

論文の内容の要旨

論文題目 Carbohydrate recognition by the hepatic asialoglycoprotein receptor manifests tumor microenvironment promoting metastasis

(転移を促進する腫瘍微小環境としての肝アジアロ糖蛋白質受容体による糖鎖認識)

氏名 上野 傑

【背景】

がんは日本における死因第一位の疾患であり、2009年の癌による死亡数は344,000人で、総死亡数の30%を占める。科学の進歩と共に、がんの診断・治療は着実に向上しているが、依然として転移が大きな障壁として存在している。実際、がんは早期に発見され、外科的に切除可能であれば良好な生存率を示すが、発見が遅れ遠隔転移が生じている場合には予後が悪いことが知られている。従って、がんの治療改善のためには転移の分子機構を解明し、その抑制法を確立することが必要である。

転移は原発組織での局所増殖、遠隔臓器へと転移する過程では脈管内への侵襲や、転移臓器での内皮細胞との接着、脈管外への浸潤、さらには転移臓器での血管新生を伴う増殖など複雑なプロセスによって構成され、これらのプロセスの成立にはがん細胞と微小環境との相互作用が重要である。

糖鎖認識分子（レクチン）は病態を制御するシステムに重要な機能を発揮している事が広く知られている。これまで植物レクチンががん細胞表面の糖鎖に結合する事で細胞機能に影響を及ぼす事が報告されており、レクチンとがん細胞表面の糖鎖の相互作用ががん病態において重要である事が示唆されるが、内在性レクチンが腫瘍微小環境においてどのような役割を担っているか、またその分子機構は明らかでなかった。

アジアロ糖蛋白質受容体（Asialoglycoprotein receptor: ASGR）は肝実質細胞に特異的に発現するレクチンであり、ASGR1とASGR2のヘテロオリゴマーにより形成されている。これまでガラクトース及びN-アセチルガラクトサミンを末端に持つ糖蛋白質のエンドサイトーシスレセプターとしての機能が報告されてきたが、微小環境因子としてがんの病態に関与するか否かは不明であった。

【研究の目標】

本研究は、がん転移の機構を解明し、がん治療を改善することを長期的目標とした。つまり、腫瘍微小環境における内在性レクチンとがん細胞表面の糖鎖との相互作用の役割を明らかにし、新たながん転移治療法の確立を目指した。

具体的には、肝実質細胞に発現するASGRと、がん細胞上の糖鎖との相互作用が転移性に影響を与えるのか、またその分子機構を明らかにすることを短期的目標にした。

【方法・結果】

第一章： ASGR は 3LL 細胞の肺転移を促進する

腫瘍微小環境における内在性レクチンとがん細胞表面の糖鎖の相互作用の役割を明らかにするため、がんの転移に ASGR が関与するか否かを検証した。

Asgr1 遺伝子欠損型マウス (Asgr1^{-/-}) 及び同腹野生型マウスの肝臓に、マウス肺癌細胞株 3LL 細胞を移植して、肝臓から肺への自然転移モデルを作成した。Asgr1^{-/-} では ASGR2 の発現も抑制されているため、Asgr1^{-/-} は肝実質細胞に機能的な ASGR を発現しないことが報告されている。ホタルルシフェラーゼ発現 3LL-Luc2 細胞を、Asgr1^{-/-} または同腹野生型マウスの肝臓の外側左葉に移植した。14 日後に肺懸濁液のルシフェラーゼ活性を測定することで肝からの肺転移を評価した。肝移植部位における原発巣の大きさに差は認められなかったが、野生型マウスに比べ Asgr1^{-/-} では 3LL 細胞の肝臓からの肺への転移性が低いことが明らかになった (図 A)。

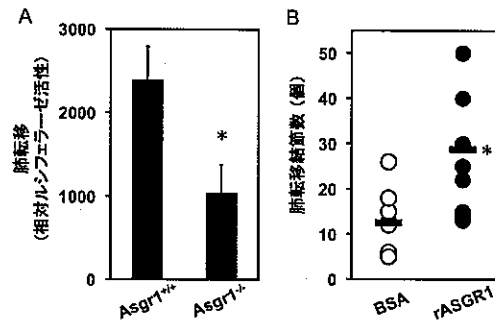


図: ASGR は 3LL 細胞の肺転移を促進する

(A) 肝原発巣からの 3LL 細胞自然肺転移モデルにおける Asgr1 遺伝子欠損型マウスでの転移の低下 (n = 4-5 マウス/グループ) (*p < 0.05)

(B) 実験的肺転移モデルにおける rASGR1 前処理による 3LL 細胞の転移の促進 (n = 6-7 マウス/グループ) (*p < 0.05)

ASGR は 3LL 細胞に直接結合することが、組換え型 ASGR1 (recombinant ASGR1: rASGR1) を用いたフローサイトメトリーにより確認されている。そこで ASGR の細胞表面への直接的な結合が、3LL 細胞の肺転移に影響を与えるか否かを検証するため、rASGR1 を添加した培地で 3LL 細胞を培養し、尾静注モデルを用いて肺転移性を評価した。その結果、対照群に比べ、rASGR1 共存下で 48 時間培養した 3LL 細胞ではその転移性が上昇した (図 B)。これらの結果から ASGR は腫瘍微小環境において 3LL 細胞に直接作用することで、その後の肺転移を促進する事が示された。

第二章： ASGR は 3LL 細胞の MMP-9 発現を誘導し、浸潤を促進する

ASGR と 3LL 細胞の相互作用による肺転移促進の機構を解明するため、ASGR による 3LL 細胞の機能変化を *in vitro* にて解析した。rASGR1 は 3LL 細胞の *in vitro* における形態、フィブロネクチンに対する接着能、増殖能、遊走能に影響を及ぼさなかったが、トランスウェルチャンバーを用いた細胞浸潤アッセイにて 3LL 細胞の浸潤能を有意に促進した。

がん細胞の浸潤過程では、がん細胞から産生されるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP-2/9) などを介した細胞外マトリックスの分解が重要である事が知られている。そこで次に rASGR1 により 3LL 細胞の MMP 発現が誘導されるかに関して検討した。rASGR1 を添加して培養した 3LL 細胞の培養上清を回収し、上清中の MMP 量をゼラチンゼイモグラフィにて定量した。対照群に比べ、rASGR1 添加群で MMP-9 量が有意に高かった。更に rASGR1 添加により、3LL 細胞の MMP-9 mRNA 発現誘導が見られた。一方で、MMP-2 量には変化は見られなかった。

以上の結果から、rASGR1 により 3LL 細胞の浸潤が促進し、肺転移が増加した原因の一つとして、MMP-9 の発現が誘導されたためである事が示唆された。

ASGR 添加による MMP-9 発現誘導が、ASGR とがん細胞表面の糖鎖との相互作用の結果である事を証明するため、抗 ASGR1 を用いた阻害実験を行った。本研究室で樹立された抗 ASGR1 は、rASGR1 の糖鎖結合を阻害する。3LL 細胞を抗 ASGR1 またはコントロール IgG の共存下で、rASGR1 を添加して 48 時間培養し、上清に含まれる MMP-9 をゼラチンザイモグラフィにより定量した。また rASGR1 共存下で 24 時間培養した後の 3LL 細胞における MMP-9 発現を蛍光染色により検討した。rASGR1 添加によって培養上清に含まれる MMP-9 量が高く、また細胞内発現の誘導が認められ、これらは抗 ASGR1 の共存下でそれぞれ阻害された。これらの結果から ASGR は 3LL 細胞上の糖鎖との結合を介して MMP-9 発現を誘導している事が示された。

さらに内在性の ASGR と 3LL 細胞上の糖鎖との相互作用について、ASGR を生体内で発現する肝実質細胞と 3LL 細胞の共培養系を確立して *in vitro* における検討を行った。Asgr1^{-/-} または野生型マウスより肝実質細胞を回収し、単層培養した。24 時間後、肝実質細胞を ASGR のレクチン活性が失われない条件下でグルタルアルデヒド固定し、さらに阻害条件においては固定後の肝実質細胞に抗 ASGR1 またはコントロール IgG を加えた。これらの条件下において 3LL 細胞を肝実質細胞上に播種し、48 時間後の培養上清に含まれる MMP-9 をゼラチンザイモグラフィにより定量した。Asgr1^{-/-} 由来の肝実質細胞と 3LL 細胞の共培養系の培養上清に含まれる MMP-9 量は、野生型のそれに比べ著しく低下した。また野生型マウス肝実質細胞上で培養した 3LL 細胞で見られた MMP-9 量は、抗 ASGR1 を添加した条件下で低下した。以上の結果より、ASGR は 3LL 細胞表面の糖鎖との結合を介して、MMP-9 発現を誘導していることが示された。

また他のがん細胞株に関しても、ASGR による細胞機能の変化を評価した。ヒト大腸癌細胞株 HT-29、マウス大腸癌細胞株 colon 38、マウス悪性黒色腫細胞株 B16-F10 において、rASGR1 による MMP-9 発現誘導が検出された。以上の結果より、幾つかのがん細胞株に関しても ASGR による細胞機能の変化が起こる事が示された。

第三章： ASGR は EGFR-ERK 経路を介して 3LL 細胞の MMP-9 発現を誘導する

次に ASGR と糖鎖との相互作用によって、3LL 細胞にどのような経路を介した活性化シグナルが伝達されるのかについて、rASGR1 を添加して培養した事による MMP-9 発現の誘導を指標として、96 種類の特異的阻害剤を用いたスクリーニング系により探索した。その結果、AG1478 (EGF 受容体-リン酸化阻害剤) 及び PD98059 (ERK-リン酸化阻害剤) の前処理により、rASGR1 添加後の 3LL 細胞における MMP-9 発現誘導の抑制が見られた。

そこで rASGR1 を添加して培養した 3LL 細胞におけるシグナル経路の活性化を評価した。3LL 細胞を無血清条件下で 24 時間培養した後に rASGR1 を添加すると、EGFR、ERK、JNK のリン酸化が起こり、ERK のリン酸化は EGFR の特異的阻害剤である AG1478 の前処理により阻害された。また rASGR1 を添加して 4 時間後の MMP-9 mRNA 発現誘導は、PD98059 または AG1478 により阻害された。

以上の結果は、ASGR はがん細胞上の糖鎖と相互作用することで、EGFR-ERK 経路を介したシグナル伝達により 3LL 細胞の MMP-9 発現を誘導していることを強く示唆している。また rASGR1 添加後の ERK のリン酸化が EGFR の特異的阻害剤で抑制されたことを考慮すると、ASGR による活性化シグナルは EGFR を上流とする ERK 活性化を介した経路であると推察される。

【考察】

がんの転移を構成する複雑なプロセスには、がん細胞と微小環境との相互作用が重要である。レクチンは病態を制御するシステムに重要な機能を発揮している事が広く知られているが、内在性レクチンが腫瘍微小環境においてどのような役割を担っているか、未だ不明な点が多い。そこで、本研究では腫瘍微小環境における内在性レクチンとがん細胞表面の糖鎖との相互作用の役割を明らかにすることを目的とした。

第一章では、肝実質細胞に発現するアジア糖蛋白質受容体(ASGR)が、3LL 細胞に直接作用し、肺転移を促進することを示した。これまで腫瘍微小環境としての内在性レクチンの機能は報告されておらず、非常に重要な発見である。

第二章では、ASGR ががん細胞の機能に与える影響を評価し、浸潤能を促進することを示した。この原因の一つとして考えられる MMP-9 の発現が、ASGR により誘導される事が示され、HT-29 細胞や colon 38 細胞でも ASGR 依存的な MMP の発現誘導が観察された。以上の結果から、3LL 細胞の肝臓を介した肺転移過程において、ASGR ががん細胞の浸潤能を調節することで、肺転移を促進した事が示唆された。

第三章では、ASGR により活性化される 3LL 細胞のシグナル経路の同定を行い、EGFR を介した ERK 経路の活性化が、MMP-9 の発現誘導に関与していることが示された。これまで EGFR の二量体形成には、細胞外ドメインに付加している糖鎖が重要であることが報告されている。ASGR が EGFR 表面の糖鎖に結合することで細胞内にシグナルが入る事が示唆され、現在 EGFR を候補として機能的リガンドの同定を行っている。

ASGR は ERK 経路の他に JNK 経路も僅かながら活性化したことから、下流の Fos と Jun が活性化され、転写因子 AP-1 の結合部位をプロモーターに持つ遺伝子の転写誘導が起こる事が示唆される。MMP-9 の転写調節領域には AP-1 結合部位があるが、MMP-2 の転写調節領域には無いことが、ASGR による MMP-9 の選択的な発現誘導の理由の一つとして考えられる。MMP-9 だけでなく、AP-1 結合部位をプロモーターに持つ様々な蛋白質の転写誘導が示唆され、浸潤過程以外への ASGR の影響を今後調べていきたいと考えている。

興味深いことに、EGFR の活性化はリガンド濃度により異なることが報告されている。つまり EGFR を介した刺激は、リガンドが低濃度の場合は細胞増殖に影響を与え、高濃度の場合は細胞浸潤に影響を与えるというリガンド濃度に依存したシグナル経路の選択性が報告されてきた。EGFR が ASGR の機能的リガンドであると仮定すると、ASGR により 3LL 細胞の浸潤能が促進され、増殖能が影響を受けなかった原因の一つとして、ASGR がリガンド高濃度と類似した条件で EGFR に刺激を与えた事が示唆される。これらの点に関しても、機能的リガンドが同定された後に、詳細な活性化シグナル伝達の分子機構の解明に取り組みたいと考えている。

【結論】

本研究では肝実質細胞に発現する ASGR が、腫瘍微小環境において糖鎖への結合を介して 3LL 細胞側にシグナルを伝えることで肺転移を促進する事を明らかにした。また ASGR 共存下による MMP-9 発現誘導が、EGFR-ERK 経路を介したシグナル伝達の活性化に因る事を示した。ASGR は糖蛋白質の取り込み機能が広く知られる一方で、がん病態における役割はほとんど知られておらず、本研究で ASGR によるがん細胞表面の糖鎖への活

性化シグナル伝達の分子機構を明らかにしたことの意義は大きいと考える。今後はがん細胞表面の糖鎖の同定を進めると共に、ASGR と糖鎖の相互作用が肺転移過程の浸潤以外のプロセスにも影響を与えるか解明したいと考えている。

本研究により、原発巣を離れたがん細胞が肝臓に到達して留まることによって浸潤・転移性を獲得するという新しいパラダイムが示され、転移治療の改善に貢献することが期待される。