

D. 考察

TGF- β で発現が誘導される TMAPAI と MafK ならびに TGF- β の標的遺伝子である TSC22D4 のファミリー分子である TSC22D4/THG-1 が、腫瘍形成に深く関わっていることを証明し、その作用機序の一端を明らかにした。これらの分子群は、我々の研究によってがんの発生・進展に関与することが独自に発見されたもので、日本発の新たな分子標的治療の開発に応用されることが強く期待されるシーズである。MafK の標的遺伝子であることを見いだした Gpnmb は、すでに抗がん剤を結合させたモノクローナル抗体による第2相臨床試験が行われている分子であり、我々は、この分子を標的とした全く新しい Gpnmb 阻害薬の開発に着手している。Gpnmb は細胞表面に発現する糖タンパク質であるとともに、がん幹細胞の増殖に関与することが示唆される分子であり、この分子を標的とした治療方法は、がんの再発の元となる幹細胞を標的とした治療方法として注目される。TMEPAI, TSC22D4/THG-1, MafK も、がん治療の有望な標的であり、今後の研究の発展が期待される。また、これらの分子群は種々のがん細胞で高度に発現が亢進する分子群であり、これらの分子群の発現解析が、がんの早期診断や予後判定に有効であることも期待される。我々は、これらの分子群のモノクローナル抗体や遺伝子改変マウスの作製を行っており、これらの研究シーズを臨床病理学的研究や診断法の開発に応用することも強く期待される。

E. 結論

発癌に関わる新規 TGF- β 関連分子として、TMEPAI, TSC22D4/THG-1, MafK ならびに Gpnmb を同定し、その作用機序の一端を明らかにした。今後、これらの分子群の検出や機能を制御する方法を開発することで、がんの新しい診断法・治療法・予防法の開発に繋がる基礎研究成果が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

1 Nakano N, Maeyama K, Sakata N, Itoh F, Akatsu R, Nakata M, Katsu Y, Ikeno S, Togawa Y, Vo Nguyen TT, Watanabe Y, **Kato M** and Itoh S. C18 ORF1: A Novel Negative Regulator of TGF- β Signaling. **J. Biol. Chem.** *in press*.

- 2 Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Shiba A, Noguchi M, Itoh S and **Kato M**. TMEPAI/PMEPA1 enhances tumorigenic activities in lung cancer cells. **Cancer Sci.** 105: 334-341, 2014.
- 3 Yoon JH, Jung SM, Park SH, **Kato M**, Yamashita T, Lee IK, Sudo K, Nakae S, Han JS, Kim OH, Oh BC, Sumida T, Kuroda M, Ju JH, Jung KC, Park SH, Kim DK and Mamura M. Activin receptor-like kinase5 inhibition suppresses mouse melanoma by ubiquitin degradation of Smad4, thereby derepressing Eomesodermin in cytotoxic T lymphocytes. **EMBO Mol. Med.** 5: 1720-1739, 2013.
- 4 Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D and **Kato M**. Transforming Growth Factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.** 288: 20658-20667, 2013.
- 5 Itoh F, Itoh S, Adachi T, Ichikawa K, Matsumura Y, Takagi T, Festing M, Watanabe T, Weinstein M, Karlsson S and **Kato M**. Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via S1PR1 and N-cadherin expressions. **Blood.** 119: 5320-5328, 2012.
- 6 Yang W, Itoh F, Ohya H, Kishimoto F, Tanaka A, Nakano N, Itoh S and **Kato M**. Interference of E2-2-mediated effect in endothelial cells by FAM96B through its limited expression of E2-2. **Cancer Sci.** 102: 1808-1814, 2011.
- 7 Taguchi S, Kawachi Y, Ishitsuka Y, Fujisawa Y, Furuta J, Nakamura Y, Xu X, Ikebe D, **Kato M** and Otsuka F. 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.
- 8 Nakano N, Itoh S, Watanabe Y, Maeyama K, Itoh F and **Kato M**. Requirement of TCF7L2 for TGF- β -dependent transcriptional activation of the TMEPAI gene. **J. Biol. Chem.** 285: 38023-38033, 2010.
- 9 Ohshima M, Yamaguchi Y, Matsumoto N, Micke P, Takenouchi Y, Nishida T, **Kato M**, Komiyama K, Abiko Y, Ito K, Otsuka K and Kappert K. TGF- β Signaling in Gingival

Fibroblast-Epithelial Interaction. **J. Dent. Res.** 89: 1315-1321, 2010.

- 10 Tanaka A, Itoh F, Takezawa T, Itoh S and **Kato M**. Inhibition of endothelial cell activation by bHLH protein E2-2 and its impairment of angiogenesis. **Blood.** 115: 4138-4147, 2010.
- 11 Watanabe Y, Itoh S, Goto T, Ohnishi E, Inamitsu M, Itoh F, Satoh K, Wiercinska E, Yang W, Shi L, Tanaka A, Nakano N, Mommaas AM, Shibuya H, ten Dijke P and **Kato M**. TMEPAI, a transmembrane TGF- β -inducible protein, sequesters Smad proteins from active participation in TGF- β signaling. **Mol. Cell.** 37: 123-134, 2010.

2. 学会発表

鈴木裕之、加藤光保. 細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリー分子の役割. (Poster) 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3 日～5 日

渡邊幸秀、加藤光保、伊東進. TGF- β シグナル抑制分子 TMEPAI の癌の進展における役割. (Poster) 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3 日～5 日

沖田結花里、鈴木裕之、加藤光保. 乳がん細胞の上皮間葉転換と転移における MafK の役割. (Oral) 第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2013 年 10 月 3 日～5 日

Kato M, Vo Nguyen TT, Watanabe Y. Tumorigenic activities of a TGF- β target gene TMEPAI in Lung Cancer Cells. (Poster) FASEB Science Research Conferences-The TGF- β superfamily: signaling in development & diseases (Colorado, USA) 2013 年 7 月 28 日～8 月 2 日

鈴木裕之. 細胞増殖、分化、がん化における Tsc-22 ファミリータンパク質の役割. (Poster) 第 32 回分子病理学研究会 (吉野) 2013 年 7 月 20 日～21 日

沖田結花里. 乳腺上皮細胞の上皮間葉転換と腫瘍形成における小 Maf 群転写因子の役割. (Poster) 第 102 回日本病理学会総会 (札幌) 2013 年 6 月 6 日～8 日

加藤光保. がんの発生と進展における TMEPAI の作用. (Oral) 第 102 回日本病理学会総会 (札幌) 2013 年 6 月 6 日～8 日

Kato M. Tumorigenic activities of TGF- β target genes; TMEPAI and MafK. (Invited) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日

Suzuki H. Roles of Tsc-22 family proteins in tumorigenesis. (Oral) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日

Okita Y. MafK promotes tumor formation and invasion/metastasis of breast cancer cells through induction of EMT. (Poster) LICR TGF- β meeting 2013 (Uppsala, Sweden) 2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日

Vo Nguyen TT. Autocrine TGF- β induces TMEPAI and potentiates tumorigenic activity in lung cancer cell lines. (Poster) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日

Watanabe Y. Roles of PARP on BMP signaling. (Poster) LICR TGF- β meeting in Uppsala 2013 (Uppsala, Sweden) 2013 年 5 月 30 日～6 月 1 日

Kato M. (Invited) Intermittently proliferating Geysercells in the colonic mucosa. LICR TGF- β meeting in Leiden 2012 (Leiden, Netherlands) 2012 年 8 月 29 日～31 日

加藤光保. 3次元定量組織学解析による発がんメカニズムの研究. (Oral) 第 101 回日本病理学会総会 (東京) 2012 年 4 月 26 日～28 日

Kato M. TMEPAI in Cancer Cell Biology. (Invited) The 1st International Symposium by JSPS Core-to-Core Program “Cooperative International Framework in TGF- β Family Signaling” (東京)

2012年1月23日～24日

鈴木裕之、加藤光保. 細胞増殖、分化、癌化における Tsc-22 ファミリー分子の役割.
(Oral) 第70回日本癌学会学術総会 (名古屋)
2011年10月3日～5日

加藤光保. ワークショップ3 (基調講演) 大腸腺腫の発生における Wnt シグナルの機能の3次元定量組織学による解析. 第100回日本病理学会総会

(横浜) 2011年4月28日～30日
Vo Nguyen TT, Watanabe Y, Itoh S, Kato M.
Monoclonal antibody for TMEPAI. (Poster)
第33回日本分子生物学会年会 (神戸)
2010年12月7日～10日

Kato M. Smad traps for negative regulation of TGF- β signaling. (Invited) 59th Fujihara International Seminar.
(Tomakomai) 2010年6月14日～17日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2012-140549

特開 2014-006100

画像システム、画像処理方法及び画像処理プログラム

新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその異常に関する研究

研究分担者 荒川 博文 国立がん研究センター研究所腫瘍生物学分野長

研究要旨

我々は p53 及びその標的遺伝子 *Mieap* によって制御される全く新しいミトコンドリア品質管理機構を見いだした。ヒトがん細胞においては、p53 の変異や *Mieap* のメチル化で、この機能が異常となっており、結果的に不良なミトコンドリアの蓄積を招いている。正常細胞とがん細胞の違いを、がん細胞における異常ミトコンドリアの蓄積ととらえ、その発がんやがん進展における役割の解明と、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法の開発の基盤を作ることをこの研究の目的とする。ヒトがんにおけるがん細胞における *Mieap* やミトコンドリアの状況を調べ、異常ミトコンドリアから産生される活性酸素による酸化ストレスの役割を、がん細胞及びがん間質細胞の両者において明らかとする。動物モデルを用いた解析から、*in vivo* におけるその意義を解明する。この研究の成果から、がんに特徴的な代謝異常のメカニズム解明と、がん細胞特異的な異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法の開発が期待される。

A. 研究目的

我々は p53 及びその標的遺伝子 *Mieap* によって制御される全く新しいミトコンドリア品質管理 (MQC) 機構を見いだした。ある種のヒトがん細胞においては、*Mieap* はメチル化で不活性化されていることを見いだした。従って、多くのがん細胞において、p53 の変異や *Mieap* のメチル化で、ミトコンドリアの MQC 機構が異常となり、結果的に不良なミトコンドリアの蓄積を招いている可能性がある。正常細胞とがん細胞の違いを、がん細胞における異常ミトコンドリアの蓄積ととらえ、その発がんやがん進展における役割の解明と、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法開発の基盤を作ることをこの研究の目的とする。

B. 研究方法

(1) 国立がん研究センター研究所の尾野らとの共同研究から開発した免疫沈降物に対する網羅的プロテオーム解析法である IP-2DICAL 法を用いて、*Mieap* 結合タンパク質の同定と機能解析を進める。候補タンパク質に対して、内在性 *Mieap* タンパク質との結合確認や、機能喪失及び機能亢進実験を行うことで、機能を明らかとして、*Mieap* による MQC 機構のメカニズムの詳細を明らかとする。

(2) *Mieap* 及び関連タンパク質である BNIP3 と NIX のメチル化異常と p53 の変異について、50 例程度の大腸がん・膵がん・胃がん組織検体を用いて解析を行う。

(3) *Mieap* ノックアウトマウスを作成し、大腸がんなどの発がんモデルマウスを交配し、生体内でのがんの発生及び進展過程における *Mieap* の役割を明らかとする。

C. 研究結果

(1) *Mieap* 結合タンパク質として BNIP3, NIX, 14-3-3 γ , UVRAG の4つを同定した。BNIP3 及び NIX はミトコンドリア外膜上に存在し、*Mieap* との結合によって、ミトコンドリア内へのリソソームタンパク質の集積をメディエートしている。14-3-3 γ は、細胞質に存在しているタンパク質であるが、*Mieap* との結合によって、ミトコンドリア内部へ移動して、リソソームタンパク質によるミトコンドリア内のタンパク質の分解をメディエートしていることを明らかとした。UVRAG はオートファジーの関連分子であるが、*Mieap* α との結合によって、*Mieap* によって誘導される液胞様構造物の生成の制御に重要な役割を果たしていることを明らかとした。

(2) *Mieap* 制御性 MQC 機構は、p53 の変異・*Mieap* プロモーターのメチル化・BNIP3 プロモーターのメチル化のいずれかによって、大腸がん患者がん組織の 80%以上、膵がん患者がん組織の 70%以上、胃がん患者がん組織の 70%以上で不活性化されていることを明らかとした。

(3) *Mieap* ノックアウトマウスを作成した。自然発がんは今のところ 1 年程度の観察に於いて認められていない。*Mieap* ノックアウトマウスと *Apc*^{MIN/+}マウスの交配によって、

Apc^{MIN/+} /Mieap^{+/-}マウスを作成したところ、寿命の顕著な短縮を認めた (Apc^{MIN/+} /Mieap^{+/-} vs Apc^{MIN/+}マウス = 19.1 weeks vs 24.4 weeks)。

D. 考察

(1) Mieap 制御性 MQC 機構は、不良なミトコンドリアに対して、ミトコンドリア内部ヘリソソームタンパク質の集積を誘導して、酸化修飾タンパク質の分解・除去を行い修復するか (MALM)、液胞様構造物を誘導して不良なミトコンドリアそのものを取り込んで分解・排除するか (MIV) のいずれかの様式で、ミトコンドリアの品質を良好に維持している。この機能は、従来からのオートファジーとは全く異なる新しいメカニズムである。従って、そのメカニズムの解明には、Mieap 結合タンパク質の同定とその役割の解明が必須である。本研究によって、4つの Mieap 結合タンパク質の同定に成功した。

MALM の誘導には、ミトコンドリア二重膜への pore の形成が必須と思われるが、BNIP3 と NIX は、ミトコンドリア外膜において、Mieap と結合して、細胞死に関連しないミトコンドリア二重膜の pore を誘導した。この事実は、ミトコンドリア内へのリソソームタンパク質の集積という現象のメカニズムの手がかりの一つを提供したと考えられる。また、ミトコンドリア内での酸化修飾タンパク質の分解について、14-3-3 γ の存在は、ミトコンドリア内におけるシャペロン介在型のオートファジーと類似のメカニズムの存在を示唆させるものと思われた。一方で、UVRAG と Mieap α の特異的結合による MIV の制御は、MALM と MIV の二つの機能がどのように制御されているかの機序の一端を明らかとすることができたと考えている。

(2) Mieap 制御性 MQC 機構は、p53 の変異と同様に、様々ながん種で高頻度に不活性化されている可能性がある。これによって、生体内の腫瘍微小環境の低酸素状態において、不良なミトコンドリアががん細胞に蓄積し、そこから産生される ROS が、がんの発生・増殖・浸潤・転移に大きく貢献している可能性が高い。免疫組織化学的解析及び臨床病態との関連性を含めて、様々ながん種での解析が今後必要と思われる。

(3) 消化管腫瘍モデルマウスである Apc^{MIN/+}マウスを用いた実験から、Mieap のヘテロ欠失は、Apc^{MIN/+}マウスの消化管腫瘍の進展を加速する可能性がある。観察された寿命の短縮は消化管腫瘍からの出血の増悪に伴う現象であると推測された。事実、現在までの解析から、通常の Apc^{MIN/+}マウスでは、ほとんど観察されない大腸

腫瘍が、Apc^{MIN/+} /Mieap^{+/-}マウスにおいて増加する傾向にあることを確認している。このことから、ヒト大腸がん患者組織における Mieap 制御性 MQC 機能の高頻度の不活性化は、大腸腫瘍組織における不良なミトコンドリアの蓄積と、そこから高いレベルの ROS の産生を生体内で招いている可能性が高く、この不良なミトコンドリアから産生された ROS が、大腸腫瘍の発生・進展に大きく寄与している可能性が高いと推測された。

E. 結論

Mieap によって制御される MQC 機構には、極めて特異的な制御メカニズムが存在している。また、MEF 細胞での再現実験で明らかのように、この機能はマウス細胞にも存在していた。また、正常細胞を 2%O₂ の低酸素状態に置くだけで、この機能が活性化されることなどから、この機能は、細胞に備わった極めて本質的かつ普遍的な機能で、少なくともマウスからヒトまで保存されている生理的な機能であると考えられる。

また、この機能は、上流で p53 が、下流で BNIP3 が極めて重要な活性化分子やメディエーターとして機能しており、p53/Mieap/BNIP3 経路はヒト大腸がん組織や膵がん組織、胃がん組織など、様々ながん種のがん組織において高頻度に不活性化されている可能性が高い。また、この MQC 機構のヒトがんにおけるその破綻は、がんの微小環境におけるがん細胞への不良なミトコン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。

以上のことから、Mieap 制御性 MQC 機構は、がん抑制遺伝子 p53 の全く新しいがん抑制メカニズムであると考えられる。

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. Miyamoto Y, Futamura M, Kitamura N, Nakamura Y, Baba H, Arakawa H. Identification of UNC5A as a novel transcriptional target of tumor suppressor p53 and a regulator of apoptosis. *Int J Oncol* 36: 1253-1260, 2010.

2. Cui H, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H, Futamura M. Regulation of apoptosis by p53-inducible transmembrane protein containing

sushi domain. *Oncol Rep* 24: 1193-1200, 2010.

3. Ohnishi S, Futamura M, Kamino H, Nakamura Y, Kitamura N, Miyamoto Y, Miyamoto T, Shinogi D, Goda O, Arakawa H. Identification of NEEP21, encoding neuron-enriched endosomal protein of 21 kDa, as a transcriptional target of tumor suppressor p53. *Int J Oncol* 37: 1133-1141, 2010.

4. 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: e16054, 2011

5. Kitamura N, Nakamura Y, Miyamoto Y, Miyamoto T, Kabu K, Yoshida M, Futamura M, Ichinose S, Arakawa H. Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. *PLoS ONE* 6: e16060, 2011

6. 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.

7. Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, Nakamura Y, Yoshida M, Kamino H, Murai R, Yamada T, Arakawa H. Identification of 14-3-3gamma as a Mieap-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Scientific Reports* 2: 379, 2012.

8. Zhu Y, Li Y, Haraguchi S, Yu M, Ohira M, Ozaki T, Nakagawa A, Ushijima T, Isogai E, Koseki H, Nakamura Y, Kong C, Mehlen P, Arakawa H, Nakagawara A. Dependence Receptor UNC5D mediates nerve growth factor depletion-induced neuroblastoma regression. *Journal of Clinical Investigation* 123: 2935-2947, 2013.

9. Ohata H, Miyazaki M, Otomo R, Matsushima-Hibiya Y, Otsubo C, Nagase T, Arakawa H, Yokota J, Nakagama H, Taya Y, Enari M. NuMA is required for the selective induction of p53-target genes. *Molecular and Cellular Biology* 33: 2447-2457, 2013.

2. 学会発表

1. 荒川博文 第 69 回日本癌学会学術総会シン

ポジウム S16 がんオートファジー 演題「p53 誘導性因子である Mieap は不良ミトコンドリアを修復あるいは排除することでミトコンドリアの品質を管理する」

2. 荒川博文、シンポジウム・疾患に関与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）

3. 荒川博文、2011JCA-Mauvernay 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）

4. 荒川博文、シンポジウム：がん・組織障害とオートファジー
演題「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とヒトがんにおけるその破綻について」、
平成 24 年 9 月 24 日、第 21 回日本 Cell Death 学会（名古屋市）

5. 荒川博文、シンポジウム：オートファジー・プロテオステイシスとがん
演題「ミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん：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 24 年 9 月 19 日、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌市）

6. 荒川博文、シンポジウム：ミトコンドリア新機能と破綻による疾患
演題「ミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん～がん抑制遺伝子 p53 の新規機能について～」
平成 25 年 9 月 11 日、第 86 回日本生化学会大会（横浜市）

7. 荒川博文、シンポジウム：オートファジー：がんに対する多面性
演題「Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理の生理的意義について」、
平成 25 年 10 月 3 日、第 72 回日本癌学会学術総会（横浜市）

8. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Noriaki

Kitamura, Manabu Futamura, Masaki Yoshida, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Yae Kanai, Yoshihiro Moriya, Hirofumi Arakawa. Frequent inactivation of the Mtap-regulated mitochondrial quality control in colorectal cancer. AACR Annual Meeting 2013, April 8, 2013, Washington D.C., USA.

9. Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Noriaki Kitamura, Hiroki Kamino, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. AACR Annual Meeting 2013, April 8, 2013, Washington D.C., USA.

10. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Masaki Yoshida, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. Cell Symposia 2013, May 5, 2013, Lisbon, Portugal.

H. 知的財産権の出願・登録状況
特にありません。

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：本研究は、ヒト膵がん間質の免疫微小環境に関わる形態学的変化、がん間質に浸潤する免疫担当細胞、がん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、抗腫瘍性の免疫微小環境の形成に関わる分子機序に迫ろうとするものである。本研究により、がん組織の免疫微小環境を抗腫瘍性と腫瘍支持性と特徴付ける因子として、抗腫瘍性：膵がん間質に浸潤する M1 マクロファージ・CD4⁺T 細胞・CD8⁺T 細胞浸潤、腫瘍内 3 次リンパ装置の存在、腫瘍支持性：がん組織内の壊死の存在、膵がん間質に浸潤する M2 マクロファージ・好中球・制御性 T 細胞浸潤、アルギナーゼ II ががん関連線維芽細胞に発現すること、を見出し、いずれも膵がん患者の独立した予後因子になることを明らかにした。またこれら因子は同時に治療の対象選別、がん組織における免疫状態の把握やモニタリング、免疫療法や薬物療法の効果対象患者の選別への応用可能性をもつ等、今後臨床に応用することが期待される多くの因子である。免疫担当細胞の浸潤様式の変化から、膵多段階発がん過程の進行に伴い免疫微小環境を抗腫瘍性から好腫瘍性に向かうこと、腺腫までの段階ではケモカイン CXCL17 と接着分子 ICAM2 が抗腫瘍免疫形成に関わることを明らかにした。ここで得られた免疫微小環境を特徴付ける因子についてさらなる分子機序の解明を通して、新たな治療標的の同定に結びつくことが期待される。

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、厚生労働行政上の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、それら遺伝子発現や浸潤様式の内の何が、抗腫瘍性(免疫反応性)と腫瘍支持性(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)と腫瘍支持性(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。そこで、これら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。

1. 膵がん組織変化と患者予後との関係：がんの悪性度と病理組織学的変化との相関を解析するために国立がん研究センター中央病院にて外

科的に切除された膵がん症例を用い、多様な組織学的因子を含む臨床病理学的因子について、特に患者予後との関係について検討した。

2. 膵がん組織に浸潤する免疫担当細胞と免疫微小環境：免疫微小環境を特徴付ける遺伝子、免疫担当細胞の同定する為に、免疫微小環境に関わる可能性のある様々な遺伝子の膵がん組織での発現および膵がん組織に浸潤する免疫担当細胞の浸潤様式を、各々定量的 RT-PCR 法、免役組織化学にて解析し、それらと臨床病理学的な患者情報とを比較検討した。

3. 膵多段階発がん過程における腫瘍への免疫担当細胞浸潤と免疫微小環境の変化を検討した。

倫理面への配慮

平成20年厚生労働省告示第415号「臨床研究に関する倫理指針」ならびに平成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した。

C. 研究結果

1. 膵がん組織変化と患者予後との関係

膵がん組織の病理形態学的変化について患者予後との関係を含めて、臨床病理学的に検討した。リンパ節転移が有ること、切離断端にがん

進展の有ること、リンパ管侵襲が有ること、膵内神経浸潤が有ること、がん組織内に壊死が有ること、が予後不良となる独立した予後因子であることを明らかにした。

2. 膵がん組織に浸潤する免疫担当細胞と免疫微小環境

膵がん組織に浸潤するリンパ球の中で、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞の各浸潤が多い症例は、疾患特異的生存(disease-specific survival, DSS)および無病生存(disease-free survival, DFS)が有意に高く、CD68⁺マクロファージ、CD163⁺あるいはCD204⁺M2マクロファージ浸潤の多い症例は、DSSとDFSが共に有意に短かった。がん間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率の高い症例は、DSS, DFSが共に有意に長かった。

より現実的な免疫微小環境の特性を検討するため、同一膵がん組織で複数の免疫細胞種の浸潤様式を組み合わせで検討した。膵がん組織に浸潤する6種の免疫細胞浸潤を組み合わせで生存解析を実施した。CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞の組み合わせでは、両細胞浸潤が多い群のみが生存が有意に長いことなどの偏りがあった。偏りを考慮して、これら因子を組み合わせた新たな因子として「CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞浸潤が多く%Tregが少ない」か否か、「%M1が多くCD163⁺M2マクロファージ浸潤が少ない」か否か、を定義し多変量解析により、より高いハザード比を有する独立した予後因子となった。複数の免疫細胞浸潤を組み合わせることで、個々の免疫細胞浸潤では計れなかったよりリアルな免疫微小環境の特性を推し量ることが可能となった。

3. 膵多段階発がん過程における免疫担当細胞浸潤の変化とその分子機序

膵乳頭粘液性腫瘍を用いて、発がん過程の進行と免疫担当細胞浸潤を検討すると、発がん過程の進行に従って、腫瘍細胞間に浸潤するCD8⁺T細胞数、骨髄性未熟樹状細胞(DC)細胞数、腫瘍間質に浸潤するマクロファージ全体に占めるCD68⁺HLA-DR⁺M1マクロファージの比率は、段階的に有意に減少した。逆に、腫瘍間質に浸潤するCD163⁺M2マクロファージ数、同好中級数、TregのCD4⁺T細胞に占める割合は、段階的に有意に増加した。次にIPMA細胞間へのDC浸

潤を促進する分子機序を明らかとするために、発がん過程各段階の上皮細胞の網羅的遺伝子発現解析を実施した。正常上皮に比して IPMA で発現が上昇し、IPMC で発現が低下する遺伝子として、ケモカイン CXCL17 と接着分子 ICAM2 を得た。マウス腫瘍を用いた同種同系移植モデルを用いて、CXCL17 と ICAM2 の免疫応答性の制御を検討した結果から、CXCL17 と ICAM2 の発現が腫瘍局所への効率的な DC 浸潤を誘導し、継いで細胞性免疫が惹起され、さらに ICAM2 発現により T 細胞の標的腫瘍細胞障害の効率がよくなること、これらが相乗的に働いて抗腫瘍免疫能が誘導されると考えられた。

4. 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 は膵がん細胞にほとんど発現していないが、膵がん組織中の壊死組織およびその近傍に存在するがん関連線維芽細胞(CAF)に特徴的に発現し、生存解析により ARG2 発現 CAF が全生存および無病生存における独立した予後因子であることがわかった。ARG2 を発現する CAF の特徴的な局在等の所見や、膵がん組織から単離培養した CAF に低酸素刺激を加えた後の遺伝子発現の検討等から、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。

5. 膵がん 3 次リンパ装置の免疫微小環境との関係

膵がん組織内に 3 次リンパ装置が形成されていることは全生存および無病生存における独立した予後因子と考えられ、別コホートを用いて確認された。膵がん組織内に 3 次リンパ装置の存在する症例は、がん組織への免疫細胞浸潤やがん組織内の免疫関連遺伝子発現から、細胞性免疫が比較的活動性の状態であることが示された。腫瘍内 3 次リンパ装置を有する膵がん組織では、細動静脈・末梢神経はがん浸潤を免れて残存するものが多いことが統計的な有意差を伴って認められ、3 次リンパ装置とそれら構造との関連性が示唆された。

6. 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、抗腫瘍性免疫微小環境と深く関連する遺伝子を同定した。新たな 2 つのコホートを用いた RNA レベルの検討と蛋白レベルの検討からその結果を確認した。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。

D. 考察

1. 膵がん組織変化と患者予後との関係

膵がん組織における腫瘍壊死同定は、臨床の場においても簡便かつ再現性高く、患者予後予測可能な有効な手段になることが実証された。さらにはがん組織の低酸素状態や HIF-1 α を標的とした治療の対象となる患者選択に有用な手段になると考えられる。

2. 膵がん組織に浸潤する免疫担当細胞と免疫微小環境

膵がん間質に浸潤する M2 マクロファージ、好中球、Treg 浸潤は腫瘍支持性免疫微小環境を、M1 マクロファージ、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞浸潤のある微小環境は抗腫瘍性免疫微小環境と深く関連すると考えられた。

複数の免疫細胞浸潤を同時に評価することで、個々の免疫細胞浸潤ではわからなかった免疫微小環境との関係を明らかにすることが出来た。

3. 膵多段階発がん過程における免疫担当細胞浸潤の変化とその分子機序

多段階発がん過程の進行に伴い、免疫微小環境は抗腫瘍性から好腫瘍性に向かっていくことが示唆された。一方、多段階発がん過程の中で、前がん病変初期、腺腫段階までは異常細胞(腫瘍細胞)を除去するある種の生体防御機序の一つとして、異常細胞自らが DC 浸潤を誘導し、細胞性免疫を惹起する分子機序が存在することがわかり、さらにその機構は発がん過程の進行により失われていくことが示唆された。

4. 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

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、肺がんでは 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。

5. 膵がんにおける 3 次リンパ装置の臨床病理学的意義

膵がん組織内の 3 次リンパ装置の存在は宿主の抗腫瘍免疫を量る指標になること、予後予測の指標になることが示された。一方で、腫瘍組織内の血管が動静脈から細動静脈レベルの血管の残存と毛細血管レベルの細い血管における非腫瘍性血管(いわゆる異常血管としての腫瘍性血管の特徴を欠く)が多くを占めていることは、がん組織内に免疫細胞の輸送経路が維持され、そのことが活動性の免疫反応につながった可能性が推測された。また血管網が比較的健常に保たれているのであれば、薬剤輸送経路も維持されている可能性が示唆され、薬物療法に対する抵抗性の低い腫瘍群、ほかの条件がそろえば治療効果の期待できる治療対象例として選別されると考えられる。以上のように、腫瘍内に 3 次リンパ装置を有することは、免疫療法や薬物療法の効果対象患者の選別条件への応用可能性が示唆された。

E. 結論

本研究では、ヒト膵がん間質の免疫微小環境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検討し、それらが抗腫瘍性(免疫反応性)と腫瘍支持性(免疫寛容)といった免疫微小環境を特徴付けていることを示した。それらはいずれも患

者予後予測因子として診断的に有用であり、また壊死や ARG2 発現 CAF は低酸素標的治療の対象選別、がん組織における免疫状態の把握やモニタリングに役立つがん組織浸潤免疫細胞や遺伝子発現、がん組織内の血管網の維持を介した免疫療法や薬物療法の効果対象患者の選別への応用可能性をもつ腫瘍内 3 次リンパ装置の存在、等の今後臨床に応用することが期待される多くの因子を見出した。同時にここで得られた免疫微小環境を特徴付ける因子についてさらなる分子機序の解明を通して、新たな治療標的の同定に結びつくことが期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. [Hiraoka N.](#), Ino Y, Sekine S, Tsuda H, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Yoshida M, Yamada K, Koyama T, Kanai Y. Tumor necrosis is a postoperative prognostic marker for pancreatic cancer patients with a high interobserver reproducibility in histological evaluation. *Br J Cancer*, **103**; 1057-65: 2010.
2. Miyazawa Y, Uekita T, [Hiraoka N](#), Fujii S, Kosuge T, Kanai Y, Nojima Y, Sakai R. CUB Domain-Containing Protein 1, a prognostic factor of human pancreatic cancers, promotes cell migration and extracellular matrix degradation. *Cancer Res*. **70**; 5136-46: 2010.
3. [Hiraoka N](#). Tumor-infiltrating lymphocytes and hepatocellular carcinoma: Molecular biology. *Int J Clin Oncol*. **6**; 544-51: 2010.
4. [Hiraoka N](#), Yamazaki-Itoh R, Ino Y, Mizuguchi Y, Yamada T, Hirohashi S, Kanai Y. 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.
5. Lohr J, Ratliff T, Huppertz A, Ge Y, Dictus C, Ahmadi R, Grau S, [Hiraoka N](#), Eckstein V, Ecker R, Korff T, von Deimling A, Unterberg A, Beckhove P, Herold-Mende CC. 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.

6. Tsuboi S, Sutoh M, Hatakeyama S, Hiraoka N, Habuchi T, Horikawa Y, Hashimoto Y, Yoneyama T, Mori K, Koie T, Nakamura T, Saitoh H, Yamaya K, Funyu T, Fukuda M, Ohyama C. A novel strategy for evasion of NK cell immunity by tumor expressing core2 O-glycans. *EMBO J.* **30**; 3173-85: 2011.

7. Hayashi T, Horiuchi A, Sano K, Hiraoka N, Kasai M, Ichimura T, Sudo T, Tagawa Y, Nishimura R, Ishiko O, Kanai Y, Yaegashi N, Aburatani H, Shiozawa T, Konishi I. Potential role of LMP2 as tumor-suppressor defines new targets for uterine leiomyosarcoma therapy. *Sci Rep.* **1**; 180: 2011.

8. Ono H, Hiraoka N, Lee Y-S, Woo SM, Lee WJ, Choi IJ, Saito A, Yanagihara K, Kanai Y, Ohnami S, Shiwaki F, Sasaki H, Sakamoto H, Yoshida T, Saeki N. Prostate Stem cell antigen, a presumable organ-dependent tumor suppressor gene, is down-regulated in gallbladder carcinogenesis. *Gene Chromosome Canc.* **51**; 30-41: 2012.

9. Morofuji N, Ojima H, Onaya H, Okusaka T, Shimada K, Sakamoto Y, Esaki M, Nara S, Kosuge T, Asahina D, Ushigome M, Hiraoka N, Nagino M, Kondo T. Macrophage-capping protein as a tissue biomarker for prediction of response to gemcitabine treatment and prognosis in cholangiocarcinoma. *J Proteomics.* **75**; 1577-89: 2012.

10. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. *Br J Cancer.* **108**; 914-23: 2013.

11. Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Oguro S, Shimada K, Kosuge T, Zavada J, Kanai Y, Hiraoka N. Arginase II expressed in cancer-associated fibroblasts indicates tissue hypoxia and predicts poor outcome in patients with pancreatic cancer. *PLoS One.* **8**; e55146: 2013.

12. Oguro S, Shimada K, Ino Y, Esaki M, Nara S, Kishi Y, Kosuge T, Kanai Y, Hiraoka N. Pancreatic intraglandular metastasis predicts poorer outcome in postoperative patients with pancreatic ductal carcinoma. *Am J Surg Pathol.* **37**; 1030-8: 2013.

13. Hori M, Takahashi M, Hiraoka N, Yamaji T, Mutoh M, Ishigamori R, Furuta K, Okusaka T, Shimada K, Kosuge T, Kanai Y, Nakagama H.

Association of pancreatic fatty infiltration with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Transl Gastroenterology.* **5**; e532012: 2014.

2. 学会発表

1. 猪野義則、山崎理恵、島田和明、金井弥栄、平岡伸介。腫瘍浸潤リンパ球およびマクロファージは膵がん患者の予後因子となる。第69回日本癌学会学術総会 大阪市。2010年9月。

2. 平岡伸介。多段階発がん過程における抗腫瘍免疫機構に関する研究。第56回日本病理学会秋期特別総会。A演説(学術研究賞)。北九州市。2010年11月。

3. 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II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。

4. Hiraoka N, Ino Y, Yamazaki-Itoh R, Shimada K, Iwasaki M, Kosuge T, Kanai Y. Immune cell infiltration as an indicator of the immune microenvironment of pancreatic cancer. An AACR Scientific Conference on Tumor Immunology: Multidisciplinary Science Driving Basic and Clinical Advances. Miami. December 2012.

5. 平岡伸介 膵がんの免疫微小環境. 第102回日本病理学会総会, 札幌, 2013年6月.

6. 平岡伸介腫瘍局所の免疫環境. 第10回日本病理学会カンファレンス, 神戸, 2013年8月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 発明の名称: 免疫微小環境を反映する、膵がんの予後予測マーカー、発明者: 平岡伸介、石川義典、山崎理恵、出願人: 独立行政法人国立がん研究センター、出願番号: 特願2013-102529

がん間質相互作用における糖鎖認識分子とがん細胞グリコームの
役割の解明と臨床応用に関する研究

研究分担者 神奈木 玲児 愛知医科大学・先端医学研究センター・客員教授

研究要旨：細胞表層の糖鎖のうちには、間質細胞の担うセレクチンやシグレックなどの糖鎖認識分子の特異的なリガンドとして働き、がん-間質相互作用に関与する機能をもつものがある。本研究ではこれらの糖鎖変化とその機能の分子機構を明らかにして新しい診断・治療法の開発に資することを研究目的とした。その結果、早期癌では糖鎖合成に関与する遺伝子のエピジェネティック・サイレンシングが起り、そのため正常細胞が発現していた機能性糖鎖が失われ、その機能欠損によって細胞の悪性化がさらに進行することが明らかになった。進行期の癌では、癌幹細胞に特徴的と考えられる転写/転写後調節機構によって糖鎖異常が惹起され、これが悪性度の増大に関与することが判明した。

A. 研究目的

細胞表層の糖鎖のうちには、セレクチンやシグレックなどの糖鎖認識分子の特異的なリガンドとして、これらの分子を担うがん間質の細胞との相互作用に関与する機能をもつものがある。癌の進展は多段階的に進行し、これに伴って細胞表層の糖鎖も段階的に変化する。これによって機能性糖鎖の発現も変動し、そのためにがん-間質相互作用が変化して癌の進展にいつそう有利な条件が形成される。本研究では、この分子機構を明らかにして臨床応用可能な新しい診断・治療法の開発につなげることを研究目的とした。糖鎖が癌化にともなって変化することはよく知られ、癌に選択的に出現する癌関連性糖鎖については良く研究されてきた。しかし、正常細胞に存在し、癌化に伴って消退・消失する正常糖鎖の機能と、癌におけるその機能欠失の病態的意義はこれまでほとんど解析されてこなかった。本研究では、これまで見逃されていたこれら正常糖鎖のがん-間質相互

作用における役割についても検索する。

B. 研究方法

糖鎖に対して作成した特異的な単クローン抗体を用いて、患者材料及び培養細胞の発現する糖鎖を分析した。また、糖鎖認識分子の遺伝子を導入した細胞やリコンビナント蛋白を用いて、細胞接着実験などからこれらの糖鎖の機能を解析した。中和抗体としての効力を持つ単クローン抗体を使った接着阻止実験などを適宜行って、関与する糖鎖を同定した。また、これらの糖鎖の合成発現に関与する糖鎖遺伝子の転写とその転写/転写後調節機構を解析し、癌化の進展に伴う糖鎖変化のメカニズムを解析した。

(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) 早期がんにおける正常糖鎖の消退・喪失とそのがん-間質相互作用における意義の検索

正常大腸上皮細胞に発現し、癌化とともに発現が消退する硫酸化糖鎖を見だし、癌化に伴うその消退が、合成に関与する硫酸輸送体遺伝子のエピジェネティック・サイレンシングによること、とくにヒストン H3K27 のトリメチル化が重要であること、この硫酸輸送体遺伝子には細胞増殖抑制作用があり、癌抑制遺伝子としての意味を持つことを明らかにした(*Cancer Res* 2010)。さらに、この硫酸化糖鎖が免疫細胞の持つ免疫抑制性分子シグレック 7 の特異的糖鎖リガンドであり、大腸粘膜にはシグレック 7 陽性の組織マクロファージが多数存在し、糖鎖リガンドを持つ上皮細胞と相互作用していること、マクロファージ様細胞の LPS 刺激による COX2 産生をシグレック 7 が抑制することも明らかにした(*J Immunol* 2012)。さらに最近、正常 B 細胞に発現し、悪性リンパ腫などの B 細胞性悪性疾患では発現が消退する別種の硫酸化糖鎖を見だし、これがシグレック 2 の特異的リガンドであり、悪性化に伴うその消退が合成遺伝子のエピジェネティック・サイレンシングによることも明らかにした(投稿準備中)。

2) 進行がんにおける異常糖鎖の出現のメカニズムとそのがん-間質相互作用における役割の検索

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培養すると上皮-間葉転換(EMT)が起こり、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などのセレクトインの糖鎖リガンドの発現が強く誘導され、セレクトインを発現する血管内皮細胞に対して癌細胞が強い細胞接着を起こすことを見いだした。さらに、この糖鎖変化の背景に転写因子

c-Myc および CDX2 による一連の糖鎖発現遺伝子の転写に対する調節作用があることを明らかにした(*PNAS* 2012)。これにともなう糖鎖の発現変化を解析して、従来から癌関連糖鎖とされてきたものの中には、癌幹細胞で発現がさらに増強するものに加え、癌幹細胞でかえって発現が低下するものもあることを認めた。また、癌幹細胞の microRNA について検索を行い、miR-9 が増加し、miR-24 が減少するなどいくつかの microRNA の発現が特徴的に変化することを見いだした。このなかには、多能性が維持されている ES 細胞に特異的に発現する SSEA-3/4 糖鎖の合成に関与するものと一部に共通性が観察された(投稿準備中)。

D. 考察

本研究の成果から、細胞の癌化に伴う糖鎖変化においては、早期癌ではエピジェネティック・サイレンシングが大きな役割を演じることが明らかになった。この機序によって間質の免疫細胞の活性化を抑制している糖鎖が失われ、COX2 などの炎症メディエーターによる慢性の炎症刺激をまねいて発癌が促進されると考えられる。このことは、エピジェネティック・サイレンシングをターゲットとした治療法が、癌の化学予防に役立つ可能性を示唆し、また糖鎖変化をモニターすることが、その治療効果判定に役立つ可能性を示唆する。

進行癌では癌幹細胞に代表されるようなより悪性度の高い細胞が出現し、血管内皮細胞の持つ細胞接着分子セレクトインの特異的リガンドの発現が亢進するため、がん細胞と間質の血管内皮細胞との相互作用が促進され、腫瘍血管形成や血行性転移が誘導される。これらの糖鎖の発現誘導の転写調節/転写後調節の様態は、ES細胞に類似することが明らかになった。これまでに知られた癌関連性糖

鎖の一部は腫瘍マーカーとして臨床応用されているが、その中には、より癌幹細胞に特異性の高いものと、そうでないものが混在していることが判明した。

E. 結論

癌の多段階的進展にともなって、癌細胞表層の糖鎖も段階的に変化し、それががん-間質相互作用に大きな変動をもたらす。早期癌では、細胞の悪性化にともなって糖鎖合成に関連する遺伝子のエピジェネティック・サイレンシングが起こり、それによって正常細胞の有していた機能性糖鎖が失われ、その機能欠損によって、細胞の悪性化がさらに進行する。また、進行期の癌では、多能性が維持されているES細胞と一部共通の転写調節/転写後調節機構によって糖鎖異常がもたらされ、これが悪性度の増大に参与する。

F. 健康危険情報

特記すべきものなし。

G. 研究発表

1. 神奈木玲児: 糖鎖と腫瘍マーカー (Carbohydrate tumor markers). 第69回日本癌学会学術総会, 大阪, 9月22-24日, 2010.
2. Kannagi R: Sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs. The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation, Shonan Village Center, Kanagawa, Japan, July 27-30, 2010.
3. 遊佐亜希子、井澤峯子、近藤 豊、関戸好孝, 神奈木玲児: Role of histone H3 trimethylation in induction of sialyl Lewis x expression in colon cancer (大腸癌のシアリル Lewis X発現誘導におけるヒストンH3トリメチル化の役割). 第69回日本癌学会総会, 大阪, 9月22日-24日, 2010.

4. 佐久間圭一朗、神奈木玲児: Growth factor-induced EMT enhances expression of E-selectin ligand glycans on colorectal cancer cells (増殖因子によるEMTは大腸癌細胞に E-セレクトインリガンド糖鎖の発現を誘導する). 第69回日本癌学会総会, 大阪, 9月22日-24日, 2010.
5. 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.
6. 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-セレクトインリガンド糖鎖の発現を誘導する)., 第70回日本癌学会総会, 名古屋, 10月3日-5日, 2011.
7. Kannagi R: Biology of sugar modification. The 3rd Workshop of the Netherlands-Japan on Recent Advances in Glycobiology, Chaired by K. Furukawa, Nagoya, Japan, October 8-11, 2011.
8. 佐久間圭一朗、神奈木玲児, 青木正博: c-MycとCDX2はEMTを起こした大腸がん細胞におけるE-セレクトインリガンド糖鎖の発現を媒介する. 第71回日本癌学会総会, 札幌, 9月19日-21日, 2012.
9. 神奈木玲児: T-およびB-リンパ球のホーミング糖鎖の活性調節機構と病態的意義. 「糖鎖免疫 Glycoimmunology 2014」平成25年度東京医科歯科大学難治疾患共同研究拠点研究集会, 東京, 2月17-18日, 2014.
10. 佐久間圭一朗、神奈木玲児, 青木正博: Sialyl Lewis glycan expression is linked with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. 第65回日本細胞生物学会大会, 名古屋, 6月19日-21日, 2013.

H. 論文発表

(発表誌名・巻号・ページ・発行年)

1. Yusa, A., Miyazaki, K., Kimura, N., Izawa, M., and Kannagi, R. Epigenetic silencing of the sulfate transporter gene *DTDST* induces sialyl Lewis^x expression and accelerates proliferation of colon cancer cells. *Cancer Res.*, 70: 4064-4073, 2010.
2. Kannagi, R., Sakuma, K., Miyazaki, K., Lim, K-T., Yusa, A., Yin, J., and Izawa, M. Altered expression of glycan genes in cancers induced by epigenetic silencing and tumor hypoxia: Clues in the ongoing search for new tumor markers. *Cancer Sci.*, 101: 586-593, 2010.
3. Igarashi, Y. and Kannagi, R. Glycosphingolipids as mediators of phenotypic changes associated with development and cancer progression. *J. Biochem.*, 147: 3-8, 2010.
4. Inoue, T., Taguchi, I., Abe, S., Li, G., Hu, R., Nakajima, T., Hara, A., Aoyama, T., Kannagi, R., Kyogashima, M., and Node, K. Sulfatides are associated with neointimal thickening after vascular injury. *Atherosclerosis*, 211: 291-296, 2010.
5. Ueda, M., Shimada, T., Goto, Y., Tei, K., Nakai, S., Hisa, Y., and Kannagi, R. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx*, 37: 488-495, 2010.
6. Yin, J., Miyazaki, K., Shaner, R.L., Merrill, A.H., Jr., and Kannagi, R. Altered sphingolipid metabolism induced by tumor hypoxia - new vistas of glycolipid tumor markers. *FEBS Lett.*, 584: 1872-1878, 2010.
7. Fujii, M., Yusa, A., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Tsunoda, N., Oda, K., Nagino, M., Ishimaru, T., Shimoyama, Y., Utsunomiya, H., Iwata, H., Itoh, Y., Itoh, J., Kannagi, R., and Kyogashima, M. Cytoplasmic expression of the JM403 antigen GlcA-GlcNH₃⁺ on heparan sulfate glycosaminoglycan in mammary carcinomas-a novel proliferative biomarker for breast cancers with high malignancy. *Glycoconj. J.*, 27: 661-72, 2010.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Sakuma, K., Chen, G. Y., Aoki, M., and Kannagi, R.: Induction of 6-sulfated glycans with cell adhesion activity via T-bet and GATA-3 in human helper T cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1820: 841-848, 2012.
16. Sakuma, K., Furuhashi, T., Kondo, S., Yabe, U., Ohmori, K., Ito, H., Aoki, M., Morita, A., and Kannagi, R.: Sialic acid cyclization of human Th homing receptor glycan associated with recurrent exacerbations of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.*, 68: 187-193, 2012.
17. Tanaka, K., Tamiya-Koizumi, K., Hagiwara, K., Ito, H., Takagi, A., Kojima, T., Suzuki, M., Iwaki, S., Fujii, S., Nakamura, M., Banno, Y., Kannagi, R., Tsurumi, T., Kyogashima, M., and Murate, T.: Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J. Biochem.*, 151: 611-620, 2012.
18. Patnode, M. L., Yu, S. Y., Cheng, C. W., Ho, M. Y., Tegesjo, L., Sakuma, K., Uchimura, K., Khoo, K. H., Kannagi, R., and Rosen, S. D.: KSGal6ST generates galactose-6-O-sulfate in high endothelial venules but does not contribute to L-selectin-dependent lymphocyte homing. *Glycobiology*, 23: 381-394, 2013.
19. Kannagi, R., Sakuma, K., and Ohmori, K. Cell-surface glycoconjugates controlling human T-lymphocyte homing: Implications for bronchial asthma and atopic dermatitis. In M. Shibasaki, M. Iino, and H. Osada (eds.), *Chembiomolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology*, Tokyo: Springer Japan, pp. 167-176. 2013.
20. Tanaka, K., Tamiya-Koizumi, K., Yamada, M., Murate, T., Kannagi, R., and Kyogashima, M.: Individual profiles of free ceramide species and the constituent ceramide species of sphingomyelin and neutral glycosphingolipid and their alteration according to the sequential changes of environmental oxygen content in human colorectal cancer Caco-2 cells. *Glycoconj. J.*, 31: 209-219, 2014.
21. Kannagi, R. Fucosyltransferase 5. GDP-Fucose Lactosamine α 3/4-Fucosyltransferase (*FUT5*). In N. Taniguchi, *et al.*, (eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, pp. 549-558. Tokyo: Springer Japan, 2014.
22. Kannagi, R. Fucosyltransferase 5. GDP-Fucose Lactosamine α 3-Fucosyltransferase (*FUT6*). In N. Taniguchi, *et al.*, (eds.), *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes*, pp. 559-571. Tokyo: Springer Japan, 2014.

I. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

特にありません

2. 実用新案登録

特にありません

3. その他

特にありません

II. 研究成果に関する一覧

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
<u>Mochizuki S. and Okada Y.</u>	ADAM28.	Rawlings N.D. and Salvesen G.S.	Handbook of Proteolytic Enzymes.	Elsevier Ltd	Oxford, UK.	2013	1136-1139
<u>Kannagi, R.</u>	Fucosyltransferase 5. GDP-Fucose Lactosamine α 3/4-Fucosyltransferase (FUT5)	Taniguchi, N.	Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes	Springer	Tokyo	in press (2014)	549-558
<u>Kannagi, R.</u>	Fucosyltransferase 6. GDP-Fucose Lactosamine α 3-Fucosyltransferase (FUT6)	Taniguchi, N.	Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes	Springer	Tokyo	in press (2014)	559-571
<u>Kannagi, R., Sakuma, K., and Ohmori, K.</u>	Cell-surface glycoconjugates controlling human T-lymphocyte homing: Implications for bronchial asthma and atopic dermatitis.	Shibasaki, M., Iino, M., and Osada, H.:	Chembiomolecular Science: At the Frontier of Chemistry and Biology	Springer	Tokyo	2013	167-176