

審査の結果の要旨

氏名 上野 傑

「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シアロ糖蛋白質受容体による糖鎖認識)」と題する本論文では、肝臓の実質細胞表面に発現しているカルシウム依存型の糖鎖認識分子（レクチン）が、肝臓に血行性に遊走、流入したがん細胞の表面に結合することによりがん細胞の肺への転移性を増強することを明らかにした。がん細胞が宿主の微小環境とりわけ臓器特異的な因子の作用によってより高い転移性を持つように性質を変える可能性は予想されていたが、その全容は明らかでなかった。本研究で発見され検証された一連の過程は、糖鎖と糖鎖認識分子の相互作用という分子レベルでの機構解明を含め、がんの生物学に新たなパラダイムを提案している。これまで微小環境のがんの進行における役割は、炎症応答ががん細胞の増殖を促進し、結果として変異の蓄積が加速することによってがんの悪性度を高めるといったシナリオが考えられてきた。一方、血流に乗ったがん細胞が、特定の臓器（ここでは肝臓）を通過する、あるいは一時的に留まる間に転移性を獲得するという機構はこれまで全く知られていなかった。また、内在性の糖鎖認識蛋白質であるレクチンがこのような形でがん転移に関与する可能性は検証されたことがなかった。本論文では、肝臓実質細胞にのみ発現する細胞表面C型レクチンである肝臓アシアロ糖蛋白質受容体（ASGR）に注目し、この分子の存在が肺転移を増強することをこの分子の遺伝子ノックアウトマウスを用いることによって明確に示し、この分子の結合によってがん細胞がマトリックスメタロプロテアーゼの産生を上昇させること、このようながん細胞の変化はEGF受容体を介して起こることを証明した。これらの発見がそれぞれ一章としてまとめられている。

第一章では、3LL細胞の肺転移形成においてASGRが肺転移を促進することが遺伝子欠損マウスを用いて検証された結果が述べられている。ASGRはASGR1とASGR2のヘテロダイマーで形成されているが*Asgr1*遺伝子を欠損させることによりASGR2も発現が消失することから、*Asgr1*遺伝子欠損マウスを用いている。このマウス及び同腹野生型マウスの肝臓に、ホタルルシフェラーゼ発現マウス肺癌細胞株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。遺伝子欠損マウスで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、肺への転移性が低いことが明らかになった。ASGRの細胞表面への結合が3LL細胞の肺転移に影響を与えるか否かを検証するため、リコンビナントASGR1を添加した培地でこの細胞を培養し、尾静注

して肺転移性を評価した。その結果未処理群に比べ転移性が上昇していることが判明し、転移性上昇が ASGR から 3LL 細胞への直接の効果であることが明らかになった。

第二章では、ASGR が 3LL 細胞に与える影響を *in vitro* で解析するために、先ず浸潤能を評価し、その分子的な背景を探った結果が述べられている。3LL 細胞をリコンビナント ASGR 存在下で培養すると、形態、細胞外マトリックス分子に対する接着性、増殖能、及び遊走能に変化が見られなかったが、細胞外マトリックスを通しての浸潤性が上昇していることがトランスウェルチャンバーを用いた測定により明らかとなった。さらに、ASGR の結合により細胞外マトリックス分解酵素の一つであるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-9 の発現が mRNA 及び蛋白質のレベルで誘導される事が示された。Asgr1 遺伝子欠損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、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、3LL 細胞と接触した状態で培養し、48 時間後に上清に含まれる MMP-9 を測定して比較した。Asgr1 遺伝子欠損マウス由来の肝実質細胞を用いた場合は MMP-9 量が著しく低かった。同様な結果は後者の培養系に抗 ASGR レクチン活性阻害抗体を添加した場合にも見られた。以上より、3LL 細胞の肺転移過程において ASGR が糖鎖を介してがん細胞に結合し、MMP-9 産生を誘導することにより浸潤能を増強させ、肺転移を促進したと推定された。

第三章では、3LL 細胞において、ASGR の結合から MMP-9 の発現誘導に至るシグナル伝達の経路を解明する試みが述べられている。3LL 細胞を無血清条件下で 24 時間培養した後にリコンビナント ASGR1 を添加すると、EGFR、ERK、JNK などのリン酸化が顕著に起こり、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。またリコンビナント ASGR1 による MMP-9 mRNA 発現誘導も、PD98059 または AG1478 により阻害された。従って、ASGR の結合により活性化される 3LL 細胞では、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。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た。また 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定された。

以上の様に、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 ASGR との相互作用によって浸潤・転移性を獲得して肺転移するポテンシャルが高くなるという新しいパラダイムが示された。実験の主要な部分に用いられたのは 3LL 細胞であるが、ヒト大腸がん HT-29 細胞などでも ASGR 依存的な MMP-9 の発現誘導が観察されたこと、直腸がん以外の下部消化管のがんが肺転移を形成する際は肝転移巣が存在するという臨床的な知見があることを考慮すると、本研究で実験的に明らかにされた現象はヒトのがんの生物学として極めて重要であると判断できる。これらの結果は、糖鎖生物学、実験病理学及び腫瘍免疫学に資するところが大きい。よって、本研究を行った上野 傑は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。