

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 一井真二

「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」と題する本論文は、マクロファージに発現する C 型レクチンの一つで単糖としてはガラクトースと N-アセチルガラクトサミンに特異性を有するもの (MGL) が、マクロファージの局在性を決定することによって癌の転移性に影響することを、分子レベルで明らかにした研究成果をまとめたものである。

癌の転移過程に関与する宿主細胞とそこにおいて機能する分子を明らかにすることは、癌が転移する機構を理解し、転移抑制に向けた研究を進展させるために重要である。マウス OV2944-HM-1 卵巣癌細胞 (HM-1 細胞) は、尾静注により肺転移を、前肢皮下に注入することによりリンパ節転移を形成する。これらの転移形成において、マクロファージとその類縁細胞が重要な役割を果たすことを示す予備的な知見は既に多く得られていた。本研究では、MGL を発現する細胞が肺転移結節に豊富に認められたことから、MGL 自身が、細胞を腫瘍内に導くナビゲーション分子として機能するという可能性を追求している。全体は大きく分けて二つの部分から成り、第 1 章では MGL がこれを発現する細胞の癌組織への積極的な移動と集積を起こさせるかを査定する目的で、MGL 強制発現細胞を作製してこの細胞の交通パターンを解析している。第 2 章では MGL 発現細胞のリンパ節転移への影響を解析する目的で、HM-1 細胞がリンパ節転移を形成する過程で、MGL 発現細胞が如何なる分布を示すか、又 MGL に対してレクチン機能を阻害する抗体がリンパ節転移形成にどのように影響するかについて検討している。

第 1 章では、T リンパ腫 CTLL-2 細胞から MGL の安定発現細胞 (CTL-ML 細胞) を得て、MGL が細胞表面に存在して糖結合能を持つことを確かめた。この *in vitro* での解析には、糖鎖で修飾した表面への細胞の接着性と、ラクトースを表面に持つマイクロスフェアとのロゼットアッセイを用いている。次に *in vivo* において、HM-1 細胞由来の肺転移巣を有するマウスに Dil で蛍光標識した CTL-ML 細胞あるいはコントロールの CTL-CEP 細胞を尾静脈内投与し、1~3 日後の肺転移結節への細胞集積を定量した。Dil 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 日後の転移結節内における細胞密度は CTL-CEP 細胞に比べて CTL-ML 細胞で有意に高かった。この結果は CTL-ML 細胞が 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。以上より学位申請者は、CTLL-2 細胞に強制発現させた MGL 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 MGL の HM-1 細胞表面糖鎖の認識を介した作用であると推測した。

第 2 章では、同じ HM-1 細胞を用いて、リンパ節転移形成の初期過程における MGL 発現細胞の意義を検討した。HM-1 細胞を前足蹠皮下に移植した後 15 日目の所属リンパ節を観察し、転移巣が形成しつつ

あるリンパ節でのMGL発現を調べた。辺縁洞における腫瘍増殖がみられた一方、MGL発現細胞は辺縁洞と腫瘍転移部位に認められた。蛍光色素CMTMRで標識したHM-1細胞を前足蹠皮下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。すなわち、少なくとも腫瘍細胞投与後3日頃にはMGL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。MGL発現細胞あるいはMGL分子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。いずれであるかを解明する為、HM-1細胞のリンパ節転移モデルにおいて、抗MGL中和抗体投与の影響を観察した。中和抗体の効果を上げる為に転移腫瘍細胞数を最小限に留め、HM-1移植量の検討を行った。リンパ節転移の評価に必要な最小移植量が 2×10^4 個であることを示し、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MGL抗体投与の効果を適切に評価できないことを明らかにした。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）を移植したマウスに対し、MGLの糖リガンドへの結合阻害活性を有する抗体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、MGL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MGL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。

本研究により、糖鎖認識分子であるMGLが癌細胞表面糖鎖を介してMGL発現細胞の癌組織への集積に寄与することが明らかにされた。また、リンパ節転移初期段階においてリンパ節内のMGL発現細胞は生体防衛的に機能している事が明かとなった。癌転移が成立する為の必要条件として、転移先臓器における癌細胞増殖環境の成立が挙げられるが、MGLが癌転移の成立過程において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強く示唆した。即ち、MGL発現細胞を癌転移巣へと誘導あるいは集積させることにより、MGLが癌転移過程を制御していることが示された。学位申請者の研究により、MGL発現細胞が癌転移の制御に積極的に関与していることが示唆され、MGL分子自身が中心的な役割を担うことも判明した。また、MGL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であることが明かとなった。これらの知見は、免疫学、腫瘍学、癌の薬物治療法の開発に大きく寄与するものであり、本研究を行った一井真二は、博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。