

主論文の要旨

**Core2 β 1,6-N-acetylglucosaminyltransferases
accelerate the escape of choriocarcinoma from
natural killer cell immunity**

絨毛癌におけるコア 2 ベータ 1,6-N-アセチルグルコサミン
転移酵素を介したナチュラルキラー細胞からの免疫逃避機構

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：梶山 広明 教授)

中村 謙一

【緒言】

ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)は絨毛細胞より産生される糖蛋白であり、様々な機能を担っている。妊娠においては子宮内血管新生の促進や母体免疫寛容、合胞体性栄養膜細胞への分化などであり、絨毛性疾患においては腫瘍細胞の増殖や浸潤に関与している。絨毛癌では高分岐型糖鎖を持つ hyperglycosylated hCG(H-hCG)が産生され、セリン結合型(O型)H-hCGは絨毛癌の活動性の指標となることや絨毛細胞の浸潤に関与することが報告されている。O型H-hCGはコア2ベータ1,6-Nアセチルグルコサミン転移酵素(C2GnT)により合成されるが、このC2GnT発現は様々な癌種において、宿主による腫瘍排除反応を抑制することで、高い転移能を有し、悪性度と相関するとされてきた。宿主による腫瘍排除反応はT細胞とNK細胞が担っているが、T細胞による腫瘍細胞障害にはHLA発現が必須である。絨毛癌においてHLAは発現していないため、腫瘍排除反応はナチュラルキラー(NK)細胞が主であると思われる。NK細胞の腫瘍細胞傷害経路は、腫瘍細胞表面に発現しているMHCクラスI分子であるMICA/BとNK細胞レセプターであるNKG2Dが結合、認識することでperforin、granzyme Bなどの細胞傷害性顆粒を分泌する経路と、腫瘍細胞膜表面のDeath Receptor(DR)にNK細胞リガンドであるtumor necrosis factor related apoptosis(TRAIL)が結合することで直接腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する2経路がある。今回我々はC2GnTを介した絨毛癌細胞における免疫逃避機構につき、NK細胞の主要免疫機構NKG2D-MICA及びTRAIL-DRの2経路につき検討した。

【方法】

絨毛癌細胞株(Jar、BeWo、JEG3)およびインフォームドコンセントを得て採取した絨毛性疾患組織におけるC2GnTの発現を免疫染色およびウェスタンブロットにて確認した。

ヒト末梢血よりNK細胞を単離、さらにBALB/Cヌードマウス大腿骨および脾臓よりNK細胞を単離した。単離したNK細胞にIL-2を添加し5日間培養後、絨毛癌細胞株と様々なeffector/target ratio(20:1、10:1、4:1)にて共培養し、溶解した細胞より放出されるLDHを測定した。絨毛癌細胞株にTRAILを添加し、24時間共培養後、MTS assayにてcell viabilityを評価した。

C2GnT発現を制御しているGCNT1遺伝子をCRISPR/Cas9 systemを利用し、C2GnT knock out絨毛癌細胞株Jar KO、BeWo KOを樹立した。O-glycan上のPoly-N-acetyllactosamine鎖を認識するBiotin-conjugate Lycopersicon esculentum lectin(LEL)を用いて、レクチンブロットを施行した。またC2GnT controlおよびKO細胞とNK細胞を共培養し、細胞傷害性を検討した。NKG2D-MICA経路におけるC2GnTの機能を評価するために、フローサイトメトリーにて絨毛癌細胞株と共培養したNK細胞の脱顆粒を評価した。

C2GnTをKOすることが、MICAの発現および、MICAの糖鎖修飾に影響を与えるか検討するために、MICA抗体を用いて免疫沈降およびウェスタンブロットを施行した。

C2GnT発現の有無が、TRAIL抵抗性に影響するかを検討するために、control およ

び KO 細胞に TRAIL を添加し、24 時間共培養後、MTS assay にて cell viability を評価した。また TRAIL 経路における galectin-3 の働きを検討するために、endo- β -galactosidase を添加し、共培養した。

C2GnT 発現の有無により、MUC1 および DR 発現が変化するかをウェスタンブロットにて確認した。また MUC1 の糖鎖修飾を検討するために、MUC1 抗体を用いて免疫沈降を施行した。

ヒト絨毛癌細胞株 Jar control および KO 細胞が、マウス NK 細胞により障害されるかを、マウス NK 細胞とヒト絨毛癌細胞株を共培養し検討した。5 週齢の BALB/Cヌードマウスに、 5×10^5 個の Jar control および KO 細胞を皮下注射し、全生存率および腫瘍径を測定した。

【結果】

免疫組織化学染色において、絨毛癌組織および PSTT では C2GnT 強発現、胎状奇胎、正常胎盤組織では弱発現であった (Fig.1A-F)。ウェスタンブロットでも同様の結果であった (Fig.1G)。絨毛癌細胞株においては Jar、BeWo は C2GnT 強発現、JEG3 は弱発現、HTR-8/SVneo では発現を認めなかった (Fig.1G)。

C2GnT 強発現である Jar および BeWo は、C2GnT 弱発現である JEG3 に比較し、NK 細胞傷害性が低かった (Fig.1H)。また TRAIL 添加による細胞傷害性試験でも、同様の結果であった (Fig.1I)。

レクチンブロットにおいて、C2GnT KO 細胞では O-glycan 上の Poly-N-acetyllactosamine 鎖が減少していた。また C2GnT KO 細胞では NK 細胞による細胞傷害性が高かった (Fig.2A)。endo- β -galactosidase を添加し、galectin-3 を除去すると、NK 細胞傷害性が改善し、NK 細胞の脱顆粒マーカーである CD107a も増加した (Fig.2B)。

LEL を用いた免疫沈降を施行すると、Jar KO および BeWo KO の MICA に付加している Poly-N-acetyllactosamine 鎖は control に比較し減少していたが、MICA の発現は C2GnT 発現の強弱によらなかった (Fig.2C)。

TRAIL 存在下による cell viability は C2GnT の発現により増加するが、endo- β -galactosidase 添加により、MUC1 上の galectin-3 を除去しても、cell viability は変化しなかった (Fig.3A)。

MUC1 および DR4 の発現は C2GnT 発現の有無により変化しなかった。LEL を用いて免疫沈降すると、MUC1 に付加する Poly-N-acetyllactosamine 鎖は KO 細胞で有意に減少していた (Fig.3B)。

ヒト絨毛癌細胞株 Jar control に比較し、KO 細胞ではより高率にマウス NK 細胞により傷害された (Fig.4A)。In vivo においては、C2GnT KO 群は control 群に比較し、増殖率が低く (Fig.4B)、全生存率も有意に延長した ($p=0.0102$, Fig.4C)。

【考察】

本研究は絨毛癌細胞における C2GnT の発現と、NK 細胞に対する免疫機構を分析し

た初の研究である。絨毛癌や PSTT においては C2GnT が強発現しており、一方正常胎盤や EVT、胞状奇胎では弱発現であった (Fig.1)。また C2GnT の発現が高い絨毛癌細胞においては、NK 細胞傷害性が低く、in vivo においても同様の結果が示された。

絨毛癌においては、C2GnT により MICA 上に Poly-N-acetyllactosamine 鎖が付加されることで、NK 細胞の細胞傷害性を低下させた。また endo- β -galactosidase 添加により C2GnT KO 細胞を処理しても、NK 細胞の機能には変化なく、これは C2GnT KO 細胞が Poly-N-acetyllactosamine 鎖を持たないためと思われた。NK 細胞の細胞傷害性経路の一つは受容体と腫瘍リガンドによる会合であり、NK 細胞活性化受容体のうちで、NKG2D が癌細胞排除において重要な役割を担っている。癌細胞に発現している MICA は NKG2D と会合することで、NK 細胞が活性化し、perforin や granzyme B といった細胞傷害性顆粒を分泌し、癌細胞を傷害する。本研究において、O-glycan に galectin-3 が結合した Poly-N-acetyllactosamine 鎖が、C2GnT により NKG2D 会合部である MICA 糖鎖付加されることで、NKG2D-MICA の会合力を減弱させ、その結果 NK 細胞の絨毛癌に対する細胞障害性が低下した。

絨毛癌において、C2GnT は TRAIL を介した NK 細胞障害経路にも関与している。癌細胞表面の MUC1 は、Poly-N-acetyllactosamine 鎖が付加された core 2 O-glycan が多数糖鎖修飾されている。NK 細胞上の TRAIL が、DR4 などの death receptor に結合することで細胞死を誘導するが、MUC1 上の Poly-N-acetyllactosamine 鎖が腫瘍細胞表面の DR4 と NK 細胞上の TRAIL との結合を阻害する。本研究では、galectin-3 と MUC1 の関連は、TRAIL の存在下で絨毛癌細胞の生存率に影響を与えなかったことから、poly-N-acetyllactosamine 鎖が絨毛癌細胞への TRAIL-DR4 結合の分子シールドとして機能する可能性がある。

【結語】

本研究は、絨毛癌細胞において、C2GnT が MICA および MUC1 の糖鎖修飾を介して、NKG2D-MICA および TRAIL-DR 免疫抑制経路に関与している可能性があることを示唆している。C2GnT 活性を低下させる特定の阻害剤により、絨毛癌の NK 細胞に対する感受性を回復させ、腫瘍排除機能を促進し、転移を抑制する可能性がある。