

論文の内容の要旨

論文題目 マウス癌転移モデルにおける細胞交通ナビゲーション分子
 としてのマクロファージレクチン

氏名 一井真二

【序】

癌の転移は連続した複数の過程から成り立っており、各過程には癌細胞と宿主組織の相互作用の機会が他数存在すると考えられる。癌の転移過程に関与しうる宿主側分子を同定し、その機能および発現分布を調べることは、癌転移機構を理解し、転移抑制に向けた研究を進展させるのに重要であると考えられる。

我々はマクロファージ細胞表面の内在性レクチン (mMGL) の癌転移への関与に注目してきた。mMGL (mouse macrophage galactose/*N*-acetylgalactosamine-specific C-type lectin) は、元々 *in vitro* での抗腫瘍活性を有する腹腔滲出マクロファージ上に発見された 42-kDa の II 型膜貫通型糖蛋白質であり、細胞外領域に糖認識ドメインを 1 つ有する。組み換え mMGL を用いて *in vitro* で認識糖鎖構造を検討した結果、腫瘍特異的に発現する糖鎖構造と重複した為、腫瘍認識分子として機能しうる可能性が示唆されていた。また免疫組織化学的検討では、mMGL の発現は種々のマウス組織および臓器の結合組織細胞上に限局する一方で、マウス実験転移モデルにおいて OV2944-HM-1 卵巣癌細胞 (HM-1) の肺転移結節に豊富に認められたことから、mMGL は既知のマクロファージ細胞表面マーカーとは生体内分布が異なるユニークな分子であり、*in vivo* においても腫瘍認識分子として機能しうる可能性が示唆されていた。

腫瘍浸潤細胞に選択的に mMGL が発現している理由は不明であるが、mMGL 発現細胞は mMGL 分子を介して転移腫瘍組織に移動あるいは集積し、転移腫瘍に対して生体防衛的に、あるいは転移促進的に作用している可能性が考えられる。また、mMGL は各種臓器で発現がみられることから、これら臓器へ転移してくる癌細胞を mMGL 発現細胞が転移経路上で捕捉し、生体防衛的にあるいは転移促進的に作用している可能性も考えられる。

本研究では結合組織性の mMGL 発現細胞を機能的に同一の細胞亜群として捉え、mMGL の腫瘍認識分子としての機能を明らかにし、癌転移に対する生体防御機構への mMGL 発現細胞の関与を解明することを目標にした。

第 1 章では mMGL 発現細胞の積極的な癌組織への移動・集積を解析する目的で、mMGL 強制発現細胞を作製してこれの HM-1 細胞由来肺転移結節への細胞交通を解析した。第 2 章では臓器組織中 mMGL 発現細胞の転移癌細胞への作用を解析する目的で、HM-1 細胞由来の転移リンパ節での mMGL 発現細胞の分布およびリンパ節転移初期過程に及ぼす作用について検討した。

【第 1 章 マウスに養子移入されたマクロファージレクチン発現 T 細胞株の腫瘍選択的集積性】

mMGL の安定発現細胞 (CTL-ML) は、mMGL cDNA を発現ベクター pCEP4 に挿入し、マウス T 細胞株 CTLL-2 細胞にトランスフェクトすることにより得た。

発現された mMGL の糖結合能は 2 通りの方法で確認した。1 つめの方法ではカルシウム存在下でガラクトース結合セファロース 4B カラムに吸着した細胞溶解液中の mMGL をイムノブロットで検出することにより行った。CTL-ML の mMGL (43 kDa) は天然型 mMGL (約 42 kDa) よりも若干大きかったが、これは糖鎖の違いよることが N グリカナーゼ消化実験から示された。また、カラム非吸着蛋白画分には mMGL は検出されなかったことから、CTL-ML に発現する mMGL の殆ど全ては天然型 mMGL と同じ糖結合能を有することが判明した。2 つめの方法では細胞表面の mMGL の機能を確認する為にラクトース結合小球体とのロゼットアッセイを行い、CTL-ML 細胞の糖結合能はモックトランスフェクタント (CTL-CEP) よりも有意に高く、その糖認識特異性は mMGL と一致することを確認した。更に *in vitro* 増殖速度および生存率に関して、CTL-ML と CTL-CEP とで違いは認められず、DiI 蛍光標識の影響も無いことを確認した。

以上より CTL-ML に発現させた mMGL の糖認識能が確認できたので、次に、HM-1 の肺転移巣を有するマウスに DiI で蛍光標識した CTL-ML あるいは CTL-CEP を尾静脈内投与し、1~3 日後の肺転移結節への細胞交通を検討した。DiI 標識細胞は赤の蛍光色として

転移巣および肺実質中に検出され、これを計測して細胞密度を算出した。マウス個体毎に転移結節内および肺実質内細胞密度を集計した結果、投与 3 日後の転移結節内細胞密度は CTL-CEP に比べて CTL-ML で有意に高かった。

この結果は CTL-ML が HM-1 の転移結節に選択的に分布あるいは滞留したことを意味するが、その要因として CTL-ML 上の mMGL が HM-1 細胞表面糖鎖と結合した可能性が考えられた。HM-1 細胞表面糖鎖を解析した結果、ピーナッツレクチン（ガラクトース特異的）および VVA-B₄（*N*-アセチルガラクトサミン特異的）の結合が認められた。

以上より、CTLL-2 細胞に強制発現させた mMGL 分子は、HM-1 転移結節への選択的細胞交通あるいは腫瘍内での滞留に寄与し、これらは mMGL の HM-1 細胞表面糖鎖の認識を介した作用であると推測された。

【第 2 章 マウス腫瘍のリンパ節転移初期過程におけるマクロファージレクチンの腫瘍認識の意義】

まず、正常マウスリンパ節で mMGL 発現部位を検討し、上腕および腋窩リンパ節において mMGL は辺縁洞、小柱周囲洞および髄質に存在することを確認した。次に転移リンパ節での mMGL 発現を調べた。マウス卵巣癌 HM-1 細胞 (2×10^4 個) の前足足蹠皮下 (fp) 移植後 15 日目の所属リンパ節 (上腕および腋窩リンパ節) では辺縁洞における腫瘍増殖がみられ、移植量が多い場合には皮質への浸潤もみられたが、mMGL 発現細胞は辺縁洞と腫瘍転移部位に認められた。

更に、蛍光色素 CMTMR で標識した HM-1 細胞を fp 移植してリンパ節への侵入過程を追跡した。3 日後の上腕リンパ節では HM-1 細胞は主に辺縁洞に沿って存在し一部は小柱周囲洞に観察されたが、リンパ節内の HM-1 細胞は少なく、移植 2 日後では 3 日後に比べて辺縁洞内 HM-1 細胞は更に少なかった。

以上より、mMGL 発現細胞はリンパ節転移の際に腫瘍細胞が最初に接触する部位 (辺縁洞) に存在したことから、mMGL 発現細胞あるいは mMGL 分子そのものはリンパ節転移に対して防御的な機能を担っている可能性、あるいは逆に細胞間接着による捕獲により転移を促進している可能性が考えられた。この点を解明する為、HM-1 のリンパ節転移モデルにおいて抗 mMGL 中和抗体投与の影響を観察することにした。

中和抗体の効果を上げる為には転移腫瘍細胞数を最小限に留めることが重要と考え、HM-1 移植量の検討を行った。本結果と組織学的所見から、リンパ節転移の評価に必要な最小移植量は 2×10^4 個であると考えた。次に抗体投与実験を試みたが、コントロール抗体 (正常ラット IgG) の投与のみで免疫応答によると思われるリンパ節重量の増加が認めら

れ、リンパ節重量を指標とする通常法では抗 mMGL 抗体投与の効果を適切に評価できないと考えた。そこで、摘出リンパ節の細胞懸濁液を *in vitro* 培養した後に腫瘍細胞数を計測する *ex vivo* 法を開発した。*ex vivo* 法の妥当性は転移リンパ節から回収した HM-1 生細胞数が移植量、リンパ節重量（通常法での転移の指標）および移植部位（fp）での腫瘍増殖と相関することで確認した。

HM-1 (2×10^4 個) を fp 移植したマウスに対し、mMGL の糖リガンドへの結合阻害活性を有する抗 mMGL 抗体 LOM-8.7 を繰り返し投与し、移植後 15 日目に *ex vivo* 法で上腕リンパ節中の HM-1 生細胞数を計測した。LOM-8.7 投与マウスで HM-1 回収数が有意に増加したことから、mMGL 発現細胞はリンパ節転移に対する宿主の防御機構の一端を担っていることが示唆された。

本検討より、HM-1 マウス卵巣癌の転移リンパ節において mMGL 発現マクロファージは癌細胞の転移（侵入）経路に沿って存在し、リンパ節転移の初期段階に対して生体防衛的に働くことが示唆された。

【総括】

本研究により、mMGL は癌細胞表面糖鎖構造の認識を介して mMGL 発現細胞の癌組織への集積に寄与していることが示唆された。また、リンパ節転移初期段階においてリンパ節内の mMGL 発現細胞は生体防衛的に機能していることが示された。

癌転移が成立する為の必要条件として、原発巣から転移先臓器への癌細胞の細胞交通が完遂することが挙げられる。本研究結果は、mMGL が癌転移過程における癌細胞およびこれを認識する宿主側細胞の細胞交通ナビゲーターとして機能していることを示唆していると考えられる。即ち、mMGL 発現細胞を癌転移巣へと誘導あるいは集積させることや、逆に転移癌細胞を mMGL 発現組織へと誘導あるいは捕捉することにより、mMGL が癌転移過程を細胞交通の面から制御している可能性が示唆された。

以上より、mMGL が腫瘍認識分子として癌転移へ積極的に関与していることが示唆されたが、腫瘍認識によって mMGL 発現細胞に引き起こされる反応の有無および転移腫瘍に対する作用については今後の検討が必要である。また、mMGL 分子は養子免疫療法におけるエフェクター細胞の腫瘍部位集積の為のデバイスとして有用と考えられ、今後の展開が期待される。