の過程で

は連結可能匿名化して取り扱うなどの細心の注意を払い、患者のプライバシーを遵守する。本研究に関して、所属施設の倫理委員会の承認を既に得ている(国立がん研究センター倫理審査委員会課題番号17-77)。動物実験は動物愛護の立場に立ち、動物愛護管理法(環境省)、厚生労働省における動物実験等の実施に関する基本指針(厚生労働省)、カルタヘナ法(文部科学省)等の法令、指針に基づく国立がん研究センターにおける動物実験に関する指針に則って実施する。

C. 研究結果

1. 免疫微小環境を特徴付けるサイトカイン遺伝子あるいはサイトカインリセプター遺伝子発現の同定に関する研究

免疫微小環境を特徴付けるサイトカインとしてIL-12ファミリーおよびそのリセプターファミリー遺伝子の発現と膵がん患者予後との関係を検討した。その中で、長期の患者生命予後と統計学的に有意に関連する遺伝子発現、すなわち抗腫瘍性免疫微小環境と深く関連する遺伝子を複数同定した。さらにこの分子に対するモノクローナル抗体を作成し、免疫組織化学を実施したところ、この分子は膵がん組織中で樹状細胞やマクロファージの一部に発現していることがわかった。

2. 膵がん組織におけるARG2発現の臨床病理学的意義に関する研究

ARG2は少数例の膵がん組織において、部分的に膵がん細胞に発現している程度であったが、膵がん組織中の壊死組織およびその近傍に存在する紡錘形細胞のミトコンドリアに一致して特徴的に発現が認められた。またARGのもう一つのアイソザイムであるARG1は好中球の細胞質に発現していたが、膵がん細胞での発現を認めなかった。ARG2発現紡錘形細胞は、しばしば α -smooth muscle actinを発現していたが、ポドプラニン、CD31、CD68の発現がほとんど見られないことから、その主体はがん関連線維芽細胞(CAF)であり、極少数の血管内皮細胞やマクロファージにもARG2発現があると考えられた。ARG2発現CAFは214症例中89症例(42%)で認められ、Kaplan-Meier生存解析の結果、ARG2発現CAFの存在は、より短い全生存率(overall survival, OS)($P = 0.003$)および無病生存率(disease-free survival, DFS)($P = 0.0006$)と有意に相関があった。しかし、ARG2発現膵がん細胞の存在はいずれの生存率の長短とも関連が示されなかった。ARG2発現CAFの存在する症例と存在しない症例の平均生存期間は、 22.71 ± 1.77 ヶ月と 37.13 ± 2.41 ヶ月であり、1年生存率、2

年生存率、5年生存率は、それぞれ、 $66.9 \pm 5.2\%$ と $78.7 \pm 3.7\%$ 、 $36.1 \pm 5.4\%$ と $51.6 \pm 4.6\%$ 、 $17.1 \pm 4.4\%$ と $34.5 \pm 4.5\%$ であった。Cox 比例ハザードモデルを使って多変量解析を行った。その際、単変量解析で有意な因子となった臨床病理学的因子と共に ARG2 発現 CAF に対する患者生存を解析した。OS では、遠隔転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲、ARG2 発現 CAF (ハザード比 1.582 (1.134-2.209), $P = 0.007$) が独立した予後因子であることがわかり、また DFS では、遠隔転移、神経叢浸潤、静脈侵襲、ARG2 発現 CAF (ハザード比 1.715 (1.244-2.364), $P = 0.001$) が独立した予後因子であることがわかった。

ARG2 発現 CAF の存在は、様々な臨床病理学的因子の中で、より分化の低い膵がん組織型、腫瘍壊死の存在、腫瘍間質細胞における carbonic anhydrase IX (CAIX) の発現との間に有意な関係が認められた。CAIX は低酸素状態で発現誘導される分子の一つである。膵がん間質に存在する多くの CAF の中で、ARG2 を発現する CAF は腫瘍壊死巣内やその周囲に特徴的な局在を示すことや ARG2 発現 CAF の存在が CAIX 発現間質細胞の存在と有意な関係を示したことから、ARG2 が低酸素状態と関連することが示唆された。実際、膵がん組織中で ARG2 発現は、低酸素状態で発現誘導される分子の HIF-1 α や CAIX 分子を発現している CAF に一致して、あるいはそれら細胞に隣接する CAF に限って認められた。次に新鮮な膵がん組織から CAF を単離培養し、低酸素刺激を加えた後の遺伝子発現を検討した。低酸素刺激で発現誘導される SLC2A1 (別名 Glut1) が刺激後 5 時間から発現誘導される一方、ARG2 は刺激後 10 時間から有意な発現誘導が 60 時間後まで認められた。しかし、ARG1 と NOS2 遺伝子の有意な発現誘導は認められなかった。以上から、ARG2 が低酸素刺激により CAF に誘導される遺伝子であり、ARG2 発現 CAF の存在は組織局所の低酸素状態を示すものと考えられた。

ところで、ARG2 発現 CAF を有する症例では腫瘍間質への CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞浸潤の減少、好中球や M2 マクロファージ浸潤増加が有意に認められた。

D. 考察

1. 免疫微小環境を特徴付けるサイトカイン遺伝子あるいはサイトカインリセプター遺伝子発現の同定に関する研究

本研究により、抗腫瘍性免疫微小環境に深く関連するサイトカイン遺伝子候補を捉えた。候補遺伝子についてはデータ精度の向上を考

慮し別の膵がんコホート(含 100-200 症例)を用いて定量的 RT-PCR 法による解析、および免疫組織化学を用いた蛋白質発現レベルでの検討をそれぞれ試みている。

2. 膵がん組織における ARG2 発現の臨床病理学的意義に関する研究

ARG2 が免疫微小環境を特徴付ける候補分子として、膵がんにおけるその発現と臨床病理学的意義について検討した。既報によれば ARG2 は前立腺がんを発現し、抗腫瘍性 T 細胞を抑制して免疫逃避に導くが、膵がんでは ARG2 分子は発現するものの免疫抑制を誘導しない。本研究から、膵がんにおいて ARG2 はがん細胞に殆ど発現しないが、低酸素環境の CAF にその発現が誘導されることから ARG2 発現が低酸素環境の指標になることが示唆され、ARG2 を発現する CAF の存在が独立した予後不良因子になることが示唆された。また ARG2 が一般的にがん微小環境の T 細胞機能低下を直接的にもたらす分子ではなく、前立腺がんのような特定のがん種で抗腫瘍免疫抑制効果を及ぼすことがわかった。ARG2 発現 CAF を有する症例では CD4⁺T 細胞や CD8⁺T 細胞浸潤の減少、好中球や M2 マクロファージ浸潤増加が有意に認められ、免疫抑制環境下にある。しかしその要因が ARG2 発現による直接的な効果であるか、あるいは低酸素環境による影響であるかは現状のデータからは判断出来ず、今後の課題である。

E. 結論

本研究では、ヒト膵がん間質の免疫微小環境の理解を深めることを目的として、それに関わる形態学的変化、腫瘍間質に浸潤する免疫担当細胞、腫瘍間質で発現される分子について、それらがいかに抗腫瘍性(免疫反応性)と好腫瘍性(免疫寛容)といった免疫微小環境を特徴付けているのかを検討している。免疫微小環境の意味づけとして、患者予後を指標にしている。本年の研究では、サイトカイン遺伝子発現と ARG2 遺伝子発現に主眼をおいて検討を実施し、それらの中で免疫微小環境を特徴付けるサイトカイン遺伝子候補を捉えることが出来た。ARG2 は免疫微小環境形成因子よりも、むしろ組織低酸素状態で誘導され、2 次性に微小環境に影響する分子と考えられた。今後の研究により、得られたサイトカイン候補遺伝子の結果を確認し、さらに免疫微小環境形成に与える詳細な機能とその分子機序に迫っていきたい。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hiraoka N. et al. (2011) CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in the early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. *Gastroenterology*. 140, 310-321.
2. Lohr J. Hiraoka N. et al. (2011) Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived transforming growth factor-betas. *Clin Cancer Res*. 17, 4296-308.
3. Tsuboi S. Hiraoka N. et al. (2011) A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumor expressing core2 O-glycans. *EMBO J*, 30, 3173-85.
4. Hayashi T. Hiraoka N. et al. (2011) Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Sci Rep*. 1, 180.
5. Ono H. Hiraoka N. et al. (2012) Prostate Stem cell antigen, a presumable

organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Gene Chromosome Canc*. 51, 30-41.

6. Morofuji N. Hiraoka N. et al. (2012) Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J Proteomics*. 75, 1577-89.

2. 学会発表

1. 猪野義則、山崎理恵、島田和明、小菅智男、金井弥栄、平岡伸介。アルギナーゼ I I の発現は膵管がんの低酸素の指標(状態)と新たな予後因子となる。第70回日本癌学会学術総会 名古屋市。2011年9月。

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発

分担研究者 神奈木 玲児 愛知医科大学・先端医学医療研究拠点・客員教授

研究要旨：従来から癌幹細胞を選択的に増殖させることが知られる培養プロトコルを用いて大腸癌細胞を EGF/FGF2 存在下で培養すると、癌関連性糖鎖であるシアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の発現が強く誘導されることを見いだした。糖鎖発現の増加に伴い、セレクチンを介した細胞接着も有意に亢進していた。この糖鎖発現誘導の背景には、従来から ES 幹細胞に関連した転写因子である c-Myc や、幹細胞関連転写因子である Oct4 とともに初期胚幹細胞の細胞分化に関与することが知られる CDX2 の働きがあることが判明した。また、細胞内ドメインに ITIM モチーフをもち免疫抑制作用を有する糖鎖認識分子シグレックを発現する免疫細胞が大腸正常粘膜に多数存在し、このシグレックの特異的リガンド糖鎖が大腸正常上皮細胞に強く発現することを見いだした。上皮細胞におけるシグレックの特異的リガンド糖鎖は癌化とともに消退・消失し、これにより粘膜中の免疫細胞に対するシグレックの免疫抑制作用が失われ、COX2 の易誘導性などを介して炎症刺激による発癌が促進するに至ると考えられる成績が得られた。

A. 研究目的

癌細胞表面には正常細胞と大きく異なる糖鎖が発現することは古くから知られ、すでに少なからぬ種類の癌関連性糖鎖が知られている。しかし、癌細胞は一様ではなく、癌病巣はさまざまな性質を持った癌細胞によって構成されている。これまで知られた癌関連性糖鎖の中に、より癌幹細胞に高頻度に出現するようなものがあるかどうか、また、新規な糖鎖で癌幹細胞に特異的に発現するものがあるかどうかを検索することは、重要な研究課題であると考えられる。今回我々は、癌細胞を幹細胞培地で培養して糖鎖とその合成遺伝子の発現変化を検索するというアプローチを用いて、この問題に取り組んだ。

また我々は以前から、発癌の母地となる正常上皮細胞の糖鎖の中には、癌化に伴い消退するものがあることを見いだしていた。今回、この正常型糖鎖の機能についても検索を加えた。

B. 研究方法

従来から癌幹細胞を選択的に増殖させることが知られている培養プロトコルを用いて、大腸癌細胞を EGF/FGF2 存在下で無血清培地にて一週間ないしそれ以上の期間培養し、形態

学的な変化と糖鎖発現の変化を解析した。変化した糖鎖については、その合成酵素遺伝子の転写レベルの変化を解析した。転写レベルの変化を認めた遺伝子については、さらに、その背景となる転写調節機構を解析した。

また、発癌の母地となる正常大腸上皮細胞の糖鎖のうち、癌化に伴い消退するものの例として、シアリル 6-スルホルイス_xとジシアリルルイス_a糖鎖に着目し、これらが免疫細胞に発現することが知られるシグレック・ファミリーの糖鎖認識分子のリガンドとなっているかどうかを ELISA および細胞接着実験を用いて検索した。特異的リガンドであることが判明した場合は、当該のシグレック分子を発現する免疫細胞が正常大腸粘膜に存在するかどうかを調査し、表面マーカーの解析からその細胞種を同定した。また、当該シグレックと糖鎖リガンドとの結合がどのような生理的意義を有するかを *in vitro* の細胞生物学的実験によって検索した。

(倫理面への配慮)

研究に使用する臨床材料は、材料を得る各施設での倫理委員会を経たものを用いた。

C. 研究結果

1) 幹細胞培地で培養した大腸癌細胞における糖鎖変化とそのメカニズムの解析

癌幹細胞を選択的に増殖させることが知られている培養プロトコルを用いて、大腸癌細胞を EGF/FGF2 存在下で無血清培地中で一週間またはそれ以上培養すると、癌関連性糖鎖であるシアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の発現が強く誘導され、接着分子セレクチンを介した細胞接着が有意に亢進した。このとき糖転移酵素遺伝子の転写レベルを解析したところ、シアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の合成に関与するシアル酸転移酵素遺伝子である *ST3Gal1*, *ST3Gal3*, *ST3Gal4* の転写誘導が認められた。このとき、c-Myc の活性が増大しており、c-Myc の shRNA 導入によりこれら合成酵素遺伝子の転写誘導が抑制され、シアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の発現誘導も阻害されることから、この現象の背後に転写因子 c-Myc の活性増大があることが判明した。一方、シアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の合成酵素と共通の合成前駆体を基質とするフコース転移酵素遺伝子 *FUT2* には、転写の著しい低下が認められた。*FUT2* は上記のシアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の合成酵素と基質を競合する関係にあることから、*FUT2* の転写低下もまた、間接的にシアリルルイス_xやシアリルルイス_a糖鎖の発現誘導に寄与すると考えられた。このとき、転写因子 CDX2 の発現が低下しており、また、CDX2 の導入により *FUT2* の転写が増大し、逆に CDX2 の shRNA の導入により *FUT2* の転写低下が誘導されることから、*FUT2* の転写低下の背後には転写因子 CDX2 の低下があることが判明した。

また、この癌幹細胞培地を用いた培養により、E-カドヘリン、MUC2 などの上皮性のマーカー分子の発現が低下し、SNAIL1, ZEB1, Vimentin が増加し、形態学的にも明な上皮間葉変換(EMT)が観察された。実際の患者大腸癌組織においても、浸潤先端部でカドヘリンの発現が減弱し、SNAIL1, ZEB1 を発現している癌細胞に、これらの糖鎖の発現が強く誘導されている様子が観察された。以上の研究成果の一部を報文(PNAS, 109: 7776-7781,

2012)として発表した。

2) シグレックを介した正常上皮細胞の糖鎖の免疫抑制作用についての検討

ヒト大腸の正常上皮細胞には、シアリル 6-スルホルイス_xやジシアリルルイス_a糖鎖が発現する。これらの糖鎖の発現は、細胞の癌化に伴い消退することから、正常型糖鎖と呼ばれる。これらの正常型糖鎖と、糖鎖認識分子シグレックとの結合性を純品糖鎖とリコンビナント・シグレック分子を用いた ELISA、および遺伝子導入によって糖鎖とシグレックとをそれぞれ強制発現した細胞を用いた細胞接着実験によって調べたところ、シアリル 6-スルホルイス_xがシグレック7のリガンドであり、ジシアリルルイス_aもまたシグレック7とシグレック9のリガンドであることが判明した。

シグレック・ファミリーの糖鎖認識分子は主に免疫細胞に発現し、細胞内ドメインに ITIM モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を持ち、免疫細胞のシグナル伝達を阻害する作用を持つ事が知られている。そこで大腸粘膜中でこれらのシグレック7およびシグレック9を発現する細胞を検索したところ、その大部分が組織マクロファージ様の細胞であり、他に少数の CD8 陽性 T 細胞がこれらのシグレックを発現することが判明した。従来から末梢血などにおいてシグレック7およびシグレック9陽性細胞の典型として報じられてきた NK 細胞は、大腸粘膜においてはシグレック7およびシグレック9陽性細胞のうちごく限られた一部であるに過ぎなかった。

シグレック7およびシグレック9が炎症性体液性因子の産生に対する抑制作用を持つかどうかを、培養マクロファージ様細胞株を用いて検索したところ、LPS 刺激にともなう COX2 産生を有意に抑制する機能を持つことが明らかとなった。炎症が発癌を促進することはよく知られ、炎症性物質のうちでも COX2 の下流にあるプロスタグランジン類の役割は特に重要であるとされている。大腸粘膜中のシグレック7およびシグレック9を発現する組織マクロファージ様の細胞と、上皮細胞の特異的糖鎖リガンドの相互作用は、これらの炎症性物質の産生を抑

制する作用を有すると考えられ、正常糖鎖の発現の保持が癌の化学予防に重要である可能性が示唆された。以上の研究成果の一部は報文(*J. Immunol.*, 188: 4690-4700, 2012)として発表した。

D. 考察

1) 幹細胞培地で培養した大腸癌細胞における糖鎖変化とそのメカニズムの解析

癌幹細胞培地を用いて細胞表面の糖鎖変化を検討した今回の成果から、その糖鎖変化の背景には、c-MycやCDX2などの転写因子による糖転移酵素遺伝子の転写調節があることが判明した。c-MycはES幹細胞に関連した転写因子であることが既に知られており、CDX2は幹細胞関連転写因子であるOct4とともに初期胚幹細胞の細胞分化に関与することが知られている。今回の結果のうち、特記すべきは、*FUT2*の転写低下である。*FUT2*は従来から知られる癌関連性糖鎖であるルイスyや乳癌関連性糖鎖として知られるGlobo-Hの合成に関与することが知られる。幹細胞培地による*FUT2*の転写低下は、これらの従来から癌関連性糖鎖として知られる糖鎖の発現低下を招くものである。実際に、今回の検討では、ルイスy糖鎖の発現低下が観察された。従来から癌関連性糖鎖として知られる糖鎖のうち、癌幹細胞培地を用いた培養によって、一部の発現が増大し、一部は発現が低下することとなる。従来から癌関連性糖鎖として知られる一連の糖鎖は、実は異なる病態的意義を持つグループから成ると考えられる点が注目される。

2) シグレックを介した正常上皮細胞の糖鎖の免疫抑制作用についての検討

また、糖鎖認識分子シグレックが、大腸粘膜における上皮細胞と間質の免疫細胞とのあいだの相互作用において、炎症性の体液性分子の産生に対する重要な抑制分子としての役割を演じることが明らかとなった。炎症は発癌を促進することから、シグレックと結合する上皮細胞の正常型糖鎖の発現を維持することは、癌の化学予防の目標のひとつになり得ると考えられる。

E. 結論

癌化に伴って細胞表面の糖鎖が大きく変化し、癌細胞に特有の糖鎖は癌マーカーとして役立つことはすでによく知られている。しかし、糖鎖の変化がいわゆる癌幹細胞とどのように関わっているかについての情報はこれまで少なかった。今後こうした検討を継続することにより、癌幹細胞を選択的に検出できるマーカー糖鎖について有用な情報が得られると考えられる。また正常糖鎖の機能解析からは、癌の化学予防の目標のひとつになり得るターゲット分子も見いだされた。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Sakuma, K., Aoki, M., and Kannagi, R.: Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/ bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109: 7776-7781, 2012.
2. Miyazaki, K., Sakuma, K., Kawamura, Y. I., Izawa, M., Ohmori, K., Mitsuki, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Saito, Y., Dohi, T., and Kannagi, R.: Colonic epithelial cells express specific epithelial ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors, siglec-7 and -9. *J. Immunol.*, 188: 4690-4700, 2012.
3. Kannagi, R., Ohmori, K., Chen, G. Y., Miyazaki, K., Izawa, M., and Sakuma, K.: Sialylated and sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs: involvement in traffic and homing of human memory T and

- B lymphocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **705**: 549-569, 2011.
4. Radhakrishnan, P., Chachadi, V., Lin, M. F., Singh, R., Varki, A., Kannagi R., and Cheng, P. W.: TNF α enhances the motility and invasiveness of prostatic cancer cells by stimulating the expression of selective glycosyl- and sulfotransferase genes involved in the synthesis of selectin ligands. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **409**: 436-441, 2011.
 5. Takematsu, H., Yamamoto, H., Naito-Matsui, Y., Fujinawa, R., Tanaka, K., Okuno, Y., Tanaka, Y., Kyogashima, M., Kannagi R., and Kozutsumi, Y.: Quantitative transcriptomic profiling of branching in a glycosphingolipid biosynthetic pathway. *J. Biol. Chem.*, **286**: 27214-27224, 2011.
 6. Tanaka, K., Yamada, M., Tamiya-Koizumi, K., Kannagi R., Aoyama, T., Hara, A., and Kyogashima, M.: Systematic analyses of free ceramide species and ceramide species comprising neutral glycosphingolipids by MALDI-TOF MS with high-energy CID. *Glycoconj. J.*, **28**: 67-87, 2011.
 7. Wang, L., Kamijo, Y., Matsumoto, A., Nakajima, T., Higuchi, M., Kannagi R., Kyogashima, M., Aoyama, T., and Hara, A.: Kidney transplantation recovers the reduction level of serum sulfatide in ESRD patients via processes correlated to oxidative stress and platelet count. *Glycoconj. J.*, **28**: 125-135, 2011.
- 2.学会発表
1. Kannagi R.: Role of glycan ligands for selectins and siglecs in cancer progression and metastasis. [Invited Speaker] Symposium Program and Abstracts, pp. 11, International Symposium on Inflammation and Disease, (Chaired by Liu, F.T.), Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, Taipei, Taiwan, Sept. 8-9, 2011.
 2. 神奈木玲児: 最近の腫瘍マーカー糖鎖研究の展望. 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会抄録集, pp. 22-23, 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会(会長:平川弘聖) 特別講演(座長:今井浩三), 名古屋, 10月2日, 2011.
 3. 佐久間圭一朗、神奈木玲児: EGF and bFGF induce EMT and E-selectin ligand glycan expression on colorectal cancer cells (EGFとbFGFは大腸癌細胞にEMTとE-セレクチンリガンド糖鎖の発現を誘導する). [口演] 第70日本癌学会学術総会記事, pp. 79, 第70回日本癌学会総会, 名古屋, 10月3日-5日, 2011.
 4. Kannagi R.: Biology of sugar modification. [Invited Speaker/Chairman] Program and Abstract, pp. 17-18, The 3rd Workshop of the Netherlands-Japan on Recent Advances in Glycobiology, Chaired by K. Furukawa, Nagoya, Japan, October 8-11, 2011.
- H.知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

Ⅲ 研究成果に関する一覧

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|---|--|-----------------------------|-----------|-----------|------|
| Yamauchi C, Fujii S, Kimura T, Kuwata T, Wada N, Mukai H, Matsumoto N, Fukayama M, Ochiai A. | E-cadherin expression on human carcinoma cell affects trastuzumab-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity through KLRG1 on NK cells. | Int J Cancer | 1;128 (9) | 2125-37 | 2011 |
| Yamada A, Fujii S, Daiko H, Nishimura M, Chiba T, Ochiai A. | Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus. | Int J Oncol | 38(2) | 345-53 | 2011 |
| Hishida T, Ishii G, Kodama T, Tsuta K, Nara M, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K, Ochiai A. | Centrally located adenocarcinoma with endobronchial polypoid growth: Clinicopathological analysis of five cases. | Pathol Int. | 61(2) | 73-9 | 2011 |
| Fujii S, Tokita K, Wada N, Ito K, Yamauchi C, Ito Y, Ochiai A. | MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. | Oncogene | 9;30(39) | 4118-28 | 2011 |
| Aoyagi K, Minashi K, Igaki H, Tachimori Y, Nishimura T, Hokamura N, Ashida A, Daiko H, Ochiai A, Muto M, Ohtsu A, Yoshida T, Sasaki H. | Artificially induced epithelial-mesenchymal transition in surgical subjects: its implications in clinical and basic cancer research. | PLoS One. | 21;6(4) | e18196 | 2011 |
| Hoshino A, Ishii G, Ito T, Aoyagi K, Ohtaki Y, Nagai K, Sasaki H, Ochiai A. | Podoplanin-positive fibroblasts enhance lung adenocarcinoma tumor formation. | Cancer Res. | 15;71(14) | 4769-79 | 2011 |
| Ichinokawa H, Ishii G, Nagai K, Yoshida J, Nishimura M, Hishida T, Suzuki K, Ochiai A. | Clinicopathological characteristics of primary lung adenocarcinoma predominantly composed of goblet cells in surgically resected cases. | Pathol Int. | 61(7) | 423-9 | 2011 |
| Takahashi Y, Ishii G, Taira T, Fujii S, Yanagi S, Hishida T, Yoshida J, Nishimura M, Nomori H, Nagai K, Ochiai A. | Fibrous stroma is associated with poorer prognosis in lung squamous cell carcinoma patients. | J Thorac Oncol. | 6(9) | 1460-7 | 2011 |
| Ikehara A, Maeda H, Kimura T, Saito S, Ochiai A. | Bone marrow-derived macrophages are associated with androgen modulated prostate regeneration. | Prostate. | 72 | 73-9 | 2012 |
| 10. Taira T, Ishii G, Nagai K, Yoh K, Takahashi Y, Matsumura Y, Kojima M, Ohmatsu H, Goto K, Niho S, Takashima H, Inoue H, Ohe Y, Ochiai A. | Characterization of the immunophenotype of the tumor budding and its prognostic implications in squamous cell carcinoma of the lung. | Lung Cancer. | 76 | 423-30 | 2012 |
| 11. Fujii S, Fukamachi K, Tsuda H, Ito K, Ito Y, Ochiai A. | RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. | Biochem Biophys Res Commun. | 417 | 1074-1079 | 2012 |
| Fukuda H., Mochizuki S., Abe H., Okano H. J., Hara-Miyauchi C., Okano H., Yamaguchi N., Nakayama M., D'Armiento J. and Okada Y. | Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production. | Brit J Cancer | 105 | 1615-1624 | 2011 |

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|--|----------------------|-------|-----------|------|
| Mikami S., Katsube K., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mukai M. and Okada Y. | Expression of Snail and Slug in renal cell carcinoma: E-cadherin repressor Snail is associated with cancer invasion and prognosis. | Lab Invest | 91 | 1443-1458 | 2011 |
| Kanamori H, Kawakami T, Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Ebinuma H, Masugi Y, Du W, Nagasaka K, Ogiwara A, Kyono Y, Tanabe M, Saito H, Hibi T, Sakamoto M. | Identification by Differential Tissue Proteome Analysis of Talin-1 as a Novel Molecular Marker of Progression of Hepatocellular Carcinoma. | Oncology | 80 | 406-415 | 2011 |
| Tsuchiya K, Komuta M, Yasui Y, Tamaki N, Hosokawa T, Ueda K, Kuzuya T, Itakura J, Nakanishi H, Takahashi Y, Kurosaki M, Asahina Y, Enomoto N, Sakamoto M, Izumi N. | Expression of keratin19 is related to high recurrence of hepatocellular carcinoma after radiofrequency ablation. | Oncology | 80 | 278-288 | 2011 |
| Yamazaki K, Masugi Y, Sakamoto M. | Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma: altering transforming growth factor- β signaling in hepatocarcinogenesis. | Dig Dis | 29(3) | 284-8 | 2011 |
| Yokoo H, Yasuda J, Nakanishi K, Chuma M, Kamiyama T, Todo S, Hirohashi S, Sakamoto M. | Clinicopathological significance of nuclear factor- κ B activation in hepatocellular carcinoma. | Hepatol Res | 41(3) | 240-9 | 2011 |
| Itoh F et al. | Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. | Blood, in press | | | 2012 |
| Yang W et al. | Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. | Cancer Sci. | 102 | 1808-1814 | 2011 |
| Taguchi S et al. | Overexpression of the transcription factor Yin-Yang-1 suppresses differentiation of HaCaT cells in three-dimensional cell culture. | J. Invest. Dermatol. | 131 | 37-45 | 2011 |
| Miyamoto Y, Kitamura N, Nakamura Y, Futamura M, Miyamoto T, Yoshida M, Ono M, Ichinose S, Arakawa H | Possible existence of lysosome-like organella and its role in mitochondrial quality control | PLoS ONE | 6 (1) | e16054 | 2011 |
| Hiraoka N. et al. | CXCL17 and ICAM2 are associated with a potential anti-tumor immune response in the early intraepithelial stages of human pancreatic carcinogenesis. | Gastroenterology | 140 | 310-321 | 2011 |
| Lohr J, Hiraoka N. et al. | Effector T-cell infiltration positively impacts survival of glioblastoma patients and is impaired by tumor-derived transforming growth factor-betas. | Clin Cancer Res | 17 | 4296-308 | 2011 |
| Tsuboi S, Hiraoka N. et al. | A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumor expressing core2 O-glycans. | EMBO J | 30 | 3173-85 | 2011 |

○研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

| 発表者氏名 | 論文タイトル名 | 発表誌名 | 巻号 | ページ | 出版年 |
|--|---|---------------------------------|-----|-------------|------|
| Hayashi T. Hiraoka N. et al. | Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. | Sci Rep. | 1 | 180 | 2011 |
| Ono H. Hiraoka N. et al. | Prostate Stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. | Gene Chromosome Canc. | 51 | 30-41 | 2012 |
| Morofuji N. Hiraoka N. et al. | Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. | J Proteomics | 75 | 1577-89 | 2012 |
| Sakuma, K., Aoki, M., and Kannagi, R. | Transcription factors c-Myc and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition | Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. | 109 | 7776-7781 | 2012 |
| Miyazaki, K., Sakuma, K., Kawamura, Y. I., Izawa, M., Ohmori, K., Mitsuki, M., Yamaji, T., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Saito, Y., Dohi, T., and Kannagi, R. | Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors, siglec-7 and -9 | J. Immunol. | 188 | 4690-4700 | 2012 |
| Kannagi, R., Ohmori, K., Chen, G. Y., Miyazaki, K., Izawa, M., and Sakuma, K. | Sialylated and sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs: involvement in traffic and homing of human memory T and B lymphocytes | Adv. Exp. Med. Biol. | 705 | 549-569 | 2011 |
| Radhakrishnan, P., Chachadi, V., Lin, M. F., Singh, R., Varki, A., Kannagi, R., and Cheng, P. W. | TNF α enhances the motility and invasiveness of prostatic cancer cells by stimulating the expression of selective glycosyl- and sulfotransferase genes involved in the synthesis of selectin ligands | Biochem. Biophys. Res. Commun. | 409 | 436-441 | 2011 |
| Takematsu, H., Yamamoto, H., Naito-Matsui, Y., Fujinawa, R., Tanaka, K., Okuno, Y., Tanaka, Y., Kyogashima, M., Kannagi, R., and Kozutsumi, Y. | Quantitative transcriptomic profiling of branching in a glycosphingolipid biosynthetic pathway | J. Biol. Chem. | 286 | 27214-27224 | 2011 |
| Tanaka, K., Yamada, M., Tamiya-Koizumi, K., Kannagi, R., Aoyama, T., Hara, A., and Kyogashima, M. | Systematic analyses of free ceramide species and ceramide species comprising neutral glycosphingolipids by MALDI-TOF MS with high-energy CID | Glycoconj. J. | 28 | 67-87 | 2011 |
| Wang, L., Kamijo, Y., Matsumoto, A., Nakajima, T., Higuchi, M., Kannagi, R., Kyogashima, M., Aoyama, T., and Hara, A. | Kidney transplantation recovers the reduction level of serum sulfatide in ESRD patients via processes correlated to oxidative stress and platelet count | Glycoconj. J. | 28 | 125-135 | 2011 |

