

博士論文

論文題目 C型レクチン受容体の抗腫瘍免疫応答における役割

氏名 木村 好孝

目次

略語一覧	3
はじめに	6
第 1 部 がん細胞上に発現している Dectin-1 リガンドの探索	8
1. 研究背景	8
2. 材料と方法	10
2-1. 培地	10
2-2. 細胞株	10
2-3. がん細胞における糖転移酵素の mRNA 発現レベルの測定	10
2-4. 糖転移酵素を強制発現するがん細胞株の作製	12
2-5. Dectin-1 とがん細胞との結合の評価	13
2-6. 統計解析	13
3. 結果	14
3-1. Dectin-1 強結合性・弱結合性がん細胞間での糖転移酵素発現レベルの違い	14
3-2. Fut9、 β 4GalT6、ST3Gal5 により制御される糖鎖構造の Dectin-1 結合にお ける役割	15
4. 考察	16
第 2 部 Dectin-2 の抗腫瘍応答における役割の解明	23
1. 研究背景	23
2. 材料と方法	25
2-1. 培地	25
2-2. 細胞株	25
2-3. マウス	25
2-4. 皮下における腫瘍増殖モデル	25
2-5. 肺転移モデル	25
2-6. 肝転移モデル	25
2-7. 肝臓に占める腫瘍領域の割合の算出	26
2-8. 肝臓構成細胞の回収	26
2-9. フローサイトメトリー解析	26
2-10. 肝臓実質細胞及び非実質細胞、クッパー細胞の単離	27

2-11. qRT-PCR 解析.....	27
2-12. 生体におけるマクロファージの除去	28
2-13. マウスからの腸内共生細菌、真菌の除去	28
2-14. 肝非実質細胞のがん細胞に対する細胞障害活性の測定	28
2-15. 共焦点顕微鏡によるファゴサイトーシスの観察.....	28
2-16. クッパー細胞によるファゴサイトーシス活性の測定.....	28
2-17. クッパー細胞における遺伝子発現プロファイルの解析	29
2-18. 統計解析.....	29
3. 結果	30
3-1. Dectin-2 依存的ながん肝転移の抑制	30
3-2. Dectin-2 依存的ながん肝転移の抑制におけるクッパー細胞の重要性	31
3-3. Dectin-2 によって亢進するクッパー細胞による SL4 細胞の貪食	32
4. 考察	34
第 3 部 謝辞	51
第 4 部 参考文献	52

略語一覽

NK : Natural killer

RIG-I : Retinoic acid-inducible gene-I

NOD : Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein

NLRP : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein

STING : Stimulator of IFN genes protein

Dectin : Dendritic cell-associated C-type lectin

CLEC : C-type lectin

DNGR : DC, NK lectin group receptor

ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activation motif

Mincle : Macrophage inducible C-type lectin

MCL : Macrophage C-type lectin

DCIR : Dendritic cell immunoreceptor

Ly49Q : Lymphocyte antigen 49Q

ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif

DC-SIGN : Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin

MGL : macrophage galactose-type C-type lectin

LOX : lectin-like oxidized LDL receptor

β 4GalT : Beta-1,4-galactosyltransferase

Mgat : mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase

Fut : Fucosyltransferase

ST3Gal : ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase

DMEM : Dulbecco's modified eagle medium

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

MEM : Minimum essential media

HEK : Human embryonic kidney

RNA : Ribonucleic acid

mRNA : Messenger RNA

DNA : Deoxyribonucleic acid

cDNA : Complementary DNA

PCR : Polymerase chain reaction

qPCR : Quantitative PCR
β3GalT : Beta-1,3-galactosyltransferase
Fc : Fragment crystallizable
TBS : Tris-buffered saline
APC : Allophycocyanin
IgG : Immunoglobulin G
SEM : Standard error of the mean
FcR : Fc receptor
Syk : Spleen tyrosine kinase
NF-κB : nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
MAPK : Mitogen-activated Protein Kinase
NFAT : Nuclear factor of activated T-cells
TNF : tumor necrosis factor
IL : Interleukin
ROS : Reactive oxygen species
KO : Knockout
GFP : Green fluorescent protein
WT : Wild-type
PBS : Phosphate buffered saline
EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid
HBSS : Hank's Balanced Salt Solution
CD : Cluster of differentiation
Gr : Granulocyte receptor
FITC : Fluorescein isothiocyanate
BSA : Bovine serum albumin
Tris : tris(hydroxymethyl)aminomethane
pH : Potential hydrogen
Gapdh : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
rDNA : Ribosomal DNA
ITS : Internal transcribed spacer
CFSE : Carboxyfluorescein succinimidyl ester
ConA : Concanavalin A
Nme : Nucleoside diphosphate kinase

CARD : Caspase recruitment domain family

Ccl : Chemokine (C-C motif) ligand

Cxcl : Chemokine (C-X-C motif) ligand

HMGB : High Mobility Group Box

CTL : Cytotoxic T lymphocyte

snRNP : Small nuclear ribonucleoprotein

SAP130 : Sin3A associated protein 130kDa

5-FU : 5-fluorouracil

ATP : Adenosine triphosphate

MFI : Mean fluorescence intensity

はじめに

生体は細菌や真菌、ウイルスといった、様々な病原体に晒されているが、これらから身を守る仕組みとして、免疫系が存在する。脊椎動物においては免疫系は自然免疫系と適応免疫系に大別されるが、中でも病原体の侵入に対し、最前線で機能するのが自然免疫系である¹⁻³。自然免疫系による病原体の排除はマクロファージや好中球、樹状細胞、NK細胞といった細胞群によって担われており、それらの機能には自然免疫受容体が重要な役割を果たしている⁴。これまでに Toll 様受容体 (Toll like receptor; TLR)、C 型レクチン受容体 (C-type lectin receptor; CLR)、RIG-I 様受容体 (RIG-I -like receptor; RLR)、NOD 様受容体 (NOD-like receptor; NLR) など、様々な自然免疫受容体が同定されており、これらの受容体は病原体が持つ特有の分子パターン (Pathogen-associated molecular pattern; 以下、PAMPs) を認識し、シグナル伝達系の活性化を介して、サイトカインやケモカイン、脂質メディエーター、抗菌ペプチド、ムチンなどの産生を促し、病原体の排除に貢献することが知られている⁵。

一方で、このような外来の病原体に対する応答に加え、免疫系は内在性の異物に対しても応答することが明らかになっている^{6,7}。生体を構成する細胞は熱や光、衝撃などにより日常的に傷害を受けており、このようなストレスを受けた、あるいは死細胞となった自己細胞は、生体の恒常性を保つために適切に排除される必要がある。自然免疫受容体はこのような細胞から提示、または放出される分子パターン (Damage-associated molecular pattern; 以下、DAMPs) を認識し、免疫系を活性化することで、組織の修復などを介して生体の恒常性維持に寄与すると考えられている⁸。

自己細胞の異常が原因で起こる疾患として代表的な例が、がんである。がんは世界において最も多い死因の一つであるが、その排除には免疫系が重要な役割を果たしており、自然免疫受容体がここでも重要な役割を担うことが知られている⁹。例えば、NLR ファミリーメンバーに属する NOD1 や NOD2、NLRP3 は大腸癌に対する抗腫瘍免疫応答に貢献し^{10,11}、また NLRP3 に関しては NK 細胞の活性化を介して、大腸癌細胞の肝転移にも抑制的に機能することが分かっている¹²。また、TLR ファミリーメンバーの一員である TLR4 や、核酸レセプターである STING が細胞死を起こしたがん細胞から放出される DAMPs に応答し、抗がん剤による治療効率を上昇させることも報告されている^{13,14}。一方で、自然

免疫受容体によって誘導される免疫応答ががんに有利に働くこともあり、がん細胞から放出される細胞外マトリックスに TLR2 が応答し、炎症や肺への転移を増悪させることや¹⁵、TLR5 を介した免疫抑制作用により、腫瘍の増殖が高まることが報告されている¹⁶。

このように、自然免疫受容体のがんと関わりの関わりが明らかにされつつある中、私が参画した先行研究において、CLR ファミリー受容体の一つである Dectin-1 が、がん細胞を認識することで抗腫瘍免疫応答に寄与することが示された¹⁷。CLR は主に骨髄系の細胞に発現し、細菌や真菌、ウイルスが持つ糖鎖を認識することで、それらの感染の制御に重要な役割を果たすことが知られているが、中には自己内在性の分子を認識するファミリーメンバーも存在し、死細胞を除去することで生体の恒常性維持に寄与していることが報告されている¹⁸。CLR は下流のシグナル伝達系の違いによっていくつかのグループに分けられており、自身の細胞内ドメインに ITAM モチーフを持つ Dectin-1 などのグループや、ITAM モチーフを持つアダプター分子と会合している Dectin-2 や Mincle、MCL などのグループは、リガンド認識により免疫応答を活性化することが示されている。それらとは対照的に、DCIR や CLEC12B、Ly49Q といった、ITIM モチーフを持つグループは免疫応答を抑制することが報告されている。

こうした様々な CLR ファミリーメンバーが知られている中、CLR の抗腫瘍応答における役割は明らかにされていなかった。先行研究で我々は Dectin-1 ががん細胞を認識し抗腫瘍応答を活性化することを明らかとしたが、この発見は、CLR の抗腫瘍応答への関与を示した初めての例である¹⁷。しかしながら、Dectin-1 による抗腫瘍応答の詳細な分子機構、及び Dectin-1 以外の CLR が抗腫瘍応答に寄与するかどうかについては解明されていなかった。そこで本研究では、CLR の抗腫瘍免疫応答における役割をさらに明らかにするため、第 1 部において「がん細胞上の Dectin-1 リガンドの探索」を、第 2 部にて「Dectin-2 の抗腫瘍応答における役割の解明」を行った。

第1部 がん細胞上に発現している Dectin-1 リガンドの探索

1. 研究背景

マクロファージや樹状細胞などの自然免疫細胞が発現している、TLR や CLR といった自然免疫受容体は、病原体に特有の分子パターンである PAMPs を認識することで下流シグナルを活性化し、自然免疫応答、ひいては適応免疫応答をも誘導する^{4,5}。一方で、自然免疫受容体は自身の細胞から暴露される DAMPs をも認識し、様々な炎症性疾患や自己免疫疾患の病態の増悪に関与することが知られており^{8,19,20}、さらに近年の解析から、がんの制御においても重要な役割を果たすことが明らかにされつつある¹⁰⁻¹⁶。

そのような中、私が参画した研究において、CLR の一つである Dectin-1 が、がん細胞を認識し、抗腫瘍免疫応答に寄与する自然免疫受容体として初めて同定された¹⁷。一連の解析により、樹状細胞やマクロファージに発現する Dectin-1 ががん細胞上の N 型糖鎖構造を認識し、NK 細胞を介したがん細胞の殺傷を亢進することが判明した。さらにそのような Dectin-1 による細胞の認識は通常の細胞に対しては認められなかったことから、がん細胞に特有の N 型糖鎖が Dectin-1 との結合に重要であることが示唆された。しかしながら、その詳細な糖鎖構造の解明までには至らなかった。

これまでに、通常の細胞とは異なる様々な N 型糖鎖の構造ががん細胞において発現していることが報告されている^{21,22}。N-アセチルグルコサミン、ガラクトース、フコースからなるルイス A、B、X、Y 構造や、糖鎖末端にシアル酸を有する構造は、がん細胞が持つ N 型糖鎖の特徴の一つである。また、ガラクトースと N-アセチルグルコサミンの繰り返し配列であるラクトサミンがポリマーとなったポリラクトサミン構造も、がん細胞において特異的に観察される。これらの糖鎖構造が形成される原因として、がん細胞における糖転移酵素の発現の異常が報告されている。例えば、乳癌細胞ではルイス X 構造の糖鎖末端への付加に重要なガラクトース転移酵素 β 4GalT3 が、卵巣癌細胞ではポリラクトサミン構造の構築に重要な N-アセチルグルコサミン転移酵素 Mgat4a が、それぞれ通常の細胞に比べ発現が上昇している^{23,24}。

このように、がん細胞において異常糖鎖が発現していること、さらに、Dectin-1 が N 型糖鎖を認識する、という先行研究の結果より、本研究では、が

んが持つ特徴的な糖鎖構造の形成に重要な糖転移酵素に注目し、それらを発現した細胞と Dectin-1 との結合を解析することで、Dectin-1 のリガンドとなる糖鎖の同定を試みた。

2. 材料と方法

2-1. 培地

500ml の MilliQ 水に 4.75 g のダルベッコ変法イーグル培地（日水製薬）を溶解し、さらに終濃度 4 mM の L-グルタミン（和光純薬）、0.12% 炭酸水素ナトリウム（和光純薬）、10% 加熱非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS, HyClone) を添加して Complete DMEM を作製した。また、RPMI medium 1640（ナカライテスク）に終濃度 100 μ M の MEM 非必須アミノ酸溶液（ナカライテスク）、100 μ M MEM ピルビン酸ナトリウム溶液（ナカライテスク）、50 μ M 2-メルカプトエタノール（2-ME、ナカライテスク）、10% FCS を加え、Complete RPMI を作製した。また、DMEM-F12 medium (Gibco / Invitrogen) に 10% FCS を加え、Complete DMEM-F12 を作製した。

2-2. 細胞株

マウス黒色腫細胞株 B16F1 及び B16F10、マウス肺癌細胞株 3LL、ヒト胎児腎臓細胞株 HEK293T は理研バイオリソースセンターより購入し、B16F1、B16F10、HEK293T は Complete DMEM、3LL は Complete RPMI にて培養した。マウス大腸癌細胞株 SL4 は東京大学薬学系研究科、入村達郎教授（現順天堂大学医学部客員教授）よりご供与いただき、Complete DMEM-F12 にて培養した。

2-3. がん細胞における糖転移酵素の mRNA 発現レベルの測定

添付のプロトコールに従い、RNAiso plus (TaKaRa) を用いてがん細胞株から total RNA を抽出し、PrimeScript RT reagent with gDNA Eraser (TaKaRa) により cDNA を合成した。得られた cDNA を LightCycler 480 (Roche) により、SYBR Green PCR Master Mix (Roche Bioscience) を用いて増幅させ、qPCR 解析をした。各遺伝子の mRNA 発現量は *Gapdh* mRNA の発現量により標準化した。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

Mgat4a forward primer : GTTGCTTCCTCCTCTTGTGC

Mgat4a reverse primer : CCCGTCTTCATCCTCATCA

Mgat4b forward primer : GGGCAAAATCCAGAACTGA

Mgat4b reverse primer : GAAATCCTCCCGCAAGTAGG

Fut1 forward primer : CATCAGAAGTCAGCCATCCA

Fut1 reverse primer : AAGCATTCCAGCATTTCCAG

Fut2 forward primer : GAACGCTGGGATTGGTTTAG
Fut2 reverse primer : AACTTGGTGAGGGGACTGTG
Fut4 forward primer : TTAGCACAAGGGTGGGAAAA
Fut4 reverse primer : TGGGTGACAGGTAAGGAAGG
Fut7 forward primer : CAGTCCACACTCACCATCCTT
Fut7 reverse primer : GAAGACCACAGCATCAGCAC
Fut9 forward primer : GGGGAGAGAAACAGATTTACCC
Fut9 reverse primer : AAGAGAGATGCCACAGCAA
Fut10 forward primer : CTTTCTGATGGTCACACTCCAG
Fut10 reverse primer : GTTTAGGCTCTCCCTCCACA
Fut11 forward primer : GAGAAGCAGAAGCCAGAAGC
Fut11 reverse primer : TAGCCTGAACCATCCTGTCC
β3GalT5 forward primer : CAGGAGTCACCAGCATCTCA
β3GalT5 reverse primer : ACAGGAAGTCAAGCAGAACCA
β4GalT1 forward primer : ATGCTGTTCGTGTTGGGTTT
β4GalT1 reverse primer : TGCTGAAAGGGAGGAGATAGG
β4GalT2 forward primer : AGCCCAAACCTCCTCACTTT
β4GalT2 reverse primer : AGTCAAACCTCCCACCTTTTC
β4GalT3 forward primer : AGATTGGCTGTTGGAATGCT
β4GalT3 reverse primer : AAGGAGTGAAGGGATTTCTGTG
β4GalT4 forward primer : CCACCAGACGGGAAGTAAAA
β4GalT4 reverse primer : GAAGTCATTCTCAGGCACCAG
β4GalT5 forward primer : GCGGAGAAGATGACGACTTG
β4GalT5 reverse primer : GGTGGTGAGGAATGGACTTG
β4GalT6 forward primer : AAAGAAATCGTGGCTGATGG
β4GalT6 reverse primer : ATAAAAAGGGGGCTGTGGAA
ST3Gal1 forward primer : AGAGGGTGAAGAAAGAAAGCAG
ST3Gal1 reverse primer : TGAGCAGAGAGGTTAGGAAGGT
ST3Gal2 forward primer : AGCCGAACAACCTCACCATTT
ST3Gal2 reverse primer : CGCTGGCAATCCACATTAG
ST3Gal3 forward primer : GCTGTGATGAAGTGGCAGTC
ST3Gal3 reverse primer : TCTCGCTGGATGTTGTGTGT
ST3Gal4 forward primer : TTGTTGGTGGTGGTTGGTT

ST3Gal4 reverse primer : GTTCCAGATTAGCCAGGGTTT

ST3Gal5 forward primer : AGTATGACCCGCCTTTTGG

ST3Gal5 reverse primer : TTGGCTCTCAAGTG TTCAGG

ST3Gal6 forward primer : GGTGGTTGGTAATGGAGGAG

ST3Gal6 reverse primer : GCCTAAGACAGGACCGTTGT

2-4. 糖転移酵素を強制発現するがん細胞株の作製

Fut9 をコードする配列は B16F1 細胞の cDNA から

Forward primer : CTCGAGATGACATCAACATCCAAAGG

Reverse primer : GCGGCCGCATTCCAAAACCATTTCTCTA

を用いて、 β 4GalT6 をコードする配列は SL4 細胞の cDNA から

Forward primer : CTCGAGATGTCTGCGCTCAAGCGGAT

Reverse primer : GCGGCCGCATAGTCTTCAATTGGAGCTA

を用いて、ST3Gal5 をコードする配列は B16F10 細胞の cDNA から

Forward primer : CTCGAGATGCACACAGAGGCGGTGGG

Reverse primer : GCGGCCGCGTGGATGCCGCCGCTGAGGT

を用いて PCR 法により増幅し、それぞれ pMSCV-pac-FLAG の *SaI*-*NotI* サイト間に挿入した。得られたベクターを VSV-G、pMD-ogp と共に X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) を用いて HEK293T 細胞にトランスフェクトし、翌日に培地を交換した。48 時間後、培養上清をシリンジフィルター (孔径 0.45 μ m; Corning) に通し、Fut9 をトランスフェクトした細胞由来の上清中で B16F10 細胞を、 β 4GalT6 と ST3Gal5 をトランスフェクトした細胞由来の上清中で B16F1 細胞を、8 μ g/mL のポリブレン (SIGMA-Aldrich) と共に培養した。翌日に培地を交換し、一晚培養した後、4.5 μ g/mL の Puromycin (Invitrogen) にて薬剤耐性細胞を選択した。十分な選択が行われた後、細胞を BD Cytotfix/Cytoperm, BD Perm/Wash (BD Biosciences) を用いて固定・浸透化させ、Monoclonal ANTI-FLAG M2 Clone M2 (SIGMA-Aldrich)、Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen) を用いて染色し、フローサイトメトリー解析にて糖転移酵素の発現を確認した。VSV-G、pMD-ogp は北海道大学大学院医学研究科生理学講座の大場雄介教授よりご供与いただいた。

2-5. Dectin-1 とがん細胞との結合の評価

可溶性組み換え Fc、Dectin-1-Fc タンパクは過去に報告されている通りに調製した¹⁷。糖転移酵素を強制発現したがん細胞株を 1.3 mM CaCl₂ の入った TBS (pH 8.0) 中にて Fc、または Dectin-1-Fc と、4°C で 15 分間反応させた。これらの組み換えタンパクを APC にて標識した抗ヒト IgG1 抗体 (4E3; Abcam) にて染色し、LSR Fortessa (BD Biosciences) によってフローサイトメトリー解析した。抗ヒト IgG1 抗体の APC による標識は APC Labeling Kit-NH2 (Dojindo) を用いて添付されたプロトコールに沿って行った。得られたデータは FlowJo software (Tree Star) を用いて処理した。

2-6. 統計解析

データは two-tailed, unpaired Student's *t* test により解析し、 $p < 0.05$ を有意差有りとした

3. 結果

3-1. Dectin-1 強結合性・弱結合性がん細胞間での糖転移酵素発現レベルの違い

Dectin-1 によるがん細胞の認識にどのような糖鎖構造が重要であるかを検討するため、Dectin-1 との結合が強い B16F1 細胞及び 3LL 細胞と、Dectin-1 との結合が弱い B16F10 細胞及び SL4 細胞における糖転移酵素の発現レベルを調べ、Dectin-1 の結合レベルと相関のあるものがあるかどうか検証した。これまでの報告で、がん細胞はポリラクトサミン構造を持った N 型糖鎖を非常に多く発現することが知られている²¹。そこで、そのような糖鎖構造の構築に重要な酵素である Mgat4a 及び Mgat4b の mRNA 発現レベルを各がん細胞の間で比較した²⁴。その結果、どちらの酵素も Dectin-1 が強く結合するがん細胞株のグループと、弱く結合するがん細胞株のグループで発現レベルの明確な差は認められなかった (図 1)。

がん細胞上の糖鎖構造は、腫瘍マーカーとしてがんの診断に利用される²⁵。そこで、次に腫瘍マーカーとして知られているシアリルルイス A または X 構造の合成に関わる糖転移酵素の発現について調べた。シアリルルイス A/X はルイス A / X 構造のガラクトース末端にシアル酸が付加した糖構造であるが²⁶、Fut1, 2, 4, 7, 9, 10, 11 がフコースの転移に重要な役割を果たしている²⁷。これら糖転移酵素のがん細胞株における mRNA 発現を調べたところ、Fut1, 2, 4, 7, 10, 11 の発現レベルと、がん細胞株に対する Dectin-1 の結合強度との相関は見られなかったが、Fut9 は B16F1 細胞及び 3LL 細胞にて発現が高かったのに対し、B16F10 細胞及び SL4 細胞では発現が低く、Dectin-1 の結合強度と相関することが判明した (図 2)。シアリルルイス A 構造ではガラクトースと N-アセチルグルコサミンが β 1-3 結合にて連結しており、それに対してシアリルルイス X 構造では β 1-4 結合にて共有結合している²⁶。そこで、シアリルルイス A 構造、シアリルルイス X 構造それぞれにおけるガラクトースの転移に重要な β 3GalT5、及び β 4GalT1, 2, 3, 4, 5, 6 の mRNA 発現を^{28,29}、がん細胞株ごとに比較した。その結果、 β 3GalT5、 β 4GalT1-5 は Dectin-1 の結合強度とは関係なく発現していたが、 β 4GalT6 は B16F1 及び 3LL 細胞で発現が低く、B16F10 及び SL4 で発現が高いという相関が認められた (図 3)。さらに、シアリルルイス A/X 構造におけるシアル酸の転移に重要な ST3Gal1, 2, 3, 4, 5, 6 の mRNA 発現についても調べた結果³⁰⁻³²、ST3Gal1-4, 6 の中に Dectin-1 に強く結合するグループと弱く結

合するグループで発現レベルの分かれるものはなかったが、ST3Gal5 の発現は B16F1 細胞及び 3LL 細胞で低く、B16F10 細胞及び SL4 細胞で高いことが明らかとなった (図 4)。以上より、Fut9 は Dectin-1 との結合が強いがん細胞で、 β 4GalT6、ST3Gal5 は Dectin-1 の結合が弱いがん細胞でより mRNA 発現が高いことが示唆された。

3-2. Fut9、 β 4GalT6、ST3Gal5 により制御される糖鎖構造の Dectin-1 結合における役割

がん細胞における Fut9 の発現は Dectin-1 の結合と正の相関があり、 β 4GalT6、ST3Gal5 の発現は Dectin-1 の結合と負の相関があったことから、Fut9 は Dectin-1 との結合を促進し、 β 4GalT6、ST3Gal5 は逆に Dectin-1 との結合を阻害する可能性が考えられた。この仮説を検証するため、Fut9、 β 4GalT6、ST3Gal5 をがん細胞株に強制発現させ、Dectin-1 との結合強度が変化するかどうかが調べた。Fut9 を Dectin-1 との結合が弱い B16F10 細胞に、 β 4GalT6 または ST3Gal5 を Dectin-1 との結合が強い B16F1 細胞にトランスフェクトさせたところ、すべての糖転移酵素とも顕著な発現が確認された (図 5)。まず B16F10 細胞の Fut9 強制発現細胞株 (B16F10-Fut9 細胞) に対する、可溶性組み換え Dectin-1 タンパクの結合レベルを調べた結果、mock 発現細胞 (B16F10-mock 細胞) との結合強度と比べて顕著な変化は認められなかった (図 2A)。また、B16F1 細胞の β 4GalT6、ST3Gal5 強制発現細胞株 (それぞれ B16F1- β 4GalT6 細胞、B16F1-ST3Gal5 細胞) においても、可溶性 Dectin-1 タンパクとの結合レベルは mock をトランスフェクトした細胞 (B16F1-mock 細胞) と比較してほとんど変化しなかった (図 6)。したがって、Fut9、 β 4GalT6、ST3Gal5 によって形成される糖鎖構造は Dectin-1 の認識に関与しないことが示された。

4. 考察

本研究により、Dectin-1 との結合が強いがん細胞で発現が高い Fut9 や、Dectin-1 との結合が弱いがん細胞で発現が高い β 4GalT6、ST3Gal5 によって形成される糖鎖構造は、Dectin-1 の認識に関わらないことが示された。したがって、これらの糖転移酵素とは異なる酵素により形成される糖鎖、もしくは Fut9 や β 4GalT6、ST3Gal5 それぞれが単独では構築することのできない糖鎖が Dectin-1 の認識に重要であると考えられる。他の糖転移酵素は細胞株における発現レベルと Dectin-1 との結合レベルが相関しなかったため、少なくとも糖転移酵素単独では Dectin-1 の認識機構には関与しないと予想される。

がん細胞では通常の細胞ではあまり発現しない糖鎖が認められることが多く報告されている²¹。したがって、Dectin-1 はがん化することにより変化した糖鎖構造を認識している可能性が考えられる。しかしながら、通常の細胞にて発現している糖鎖構造に Dectin-1 が結合する可能性も排除できない。Dectin-1 のがん細胞に対する結合はアスパラギンから N 型糖鎖を切断する N-glycosidase 処置により大きく減少するため、タンパク質の持つ N 型糖鎖が Dectin-1 の認識に重要と考えられるが¹⁷、がん細胞では様々な膜タンパク質が通常の細胞よりも多く発現することが知られている³³⁻³⁵。そのため、特定の膜タンパク質において糖鎖構造は変化しないものの、その発現ががん化により増加することで、Dectin-1 に認識されるようになる可能性が考えられる。

これまでの報告により、がん細胞に発現する N 型糖鎖は細胞の増殖や浸潤、また、腫瘍内の血管新生を促すことでがんの進展に有利に働くことが知られている²¹。さらにそのような N 型糖鎖は抗腫瘍免疫応答を抑制する機能も有することが報告されている³⁶。したがって、がんにとって特徴的な N 型糖鎖を発現することは宿主の免疫監視を逃れるための一種の戦略であると捉えることができるが、その N 型糖鎖を認識する Dectin-1 は、がん細胞が使う知恵を上回るために生体が用意した、言わば免疫系の更なる砦とも捉えられる。Dectin-1 が認識する糖鎖の構築に必要な糖転移酵素を同定し、がん細胞をターゲットとした遺伝子治療等に用いることで、こうした抗腫瘍応答の機構を利用した、より効果の高いがん治療法の開発に貢献できるかもしれない。

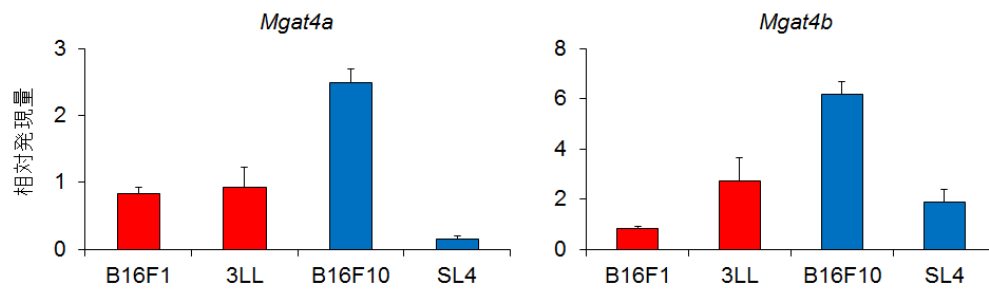


図1 Dectin-1 が強く結合するがん細胞と弱く結合するがん細胞における、ポリラクタミン構造の構築に重要な N-アセチルグルコサミン転移酵素の発現の比較

Dectin-1 が強く結合する B16F1 細胞と 3LL 細胞（赤）、Dectin-1 が弱く結合する B16F10 細胞と SL4 細胞（青）における Mgat4a, b の mRNA 発現量を測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。

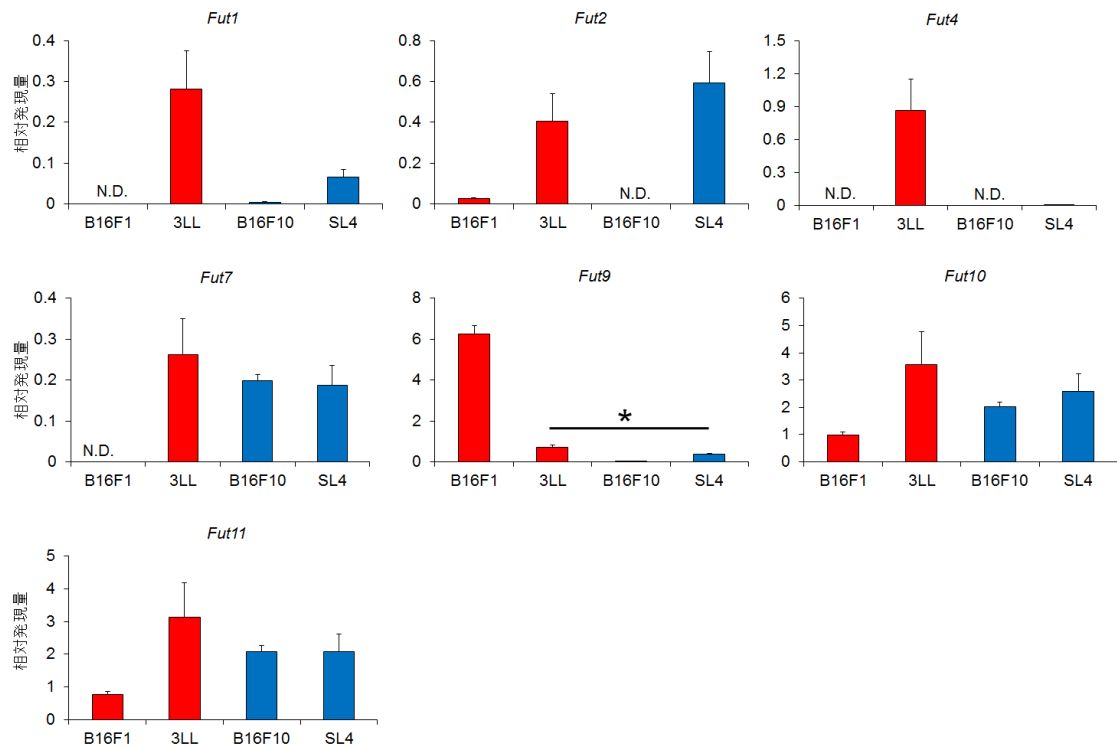


図2 Dectin-1 が強く結合するがん細胞と弱く結合するがん細胞における、シアリルルイス A/X 構造の構築に重要なフコース転移酵素の発現の比較
Dectin-1 が強く結合する B16F1 細胞と 3LL 細胞（赤）、Dectin-1 が弱く結合する B16F10 細胞と SL4 細胞（青）における Fut1, 2, 4, 7, 9, 10, 11 の mRNA 発現量を測定した。データは平均値 ± SEM を示している。* $p < 0.05$ 。

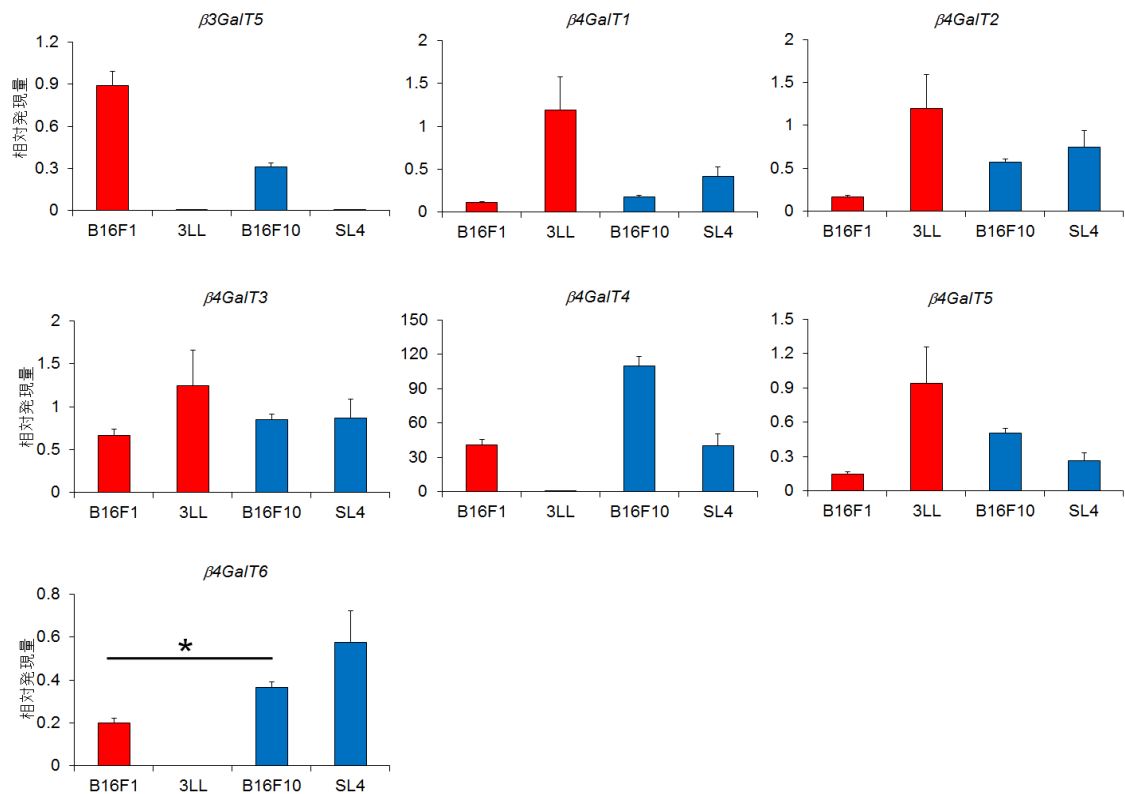


図3 Dectin-1 が強く結合するがん細胞と弱く結合するがん細胞における、シアリルルイス A/X 構造の構築に重要なガラクトース転移酵素の発現の比較
Dectin-1 が強く結合する B16F1 細胞と 3LL 細胞 (赤)、Dectin-1 が弱く結合する B16F10 細胞と SL4 細胞 (青) における $\beta 3GalT5$, $\beta 4GalT1$, 2, 3, 4, 5, 6 の mRNA 発現量を測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。* $p < 0.05$ 。

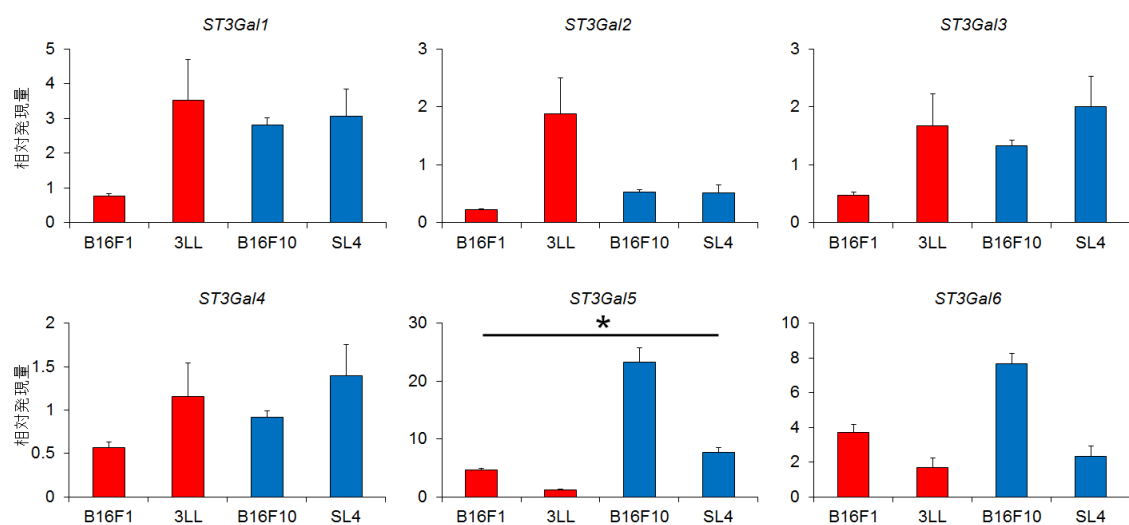


図4 Dectin-1 が強く結合するがん細胞と弱く結合するがん細胞における、シアリルルイス A/X 構造の構築に重要なシアル酸転移酵素の発現の比較
Dectin-1 が強く結合する B16F1 細胞と 3LL 細胞（赤）、Dectin-1 が弱く結合する B16F10 細胞と SL4 細胞（青）における ST3Gal1, 2, 3, 4, 5, 6 の mRNA 発現量を測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。* $p < 0.05$ 。

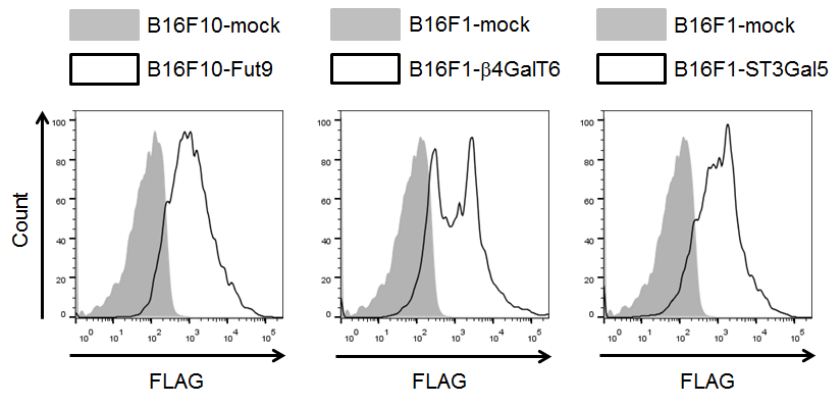


図5 B16F10-Fut9細胞、B16F1-β4GalT6細胞、B16F1-ST3Gal5細胞における、トランスフェクトさせた糖転移酵素の発現

B16F10-Fut9細胞、B16F1-β4GalT6細胞、B16F1-ST3Gal5細胞における、トランスフェクトされた糖転移酵素の発現をフローサイトメトリーにて解析した。糖転移酵素に付随しているFLAGタグを染色し、トランスフェクトされたタンパクの発現量を評価した。

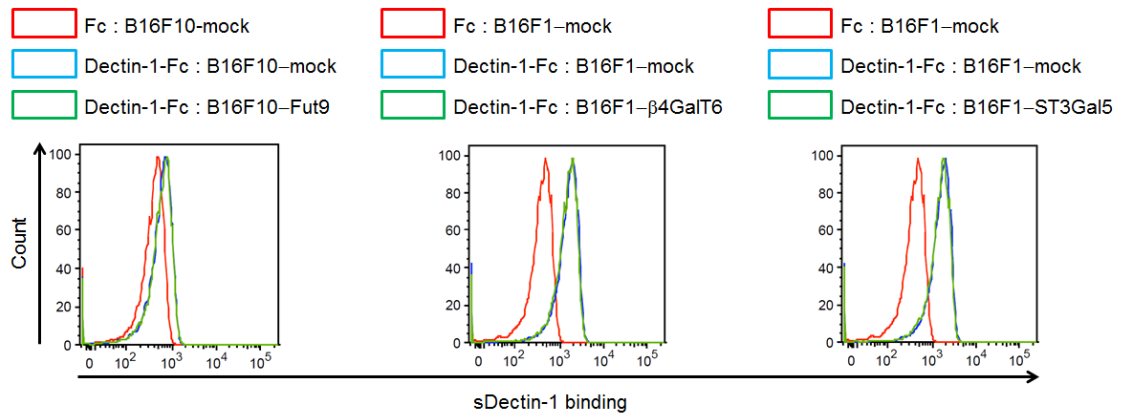


図 6 Fut9、β4GalT6、ST3Gal5 を強制発現させた B16F1 細胞、または、B16F10 細胞の Dectin-1 への結合
 Fut9、β4GalT6、ST3Gal5 を強制発現させた細胞への Dectin-1 結合の変化をフローサイトメトリーにて評価した。(Fc または Dectin-1-Fc) : (細胞) は Fc または Dectin-1-Fc の、記載された細胞への結合を意味している。

第2部 Dectin-2の抗腫瘍応答における役割の解明

1. 研究背景

第1部において述べたように、がん細胞を認識することで抗腫瘍免疫応答に寄与する自然免疫受容体として、CLRの一つであるDectin-1を初めて同定した¹⁷。しかしながら、Dectin-1に関する一連の解析はCLRの抗腫瘍応答における役割の一端を明らかにしたにすぎず、その多くは未だ不明である。そこで、本研究ではさらにCLRのがん制御における役割を解明するため、Dectin-1以外のCLRに着目した。様々なCLRファミリー分子のうち、私は抗腫瘍免疫応答を誘導するDectin-1と高い相同性を示し、Dectin-1と同様にITAMを介した免疫応答の活性化を呈するDectin-2に注目し、がん制御における役割を解析することにした^{37,38}。

Dectin-2は主に樹状細胞やマクロファージ、炎症性単球に発現しており、細菌や真菌が有する高度にマンノース化された糖構造を認識し、真菌の排除に重要な役割を果たす一方、肺のアレルギー性炎症を増悪させることが知られている³⁹⁻⁴²。そのシグナル伝達にはITAMモチーフを持ったFcR γ 鎖を必要とし、Sykを介してNF- κ BやMAPK、NFAT経路を活性化するほか、NLRP3の活性化をも行うことでTNF- α 、IL-6、IL-23、IL-1 β などのサイトカイン産生を誘導することが報告されている¹⁸。現在までにDectin-2ががんの制御に関わるとの報告はなされていない。

がんにより生体が死に至る大きな要因の一つが転移である。その中でも、肝転移は臨床での重要性が長年指摘されている。大腸癌や肺癌、胃癌、膵臓癌など、様々ながんで肝臓への転移が見られることが知られており⁴³、特に大腸癌においては、転移が認められる患者のうち、約80%は肝転移を有している⁴⁴。肝転移と大腸癌の予後には強い負の相関があるため、肝転移を制御するメカニズムを解明し、その治療法を開発することが急務となっている。⁴⁵

肝転移における宿主免疫系の役割として、NK細胞や、肝臓常在マクロファージであるクッパー細胞などによる制御が報告されているが^{46,47}、特にクッパー細胞が腫瘍抑制の機能を持つのか、それとも腫瘍を亢進させるのかについては明らかになっていない⁴⁸。ROSの産生やファゴサイトーシスによりがん細胞を直接排除することや、NK細胞の抗腫瘍応答を間接的に高めることが知られて

いる反面、炎症性サイトカインやケモカインの産生、細胞外マトリックスのリモデリング、血管新生の亢進により、腫瘍に有利な微小環境をもたらすことも示されており、肝転移におけるクッパー細胞の役割については未だ議論がなされている状態である⁴⁹。近年、NLRファミリー分子の一つであるNLRP3がクッパー細胞において機能し、IL-18の産生を介したNK細胞の活性化を促進することで肝転移の抑制に関わることが報告され、自然免疫受容体を切り口としたクッパー細胞のがん制御における役割に注目が集まっている¹²。

本研究ではがんに対する宿主免疫応答における、自然免疫受容体Dectin-2の機能を明らかにすることを目的とし、マウスにおける*in vivo*肝転移モデルを用いて解析を行った。

2. 材料と方法

2-1. 培地

第1部の第2章2-1.に準ずる。

2-2. 細胞株

第1部の第2章2-1.に準ずる。3LL-GFP細胞、SL4-GFP細胞は過去に報告のあるものを用い¹⁷、それぞれ Complete RPMI、Complete DMEM-F12にて培養した。

2-3. マウス

Dectin-2欠損（以下、Dectin-2 KO）マウスは千葉大学真菌医学研究センターの西城忍准教授よりご供与いただいた⁴¹。いくつかの実験では野生型（WT）のC57BL/6マウス6週齢を日本クレアより購入し、使用した。全ての実験は東京大学ライフサイエンス委員会によって承認を得、ライフサイエンス委員会のガイドラインに従って行った。

2-4. 皮下における腫瘍増殖モデル

5×10^5 個のB16F1細胞、 1×10^5 個のB16F10細胞、 5×10^5 個の3LL細胞、 2×10^5 個のSL4細胞のいずれかをマウスの皮下に播種し、形成される腫瘍の体積を長軸をa、短軸をbとして $ab^2/2$ により算出した。

2-5. 肺転移モデル

1×10^6 個のB16F1細胞、 5×10^5 個のB16F10細胞、 1×10^6 個の3LL-GFP細胞、 3×10^5 個のSL4-GFP細胞のいずれかをマウスの尾静脈から播種した。B16F1細胞、B16F10細胞を播種したマウスは14日後に肺の転移コロニー数を計測した。3LL-GFP細胞、SL4-GFP細胞を播種したマウスは12日後に肺における*Gfp* mRNAの相対量を測定した。

2-6. 肝転移モデル

マウスの左横腹に切れ込みを入れ、脾動脈、脾静脈を傷つけぬよう、慎重

に脾臓を体外へ出した。3 × 10⁵ 個の 3LL 細胞、2 × 10⁵ 個の SL4 細胞、2 × 10⁵ 個の SL4-GFP 細胞のいずれかをその中に播種し、5 分間静置した。その後脾臓を摘出し、ホチキスにて傷口を塞いだ。3LL 細胞、SL4 細胞を播種したマウスは 14 日後に肝臓を回収し、巨視像の撮影と肝重量の測定を行った。SL4-GFP を播種したマウスは 24、96 時間後に肝臓における *Gfp* mRNA の相対量を測定した。

2-7. 肝臓に占める腫瘍領域の割合の算出

がん細胞が転移した肝臓を 4% Paraformaldehyde が入った PBS にて保存し、株式会社バイオ病理研究所に切片の Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を依頼した。得られた染色像を Image J (National institute of Health) にて解析し、肝臓に占める腫瘍領域の割合 (%) = 100 × (腫瘍領域の面積) / (肝臓全体の面積) を算出した。

2-8. 肝臓構成細胞の回収

肝臓を細かく切り刻み、750μg/ml の collagenase D (Roche)、40μg/ml の DNase I (Roche)、500μg/ml の Dispase (Gibco) が入った RPMI medium 1640 中にて 1 時間、37°C で反応させた後、セルストレイナー (孔径 40μm; BD) 上ですり潰した。または、0.2mM の EDTA が入った HBSS (ナカライテスク)、及び 1mM の CaCl₂ と 750μg/ml の collagenase D が入った HBSS を 37°C にて温め、下大静脈から 1-2ml/min の速度にて注入することで肝臓を還流した後、セルストレイナー上ですり潰した。

2-9. フローサイトメトリー解析

抗 CD16/CD32 (93)、CD45.2 (104)、CD11b (M1/70)、CD11c (N418)、Gr-1 (RB6-8C5)、F4/80 (BM8)、CD49b (DX5)、CD3ε (145-2C11)、CD4 (RM4-5)、CD8a (53-6.7) 抗体は Biolegend より購入した。ヤギ IgG 抗体は Santa Cruz Biotechnology より購入した。抗 Dectin-2a 抗体は R&D Systems より購入した。抗体の非特異的な結合を阻害するため、抗 CD16/CD32 抗体存在下で 4°C にて 5 分間、細胞を反応させた後に細胞を染色した。Biotin 化抗体は Streptavidin-FITC (BD pharmingen) によって蛍光標識した。細胞と抗体との反応は 0.2% BSA と 0.2% sodium azide が入った PBS 中で、4°C にて 20 分間行った。サンプルは LSR Fortessa (BD Biosciences) によって解析し、データは FlowJo software (Tree Star) を用い

て処理した。セルソーティングは、東京大学医科学研究所 FACS コアにて FACS Aria (BD Biosciences) を使用して行った。

2-10. 肝臓実質細胞及び非実質細胞、クッパー細胞の単離

肝臓から回収した細胞を 50g にて 2 分間遠心し、沈殿物を肝実質細胞として単離した。上清はさらに 50g にて 2 回遠心することで実質細胞を除き、肝非実質細胞とした。得られた細胞を 0.83% NH₄Cl と Tris-HCl 20.6g/l (pH7.65) を 9 : 1 にて混合した溶液にて処置し、赤血球を溶解してからその後の解析に使用した。クッパー細胞は非実質細胞からセルソーティングにより単離した。

2-11. qRT-PCR 解析

添付のプロトコールに従い、NucleoSpin RNA II (MACHEREY NAGEL) を用いて細胞から total RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix (TAKARA) により cDNA を合成した。得られた cDNA を LightCycler 480 (Roche) により、SYBR Green PCR Master Mix (Roche Bioscience) を用いて増幅させ、qPCR 解析をした。各遺伝子の mRNA 発現量は *Gapdh* mRNA の発現量により標準化した。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

GFP forward primer : CTTCTTCAAGTCCGCCATGC

GFP reverse primer : GTGTCGCCCTCGAACTTCAC

Dectin-2 forward primer : TTCTTACTTCCTGGGTCTTTTCG

Dectin-2 reverse primer : AACACACCGCTCTTCTGGA

Gapdh forward primer : CTCATGACCACAGTCCATGC

Gapdh reverse primer : CACATTGGGGGTAGGAACAC

また、QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付のプロトコールに従い、マウスの糞から DNA を抽出し、qPCR 解析をした。各 DNA の量は糞の重量により標準化した。使用したプライマーの配列は以下の通りである。

16S rDNA forward primer : GGTGAATACGTTCCCGG

16S rDNA reverse primer : TACGGCTACCTTGTTACGACTT

ITS1-2 forward primer : CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA

ITS1-2 reverse primer : GCTGCGTTCTTCATCGATGC

2-12. 生体におけるマクロファージの除去

SL4細胞を播種する2日前と2日後に200 μ l のPlain Control Liposomes for Clophosome-N (TM) (Neutral) (FormuMax) またはClophosome-N (TM) - Clodronate Liposomes (Neutral) を、マウスに尾静脈播種した。

2-13. マウスからの腸内共生細菌、真菌の除去

抗細菌剤 (Ampicillin 1g/l、Neomycin 1g/l、Metronidazole 1g/l、Vancomycin 0.5g/l)、または抗真菌剤 (Fluconazole 0.25g/l、Amphotericin B 0.5g/l、Terbinafine 0.25 g/l) の入った飲み水をC57BL/6マウスを3週間投与した後、がん細胞播種の実験に用いた。腸内共生細菌、真菌の減少は糞中における16S rDNA、ITS1-2の相対量を定量することで確認した。がん細胞を播種したマウスを犠牲死させるまで、抗細菌剤及び抗真菌剤の投与を続けた。

2-14. 肝非実質細胞のがん細胞に対する細胞障害活性の測定

CellTrace CFSE Cell Proliferation Kit (Molecular Probes) にて標識した 1×10^5 個の SL4 細胞を 5×10^6 個の肝非実質細胞と共培養した。4 時間後に細胞を抗対と Propidium Iodide (PI; Invitrogen) にて染色し、CFSE⁺ 細胞における PI⁺ 細胞の割合を細胞の割合を測定した。肝非実質細胞と共培養時の PI⁺ 細胞の割合から、SL4 単独で培養した際の PI⁺ 細胞の割合を差し引くことで、肝非実質細胞の SL4 細胞に対する細胞障害を評価した。

2-15. 共焦点顕微鏡によるファゴサイトーシスの観察

1.5×10^6 個の肝非実質細胞を CFSE にて標識した 3×10^5 個の SL4 細胞と、cover slip 上にて 4 時間共培養した。上清を除き、4% Paraformaldehyde が入った PBS にて固定した後、Blocking Solution (Duolink) と 4°C にて一晩中反応させた。PBS にて洗浄した後、Biotin anti-mouse F4/80 (BM8; Biolegend)、Streptavidin-PE (BD Pharmingen)、Hoechst 33342 (Invitrogen) を用いて細胞を染色し、Fluoromount/Plus (Diagnostic Biosystems) にてマウントした。

2-16. クッパー細胞によるファゴサイトーシス活性の測定

1.5×10^6 個の肝非実質細胞を 3×10^5 個の非標識 SL4 細胞、または CFSE にて標識した 3×10^5 、 1×10^5 個の SL4 細胞と 4 時間共培養し、0.05% Trypsin で処

理後、フローサイトメトリーにて CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺ 細胞における CFSE⁺ 細胞の割合を測定した。

2-17. クッパー細胞における遺伝子発現プロファイルの解析

PBS、または 2×10^5 個の SL4 細胞を脾臓から播種した後、4 日後に肝臓からクッパー細胞を単離し、total RNA を抽出した。この RNA を用い、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) にて遺伝子発現プロファイルを調べた。

2-18. 統計解析

データはtwo-tailed, unpaired Student's *t* testまたはa Mann-Whitney testにより解析し、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

3. 結果

3-1. Dectin-2 依存的ながん肝転移の抑制

最近の我々の解析から、Dectin-1 が生体内における抗腫瘍免疫応答に大きく寄与することが示された¹⁷。Dectin-2 は下流のシグナル伝達経路や発現を誘導する遺伝子、及び真菌の排除に関わる点において、Dectin-1 と似た性質を持つことが示唆されている³⁸。そこで、Dectin-1 と似た機能をもつ Dectin-2 が、抗腫瘍免疫応答に寄与するか否か、Dectin-2 KO マウスを用いて検討した。

大腸癌や肺癌、胃癌、膵臓癌など、様々ながんで肝臓への転移が見られることが知られており、特に大腸癌においては、がん患者を死に至らしめる大きな要因の一つとして、長年臨床での重要性が指摘されてきた⁴³。そこで、がん細胞の脾臓播種による肝転移モデルを用いて、Dectin-2 が肝転移に対する宿主免疫応答に関わるかどうかについて検討した。SL4 細胞を播種し、14 日後に肝臓を観察した結果、Dectin-2 KO マウスでは WT マウスに比べ顕著に肝転移が増加しており、それに伴って肝臓の重量も上昇していた (図 7A, B)。さらに、肝組織切片を HE 染色すると、Dectin-2 KO マウスにおける肝臓に占める腫瘍領域の割合が、WT マウスに比べて約 10 倍増加していた (図 7C, D)。SL4 細胞以外のがん細胞の肝転移に関しても同様の制御が成されるか検討するため、3LL 及び B16F1、B16F10 細胞について同様に検討したところ、3LL 細胞の肝転移は WT と Dectin-2 KO マウスで差が認められなかったものの、B16F1、B16F10 細胞では Dectin-2 KO マウスにおいて顕著な肝転移の増加が見いだされた (図 8)。一方で、興味深いことに、B16F1、B16F10、3LL、SL4 細胞をマウスの皮下に播種し、時間経過ごとに腫瘍体積を測定すると、WT と Dectin-2 KO マウスで同程度の腫瘍増殖を示した (図 9)。さらに、尾静脈播種によりがん細胞を肺転移させた場合においても、Dectin-2 欠損における顕著な転移レベルの変化は見られなかった (図 10)。したがって、Dectin-2 はがん制御において、肝転移の抑制に選択的に寄与していることが示唆された。

これまでの報告より、脾臓播種後のがん細胞は、肝臓において約 24 時間までの間に半数が血管外へと浸潤し、約 4 日までの間に血管外における微小転移巣が形成されることが知られている^{50,51}。その後この微小転移巣が増殖を始め、巨大な転移コロニーへと成長していく。そこで、Dectin-2 による抗腫瘍免疫応答が肝転移過程のどの段階で起きているかを検討するため、GFP を発現させた SL4

細胞をマウスに播種し、24 時間、96 時間後に肝臓における GFP mRNA の相対量を測定した。その結果、96 時間後の時点で Dectin-2 KO マウスにおける GFP 発現量が WT マウスに比べ、約 10 倍増加することが明らかとなった (図 11)。この結果から、Dectin-2 は肝転移の早期の段階で機能し、微小転移巣が増殖するよりも前にがん細胞の排除に寄与していることが示唆された。

3-2. Dectin-2 依存的ながん肝転移の抑制におけるクッパー細胞の重要性

Dectin-2 依存的な抗腫瘍応答を担う細胞を同定するため、肝臓における Dectin-2 発現細胞を調べた。肝臓細胞をフローサイトメトリーにて解析した結果、免疫細胞のうち、主に樹状細胞にて構成される CD11b⁻CD11c⁺細胞や好中球などの細胞が含まれる CD11b⁺Gr1⁺細胞では明らかな Dectin-2 の発現は認められなかったが、CD11b⁺F4/80⁺細胞、すなわち肝臓常在マクロファージであるクッパー細胞が Dectin-2 を発現することを見いだした (図 12A)。NK 細胞、CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞についても顕著な Dectin-2 の発現は見られず、さらに非免疫細胞である CD45⁻細胞も Dectin-2 の強い発現を示さなかった (図 12B)。単離した肝実質細胞の Dectin-2 mRNA 発現も、クッパー細胞に対して非常に弱いことが判明した (図 12C)。また、SL4 を播種して 4 日後においても、Dectin-2 の発現はクッパー細胞でのみ認められた (図 13)。したがって、肝臓では主にクッパー細胞が Dectin-2 を発現していることが示唆された。

クッパー細胞は肝臓の血管壁に存在する細網内皮系のマクロファージとして同定された細胞である⁵²。このクッパー細胞が Dectin-2 を起点とした抗腫瘍応答における担当細胞であるか検証するため、マクロファージを生体内から除去する liposome clodronate にてマウスを処置した。Dectin-2 が抗腫瘍応答を引き起こす、肝転移の早期の段階にて liposome clodronate を投与した結果、WT マウスにおいて SL4 細胞の肝転移が増悪し、また WT マウスと Dectin-2 KO マウスにおける肝転移の差が認められなくなった (図 14A)。肝重量、及び肝臓に占める腫瘍領域の割合においても同様の結果を得た (図 14B-D)。以上より、クッパー細胞が抗腫瘍能を有しており、Dectin-2 による肝転移の抑制に中心の役割を果たすことが示唆された。

近年、腸内共生細菌と自然免疫受容体との相互作用が、リウマチ関節炎や肺のアレルギー性炎症など、腸管とは別の器官における病態の制御に深く関わることが明らかとなり⁵³、さらに遠隔組織における腫瘍の進展をも制御するこ

とが報告されている^{16,54}。細菌や真菌を認識する Dectin-2 は腸管でも発現が認められているため⁴²、Dectin-2 による肝転移抑制に腸内共生細菌、腸内共生真菌が関わっている可能性も考えられた。そこで抗細菌剤または抗真菌剤をマウスに飲ませ、SL4 を播種したところ、肝転移の顕著な増加は見られなかった (図 15A, B)。この時、マウスの糞中における 16S rDNA、ITS1-2 を定量することにより、それぞれ細菌、真菌の量が抗細菌剤、抗真菌剤を投与したマウスで顕著に減少することを確認した (図 15C, D)。以上より、Dectin-2 による肝転移の抑制に、腸内微生物は関与していない可能性が示された。この結果は、Dectin-2 による肝転移の抑制にはクッパー細胞が重要な役割を果たすことを支持するものである。

3-3. Dectin-2 によって亢進するクッパー細胞による SL4 細胞の貪食

クッパー細胞における Dectin-2 がどのように抗腫瘍応答に寄与しているのか明らかにするため、まず抗腫瘍応答に寄与するクッパー細胞の、肝臓構成細胞に占める割合や数が Dectin-2 によって制御されている可能性を検証した。肝臓から回収した細胞をフローサイトメトリーにて解析した結果、クッパー細胞の割合、及びクッパー細胞の数は Dectin-2 KO マウスにおいても有意な変化は見られなかった (図 16A, B)。したがって、Dectin-2 はクッパー細胞の肝臓構成細胞に占める割合や数ではなく、機能を制御することで抗腫瘍応答を引き起こしている可能性が考えられた。

前述のように、近年 CLR の一つである Dectin-1 が抗腫瘍免疫応答に寄与する自然免疫受容体として同定された¹⁷。一連の解析により、樹状細胞やマクロファージにおける Dectin-1 が NK 細胞を活性化し、がん細胞の殺傷を亢進することが示された。そこで、Dectin-1 と似た機能をもつと考えられている Dectin-2 が、これと同様に免疫細胞によるがん細胞の殺傷に寄与するのかどうか検討を行った。WT 及び Dectin-2 KO マウスから回収した肝非実質細胞を CFSE にて標識した SL4 細胞と共培養し、CD45⁻CFSE⁺細胞における PI⁺細胞の割合を測定することで、がん細胞に対する細胞障害活性を評価した。その結果、Dectin-2 を欠損した非実質細胞は WT マウス由来の細胞と同程度の細胞障害活性を示した (図 17A, B)。したがって Dectin-2 は免疫細胞によるがん細胞の殺傷とは異なる機構を利用し、抗腫瘍応答を引き起こしていることが示唆された。

これまでの報告において、クッパー細胞は肺泡マクロファージや腹腔マクロファージといった他の組織常在マクロファージに比べ高いファゴサイトー

シス活性を持っており⁵⁵、さらに真菌感染において、Dectin-2 の活性化はマクロファージによるファゴサイトーシスを誘導することが知られている⁵⁶。そこで、Dectin-2 を起点とした抗腫瘍応答にはクッパー細胞によるがん細胞の貪食が関わっているのではないかと考えた。この仮説を検証するため、肝臓の非実質細胞と CFSE 標識した SL4 細胞を共培養し、共焦点顕微鏡にて観察したところ、確かにクッパー細胞により SL4 細胞が取り込まれていることが判明した(図 18A)。このようながん細胞の貪食における Dectin-2 の役割を明らかにするため、Dectin-2 KO マウス由来の肝非実質細胞を用いて SL4 細胞との共培養を行うと、WT マウス由来の細胞に比べ、クッパー細胞における CFSE⁺細胞の割合が有意に低下した(図 18B)。したがって、クッパー細胞は Dectin-2 依存的に SL4 細胞を貪食することが示された。以上より、Dectin-2 がクッパー細胞のがん細胞に対するファゴサイトーシスを誘導することで、がん肝転移を抑制していることが示唆された。

4. 考察

本研究により、Dectin-2 は皮下腫瘍の増殖や肺転移の制御には関与しないにも関わらず、肝転移に対する抗腫瘍応答に選択的に寄与することが示された。そしてそのようながん排除のメカニズムについて解析した結果、肝臓において主にクッパー細胞が Dectin-2 を発現しており、Dectin-2 依存的な抗腫瘍応答の中心を担っていることが判明し、さらに Dectin-2 がクッパー細胞によるがん細胞の貪食を亢進することでがんの排除に寄与することが示唆された。

肝転移の抑制においてどのようなリガンドが Dectin-2 を活性化しているのか特定することは、Dectin-2 依存的な抗腫瘍応答を理解するうえで非常に重要な今後の課題である。いくつかのがん細胞が通常の細胞に比べ多くの高マンノース型糖鎖を持つことが報告されていることから⁵⁷、一つの可能性として、がん細胞由来の分子が Dectin-2 を活性化していることが考えられる。皮下腫瘍に浸潤している細胞や肺に常在している細胞が Dectin-2 を発現していることが判明したため (図 19)、その場合、皮下腫瘍や肺における Dectin-2 発現細胞はがん細胞上のリガンドに応答できないと考えられる。クッパー細胞のみ、そのようなリガンドに応答でき、がん細胞の排除を行っているのかもしれない。一方、別の可能性として、Dectin-2 はがん細胞由来の分子を認識していないことも考えられる。すなわち、Dectin-2 は肝臓に選択的に発現する分子により活性化され、肝転移の抑制に寄与している可能性がある。実際にマンノース残基を認識することが知られている ConA レクチンが、類洞内皮細胞やクッパー細胞に結合することが報告されていることから⁵⁸、Dectin-2 もそれらの細胞を認識するかもしれない。その場合、定常的に Dectin-2 が活性化されることでクッパー細胞のファゴサイトーシス活性が高められており、がん細胞の排除に寄与していることが予想される。実際、WT 及び Dectin-2 KO マウス由来のクッパー細胞の mRNA 発現をマイクロアレイにて比較した結果、エンドサイトーシスを亢進する Nme1 の発現が、Dectin-2 の欠損により約 8 倍減少していた (図 20)。定常的に起こる Dectin-2 依存的な Nme1 の発現上昇が、クッパー細胞によるファゴサイトーシス活性を上昇させている可能性がある。

Dectin-2 下流においてどのようなシグナル応答が肝転移の抑制に重要であるかは定かではない。これまでに、Dectin-2 は FcR γ 鎖と会合しており、リガンド刺激により CARD9 を介した NF- κ B の活性化する他、NLRP3 経路などを動

かすことが知られている¹⁸。しかしながら、FcR γ 鎖は皮膚の発癌モデルにおいて腫瘍の増殖を亢進することや⁵⁹、宿主の CARD9 はまさに SL4 細胞の肝転移を増加させることが報告されている⁶⁰。免疫細胞における NLRP3 は肝転移を抑えるが¹²、NK 細胞を介したがん細胞の排除を誘導するため、Dectin-2 が SL4 細胞に対する肝非実質細胞の細胞障害に関与しないことを考えると（図 16）、本研究にて明らかにした肝転移抑制機構とは別の経路として働いていると考えられる。NFAT も、免疫細胞において腫瘍亢進の機能を誘導することが示唆されており⁶¹、Dectin-2 による抗腫瘍応答の一員として機能する可能性は低いと予想される。他の受容体によって活性化されるこれらのシグナル分子の影響を考慮することは必要であるが、以上の知見より、肝転移の抑制を引き起こす Dectin-2 シグナルはこれまでに報告のない全く新しいものであるか、もしくは Dectin-2 は何のシグナル経路も活性化させずにがん細胞の排除を行っている、という可能性も排除することはできない。今後、これらの仮説について検証する必要があると考えている。

クッパー細胞による貪食が直接がん細胞の排除に重要であるかについては、今後精査する必要がある。通常、細胞は CD47 の発現や、膜タンパクに付加されている糖鎖の末端部位におけるシアル酸により、マクロファージに don't-eat-me シグナルを送り、貪食から免れている⁶²。しかし、細胞がストレスを受けると、Phosphatidylserine や Calreticulin を細胞膜表面に暴露し、貪食細胞に eat-me シグナルを送ることでファゴサイトーシスの標的となる。元来、ファゴサイトーシスは死細胞の排除に重要であることが報告されてきたが、近年、生細胞をも貪食細胞により取り除かれることが明らかとなってきた⁶³。したがって、クッパー細胞が生きたがん細胞を貪食することで、直接肝転移の抑制に貢献している可能性は十分考えられる。一方、死細胞となったがん細胞がクッパー細胞によって取り込まれ、何らかの応答を引き起こすことで生きたがん細胞への抗腫瘍応答を誘導する、といった2次的ながん排除機構も考えられる。いずれにしても、がん細胞の存在下にて、クッパー細胞で Dectin-2 依存的に発現が変化する遺伝子を解析するなどして、間接的な抗腫瘍応答の可能性についても検討していきたい。

Dectin-2 を起点としたがん進展の抑制を臨床応用へと発展させるにあたり、注目すべきは、肝転移は Dectin-2 によって抑制されるにも関わらず、皮下腫瘍の増殖と肺転移はそのような制御を受けないことである（図 1-3）。この結

果より、Dectin-2 が誘導する抗腫瘍応答には組織選択性があることが示された。今後そのような組織選択性の機構を解明することで、他の組織への副作用を抑えた、新たな創薬ターゲットや肝転移治療法の開発が期待される。

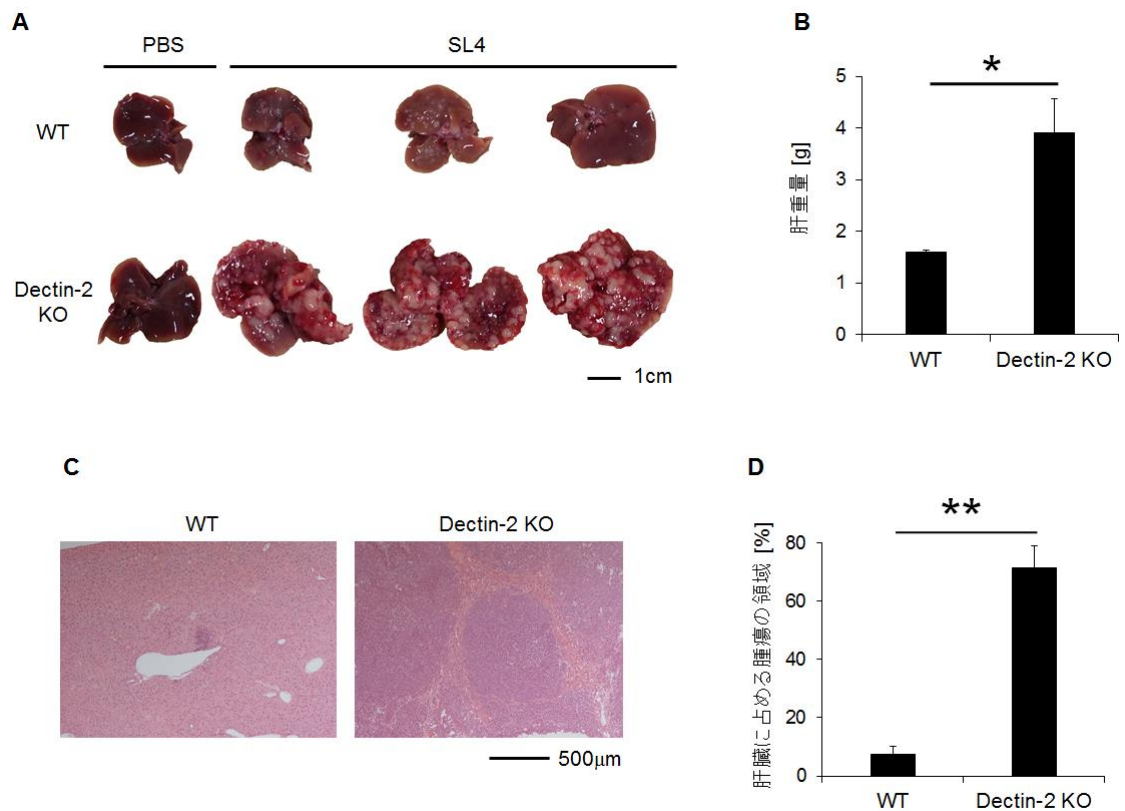


図7 Dectin-2によるSL4細胞の肝転移の抑制

2×10^5 個のSL4細胞をWT及びDectin-2 KOマウスの脾臓に播種し、14日後に肝転移の度合いを評価した。(A) 肝臓の巨視像。(B) 肝臓の重量。データは平均値 \pm SEMを示している。* $p < 0.05$ 。(C) 肝臓切片のHE染色像。(D) HE染色により測定した、肝臓に占める腫瘍領域の割合。データは平均値 \pm SEMを示している。** $p < 0.01$ 。

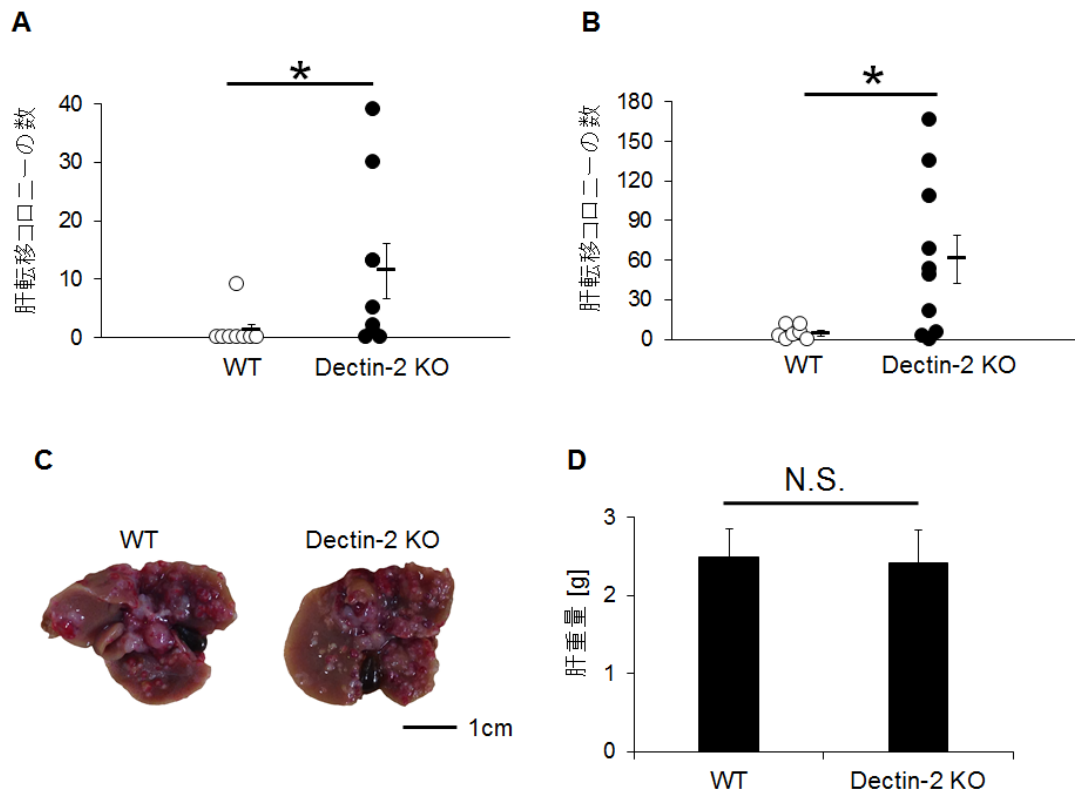


図8 様々ながん細胞による肝転移の抑制における Dectin-2 の寄与

(A and B) 1×10^6 個の B16F1 細胞 (A) または 5×10^5 個の B16F10 細胞 (B) を WT 及び Dectin-2 KO マウスに尾静脈播種し、14 日後に肝臓における転移コロニーの数を計測した。黒線は平均値を示し、SEM と共に記載している。* $p < 0.05$ 。(C and D) 3×10^5 個の 3LL 細胞を WT 及び Dectin-2 KO マウスの脾臓に播種し、14 日後に肝転移の度合いを評価した。(C) 肝臓の巨視像。(D) 肝臓の重量。データは平均値 \pm SEM を示している。N.S., not significant.

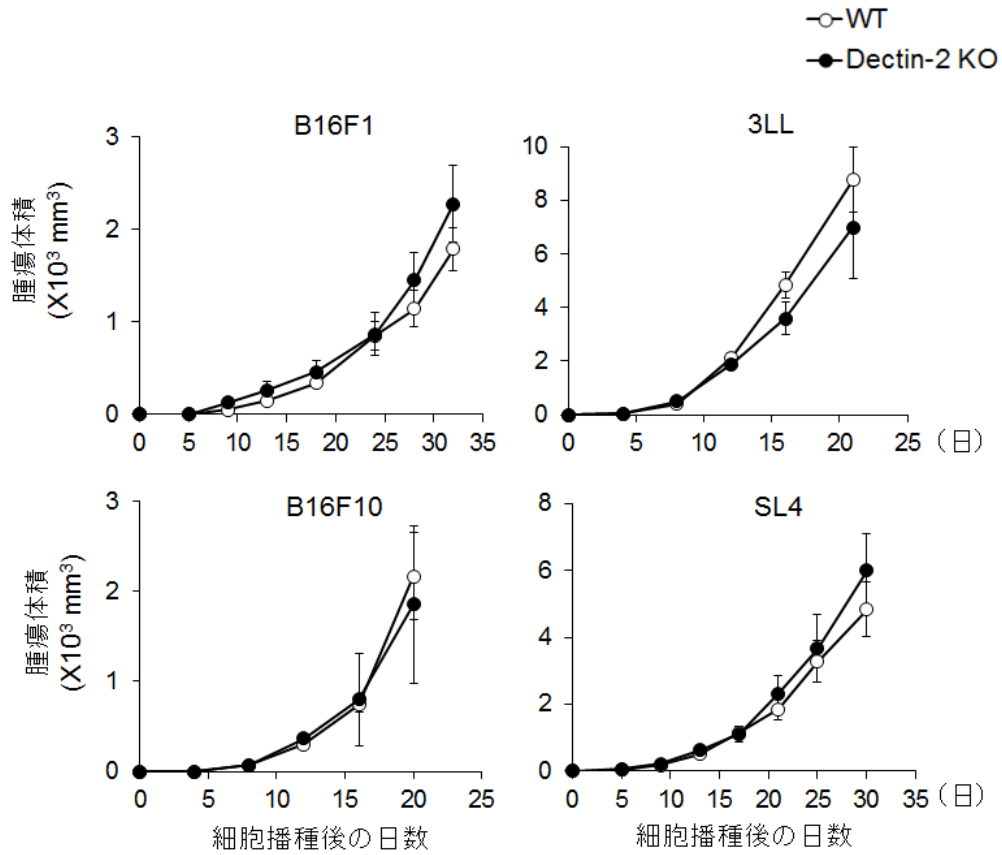


図9 皮下における腫瘍増殖に果たす Dectin-2 の役割

5×10^5 個の B16F1 細胞、 1×10^5 個の B16F10 細胞、 5×10^5 個の 3LL 細胞、 2×10^5 個の SL4 細胞のいずれかを WT 及び Dectin-2 KO マウスの皮下に播種し、形成される腫瘍の体積を経時的に測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。

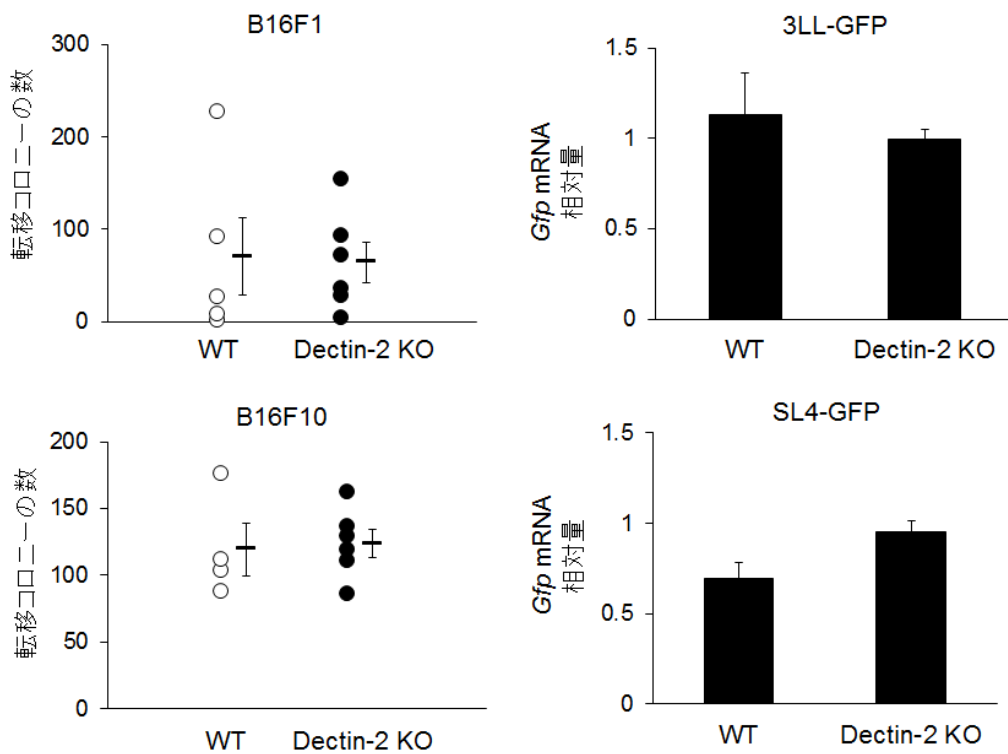


図 10 肺転移の制御における Dectin-2 の役割

1×10^6 個の B16F1 細胞、 5×10^5 個の B16F10 細胞、 1×10^6 個の 3LL-GFP 細胞、 3×10^5 個の SL4-GFP 細胞のいずれかを WT 及び Dectin-2 KO マウスに尾静脈播種した。B16F1 細胞、B16F10 細胞を播種したマウスは 14 日後に肺の転移コロニー数を計測した。黒線は平均値を示し、 \pm SEM と共に記載している。3LL-GFP 細胞、SL4-GFP 細胞を播種したマウスは 12 日後に肺における *Gfp* mRNA の相対量を測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。

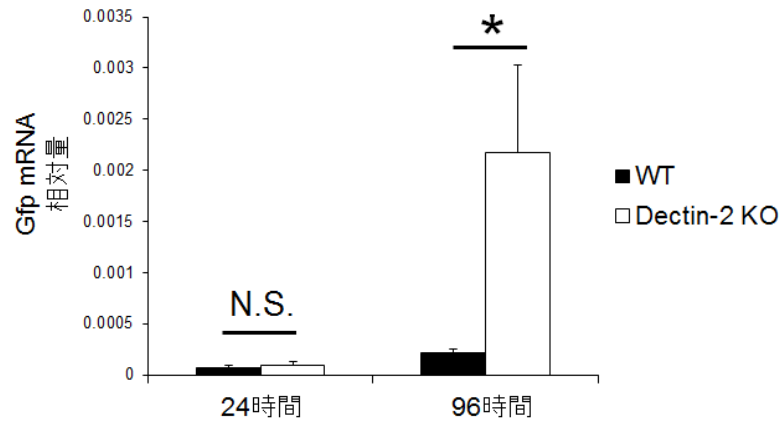


図 11 肝転移早期の Dectin-2 依存的な抗腫瘍応答

2×10^5 個の SL4-GFP 細胞を WT 及び Dectin-2 KO マウスの脾臓に播種し、24、96 時間後に肝臓における *Gfp* mRNA の相対量を測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。N.S., not significant。* $p < 0.05$ 。

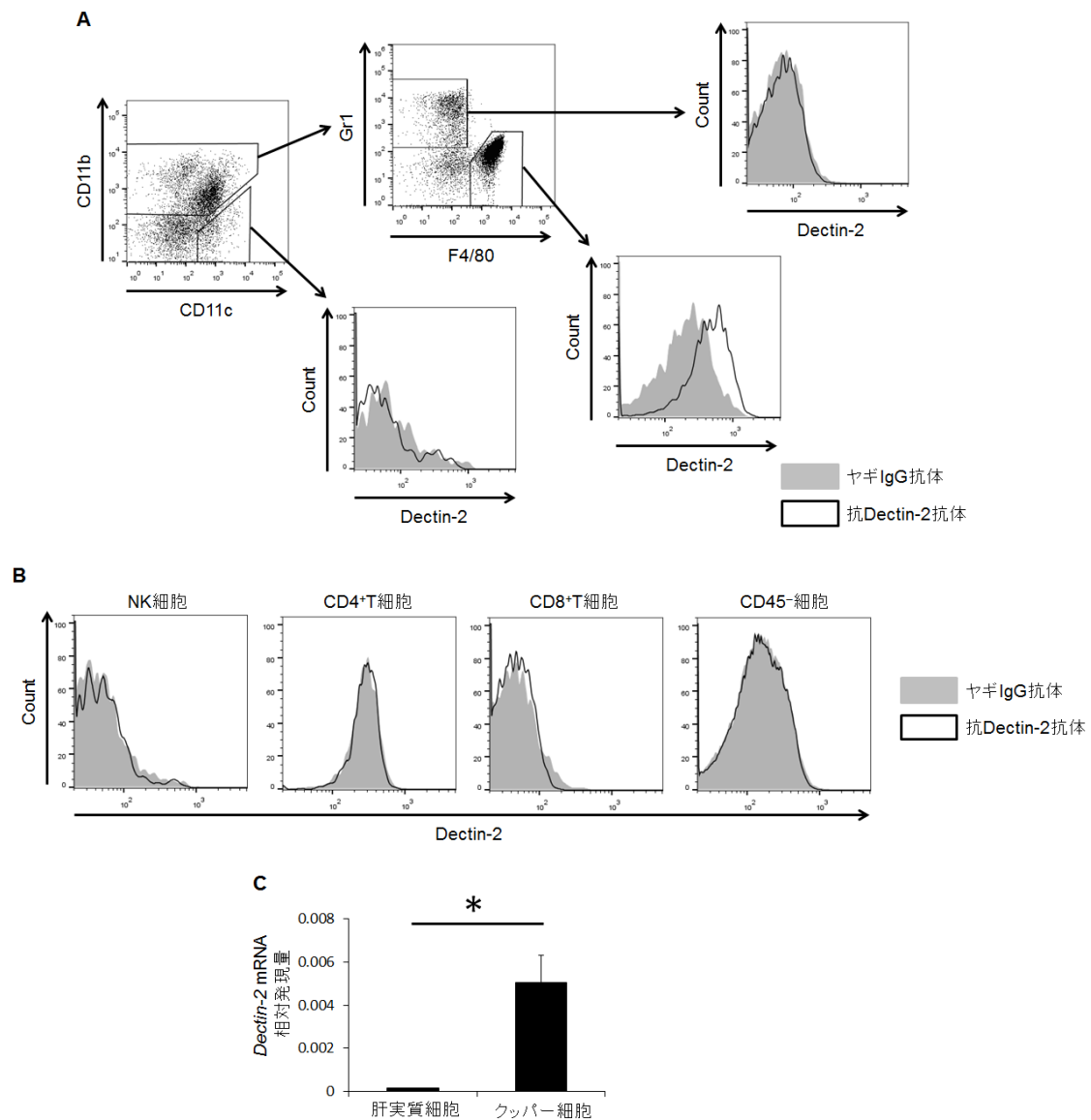


図 12 クッパー細胞による Dectin-2 の発現

(A and B) WT マウスの肝臓から細胞を回収し、様々な細胞種における Dectin-2 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。(A) CD45⁺ 細胞にゲートをかかけたプロットを示している。(B) NK 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁻DX5⁺ 細胞)、CD4⁺T 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺DX5⁻CD4⁺ 細胞)、CD8⁺T 細胞 (CD45⁺CD3 ϵ ⁺DX5⁻CD8⁺ 細胞)、CD45⁻ 細胞にゲートをかかけたヒストグラムを示している。(C) WT マウスの肝臓から実質細胞とクッパー細胞を単離し、Dectin-2 の mRNA 発現量を測定した。データは平均値 \pm SEM を示している。* p < 0.05。

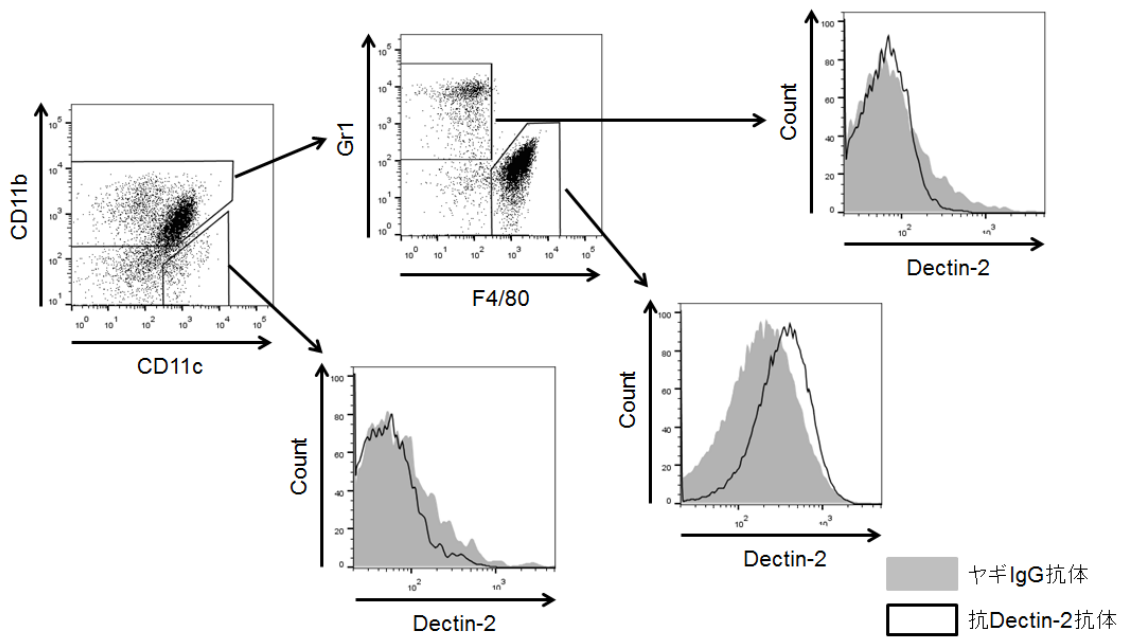


図 13 SL4 細胞播種後の肝臓構成細胞における Dectin-2 の発現

WT マウスに 2×10^5 個の SL4 細胞を脾臓播種し、4 日後に肝臓構成細胞における Dectin-2 の発現をフローサイトメトリーにて解析した。CD45⁺ 細胞にゲートをかかけたプロットを示している。

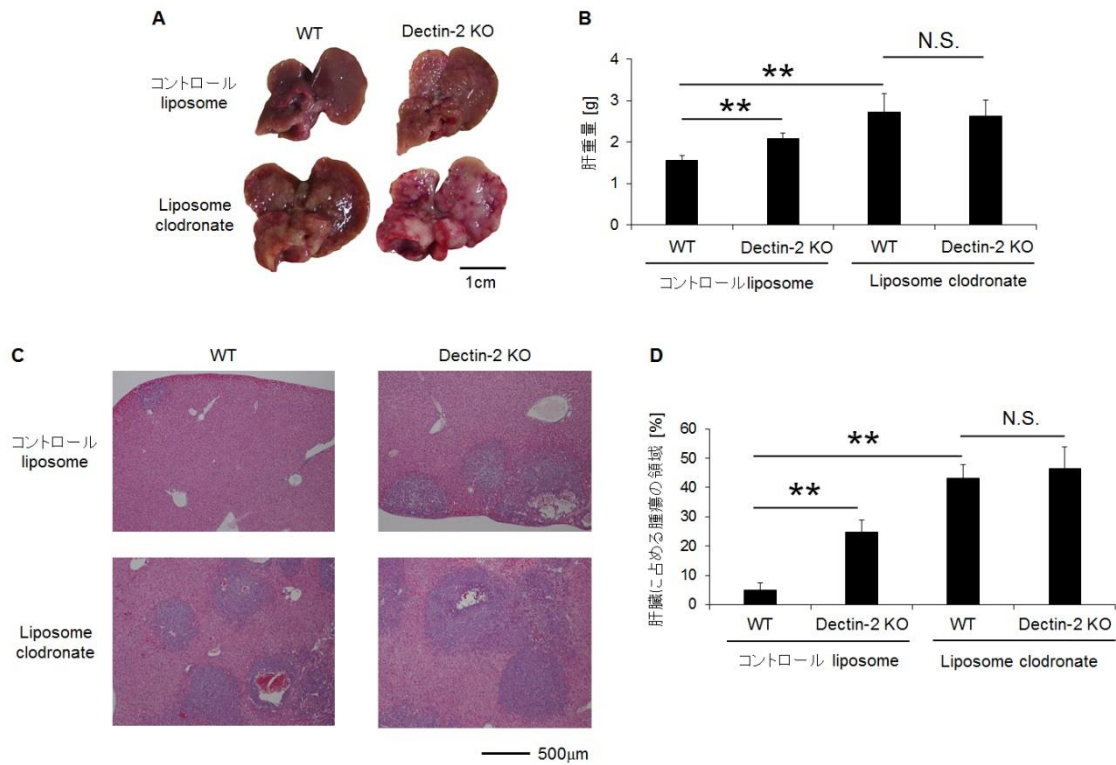


図 14 Dectin-2 依存的な肝転移抑制におけるクッパー細胞の重要性
 WT 及び Dectin-2 KO マウスに、 2×10^5 個の SL4 細胞を脾臓播種する 2 日前と 2 日後にコントロール liposome または Liposome clodronate を投与した。がん細胞を播種してから 10 日目の肝転移を評価した。(A) 肝臓の巨視像。(B) 肝臓の重量。データは平均値 \pm SEM を示している。** $p < 0.01$ 。(C) 肝臓切片の HE 染色像。(D) HE 染色により測定した、肝臓に占める腫瘍領域の割合。データは平均値 \pm SEM を示している。** $p < 0.01$ 。N.S., not significant。

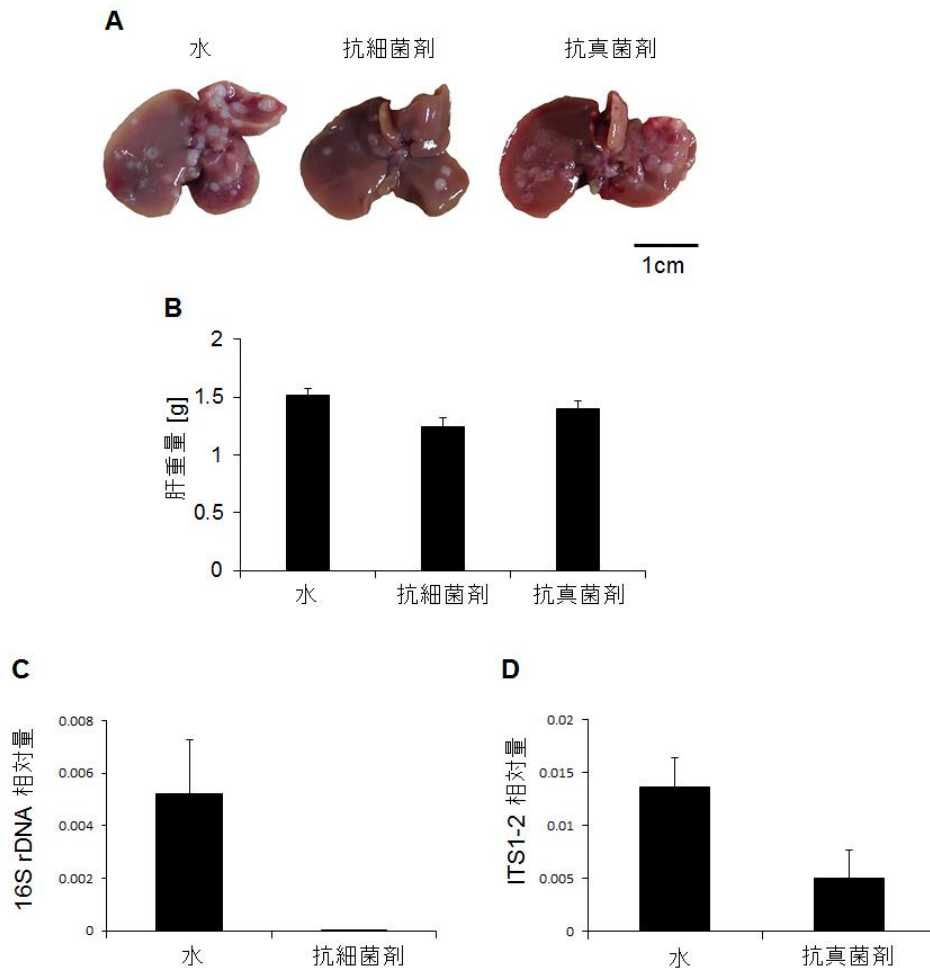


図 15 SL4 細胞の肝転移における腸内共生細菌・真菌の役割

水のみ、あるいは、抗細菌剤（Ampicillin, neomycin, metronidazole, vancomycin）または抗真菌剤（Fluconazole, amphotericin B, terbinafine）入りの飲水のいずれかを WT マウスに投与した。3 週間後、 2×10^5 個の SL4 細胞を脾臓播種し、薬剤処置を続けたまま 14 日目に肝転移、及び糞中における細菌・真菌の量を評価した。(A) 肝臓の巨視像。(B) 肝臓の重量。データは平均値 \pm SEM を示している。

(C and D) 糞中における 16S rDNA (C) と ITS1-2 (D) の、糞重量にて標準化した相対量。データは平均値 \pm SEM を示している。

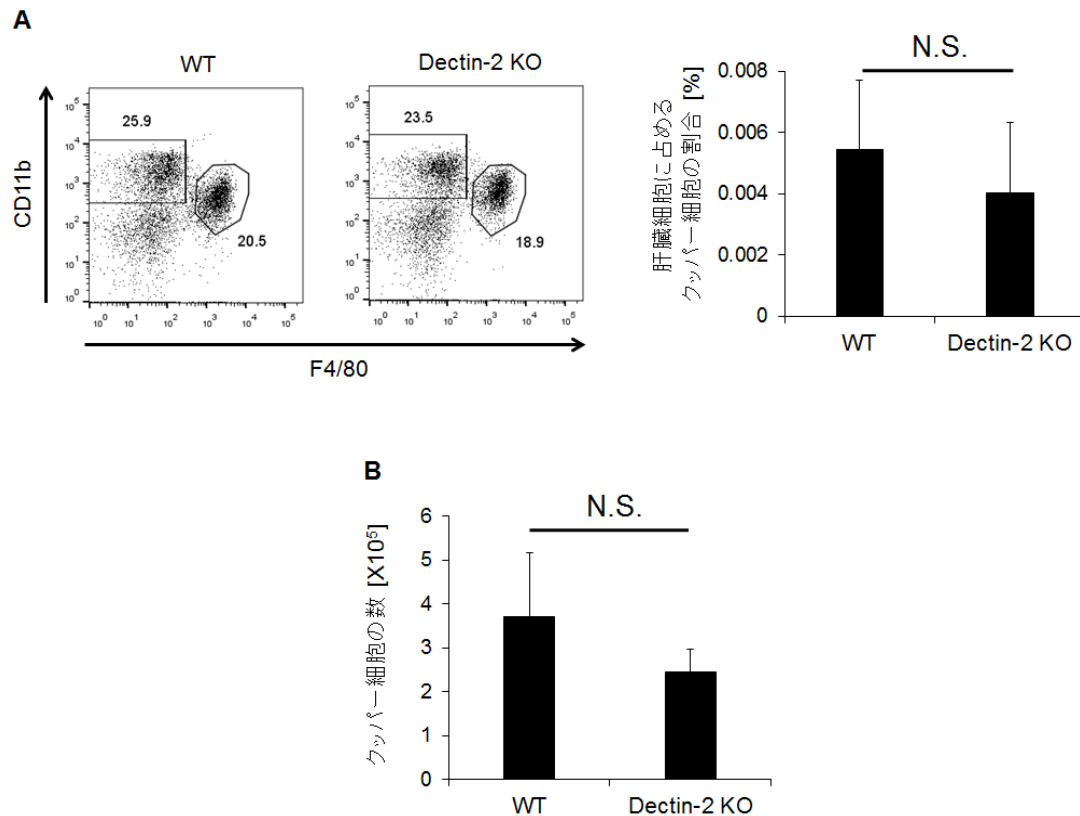


図 16 肝臓構成細胞に占めるクッパー細胞の割合及び数の制御における Dectin-2 の役割

WT 及び Dectin-2 KO マウスの肝臓から細胞を回収し、クッパー細胞の割合をフローサイトメトリーにて解析した。(A) 左は $CD45^+$ 細胞にゲートをかけたプロットを示している。右は肝臓構成細胞に占めるクッパー細胞の割合を平均値 \pm SEM にて示している。N.S., not significant。(B) 肝臓におけるクッパー細胞の数を平均値 \pm SEM にて示している。N.S., not significant。

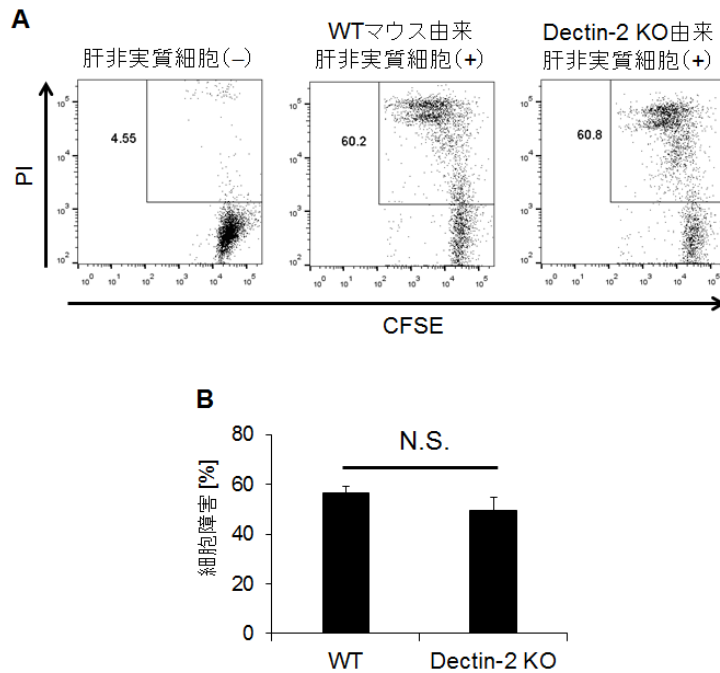


図 17 肝臓非実質細胞による Dectin-2 非依存的な SL4 細胞の細胞障害
 WT または Dectin-2 KO マウスから回収した 5×10^6 個の肝非実質細胞を、CFSE
 で標識した 1×10^5 個の SL4 細胞と共培養した。4 時間後に細胞をフローサイト
 メトリーにて解析し、SL4 細胞における死細胞の割合を測定した。(A)
 CD45-CFSE⁺ 細胞にゲートをかけたプロットを示している。(B) 肝非実質細胞と
 共培養時の CD45-CFSE⁺ 細胞における PI⁺ 細胞の割合から、SL4 単独で培養し
 た際の CD45-CFSE⁺ 細胞における PI⁺ 細胞の割合を差し引くことで、肝非実質
 細胞の SL4 細胞に対する細胞障害を評価した。データは平均値 \pm SEM を示し
 ている。N.S., not significant。

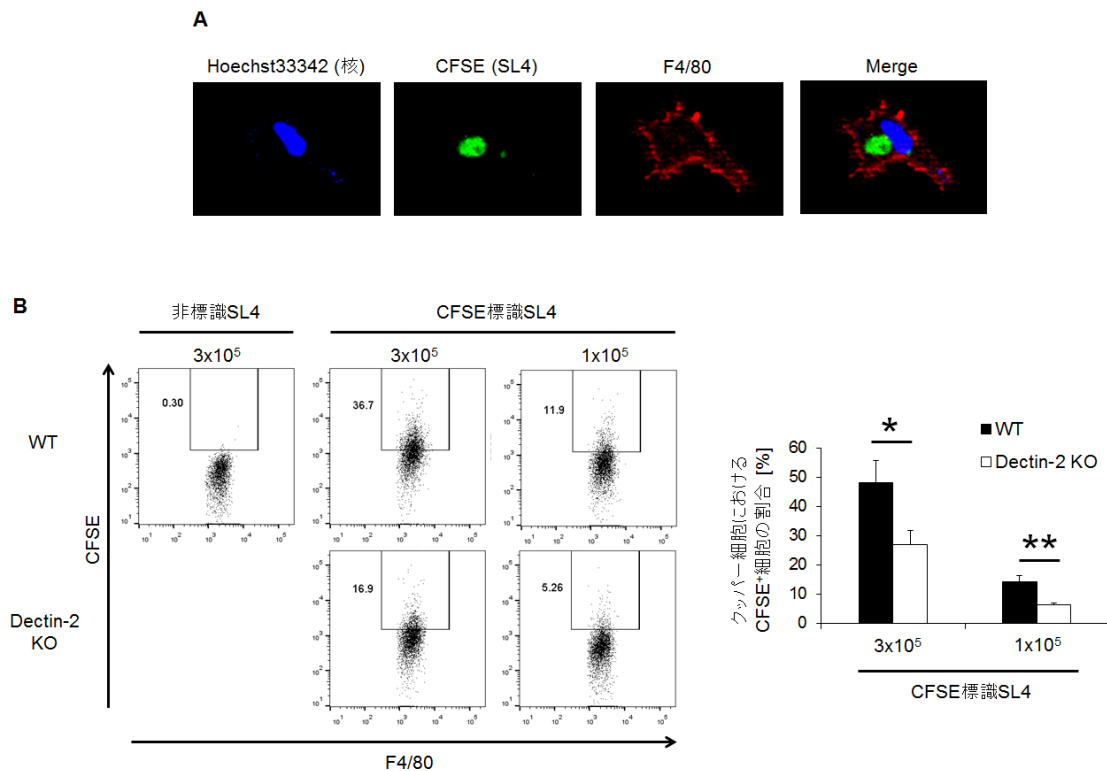


図 18 クッパー細胞による Dectin-2 依存的な SL4 細胞の貪食

(A) WT または Dectin-2 KO マウス由来の 1.5×10^6 個の肝非実質細胞を、 3×10^5 個の CFSE 標識 SL4 細胞と共に、カバーガラス上にて培養した。4 時間後にカバーガラスを回収し、染色した後共焦点顕微鏡にて観察した。(B) WT または Dectin-2 KO マウスから回収した 1.5×10^6 個の肝非実質細胞を、 3×10^5 個の非標識 SL4 細胞、または 3×10^5 、 1×10^5 個の CFSE 標識 SL4 細胞と共培養した。4 時間後にクッパー細胞による SL4 細胞の取り込みをフローサイトメトリーにて解析した。左は $CD45^+CD11b^+F4/80^+$ 細胞にゲートをかけたプロットを示している。右は左図における CFSE⁺ 細胞の割合を平均値 \pm SEM にて示している。* $p < 0.05$ 。** $p < 0.01$ 。

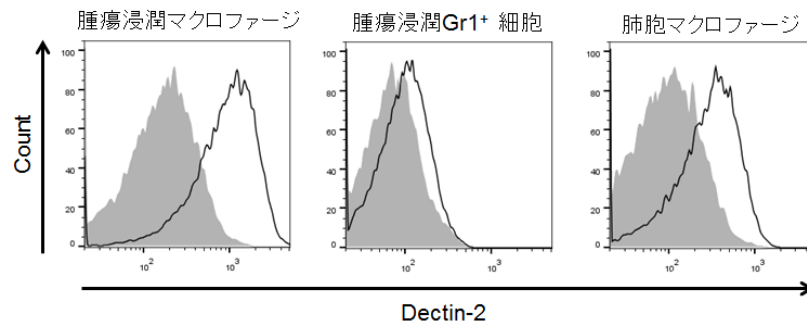


図 19 皮下腫瘍及び肺における Dectin-2 の発現

2×10^5 個の SL4 細胞を WT マウスに皮下播種して 19 日目の腫瘍、またはがん細胞を播種していない WT マウスの肺から細胞を回収し、フローサイトメトリーにて Dectin-2 の発現を解析した。左は腫瘍浸潤細胞のうちマクロファージ ($CD45^+CD11b^+F4/80^+$ 細胞)、中央は腫瘍浸潤細胞のうち Gr1⁺ 細胞 ($CD45^+Gr1^+$ 細胞)、右は肺の構成細胞のうち肺胞マクロファージ ($CD45^+CD11c^+F4/80^+$ 細胞) にゲートをかけたヒストグラムを示している。

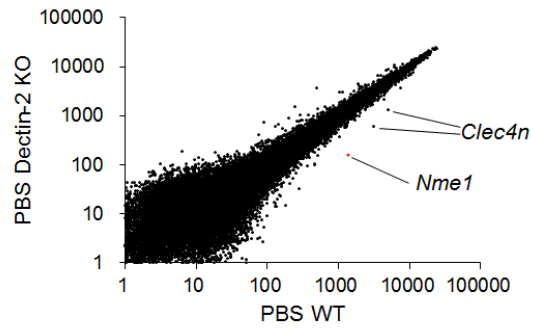


図 20 クッパー細胞において Dectin-2 依存的な制御を受ける遺伝子の発現プロファイル

WT 及び Dectin-2 KO マウスの脾臓に PBS を投与してから 4 日後に肝臓からクッパー細胞を単離し、遺伝子発現をマイクロアレイにて解析した。軸の値はプローブによって検出された RNA のシグナル強度を示している。

第3部 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご助力と適切な指導を賜りました、研究委託先である東京大学生産技術研究所、炎症・免疫制御学社会連携研究部門の谷口維紹特任教授、柳井秀元特任准教授、根岸英雄特任助教、西尾純子特任助教、生島弘彬特任助教に深く感謝します。試薬の管理やマウスの維持に多大なご協力をいただいた同研究室の技術補佐員である菅原愛美さんにも深く感謝します。

また、Dectin-2 KO マウスをご供与いただきました東京理科大学生命医科学研究所、実験動物学研究部門の岩倉洋一郎教授、千葉大学真菌研究センター、感染免疫分野の西城忍准教授に深く感謝いたします。

最後に、東京大学生産技術研究所、炎症・免疫制御学社会連携研究部門への研究委託をご了承いただいた、指導教員である東京大学大学院薬学系研究科、分子生物学教室の後藤由季子教授にも深く感謝申し上げます。

第 4 部 参考文献

- 1 Banchereau, J. & Steinman, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252, doi:10.1038/32588 (1998).
- 2 Lanier, L. L. Evolutionary struggles between NK cells and viruses. *Nat Rev Immunol* **8**, 259-268, doi:10.1038/nri2276 (2008).
- 3 Torrado, E., Robinson, R. T. & Cooper, A. M. Cellular response to mycobacteria: balancing protection and pathology. *Trends Immunol* **32**, 66-72, doi:10.1016/j.it.2010.12.001 (2011).
- 4 Netea, M. G. & van der Meer, J. W. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *The New England journal of medicine* **364**, 60-70, doi:10.1056/NEJMra1001976 (2011).
- 5 Trinchieri, G. & Sher, A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* **7**, 179-190, doi:10.1038/nri2038 (2007).
- 6 Chen, G. Y. & Nunez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* **10**, 826-837, doi:10.1038/nri2873 (2010).
- 7 Kono, H. & Rock, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**, 279-289, doi:10.1038/nri2215 (2008).
- 8 Jounai, N., Kobiyama, K., Takeshita, F. & Ishii, K. J. Recognition of damage-associated molecular patterns related to nucleic acids during inflammation and vaccination. *Front Cell Infect Microbiol* **2**, 168, doi:10.3389/fcimb.2012.00168 (2012).
- 9 Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* **29**, 235-271, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324 (2011).
- 10 Allen, I. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *Journal of Experimental Medicine* **207**, 1045-1056, doi:10.1084/jem.20100050 (2010).
- 11 Philpott, D. J., Sorbara, M. T., Robertson, S. J., Croitoru, K. & Girardin, S. E. NOD proteins: regulators of inflammation in health and disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 9-23, doi:10.1038/nri3565 (2014).

- 12 Dupaul-Chicoine, J. *et al.* The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. *Immunity* **43**, 751-763, doi:10.1016/j.immuni.2015.08.013 (2015).
- 13 Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* **13**, 1050-1059, doi:10.1038/nm1622 (2007).
- 14 Deng, L. *et al.* STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity* **41**, 843-852, doi:10.1016/j.immuni.2014.10.019 (2014).
- 15 Kim, S. *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature* **457**, 102-106, doi:10.1038/nature07623 (2009).
- 16 Rutkowski, M. R. *et al.* Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell* **27**, 27-40, doi:10.1016/j.ccell.2014.11.009 (2015).
- 17 Chiba, S. *et al.* Recognition of tumor cells by Dectin-1 orchestrates innate immune cells for anti-tumor responses. *Elife* **3**, e04177, doi:10.7554/eLife.04177 (2014).
- 18 Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annu Rev Immunol* **30**, 491-529, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101352 (2012).
- 19 Gregersen, P. K. & Behrens, T. W. Genetics of autoimmune diseases--disorders of immune homeostasis. *Nat Rev Genet* **7**, 917-928, doi:10.1038/nrg1944 (2006).
- 20 Li, G., Liang, X. & Lotze, M. T. HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells. *Front Immunol* **4**, 68, doi:10.3389/fimmu.2013.00068 (2013).
- 21 Fuster, M. M. & Esko, J. D. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**, 526-542, doi:10.1038/nrc1649 (2005).
- 22 Stowell, S. R., Ju, T. & Cummings, R. D. Protein glycosylation in cancer. *Annu Rev Pathol* **10**, 473-510, doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040438 (2015).
- 23 Abbott, K. L. *et al.* Focused glycomic analysis of the N-linked glycan biosynthetic pathway in ovarian cancer. *Proteomics* **8**, 3210-3220, doi:10.1002/pmic.200800157 (2008).

- 24 Potapenko, I. O. *et al.* Glycan gene expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. *Mol Oncol* **4**, 98-118, doi:10.1016/j.molonc.2009.12.001 (2010).
- 25 Dube, D. H. & Bertozzi, C. R. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 477-488, doi:10.1038/nrd1751 (2005).
- 26 Pinho, S. S. *et al.* Gastric cancer: adding glycosylation to the equation. *Trends Mol Med* **19**, 664-676, doi:10.1016/j.molmed.2013.07.003 (2013).
- 27 Becker, D. J. & Lowe, J. B. Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* **13**, 41r-53r, doi:10.1093/glycob/cwg054 (2003).
- 28 Mare, L. & Trinchera, M. Suppression of β 1,3galactosyltransferase β 3Gal-T5 in cancer cells reduces sialyl-Lewis a and enhances poly N-acetyllactosamines and sialyl-Lewis x on O-glycans. *European Journal of Biochemistry* **271**, 186-194, doi:10.1046/j.1432-1033.2003.03919.x (2003).
- 29 Sperandio, M., Gleissner, C. A. & Ley, K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological reviews* **230**, 97-113, doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x (2009).
- 30 Hauselmann, I. & Borsig, L. Altered tumor-cell glycosylation promotes metastasis. *Front Oncol* **4**, 28, doi:10.3389/fonc.2014.00028 (2014).
- 31 Mondal, N. *et al.* ST3Gal-4 is the primary sialyltransferase regulating the synthesis of E-, P-, and L-selectin ligands on human myeloid leukocytes. *Blood* **125**, 687-696, doi:10.1182/blood-2014-07-588590 (2015).
- 32 Pinho, S. S. & Reis, C. A. Glycosylation in cancer: mechanisms and clinical implications. *Nat Rev Cancer* **15**, 540-555, doi:10.1038/nrc3982 (2015).
- 33 Huang, H. *et al.* Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**, 4357-4364, doi:10.1158/1078-0432.ccr-04-2107 (2005).
- 34 Ishimoto, T. *et al.* CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* **19**, 387-400, doi:10.1016/j.ccr.2011.01.038 (2011).
- 35 Yousef, S. *et al.* Immunomodulatory molecule PD-L1 is expressed on malignant plasma cells and myeloma-propagating pre-plasma cells in the bone marrow of

- multiple myeloma patients. *Blood Cancer J* **5**, e285, doi:10.1038/bcj.2015.7 (2015).
- 36 Chen, L., Sundback, J., Olofsson, S. & Jondal, M. Interference with O-glycosylation in RMA lymphoma cells leads to a reduced in vivo growth of the tumor. *Int J Cancer* **119**, 1495-1500, doi:10.1002/ijc.21981 (2006).
- 37 Ariizumi, K. *et al.* Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *The Journal of biological chemistry* **275**, 11957-11963 (2000).
- 38 Drummond, R. A., Saijo, S., Iwakura, Y. & Brown, G. D. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. *Eur J Immunol* **41**, 276-281, doi:10.1002/eji.201041252 (2011).
- 39 Barrett, N. A. *et al.* Dectin-2 mediates Th2 immunity through the generation of cysteinyl leukotrienes. *The Journal of experimental medicine* **208**, 593-604, doi:10.1084/jem.20100793 (2011).
- 40 McGreal, E. P. *et al.* The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* **16**, 422-430, doi:10.1093/glycob/cwj077 (2006).
- 41 Saijo, S. *et al.* Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*. *Immunity* **32**, 681-691, doi:10.1016/j.immuni.2010.05.001 (2010).
- 42 Taylor, P. R. *et al.* Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo. *Eur J Immunol* **35**, 2163-2174, doi:10.1002/eji.200425785 (2005).
- 43 Valastyan, S. & Weinberg, R. A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell* **147**, 275-292, doi:10.1016/j.cell.2011.09.024 (2011).
- 44 Tsikitis, V. L., Larson, D. W., Huebner, M., Lohse, C. M. & Thompson, P. A. Predictors of recurrence free survival for patients with stage II and III colon cancer. *BMC cancer* **14**, 336, doi:10.1186/1471-2407-14-336 (2014).
- 45 Manfredi, S. *et al.* Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Annals of surgery* **244**, 254-259, doi:10.1097/01.sla.0000217629.94941.cf (2006).
- 46 Seki, S., Nakashima, H., Nakashima, M. & Kinoshita, M. Antitumor immunity

- produced by the liver Kupffer cells, NK cells, NKT cells, and CD8 CD122 T cells. *Clin Dev Immunol* **2011**, 868345, doi:10.1155/2011/868345 (2011).
- 47 Van den Eynden, G. G. *et al.* The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res* **73**, 2031-2043, doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3931 (2013).
- 48 Wen, S. W., Ager, E. I. & Christophi, C. Bimodal role of Kupffer cells during colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Biology & Therapy* **14**, 606-613, doi:10.4161/cbt.24593 (2014).
- 49 Paschos, K. A., Majeed, A. W. & Bird, N. C. Role of Kupffer cells in the outgrowth of colorectal cancer liver metastases. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **40**, 83-94, doi:10.1111/j.1872-034X.2009.00578.x (2010).
- 50 Martin, M. D. *et al.* Rapid extravasation and establishment of breast cancer micrometastases in the liver microenvironment. *Mol Cancer Res* **8**, 1319-1327, doi:10.1158/1541-7786.MCR-09-0551 (2010).
- 51 Ritsma, L. *et al.* Intravital microscopy through an abdominal imaging window reveals a pre-micrometastasis stage during liver metastasis. *Science translational medicine* **4**, 158ra145, doi:10.1126/scitranslmed.3004394 (2012).
- 52 Bilzer, M., Roggel, F. & Gerbes, A. L. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease. *Liver Int* **26**, 1175-1186, doi:10.1111/j.1478-3231.2006.01342.x (2006).
- 53 Kamada, N., Seo, S. U., Chen, G. Y. & Nunez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* **13**, 321-335, doi:10.1038/nri3430 (2013).
- 54 Iida, N. *et al.* Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science* **342**, 967-970, doi:10.1126/science.1240527 (2013).
- 55 Laskin, D. L., Weinberger, B. & Laskin, J. D. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *Journal of leukocyte biology* **70**, 163-170 (2001).
- 56 Ifrim, D. C. *et al.* Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*. *Infect Immun* **82**, 1064-1073, doi:10.1128/IAI.01189-13 (2014).
- 57 Liu, X. *et al.* Cell surface-specific N-glycan profiling in breast cancer. *PLoS One*

- 8, e72704, doi:10.1371/journal.pone.0072704 (2013).
- 58 Knolle, P. A. *et al.* Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **24**, 824-829, doi:10.1002/hep.510240413 (1996).
- 59 Andreu, P. *et al.* FcRgamma activation regulates inflammation-associated squamous carcinogenesis. *Cancer Cell* **17**, 121-134, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.019 (2010).
- 60 Yang, M. *et al.* Tumor cell-activated CARD9 signaling contributes to metastasis-associated macrophage polarization. *Cell Death Differ* **21**, 1290-1302, doi:10.1038/cdd.2014.45 (2014).
- 61 Mancini, M. & Toker, A. NFAT proteins: emerging roles in cancer progression. *Nat Rev Cancer* **9**, 810-820, doi:10.1038/nrc2735 (2009).
- 62 Brown, G. C. & Neher, J. J. Eaten alive! Cell death by primary phagocytosis: 'phagoptosis'. *Trends Biochem Sci* **37**, 325-332, doi:10.1016/j.tibs.2012.05.002 (2012).
- 63 Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci* **15**, 209-216, doi:10.1038/nrn3710 (2014).