

論文の内容の要旨

論文題目 ヒト腫瘍環境内に見られる抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体の機能解析

氏名 古谷 弦太

腫瘍免疫学の研究については、抗 PD-1/PD-L1 抗体などによる免疫チェックポイント阻害療法の奏功を背景に、細胞性免疫ないし細胞傷害性 T 細胞を中心として研究が進められてきた。一方で、腫瘍における液性免疫は未解明な点も多い。腫瘍液性免疫における既報の多くは、腫瘍浸潤 B 細胞が産生するサイトカインと腫瘍細胞との相互作用や、細胞性免疫との相互作用、腫瘍内における tertiary lymphoid structure (TLS) と予後ないし細胞障害性 T 細胞やヘルパー T 細胞との関係を扱ったものである。前二者については、腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞は、腫瘍の進行を促進する作用があるとすると多い一方、後二者は、腫瘍の原発臓器にもよるが、腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞が抗腫瘍効果を有する、ないし良好な予後や治療反応性のマーカーになる、というものが多く見られる傾向が窺える。

元来、B 細胞や形質細胞は、種々の抗原特異的な抗体を産生しており、その抗原特異的結合が、感染症に対する液性免疫応答や、自己免疫疾患の病態形成において中心的な役割を果たしている。また、産生される抗体の抗原を同定することが、これらの生体機構や疾患の発生メカニズムの解明に必要不可欠である。一方で腫瘍免疫学における既報は、その殆どが上記のような、抗原特異的認識を扱っていないものである。

腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞が、どのような抗原を認識しているのか、ひいては、どのような機構で発生したのか、検討している既報は散見されるのみであるが、これらの既報の多くは、腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞が、腫瘍抗原（腫瘍細胞で高発現している、ないし変異抗原）を認識しているとし、腫瘍抗原が腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞ないし TLS 発生の原因であるとしている。また、これらの論文は、こういった腫瘍抗原を認識する抗体が、腫瘍細胞表面に結合し、antibody dependent cellular cytotoxicity や complement dependent cytotoxicity を介して抗腫瘍効果をもたらす可能性を指摘している。しかし、これらの既報では、その腫瘍抗原を認識するクローンが、腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞のうちどれくらいの割合で存在しているのか、あるいはどれくらい主要な群を占めているのか明らかではなかった。

どのクローンがどれくらいの割合で存在するのかを検討するには、免疫グロブリンレパトアシークエンスという手法が有効である。本来 B 細胞受容体は V, D, J 遺伝子の再構成と somatic hypermutation により、多様な配列を有している。その配列情報を取得するべく、V 遺伝子の末端から C 遺伝子中程までを Polymerase chain reaction で増幅し、次世代シーケンサーで配列情報を取得する。その情報から、どの V, J 遺伝子が用いられているか、またその配列がどれくらいのリード数で得られたか、といったことを知ることができる。

2017 年に、びまん型胃癌 30 症例の凍結サンプルより抽出した RNA を用いて、免疫グロブリンレパトアシークエンスを行い、正常組織に比べ、腫瘍部ではレパトアの多様性が低下し、ドミナントクローンが存在すること、そのドミナントクローンの 3 割程度が、硫酸化グリコサミノグリカンを認識していることが報告された。腫瘍浸潤 B 細胞 / 形質細胞の認識する抗原のうち主要なものが同定された一方で、以下のような疑問が残されていた。

まず、硫酸化グリコサミノグリカンが、なぜ腫瘍液性免疫における主要な抗原になったのかということである。硫酸化グリコサミノグリカンは、腫瘍抗原としての既報がなく、正常組織の主に細胞外マトリックスに豊富に存在するとされている。しかし一方で、硫酸化グリコサミノグリカン自体、様々な硫酸化修飾を受けることが知られており、その修飾や分布は一様ではないとされている。硫酸

化グリコサミノグリカンの中の、どのような修飾部位が抗原として認識されていたのか、またそのエピトープは免疫原性としてどのような意味合いを持つのか、ということについて解析が必要と考えられた。

また、これらの抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体クローンの発生源も、明らかではなかった。腫瘍反応性 T 細胞の発生機序については、Cancer immunity cycle という一連の過程が定説となっている。腫瘍抗原を有する樹状細胞が、腫瘍領域リンパ節に移動し、そこで T 細胞を感作し、活性化された T 細胞が、血流から腫瘍組織に流入し、腫瘍抗原を認識して、clonal expansion する、というものである。腫瘍反応性 B 細胞 / 形質細胞の発生源も、Cancer immunity cycle に倣い、リンパ節であることが想定されるが、一方で、腫瘍内にしばしば見られる異所性のリンパ組織である TLS が、むしろその発生源であるという既報もしばしば見られている。これらの既報は、腫瘍組織と正常組織の検討に留まり、領域リンパ節の検討が行われていなかったため、これらのクローンの発生源も、未解明な状態であった。

本論文では、これらの問いに答えるべく、胃癌 102 症例における免疫グロブリンレパトアシークエンスを行い、腫瘍浸潤ドミナントクローンとして同定された抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体の、詳細なエピトープとその腫瘍内における分布を同定し、生化学的性質や機能を検討し、更にこれらのクローンを産生する形質細胞の分布を評価した。これらの結果により、腫瘍液性免疫の特異的な側面を明らかにした。

胃癌臨床検体 102 例（びまん型 50 症例、腸型 40 症例、EB ウイルス関連 9 症例、マイクロサテライト不安定型 3 症例）より抽出した RNA を用いて、免疫グロブリンレパトアシークエンスを行った。正常部に比べて腫瘍部で、レパトアの多様性が低下する傾向が見られ、複数症例で腫瘍に浸潤するドミナントクローンを、合計 26 クローン同定した。得られた配列から抗体を再構築して、免疫沈降と質量分析、及び種々の硫酸化修飾からなるグリコサミノグリカンとその類似糖鎖からなる ELISA を行った。その結果、9 つの種々のタンパクに対する抗体と、9 つの抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体を同定し、さらに、その抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体の抗原エピトープは、ヘパリンの主な構成要素である Tri-sulfate motif (IdoA2S-GlcNS6S) に代表される硫酸基が密なもの (densely sulfated glycosaminoglycan, dsGAG) であることが明らかになった。この dsGAG は、グリコサミノグリカンの中でも最も生体内で多いとされるヘパラン硫酸 / ヘパリン内に存在していることが、ヘパラン硫酸 / ヘパリンを特異的に切断する Heparinase I + III による処理や、ヘパラン硫酸 / ヘパリンの伸張に必要な糖転移酵素である EXT1、EXT2 の knockdown と、今回同定された抗硫酸化グリコサミノグリカン抗体 (α -dsGAG clone) を用いた flow cytometry で明らかになった。

腫瘍環境における dsGAG エピトープの分布を、免疫組織化学により検索したところ、このシグナルは主に腫瘍細胞に認められた。また、免疫細胞化学上は、腫瘍細胞の表面に点状に分布していた。ヘパラン硫酸プロテオグリカンとの関係性を検討したところ、腫瘍細胞表面の Syndecan-1 や Glypican-1 の一部に集中しており、グリコサミノグリカン上の硫酸基の局在の疎密を制御する機構が示唆された。

一方、免疫組織化学では、細胞膜や細胞質のみならず、腫瘍細胞の核に陽性所見が見られた。核の構成要素である二本鎖 DNA (dsDNA) は、硫酸化グリコサミノグリカンと同じく、negatively charged polymer (polyanion) であり、両者とも、溶液中では螺旋様の構造をとることが知られている。そこで、dsDNA に対する α -dsGAG clone の反応性を ELISA で検討したところ、これらの α -dsGAG clone は dsDNA にも結合することが明らかになった。一方、他のタンパク抗原を認識する腫瘍浸潤ドミナントクローンの抗原タンパクのほとんどが、DNA や RNA といった核酸への結合が知られているものであった。DNA や RNA、及びその結合タンパク質は、全身性エリテマトーデスなどの自己免疫疾患における自己抗体の抗原として、しばしば患者血清内で見られるものであり、ここに腫瘍液性免疫と自己免疫疾患との類似性が窺われた。一方で、 α -dsGAG clone は、dsDNA ELISA に

において、ヘパリンにより、その結合が阻害されており、negative charge に強く依拠した結合様式をとっていることが認められた。

また、腫瘍細胞に対する α -dsGAG clone の機能を検討した。目立った抗腫瘍効果は認められなかったものの、flow cytometry と免疫細胞化学での検討により、 α -dsGAG clone は、腫瘍細胞の表面に結合後、30 分程度と比較的速やかに、取り込まれることが確認された。

α -dsGAG クローンの発生起源を探るべく、腫瘍及び領域リンパ節における RNA-in situ hybridization を行った。陽性形質細胞は腫瘍内のある領域を中心に密に、そこからより疎に分布していることが見られ、一症例のみであるが、最も密に存在する組織標本中の TLS 周囲への分布も確認された。一方でリンパ節には、陽性細胞はごく少ない、ないし分布に領域性が見られなかった。以上から α -dsGAG は腫瘍の特定の領域から発生したと考えられた。一方で、 α -dsGAG clone の V 遺伝子内には比較的多くの変異が見られること、及び、その中でも dsGAG や dsDNA への結合能が高いクローンの方が、低いクローンに比べて、complementary determining region における non-synonymous mutation と framework region の non-synonymous mutation の比率が高い傾向が見られており、 α -dsGAG clone は affinity maturation を経ていること、胚中心を介したものであることが示唆された。以上を併せ、腫瘍内 TLS が α -dsGAG clone の発生起源であることが強く示唆された。

ヒト胃癌内でドミナントになっている免疫グロブリンクローンの半数が、腫瘍細胞に認められる高密度に硫酸化されたグリコサミノグリカンと、二本鎖 DNA に結合するクローンであった。これらのクローンは腫瘍細胞に比較的速やかに取り込まれた。これらのクローンを産生する形質細胞は腫瘍局所に集中して存在しており、腫瘍内から発生したことが強く示唆された。