

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題「担癌状態におけるムチンを介した
免疫能の変化の解析と応用」

研究終了報告書

研究期間 平成15年10月～平成21年3月

研究代表者：中田
(京都産業大学 大学院長／工学部教授)

§ 1 研究実施の概要

上皮性癌細胞の産生するムチンは、癌組織や血流中に分泌され、従来より腫瘍マーカーとして研究対象とされてきた。しかしながら、腫瘍形成の結果ではなく、腫瘍の悪性化に関与する因子として機能している可能性が示唆されてきた。糖鎖抗原の血中含量と 5 年生存率には逆の相関性があることは古くから知られている。本現象の背景には、広範な内容を含むことが予想されるが、ムチンの物性に基づいて相互作用する因子を想定することでその背景を絞り込むことが出来る。すなわち、ムチンは癌関連糖鎖抗原を含む多様な O-グリカンをもつことと、タンデムリピートをもつ巨大分子であることは、リガンドとして機能する場合に対象としてレクチンが想定される。さらに、一般的に糖鎖の結合は弱いが多数の結合部位をもつことから強力なリガンド活性をもつことも可能であると考えられる。近年、免疫系細胞や血管内皮などに多くのレクチンが見出され、その生物学的機能が注目されている。とりわけ、シグレックファミリーはシアル酸を含む糖鎖を認識し、かつ、その多くが細胞質側に ITIM と呼ばれる免疫抑制のシグナルを伝達することが知られており、免疫抑制の観点から注目されている。一方、このような視点から研究を進める過程で、ムチン上のシアル酸や硫酸基の負電荷を認識するスカベンジャーレセプターがレクチンとは別に見出された。同受容体を介した情報伝達は、PGE₂ などの過剰生産をもたらし、癌細胞の増殖に有利な環境をもたらしていることが示唆された。このような状況は、過形成を伴う類癌症状にも当てはまる現象であることが予想された。このような背景のもとで、マイクロアレイを用いた糖鎖とレクチンの結合の解析(福井)、ムチン様の糖鎖をもつ合成グリコポリマーによる生物活性(村田)、炎症と糖鎖(川人)でチームを構成し、本プロジェクトを開始した。スカベンジャーレセプター(SCR)を介した系では、可溶性 SCR 組換体を用いてムチンへの結合を確認すると共に、大腸癌細胞の産生するムチンで得られた結果(PNAS 100, 2736, 2003)をヒト癌患者で検討した。すなわち、患者血清による SCR を介したマクロファージの活性化、ムチン除去による不活性化及び CA19-9 の血中含量と PGE₂ 産生の相関性などを明らかにした(Cancer Lett 245, 149, 2007; Clin Cancer Res 11, 6127, 2005)。また、子宮癌組織におけるシアル Tn 抗原と COX2 発現の相関性(Anticancer Res 26, 4047, 2006)等を明らかにした。また、ムチン産生腫瘍担癌マウスにおける腫瘍増殖の背景にムチンが関与することを示した。すなわち、マウス乳癌細胞株 TA3-Ha の産生するムチン(MUC21、エピグリカニン)もマクロファージの SCR を介して PGE₂ 産生を亢進することを示すと共に、PGE₂ の産生に伴う血管新生や免疫抑制が腫瘍の増殖に大きく関与していることを示した。すなわち、ムチン産生腫瘍の担癌マウスでの腫瘍組織では、血管新生の亢進を認めた。また、同担癌マウスの脾臓からの CD4 T 細胞の内、IL-4 産生 CD4 T 細胞数は、正常マウスやムチン非産生細胞の担癌マウスとはほぼ同等であったが、IFN- γ 産生細胞数は著しく減少していた。また、COX2 特異的阻害剤の投与によって、ムチン産生腫瘍担癌マウスのみ著しい腫瘍増殖抑制効果を認めた。これらの結果は、ムチン→マクロファージの COX2 誘導→PGE₂ の過剰産生→血管新生の亢進・免疫抑制というカスケードの存在を強く示唆している(Cancer Res 66, 6175, 2006)。一方、過剰な炎症を伴う症状という観点から、関節炎についても SCR に対するリガンドはともかくとして、可溶性 SCR 組換体を用いてコラーゲン誘導のマウス関節炎モデルにおいてその効果を検討した。その結果、関節炎発症に対する抑制効果及び炎症の発生後の改善効果についても有意の結果を得た。特に、関節炎において特徴的に見られる滑膜の増殖が著しく抑制されていることがわかった(特願 2008-32226)。

次に、シグレックファミリーとムチンの相互作用と生物学的作用について検討した。多くのシグレックがそのリガンドの中にシアル Tn 抗原が含まれることから、腫瘍の産生するムチンとの相互作用が予測された。ムチンとの結合は可溶性組換体(シグレック 2, 3, 7, 9)を作成し、プレートアッセイで確認した。シグレック 2 については、ヒト、マウスの組換体及びシアル酸の結合に必須な Arg を Ala に変換した変異体を作成し、各種ムチンとの結合と特異性を確認した。B 細胞上に発現しているシグレック 2 へのムチンの結合が B 細胞受容体(BCR)を介した情報伝達にどのような影響をもたらすかを検討した。BCR を介した情報伝達において、ムチンのシグレック 2 への結合によりシグレック 2 のリン酸化の抑制、SHP-1 のリクルートの抑制及び ERK1/2 のリン酸化の抑制が見られた。ムチンの効果は濃度依存的であり、アジアロムチンでは効果が見られなかった。ERK1/2 に対する影響は、従来報告されているシグレック 2 への抗体の結合に伴う効果と逆の結果となった。ムチンによ

るB細胞表面の多数のシグレック2分子の架橋は、シグレック2及びBCRのラフトへの移行を阻害することに起因するものと予想される(BBRC 372, 45, 2008)。次に、マウス乳癌由来細胞株でムチン産生細胞株(TA3-Ha)と亜株のムチン非産生細胞株(TA3-St)の担癌マウスにおけるB細胞への影響を検討した。まず、TA3-Haの産生するムチン(エピグリカニン)によっても前述したBCRを介した情報伝達を抑制することがわかった。蛍光標識したエピグリカニンを正常マウスに静注すると大半は肝臓に取り込まれるが、一部は脾臓にトラップされ、脾臓組織のマージナルゾーンに検出された。次に、TA3-HaとTA3-St細胞の担癌マウスの脾細胞を調製し、T及びB細胞をFACSで解析すると、TA3-Ha担癌マウスにおいてB細胞の減少が見られた。さらに、B細胞の中で特異的にCD1d、CD23高発現B細胞、すなわちマージナルゾーンB細胞の減少が顕著であった。この結果は、組織化学的観察とも一致した。また、TA3-Ha担癌マウスにおいて、T細胞依存性抗原に対する免疫応答は正常であったが、T細胞非依存性抗原に対する抗体産生はIgG、IgMともに著しく減少することとも一致した。マージナルゾーンB細胞への影響は正常マウスにムチンを静注することによっても見られた。これらの結果は、担癌状態において血流中のムチンと脾臓マージナルゾーンB細胞の相互作用の結果と考えられる(BJ, in press)。このことは、担癌状態のマウスに抗ムチン抗体(抗Tn抗体)を静注することによってもマージナルゾーンB細胞の減少を部分的に抑制することが出来ることから支持される(特願 2006-287359)。さらに、ヒト癌患者の脾臓摘出標本を用いて、抗シグレック2抗体を用いた免疫染色を行った。染色パターンをもとに脾臓切片の単位面積当たりの濾胞数と濾胞面積の総和を算出した。癌患者血中のCA19-9値で37ユニット以上及び未満の患者に分けると、明らかにCA19-9値の高いグループで濾胞数と面積が低い値を示した。これらの結果は、ヒトにおいても血中ムチンが脾臓B細胞に影響していることを示唆している(未発表データ)。

次に、シグレック9を介した生物学的作用について検討した。ヒト末梢血より調製した単球を分化誘導し、未熟樹状細胞を経て成熟樹状細胞を得た。シグレック9は単球ではほとんど発現せず、未熟樹状細胞で高発現となり、成熟樹状細胞では減少していた。未熟樹状細胞にムチンあるいは合成グリコポリマーの存在下でLPSを加えてサイトカインの産生を測定した。いずれの場合もIL-10の産生にはほとんど変化は見られなかったが、IL-12の産生が有意に減少した。この結果は、抗シグレック9抗体を用いても同様の結果が得られることから、ムチンとシグレック9の相互作用によりTh2環境を強める作用があることを示している。すなわち、癌組織微小環境においてTh2環境をつくり出す要因の一つとなって、免疫抑制に働いているものと考えられる(未発表データ)。また、シグレック3については、単球から成熟樹状細胞への分化過程において、その発現量は一定であった。単球からの分化初期過程でムチンが存在した場合、成熟樹状細胞のマーカーであるCD83の発現が低下すると共に、アネキシンVの結合が増加した。その増加はムチンの濃度依存的であった。また、この現象は抗シグレック3抗体や可溶性シグレック3組換え体をムチンと共に共存させることによって、アネキシンV陽性細胞が部分的に減少した。従って、部分的ではあるがムチンによりシグレック3を介してアポトーシスが誘導されたものと考えられる(Proteomics 8, 3342, 2008)。

以上のように、種々の免疫系細胞においてムチンがシグレックなどの受容体を介して作用し、免疫抑制に関与していることがわかった。また、マクロファージではSCRを介した系での過剰で持続的な活性化が免疫抑制も含めて、腫瘍増殖に有利な微小環境の形成を促進しているものと考えられる。従来より、TAM(tumor-associated macrophages)と呼ばれる悪玉としてのマクロファージの分子的背景の一つと考えられる。

ムチンの生物学的機能として、分泌型ムチンを対象に研究を進めてきたが、膜結合型ムチンについても免疫系細胞との相互作用の可能性もある。この場合、免疫細胞への影響と共に、膜結合型ムチンを介した癌細胞への影響も考えられる。シグレック9の結合に伴うMUC1発現細胞への影響を検討した。MUC1へのシグレック9の結合は、シグレック9の濃度依存的にMUC1のC末側への β -カテニンのリクルートを促進することがわかった。 β -カテニンのリクルートは20分程度でピークとなり、60分後には核内への β -カテニン及びMUC1C(MUC1のC末側断片)の移行が認められた。また、可溶性シグレック9の存在下でMUC1発現細胞を培養すると、有意に増殖が促進されることがわかった。この結果は、癌組織微小環境で免疫細胞と癌細胞が接触した際に起こりうる現象であり、いずれの細胞の立場からも癌細胞の増殖を促進する効果があることがわかった(未発表デ

ータ)。

最近、分泌型ムチンあるいは膜結合型ムチンを発現する癌細胞において、後者の発現細胞の方が悪性度が高い傾向があるという報告がある。癌組織微小環境において、膜結合型ムチンへのリガンド(レクチン)の結合が分泌型ムチンによって阻害されるとすれば、この現象においてのみ分泌型ムチンは抗増殖作用をもつことになる。

§2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

免疫担当細胞や血管内皮細胞上には多くのレクチンが存在することが明らかになっている。一方、ムチン上の O-グリカンの多くはクラスターを形成し、レクチンとの親和性も高いことが予想される。又、細胞表面に存在するレクチンがムチンのタンデムリピートユニットに少なくとも 1 個の結合部位をもつならば、多くの細胞表面のレクチンがムチンにより架橋されることになる。膜結合型のレクチンが何らかの情報伝達分子であれば、リガンドとしてのムチンの作用は極めて強力であることになる。免疫担当細胞上に発現しているシグレックはシアル酸を含む糖鎖を認識するレクチンで、その認識部位にシアリル Tn 抗原を含むものもあることに加えて、その多くが細胞質側に ITIM をもつことから、ムチンの結合は抑制シグナルを伝える可能性がある。また、ムチンのように分子上に陰性荷電をもつ分子に結合することが知られているスカベンジャーリセプター(SCR)を介した情報伝達は、単球/マクロファージの活性化をもたらす。このような受容体を介したムチンの作用が、免疫抑制や腫瘍増殖に関与することが予想され、その分子機構を明らかにすることが大きな目標であった。また、その分子機構を背景として、そのような状況を回避もしくは回復する実際的手法の開発を目指した。このような計画の中で、福井(レクチンと糖鎖の結合についてのマイクロアレイを用いた解析)、村田(合成グリコポリマーとレクチンの結合)、川人(マクロファージによる炎症)らの協力のもとにスタートした。すなわち、糖鎖の結合部位の微細構造の解析、構造の明確な合成グリコポリマーを用いた結合特異性の解析、炎症に関わるマクロファージの機能の解析などの研究を統合することにより、本プロジェクトを遂行してきた。その後の展開の中で、スカベンジャーリセプターを介した作用をブロックすることにより、関節炎の抑制効果があることがわかった。本疾患におけるスカベンジャーリセプターのリガンドは明確ではないが、その作用機構の解明と応用が期待される。また、合成グリコポリマーの中で、硫酸化グリコポリマーがシグレックや P-セレクトリンなどと強い親和性を持ち、特に P-セレクトリンとの関連で癌細胞の肺転移を強く抑制することがわかった。分子サイズの最適化などを検討した上で応用に結びつけたい。ムチンの作用機構の中で、発足時のテーマとしては分泌型ムチンを対象としていた。膜結合型ムチンを発現している癌細胞とレクチンを発現している免疫系細胞の相互作用の結果、癌細胞における情報伝達とその生物学的作用が重要な意味をもつことがわかってきた。これは、MUC1 等の発現癌細胞の悪性度が高いという分子的背景となりうる可能性があり、癌細胞の産生するムチンの機能的仕分けをより明確に出来るものと考えている。

(2) 実施体制

グループ名	研究代表者又は主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
京都産業大・中田博グループ	中田 博	京都産業大学・工学部生物工学科・教授	担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化と腫瘍組織形成

京都産業大・福井成行グループ	福井成行	京都産業大学・工学部生物工学科・教授	シアル酸含有オリゴ糖の調製とその糖鎖マイクロアレイを用いたシグレック 2 の結合する糖鎖構造の解析
静岡大グループ	村田健臣	静岡大学・農学部応用生物化学科・准教授	シグレック及びスカベンジャーリセプターに結合する人工ムチンの合成
京都府立医科大学グループ	川人 豊	京都府立医科大学・大学院医学研究科生体機能制御学・講師	関節リウマチの病因に關与する糖鎖抗原の研究

§ 3 研究実施内容及び成果

3. 1 担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化と腫瘍組織形成(京都産業大 中田博グループ)

(1)研究実施内容及び成果

[実施方法・実施内容・成果]

上皮性癌細胞の産生するムチンと免疫細胞上の受容体との相互作用を通じて、担癌状態における免疫機能への影響及び癌の進展との関連性を明らかにすることを目的として本プロジェクトをスタートした。上皮性癌細胞の産生するムチンが正常ムチンと異なる点は、その生体内分布及び糖鎖構造にある。また、ムチンは分泌型と膜結合型に分類され、前者は癌化に伴い癌組織全体あるいは血流中に流出し、様々な免疫担当細胞と相互作用する可能性がある。後者については、癌組織に浸潤した免疫細胞と相互作用する可能性がある。ムチンと結合する受容体としては、スカベンジャーリセプター(SCR)や数種のシグレックファミリーを見出し、免疫抑制作用を検討すると共に癌細胞への影響についても明らかにした。

I. SCR を介した系

I-1. ムチン産生腫瘍の担癌マウスにおけるムチンの作用

1) 単球/マクロファージへの SCR を介した結合と PGE₂ の産生

我々は、免疫細胞とムチンの相互作用を検討する過程で、ムチンが単球/マクロファージ

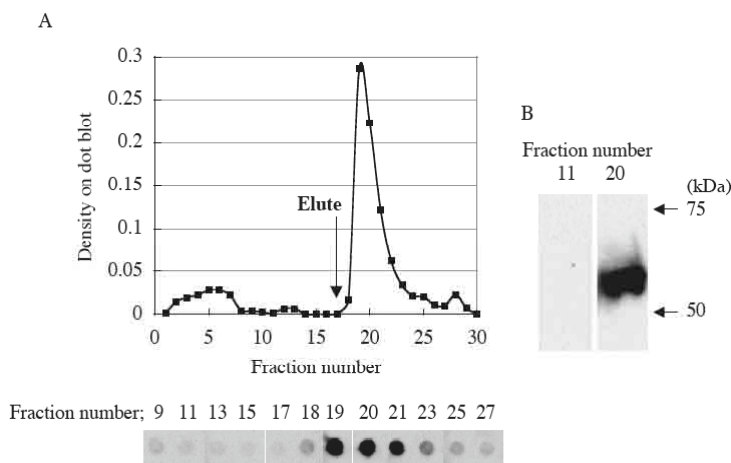


図 1. 可溶性スカベンジャーリセプターのムチンへの結合

A: 可溶性スカベンジャーリセプター(トランスフェクタントの培養上清を 50%飽和硫酸で沈殿させたもの)を BSM-セファロース(2 ml)に通し、50 mM トリス-塩酸緩衝液、pH8.0-15 mM NaCl, 5 mM EDTA で洗浄後、1 M NaCl で溶出した。各フラクション 1 ml を集め、その内 100 μ l をドットプロットに用いた。FLAG に対する抗体により検出し、数値化した。B: フラクション 11 と 20 について電気泳動後ウェスタンブロッティングを行い、抗 FLAG 抗体で検出した。

に結合することを見出した。ムチンは、ヒト腸癌由来細胞株 LS180 細胞の培養上清より調製した (LSM)。¹²⁵I で標識したムチンとヒト末梢血より調製した単球への結合を様々な阻害物質の存在下で検討したところ、単球への結合は、ウシ顎下腺ムチン (BSM)、フコイダン、ポリイノシン酸 (poly I) で効果的に阻害された。一方、ポリシチジル酸 (poly C) では強い阻害は見られなかった。フコイダンや poly I に結合する受容体としては、SCR グループ A (SCR-A) が挙げられている。SCR-A cDNA の強制発現株を作成し、同様にムチンの結合を調べると、フコイダンや poly I による結合阻害がより明確に確認された。さらに、SCR-A のエクストドメインに相当する可溶性組換え体 (FLAG タグ付き) を作成し、BSM-セファロースに通すと、溶出画分に SCR-A が回収されることを確認した (図 1)。これらの結果は、SCR は従来から報告されているアセチル LDL やフコイダンに加えて、ムチンも結合することを示している。ヒト末梢血より調製した単球やマウス腹腔マクロファージに LS180 細胞由来のムチン、マウス乳癌細胞 TA3-Ha の産生するムチン (MUC21)、羊顎下腺ムチン (OSM) あるいは BSM を加え、上清に分泌される PGE₂ を測定した。OSM を除いて PGE₂ の産生を亢進する活性が認められ、この活性は細胞内の COX2 mRNA の誘導レベルに相当した。従って、ムチンの作用により COX2 が誘導され、PGE₂ の産生が亢進することが分かった。

2) ムチン産生腫瘍の担癌マウスにおける腫瘍増殖とムチン

このようなムチンの作用をより明らかにするために、マウス乳癌由来細胞株でムチン産生細胞である TA3-Ha と亜株でムチン非産生細胞 TA3-St の皮下腫瘍形成について比較した。なお、TA3-Ha、-St の *in vitro* での増殖速度は同等であったが、皮下腫瘍の場合は TA3-Ha のほうが著しく早く増殖した。マウス皮下腫瘍の抽出物及び切片を調製し、生化学的及び組織化学的に比較した。抽出物より抗 Tn 抗体 (MLS128) 及び抗 COX2 抗体を用いた免疫沈降物を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後にムチンと COX2 を検出すると、TA3-Ha 腫瘍の抽出物のみを検出された。組織化学による結果では、TA3-Ha 細胞の皮下腫瘍にムチンは一様に存在し、COX2 の誘導が認められた。浸潤したマクロファージについては、TA3-Ha、-St の双方の腫瘍組織で差はなく、組織全体に認められた。COX2 と浸潤マクロファージの画像をマージすると、TA3-Ha 腫瘍組織に浸潤したマクロファージには COX2 の誘導が観察された。さらに、抗 CD31 抗体により新生された血管を染色すると、TA3-Ha の腫瘍組織に著しい血管新生が観察された (図 2)。この結果は、TA3-Ha 腫瘍組織がより早く形成されることと一致した。

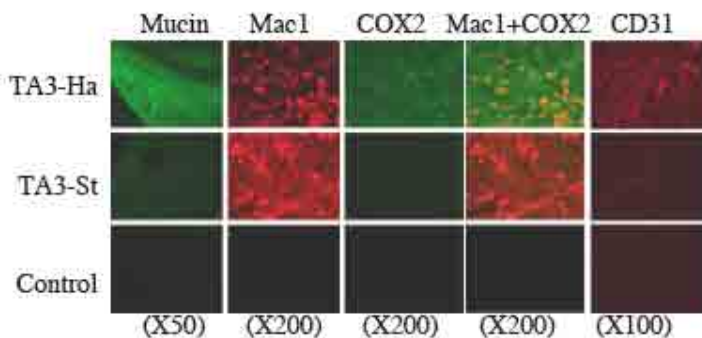


図 2. TA3-Ha 及び TA3-St 細胞の腫瘍組織における COX2 の誘導と血管新生

TA3-Ha、TA3-St 細胞 (1 x 10⁶ 細胞) を A/J マウス背皮下に注射し、5 日後に摘出した腫瘍組織を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、それぞれの抗体を用いて免疫染色を行った。

3) ムチン産生腫瘍の担癌マウスにおける免疫抑制

次に、PGE₂ は免疫能にも影響することが知られていることから、担癌状態における T 細胞のサイトカイン産生能を検討した。TA3-Ha、-St 担癌マウスの脾臓より CD4 T 細胞を調製し、ConA 存在下での IFN- γ の産生を検討したところ、TA3-Ha 担癌マウス由来の T 細胞において、著しい IFN- γ 産生能の低下が認められた (図 3A)。また、同 CD4 T 細胞をイオノフォアなどで刺激し、ブレフェルدين A で処理後、IFN- γ 、IL-4 産生細胞数を蛍光抗体法で測定した。IL-4 産生 CD4 T 細胞は、コントロール、TA3-Ha、-St 担癌マウスでほとんど変化がなかったが、IFN- γ 産生 CD4 T 細胞の場合は、コントロール、TA3-St 担癌マウスに比して TA3-Ha 担癌マウスで著しく減少していた。PGE₂ の作用により Th2 環境になっていること

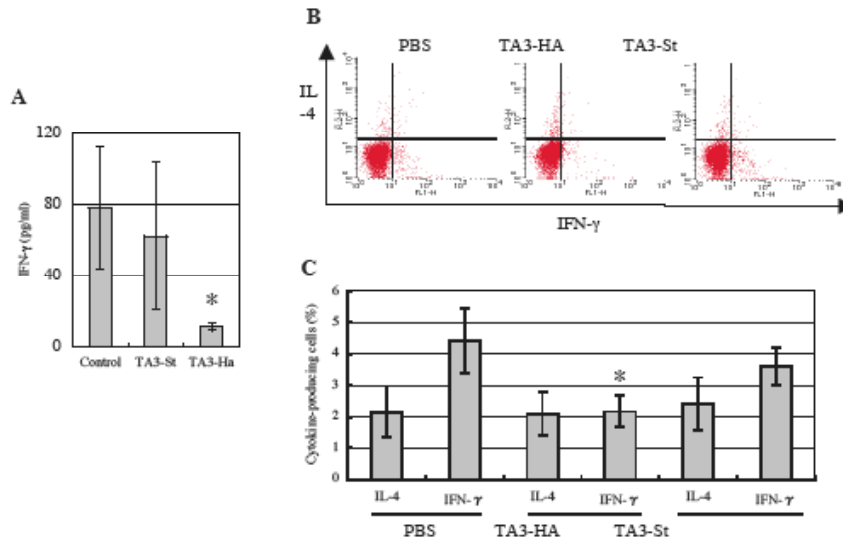


図3. Th1 サイトカイン産生に対するエピゲリカニンの影響
 A: TA3-Ha、TA3-St 担癌マウス (1×10^6 細胞を皮下注射して3週間後) より脾臓を摘出し、CD4 T 細胞を調製した。CD4 T 細胞 (1×10^6 細胞) を ConA (5 $\mu\text{g/ml}$) 存在下で培養し、上清に分泌された IFN- γ を ELISA で測定した (n=4、average \pm SD、*P<0.05)。B: 上述したように CD4 T 細胞を調製し、ホルボールエステル (50 nmole/l)、イオノマイシン (500 nmole/l) 及びブレフェルディン A (10 ng/ml) で6時間処理した。2%パラホルムアルデヒドで固定後、0.5%サボンで処理し、蛍光標識した抗 IL-4 及び IFN- γ 抗体を用いて解析した。C: CD4 T 細胞中の IFN- γ 又は IL-4 産生細胞数の割合を棒グラフで示した (n=6、average \pm SD、*P<0.05)。

を示している(図 3BC)。また、COX2 阻害剤であるエトドラッグを担癌マウスに経口投与すると、TA3-Ha 担癌マウスにおいてその増殖が著しく抑制されることから、ムチンを起点とした COX2 の誘導に伴う PGE₂ の産生亢進が癌細胞の増殖をサポートする微小環境の形成を促進していることを示唆している。

I-2. 消化器系癌における血中ムチンと PGE₂ の産生
 ヒト癌患者においても血中ムチンによるヒト末梢血単球での PGE₂ 産生亢進を検証した。健康人末梢血より Ficoll-Isopaque により PBMC を調製し、抗 CD11b 抗体マグネティックビーズを用いて単球を得た。ヒト末梢血単球に患者血清を加え、24時間培養後、上清に分泌された PGE₂ を測定すると、血清量に比例して産生量が増加した。予め血清を抗シアリルルイス a 抗体-セファロースで前処理したものでは、PGE₂ 産生量は約 40%減少した(図 4)。また、PGE₂ 産生量と血中シアリルルイス a のレベルには緩やかな相関性があることがわかった(図 5)。全てのムチンがシアリルルイス a 抗原を発現しているわけではなく、また、同抗原が PGE₂ 産生亢進に直接関与するわけではないが、ムチンが PGE₂ の産生亢進に関与していることを強く示唆する結果となった。

なお、これらの患者末梢血単球では、COX2 mRNA が発現していることが RT-PCR で明らかになった(図 6)。さらに、患者血清をゲルろ過し、高分子画分にムチンが存在することを確認した。以上の結果は、ムチン産生腫瘍の担癌マウスと同様に、ヒト癌患者においてもムチンによる PGE₂ の産生が亢進し、癌細胞の増殖に有利な環境をもたらしているものと考えられる。

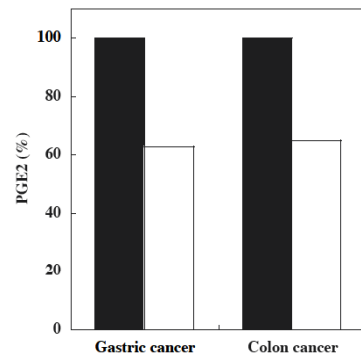


図4. シアリルルイス a 抗原をもつムチンを除去した癌患者血清により処理した健康人末梢血単球による PGE₂ の産生
 胃・腸癌患者の血清を抗シアリルルイス a 抗体-セファロース (□) またはコントロール IgG-セファロース (■) で 4°C、4 時間処理した。遠心後の上清を健康人末梢血単球に加え、24 時間培養した。測定値は、コントロール IgG で処理したサンプルを 100 として示した。

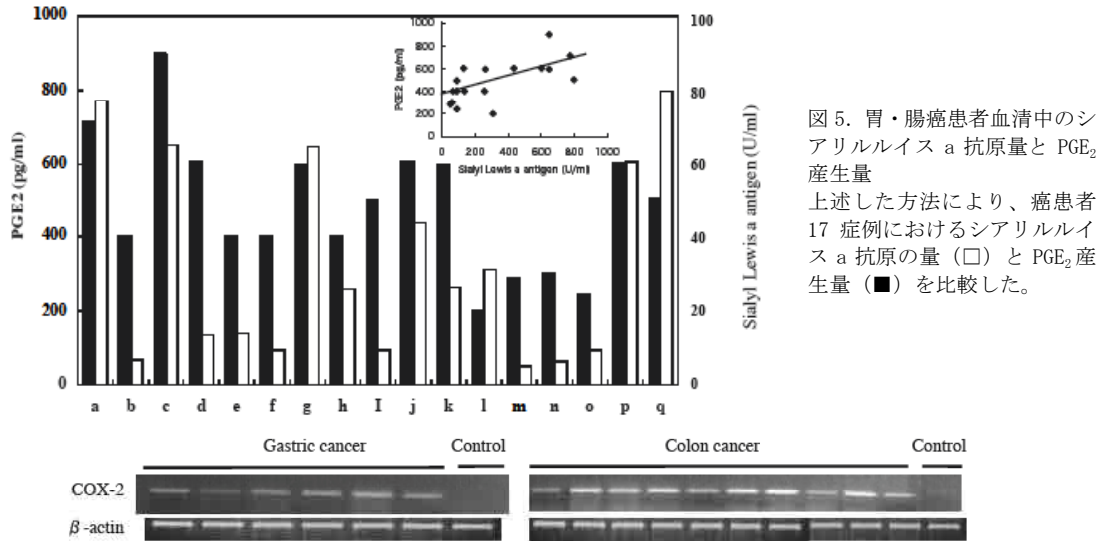


図5. 胃・腸癌患者血清中のシアリルルイス a 抗原量と PGE₂ 産生量
 上述した方法により、癌患者 17 症例におけるシアリルルイス a 抗原の量 (□) と PGE₂ 産生量 (■) を比較した。

図6. 血清中にシアリルルイス a 抗原をもつ癌患者より調製した単球の COX2 mRNA
 胃・腸癌患者末梢血より単球を調製し、total RNA を得た。PCR プライマーは、センス : 5'-TTCAAAAGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'、アンチセンス : 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3' を用いた。PCR は 40 サイクル、変性 : 95 °C、40 秒、アニーリング : 62 °C、40 秒、伸長 : 72 °C、80 秒で行った。

I-3. コラーゲン誘発関節炎モデルにおける可溶性 SCR の効果

腫瘍をはじめとする過形成を伴う疾患には、マクロファージの過剰な活性化が原因の一つであり、かつ SCR を介した系もその活性化シグナルになりうるという仮説のもとに、滑膜の異常増殖を伴う関節リウマチについて可溶性 SCR の効果を検討した。上述したように、SCR

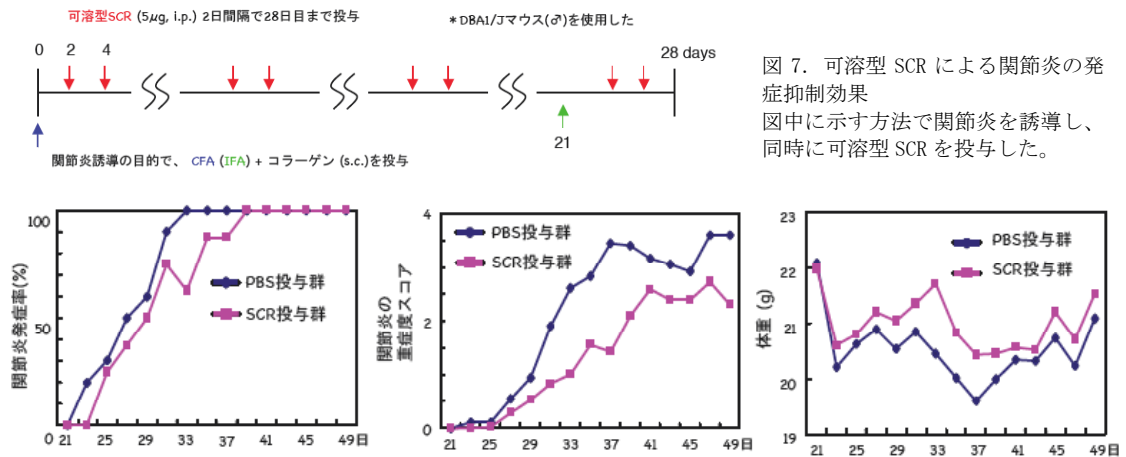


図7. 可溶性 SCR による関節炎の発症抑制効果
 図中に示す方法で関節炎を誘導し、同時に可溶性 SCR を投与した。

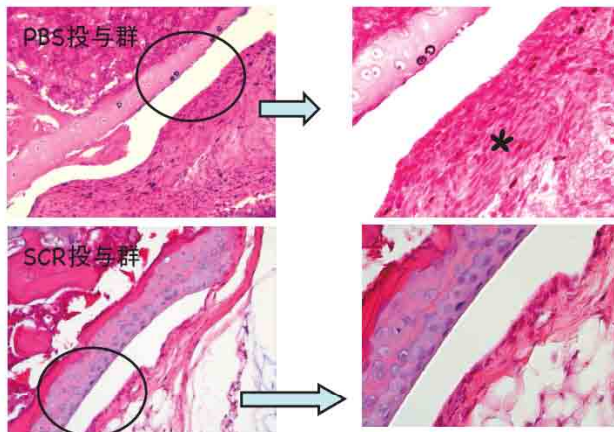


図8. 関節炎マウスの組織学的所見
 SCR 投与及びコントロールマウスの左足首の組織切片。コントロール群と比較して、SCR 投与マウスにおいて滑膜の肥大化 (*) が軽減している。

(グループ A、タイプ II)のエクトドメインに相当するcDNAをCHO細胞に導入し、安定発現株を得た。培養上清より可溶性 SCR を調製し、以下の実験に用いた。DBAI/J マウス(♂)の尾根部に完全フロイントアジュバント(CFA)と牛コラーゲンのエマルジョンを皮下注射し、関節炎を発症させた。可溶性 SCR (5 μ g, i.p)を2日おきに28日間投与した。なお、コントロールとしては、可溶性 SCR を最終的に調製する際に行った透析外液(PBS)を等量用いた。図7に示すように、SCR 投与群においても関節炎は発症したが、すべてのマウスが発症したのは、コントロール群のマウスに比して6日遅延された。関節炎スコアでは全経過を通じてSCR 投与群で低く、体重の減少(炎症性痩せ)も軽減された。また、組織学的所見では、滑膜の肥大化が著しく抑制されることがわかった(図8)。次に、関節炎を誘発したマウスを2群に分け、可溶性 SCR の投与による関節炎改善効果を検討した。すなわち、前述したように関節炎を発症させ、関節炎スコアの平均値が同じになるように関節炎発症マウスを2群に分けた。関節炎誘導開始日より56日から70日目まで可溶性 SCR (10 μ g, i.p)を毎日投与した。SCR 投与後の関節炎スコアの減少と体重減少の軽減が認められた(図9)。従って、SCR 投与によってコラーゲン誘導関節炎の発症が抑制されるだけでなく、関節炎発症後においても SCR 投与が症状改善効果をもつことが示唆された。現在、詳細なメカニズムを検討中である。

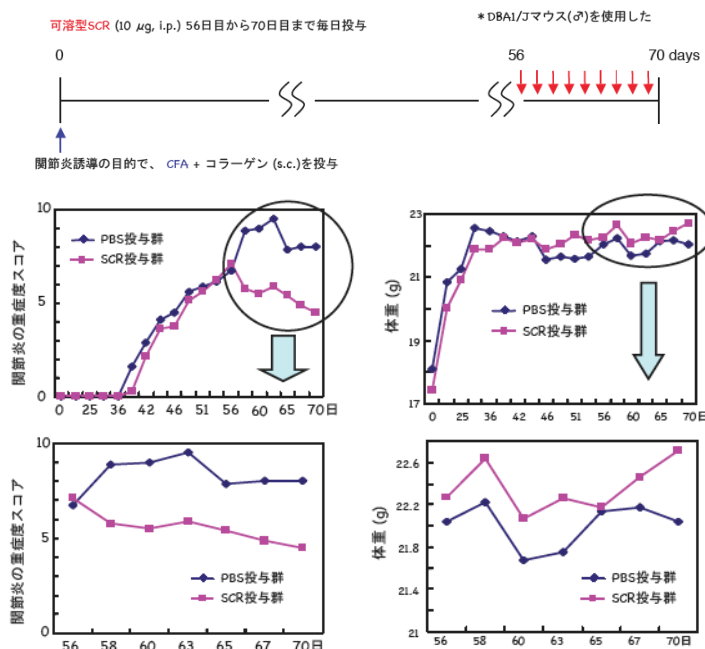


図9. 可溶性 SCR による関節炎の改善効果
 図中に示す方法で関節炎を誘導後、可溶性 SCR を投与した。

II. シグレックファミリーを介した系

シグレックファミリーはシアル酸を含む糖鎖を認識するレクチンで、その多くが免疫系細胞に発現している。また、多くのシグレックが細胞質側に ITIM (Immuno tyrosine inhibitory motif) をもち、抑制性のシグナルを伝達することが知られている。リガンドである糖鎖の中には、SA α 2-6 GalNAc、すなわち、癌関連糖鎖抗原であるシアル Tn 抗原を認識するシグレックも存在する。多くのムチンが同抗原を発現していることから、担癌状態における免疫抑制に関与する可能性がある。また、癌細胞上に発現している膜結合型ムチンの糖鎖に免疫細胞上のシグレックが結合する可能性もある。この場合、免疫細胞における免疫抑制に加えて、膜結合型ムチンを介した情報伝達の可能性もある。

II-1. シグレック 2 を介した B 細胞の免疫抑制

シグレック 2 は B 細胞上に特異的な膜タンパク質で、pre-B 細胞で細胞表面に発現され、形質細胞では消失している。シグレック 2 も癌関連糖鎖の一つであるシアル Tn 抗原を含めて SA α 2-6 Gal/GalNAc 構造を認識することが知られていることから、ムチンと相互作用

することが予想された。担癌状態で血流中に存在するムチンが、B 細胞上のシグレック 2 を介して相互作用することにより、B 細胞の活性化シグナルを抑制する可能性がある。一般的にシグレック 2 は内在性のシスリガンドによってマスクされていると考えられてきた。しかし、近年、ある休止 B 細胞あるいは一部の活性化 B 細胞では内在性リガンドが結合していないことが報告されている。また、シスリガンドにマスクされた状態でも、接着した細胞上のトランスリガンドと相互作用しうることが示されている。従って、シグレック 2 は構造的に適合する糖タンパク質であればシスリガンド以外にも結合すると考えられる。

1) マウスシグレック 2 とムチンの結合

担癌状態における B 細胞を対象としたムチンの影響を調べる目的で、前述したマウス乳癌

細胞株 TA3-Ha とコントロールとして亜株の TA3-St を用いた。TA3-Ha 細胞の産生するムチンであるエピグリカニン(MUC21)について、同細胞担癌マウスの腹水を用いて検討した。細胞成分を除いた腹水を直接電気泳動し、ナイロン膜にウエスタンブロットした。MLS128 (抗 Tn 抗体) 及び $\alpha 2,6$ シアル酸を認識するレクチン (SSA) により検出した。図 10A に示すように、エピグリカニンに相当する同一で唯一のバンドが TA3-Ha のみに検出された。従って、TA3-Ha 細胞はムチンとしてはエピグリカニンのみを産生し、 $\alpha 2,6$ シアル酸をもつ O-グリカンを発現していることがわかった。また、組織化学的にも、MLS128 mAb を用いてムチンが TA3-Ha 細胞表面に発現し、TA3-St 細胞には発現していないことを確認した (図 10B)。なお、TA3-Ha 細胞担癌マウスでは、血流中にエピグリカニンが検出されることが報告されている。さらに、シグレック 2 のエピグリカニンへの結合を確認するために、同細胞の担癌マウス腹水より同ムチンを精製した。すなわち、腹水よりゲルろ過 (セファロース 6B)、過塩素酸沈殿及びセシウムクロライド密度勾配遠心を用いて精製した。シグレック 2 については、同分子のエクドメインからなる可溶性シグレック 2 及びシアル酸との結合に必須なアミノ酸である Arg30 を Ala に変換した可溶性シグレック 2 を作成した。エピグリカニンあるいは BSM を固相化したプレートに、可溶性シグレック 2 は濃度依存的に結合した (図 10C)。Arg30 を Ala に変換したシグレック 2 はエピグリカニンに結合せず、シアル酸に特異的な結合であることが確認された (図 10D)。

2) 脾臓へのムチンの取り込み

次に、血流中のムチンの動態について検討した。

蛍光標識したエピグリカニンを正常マウスに静注し、一定時間後に各組織への取り込みを調べた。従来から指摘されている通り、大半のエピグリカニンは肝臓に取り込まれたが、一部は脾臓に検出された。脾臓内における部位を特定するために、白脾髄近くのマージナルゾーンの内側に沿って存在する M

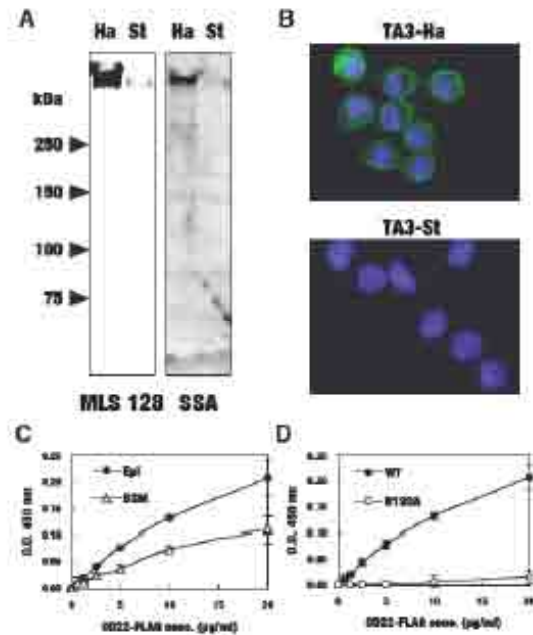


図 10. シグレック 2 へのエピグリカニンの結合

A: マウス乳癌細胞株 TA3-Ha 及び TA3-St をマウス腹腔内に播種し、8 日後に腹水を採取した。細胞成分を除いた後、直接電気泳動しナイロン膜にウエスタンブロットした。単クローン抗体 MLS128 (Tn 抗原を認識) 及び $\alpha 2,6$ シアル酸を認識するレクチン (SSA) で検出した。B: 2 つの細胞を MLS128 (緑) 及び DAPI (青) を用いて染色した。C: BSM (Δ) 及びエピグリカニン (\bullet) を固相化したプレートに FLAG タグ付き可溶性シグレック 2 を加え、結合活性を測定した。D: エピグリカニンを固相化したプレートに FLAG タグ付き可溶性シグレック 2 (\bullet) 及び N 末より 30 番目の Arg を変換した FLAG タグ付き可溶性シグレック 2 (\circ) を加え、結合活性を測定した。

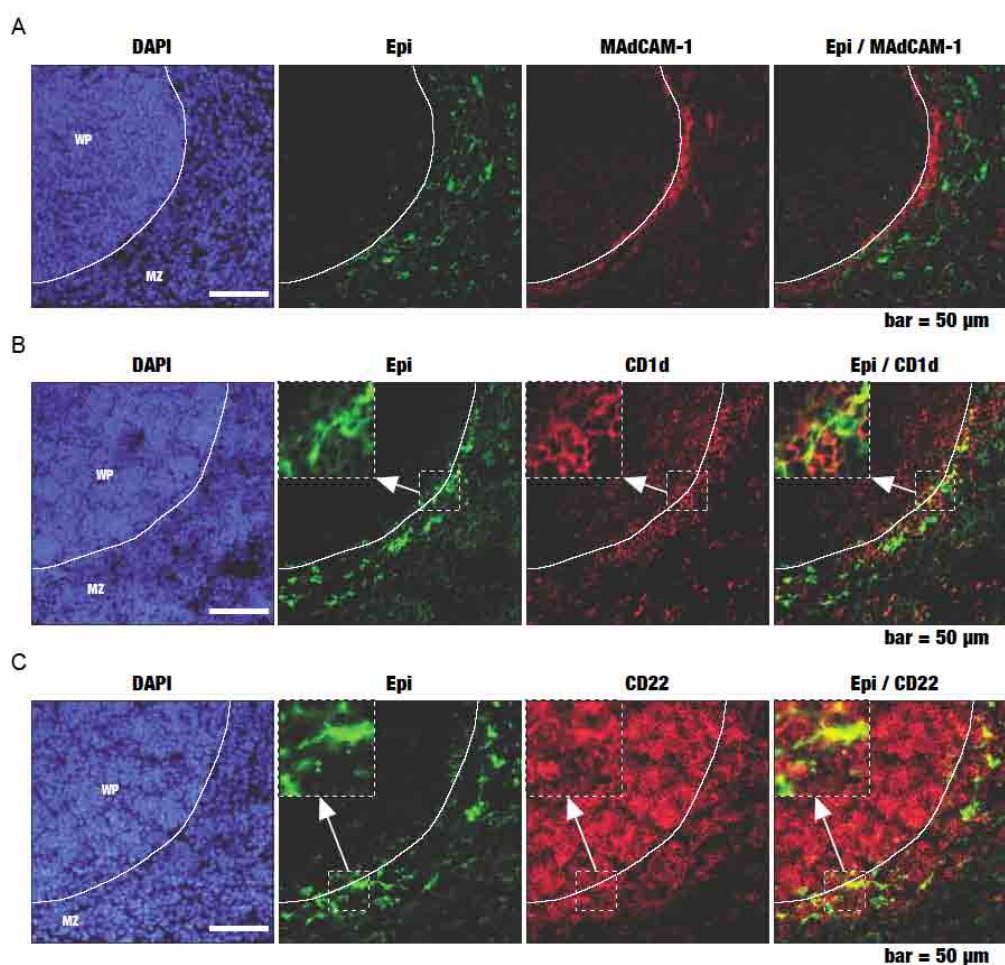


図 11. 蛍光標識したエピグリカニンのマウス脾臓への取り込み

Alexa Fluor 488 標識-エピグリカニンを正常マウスに静注した。20 分後に 4%パラホルムアルデヒドで還流固定し脾臓を摘出した。MAdCAM-1 (A)、CD1d (B)、CD22 (シグレック 2) (C) に対するビオチン化抗体と Alexa Fluor 594 標識-ストレプトアビジンを用いてそれぞれの抗原の分布を可視化し、エピグリカニンの分布と比較した。

AdCAM-1 を検出したところ、取り込まれたエピグリカニンはその周辺に存在することがわかった(図 11A)。また、抗 CD1d あるいは抗 CD22 抗体を用いて B 細胞を検出すると、その一部は取り込まれた蛍光標識エピグリカニンとマージした(図 11BC)。すなわち、取り込まれたエピグリカニンは、マージナルゾーン B (MZB) 細胞上に結合しているか又は B 細胞に取り込まれていることが示された。さらに、他の細胞表面マーカーとの局在性について調べた。すなわち、CD169 (marginal metallophilic macrophage = MMM)、SIGN-R1 (marginal zone macrophage = MZM) 及び CD11c (marginal zone dendritic cells = MDC) との局在性を検討したところ、一部のエピグリカニンにおいて CD169 陽性細胞との共局在性が認められたが、他の細胞マーカーとはほとんど共局在しなかった(図 12)。従って、静注されたエピグリカニンは、脾臓中の MZB 細胞や MMM 細胞に取り込まれたものと考えられる。

3) 担癌状態における脾臓マージナルゾーン B 細胞の減少と免疫抑制

静注したムチンが脾臓マージナルゾーン B 細胞に認められたことから、担癌状態においても同様の現象が起こることが想定され、B 細胞への影響を検討した。TA3-Ha あるいは TA3-St 細胞を腹腔内に注射し、8 日後に調製した脾細胞中の B220 あるいは CD3 陽性細胞を FACS により解析した。図 13A に示すように、TA3-St 担癌マウスとコントロールマウスでは、B220 陽性細胞/CD3 陽性細胞の比はほぼ同等であったが、TA3-Ha 担癌マウスの

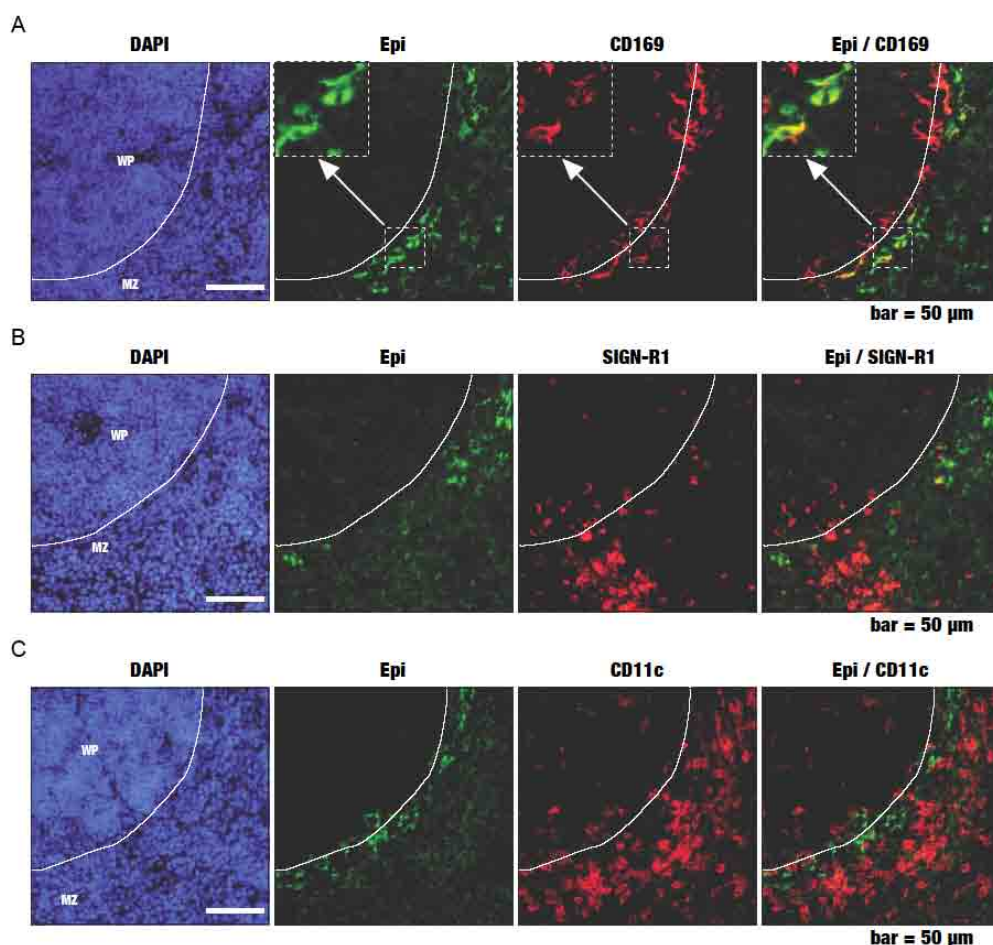


図 12. 脾臓マージナルゾーンにおける MMM、MZM、MDC とエピグリカニンの分布
 図 11 と同様に処理したマウスについて、CD169 (MMM) (A)、SIGN-R1 (MZM) (B)、CD11c (MDC) (C) の分布とエピグリカニンの分布を比較した。

それは著しく低い値を示し、B 細胞の減少が示唆された。さらに、B 細胞の中で CD23 及び CD21 陽性細胞の分布を検討した(図 13BC)。新しく形成された B 細胞(NFB)は、コントロールに比して TA3-Ha、-St のいずれの担癌マウスにおいても増加したが、免疫反応の亢進に伴うものと考えられる。濾胞 B (FOB) 細胞に大きな相違は認められなかったが、TA3-Ha 担癌マウスの MZB 細胞は著しく減少していた。MZB 細胞は CD1d、CD21 陽性細胞であることを特徴とすることから、2 つの抗原の発現を調べた。図 14AB に示すように、CD1d、CD21 ダブルポジティブ細胞、すなわち MZB 細胞は、コントロール及び TA3-St 担癌マウスではほぼ同等であったが、TA3-Ha 担癌マウスでは著しく減少していた。また、同細胞の減少は、TA3-Ha 細胞の播種後の経過に伴って亢進することがわかった(図 14C)。さらに、担癌マウスの脾臓組織を抗 CD22(シグレック 2) 抗体あるいは抗 CD1d 抗体で免疫染色すると、TA3-Ha 担癌マウスのマージナルゾーンにおいて B 細胞の減少が観察された(図 15)。TA3-St 担癌マウス及び正常マウスでは相違は見られなかったことから、上述の FACS の結果と良く一致した。

MZB 細胞は、T 細胞非依存性抗原に対する抗体を産生することが知られている。従って、担癌マウスを用いて T 細胞非依存性抗原(TNP-フィコール)に対する抗体産生を調べた。癌細胞播種後 5 日と 7 日目の担癌マウスに TNP-フィコール又は TNP-KLH(T 細胞依存性抗原)を静注し、8 日目に採血した試料の抗体価を ELISA

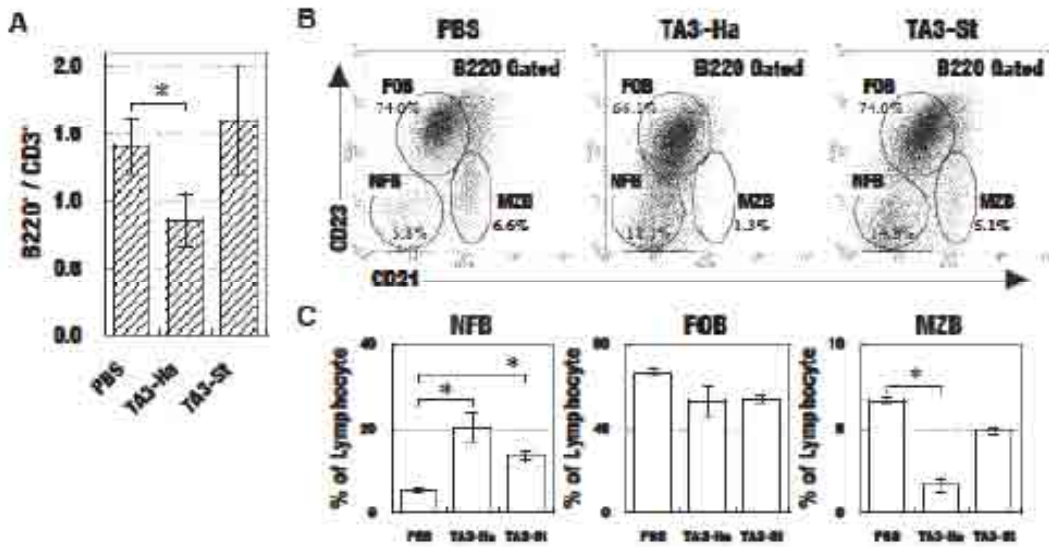


図 13. TA3-Ha 又は TA3-St 担癌マウスの脾臓 B 細胞の分布
 A: 癌細胞を播種して 8 日後に脾細胞を調製し、FITC 標識-抗 B220 抗体と RPE 標識-抗 CD3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。数値は B220 陽性細胞/CD3 陽性細胞の比の平均値±SD で示す (n≥6, *P<0.01)。B: 同様に脾細胞を調製し、PE-Cy5.5 標識-抗 B220 抗体、FITC 標識-抗 CD21 抗体及び PE 標識-抗 CD23 抗体で染色し解析した。数字は B220 陽性細胞中のそれぞれの割合を示す。C: B の値を棒グラフで示した。データは平均値±SD で示す (n=6, *P<0.01)。

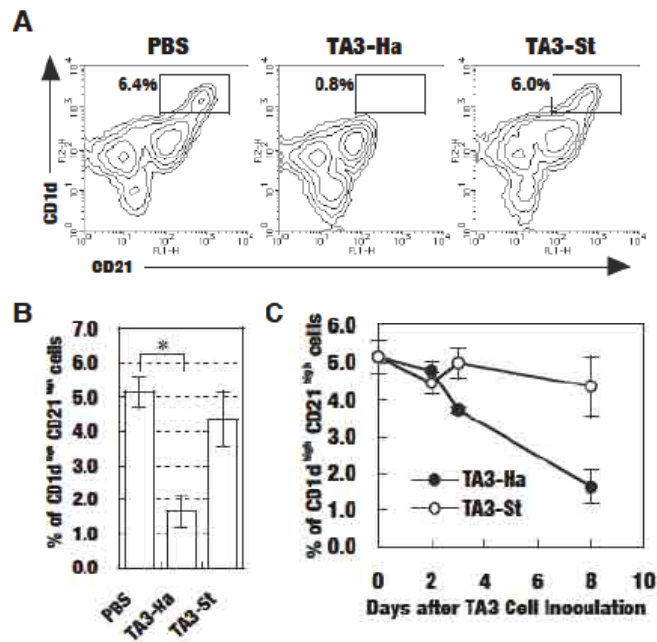


図 14. TA3-Ha 担癌マウスにおける脾臓マージナルゾーン B 細胞の減少
 A: 図 13 と同様に脾細胞を調製し、FITC 標識-抗 CD21 抗体及び RPE 標識-抗 CD1d 抗体で染色した。代表的なフローサイトメトリーの結果を示す (n≥6)。数値は、図中のゲートで囲まれた CD21、CD1d ダブル高発現細胞の割合を示す。B: A の値を棒グラフで示した。値は CD21、CD1d ダブル高発現細胞の割合を示す(平均値±SD, n≥6, *P<0.01)。C: 細胞を播種し、2, 3, 8 日後に脾細胞を調製した。B と同様に、CD21、CD1d ダブル高発現細胞の割合を調べた (平均値±SD, n≥6)。

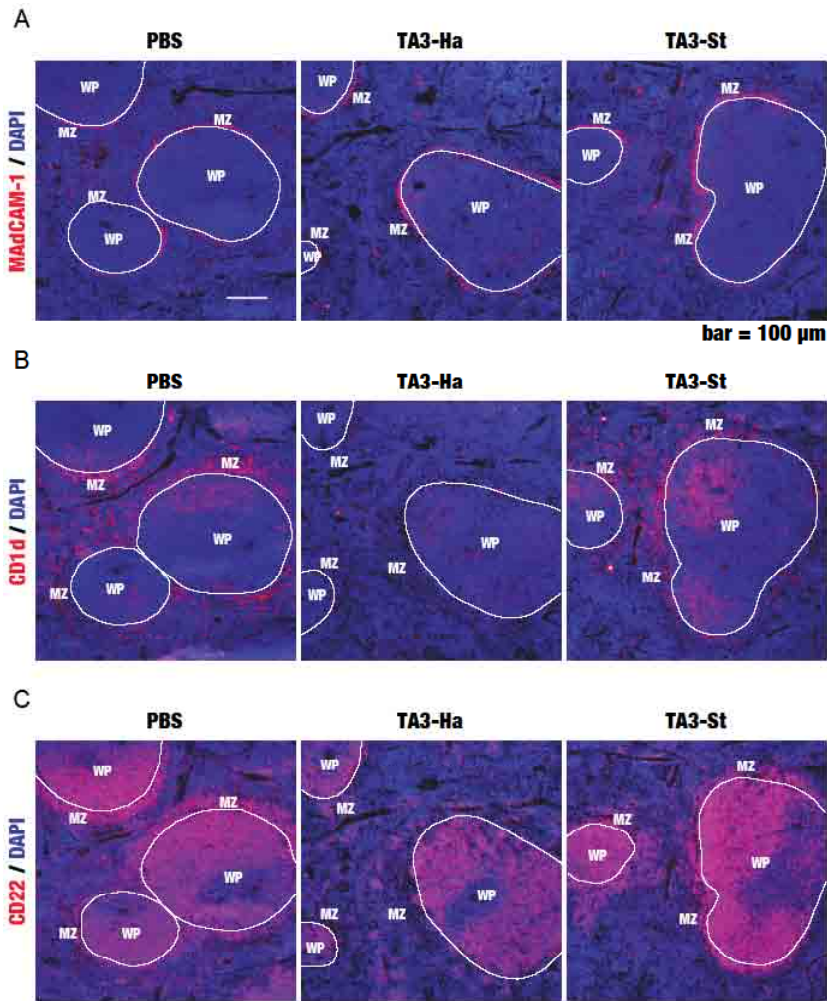


図 15. TA3-Ha 担癌マウスにおける脾臓マージナルゾーンB細胞の分布。癌細胞を播種して8日後に脾臓切片を調製した。ビオチン化した抗 MadCAM-1 抗体 (A)、抗 CD1d 抗体 (B)、抗 CD22 (シグレック 2) 抗体 (C) 及び Alexa Fluor 594 標識-ストレプトアビジンを用いて可視化した。核は DAPI により染色した。WP: 白脾髄、MZ: マージナルゾーン。WP と MZ の境界を白線で示す。

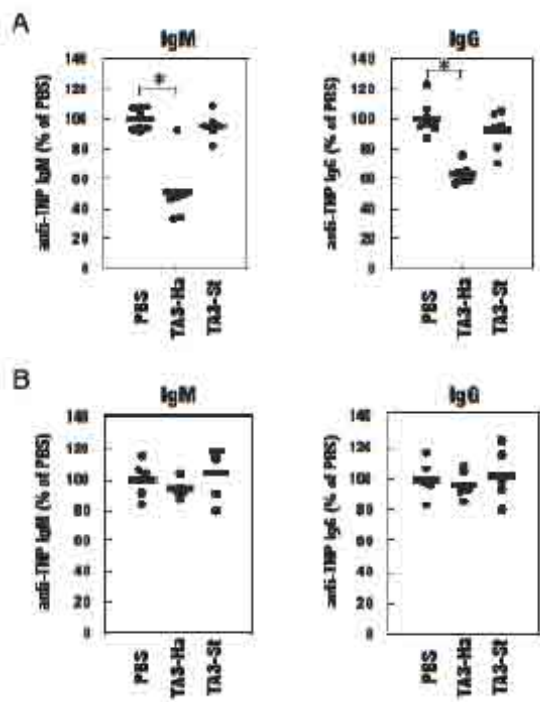


図 16. 担癌マウスにおける抗体産生。TA3-Ha (n=6)、TA3-St (n=8) 担癌マウスあるいは正常マウス (n=8) に、播種後 5、7 日目に 10 μg の TNP-フィコール (A) 又は TNP-KLH (B) を静注した。8 日目に採血し、抗 TNP IgM 及び IgG 抗体を ELISA で測定した。ドット及びバーはそれぞれ各サンプルの測定値と平均値を示す (* $P < 0.01$)。

で測定した。図 16A に示すように、TA3-Ha 担癌マウスでの TNP-フィコールに対する抗体は、IgM と IgG でそれぞれコントロールに比して約 50% と 60% に減少した。TA 3-St 担癌マウスではほぼコントロールレベルであった。また、TNP-KLH を抗原とした場合は、いずれのマウスでも同レベルであった (図 16B)。MZB 細胞の減少と T 細胞非依存性抗原に対する免疫能の低下は良く一致した。

次に、正常マウスにムチン (BSM) を静注した場合に同様の現象が起こるか否かについて検討した。まず、蛍光標識した BSM を静注し、エピグリカニンと同様に脾臓マージナルゾーンに取り込まれることを確認した (図 17A)。正常マウスに隔日に 100 μ g の BSM を静注し、8 日後に脾細胞を調製し、CD1d、CD21 ダブルポジティブ細胞を解析した。図 17B に示すように、PBS を静注したマウスと比較して、MZB 細胞は 40% 以上減少した。従って、ムチンの直接的作用によって MZB 細胞が減少することを強く示唆した。

4) ムチンによる B 細胞情報伝達の抑制

次に、B 細胞の情報伝達におけるムチンの影響について検討した。ハプテンのニトロフェニル基 (NP) を認識する受容体 (BCR) とシグレック 2 を発現する安定株 (K46 μ m λ -シグレック 2 細胞; 東京医科歯科大、鏑田博士より供与) をエピグリカニン存在下で抗原 (NP-BSA) により同細胞を刺激した。細胞のライセートより、シグレック 2、SHP-1 をそれぞれ免疫沈降及び共沈させた。沈殿物を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後にシグレック 2 のリン酸化チロシン及び SHP-1 を検出したところ、いずれもエピグリカニン存在下では減少した (図 18A)。さらに、細胞のライセートを直接電気泳動し、ウエスタンブロッティング後、リン酸化 ERK1/2 を検出すると、リン酸化の減少が認められた (図 18B)。マウス脾臓 B 細胞を調製し、エピグリカニン存在下又は非存在下で抗 IgG F(ab')₂ により B 細胞を刺激した。その結果、同様にシグレック 2 のリン酸化の抑制、SHP-1 のリクルートの抑制及び ERK1/2 のリン酸化の抑制が見られた (図 18CD)。

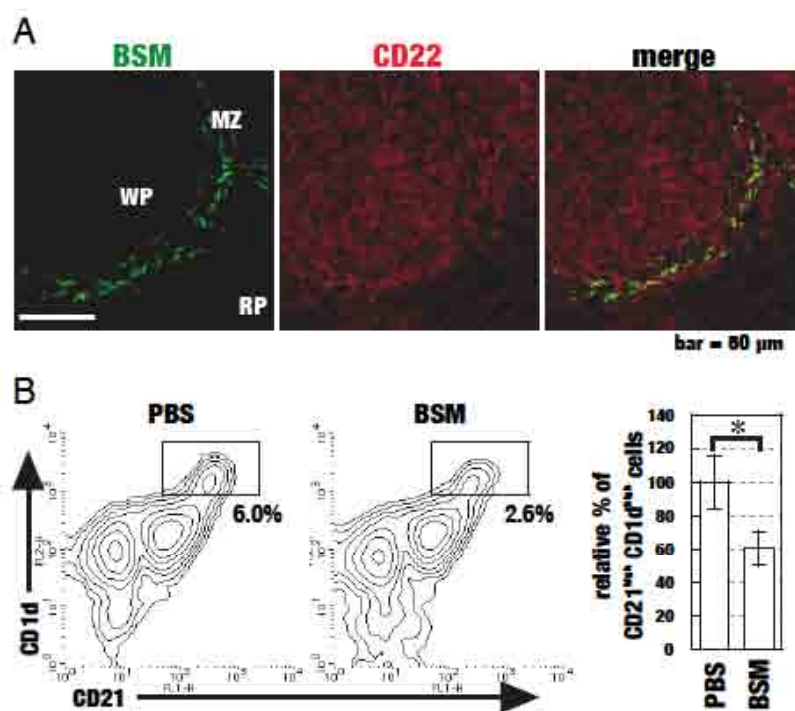


図 17. 正常マウス脾臓マージナルゾーン B 細胞に対する血中ムチンの影響

A : 正常マウスに蛍光標識した BSM を静注し、図 11 と同様に脾臓への取り込みを観察した。B : 正常マウスに BSM (100 μ g) を 1 日置きに静注し、8 日後に調製した脾細胞を FACS で解析し、CD21、CD1d 高発現細胞を比較した。ヒストグラムでは、コントロールの CD21、CD1d 高発現細胞を 100 として相対値を示した (n=9、P<0.05)。

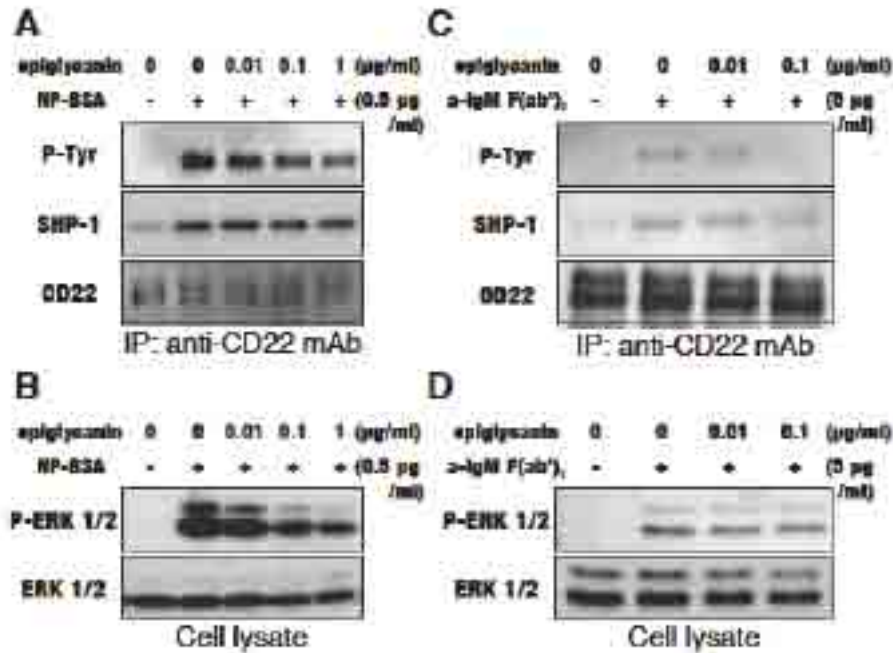


図 18. エピゲロカニン存在下における B 細胞受容体を介した情報伝達の抑制
 A, B: K46μλ-CD22 強制発現株における情報伝達; エピゲロカニン存在下、非存在下において、K46μλ-シグレック 2 細胞を NP-BSA で刺激後、リン酸化シグレック 2, SHP-1 のリクルート及びリン酸化 ERK1/2 を検出した。C, D: 正常マウスより調製した脾臓 B 細胞における情報伝達; エピゲロカニン存在下、非存在下で脾臓 B 細胞をヤギ抗 IgM F(ab')₂ 抗体で刺激後、リン酸化シグレック 2, リクルートされた SHP-1 及びリン酸化 ERK1/2 を検出した。

5) シグレック 2 とムチンの結合及び B 細胞情報伝達の抑制

ヒトシグレック 2 とムチンの結合についても検討した。シグレック 2 の可溶性組換え体、及びシアル酸の結合に必須な Arg120 の Ala 変換体を作成した。又、ヒト大腸癌由来細胞株 LS180 細胞の産生するムチン (LSM) を常法に従って精製した。さらに、COS7 細胞に FLAG タグ付き全長シグレック 2 あるいは Arg120 変換体を発現する安定発現株を作成した。プレートアッセイによりヒトシグレック 2 が LS180 細胞のムチンに結合することを示すと伴に、Arg120 の変換体では結合せず、シアル酸に特異的な結合であることを確認した (図 19AB)。さらに、シグレック 2 発現 COS7 細胞に、ビオチン化 LS180 ムチンを結合させ、蛍光標識ストレプトアビジンで観察した。図 19C に示すように、ムチンがシグレック 2 発現株には結合したが、Arg120 変換体発現株には結合しないことが確認された。また、ヒトバーキットリンパ腫由来 B 細胞株 Daudi 細胞を用いて B 細胞情報伝達に対するムチンの影響について検討した。Daudi 細胞にシグレック 2 が発現していることに加えて、同細胞に BSM は結合するがアシアロ BSM は結合しないことを FACS により確認した。LS180 ムチン存在下又は非存在下で抗 IgM F(ab')₂ で Daudi 細胞を刺激した。シグレック 2 を免疫沈降し、沈降物を電気泳動後ウエスタンブロッティングを行った。シグレック 2 のリン酸化及び共沈した SHP-1 を検出したところ、いずれもムチン処理により減少した (図 20AB)。また、ERK1/2 のリン酸化も同様に抑制されることがわかった。

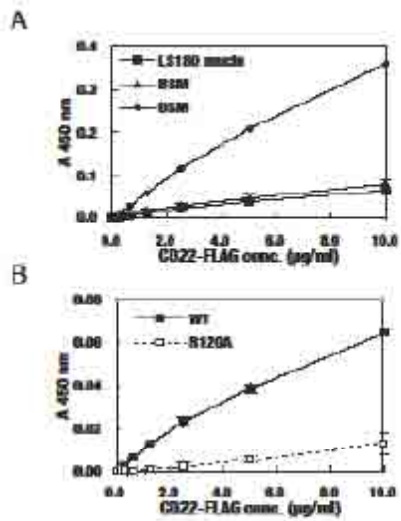


図 19. ヒトシグレック 2 へのムチンの結合

A: 可溶性シグレック 2 を LS180 ムチン、BSM 及び OSM を固相化したプレートに加え、FLAG タグに対する抗体で検出した。B: 可溶性シグレック 2 及び Arg120 を Ala に変換したシグレック 2 を LS180 ムチンを固相化したプレートに加え、FLAG に対する抗体で検出した。C: 野生型及び Arg120 変換型で膜結合部位をもつシグレック 2 (FLAG タグ付き) cDNA を CHO 細胞に導入し、安定発現株を得た。蛍光標識した LS180 ムチンの結合を観察した。

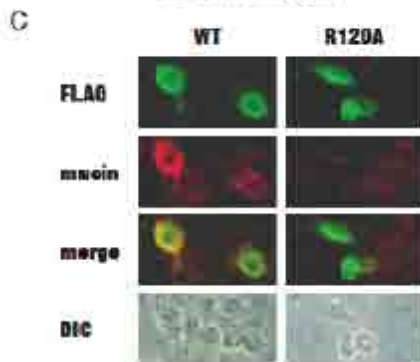
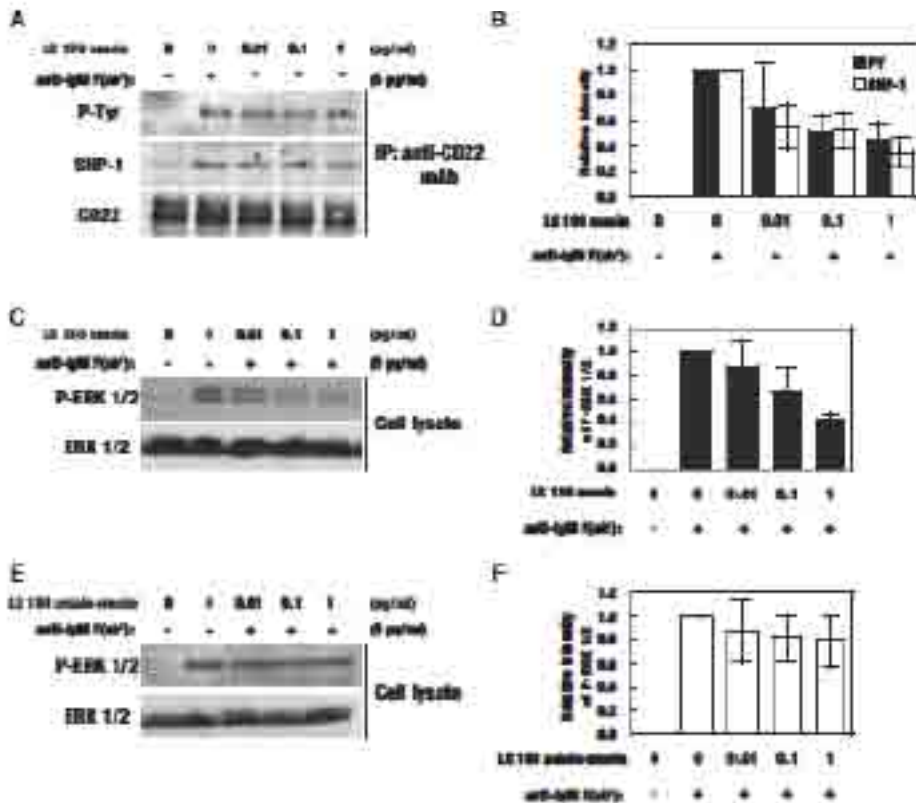


図 20. ムチン存在下における BCR を介した情報伝達の抑制

A, B: Daudi 細胞 (1×10^6 cells) をムチン存在下で 10 分間処理後、抗 IgM F(ab')₂ で 3 分間刺激した。ライセートより抗シグレック 2 抗体による免疫沈降物及び共沈物を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後にリン酸化 Tyr、SHP-1 及びシグレック 2 を検出し、Image J software で数値化した (n=3、average±SD)。C, D: 同様に処理した細胞のライセートを直接電気泳動し、ウエスタンブロッティング後にリン酸化 ERK1/2、ERK1/2 を検出し、数値化した。E, F: アシアロ LS180 ムチンを用いて同様の実験を行った。



(図 20CD)。また、この現象はアシアロムチンでは観察されなかったことより、シアル酸に依存した反応であることが確認された(図 20EF)。従来、シグレック 2 を介した B 細胞情報伝達への影響については、抗シグレック 2 抗体を用いて検討されてきた。その結果、BCR へのラフトへの移行とシグレック 2 の動きが連動しなくなり、B 細胞情報伝達は促進されるとされている。ムチンは巨大分子で分子上に多数のシグレック 2 結合部位をもち、B 細胞上の多数のシグレック 2 分子を架橋することが予想される。その結果、シグレック 2 に加えて BCR のラフトへの移行も影響を与えるため、情報伝達の抑制が見られるものと考えているが、さらに詳細な検討が必要である。

6) ヒト癌患者脾臓の組織化学的検証

上述したように、ムチン産生腫瘍の担癌マウスにおいて MZB 細胞の減少が見られた。抗シグレック 2 抗体で脾臓組織を染色した場合、濾胞全体の面積や数に変化が見られる可能性がある。癌患者血清中のムチンの存在量の目安として、シアリルルイス a 抗原量と脾臓組

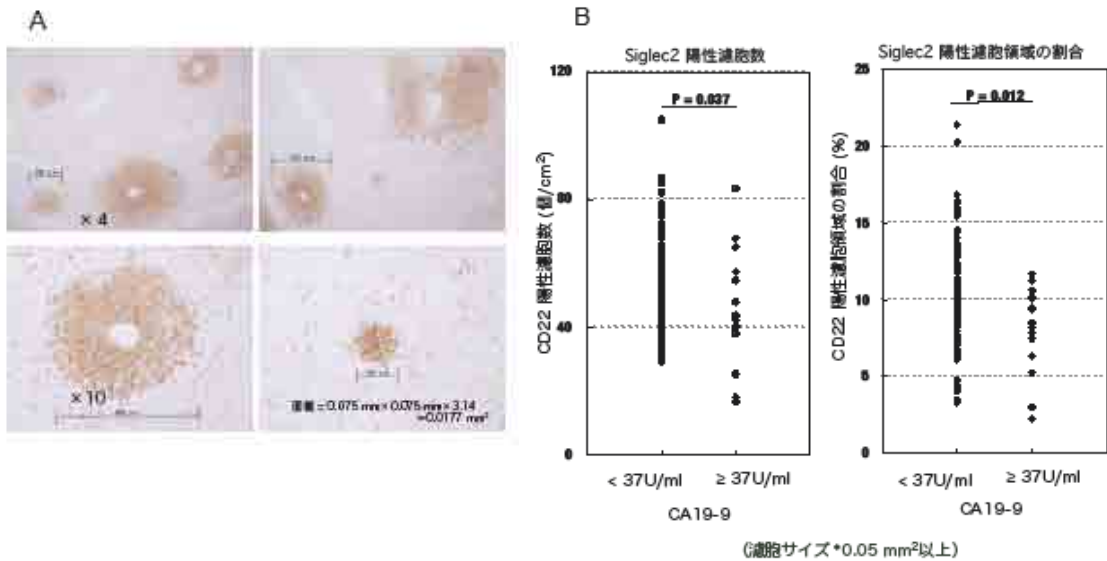


図 21. ヒト癌患者脾臓標本における濾胞と CA19-9 のレベル

A: ヒト癌患者脾臓の切片を抗シグレック 2 抗体を用いて染色した。B: それぞれのサンプルについて、単位面積当たりの濾胞数と全体の面積に対する濾胞の面積の割合を CA19-9 値が 37 ユニット以上と未満の患者で比較した。

織の抗シグレック 2 抗体による染色像を比較した。すなわち、シアリルルイス a 抗原 37 ユニット以上と未満の患者について、シグレック 2 発現細胞で占める集塊(濾胞)の面積と数について比較した。図 21AB に示すように、面積と数において、いずれもシアリルルイス a 抗原値が 37 ユニット以上の患者において有意に低いことがわかった。さらに、濾方面積が全体の 10% 以下の患者は、有意に 5 年生存率が低いことも明らかとなった(図 22)。これらの結果は、血中ムチンの作用によって B 細胞に影響するという担癌マウスの結果と符合するものである。

II-2. シグレック 9 を介したムチンの結合に伴う樹状細胞への影響

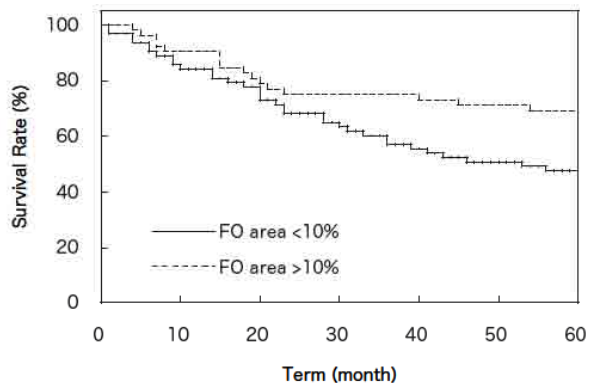


図 22. 担癌患者脾臓シグレック 2 陽性濾胞面積の割合と 5 年生存率

濾胞面積の占める割合で 10% を境界として患者を 2 分し、5 年生存曲線を示した。

樹状細胞の調製は、以下のように行った。健康人末梢血より末梢血単核球画分を調製し、抗 CD14 マグネティックビーズを用いて単球を得た。単球を GM-CSF 及び IL-4 存在下で 48 時間培養することにより、未熟樹状細胞を得た。さらに、LPS 存在下で 20 時間培養することにより成熟樹状細胞を得た(図 23A)。各種表面抗原については、分化に伴う CD14 の消失、CD83 や CD80 の発現など、従来の報告と一致する結果を得た(図 23B)。シグレック 9 は単球ではほとんど発現していないが、未熟樹状細胞で高発現となり、成熟樹状細胞で

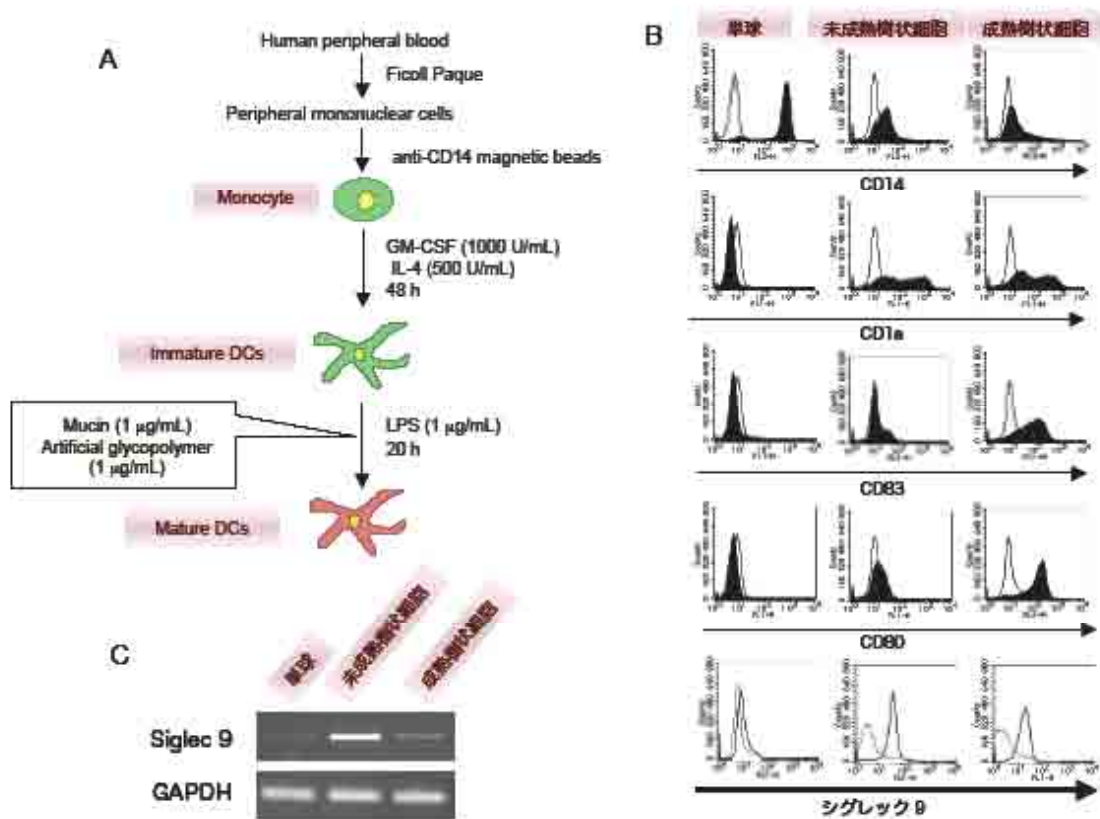


図 23. 樹状細胞の調製とシグレック 9 の発現

A : 健康人末梢血より単核球画分を調製し、抗 CD14 マグネティックビーズにより単球を得た。GM-CSF、IL-4 存在下で培養し未熟樹状細胞に誘導後、さらに LPS により成熟樹状細胞に分化させた。B : 表面抗原 (CD14、CD1a、CD83、CD80) 及びシグレック 9 の発現を、各抗体を用いて解析した。C : 単球、未熟樹状細胞、成熟樹状細胞より RNA を調製し、RT-PCR を行った。逆転写反応は 50 °C、30 分を行った。PCR は、シグレック 9 のセンスプライマー : 5' -CCTGAGGAACAGACGTCCCTC-3'、アンチセンスプライマー : 5' -AGTCTCTGCAGTTTCTCATCTGTG-3' を用いて、変性 : 94 °C、30 秒、アニーリング : 60 °C、30 秒、伸長 : 72 °C、120 秒の条件で、30 サイクルを行った。

は減少していた(図 23B)。この傾向は、シグレック 9 mRNA の RT-PCR でも確認された(図 23C)。次に、可溶性シグレック 9 を作成し(図 24A)、ヒト大腸癌由来細胞株 LS180 細胞より調製したムチン(LSM)、BSM、合成グリコポリマーへの結合をプレートアッセイにより確認した。シグレック 9 は BSM や LSM に結合することを確認するとともに、合成グリコポリマーでは、従来の報告の通り SA α 2-6 LacNAc より SA α 2-3 LacNAc に強く結合

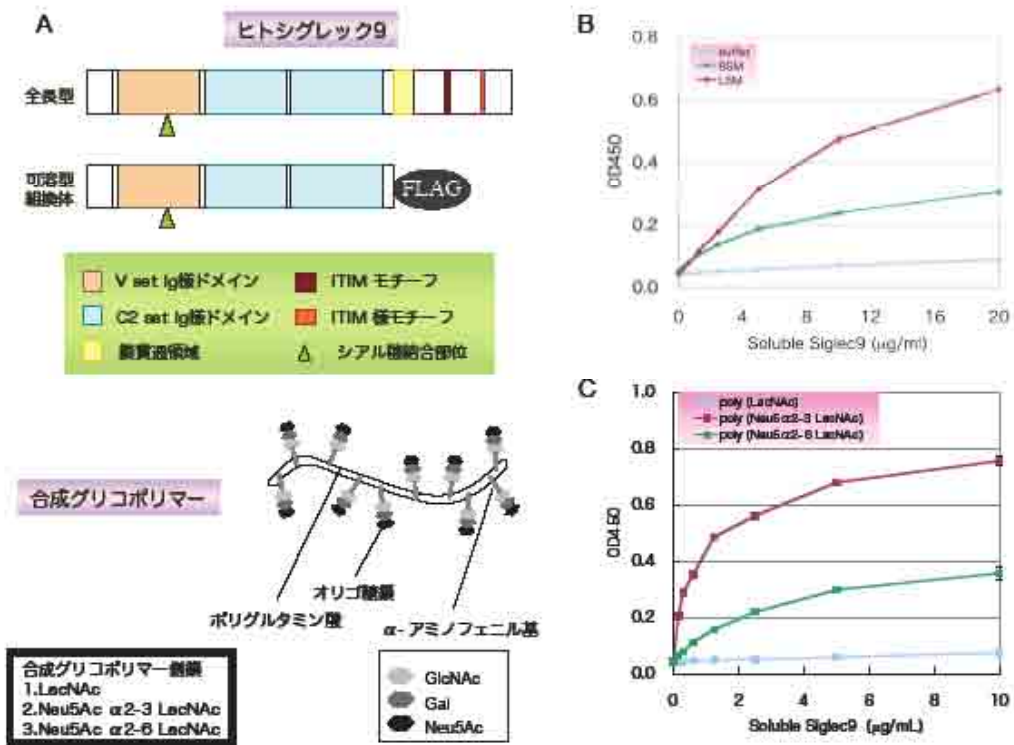


図 24. 可溶性シグレック 9 の調製とムチンへの結合
 A : 可溶性シグレック 9 の模式図。B, C : BSM, LS180 ムチン (LSM) (B)、合成グリコポリマー (C) (10 μg/ml) を固相化し、可溶性シグレック 9 (0-20 μg protein/ml) を加え、FLAG に対する抗体で検出した。

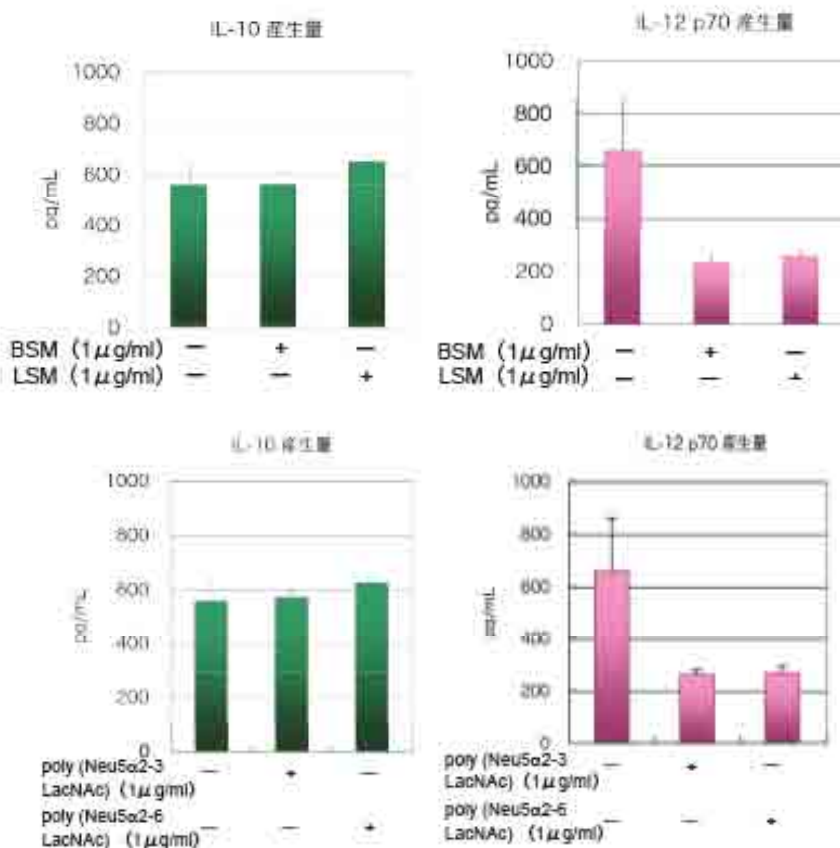


図 25. 樹状細胞のサイトカイン産生に及ぼすムチン (BSM, LSM)、合成グリコポリマーの影響
 未熟樹状細胞 (5×10^5 cells) を各種ムチン、合成グリコポリマー (1 μg/ml) の存在下又は非存在下で LPS (1 μg/ml) を加えて刺激した。20 時間後に上清を回収し、IL-12 p70 及び IL-10 を ELISA で測定した。

することを確認した(図 24BC)。次に、シグレック 9 を高発現している未熟樹状細胞の培養液中に LPS と伴にムチンを加え、サイトカイン (IL-10、IL-12) の産生に対する影響を検討した。BSM、LSM、合成グリコポリマーのいずれにおいても、IL-12 の産生量は著しく減少することがわかった(図 25)。さらに、同様の系で抗シグレック 9 抗体の存在下においても IL-12 の産生が抑制されることがわかった(図 26)。これらの結果は、ムチンの存在下で Th2 環境を促進する傾向があることを強く示唆している。

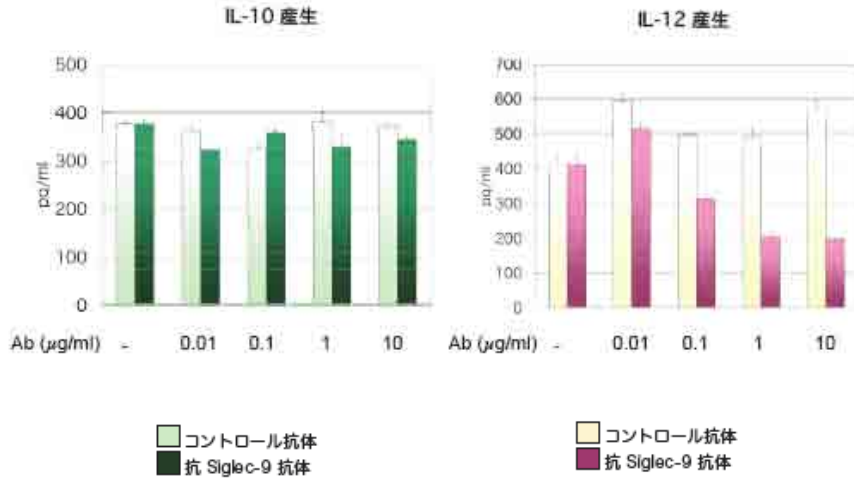


図 26. 樹状細胞のサイトカイン産生に及ぼす抗シグレック 9 抗体の影響
 図 25 と同様に、抗シグレック 9 抗体 (mAb) (0.01-10 µg/ml) 存在下で未熟樹状細胞を LPS (1 µg/ml) で刺激し、IL-12 p70 及び IL-10 を測定した。

II-3. シグレック 9 の膜結合型ムチンへの結合に伴う情報伝達

癌組織の微小環境においては、シグレック 9 を発現している免疫系細胞と癌細胞上の膜結合型ムチン上の糖鎖が相互作用する可能性がある。膜結合型ムチンとして MUC1 を取り上げ、シグレック 9 の結合に伴う MUC1 を介した情報伝達について検討した。なお、ここでは可溶性シグレック 9 及び MUC1 発現 3T3 細胞(図 27B)を用いた。図 27AC に示すように、

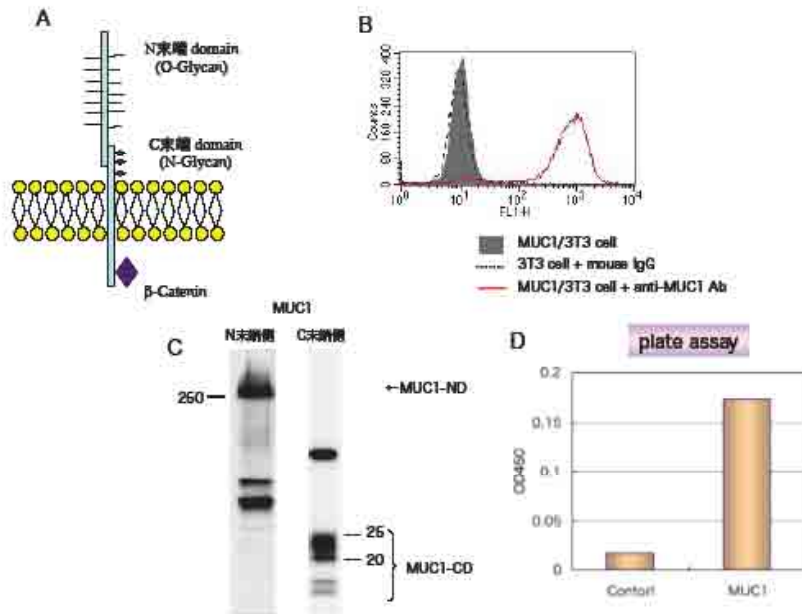


図 27. MUC1 の性質
 A, B : MUC1 の細胞膜上での存在状態 (A) と発現細胞の FACS による解析 (B) を示す。C : ライセートを電気泳動し、ウエスタンブロッティング後、抗 MUC1N 抗体 (N 末側を認識する抗体)、抗 MUC1C 抗体 (C 末側を認識する抗体) を用いて検出した。D : MUC1 を精製し、プレートに固相化後可溶性シグレック 9 の結合を確認した。

MUC1 は、膜上では N 末側のエクトドメインと膜を貫通した C 末側のドメインで構成され、細胞質側にβ-カテニンの結合部位をもつことが知られている。また、N 末側は培養液中に

シェディングされることから、培養液中より MUC1 を精製し、プレートに固相化し、可溶性シグレック 9 の結合を確認した(図 27D)。次に、MUC1/3T3 細胞の培養液中にシグレック 9 を加え、20 分後にライセートを調製した。抗 MUC1 抗体又は抗 β -カテニン抗体を用いて、ライセートより得た免疫沈降物を電気泳動し、ウエスタンブロットリング後に抗 β -カテニン抗

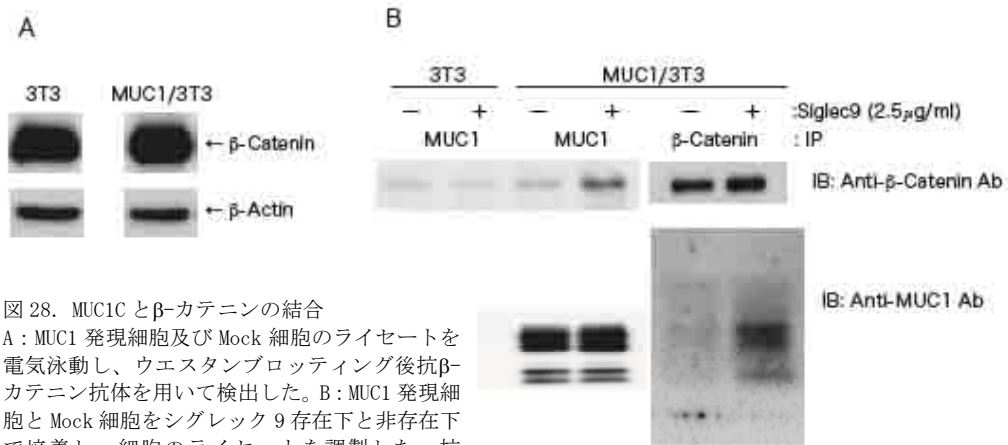


図 28. MUC1C と β -カテニンの結合

A: MUC1 発現細胞及び Mock 細胞のライセートを電気泳動し、ウエスタンブロットリング後抗 β -カテニン抗体を用いて検出した。B: MUC1 発現細胞と Mock 細胞をシグレック 9 存在下と非存在下で培養し、細胞のライセートを調製した。抗 MUC1C 抗体及び抗 β -カテニン抗体で免疫沈降し、沈降物を電気泳動した。ウエスタンブロットリング後、前者は抗 β -カテニン抗体、後者は抗 MUC1C 抗体を用いて検出した。

体又は抗 MUC1C 抗体 (MUC1 の細胞質側を認識する抗体) を用いて検討した。図 28 に示すように、シグレック 9 の結合に伴い、MUC1 の C 末側と β -カテニンの共沈が認められた。また、抗 β -カテニン抗体によっても MUC1C は共沈した。シグレック 9 の結合に伴う β -カテニンのリクルートについて、時間依存性を検討した。図 29 に示すように、20 分後がピークとなり、シグレック 9 の濃度が増すにつれて β -カテニンのリクルートも増加した。また、 β -カテニンはリン酸化されるとプロテオソームで分解されることが知られている。シグレック 9 の結合後の細胞質のリン酸化 β -カテニンを検出すると、時間経過と共に減少する傾向が見られた(図 30)。シグレック 9 の結合により β -カテニンがリクルートされ、リン酸化 β -カテニンが減少し、安定化するものと予想される。MUC1C と β -カテニンの結合物は核に移行し、増殖を促進することが知られている。シグレック 9 の結合の 1 時間後に、核内の β -カテニンを免疫染色した(図 31)。DAPI とマージする β -カテニンは、シグレック 9 の結合により増加する様子が観察された。また、核と細胞質を分画し、それぞれの画分の MUC1C と β -カテニンを検出した。シグレック 9 の結合により、核内の β -カテニンと MUC1C が増加することが確認された(図 32)。さらに、シグレック 9 存在下で MUC1/3T3 を培養した場合、72 時間後には MUC1 発現細胞において細胞増殖が \sim 50% 亢進することがわかった(図 33)。これらの結果は、癌組織微小環境において、シグレック 9 を介して免疫機能の抑制と癌細胞の増殖の促進がもたらされていることを示唆している。

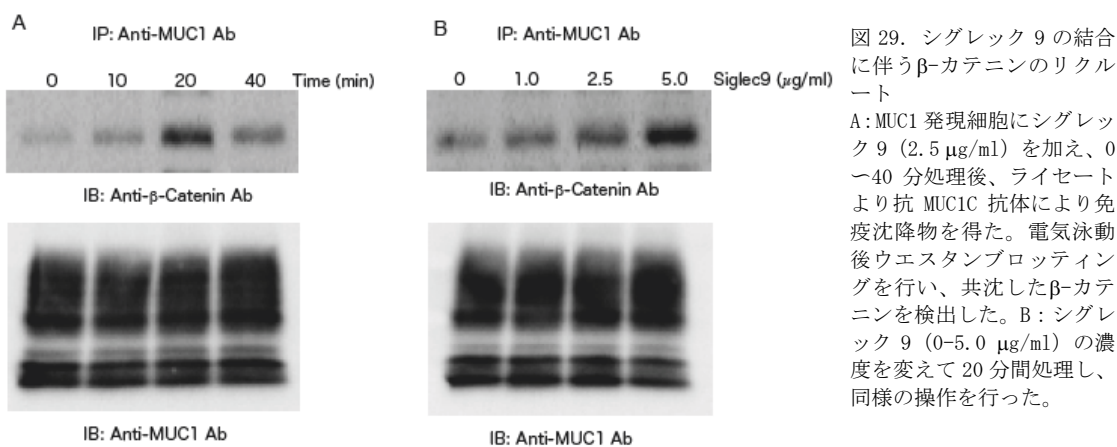


図 29. シグレック 9 の結合に伴うβ-カテニンのリクルート

A: MUC1 発現細胞にシグレック 9 (2.5 μg/ml) を加え、0～40 分処理後、ライセートより抗 MUC1C 抗体により免疫沈降物を得た。電気泳動後ウエスタンブロッティングを行い、共沈したβ-カテニンを検出した。B: シグレック 9 (0-5.0 μg/ml) の濃度を変えて 20 分間処理し、同様の操作を行った。

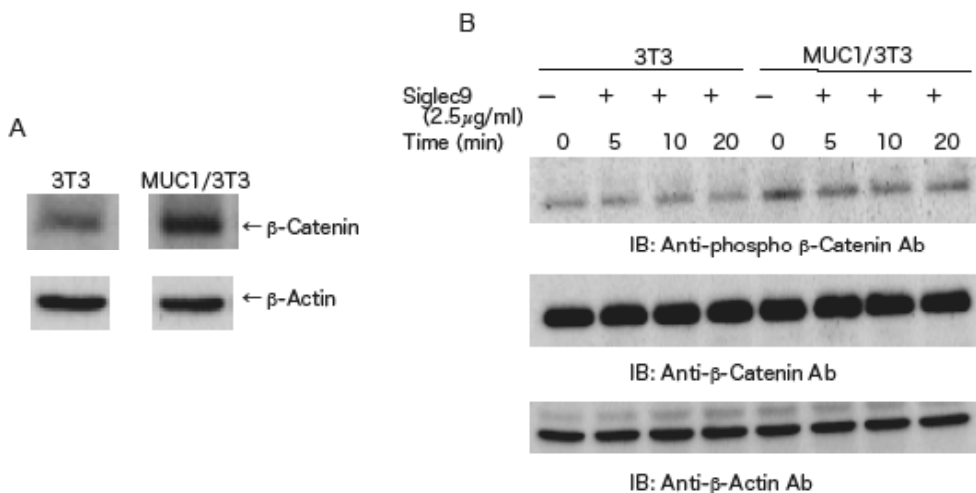


図 30. シグレック 9 の結合に伴うリン酸化β-カテニンの変化

A: MUC1 発現細胞及び Mock 細胞のライセートを電気泳動し、ウエスタンブロッティング後にリン酸化β-カテニンを検出した。B: シグレック 9 で刺激後、経時的にリン酸化β-カテニンを検出した。

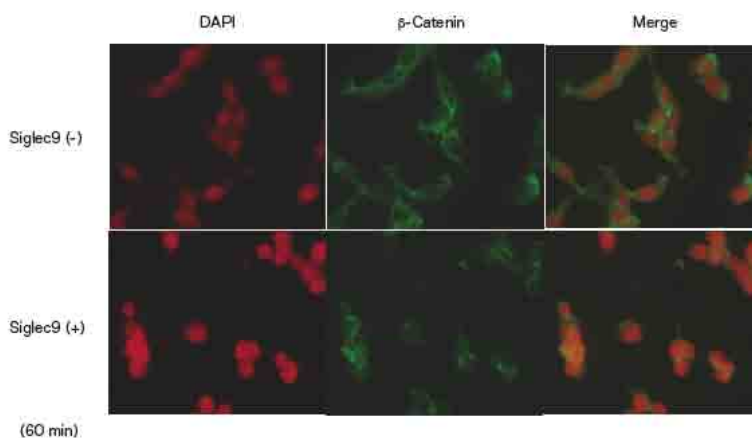


図 31. シグレック 9 の結合に伴うβ-カテニンの核移行
MUC1 発現細胞の培養液に可溶性シグレック 9 を加え、1 時間後に核内に移行したβ-カテニンを抗体を用いて観察した。

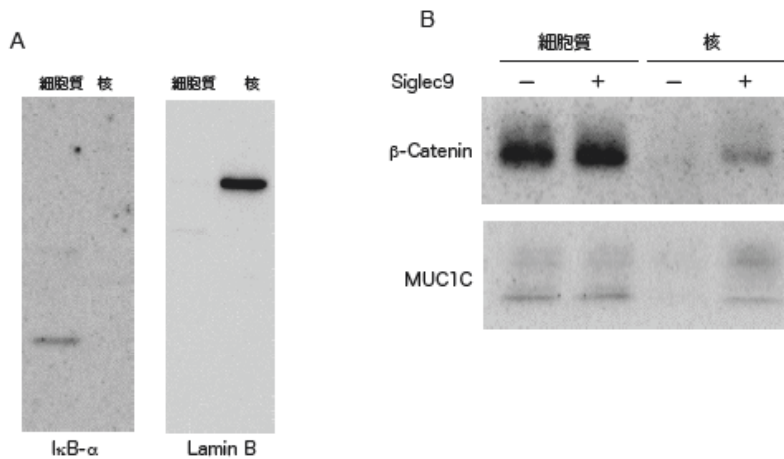


図 32. シグレック 9 の結合に伴うβ-カテニンの核移行
 A: 図 31 と同様に処理した細胞について、細胞分画を行った。細胞質及び核のマーカーとして、それぞれ IκB-α と Lamin B を検出した。B: MUC1 発現細胞の培養液にシグレック 9 を加え、1 時間後に細胞分画を行った。各画分を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に各抗体を用いてβ-カテニンと MUC1C を検出した。

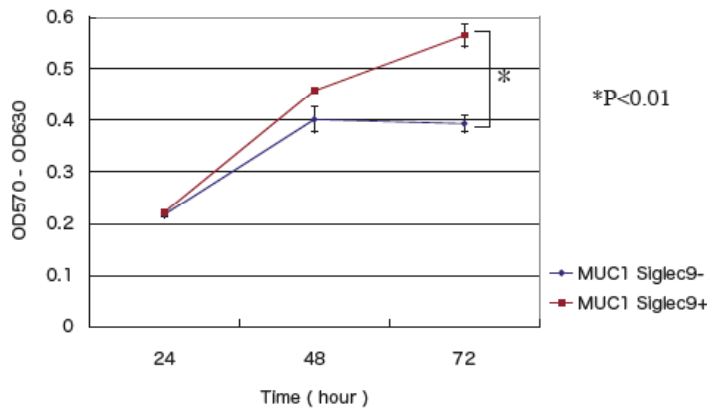


図 33. シグレック 9 による細胞増殖の促進
 MUC1 発現細胞をシグレック 9 (2.5 μg/ml) 存在下と非存在下で培養し、MTT アッセイで細胞増殖を測定した。

II-4. シグレック 3 を介した単球／樹状細胞へのムチンの影響

シグレック 3 発現細胞についてもムチンの結合に伴う影響について検討した。先ず、FLAG タグ付き可溶性シグレック 3 を作成した。ヒト大腸癌由来細胞株 LS180 細胞の産生するムチン (LSM) 及び BSM を固相化し、可溶性シグレック 3 の結合を確認した (図 34A)。なお、シグレック 3 についてもシアリル Tn 抗原を認識することが知られているので、LSM 上での同抗原の発現について LSM を固相化し、抗シアリル Tn 抗体 (MLS132) を用いたプレートアッセイにより確認した (図 34B)。次に、単球より未熟樹状細胞を経て成熟樹状細胞に至る過程でのシグレック 3 の発現について検討した。図 35 に示すように、シグレック 3 は分化過程を通じて一定量発現していることがわかった。ヒト末梢血より前述した方法により単球を調製し、LSM 存在下で分化誘導した場合、CD83 陽性細胞が著しく減少し、その効果は抗シグレック 3 抗体あるいは可溶性シグレック 3 を共存させることで部分的に減弱した。従って、CD83 陽性細胞の減少は、部分的にシグレック 3 を介した現象であることが示唆された (図 36)。また、アネキシン V を用いてアポトーシスした細胞を検出したところ、ムチンの濃度依存的に増加することがわかった (図 37)。さらに、抗

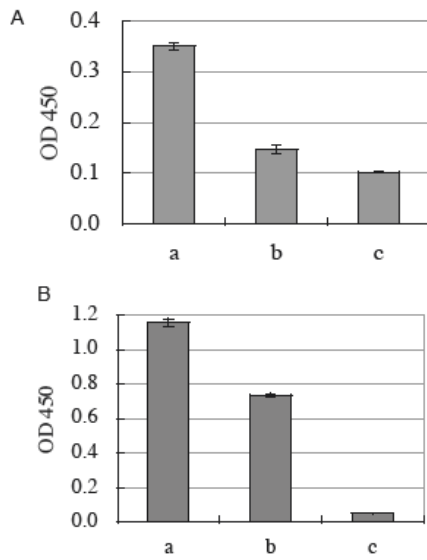


図 34. 可溶性シグレック 3 のムチンへの結合
 A: LS180 細胞より調製したムチン (a) 及び BSM (b) を固相化したプレート (c; コントロール) への可溶性シグレック 3 の結合を FLAG に対する抗体で検出した。B: LS180 ムチンを固相化したプレートへの抗シアリル Tn 抗体 (MLS132) (a)、抗 Tn 抗体 (MLS128) (b)、(c; コントロール) の結合を HRP-プロテイン G で検出した。

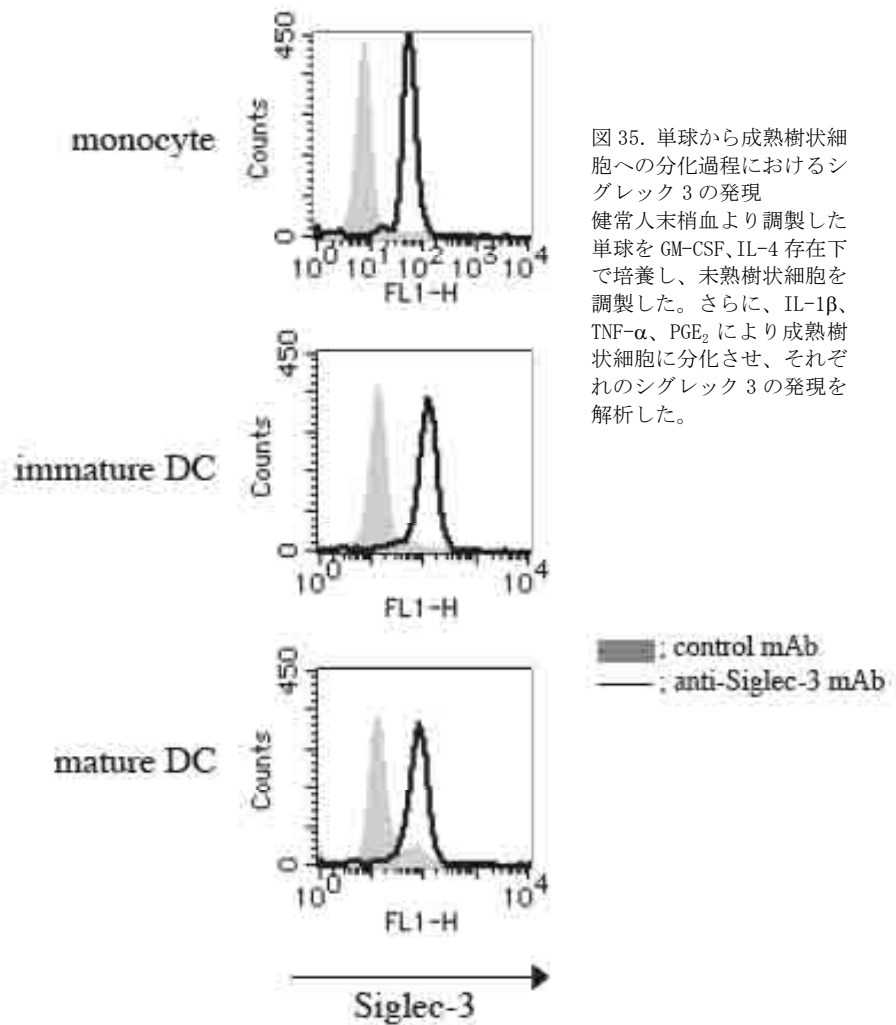


図 35. 単球から成熟樹状細胞への分化過程におけるシグレック 3 の発現
 健康人末梢血より調製した単球を GM-CSF、IL-4 存在下で培養し、未熟樹状細胞を調製した。さらに、IL-1 β 、TNF- α 、PGE₂ により成熟樹状細胞に分化させ、それぞれのシグレック 3 の発現を解析した。

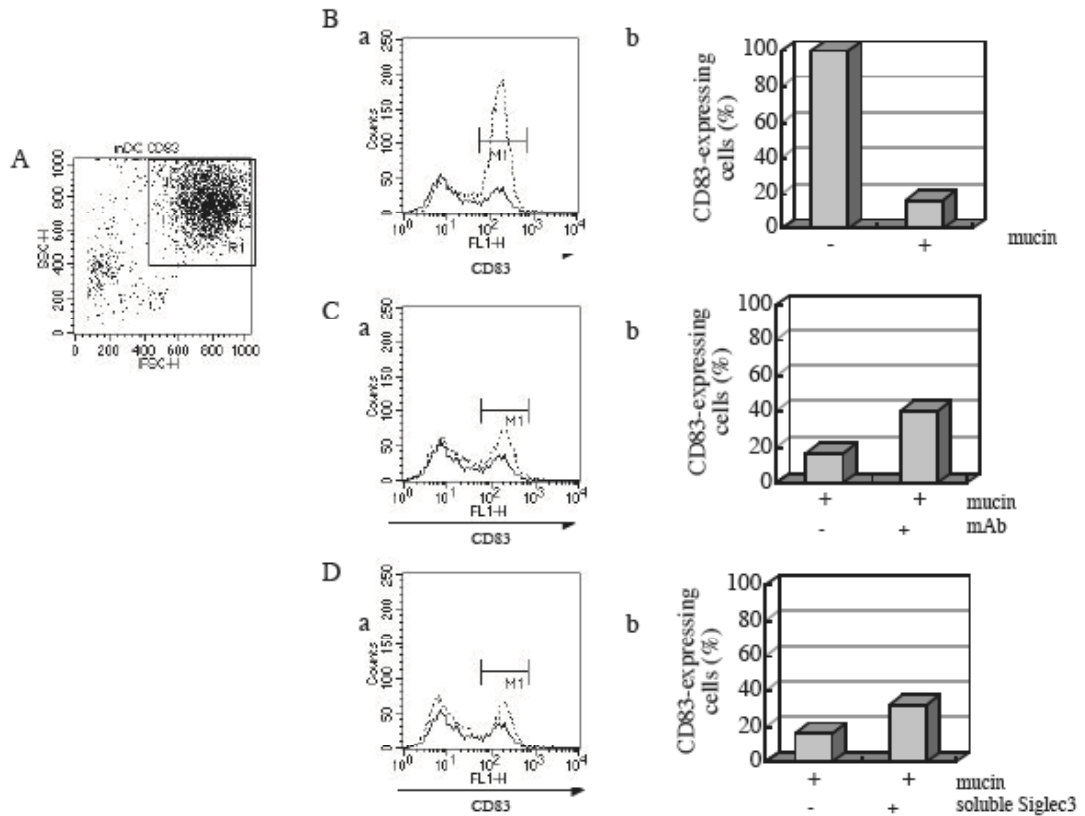


図 36. LS180 ムチン処理による CD83 の発現低下

A : 単球より誘導した成熟樹状細胞について、Forward versus side scatter analysis を行った。B : gate をかけた細胞集団を以下の解析に用いた。単球を LS180 ムチン (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下 (—) 又は非存在下 (---) で培養し、分化誘導後 CD83 の発現を解析した (a)。コントロールの CD83 陽性細胞を 100 として示した (b)。C : 単球を LS180 ムチン存在下 (—) 又は LS180 ムチンプラス抗シグレック 3 抗体 (mAb) 存在下 (---) で培養し、分化誘導後 CD83 の発現を解析した (a)。B のコントロールの CD83 陽性細胞を 100 として示した (b)。D : 単球を LS180 ムチン存在下 (—) 又は LS180 ムチンプラス可溶性シグレック 3 存在下 (---) で培養し、分化誘導後 CD83 の発現を解析した (a)。B のコントロールの CD83 陽性細胞を 100 として示した (b)。

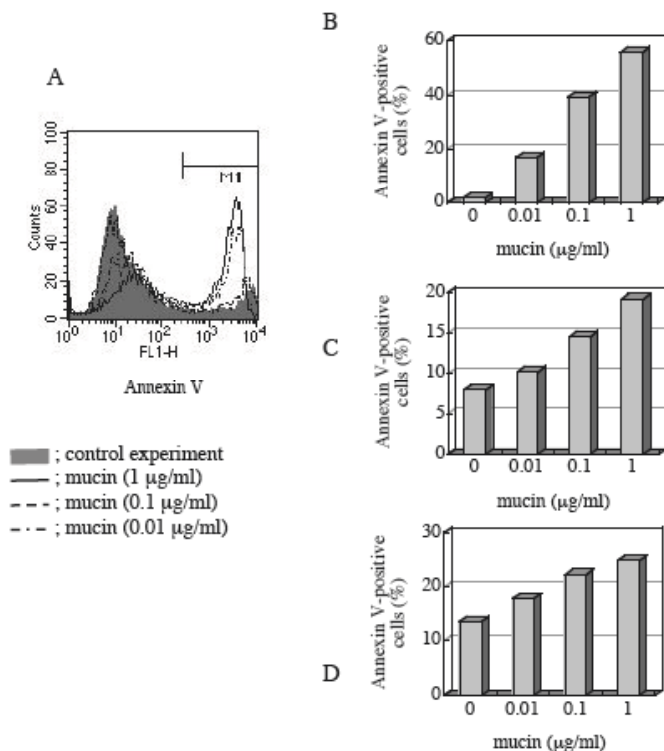


図 37. ムチン処理による樹状細胞のアポトーシス

A : 図 36 と同様に単球を LS180 ムチン存在下で培養し、FITC-アネキシン V の結合を解析した。B : A のアネキシン V 陽性細胞をヒストグラムで示した。C, D : 他のドナーの単球についての解析結果を示す。

グレック 3 抗体あるいは可溶性シグレック 3 の共存下で分化誘導したところ、アポトーシスされた細胞は部分的に減少することがわかった(図 38)。なお、この現象は、単球から未熟樹

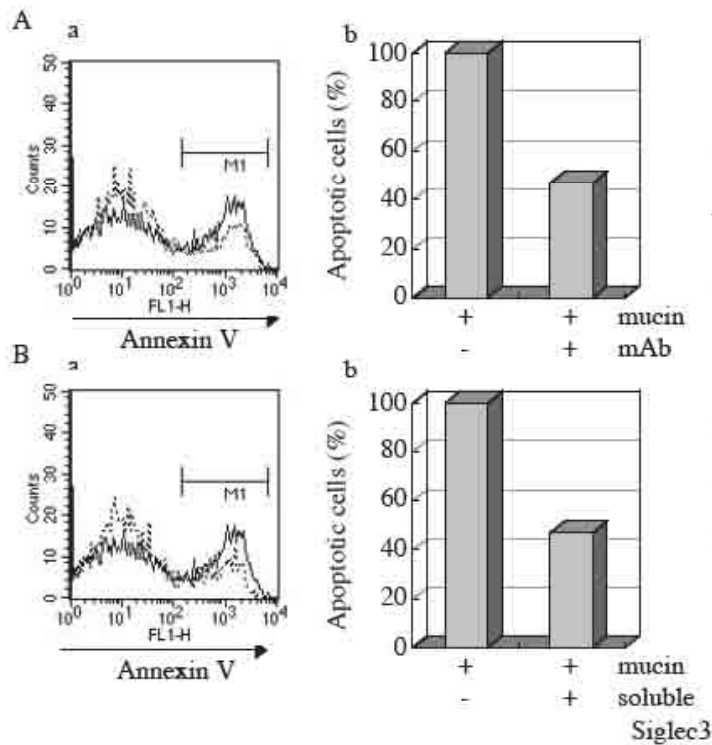


図 38. 抗シグレック 3 抗体又は可溶性シグレック 3 によるアポトーシスの抑制
 A: 図 36 と同様に単球を LS180 ムチン存在下 (—) 又は LS180 ムチンプラス抗シグレック 3 抗体 (mAb) 存在下 (---) で培養し、分化誘導後アネキシン V の結合を解析した (a)。LS180 ムチン存在下で誘導した細胞のアネキシン V 陽性細胞を 100 として示した (b)。B: 単球を LS180 ムチン存在下 (—) 又は LS180 ムチンプラス可溶性シグレック 3 存在下 (---) で分化誘導し、アネキシン V の結合を解析した (a)。LS180 ムチン存在下で誘導した細胞のアネキシン V 陽性細胞を 100 として示した (b)。

状細胞の分化過程にムチンを加えることによって認められることから、分化初期でのシグレック 3 を介した反応に由来するものと考えられる。担癌患者における樹状細胞の減少も報告されており、この現象もムチンを起点とした免疫機能の抑制の分子的背景の一つと考えられる。

[成果の位置づけや類似研究の比較のまとめ]

以上の内容をもとに、成果の位置づけを以下に記す。

担癌患者に見られる血流中のムチンは、主に腫瘍マーカーとして研究対象とされてきたが、癌患者の 5 年生存率などとの関連から癌細胞の増殖・進展あるいは癌の悪性化に関与する可能性が示唆されてきた。その分子的背景を解明することは、今後の臨床的応用を図る上で極めて重要であると考えられる。加えて、主たる糖鎖である O-グリカンの糖鎖生物学という視点からも興味深い内容をもつ。

シグレックを介した系では、ムチンの結合及びそれぞれのシグレック発現細胞における生物学的作用を明らかにした。特に、担癌状態で血流中のムチンの一部が脾臓マージナルゾーン B 細胞にシグレック 2 を介して結合することを示した。担癌状態の推移に伴って同組織の消失が認められた。この B 細胞は、T 細胞非依存性抗原に対する免疫応答を行うことが知られているが、担癌状態で明らかにその機能が低下していることを示した。さらに、ヒト癌患者標本においても、脾臓濾胞の形成と血液中シアリルルイス a 抗原量に一定の関係を認め、ヒトにおいても上記の現象を強く支持する結果となった。ムチンを対象としてもものでは、この領域の研究は国内外を問わずほとんど報告されていないが、シグレック 2 を対象とした研究では、同遺伝子の欠損あるいは糖鎖結合部位の欠損したシグレック 2 発現トランスジェニックマウスで、脾臓マージナルゾーンの消失が報告されている (Eur J Immunol 32, 562, 2002; Nat Immunol 5, 1078, 2004)。シグレック 3 や 9 を介した系においても、単球より樹状細胞への分化過程においてアポトーシスの誘導やサイトカインの産生に対して影響を与えることがわかった。MUC1 ムチンによる免疫抑制が報告 (J Immunol 175, 7764, 2005) されて

いるが、受容体との関連で明確にされた報告はない。生物学的作用としては、いずれの場合も免疫機能の低下をもたらすものであり、担癌状態での免疫能低下の分子的背景の一つを明らかにしたと考えている。スカベンジャーリセプター (SCR) を介した系では、ムチン産生腫瘍と非産生腫瘍担癌マウスでの *in vivo* での増殖速度の違いが、ムチンを起点とした SCR を介した情報伝達の結果として PGE₂ の産生亢進による可能性を示した。PGE₂ による血管新生の促進、免疫抑制などが癌組織微小環境における腫瘍の増殖を支える大きな要因と考えられる。ムチン産生腫瘍担癌マウスのみ COX2 阻害剤の効果が見られたことは、上記の結果を支持している。腫瘍増殖における COX2 の重要性は指摘されてきた (Cell 87, 803, 1996, Nature Med 2, 1048, 2001) が、その誘導機構は必ずしも明確になっていない。

過形成に伴う炎症という観点から関節炎におけるマクロファージの関与、その中でも SCR を介した系について検討した。可溶性 SCR を投与することによる滑膜の増殖抑制には特に注目している。本領域において SCR を対象にした研究は皆無と言って良い。

(2)研究成果の今後期待される効果

様々な免疫細胞においてムチンの作用が明らかになった。ムチンを対象とした研究において、機能的な解析は世界的に見ても端緒についたばかりと言えるが、今回の研究で基礎的には分泌型ムチンと膜結合型ムチンの機能的な相違点も見えてきた。膜結合型レクチンと分泌型ムチンの相互作用、膜結合型レクチンと膜結合型ムチンの相互作用 (細胞間相互作用) の解析を積み重ねることにより、担癌状態のムチンの機能の全体像を把握できると考えている。また、*in vivo* において、脾臓 B 細胞上のシグレック 2 と血液中のムチンが相互作用することを示したように、血液中の N-グリカンに富む糖タンパク質の存在下においても、ムチンの O-グリカンが反応しうることがわかった。この事実は、生理的状況下でムチン上の O-グリカンの生物学的機能を検討していく上で重要な意味をもつと考えられる。

一方、このような成果に基づく応用研究については、ムチンの作用による免疫抑制とムチンの作用の回避による免疫増強という 2 つの方向性がある。後者の場合の担癌状態における免疫能の回復という観点から検討中である。脾臓 B 細胞の場合は、担癌状態で抗ムチン抗体の静注によってマージナルゾーン B 細胞の減少が抑制される結果を得ているが、樹状細胞などの他の細胞を対象とした解析をもって全体像を把握する必要があると考えている。その上で、担癌状態におけるムチンの除去などの有効性を判定し、有意であればヒトなどへの応用を検討する。その前提として、マウス単クローン抗体のヒト型への変換は既に終えている。

また、抗炎症効果を期待しての SCR へのリガンドの結合をブロックする手法は、今後、過形成を伴う類癌症状を示す疾患に適用可能ではないかと考え、基礎研究を続行する予定である。

3.2 シアル酸含有オリゴ糖の調製とその糖鎖マイクロアレイを用いたシグレック 2 の結合する糖鎖構造の解析 (京都産業大 福井成行グループ)

(1)研究実施内容及び成果

シグレック 2 が結合する糖タンパク質のシアル酸含有糖鎖の特異性を探るために、シグレック 2 が結合すると報告されているウシ顎下腺ムチン (BSM) を材料とした。通常、ムチン型糖鎖の分離にはアルカリ還元処理が用いられるが、糖鎖の還元末端が糖アルコールとなるために化学修飾が困難であった。また、ムチン型糖鎖のヒドラジン分解法も考案されているが、この方法ではシアル酸が最終的に全て N-アセチル型となり、N-グリコシル型を失う致命的な欠点がある。最近、ムチン型糖タンパク質からアルカリ還元処理により遊離させた O-グリコシド型糖鎖の糖アルコールを緩和な条件下での過ヨウ素酸酸化により、還元末端の糖アルコールの 4 位と 5 位の炭素を切断し、アルデヒド基にする方法が考案された。そこで、還元性をもたせたムチン型糖鎖にアミノ基を有するホスファチジン酸誘導体を共有結合させ、ネオグ

ライコリピドを作製した。ネオグライコリピドは、ニトロセルロース膜に固相化が可能であり、微量糖鎖を網羅した糖鎖マイクロアレイを作成することができる。

最初の実験として、BSM から遊離した糖鎖やヒト乳由来の糖鎖（市販の Lacto-tetraose を基本骨格とする様々な糖鎖）を用いて、蛍光をもつ ADHP でネオグライコリピド化して糖鎖マイクロアレイを作製した。先ず、調製したネオグライコリピドの糖鎖構造を質量分析により決定することを試みた。英国 Imperial College の Chai 博士に依頼して ADHP 化ネオグライコリピド質量分析を行った結果

表 1

Structure	Molecular Weight		
	H ⁺	Na ⁺	2Na ⁺
6-OY-ADHP	955	977	
3-OX-ADHP	1056	1078	
NeuAc-6-OY-ADHP	1246	1268	1290
NeuGc-6-OY-ADHP	1262	1284	1306
GlcNAc-3-OX-ADHP	1259	1281	1303
Gal-GlcNAc-3-OX-ADHP	1421	1443	1465
Fuc-Gal-GlcNAc-3-OX-ADHP	1567	1589	1611
NeuAc-Gal-GlcNAc-3-OX-ADHP	1712	1734	1756
NeuGc-Gal-GlcNAc-3-OX-ADHP	1728	1750	1772

を表 1 に示す。検出された糖鎖を表中に着色して示した。GalNAc₁ の 6 位にシアル酸が結合していないときに得られる分子量 955 あるいは 977 の 6-OY-ADHP はいずれの画分(糖鎖)からも全く検出されず、BSM 由来の酸性糖鎖は全て、還元末端の GalNAc の 6 位の炭素にシアル酸が結合していることが分かった。また、還元末端の GalNAc の 3 位の炭素から伸長した糖鎖には、シアル酸が結合した構造から由来する分子量 (H⁺型として、1712 あるいは 1728) のシグナルは全く検出されなかった。従って、BSM 分子に含まれるシアル酸としては、還元末端の GalNAc に α 2,6 結合した構造のみであることが分かった。そこで、BSM 由来の糖鎖から Sia α 2,6GalNAc₁ を過ヨウ素酸酸化して還元性をもたせ ADHP と結合させた糖鎖、NeuAc-CC-ADHP、NeuGc-CC-ADHP を用いて糖鎖マイクロアレイを作成したが、シグレック 2 に対して全く結合シグナルを与えなかった。この理由として、後で判明したことであるが、シグレック 2 の糖鎖への結合は K_d 値が 1 mM 程度と非常に弱く、微量糖鎖の場合はシグレック 2 が膜面から容易に遊離すること、及びシグレック 2 の糖鎖への結合には GalNAc の存在が必須であることが考えられる。この事実は、後に、他の研究者による研究で、シグレック 2 は還元末端の GalNAc に α 2,6 結合した糖鎖 (Sia α 2,6GalNAc₁) に弱いながらも結合することが明らかにされた。従って、消去法的な結論であるが、シグレック 2 は BSM 分子上の Sia α 2,6GalNAc 残基に弱いながらも結合するが、その糖鎖がクラスター状に存在するために結合が増強されたものと推察された。

次に、他のシグレックについて識別するシアル酸含有糖鎖の特異性を明らかにす

るために、入手可能な糖鎖としてタイプ 1 型と 2 型の小糖 (4 糖) の Lacto-(neo)tetraose を基本骨格として、シアル酸やフコースを酵素的に転移させて様々な糖鎖を生合成し、リガンドとなる糖鎖の検索を試みた。糖鎖マイクロアレイ (S. Fukui, et al., *Nature Biotechnology*, 20, 1011- 1017 (2002)) を作成して、その結合シグナルの有無を検索したところ、シアル酸認識タンパク質のみの現象であったが、通常の BSA をブロッキング剤とするアッセイ条件では全く結合シグナルを検出できなかった。pmol レベルの微量糖鎖であることが原因である可能性もあり、アッセイ系の改良を試みた。これまでの糖鎖マイクロアレイでは、糖鎖を識別する抗体や細胞接着分子のリガンド糖鎖の検出には、ニトロセルロース (NC) 膜への非特異的な結合を防止する目的でブロッキング剤として BSA や casein などを用いた。しかし、糖鎖に対する結合が相対的に弱く、解離定数が 10^{-9} - 10^{-6} mol 程度である細胞増殖因子やサイトカイン、ケモカインの硫酸化ムコ多糖鎖への相互作用を比較する場合には、電気的な結合に加えて NGL に起因する疎水結合が無視できなくなり、本来の相互作用の検出が妨げられることがわかった。そこで、解離定数がシグレックと同レベルであるとされる細胞増殖因子やサイトカイン、ケモカインを材料として、リガンド糖鎖としてイズロン酸残基に注目して硫酸化ムコ多糖鎖への結合をモデル実験とした。鎖長の異なる様々な糖鎖を網羅した糖鎖マイクロアレイを作成し、認められる疎水結合や静電的な相互作用による非特異的な結合を防止する方法を検討した。様々なブロッキング剤や界面活性剤を検討した結果、図 1 に示すように、NC 膜を 1% polyvinylpyrrolidone (PVP) と 0.05% Tween で前処理すると共に、更なるブロッキング剤として 0.1% ovalbumin を追加することにより、疎水結合による非特異的な結合が軽減された。またリガンド糖鎖の負の電荷に起因すると考えられる静電的な非特異的な結合は、overlay 時の NaCl 濃度を 0.15M から 0.3M に上昇させることによって除去することができた。その結果、デルマタン硫酸 (DS) 鎖を識別するとされる HGF/SF、KGF (FGF-7)、Heparin cofactor II は 8mer 以上の DS 鎖に選択的に結合すること、RANTES は DS 鎖に限らず、その結合は鎖長 (負の電荷量) に依存した静電的な結合であることを明らかにした。

そこで次に、タイプ 1 型と 2 型の小糖 (4 糖) の Lacto-(neo)tetraose (LNT, LNNT) を基本骨格とし、シアル酸 (NANA) が $\alpha 2, 3/\alpha 2, 6$ で結合し、N - アセチルラクトサミンの Gal が $\beta 1, 3/\beta 1, 4$ で結合した構造をもつ糖鎖や、フコース転移酵素組換体を用いて Gal/GlcNAc 残基に $\alpha 1, 2/\alpha 1, 3/\alpha 1, 4$ 結合でフコースを付加した糖鎖等を用い、シアル酸を識別して結合するとされるタンパク質のリガンドとなる糖鎖を的確に single out 出来るか否かを検討した。レクチンとしては、糖鎖との解離定数が 10^{-6} - 10^{-3} mol 程度であるのものを選択した。一般的に、シアル酸残基を認識する植物レクチン (SNA, MAA) やヒトシグレック (シグレック 2, シグレック 3) においては、微量糖鎖を用いた場合、結合シグナルの検出は困難とされている。しかし、数 pmol の NGL 化糖鎖であっても感度よく結合シグナルが検出できる糖鎖マイクロアレイならばアッセイ系の工夫で可能になると考えた。

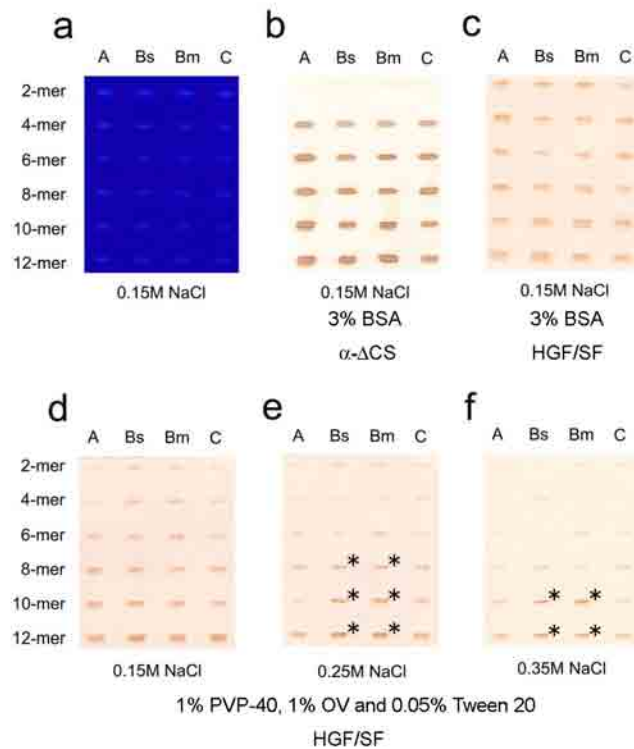
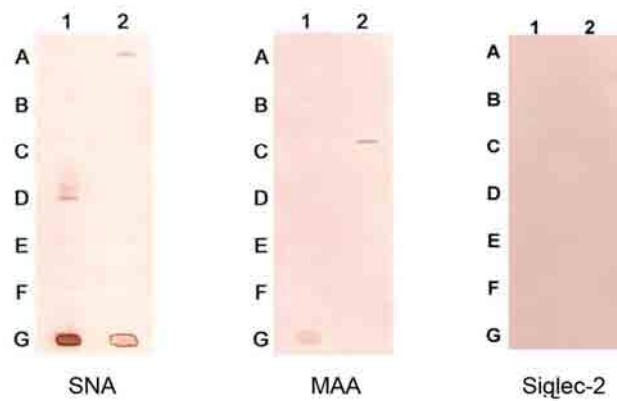


図 1 Surveying the features of HGF/SF-binding oligosaccharides within arrays derived from chondroitin sulfates A, B and C.

フコース含有糖鎖の酵素合成は現在も継続しているが、質量分析や抗体を用いた確認が出来ていないため、今回の実験には用いることが出来なかった。図 2 には LNT, LNNT を基本骨格として、シアル酸 (NANA) が $\alpha 2, 3/\alpha 2, 6$ 結合した糖鎖、ヒト Fetuin (スポット 1、図中の G1) 及びヒト $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質 ((スポット 1、図中の G2) 由来のシアル酸が結合する Gal が $\beta 1, 3$ 結合/ $\beta 1, 4$ 結合で GlcNAc に結合した糖鎖、及びウシ脳から分離したガングリオシド (GM1) を出発原料としてシアル酸が Gal 残基に $\alpha 2, 3/\alpha 2, 6$ 結合した合成糖鎖などを用いて、糖鎖マイクロアレイによるアッセイ系の検討を行った結果を示す。糖鎖認識タンパク質としては、動物レクチンであるシグレック (シグレック 2、シグレック 3) 及びシアル酸残基を認識する植物レクチン (SNA, MAA) を用いた。その結果、シアル酸含有糖鎖の場合も硫酸基含有糖鎖の場合と同様に、ブロッキング剤として BSA を用いると結合シグナルを検出することができなかった。しかしながら、PVP と Tween 20 を用いた改良分析系では、SNA, MAA やシグレック 3 の結合する糖鎖を的確に single-out することができた。Kd 値が 1mM と他のもの比べて高く、洗浄の過程で容易に解離すると考えられるシグレック 2 については、検出することが出来なかった。特に、SNA では $\alpha 2, 6$ 結合したシアル酸残基を有する糖鎖であってもシアル酸に結合した Gal が $\beta 1, 4$ 結合で GlcNAc に結合した糖鎖に特異性が高いこと、MAA では $\alpha 2, 3$ 結合したシアル酸残基を有する糖鎖であってもシアル酸に結合した Gal が $\beta 1, 4$ 結合で GlcNAc に結合した糖鎖でないことと結合しないことをも明らかにすることができた。すなわち、この糖鎖マイクロアレイは、シグナルの相対的な強弱から、シアル酸が結合する糖の Gal の結合様式も区別できることを示している。しかし、シグレック 2 については、結合親和性が弱いため、洗浄過程の無いアッセイ系 (たとえば蛍光を用いた FRET 法など) の工夫が必要であると考えられた。また、図は示さなかったが、Gal β



NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc	A1
NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc	A2
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	B1
Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	B2
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	C1
NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	C2
NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	D1
Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc	D2
Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc	E1
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc	E2
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc	F1
NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc < NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc	G1
NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc < NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc	G2

Binding specificity of MAA

NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	++
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc	-

Binding specificity of Siglec-3

NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	++
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	+
NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	++
NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc	±
NeuAc α 2,3Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc	+

Binding specificity of SNA

NeuAc α 2,3Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,6Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	++
NeuAc α 2,3Gal β 1,4Glc	-
NeuAc α 2,6Gal β 1,4Glc	+

	PNA	RCA
Gal β 1,3GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	++	++
Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β 1,4Glc	-	++
Gal β 1,3GalNAc β 1,4Gal β 1,4Glc	++	++
Gal β 1,3GalNAc β 1,4(NeuAc α 2,3)Gal β 1,4Glc	+	+

☒ 2

1, 3GalNAc を認識するとされる PNA や、Gal β 1, 3/4GlcNAc を認識する RCA などのレクチンでは、BSA による阻害効果は認められなかった。BSA は負に荷電した糖鎖への結合に阻害的に働くことが考えられ、その原因の一つが、BSA にはカルボキシル基の数が多く（等電点；pH 4.6）、中性の緩衝塩溶液ではが電離して負の電荷を帯びることによる拮抗作用が働いたためと考えられる。糖鎖マイクロアレイは微量な固相化糖鎖に対して高感度に結合シグナルを検出できる特徴を備えている。その一例として、一般的に Gal β 1, 3GalNAc を認識するとされる PNA では、図 2 の結合特異性の表中に示したように、Gal β 1, 3GlcNAc にも強い結合シグナルを与えているが、GM1 糖鎖に見られるように、Gal β 1, 3GalNAc の結合する Gal がシアル酸で修飾されると結合が弱められた。この結果は PNA の認識する糖鎖は 3 糖構造であり、非還元末端の Gal が β 1, 3 であれば GalNAc でも GlcNAc でもかまわないが、3 番目の Gal が修飾を受けると結合が弱まることを示唆している。

また、結果として示さないが、糖鎖マイクロアレイ法を用いた抗 GAG 抗体(WF6)の抗原決定基の検索を行ったところ、WF6 は糖鎖構造を異にする Δ D-C-C-C と Δ C-C-A-D に結合するが類似の構造である Δ C-A-D-C や Δ C-C-C-C には結合しなかった。分子モデルの計測から Δ D-C-C-C と Δ C-C-A-D には共通した分子位置に官能基が配座することが示され、糖鎖認識抗体は必ずしも糖鎖内の糖の結合位置やアノメリックのみならず、糖の組成が異なっても認識する場合があることを示すことができた。

(2)研究成果の今後期待される効果

今後、他のシグレック分子における糖鎖結合様式の特異性を調べると共に、アッセイにおけるリガンド糖鎖への結合に関連して、NGL との相互作用の立体障害による結合阻害の有無を検討する必要がある。そのために、天然糖鎖として、シアル酸が α 2, 6 結合した糖鎖、あるいは high-mannose 型の N-グリコシド型糖鎖も加える。現在、容易に調製可能な材料として、ニワトリ卵黄および卵白に含まれるそれぞれ vitellogenin や ovalbumin の糖鎖が最適と考え、糖鎖の分離・精製を行っているところである。また同時に、糖鎖内部の GlcNAc 残基に Fuc の結合した Lewis 型の血液型関連糖鎖も検討するために、創価大学西原教授から提供された発現系を用いて recombinant の FucT-III や VI などを大量に調製し、LNT や LNNT などの 4 糖を出発原料として酵素的に Lewis 型 6 糖を調製している。

これまでに、シアル酸含有糖鎖を識別できる糖鎖マイクロアレイのアッセイ系をほぼ確立できたので、将来への発展として、シアル酸が関与するとされる病変の原因解明や診断への応用を考えている。現在、感染と病原性に糖鎖が関わりと推察されている *H. pylori* の colonization や Influenza A virus に注目している。胃潰瘍や胃癌の原因菌とされるピロリ菌では宿主細胞表面への菌の結合と好中球の活性化誘導に関わりとされる BabA, SabA, NP-NAP の識別する糖鎖の詳細な構造を明らかにし、病変の原因解明や診断への応用に役立てたい。また、A 型鳥インフルエンザウイルスでは、鳥型からヒト型への変異の過程で生じるとされる、HA タンパク質の認識するリガンド特異性が NeuAc α 2, 3Gal から NeuAc α 2, 6Gal へと変異する過程に関して、宿主の受容体であるシアル酸含有糖鎖の内部構造も含め、結合糖鎖特異性の変異の過程を追跡して、A 型鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染防御へ向けての一助となればと思っている。

3.3 シグレックおよびスカベンジャーリセプターに結合する人工ムチンの合成(静岡大グループ)

(1)研究実施内容及び成果

I. 人工ムチンの化学酵素合成

これまでに上皮癌細胞が分泌するムチンが、シグレックやスカベンジャーリセプターに結合し、免疫システムを介したシグナル伝達に深く関与していることを示して

きた。

そこで、天然ムチンを模倣した人工ムチンを構築し、免疫システムに関する可溶性シグレック及びビスカベンジャーリセプターとの結合特異性を精密有機化学的に解析する目的で、*O*型糖鎖構造を有し分子サイズ、糖鎖構造、糖鎖導入率の異なる α -L-ポリグルタミン酸 (α -PGA) をベースとした様々なシアル酸含有人工ムチンライブラリーや硫酸糖含有人工ムチンライブラリーを作製した。(図1)。

II. シアル酸含有人工ムチンの合成

人工ムチン合成のためのシアル酸含有オリゴ糖を下記のように酵素合成した。アクセプターとして LacNAc β -pNP、ドナーとして UDP-GlcNAc 及び UDP-Gal を使い、 β 3GnT II と β 4GalT I を順次使用することにより、LacNAc の繰り返しを 2, 3 個含む (LacNAc) $_m$ β -pNP ($m=2, 3$) を酵素合成した。このうち、(LacNAc) $_3$ β -pNP が主生成物であり、アクセプター当たり 35%の収率で得られた。

以上のように合成した糖鎖を用い人工ムチンを構築した。(LacNAc) $_m$ β -pNP ($m=1\sim 3$) のニトロ基をアミノ基に還元後、 α -ポリグルタミン酸 (α -PGA) の γ -カルボキシル基に縮合反応し、様々な糖鎖置換度 (DS, 11~67%)、分子量 (MW, 10 ~ 330 kDa)、及び異なる長さの糖鎖をもつ Poly[(LacNAc) $_m$ β -pAP/Gln-co-Glu] ($m=1\sim 3$) を合成した。これをアクセプターに使い、CMP-Neu5Ac をドナーとして、 α 2, 3/6-(*N*)-シアリルトランスフェラーゼによりシアリル化を試みたところ、ほぼ定量的にシアル酸が導入された Poly[Neu5Ac α 2-3/6(LacNAc) $_m$ β -pAP/Gln-co-Glu] ($m=1\sim 3$) を合成することができた(図2)。

III. シアル酸含有人工ムチンとシグレック 2 の相互作用解析

ELISA 法による人工ムチンとシグレック 2 との相互作用解析を行った。直接 ELISA 法により、人工ムチンとシグレック 2 との相互作用解析の結果、シアル酸が α 2-6 結合した構造を有する人工ムチンに対し、シグレック 2 との結合が確認された。一方、レクチン活性を欠損した変異体シグレック 2 (R120A) に対しては人工ムチンに結合しなかった。従って、人工ムチンに導入された糖鎖が特異的にシグレック 2 に結合することがわかった。間接競合 ELISA 法により、種々の人工ムチンのシグレ

図1 天然ムチンと人工ムチンの模式図

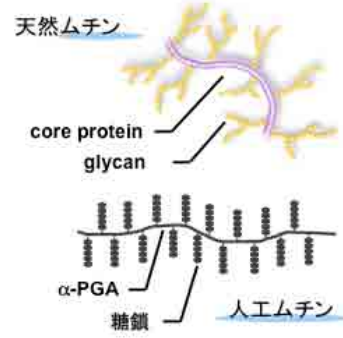


図2 シアル酸含有ムチンの化学・酵素合成

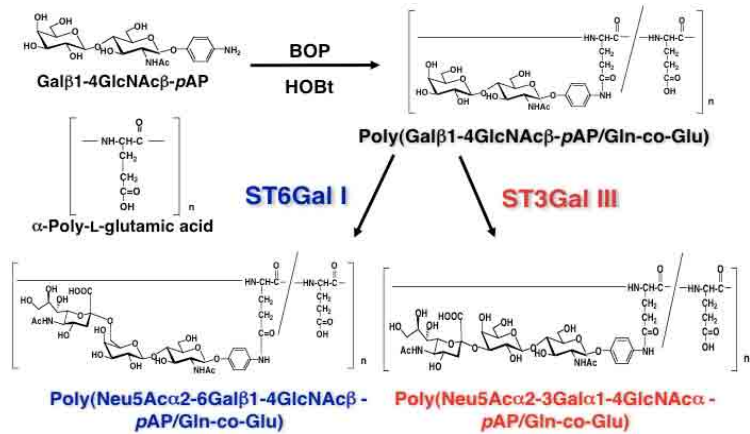
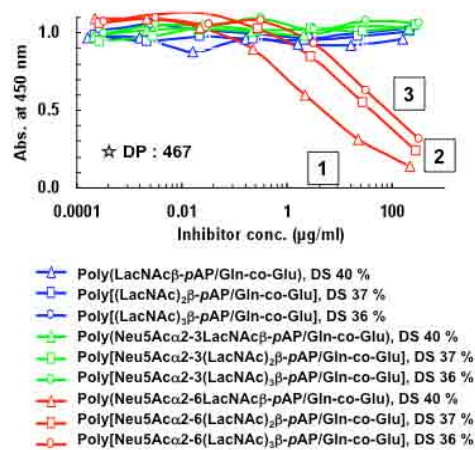


図3 ポリラクタサミン鎖長によるシグレック2に対する親和性



ック 2 との親和性の比較を行なったところ、LacNAc 繰り返し単位が 1 ユニットである Poly(Neu5Ac α 2-6LacNAc β -pAP/Gln-co-Glu) (DP 467) が最も高い親和性を有していた (図 3)。この親和性の強さは、2 種の天然ムチンに比べて 150 倍以上高い値を示した。

α -PGA の重合度が DP86 と DP467 のポリグルタミン酸主鎖の長さの異なるシアル酸含有人工ムチンの結合能はほぼ同等であった。 α -PGA のグルタミン酸の γ -カルボキシル基に導入された糖鎖置換度が 12%, 40%, 60% のシアル酸含有人工ムチンとシグレック 2 の反応性を比較した。その結果、図 4 に示す糖鎖置換度が 40% の人工ムチン結合能は、糖鎖置換度 12% および 60% の人工ムチンと同等であった。従ってシグレック 2 の反応性は、糖鎖置換度 12% の人工ムチンでも強力に結合できることが分った。

IV. シアル酸含有人工ムチンとシグレック 9 の相互作用解析

シグレック 2 の研究と同様に合成した人工ムチンを用い、直接および間接 ELISA 法を用いたシグレック 9 との相互作用解析を行った。シグレック 9 では Neu5Ac α 2, 3Gal に対し最も強い結合能をもつことが明らかとなった。また、Neu5Ac α 2, 3Gal に比べて結合能は低い、Nue5Ac α 2, 6Gal 単位を有する人工ムチンにも特異的に結合した。

また、シグレック 2 の結果と同様に、LacNAc 繰り返し単位が 1 ユニットである Poly(Neu5Ac α 2-3LacNAc β -pAP/Gln-co-Glu), DP 467 が最も高い親和性を有していた (図 4)。 α -PGA の重合度が DP 86 と DP 467 のポリグルタミン酸主鎖の長さの異なる Neu5Ac α 2, 3Gal 及び Neu5Ac α 2, 6Gal をもつシアル酸含有人工ムチンの結合能はほぼ同等であった。また、 α -PGA のグルタミン酸の γ -カルボキシル基に導入された糖鎖置換度が 12%, 40%, 60%

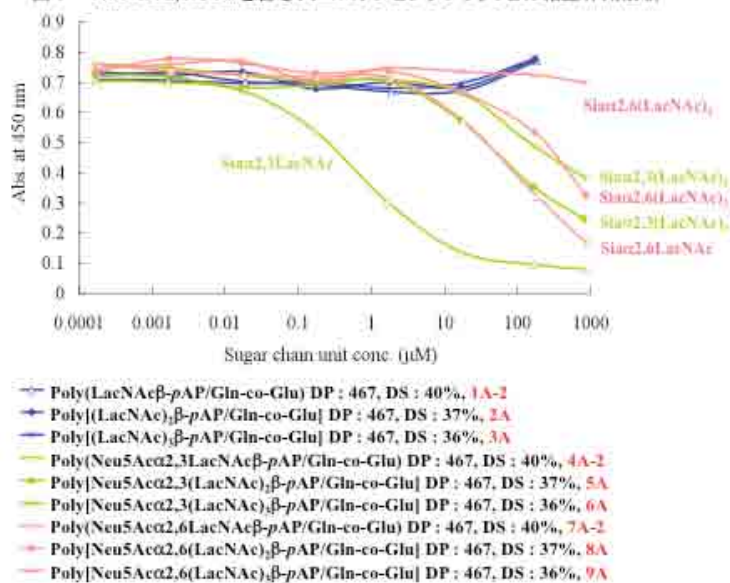
Neu5Ac α 2, 3Gal 及び Nue5Ac α 2, 6Gal シアル酸含有人工ムチンとシグレック 9 の反応性を比較した。その結果、図 4 に示してある糖鎖置換度が 40% の人工ムチン結合能は、糖鎖置換度 12% および 60% の人工ムチンと同等であった。従って、シグレック 9 の反応性については、シグレック 2 と同様に糖鎖置換度 12% の人工ムチンでも強力に結合できることが分った。

V. 硫酸化糖含有人工ムチンの化学・酵素合成

まずはじめに、GlcNAc β -pNP、Gal β -pNP、Gal β 1-4GlcNAc β -pNP の 6 位水酸基の硫酸化を行った。各配糖体をそれぞれ DMF 溶解したのち、DMF に溶解した SO₃NMe₃ を氷中にて滴下し反応を行った。反応後、MeOH で反応を停止させた。次にこの反応液を TSK gel Octadecyl-4PW カラムに供し硫酸化糖を精製した。これを Dowex 50 Na⁺ Form を用いて Na⁺ Form にし、減圧濃縮、凍結乾燥し、硫酸化糖である 6-sulfo GlcNAc β -pNP、6-sulfo Gal β -pNP、6, 6' -disulfo LacNAc β -pNP を得た。更に、6-sulfo GlcNAc β -pNP をアクセプターとしてガラクトース転移酵素の反応により、6-sulfo LacNAc β -pNP を得た。

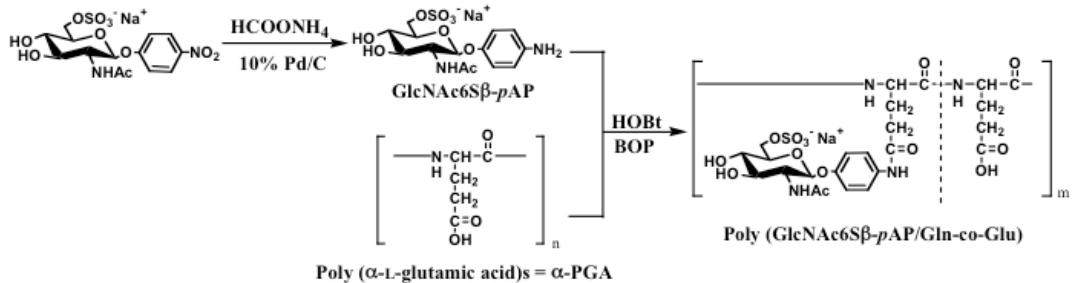
上記のように合成した硫酸化糖を用い図 5 のように硫酸化含有人工ムチンを合成

図4 NueAc α 2, 3/6Galを含む人工ムチンとシグレック9との相互作用解析



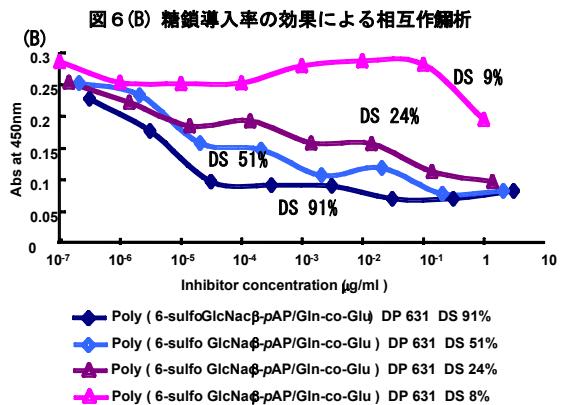
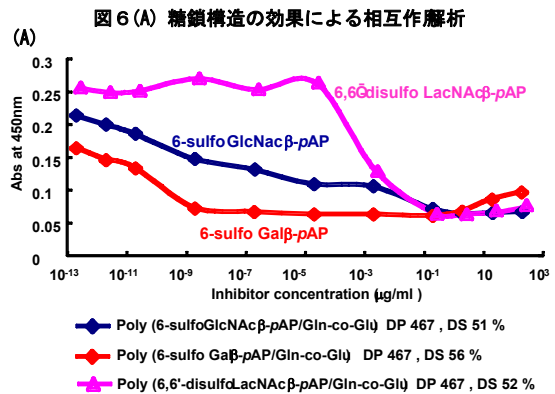
した。P-ニトロフェニル基のニトロ基をアミノ基に還元後、 α -PGA の γ -カルボキシル基に導入し、様々な糖鎖置換度 (DS, 4~91%)、 α -PGA 平均重合度 (DP, 26~631) の硫酸化糖含有人工ムチン Poly(6-sulfo GlcNAc β -pAP/Gln-co-Glu), Poly(6-sulfo Gal β -pAP/Gln-co-Glu) 及び、Poly(6,6'-disulfo LacNAc β -pAP/Gln-co-Glu) を合成した。

図5 硫酸化糖含有人工ムチンの合成



VI. 硫酸化糖含有人工ムチンとスカベンジャーレセプターとの相互作用解析

硫酸化糖含有人工ムチンである Poly(6-sulfo GlcNAc β -pAP/Gln-co-Glu) およびシアル酸含有人工ムチン [Poly(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-4GlcNAc β -pAP/Gln-co-Glu), Poly(Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4GlcNAc β -pAP/Gln-co-Glu), Poly(Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α -pAP/Gln-co-Glu)] を用いて、SCR-A との相互作用解析を行った。その結果、シアル酸含有人工ムチンよりも硫酸化糖含有人工ムチンの結合親和性が高いことがわかった。従って、SCR-A との相互作用にはシアル酸残基に比べて硫酸基が強く認識されることがわかった。さらに、硫酸基およびシアル酸を持たない人工ムチンとの相互作用解析を行ったところ、それらの人工ムチンでは全く親和性が見られなかった。硫酸化糖 Poly 含有人工ムチンである (6-sulfo GlcNAc β -pAP/Gln-co-Glu), Poly(6-sulfo Gal β -pAP/Gln-co-Glu) 及び、Poly(6,6'-disulfo LacNAc β -pAP/Gln-co-Glu) を用いて SCR-A との結合親和性を直接 ELISA 法と間接競合 ELISA 法の双方にて調べたところ、人工ムチンの糖鎖置換度かつ分子量増加によって結合能が上昇する事が明らかとなった。また、糖鎖構造の結合親和性に与える影響については、間接競合 ELISA 法による競争阻害試験の結果、その結合能は高いものから順に 6-sulfo Gal > 6-sulfo GlcNAc > 6,6'-disulfo LacNAc であった。これらの結果により、人工ム



チンと SCR-A との特異的な相互作用には分子に多価に結合した硫酸化糖鎖のマイナスチャージだけでなく、糖鎖構造が関わっていることが明らかとなった。(図 6)。

VII. 人工ムチンによる B 細胞の免疫活性化抑制効果

B 細胞は、抗原により刺激されるとリン酸化カスケードを介して活性化することが知られている。本研究では、このリン酸化カスケードの下流に位置しているマップカイネース (MAPK) のリン酸化の度合いを調べることによって、B 細胞の活性化を評価した。抗原刺激により MAPK のリン酸化、つまり B 細胞の免疫活性化が誘導される。一方、B 細胞表面上に発現するシグレック 2 は、癌細胞が分泌するムチンの糖鎖である Neu5Ac α 2-6 Gal や Neu5Ac α 2-6 GalNAc に結合し、免疫抑制効果を示すことがわかっている。

本研究では、シグレック 2 を細胞表面に強制発現させた K46 μ m λ 細胞 (マウス B 細胞株) を用いて人工ムチンの免疫能に対する効果を検討した。Poly(Neu5Ac α 2-6LacNAc β -pAP/Gln-co-Glu) 存在下および非存在下で K46 μ m λ 細胞を抗原 (NP-BSA) 刺激し、活性化を誘導した。その結果、人工ムチンの濃度依存的な MAPK のリン酸化の抑制が観察された。従って、人工ムチンは、B 細胞表面上のシグレック 2 と結合し、そのシグナルにより B 細胞の免疫活性化を抑制する機能をもっていることが明らかとなった。

VIII. 人工ムチンによる樹状細胞の免疫活性化効果

樹状細胞表面には Toll-like receptor (TLRs) が存在し、そのリガンドとして知られる細菌由来のリポポリサッカライド (LPS) の刺激により、サイトカインであるインターロイキン 12 (IL-12) やインターロイキン 10 (IL-10) が分泌される。その結果、Th0 細胞 (ナイーブ Th 細胞) は、IL-12 によって Th1 細胞 (細胞性免疫を担当) へ、IL-10 によって Th2 細胞 (液性免疫を担当) へと分化する。Th1 細胞と Th2 細胞はお互いの作用を調整し合うことにより免疫バランスを維持している。

本研究では、LPS 刺激下において、人工ムチンと共にシグレック 9 を発現する樹状細胞を培養し、培養上清中の IL-12、IL-10 産生能を測定した。その結果、シアル酸が α 2,3 結合した構造を有する人工ムチン、シアル酸が α 2,6 結合した構造を有する人工ムチンの両方において、シグレック 9 を発現する樹状細胞からの IL-12 産生は減少し、一方で、IL-10 の産生量は変化しないことが明らかとなった。この結果から、人工ムチンが樹状細胞上のシグレック 9 と相互作用することによって、免疫バランスが Th2 (液性免疫) に偏ることが示唆された。Th1 細胞は癌に対する細胞性免疫を担当しているため、Th1/Th2 バランスが Th2 側に偏ると癌に対する免疫が低下すると考えられる。

(2)研究成果の今後期待される効果

天然に存在するムチンを生体から精製したり、合成することは困難である。本研究では、天然ムチンを模倣した人工ムチンを大量合成し、免疫能を調節する B 細胞、樹状細胞、マクロファージ細胞上に発現するシグレックやスカベンジャーリセプターに特異的結合する人工ムチンを構築した。この人工ムチンは、 α 2-3 および α 2-6 結合シアル酸、ポリラクトサミン構造、硫酸化糖などの様々な糖鎖を α -L-ポリグルタミン酸 (α -PGA) ベースに導入し、糖鎖をクラスター化した多糖含有糖タンパク質である。さらに、多様な分子サイズ、糖鎖導入率の異なる様々な人工ムチンを構築することが可能である。このような分子は、シグレック等のレクチンに糖鎖特異的に結合可能であるだけでなく、上記に示したような様々な結合能を保持した人工ムチンとして考えることができる。この観点から人工ムチンは免疫細胞等に対する様々な生理活性機能を期待できる。

本研究では、人工ムチンの免疫能に対する研究を行ってきた。その結果、シアル酸含有人工ムチンは、B 細胞のシグレック 2 に結合することにより抗原刺激後の情報伝達を抑制し、抗体産生の低下を誘導する機能が明らかとなった。

また、樹状細胞のシグレック 9 への結合においては、シアル酸含有人工ムチンは癌細胞の分泌するムチン同様、細胞性免疫の低下効果を持つと考えられる。

本研究の成果である人工ムチンの合成とその生物学的黄の解析は、生体内で機能する糖鎖認識タンパク質の機能解明に寄与できるだけでなく、免疫細胞の活性化抑制による免疫抑制剤として自己免疫疾患などの治療への利用が期待できる。

3. 4 関節リウマチ関節液からの COX-2 誘導性糖鎖抗原の単離(京都府立医科大グループ)

A: 関節リウマチのサイトカイン誘導性ムチンの単離・精製と治療法への応用の検討

(1) 研究実施内容及び成果

I. 関節組織におけるムチンの発現

関節リウマチにおけるムチンについて、関節組織や関節液での詳細な役割や存在は知られていない。本研究では、Tn, sialylTn に対するモノクローナル抗体 (MLS 128, MLS 132 mAb)、抗 MAC-1 抗体 (BD Biosciences) を用いて、ABC 法 (Vector Lab) により関節リウマチと変形性関節症の関節組織におけるこれらムチンの発現を免疫組織学的法により比較検討した。

図 1 に示すように、MUC-1, Tn, sialylTn は関節リウマチの滑膜表層細胞や、滑

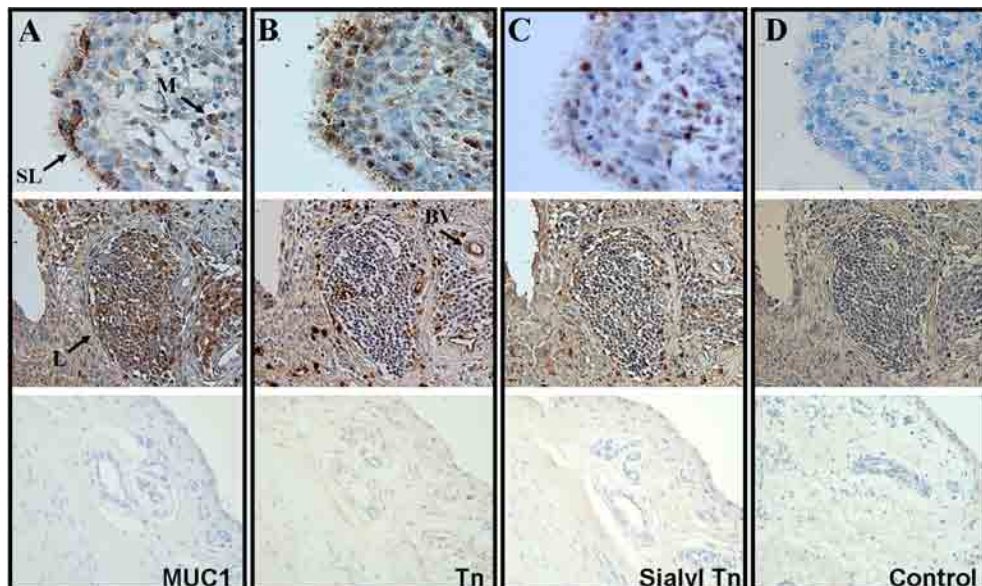


図 1 Tn, sialyl Tn, MUC1 の滑膜組織における発現

A: 抗MUC1抗体 B: 抗Tn抗体 C: 抗sialyl Tn抗体 D: 正常IgG

上段、中段: 関節リウマチ滑膜組織 下段: 変形性関節症滑膜組織

SL: synovial lining cell; BV: blood vessel; M: mononuclear cell; L: lymphoid follicle.

膜組織内のリンパ濾胞中の単核球の浸潤単核球に存在した (図 1A, B, C の上段、中段)。しかし、変形性関節症の滑膜組織ではその発現は非常に弱く (図 1A, B, C の下段)、免疫染色スコア (0-3 点, 0 点: 無染色, 3 点が最高点) を用いて、解析すると関節リウマチでのこれらムチンの発現が有意に変形性関節症に比較して強いことが明らかになった (図 2)。また、上皮性癌細胞の産生するムチンが単球/マクロファージのスカーベンジャーリセプター (SCR) に結合し、COX-2 の誘導に続いて PGE 2 の産生亢進をもたらすため、マクロファージとこれらムチンとの局在について、抗 CD68 抗体をペルオキシダーゼ染色 (茶色)、上記ムチンをアルカリホスファターゼ染色 (青) で二重染色した。その結果、CD68 陽性細胞はムチン陽性細胞と隣接して存在するものがあり、CD68 陽性の単核球や滑膜細胞にムチンが存在する 2 重染色

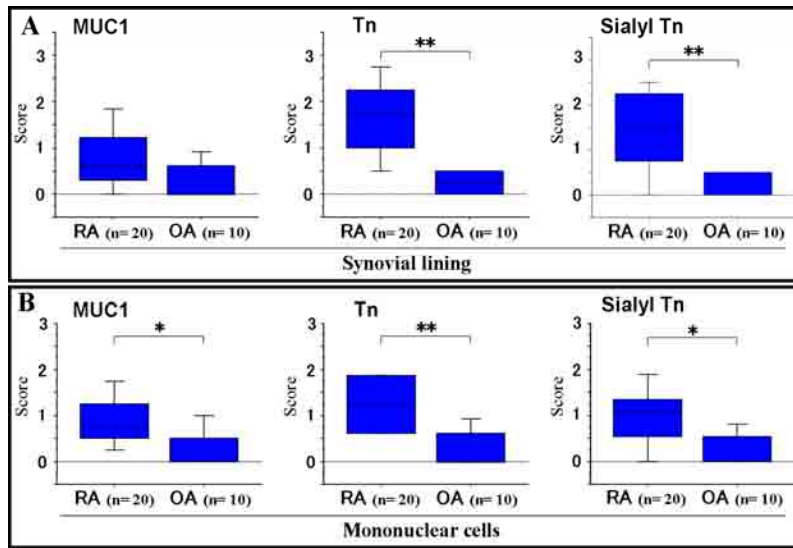


図2 免疫組織スコアを用いた Tn, sialyl Tn, MUC1 の滑膜組織における発現の比較
RA:Rheumatoid arthritis
OA:Osteoarthritis A: Synovial lining B: Mononuclear cell
免疫染色スコア 0点:無染色 染色度 1点:弱 2点:中 3点:高
Mann-Whitney *U* test.

陽性細胞の存在も明らかになった(図3)。これらは、滑膜組織から産生されたムチンが CD68 陽性細胞と免疫反応を生じさせる可能性を示唆する。

II. 関節液中におけるムチンの存在及びその精製と生物活性

関節リウマチ関節液中に存在するムチン分子を精製し、その機能を解析し、関節リ

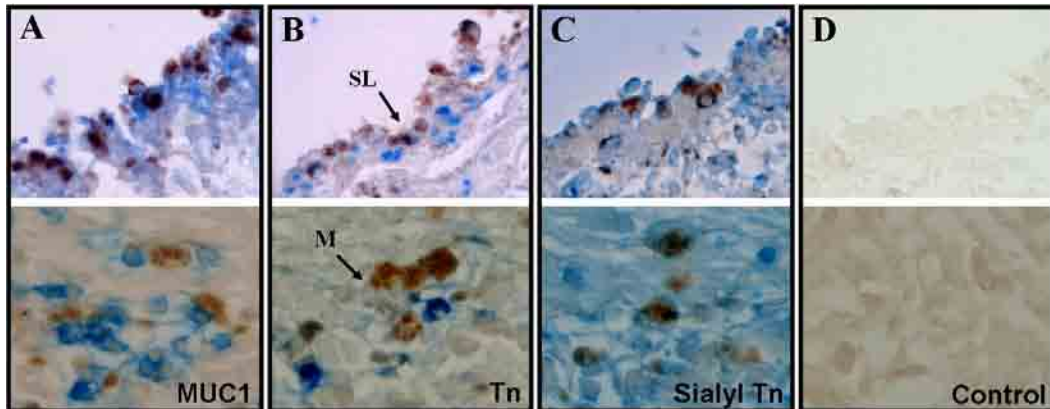


図3 関節リウマチ滑膜組織における Tn, sialyl Tn, MUC1 発現と CD68 発現
抗 CD68 抗体と各ムチン (A: MUC1, B: Tn, C: sialyl Tn) 抗体との 2 重染色を行った。CD68 陽性細胞は茶色、各ムチン陽性細胞は青色に染色。D は正常血清・IgG を用いたコントロール。Magnification×400

ウマチの病因に関与するムチン分子を同定する目的で、関節リウマチ関節液を Sepharose 6B カラムを用いてゲルろ過した(図4A)。その高分子画分(図4B カラム No26-30)にはドットブロット法にて、Tn, sialylTn が含有されることを示した。この Tn, sialylTn の含有画分をさらに cesium chloride(CsCl)を用いた密度勾配遠心法で精製しその性状を解析した。ドットブロット法で、Tn, sialylTn、MUC-1 を含有した画分 No2 は、銀染色で陰性、PAS 染色で陽性バンドが検出され、抗 MUC-1 抗体を用いたウエスタンブロット法で、陽性バンドが検出された(図5)。また、同画分をヒト末梢血単核球(PBMC)に添加し、上清中の IL-6 を ELISA 法で測定すると、negative control としての PBS 添加で 112pg/ml、positive control としての LPS 添加で 1981 pg/ml に対して、同画分の添加で 2107 pg/ml の産生があり、同画分には末梢血単核球に IL-6 産生能があることが明らかになった。すなわち、関節リウマチ患者関節液中にこれらムチンが存在し、関節リウマチの病因となる炎症免疫

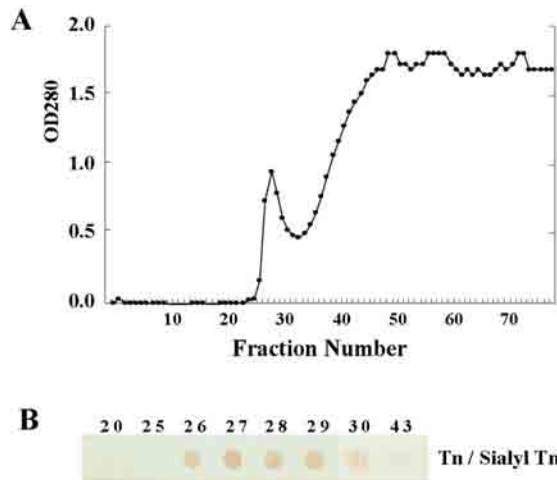


図4 関節リウマチ患者関節液のゲルろ過法による精製とムチンの発現
A: Sepharose 6B カラムを用いた精製物 (吸光度 280 nm) (リウマチ患者 n=3)
B: Tn and sialyl Tn による各カラムのドットプロット法による解析

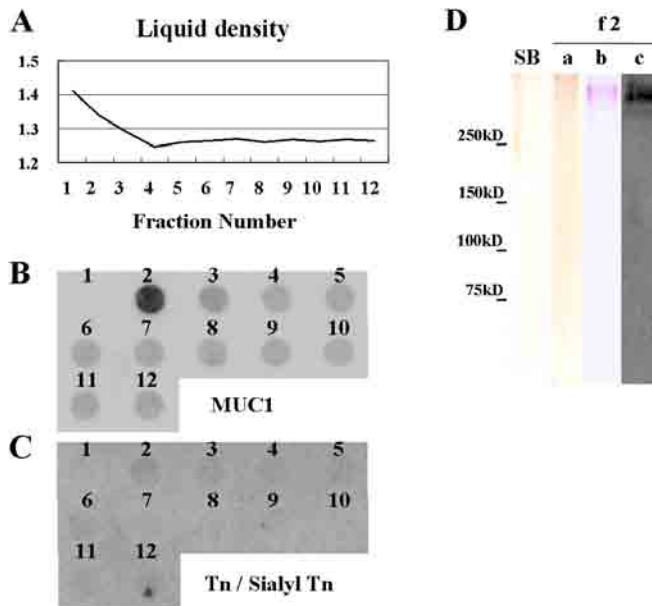


図5 関節リウマチ患者関節液由来のムチンの精製
ゲルろ過により採取した Tn、sialylTn を含有する高分子量分画を CsCl を用いた密度勾配遠心法にてさらに精製をおこなった。精製物には、ムチン (Tn、sialylTn、MAC-1) が認められた。A: 各画分の密度 B、C: 各画分のドットプロット法でのムチンの解析。
D: 画分 No. 2 の a: 銀染色、b: PAS 染色 c: MAC-1 抗体によるウエスタンブロット法での解析。SB: sample buffer (bovine salivary gland)

反応を生じさせる可能性が示された。

(2)研究成果の今後期待される効果

関節リウマチの病因に関わる関節組織及び関節液内のムチン物質に関する研究は、国内外では類似研究のない全く新しいものであり、免疫疾患と糖鎖関連物質としてのムチンのリウマチ性疾患の病態への関与に関する最初の知見と考えている。関節液からのムチン精製物質の生化学構造解析は現段階で難しいが、新しい糖鎖の検出技術を用い解明していく予定である。また、これらムチンの生物学的活性としての関節リウマチの病因を探るため、同物質が関節リウマチ滑膜細胞の増殖や破骨細胞の分化誘導などに関与しているかなどについて、今後検討していく予定である。ポストポストゲノムプロジェクトとしての糖鎖研究は、特に関節リウマチを中心とした免疫疾患の病態解明や治療法の開発に大きな進展を与えるものと考えられる。

B:ヒト胃癌増殖と転移メカニズムにおけるムチンの関与について

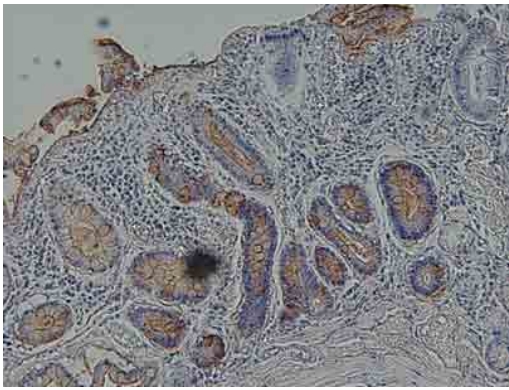
(1)研究実施内容及び成果

大腸癌組織では、間質組織、特にマクロファージにおいてムチン誘導性 COX-2 が発現するが、ムチン産生性腫瘍を含む大腸癌以外の消化管組織として胃癌でのこの事象の普遍性を検討し、悪性度、浸潤度、転移様式との関連性やムチン産生性腫瘍癌増殖メカニズムの解明が当初の目的である。計画初年度より、外科的切除術を受けた胃癌患者の胃組織の正常部及び癌部組織を採取し検体数を増やししながら、Tn, Sialyl Tn, Sialyl Lewis x 各抗原に対する抗体を用い免疫染色を行い、胃組織内でのムチンの発現とその局在を確認し良悪性、組織型による違いを評価した。結果は以下に示すとおりである。

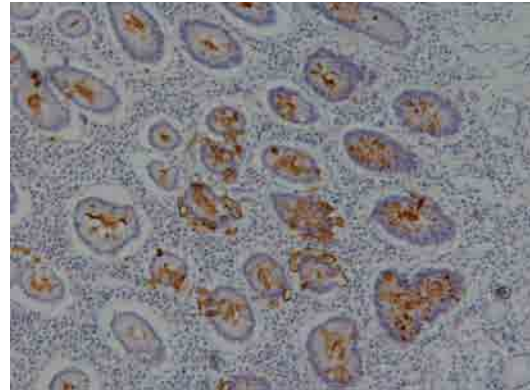
I. 各ムチン抗原の胃癌組織での発現について

Tn antigen, Sialyl Tn antigen, Sialyl Lewis x antigen: 過去の文献では癌組織で発現が強いという報告があり、本研究で症例数を増やし統計学的に評価した結果、正常、癌組織での差はなかったが、癌組織の中では分化度が高い癌細胞に有意により強い発現を示すという知見を得た。

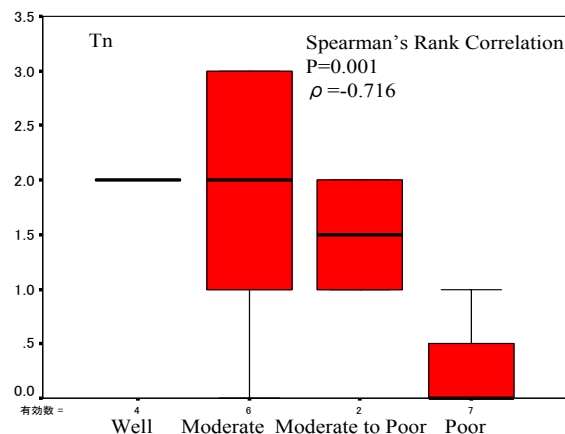
a. Tn antigen



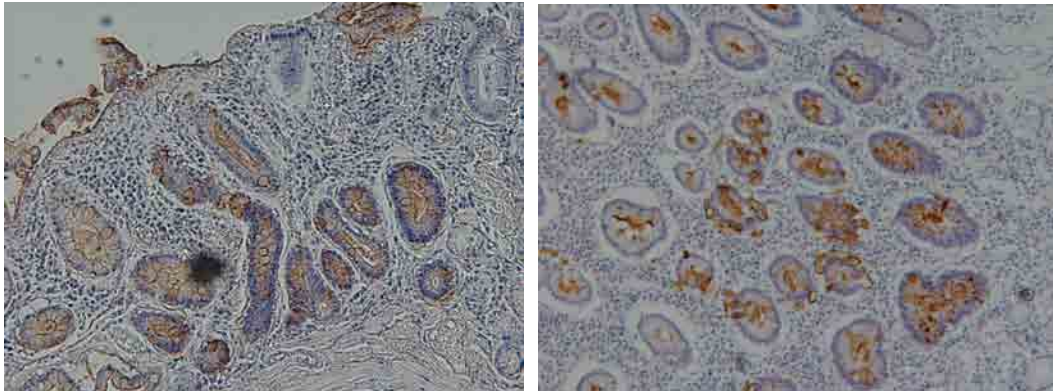
高分化型胃癌 (X100)



中分化型胃癌 (X100)

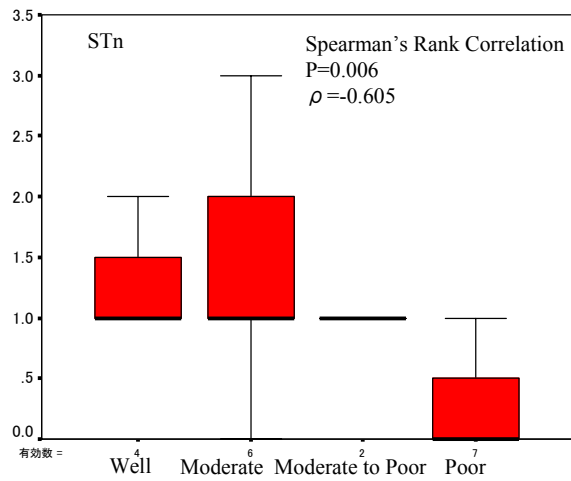


b. Sialyl Tn antigen

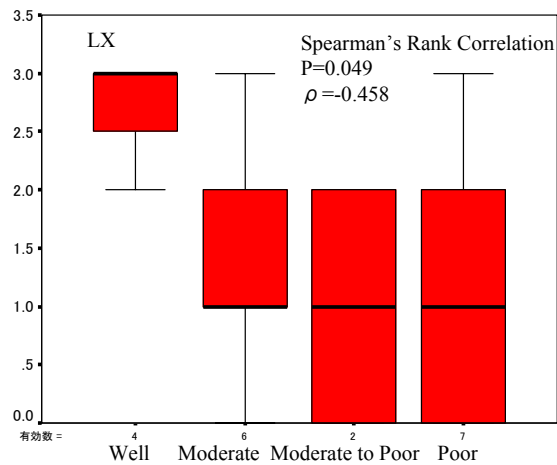


高分化型胃癌 (X100)

中分化型胃癌 (X100)



c. Sialyl Lewis x antigen



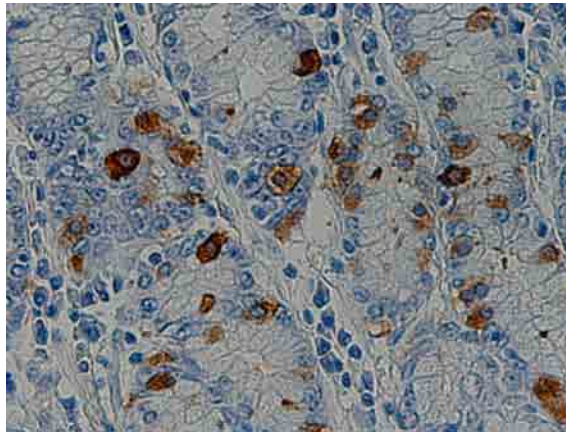
II. 癌間質組織におけるムチンの発現について

大腸癌組織における過去の研究では、間質においてマクロファージおよびその周囲においてムチン、およびムチン誘導性 COX-2 の発現が確認され、癌組織におけるムチンの果たす役割の一つが解明されたが、今回行った胃組織では未分化型胃癌組織中の間質において繊維芽細胞様の細胞における発現を若干認める症例が散見される以外ほとんどの

胃組織の間質中ではムチン関連蛋白の発現は認められなかった。

Ⅲ. シアリルルイス x 抗原の増殖帯における発現について

未分化型胃癌を除いた胃癌組織において、上皮のいわゆる増殖帯と考えられる部分の腺管上皮細胞の細胞質内に Sialyl Lewis x antigen の発現が、正常胃組織よりも強く認められた。この所見は過去に報告されていない新知見である。



中分化型胃癌 (X200)

(2)研究成果の今後期待される効果

我々は、大腸癌組織でのムチン誘導性 COX-2 が特に間質に発現し、大腸癌の増殖に関係することを明らかにしてきたが、本研究では、胃癌組織において胃癌細胞の高分化度と Tn、sialyl Tn などの癌関連ムチンの発現に相関が得られた。また、胃癌組織間質でのムチン発現は、大腸癌に比較し強発現しておらず癌増殖メカニズムの違いが推定される。さらに、Sialyl Lewis x antigen は粘膜増殖帯に局在しており、これらムチンの局所発現の意味が今後の検討課題であり、従来の報告にない知見でもある。今後これらの知見をもとにして、胃癌組織の増殖・転移のメカニズムについての新たな展開が予測される。

§4 研究参加者

①京都産業大 中田博グループ(担癌状態におけるムチンを介した免疫能の変化と腫瘍組織形成に関する研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	中田 博	京都産業大学	教授	研究全体を総括	H15.10～H21.3
*	井上 瑞江	京都産業大学	CREST 研究員	ムチンのシグレック 7 を介した 生物学的作用	H16.3～H21.3
*	戸田 宗豊	京都産業大学	CREST 技術員	ムチンのシグレック 2 を介した 生物学的作用	H15.11～H21.3
*	竹内 紀子	京都産業大学	CREST 研究補助員	担癌状態における Th1/Th2 バランスの低下機 構	H16.4～H20.3
	秋田 薫	京都産業大学	特約講師	ムチン遺伝子の導入株の作 製	H15.10～H16.5 H18.10～H21.3

	横井川 規臣	関西医科大学	D3	担癌患者における免疫能力の低下の解析	H15.10～H16.3
	杉本 直俊	関西医科大学	D3	担癌患者における免疫能力の低下の解析	H16.4～H20.3
	繁延 達郎	京都産業大学	M2	マウス乳癌細胞 TA3-Ha のムチンと COX2 の誘導	H15.10～H16.3
	杉原 一平	京都産業大学	M2	担癌状態における Th1/Th2 バランスの低下機構	H15.10～H17.3
	細木 由起	京都産業大学	M2	ムチン遺伝子導入株の作製	H15.10～H17.3
	高木 宏晃	京都産業大学	M2	スカベンジャーレセプターを介した生物学的作用	H16.4～H18.3
	吉田 周平	京都産業大学	D3	スカベンジャーレセプターの生物学的意義	H18.4～H21.3
	石田 有希子	京都産業大学	D2	ムチンのシグレック 3 を介した生物学的作用	H17.4～H21.3
	太田 麻利子	京都産業大学	M2	ムチンのシグレック 9 を介した生物学的作用	H17.4～H19.3
*	太田 麻利子	京都産業大学	CREST 研究補助員	ムチンのシグレック 9 を介した生物学的作用	H19.4～H20.3
	圓山 浩二	京都産業大学	M2	スカベンジャーレセプターの生物学的意義	H18.4～H20.3
	藤本 祥彰	京都産業大学	M2	スカベンジャーレセプターの生物学的意義	H18.4～H20.3
	中嶋 章雄	京都産業大学	M2	スカベンジャーレセプターの生物学的意義	H19.4～H21.3
	万木 肇	京都産業大学	M2	シグレック 2 内在性リガンドの検索	H19.4～H21.3
	谷田 周平	京都産業大学	M1	MUC1 を介した情報伝達	H20.4～H21.3

②京都産業大 福井成行グループ(シアル酸含有オリゴ糖の調製と糖鎖マイクロアレイを用いたシグレック 2 の結合する糖鎖構造の解析に関する研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	福井 成行	京都産業大学	教授	ムチンの調製と受容体との結合糖鎖の同定	H15.10～H21.3
*	山口 圭子	京都産業大学	CREST 技術員	ムチン型糖鎖の糖鎖マイクロアレイ作製	H16.4～H20.3
	里 正人	京都産業大学	M2	ムチンの調製と受容体との結合糖鎖の同定	H15.10～H16.3
	玉置 広寿	京都産業大学	M2	ムチンの調製と受容体との結合糖鎖の同定	H15.10～H16.3
	高木 佑輔	京都産業大学	M2	糖鎖マイクロアレイの改良	H16.4～H18.3
	松實 宏幸	京都産業大学	M2	BSMからのムチン型糖鎖の	H16.4～H18.3

				分離精製	
--	--	--	--	------	--

②静岡大グループ(シグレック及びスカベンジャーリセプターに結合する人工ムチンの合成に関する研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	村田 健臣	静岡大学	准教授	人工ムチンの合成及び機能解析	H15.10～H21.3
	碓氷 泰市	静岡大学	教授	人工ムチンの合成	H15.10～H21.3
	浅沼 俊倫	静岡大学	M2	人工ムチンの評価	H15.10～H16.3
	服部 武史	静岡大学	M2	人工ムチンの合成	H15.10～H16.3
	尾形 慎	静岡大学	D3	人工ムチンの合成	H16.4～H20.3
	本多 洋規	静岡大学	M2	人工ムチンの評価	H16.4～H18.3
	堀 真人	静岡大学	M2	人工ムチンの評価	H16.4～H18.3
	高橋 香元	静岡大学	M2	人工ムチンの合成	H17.4～H19.3
	藤田健太郎	静岡大学	M2	人工ムチンの合成	H17.4～H19.3
	高橋 美生	静岡大学	M2	人工ムチンの評価	H18.4～H20.3
	三ツ石純子	静岡大学	M2	人工ムチンの評価	H18.4～H20.3
	柴 愛子	静岡大学	M2	人工ムチンの合成	H18.4～H20.3
	小崎 涉	静岡大学	M2	人工ムチンの合成	H19.4～H21.3
	小菅 正裕	静岡大学	M2	人工ムチンの評価	H19.4～H21.3
	小原 平圭	静岡大学	M1	人工ムチンの合成	H20.4～H21.3
	近藤 修啓	静岡大学	M1	人工ムチンの評価	H20.4～H21.3

②京都府立医大グループ(関節リウマチの病因に関する糖鎖抗原の研究)

	氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
○	川人 豊	京都府立医科大学	講師	ヒト消化器癌組織及び関節リウマチ組織におけるムチンあるいはムチン様物質による COX2 誘導と病因との関連性	H15.10～H21.3
	坪内 康則	京都府立医科大学	助教	関節リウマチ関節液からの COX2 誘導性糖鎖抗原	H17.4～H21.3

				の単離	
	和田 誠	京都府立医科大学	研究生	ヒト消化器癌組織におけるムチン発現及びムチンによる COX2 誘導とその病因との関連性	H16.4~H21.3
	石野 秀岳	京都府立医科大学	後期専攻医(特任助教)	関節リウマチ関節液からの COX2 誘導性糖鎖抗原の単離	H16.4~H21.3
	濱口 真英	京都府立医科大学	D4	関節リウマチ関節液からの COX2 誘導性糖鎖抗原の単離	H18.4~H21.3

§ 5 招聘した研究者等

なし

§ 6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際(欧文)誌 15 件)

[主論文]

1. Toda M, Hisano R, Yurugi H, Akita K, Maruyama K, Inoue M, Adach T, Tsubata T, Nakada H. Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. *Biochem J* 417, 673, 2009.
2. Toda M, Akita K, Inoue M, Taketani S, Nakada H. Down-modulation of B cell signal transduction by ligation of mucins to CD22. *Biochem Biophys Res Commun* 372, 45, 2008.
3. Ishida A, Ohta M, Toda M, Murata T, Usui T, Akita K, Inoue M, Nakada H. Mucin-induced apoptosis of monocytes-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics* 8, 3342, 2008.
4. Yokoigawa N, Takeuchi N, Toda M, Inoue M, Kaibori M, Yonagida H, Inaba T, Tanaka H, Ogyra T, Takada H, Lkumura T, Kwon AH, Kamiyama Y, Nakada H. Overproduction of PGE2 in peripheral blood monocytes of gastrointestinal cancer patients with mucins in their bloodstream. *Cancer Lett* 245, 149, 2007.
5. Sugihara I, Yoshida M, Shigenobu T, Takagi H, Murayama K, Takeuchi N, Toda M, Inoue M, Nakada H. Defferent progression of tumor xenografts between mucin-producing and -nonproducing mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Cancer Res* 66, 6175, 2006.
6. Yokoigawa N, Takeuchi N, Toda M, Inoue M, Kaibori M, Yanagida H, Tanaka H, Ogura T, Takada H, Okumura T, Kwon AH, Kamiyama Y, Nakada H. Enhanced production of IL-6 in peripheral blood monocytes stimulated with mucins secreted into the bloodstream. *Clin Cancer Res* 11, 6127, 2005.

[関連論文]

- (ア) Misawa Y, Akimoto T, Amarure S, Murata T, Usui T. Enzymatic synthesis of spacer-linked divalent glycoside carrying N-acetylglucosamine and N-acetyllactosamine: Analysis cross-linked activity with WGA. *J Biochem* 143, 21, 2008.
- (イ) Ohno S, Ohno Y, Nakada H, Suzuki N, Soma G, Inoue M. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in endometrial cancer. Its relationship with tumor-produced cyclooxygenase-2, tumor-infiltrated lymphocytes and patient prognosis. *Anticancer Res* 26, 4047, 2006.
- (ウ) Murata T, Usui T. Enzymatic synthesis of oligosaccharides and neoglycoconjugates. *Biosci Biotechnol Biochem* 70, 1049, 2006.
- (エ) Murata T, Honda H, Hattori T, Usui T. Enzymatic synthesis of poly-N-acetyllactosamines as potential substrates for endo-beta-galactosidase-catalyzed hydrolytic and transglycosylation reactions. *Biochem Biophys Acta* 1722, 60, 2005.
- (オ) Murata T, Hattori T, Honda H, Amarume S, Usui T. Kinetic studies on endo-beta-galactosidase by a novel colorimetric assay and synthesis of poly-N-acetyllactosamines using its transglycosylation activity. *J Appl Glycosci* 52, 161, 2005.
- (カ) Nozaki K, Kano A, Amano Y, Murata T, Usui T, Ito K, Kanda T. Transglycosylation reaction and acceptor specificity of exo- and endo-type cellulase. *J Appl Glycosci* 51, 87, 2004.
- (キ) Totani K, Yasutake N, Murata T, Usui T. Transglycosylation and condensation of disaccharide units using endo-type glycosidases. *Trends Glycosci Glycotech* 16, 383, 2004.
- (ク) Yasutake N, Totani K, Harada Y, Haraguchi S, Murata T, Usui T. Novel synthesis of lactosyl-glycosides and analogs through cellulase-mediated transglycosylation of condensation reaction. *J Appl Glycosci* 51, 141, 2004.
- (ケ) Horiguchi N, Arimoto K, Mizutani A, Endo-Ichikawa Y, Nakada H, Taketani S. Galectin-1 induces cell adhesion to the extracellular matrix and apoptosis of non-adherent human colon cancer Colo 201 cells. *J Biochem* 134, 869, 2003.

(2)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 (国内会議 10 件、国際会議 2 件)

1. 中田博. 担癌状態におけるムチンの生物学的機能. 平成 20 年度東海大学生理学研究所研究会・糖鎖機能研究会、p.X、2008.5.22、岡崎 [2008.5.22-23]
2. 朴 龍洙、加藤 竜也、村田 健臣、碓氷泰市. 糖鎖科学のプラットフォームテクノロジーとしてのカイコによる糖転移酵素の発現. 日本農芸化学会 2008 年度大会講演要旨集、p73、2008、名古屋
3. Nakada H. Effect of tumor-produced mucins on immune function. The 27th Sapporo Cancer Seminar International Symposium: Glycomics; New perspectives in Cancer Cell Behavior, p.36-37, 2007.7.12. Sapporo, Japan [2007.7.11-13]
4. 中田博. 担癌状態における免疫機能の低下. 創価大学ハイテクリサーチセンター公開シンポジウム、2007.3.26、つくば [2007.3.26]

5. 中田博. 担癌状態における新たな免疫抑制機構の解析. 医工薬産学公連携フォーラム、2007.3.19、京都 [2007.3.19]
6. 中田博. 担癌状態における危険因子としてのムチンの生物学的意義. サイエンスフォーラム、2006.11.9、大阪 [2006.11.9]
7. 中田博. 担癌状態におけるムチンを介した免疫抑制機構の解析. 生理学研究所研究会 病態糖鎖研究会、2006.9.25、岡崎 [2006.9.25-26]
8. 中田博. 上皮性癌細胞の産生するムチンの構造と生物学的意義. 創薬等ヒューマンサイエンス総合事業若宮班班会議、2006.1、旭川
9. 村田健臣. 糖鎖ライブラリーを利用した分子認識プローブの構築に関する研究. 日本農芸化学会中部支部、p.3、2005.6、静岡
10. 村田健臣. 糖鎖ライブラリーを利用した分子認識プローブの構築に関する研究. 日本農芸化学会 2005 年度大会、p.368-.369、2005、静岡
11. Nakada H, Toda M, Takagi H, Shigenobu T, Yoshida M, Inaba T, Takeuchi N and Inoue M (Kyoto Sangyo Univ.). Biological function of mucins through scavenger receptor present on monocytes/macrophages. US/JAPAN GLYCO 2004, Hawaii (USA), November 2004.
12. 碓氷泰市. グライコマテリアルズとしての人工複合糖質の機能解析. 日本農芸化学会中部支部設立 50 周年記念講演会、p.10-12、2004、名古屋

② 口頭発表 (国内会議 24 件、国際会議 0 件)

1. 中田博、戸田宗豊、藤本祥彰、谷田周平、石田有希子、太田麻利子、秋田薫、井上瑞江. 担癌状態におけるムチンを介した様々な生物学的機能. 第 28 回日本糖質学会年会、p.xi、2008.8.18、つくば [2008.8-18-20]
2. 矢野恵美、三澤義知、前田佳代、眞坂隆一、村田健臣、碓氷泰市. リンカーの長さが異なる O-結合型二価配糖体の合成とレクチンとの相互作用. 日本農芸化学会 2008 年度大会、p179、2008、名古屋
3. 眞坂隆一、三澤義知、前田佳代、矢野恵美、村田健臣、碓氷泰市. N 結合型二価配糖体の合成とレクチンとの相互作用. 日本農芸化学会 2008 年度大会、p180、2008、名古屋
4. 松田紗世子、高橋美生、太田麻利子、戸田宗豊、朴龍沫、村田健臣、碓氷泰市、中田博. シグレック 9 に親和性を有するシアロオリゴ糖鎖含有人エムチンの合成と機能解析. 日本農芸化学会 2008 年度大会、p180、2008、名古屋
5. 戸田宗豊、圓山浩二、万木肇、秋田薫、井上瑞江、竹内紀子、安達貴弘、鏝田武志、中田博. Ligation of tumor-produced mucin to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、p.717、2007.12.14、横浜 [2007.12.11-15]
6. 山田佳太、兵藤里美、木下充弘、中田博、米澤傑、掛樋一晃. ヒト培養癌細胞中のムチン型糖鎖の比較解析-糖鎖自動切断装置の適用. Application of Automatic Glycan-releasing Apparatus "AutoGlycoCutter (AGC)" to Comparative Analysis of Mucin-Type Glycans in Human Cancer Cells. 第 27 回日本糖質学会年会、p.71、2007.8.3、福岡 [2007.8.1-3]
7. 中田博、戸田宗豊、太田麻利子、石田有希子、竹内紀子、鏝田武志、安達貴弘、村田健臣、碓氷泰市、井上瑞江. 担癌状態におけるシグレックファミリーを介したムチンの免疫抑制について. Immune Attenuation through Interactions of Mucins with Siglec Family in Tumor-Bearing State. 第 27 回日本糖質学会年会、p.27、2007.8.2、福岡 [2007.8.1-3]

8. 三澤義知、眞坂隆一、前田佳代、矢野恵、村田 健臣、碓氷泰市. O-, N-結合型二価配糖体の合成とレクチンとの相互作用. 第 27 回日本糖質学会年会、p82、2007.8.、福岡 [2007.8.1-3]
9. 石野秀岳、川人豊、濱口真英、河野正孝、坪内康則、和田誠、山本相浩、角谷昌俊、新美美貴子、吉川敏一. 関節リウマチ患者関節液中に存在する糖鎖分子精製とその生化学的活用. 第 28 回日本炎症・再生医学会、p.434、2007.8.3、東京 [2007.8.2-3]
10. 石野秀岳、川人豊、濱口真英、竹内紀子、徳永大作、北條達也、河野正孝、坪内康則、和田誠、山本相浩、角谷昌俊、新美美貴子、吉川敏一、中田博. 関節リウマチの病因に關与する関節液由来糖鎖分子の検討. 第 51 回日本リウマチ学会総会・学術集会、p.377、2007.4.28、横浜 [2007.4.26-29]
11. 中田博. 担癌状態における免疫能の低下-腫瘍マーカーは単なるマーカーではない-. 京都市バイオ産業技術フォーラム・京都バイオ産業創出支援プロジェクト連携事業「バイオ創薬及び支援ツールのイノベーション」発表交流会、2007.2.2、京都 [2007.2.2]
12. 高橋美生、本多洋規、戸田宗豊、朴龍洙、村田健臣、碓氷泰市、中田博. シグレックに親和性を有するシアロ糖鎖含有人工ムチンの合成と機能解析. 日本農芸化学会 2007 年度大会、p. 7、2007、東京
13. 柴愛子、藤田健太郎、戸田宗豊、村田健臣、碓氷泰市、中田博. 硫酸化糖含有人工ムチンとマクロファーヂスカベンジャーレセプターとの相互作用解析. 日本農芸化学会 2007 年度大会、p. 7、2007、東京
14. 中田博、井上瑞江. 担癌状態における危険因子としてのムチンの生物学的意義. 第 65 回日本癌学会学術総会、p.101、2006.9.28、横浜 [2006.9.28-30]
15. 中田博、戸田宗豊、太田麻利子、竹内紀子、村田健臣、鏝田武志、井上瑞江. 担癌状態におけるリスクファクターとしてのムチンの生物学的機能. 第 26 回日本糖質学会年会、p.36、2006.8.23、仙台 [2006.8.23-8.25]
16. 村田健臣、本多洋規、高橋美生、戸田宗豊、大田麻利子、中田博、碓氷泰市. シグレックに親和性を有するシアロ糖鎖含有人工ムチンの合成、第 26 回日本学会年会、p. 43、2006.8.23、仙台 [2006.8.23-8.25]
17. 藤田健太郎、本多洋規、高橋美生、戸田宗豊、中田博、村田健臣、朴龍洙、碓氷泰市. 多価性シアリルオリゴ糖含有人工ムチンと Siglec-2 との相互作用解析. 日本農芸化学会 2006 年度大会、2006.3、京都
18. 三善義知、秋本崇、餘目哲、前田佳代、村田健臣、碓氷泰市. 双頭型 GlcNAc および LacNAc 配糖体の合成とレクチンとの相互作用. 日本農芸化学会 2006 年度大会、p.21、2006、京都
19. 高橋香元、尾形慎、村田健臣、碓氷泰市. 糖転移酵素の高感度活性測定基質の開発. 日本農芸化学会 2006 年度大会、p.21、2006、京都
20. Toda M, Takeuchi N, Adachi T, Nakanishi K, Matsubara J, Taketani S, Tsubata T, Muarata T, Nakada H. Immunosuppressive effect of mucin on B cell function in tumor-bearing state. 戸田宗豊、竹内紀子、安達貴弘、中西勝幸、松原順子、竹谷茂、鏝田武志、村田健臣、中田博. 担癌状態における B 細胞機能に対するムチンの抑制効果. 第 78 回日本生化学会大会、2005.10、神戸
21. 戸田宗豊、杉原一平、井上瑞江、竹内紀子、鏝田武志、村田健臣、中田博. B 細胞に対するシグレック 2 を介したムチンの影響. Effect of mucins on B cell through

Siglec2. 第 25 回日本糖質学会年会、2005.7、大津

22. 本多洋規、高橋美生、村田健臣、碓氷泰市、戸田宗豊、中田博. 多価性シアリルオリゴ糖含有人工ムチンの合成, および CD22 との相互作用解析. 日本農芸化学会 2005 年度大会、p.155、2005.3、札幌
23. 村田健臣、碓氷泰市. エンド- β -ガラクトシダーゼの基質特異性と糖転移反応によるオリゴ糖の合成. *J Appl Glycosci* 51, Suppl p.49, 2005.
24. 福井成行. 糖鎖-タンパク質の相互作用の敏速な検出と糖鎖の特異性を探るための糖鎖マイクロアレイ. 京都産学公連携フォーラム 2003、2003.11、京都

③ ポスター発表 (国内会議 29 件、国際会議 16 件)

1. 塚本和浩、酒井恵子、木崎安紀子、湯浅徳行、高崎(松本)綾乃、浅沼秀樹、佐藤玲子、川上宏子、水野真盛、高柳淳、中田博、山口(藤田)陽子. Tn 抗原特異的単クローン抗体 MLS128 と 83D4 由来単鎖抗体の調製と特異性解析. 第 28 回日本糖質学会年会、p.xxv、2008.8.19、つくば [2008.8.18-20]
2. 秋田薫、中嶋章雄、戸田宗豊、井上瑞江、中田博. 皮膚創傷治癒におけるマクロファージクラス A スカベンジャー受容体の生物学的意義. 第 28 回日本糖質学会年会、p.xx、2008.8.20、つくば [2008.8.18-20]
3. 村田健臣、戸田宗豊、碓氷泰市、中田博. 硫酸化糖含有人工ムチンとマクロファージスカベンジャーリセプターとの相互作用解析. 第 28 回日本糖質学会年会、p.xx、2008.8.19、つくば [2008.8.18-20]
4. 秋田薫、中嶋章雄、圓山浩二、戸田宗豊、井上瑞江、中田博. 皮膚創傷治癒過程におけるマクロファージクラス A スカベンジャー受容体の生物学的意義. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、p.366、2007.12.12、横浜 [2007.12.11-15]
5. 高橋美生、本多洋規、戸田宗豊、Enoch Y. Park、村田健臣、碓氷泰市、中田博. Synthesis of artificial mucins carrying sialyloligosaccharides and the interaction with Siglec-9. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、p.728、2007.12.14、横浜 [2007.12.11-15]
6. 柴愛子、藤田健太郎、戸田宗豊、村田健臣、碓氷泰市、中田博. 硫酸化糖含有人工ムチンとマクロファージスカベンジャーリセプターとの相互作用解析. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、p.728、2007.12.14、横浜 [2007.12.11-15]
7. 堀江仁一郎、酒井恵子、佐藤玲子、川上宏子、戸潤一孔、高柳淳、中田博、浅沼秀樹、山口(藤田)陽子. ムチン型糖鎖抗原に対する単鎖抗体の調製とその性質. 第 80 回日本生化学会大会・第 30 回日本分子生物学会年会合同大会、p.729、2007.12.14、横浜 [2007.12.11-15]
8. Ishino H, Kawahito Y, Hamaguchi M, Takeuchi N, Tokunaga D, Hojo T, Kohno M, Tubouchi Y, Yamamoto A, Kadoya M, Niimi M, Senoo T, Yoshikawa T, Nakada H. An Important Role for Aberrantly Glycosylated Mucin in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. The 71st annual meeting of the American College of Rheumatology, 2007.11.8. Boston, USA
9. Inoue M, Nakada H. Inhibitory effect of tumor-produced mucins on immune function of dendritic cells (DCs). 第 66 回日本癌学会学術総会、p.333、2007.10.4、横浜 [2007.10.3-5]
10. Toda M, Maruyama K, Yurugi H, Inoue M, Akita K, Takeuchi N, Adachi T, Tsubata T, Nakada H. Ligation of tumor-produced mucin to Siglec-2 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. GLYCO-19: XIVth International Symposium on

- Glycoconjugates, p.393, 2007.7.19. Cairns, Australia [2007.7.15-20]
11. Morita N, Yajima Y, Nakada H, Fujita-Yamaguchi Y. Effects of an anti-GalNAc-Ser(Thr) monoclonal antibody, MLS 128, on human colon cancer LS180 cells. GLYCO-19: XIVth International Symposium on Glycoconjugates, p.365, 2007.7.17. Cairns, Australia [2007.7.15-20]
 12. Ishino H, Kawahito Y, Hamaguchi M, Takeuchi N, Tokunaga D, Hojo T, Kohno M. An important role for aberrantly glycosylated mucin in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. The 71th annual meeting of the American Collage of Rheumatology, 2007.11.9. Boston, USA [2007.11.7-11]
 13. 石野秀岳、川人豊、濱口真英、坪内康則、山本相浩、角谷昌俊、妹尾高宏、吉川敏一. 関節リウマチの関節液由来糖鎖分子の検討. 第 35 回日本臨床免疫学会総会、p.311、2007.10.20、大阪 [2007.10.19-20]
 14. Fukui S, Yamaguchi K. Detection of oligosaccharide ligands for sialic acid-recognizing proteins, such as SNA, MAA and Siglecs by neoglycolipid-based microarray. Ligation of tumor-produced mucin to Siglec-2 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. GLYCO-19: XIVth International Symposium on Glycoconjugates, Cairns, Australia [2007.7.15-20]
 15. 眞坂隆一、三澤義知、前田佳代、矢野恵、村田健臣、碓氷泰市. N 結合型二価配糖体の調製とレクチンとの相互作用. 第 27 回日本糖質学会年会要旨集、p113、2007
 16. 大野智、大野由美子、中田博、鈴木信孝、杉源一郎、井上正樹. 子宮体癌における Tn/sialyl-Tn 抗原発現と COX-2 発現、宿主免疫および予後との関連. 第 65 回日本癌学会学術総会、p.357、2006.9.29、横浜 [2006.9.28-30]
 17. 村田健臣、本多洋規、高橋美生、戸田宗豊、太田麻利子、中田博. シグレックに親和性を有するシアロ糖鎖含有人工ムチンの合成. 第 26 回日本糖質学会年会、p.43、2006.8、仙台 [2006.8.23-8.25]
 18. 太田麻利子、竹内紀子、戸田宗豊、井上瑞江、村田健臣、中田博. Siglec-9 を介したムチンの樹状細胞への影響. 第 26 回日本糖質学会年会、p.134、2006.8.25、仙台 [2006.8.23-8.25]
 19. 福井成行、山口圭子. 糖鎖マイクロアレイを用いたシアル酸認識タンパク質のリガンド糖鎖の検索. 科学研究費補助金特定領域研究「糖鎖によるタンパク質と分子複合体の機能調節」第 4 回夏期シンポジウム、2006.8、浜松
 20. Sugihara I, Yoshida M, Shigenobu H, Takagi H, Maruyama K, Takeuchi N, Toda M, Inoue M, Nakada H. Mucins facilitate tumor progression through overproduction of PGE2. 5th International Symposium on Glycosyltransferases, GlycoT 2006, p.P15, 2006.7.28, Tsukuba, Japan. [2006.7.25-28]
 21. Nakada H, Sugihara I, Yoshida M, Shigenobu T, Takagi H, Maruyama K, Takeuchi N, Toda M, Inoue M. Different progression of tumor xenograft between mucin-producing and -nonproducing mammary adenocarcinoma bearing mice. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. p.83, 2006.6.19, Kyoto Japan. [2006.6.18-23]
 22. Toda M, Takeuchi N, Matsubara J, Inoue M, Adachi T, Taketani S, Tsubata T, Murata T, Nakada H. Immunosuppressive effect of mucin on B cell function in tumor-bearing state. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. p.87, 2006.6.19, Kyoto Japan. [2006.6.18-23]
 23. Inoue M, Toda M, Takeuchi N, Nakada H. Inhibitory effect of mucins on NK cell activity. 井上瑞江、戸田宗豊、竹内紀子、中田博. NK 細胞活性に及ぼすムチンの抑制効果. 第 78 回日本生化学会大会、2005.10、神戸

24. Ohta M, Toda M, Takeuchi N, Inoue M, Murata T, Nakada H. Inhibitory effect of mucin on immune responses of dendritic cells. 太田麻利子、戸田宗豊、竹内紀子、井上瑞江、村田健臣、中田博. 樹状細胞の免疫応答におけるムチンの抑制効果. 第 78 回日本生化学会大会、2005. 10 月、神戸
25. Ishida Y, Toda M, Takeuchi N, Inoue M, Murata T, Nakada H. Induction of apoptosis by mucin engagement during the development of monocytes. 石田有希子、戸田宗豊、竹内紀子、井上瑞江、村田健臣、中田博. 単球から樹状細胞への分化過程におけるムチンのアポトーシス抑制効果. 第 78 回日本生化学会大会、2005.10、神戸
26. Takagi H, Toda M, Inoue M, Nakada H. Inhibitory effect of soluble scavenger receptor on tumor growth. 高木宏晃、戸田宗豊、井上瑞江、中田博. 可溶性スカベンジャーリセプターの腫瘍増殖における抑制効果. 第 78 回日本生化学会大会、2005.10、神戸
27. 松實宏幸、高木佑輔、山口圭子、福井成行. Preparation of carbohydrate microarrays in order to elucidate the role of mucin-type oligosaccharides in tumor progression. 第 78 回日本生化学会大会、2005.10、神戸
28. 本多洋規、高橋美生、藤田健太郎、戸田宗豊、中田博、村田健臣、碓氷泰市. 多価性シアリルオリゴ糖含有人工ムチンの合成およびシグレック 2 との相互作用解析. 第 78 回日本生化学会大会、p.890、2005.10、神戸
29. Akimoto T, Misawa Y, Amarume S, Murata T, Usui T. Enzymatic synthesis and characteristics of bis-O-glycosides. 第 78 回日本生化学会大会、p.891、2005.10、神戸
30. Takagi H, Toda M, Inoue M, Nakada H. Functional aspect of scavenger receptor on tumor growth. GLYCO XVIII: XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, 2005. September, [Florence, Italy]
31. Toda M, Takeuchi N, Inoue M, Murata T, Tubata T, Nakada H. Immunosuppressive effect of mucins on B cell function in tumor-bearing state. GLYCO XVIII: XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, 2005. September, [Florence, Italy]
32. Ohta M, Ichida A, Toda M, Inoue M, Murata T, Nakada H. Effect of mucin on functional aspect of dendritic cell. GLYCO XVIII: XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, 2005. September, [Florence, Italy]
33. Murata T, Honda H, Toda M, Nakada H, Usui T. Interaction analysis between glycopolymers carrying multivalent sialyloligosaccharides and Siglec-2. GLYCO XVIII: XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, 2005. September, [Florence, Italy]
34. Ogata M, Zeng X, Murata T, Usui T, Uzawa H. Synthesis of 6'-sulfodisaccharides by *Aspergillus oryzae* β -N-acetylhexosaminidase-catalyzed transglycosylation reaction. GLYCO XVIII: XVIIIth International Symposium on Glycoconjugates, 2005. September, [Florence, Italy]
35. 井上瑞江、戸田宗豊、竹内紀子、中田博. ムチンによるシグレック 7 を介した NK 細胞への影響. Effect of mucins on NK cell through Siglec7. 第 25 回日本糖質学会年会、2005.7、大津
36. Sugihara I, Toda M, Inoue M, Nakada H (Kyoto Sangyo Univ.). Immunomodulatory effect of mucins produced by epithelial cancer cells. US/JAPAN GLYCO 2004, November 2004, Hawaii (USA)
37. Hosoki Y, Akita K, Toda M, Inoue M, Fushiki S, Oohira A, Okayama M, Nakada H. (Kyoto Sangyo Univ., Kyoto Pref. Med. Univ.). Heparan sulfate proteoglycans interact with neurocan and promote neurite outgrowth from cerebellar granule cells. US/JAPAN

GLYCO 2004, November 2004, Hawaii (USA)

38. 杉原一平、戸田宗豊、井上瑞江、中田博 (京都産業大工). 上皮性癌細胞より産生されるムチンの免疫学的影響. 第 77 回日本生化学会大会、2004.10、横浜
39. 井上瑞江、戸田宗豊、秋田薫、中田博 (京都産業大工). ムチンによるシグレック 7 を介した NK 活性の制御. 第 77 回日本生化学会大会、2004.10、横浜
40. Honda H, Hattori T, Murata T, Usui T. Enzymatic synthesis of poly-N-acetyllactosamine utilizing endo-beta-galactosidase-catalyzed transglycosylation. 第 77 回日本生化学会大会、p.1029、2004、横浜
41. 中田博、横井川規巨、稲葉隆明、海堀昌樹、小倉徳裕、高田秀穂、井上瑞江、権雅憲、上山泰男 (京都産業大工、関西医大). 担癌状態におけるムチンの生物学的意義. 第 63 回日本癌学会総会、2004.9、福岡
42. Murata T, Hattori T, Honda H, Amarume S, Usui T (Sizuoka Univ.). Kinetic studies of endo- β -galactosidase by a novel colorimetric assay and synthesis of poly-N-acetyllactosamines using its transglycosylation activity. US/JAPAN GLYCO 2004, November 2004, Hawaii (USA)
43. Shigenobu T, Toda M, Yoshida M, Akita K, Yamashina I, Inoue M, Nakada H. Biological significance of mucins in progression of epithelial cancer tissues. 第 75 回日本生化学会大会、p.162、2003.10
44. Toda M, Sugihara I, Akita K, Inoue M, Yamashina I, Yamaguchi T, Hosokawa Y, Kutsumi H, Kurioka H, Kawahito Y, Nakada H. Interactions of CD22 with mucins produced by epithelial cancer cells. 第 75 回日本生化学会大会、p.163、2003.10
45. Horiguchi N, Arimoto K, Mizutani A, Nakada H, Taketani S. Induction of adhesion of non-adherent colon cancer cells by Galectin-1. 第 75 回日本生化学会大会、p.252、2003.10

(3)特許出願

①国内出願 (3 件)

1. 発明の名称: 関節リウマチ治療剤
発明者: 中田博、川人豊
出願人: 学校法人京都産業大学
出願日: 2008 年 2 月 13 日
出願番号: 2008-32226
2. 発明の名称: B 細胞傷害抑制剤
発明者: 中田博、戸田宗豊
出願人: 学校法人京都産業大学
出願日: 2006 年 10 月 23 日
出願番号: 2006-287359
3. 発明の名称: 免疫抑制剤
発明者: 中田博、村田健臣、碓氷泰市
出願人: 学校法人京都産業大学
出願日: 2004 年 8 月 24 日
出願番号: 2004-244403

その他 0 件

②海外出願 (0 件)

その他 0 件

(4)受賞等

①受賞

1. 第 27 回日本糖質学会ポスター賞 [村田健臣]
2. 2005 年農芸化学奨励賞(日本農芸化学会) [村田健臣]

②新聞報道

なし

③その他

なし

(5)その他特記事項

1. Nakada H. Biological significance of mucins produced by epithelial cancer cells. *Experimental Glycoscience* (eds. N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki and S. Hase) : pp.238-245, 2008, Springer.
2. Murata T, Usui T. Convenient synthesis of glycan-related oligosaccharides and their transformation into neoglycoconjugates using enzymatic methods. *Experimental glycoscience, glycobiology. Part 1 Glycosyltransferase gene, Section 1 Glycosyltransferases* : pp.5-8, 2008, Springer.
3. 中田博. 担癌状態におけるムチンの生物学的意義. 遺伝子医学、MOOK11「臨床糖鎖バイオマーカーの開発-糖鎖機能の解明とその応用」: pp.148-154、2008. メディカル・ドウ.
4. 中田博. ムチンを介した腫瘍細胞の増殖・進展. 蛋白核酸酵素 Vol.53 No.12. :pp.1604-1610、2008. 共立出版.
5. 村田健臣. オリゴ糖鎖及び糖鎖含有人工ムチンの合成と疾患制御への応用. 財団法人杉山産業科学研究所研究報告、2008
6. 中田博. 上皮性癌細胞の産生するムチンの生物学的意義. 未来を拓く糖鎖科学 : pp.288-291、2005. 金芳堂.
7. 村田健臣、碓氷泰市. 酵素法を組み合わせた生物活性オリゴ糖鎖分子の合成. 未来を拓く糖鎖科学 : pp.130-132、2005. 金芳堂.
8. 中田博. O-グリカンおよびムチンの性質と生物学的機能. 糖鎖科学の新展開-機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて : pp.11-17、2005. 株式会社 NTS.
9. 中田博. 上皮性癌細胞の産生するムチンの特性と腫瘍組織における生物学的意義. 生化学、第 77 巻、第 7 号 : pp.652-646、2005. 日本生化学会.
10. 中田博. 上皮性癌細胞の産生するムチンの特性と機能. 遺伝子医学、MOOK3「病気と

糖鎖」：pp.80-84、2005. メディカル・ドゥ.

11. 碓氷泰市、村田健臣. 分子認識チップとしてのオリゴ糖鎖の合成と展開. 糖鎖科学の最新展開：pp.510-517、2005. エヌティーエス出版.
12. 福井成行. 糖鎖マイクロアレイ：糖鎖情報解読への Sweet Spot (Carbohydrate microarray: A sweet spot for deciphering the information embedded in oligosaccharide structure). 生化学、第75巻、第2号：pp.1545-1550、2003. 日本生化学会.

§ 7 研究期間中の主な活動

ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2006.5.18	セミナー及びミーティング	静岡大学農学部	7名	シグレック 9 とムチンの相互作用の評価
2005.4.21-22	ミーティング	京都産業大学	4名	人工ムチンの設計及び機能評価

§8 結び

[達成度・自己評価・今後の展開]

当初の目標であるムチンを介した免疫能の変化の解析という観点からみれば、数種の免疫系細胞でムチンと受容体の結合とその受容体を発現している細胞への影響を明らかにした。分子レベルでの解析は、今後の応用研究につながる内容と考えている。基礎的には、ムチンの中でも分泌型ムチンと膜結合型ムチンの機能的視点からの相違が明らかになりつつある。これも、ムチンに対する抗体を用いた臨床応用を視野に入れる上で考慮に入れなければならない点と考えている。今後、このような基礎的内容をさらに発展させていくと共に、このような研究が対癌戦略の中でどの程度の意義をもつかを見極める必要がある。上述したように、マクロファージや樹状細胞への影響は免疫の方向性(免疫環境)を決定する上で極めて重要であると考えており、担癌マウスのレベルでその全体像を明確にしていく必要があると考えている。

[研究代表者としてのプロジェクト運営]

互いの主たる研究内容で連携する場合は、比較的スムーズであるが、そうでない場合の運営の困難さを実感した。研究費の使途については、本プロジェクトの場合、代表者の所属する大学のシステムが大講座制で研究スタッフがいないことから、多くの予算を人件費に使わざるを得なかった。この点については、代表者の立場としては有意義に使わせていただいたことを感謝している。



