

戦略的創造研究推進事業 C R E S T
研究領域 「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」
研究課題 「糖鎖シグナルによる獲得免疫応答制御の
解明と疾患制御への応用」

研究終了報告書

研究期間 平成16年10月～平成22年3月

研究代表者：鏑田武志

東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部・教授

§1 研究実施の概要

本研究は、B リンパ球に発現するシグナル制御機能をもつ膜型レクチン分子 CD22/Siglec-2 および CD72 とその糖鎖リガンドに焦点を合わせ、獲得免疫応答におけるこれらの分子の役割を明らかにすることにより、獲得免疫応答における糖鎖シグナルとそのレセプターの重要性を明らかにし、さらに、改変糖鎖リガンドを用いた免疫制御法の開発を行うことを目的として行った。その結果、CD22/Siglec-2 および CD72 分子やそのリガンドが、抗体の産生制御や自己免疫の発症制御などで重要な役割を果たすことを明らかにした。さらに、CD22/Siglec-2 の合成改変糖鎖リガンドにより B 細胞機能を制御し、感染防御が可能になることを示し、これら改変糖鎖リガンドによりワクチンや抗菌/抗ウイルス薬とは別の画期的な感染防御薬の開発が可能であることを実証した。以下にその概要を示す。

1. CD22/Siglec-2 の機能解明

CD22/Siglec-2 欠損ナイーブ B 細胞が免疫応答の際に記憶細胞のように迅速に活性化し、抗体産生を行うことを明らかにした。この知見は、CD22/Siglec2 機能阻害によりナイーブ B 細胞が記憶 B 細胞様の反応性を獲得することを示唆する。

2. CD22/Siglec-2 に高親和性に結合する合成改変糖鎖リガンドの合成

岐阜大学木曾教授らの研究グループと共同で CD22/Siglec-2 に数十ないし 100nM で結合する優れた化合物の開発に成功した。

3. CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドの機能解明

Neu5Gc 合成に必要な CMP-N-アセチルノイラミン酸水酸化酵素 (CMAH) 欠損マウスを解析することにより、マウス CD22/Siglec2 がもっぱら認識する Neu5Gc が B 細胞機能に抑制的に働くことを明らかにした。また、合成糖鎖リガンドで CD22/Siglec-2 と内因性の糖鎖リガンドとの反応を阻害すると、CD22/Siglec-2 が B 細胞抗原受容体と共局在しなくなるなど、CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドが CD22/Siglec-2 の機能を正に制御して B 細胞機能を阻害することが示唆された。

4. CD22/Siglec-2 糖鎖リガンド代謝の解明

CD22/Siglec-2 リガンドの発現は、主要なシアル酸分子種を Neu5Gc から Neu5Ac に変換することで活性化 B 細胞、特に胚中心 B 細胞において抑制されることを明らかにした。また、β セクレターゼ欠損マウスを樹立し、β セクレターゼが CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドの発現制御を行っていることを明らかにした。なお、細胞表面での糖鎖発現制御に関わる責任酵素遺伝子の DNA マイクロアレイプロファイル解析を通じた新たなスクリーニング法の確立も行った。

5. CD72 の糖鎖結合活性

CD72 の C タイプレクチンドメインの可溶化タンパクを作成し、糖鎖結合能があることを明らかにした。

6. CD72 の機能解明

CD72 ハプロタイプコンジェニックマウス、CD72 欠損マウスの樹立により、マウス CD72 が自己抗体産生や自己免疫疾患の発症を制御していることを明らかにした。また、ヒト CD72 が B 細胞の機能を制御し、自己免疫発症に関連することを明らかにした。

7. Siglec7 の機能解明

Siglec7 はヒトのNK 細胞や単球に発現され、ガン関連糖鎖に強く結合することが示されている。Siglec7 に ITIM に依存しない新規のシグナル系を持つことを示した。

§ 2. 研究構想

(1) 当初の研究構想

1. 免疫応答におけるCD22/Siglec-2の機能解明

CD22/Siglec-2変異マウスやこれらの変異マウスと抗体トランスジェニックマウスを交配したマウスを用いて、免疫応答の際の生体内でのCD22/Siglec-2の機能を解明し、これまでのB細胞株などを用いて得られた、CD22/Siglec-2が抗原と反応したリンパ球の運命を決める分子シグナルであるかどうか、また、CD22/Siglec-2のシグナル抑制機能解除による記憶応答の際のような迅速・大量の抗体産生がおこるかを明らかにする。

2. CD22/Siglec-2の糖鎖リガンドの機能解明

CMP-*N*-アセチルノイラミン酸水酸化酵素 (CMAH) 欠損マウスや CMAH と CD22/Siglec-2 ダブル欠損マウスの免疫応答やBリンパ球機能などを解析し、生体内での CD22/Siglec-2 によるBリンパ球活性化抑制やその他の機能に糖鎖リガンドが必要か、また、リガンドが CD22/Siglec-2 のシグナル機能をどのように制御するのか明らかにする。

3. CD22/Siglec-2と糖鎖リガンドの反応様態の解明

CD22/Siglec-2 が糖鎖リガンドによる制御を受ける際に、同じ細胞上のリガンドおよび他の細胞とのリガンドの役割を明らかにするため、B細胞欠損マウスをホストとして細胞移入を行うことにより、Bリンパ球は糖鎖リガンドを持たないが、その他の細胞はすべて糖鎖リガンドを持つマウスを作成し、このようなマウスでの B 細胞機能を明らかにする。また、Bリンパ球上で CD22/Siglec-2 と co-modulate する分子や共沈降する分子を同定することにより、同一細胞膜上で、CD22/Siglec-2 がどのような分子上のリガンドに反応するのかを明らかにする。このような解析により、CD22/Siglec-2 がどの細胞のどの分子上のリガンドを認識することにより、抗原受容体シグナルを特異的に制御するのか解明する。

4. CD22/Siglec-2の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

Siglec ファミリー分子のリガンド発現制御に関与する糖鎖生合成及び分解酵素の探索、同定を行う。Siglec ファミリーの糖鎖認識部位とヒトの IgGFc 部位との融合タンパクを作成し、これをプローブとしてリガンドの発現を検索し、リガンドの発現の異なる細胞について糖鎖関連遺伝子マイクロアレイを用いて解析を行い、Siglec 認識糖鎖の生合成経路内での鍵遺伝子を同定するとともに、この遺

伝子の同一経路内での協同的発現の調節の有無などの調節機構を解明してゆくことで、Siglec リガンド糖鎖の免疫系での発現調節機構を明らかにする。また、 β セクレターゼ・ノックアウトマウスあるいはトランスジェニックマウスを解析することにより β セクレターゼが CD22/Siglec-2 糖鎖リガンドの発現制御に関わるか明らかにする。さらに、糖鎖リガンドの発現や糖鎖リガンド合成に関わる鍵酵素および β セクレターゼの産生の変化を B 細胞の活性化段階や種々の細胞で検索し、その変化が免疫応答の制御に関わるか解析を行う。

5. CD33ファミリーSiglecsとCD72の機能の解明

CD33ファミリーSiglecのうちリンパ球に発現するヒトSiglec7のトランスフェクタントなどを樹立し、シグナル機能を解明する。また、C型レクチン様ドメインを持つCD72はCD22/Siglec-2と同様にB細胞抗原受容体シグナルを制御することが明らかになっているので、CD72遺伝子変異マウスの解析を行うことにより、その生体内での抗体応答制御機能を明らかにする。また、CD72が糖鎖リガンドに反応するか可溶性CD72分子を作成して検討する。

6. 改変糖鎖リガンドによるCD22/Siglec-2の機能制御法の開発

改変糖鎖リガンドを多数合成し、CD22/Siglec-2の機能を効率よく阻害する化合物を同定する。そして、この改変糖鎖リガンドを動物に投与することにより、初回感染時においても迅速・大量の抗体産生をおこし、感染抵抗性が増強するか明らかにする。

(2) 新たに追加・修正などした研究構想

1. ヒトCD72ハプロタイプの解析

我々の研究で、マウスのCD72ハプロタイプが自己免疫疾患制御で重要であることが明らかとなったので、ヒトCD72のハプロタイプとBリンパ球機能や自己免疫疾患との関連についての解析をおこなった。

2. DNAマイクロアレイ解析法の一般性の解析

我々の研究でCD22/Siglec-2リガンドの発現抑制をプローブすることが明らかとなった、単クローン抗体GL7の認識するエピトープの解析を行った際、糖鎖関連遺伝子マイクロアレイ解析を用いて、そのエピトープの発現を制御する責任酵素遺伝子の同定を行うことができた。この方法は、糖鎖結合性プローブの解析手法としてはもちろん、DNAマイクロアレイ解析法としても例を見ない新規な方法論であったため、その一般性に関して調べる必然性が生じた。そこで、エピトープ既知の植物レクチンを多数用いて、同様の実験系の一般性を調べることで、新たな研究手法の開発を行うこととした。

3. CMAHの過剰発現によるCD22/Siglec-2糖鎖リガンドの機能解明

CD22/Siglec-2 のリガンドは、胚中心の活性化B細胞においてダイナミックにその発現が抑制されていることが明らかとなった。当初、このような発現制御は想定していなかったため、*Cmah* 欠損マウスを用いてシアル酸分子種 Neu5Gc の機能が解析できることを想定していた。しかしながら、液性免疫に関わる場面での CD22/Siglec-2 リガンドの機能は、野生型マウスにおいて CMAH の発現抑制によりリガンド発現が抑制されることから、*Cmah* 欠損マウスでは解明できないことが明らかとなった。そこで、胚中心反応に及ぼす影響を調べるために、活性化B細胞においてもその発現が抑制されないトランスジェニックマウスを用いてこれを検証する必要性が生じた。そこで、イムノグロブリン可変部プロモーターにより CMAH を発現するトランスジェニックマウスを樹立し、このマウスの T 細胞依存性抗原に対する応答を調べることにした。

4. ITIM に依存しない抑制性シグナルの解析

Siglec-7 の ITIM は抑制性シグナルを伝えることを示した。一方で、ITIM を含む細胞内ドメインを欠損する変異体が細胞機能の抑制性シグナルを伝えることが明らかとなった。そこで、このシグナル伝達に重要な部位の同定を行った。また、この部位に対する抗体や結合性を示す化合物のスクリーニングを新たな目標とした。

§ 3 研究実施体制

(○：研究代表者または主たる共同研究者)

(1) 「免疫シグナル制御」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	鏑田武志	東京医科歯科大学 大学院疾患生命科学研究部	教授	H16.10～ 22.3
	安達貴弘	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	准教授	H16.10～ H20.3
	渡辺幸造	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	助教	H16.10～ 22.3
	小野寺大志	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	特任助教	H16.10～ 20.3
	朱丞華	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	特任助教	H16.10～ 20.3
	巖 斌成	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	特任助教	H18.4～ 20.3
	岸 祐介	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	特任助教	H18.4～ 22.3

	一場 孝友	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	大学院生	H18.4～ H19.3
	満 栄勇	東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科	大学院生 D4	H18.4～ 22.3
	佐藤 元彦	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	ポスドク	H18.10～ H19.3
	築地 信	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	特任講師	H19.1～ 22.3
	江藤 朋憲	東京医科歯科大学 難治疾患研究所	学術振興会特 別研究員	H18.4～ 20.3
	于 潔	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院特別研 究学生	H18.4～ 19.9
	Chinthika Gunasekara	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院生 D1	H20.10～ 22.3
	小西 真紀子	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院生 M2	H20.10～ 21.3
	品川 健朗	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院生 M2	H20.10～ 22.3
	玉中 大智	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院生 M2	H20.10～ 21.3
	翁 東	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院生 D1	H20.11～ 22.3
	徐 米多	東京医科歯科大学大学院生 命情報科学教育部	大学院生 M1	H21.3～ 22.3
	林崎 浩史	難治疾患研究所 免疫疾患分野	技術補佐員	H21.2～ 22.3
	高橋 博子	東京医科歯科大学大学院疾 患生命科学部	事務補佐員	H16.10～ 22.3

②研究項目

免疫応答における CD22/Siglec-2 の機能解明

CD22/Siglec-2 と糖鎖リガンドの反応様態の解明
 CD33ファミリーSiglecs と CD72 の機能の解明
 改変糖鎖リガンドによる CD22/Siglec-2 の機能制御法の開発

(2)「糖鎖リガンド」グループ

① 研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	小堤 保則	京都大学	教授	H16.10～H22.3
	竹松 弘	京都大学	准教授	H16.10～H22.3
	金沢 崇之	京都大学	特任助教	H18.10～H20.3
	内藤 裕子	京都大学	D1～D4、助教	H16.10～H22.3
	山銅 ゆかり	京都大学	教務職員	H16.10～H22.3
	山本 寛	京都大学	M1～D3	H16.10～H21.3
	藤原 奈穂子	京都大学	M1～2	H16.10～H18.3
	大野 宏幸	京都大学	M1～2	H17.4～H19.3
	山本 敦子	京都大学	M1～2	H17.4～H19.3
	槇野 彰人	京都大学	M1～2	H17.4～H19.3
	安藤 祐実	京都大学	M1～2	H17.4～H19.3
	下林 貢	京都大学	M1～D3	H17.4～H22.3
	大西 功一	京都大学	M1～2	H18.4～H20.3
	村田 恵祐	京都大学	M1～2	H18.4～H20.3
	野中 淑恵	京都大学	M1～2	H18.4～H20.3
	今井 未希	京都大学	M1～2	H19.4～H21.3
	瀬野 裕子	京都大学	M1～2	H19.4～H21.3
	川井 明日香	京都大学	M1～2	H19.4～H21.3
	岡野 真歩	京都大学	M1～2	H20.4～H22.3
	清川 真也	京都大学	M1	H20.4～H21.3
	昼馬 和宏	京都大学	M1	H20.4～H21.3
	江田 美沙子	京都大学	M1	H21.4～H22.3
	岡原 京平	京都大学	M1	H21.4～H22.3
	遊川 秀哉	京都大学	M1	H21.4～H22.3

②研究項目

- 1 CD22/Siglec-2 糖鎖リガンドの機能解明
- 2 CD22/Siglec-2 糖鎖リガンド発現制御機構の解明

(3) 「リガンド代謝」グループ

①研究参加者

	氏名	所属	役職	参加時期
○	橋本 康弘	独立行政法人理化学研究所／ 公立大学法人福島県立医科大学	チームリーダー／教授	H16.10～H22.3
	北爪 しのぶ	独立行政法人理化学研究所	研究員	H16.10～H19.9
	高島 晶	独立行政法人理化学研究所／ 公立大学法人福島県立医科大学	研究員／博士 研究員	H16.10～H20.3
	中川 和博	独立行政法人理化学研究所	研究員	H16.10～H19.9
	三ツ木 元章	独立行政法人理化学研究所	研究員	H16.10～H19.9
	杉本 一路	独立行政法人理化学研究所	研究員	H16.10～H19.9
	城谷 圭朗	公立大学法人福島県立医科大学	准教授	H20.1～H22.3
	奈良 清光	公立大学法人福島県立医科大学	講師	H19.5～H22.3
	二川 了次	独立行政法人理化学研究所／ 公立大学法人福島県立医科大学	テクニカルスタ ッフ／博士 研究員-助教	H18.6～H22.3
	亀高 愛	公立大学法人福島県立医科大学	博士研究員	H19.10～H21.3
	遠山 ゆり子	公立大学法人福島県立医科大学	専門医療技師	H19.4～H22.3
	星 京香	公立大学法人福島県立医科大学	主任医療技師	H19.4～H20.12
	菅野 真由美	公立大学法人福島県立医科大学	講座等研究員	H20.6～H22.3
	齋藤 由加里	公立大学法人福島県立医科大学	講座等研究員	H20.6～H22.3
	半沢 雄助	公立大学法人福島県立医科大学	医療技師	H21.4～H22.3
	萩田 香織	公立大学法人福島県立医科大学	講座等研究員	H19.3～H22.3

②研究項目

- 1 CD22/Siglec-2 糖鎖リガンド発現制御機構の解明
- 2 CD33 ファミリー-Siglecs と CD72 の機能の解明

§ 4 研究実施内容及び成果

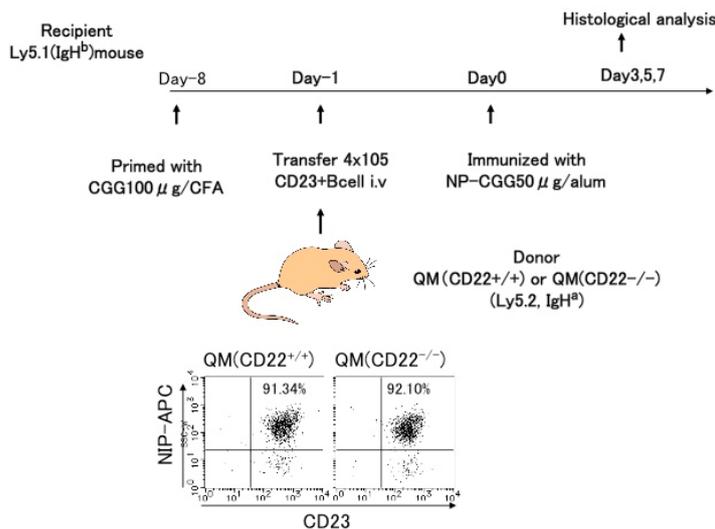
[1] 免疫シグナル制御グループ（東京医科歯科大学 鏑田グループ）

(1) 研究実施内容及び成果

1. CD22 欠損 B 細胞の機能解析

CD22/Siglec-2 は B 細胞抗原受容体シグナルの負の制御因子であるが、これまで CD22/Siglec-2 欠損マウスを免疫しても必ずしも高い抗体産生は観察されず、抗原によっては免疫応答の低下が報告されている。そこで、我々は、CD22/Siglec-2 欠損マウスの抗体産生応答について詳細な検討を行った。

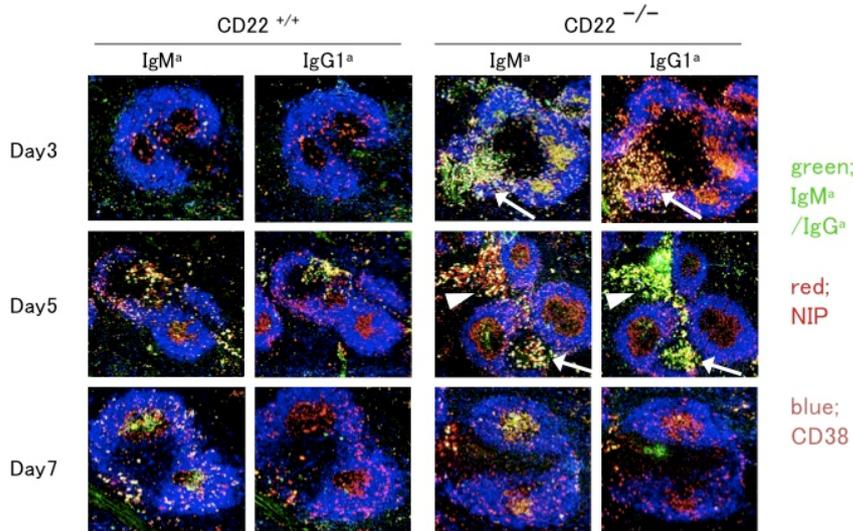
抗原刺激の際の B 細胞の増殖やプラズマ細胞（抗体産生細胞）への分化を詳細に解析するために、我々は、CD22/Siglec-2 欠損マウスと、免疫グロブリントランスジェニックマウスである QM マウスを交配した。QM マウスは免疫グロブリン H 鎖遺伝子座に再構成ずみの VH17.2.25 遺伝子断片がノックインされたマウスを免疫グロブリン κ 鎖欠損マウスと交配したもので、すべての B 細胞が VH17.2.25 を含む H 鎖と λ L 鎖からなるニトロフェノール (NP) に特異的な免疫グロブリンを発現する。次いで、CD22^{+/+}QM マウスおよび CD22^{-/-}QM マウスの脾臓から B 細胞を精製し、あらかじめトリッグロブリン (CGG) で免疫し T 細胞を誘導した C57BL/6.Ly5.1 コンジェニックマウスに移入した。QM マウス、CD22/Siglec-2 欠損マウスおよび C57BL/6.Ly5.1 マウスはいずれも C57BL/6 系統のマウスであるが、C57BL/6 マウスが Ly5.2 ハプロタイプであるのに対し、B6.Ly5.1 マウスでは Ly5.1 ハプロタイプを持つ。Ly5 (CD45) 分子は B 細胞を含む血液細胞表面に広く発現するので、Ly5.1 および Ly5.2 に特異的な抗体を用いれば、ドナー由来の B 細胞とレシピエント由来の B 細胞が区別できる。また、QM マウスは IgH^b ハプロタイプの免疫グロブリンを産生するが、C57BL/6 マウスは IgH^b ハプロタイプの免疫グロブリンを産生し、ハプロタイプ特異的な抗体により区別できる。



CD22^{+/+}QM および CD22^{-/-}QMB 細胞を C57BL/6.Ly5.1 コンジェニックマウスに移入後、レシピエントマウスを NP-CGG/Alum で免疫し、経時的に免疫応答の解析を行った。まず、脾臓の組織学的解析を行った。CD22^{+/+}QMB 細胞は免疫後、3、5、7日と徐々に増加し、若干のプラズマ細胞の出現も見られた。一方、CD22^{-/-}QMB 細胞は、免疫後3日目

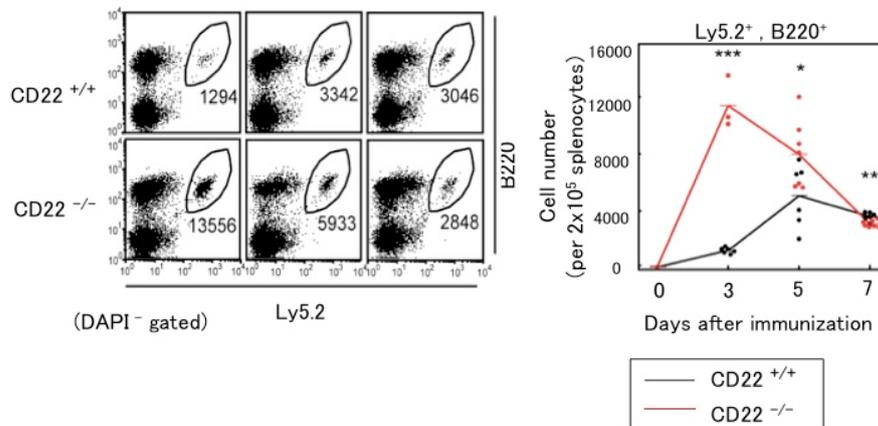
bridging channel を中心に多量の IgM+プラズマブラストが出現し、5日後には赤脾髄を中心に多量の IgG 産生プラズマ細胞が出現した。このような多量のプラズマブラストおよびプラズマ細胞の出現は記憶応答の際にのみ見られる現象で、この結果は、CD22 欠損によりナイーブ B 細胞が記憶 B 細胞様の反応性を獲得したことを示すものである。

CD22欠損B細胞では抗体応答が早期化する

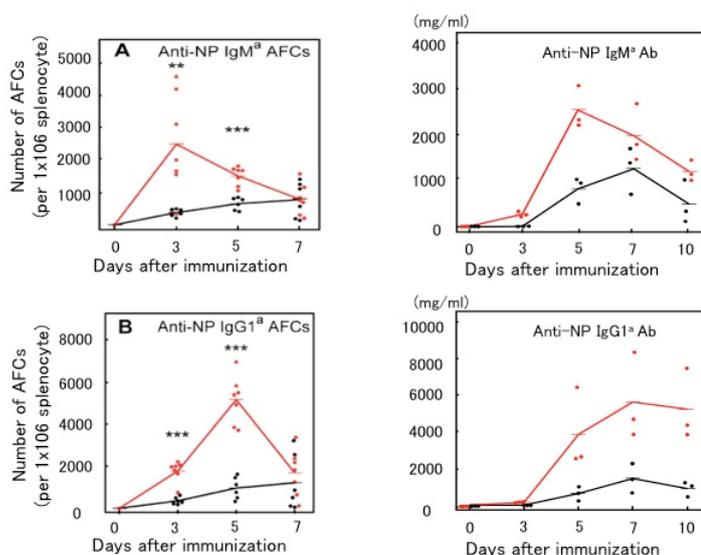


さらに、脾臓での移入した B 細胞の増殖や抗 NP 抗体産生細胞の出現についてフローサイトメトリーおよび ELISPOT 法により解析を行ったところ、CD22^{-/-}QMB 細胞は CD22^{+/+}QMB 細胞に比べて免疫後 3-5 日にかけて、顕著に増加していた。また、CD22^{-/-}QMB 細胞に由来する抗体産生細胞数も CD22^{+/+}QMB 細胞に由来するものに比べて顕著に増加していた。さらに、CD22^{-/-}QMB 細胞移入マウスでは CD22^{+/+}QMB 細胞移入マウスに比べて血清中の抗 NP 抗体レベルが顕著に増加していた。しかし、免疫 7 日目には、CD22^{-/-}QMB 細胞数や CD22^{-/-}QMB 細胞に由来する抗体産生細胞数は CD22^{+/+}QMB 細胞の場合とほぼ同じレベルにまで減少していた。したがって、CD22 欠損により B 細胞の増殖やプラズマ細胞への分化が顕著に亢進し、ごく初期から多量の抗体産生がおこるが、このような亢進した B 細胞応答は免疫後 7 日目には収束することが明らかとなった。

免疫後のCD22欠損B細胞の迅速な増殖



CD22欠損B細胞の迅速な抗体産生



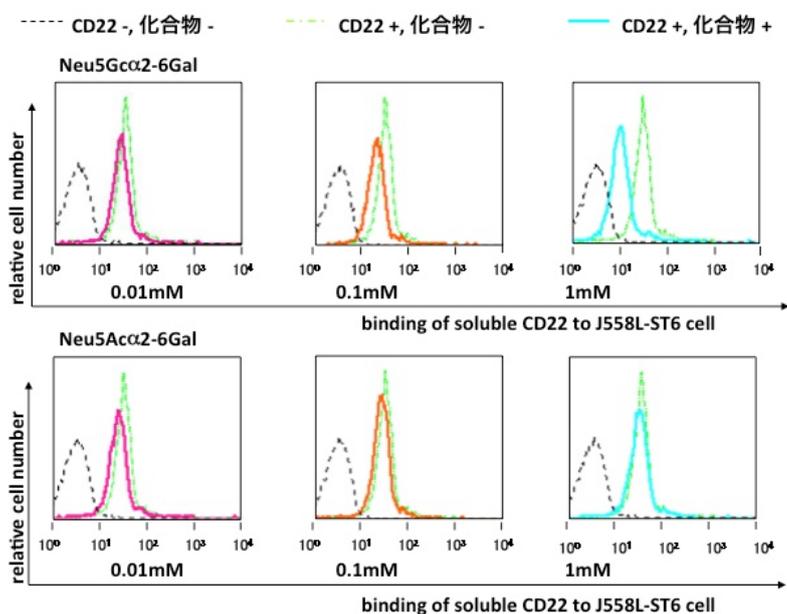
以上の結果から、CD22 は B 細胞応答のタイムコースの制御に重要な役割を果たし、CD22 欠損によりナイーブ B 細胞が記憶 B 細胞様の迅速な応答をおこすことが明らかとなった。しかしながら、CD22 欠損により B 細胞応答は早く収束するようになる。これまで、CD22 欠損マウスの解析で抗体応答の増強が示されなかったのは、これまでの解析では免疫応答のごく初期での解析はなく、B 細胞応答が収束してから解析をしていたためかもしれない。

2. CD22/Siglec-2 制御化合物の開発

CD22/Siglec-2 機能抑制により感染防御が可能であることが明らかとなってきたので、CD22/Siglec-2 機能制御化合物の開発を行った。CD22/Siglec-2 は $\alpha 2, 6$ シアル酸に結合することが知られている。また、シアル酸の 9 位をビフェニール基などで修飾することにより、CD22/Siglec-2 への親和性を上昇できること、また、このような化合物を用いることで、B 細胞の抗原受容体架橋の際のカルシウムイオン濃度上昇を増強することが報告されていた。しかしながら、この報告での実験系は通常用いられるものとは若干ことなる条件でおこなっており、我々が行った限りでは、同様の化合物は B 細胞抗原受容体架橋の際のカルシウムイオン濃度を制御しなかった。そこで、我々は、岐阜大学木曾教授、石田教授らと共同で CD22/Siglec-2 機能制御化合物の開発を行った。

まず、CD22/Siglec-2 に特異的に結合する化合物を同定する系を樹立した。ミエローマ細胞 J558L 細胞は $\alpha 2, 6$ シアル酸の合成に必要なシアリルトランスフェラーゼ ST6GalI の発現を欠損する。このため、ヒトおよびマウス CD22/Siglec-2 とヒト IgG の Fc 部分との融合タンパク (それぞれ hCD22Fc および mCD22Fc) は J558L に反応しない。しかし、J558L 細胞に ST6GalI 発現プラスミドを導入すると (J558LST6)、 $\alpha 2, 6$ シアル酸を発現するために、CD22Fc との反応をフローサイトメトリーで観察することができるようになる。 $\alpha 2, 6$ シアル酸として Neu5Gc $\alpha 2, 6$ Gal と Neu5Ac $\alpha 2, 6$ Gal を合成し、mCD22Fc の J558LST6 細胞への反応を阻害するか調べたところ、1mM の Neu5Gc $\alpha 2, 6$ Gal で mCD22Fc の結合を約 50% 阻害していた。これは、CD22 の $\alpha 2, 6$ シアル酸への結合定数が mM オーダーであることとよく合致する。一方、Neu5Ac $\alpha 2, 6$ Gal は mCD22Fc の J558LST6 への反応を阻害しなかった。これは、マウス CD22 が Neu5Gc $\alpha 2, 6$ Gal に優先的に結合し Neu5Ac $\alpha 2, 6$ Gal にはごく弱くしか反応しないためと考えられる。

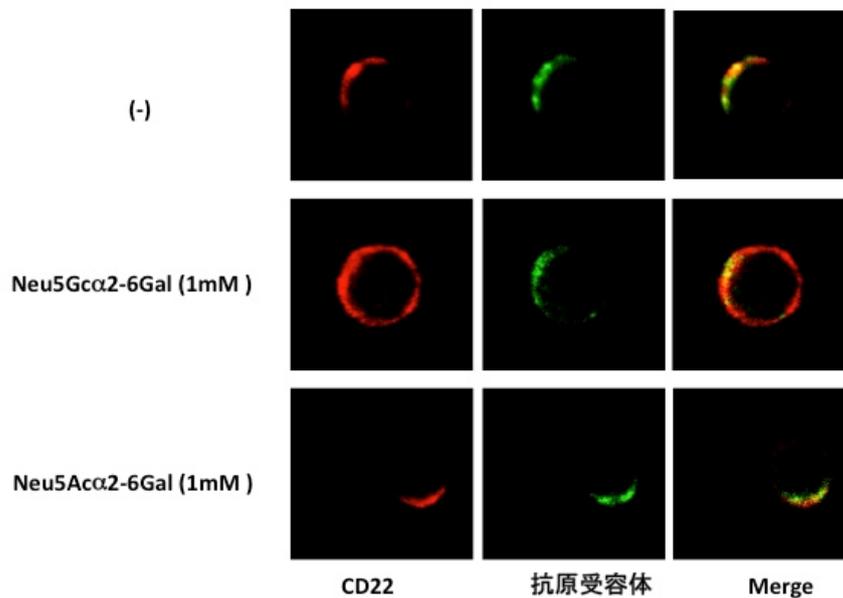
CD22合成糖鎖リガンドとCD22の反応



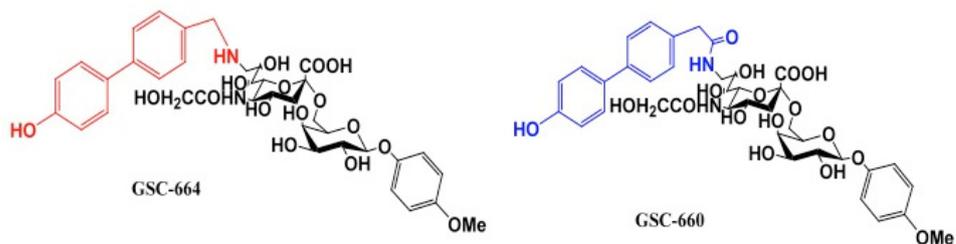
次いで、Neu5Gc α 2, 6Gal のマウス B 細胞機能への影響を調べた。まず、B 細胞株などを用いて抗原受容体架橋の際のカルシウムイオン濃度上昇への影響を調べたが、1mM までの Neu5Gc α 2, 6Gal ではカルシウムイオン濃度の変化は見られなかった。

マウス B 細胞の抗原受容体を架橋すると、キャッピングと呼ばれる抗原受容体が細胞の一極に集まる現象がおこる。QM マウス B 細胞を精製し、抗原である NP-BSA で架橋したのちに抗原受容体と CD22/Siglec-2 の局在を共焦点顕微鏡で観察したところ、CD22/Siglec-2 もキャッピングをおこし、抗原受容体とともに共局在した。一方、1mM の Neu5Gc α 2, 6Gal の存在下で抗原で処理をすると、抗原受容体はキャッピングをおこしたが、CD22/Siglec-2 はキャッピングをおこさなかった。CD22/Siglec-2 は同じ細胞上の IgM を含む糖タンパクや糖脂質が発現する糖鎖リガンド（シスリガンド）ともっばら反応するとされているが、このシスリガンド、とりわけ IgM 上のリガンドとの反応を合成糖鎖リガンドで阻害することにより、抗原受容体 CD22/Siglec-2 との会合がおこらなくなったものと考えられる。したがって、Neu5Gc α 2, 6Gal によってカルシウムシグナルを制御できなかったものの、CD22/Siglec-2 の機能を阻害できる可能性が示唆された。

CD22糖鎖リガンドによるCD22と抗原受容体の共局在の阻害



CD22/Siglec-2 の機能を効率よく制御する化合物を開発するために、Neu5Gc α 2, 6Gal のシアル酸の 9 位を修飾した種々の化合物を合成し、すでに報告されている最も CD22 に親和性の高い化合物 (ヒト CD22 で BPC-NeuGc-Gal, マウス CD22 では BPA-NeuGc-Gal) よりも、マウス CD22 に約 4 倍強く結合する化合物 (GSC-660) とヒト CD22 に約 5 倍強く結合する化合物を得た。また、ビオチン化 GSC-660 合成することにより、高感度に CD22 に結合する化合物の親和性を測定する ELISA を開発した。

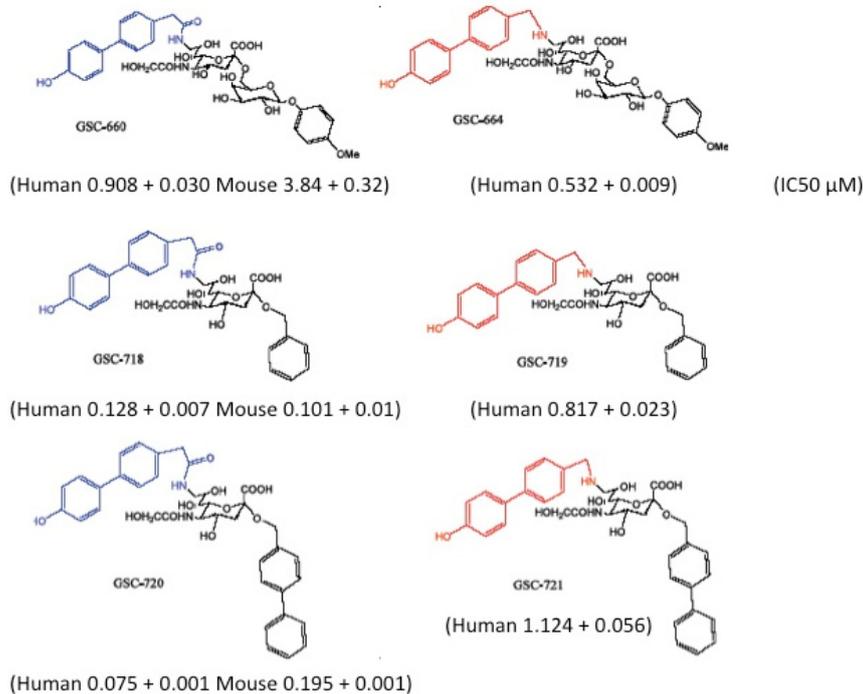


	BPC-NeuGc-Gal	BPA-NeuGc-Gal	GSC-664	GSC-660
Human CD22	1.10 ± 0.22	3.70 ± 1.41	0.23 ± 0.02	0.90 ± 0.01
Mouse CD22	52.93 ± 9.60	6.20 ± 0.50	12.50 ± 1.80	1.70 ± 0.30

(IC50 μ M)

さらに、より高親和性の化合物を開発するために、シアル酸の 2 位に結合するガラクトースに代えて、フェノール基やビフェニール基で修飾したところ、ヒト CD22 には GSC-664 の 7 倍程度 (GSC-720)、マウス CD22 については GSC-660 に比べ約 40 倍親和性の高い化合物 (GSC-718) を得た。このようにして、すでに報告されている化合物に比べ、ヒト CD22 に対して約 35 倍、マウス CD22 に対して約 200 倍親和性の高い化合物を開発すること

に成功した。



3. CD22 の糖鎖リガンドの機能についての解析

前述のように合成高親和性糖鎖リガンドにより CD22/Siglec-2 と内因性糖鎖リガンドとの反応を阻害すると、B リンパ球の活性化が増強することから、内因性糖鎖リガンドと CD22/Siglec-2 との反応が CD22/Siglec-2 のシグナル抑制能を正に制御し、その反応を阻害することによりシグナル抑制が解除されて B リンパ球の活性化が増強するものと考えられる。しかし、Paulson らは $\alpha 2,6$ シアル酸合成に必要なシアリルトランスフェラーゼ ST6GalI を欠損するマウスの解析により、CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドが、CD22/Siglec-2 のシグナル抑制機能の負の制御因子であることを示している。そこで、我々は、ST6GalI 欠損マウスおよび Neu5Gc 合成に必要な CMAH を欠損することにより CD22/Siglec-2 の高親和性リガンドを欠損する CMAH 欠損マウスの B 細胞機能について検討した。その結果、これまでの研究者がおこなっていたように抗 IgM 抗体で抗原受容体を架橋した際には、これら糖鎖リガンド欠損 B 細胞ではシグナル伝達は顕著に阻害されるが、抗原により刺激した場合にはシグナル伝達の抑制はおこらず、また、B 細胞の増殖反応等で抗原受容体シグナル伝達を評価した際には、ST6GalI 欠損 B 細胞や CMAH 欠損 B 細胞では抗原受容体シグナル伝達がむしろ増強していた。これらの結果から、CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドはかならずしも CD22/Siglec-2 の負の制御因子ではないことが明らかとなった。

4. CD72 の機能解析

CD72 には CD72^a, CD72^b, CD72^c, CD72^d のハプロタイプがあり、CD72^c はスプライスサイトでの変異により C 型レクチンドメインに 7 アミノ酸の欠失があるなど、他のハプロタイプとはタンパクの 1 次構造が異なる。また、CD72^c は SLE 様の自己免疫疾患を自然発症する MRL/lpr マウスや 1 型糖尿病を自然発症する NOD マウスで見られる。そこで、CD72^c の機能解析を行った。

(2) 研究成果の今後期待される効果

1. CD22/Siglec-2 阻害剤をもととした画期的感染防御薬の開発

感染症は今日でも大きな問題であり、とりわけマラリア、結核、HIV では毎年世界中でそれぞれ約500万人が死亡し、とりわけこれらの疾患は若年者の死亡が多く、社会的にも大きな問題である。また、インフルエンザなど新たな変異ウイルスが世界的な脅威となっている。また、既知のウイルスについても薬剤耐性株の出現など解決すべき問題が多い。

本研究では、CD22/Siglec-2 の機能を阻害することにより、ナイーブ B 細胞の機能を記憶 B 細胞様に変換してワクチンと同様の感染防御効果を発揮することを、実際のマウス感染系を用いて実証した。さらに、CD22/Siglec-2 の有効な阻害薬を改変糖鎖リガンド合成により開発し、これまでの抗菌剤/抗ウイルス薬と全く作用機序が異なる糖鎖医薬が開発できることを示した。この医薬は、ホストの免疫系を標的とするため耐性菌/耐性ウイルスの出現の心配はなく、さらに、抗原性を変異させる微生物にも有効と考えられる。また、病原微生物を同定する必要がないために新興感染症などの対策に有用である。したがって、CD22/Siglec-2 阻害作用を持つ薬剤を開発することにより画期的な感染防御薬を開発できると期待される。また、今回実証した微生物以外の微生物にも有効性が期待できるので、マラリアや HIV など種々の感染症への効果を検討することにより、世界的な課題となっている感染症への有効な医薬品を開発でき、人類の保健に貢献することが期待できる。

また、ワクチンの開発の際には、微生物によっては抗原性等の問題で有効な免疫反応を誘導できないものがある。また、乳児や高齢者など免疫応答の弱いものに有効な免疫応答を誘導することが困難な場合が多い。このような場合に有効な免疫応答を誘導するにはよりよいアジュバントの開発が必要である。CD22/Siglec-2 阻害剤を利用した、より優れたアジュバントの開発についても期待できる。

2. 獲得免疫応答におけるレクチンと糖鎖シグナルの役割

本研究では、CD72 が自己免疫の制御や多糖抗原への免疫応答に関わることを明らかにし、その糖鎖リガンドの同定を進めた。多糖抗原は、インフルエンザ菌や髄膜炎菌、肺炎双球菌などの微生物への感染防御で中心的な役割を果たす。今回の我々の成果から、今後自己免疫の病態の解明や多糖抗原への免疫応答のしくみの解明が進むとともに、改変糖鎖リガンド等を用いて多糖抗原への免疫応答の制御による感染防御法の開発や自己免疫の制御法の開発が可能となる。

また、CD22/Siglec-2 のトランス糖鎖リガンドが B 細胞の分化に何らかの役割を果たすことを示すことができるなど、CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドの機能について新たな知見が得られた。本研究の成果は、糖鎖リガンドによる獲得免疫応答の制御の仕組みの理解を進め、今後、糖鎖リガンドがどのように獲得免疫応答を制御するかの全貌の解明が促進されると考えられる。

[2] 糖鎖リガンドグループ (京都大学 小堤グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

背景

CD22/Siglec-2 は B 細胞に発現する B 細胞抗原受容体の共受容体分子であり、その糖鎖リガンドとして末端に α 2,6 結合でシアル酸を持つ糖鎖と細胞外領域で結合する活性を有する。一方で、CD22/Siglec-2 はその細胞内領域に Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM)をもち、ここがリン酸化されることで、細胞内シグナル伝達を負に調節する活性を持つと考えられているチロシンフォスファターゼ SHP-1 をリクルートする活性を持つ。このことから、CD22/Siglec-2 は細胞外の糖鎖情報を細胞内のシグナル伝達に直接変換する活性を持つ分子として注目を集めていた。しかしながら、そのレクチン活性がどのように細胞内シグナルに変換されるかに関しては分かっておらず、また、CD22/Siglec-2 糖鎖リガンドが B 細胞抗原受容体からのシグナルにどう関わるかについても不明であった。さらに、CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドはその後の我々の研究で明らかとなるまで、この発現制御が B 細胞の活性化に応じて行われているかについても、特に注目されていなかった。一方、マウスの CD22/Siglec-2 はシアル酸分子種のうち *N*-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) を含む糖鎖に特異性を示すことが報告されており、B 細胞上の Neu5Gc α 2,6 Gal-末端を持つ糖鎖が CD22/Siglec-2 に高親和性リガンドとして認識されることが考えられていた。

CD22/Siglec-2 糖鎖リガンド改変のための戦略

細胞表面の末端部に位置する糖鎖非還元末端には、通常酸性の9単糖であるシアル酸が糖鎖合成系により付加されていることが多い。このシアル酸は、その結合様式として内側の糖であるガラクトースの3位または6位に結合するか、それともシアル酸の8位に結合するかで構造多様性を持つと共に、シアル酸分子種の修飾の変化によっても多様性を発揮する。哺乳動物細胞においては、シアル酸分子の5位の炭素原子に注目すると、シアル酸は Neu5Ac と Neu5Gc に分類される。CMP-Neu5Ac 水酸化酵素(Cmah)は、細胞内で *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)より糖供与体である CMP-Neu5Ac を基質として Neu5Gc を合成する酵素であるが、この反応を制御することで、CD22/Siglec-2 のリガンド発現を人為的に改変できることが考えられた(図1)。シアロ糖鎖を豊富に発現する B 細胞においては、 α 2,6 結合を残しシアル酸分子種のみを改変することは、シアル酸分子種多様性を残してシアル酸転移酵素である ST6Gal1 を欠損させ、B 細胞表面の α 2,6 結合様式をすべて欠損させるよりも、厳密な意味での特異的な糖鎖改変となることが当然のことながら予想され、これを目指し、*Cmah*をマウス個体レベルで欠損するマウスを作製することとした。

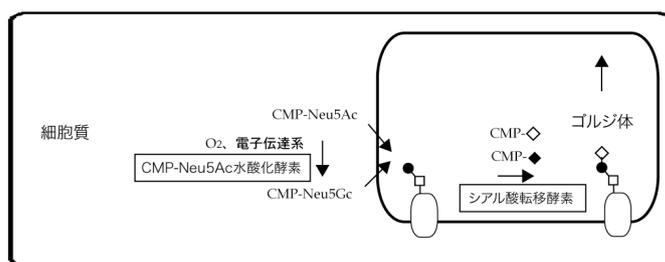


図1 シアル酸含有糖鎖合成の模式図

細胞表面に発現するシアル酸含有複合糖質中のシアル酸分子種の発現調節機構を模式的に示す。細胞表面のシアル酸含有糖鎖はゴルジ体のシアル酸転移酵素反応により合成されるが、ここで使用されるCMP-シアル酸は細胞質からゴルジ体へ輸送される。CMP-シアル酸プールのうちの分子種の内訳は、細胞質中の反応であるCMP-Neu5Ac水酸化酵素反応により決定される。

Cmah 遺伝子欠損マウスの作製

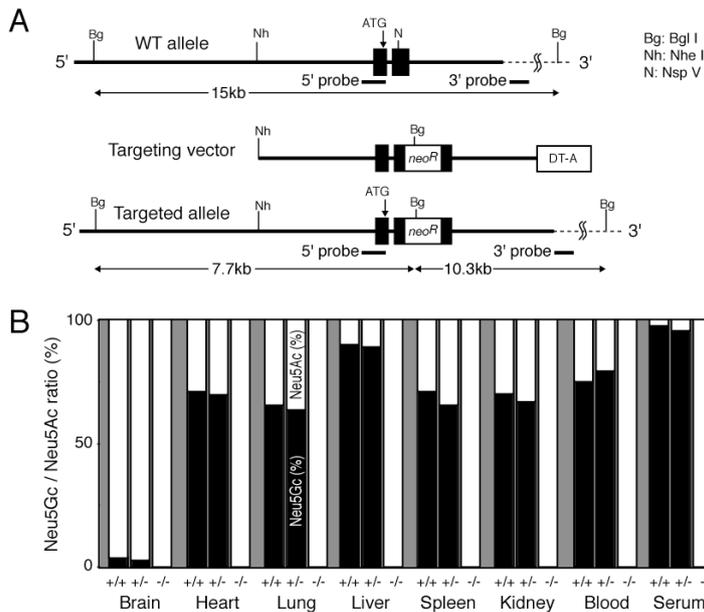


図2 Cmah欠損マウスの作製

(A)CMP-Neu5Ac水酸化酵素(Cmah)遺伝子中の2番目のコーディングエクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入した。(B)Cmah欠損マウスにおけるシアル酸分子種の発現。野生型、ヘテロ、ホモ欠損マウスにおける各組織中のシアル酸をHPLC解析した。グラフでは、全シアル酸中の各分子種の割合を示す。Cmah欠損マウスではNeu5Gcの発現はいずれの組織においても検出限界以下であった。

遺伝子欠損には *Cmah* 遺伝子のうち開始コドンの含まれるエクソンの次のエクソンにネオマイシン耐性遺伝子を挿入したターゲットコンストラクトを作製し、これを ES 細胞に導入し、相同的組み換えを起こしたクローンを選択後、胚盤胞に導入して、生殖細胞に分化した系統からヘテロ接合体を作製し、これを組み換えることにより遺伝子欠損ホモ接合体マウスを作製した。*Cmah* はヒトでは欠損していることが知られており、ヒトにおいては発現する主要シアル酸分子種が Neu5Ac であるものの、低レベルでの Neu5Gc の発現も検出される。そこで、まず、*Cmah* 欠損マウスにおける Neu5Gc の発現を

調べた。すると、*Cmah* 欠損マウスの各組織における Neu5Gc の発現は検出限界以下であり、このことから、Neu5Gc の発現は *Cmah* に完全に依存していることを世界に先駆けて明らかとした(図2)(Naito et al. Mol Cell Biol 2007)。また、この件に関して、共同研究により、*Cmah* 欠損マウスに Neu5Gc を経口投与しても、マウス体内への取り込みは非常に低いこと(Hedland et al. Mol Cell Biol 2007)、また、ヒトでみられるガン細胞での Neu5Gc の発現が、ガン細胞が組織中で低酸素濃度に応じて細胞でのシアル酸取り込みを亢進しているために起こること(Yin et al. Cancer Res 2006)などを明らかにしてきている。Neu5Gc を含む糖鎖は、古くから Hanganutziu-Delcher 抗原と呼ばれ、ヒトに対して抗原性を持ち、血清病などで抗体が誘導されることが知られている。その一方で、ヒトにおいてはガン胎生の発現を示し、自己抗原としても発現する。この一見矛盾する発現形態が、ヒトに特異的な *Cmah* の欠損と、ガン細胞でのシアル酸取り込み機構の亢進が組み合わさることで起こっていることを明らかにした。

Cmah 欠損マウスの B 細胞の解析

Cmah 欠損により、Neu5Gc の発現は完全に抑制された。このマウスから B 細胞を調製し、分子内にシアル酸を持たないように調製され、高感度に CD22 リガンドを検出できる CD22-Fc 融合プローブを用いてフローサイトメトリーを行ったところ、CD22/Siglec-2 の糖鎖リガンドは野生型の約20分の1の発現強度を示した。このことから、*Cmah* 欠損マウスは CD22/Siglec-2 の高親和性リガンド欠損モデルマウスとして位置づけられることが考えられた。Neu5Gc 含有糖鎖の B 細胞機能における役割を明らかにするため、*Cmah* 欠損マウスの B 細胞における表現型を検証した。*Cmah* 欠損 B 細胞は C57Black/6 背景に7回以上戻し交配したものを用いた。*Cmah* 欠損マウスは非免疫時の血清中の IgG1 が増加しており、T 細胞非依存性抗原である、DNP-Ficoll に対する免疫応答が亢進していた。*Cmah* 欠損 B 細胞は、コントロールである野生型 B 細胞と比べて、B 細胞の細胞増殖が亢進しており、この B 細胞の反応性の違いが、個体レベルでの反応性亢進の原因と考えられた。一方で、T 細胞依存性抗原である DNP-KLH に対しては、コントロ

ールと同等の反応を示した(図3)。このことは、後述する胚中心での Neu5Gc の特異的な発現抑制からも整合性のとれる結果であると考えられた。

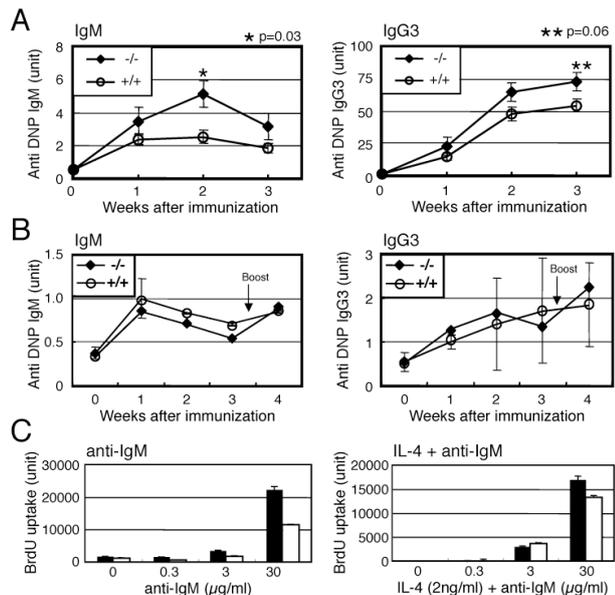


図3 Cmah欠損マウスのB細胞における表現型 (A-B)Cmah欠損マウスと、コントロールマウスをT細胞非依存性抗原(DNP-Ficoll)(A)及びT細胞依存性抗原(DNP-KLH)(B)で免疫し、個体レベルでの応答を血清中の抗ハプテン抗体を測定することで検証した。(C)脾臓B細胞を調製し、抗IgM抗体及びIL-4で刺激した場合の細胞増殖を測定した。

体液性免疫に関わる胚中心反応における CD22/Siglec-2 糖鎖リガンドの発現抑制
個体が液性免疫を獲得する際に、脾臓、リンパ節などの二次免疫器官では、胚中心が形成され、ここでは成熟 B 細胞の急激な増殖、抗体の親和性の上昇やサブクラスの変換という重要な細胞反応がおこる。この胚中心反応を起こす中心となるシグナルは、B 細胞抗原受容体(BCR)からの抗原刺激であり、適正な BCR シグナル調節が正常な免疫反応を起こすために必須である。

胚中心B細胞はその細胞表面の糖鎖を大きく変化させることが知られている。そのような胚中心特異的な糖鎖の変化は、組織染色等において歴史的にマーカーとして利用されており、現在でも、ピーナツ由来レクチンである PNA が胚中心 B 細胞のマーカーとして使用されている。また、ヒトにおいてはスフィンゴ糖脂質の CD77/Gb3Cer 発現が誘導され、マウ

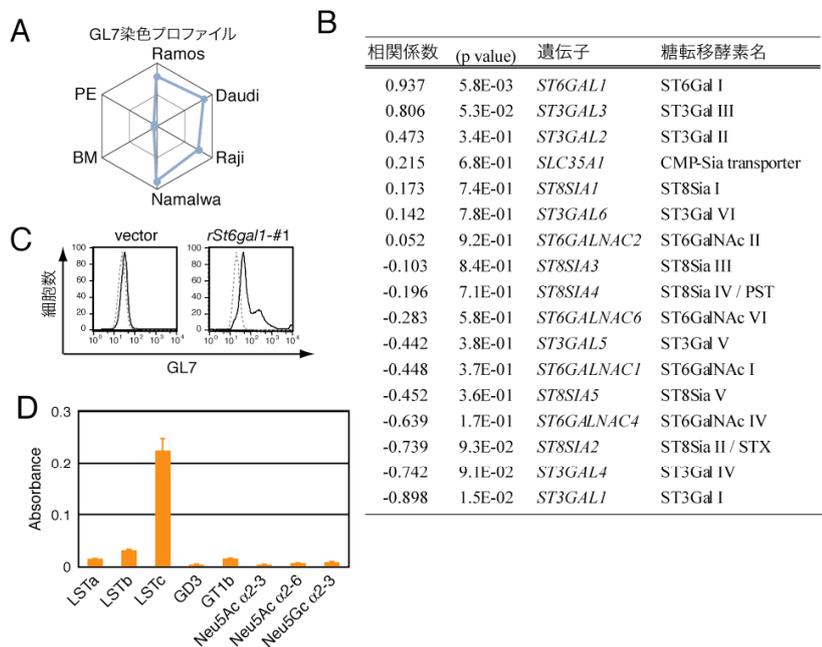


図4 モノクローナル抗体GL7のエピトープ同定 (A) エピトープ未知のモノクローナル抗体GL7で6種類のヒトB細胞株を染色、フローサイトメトリー解析し、その相対的な染色強度をウェブグラフにプロットしたプロファイルを示す。それぞれの細胞での発現強度は軸の外側に行くにしたがって強くなる。このプロファイルをマイクロアレイ解析で得られた糖鎖脂質関連遺伝子の発現プロファイルと相関解析した。(B) GL7染色とシアル酸転移酵素遺伝子発現の相関解析。ピアソンの相関係数と遺伝子を示す。(C) GL7エピトープを発現しないCHO細胞に相関解析で正の相関を示したST6GAL1遺伝子を導入すると、GL7エピトープの発現がみられた。(D) GL7はELISA法による解析の結果、Sia α 2-6 Gal β 1-4 GlcNAcを含む糖鎖LSTcと特異的に結合することが同定された。

スの胚中心は単クローン抗体 GL7 により染色される。GL7 はエピトープ未知のラット由来 IgM 抗体であり、マウス胚中心細胞を特異的に染色するため、マーカーとして汎用されていた。そこで GL7 のエピトープに興味を持ち、様々な培養細胞の染色を行った。すると、GL7 はヒト B 細胞株をそれぞれ異なる特定の強度で染色することが明らかとなった。GL7 染色はシアリダーゼ感受性であり、染色時に Neu5Ac を添加することで用量依存的に GL7 の結合が阻害されたことから、GL7 のエピトープにはシアル酸が関わっていることが予想された。また、*N*-結合型糖鎖生成阻害剤でも GL7 エピトープの発現が阻害されたこと、さらに、ウエスタンブロット解析により複数のバンドが検出されたことから、GL7 は抗糖鎖抗体であることが予想された。そこで、異なる B 細胞株上の GL7 エピトープの量をフローサイトメリーの結果を用い相対化することで、複数細胞株間における相対的 GL7 エピトープ発現強度プロファイルを作製した。ここで、仮説として、細胞上での糖鎖エピトープの発現強度は特定の糖転移酵素などを含む糖鎖関連遺伝子の発現強度により制御されていることを想定した。GL7 エピトープ発現強度プロファイルを、同じ細胞株間での cDNA マイクロアレイ解析で得られたシアル酸関連遺伝子の相対化発現プロファイルと比較するため、Pearson の相関係数を用いた統計解析を行った。すると、GL7 エピトープ糖鎖発現強度はシアル酸転移酵素の *ST6GAL1* 遺伝子の発現プロファイルと正の相関を示した。*ST6GAL1* 陰性細胞に *ST6GAL1* 遺伝子を導入すると GL7 エピトープの発現が誘導されたこと、ELISA による結合実験から、GL7 は Neu5Ac α 2,6 Gal β 1-4 GlcNAc を末端に持つ糖鎖構造をエピトープとすることが明らかとなった (図4)。

しかしながら、マウス B 細胞においては α 2,6 結合を持つシアル酸は活性化非依存的に発現していると考えられ、この構造が胚中心 B 細胞で制御されているとは考えにくい。そこで、GL7 エピトープがシアル酸分子種の違いを認識している可能性を考えて、*Cmah* 欠損マウス B 細胞を GL7 で染色すると、*Cmah* 欠損 B 細胞では非活性化状態にもかかわらず非常に強い染色がみられた。この染色は、*Cmah* 欠損細胞にレトロウイルスで *Cmah* を戻すことで阻害されたため、GL7 は、シアル酸分子種のうち Neu5Gc は認識せず、Neu5Ac 特異性を示すことが明らかとなった。前述のように、CD22/Siglec-2 は α 2,6 結合したシアル酸のうち Neu5Gc により高い親和性を示す。つまり GL7 の糖鎖エピトープは CD22/Siglec-2 のエピトープと対照をなす。そこで、マウスの胚中心を、CD22/Siglec-2 のリガンド糖鎖を検出できるプローブである CD22-Fc 融合タン

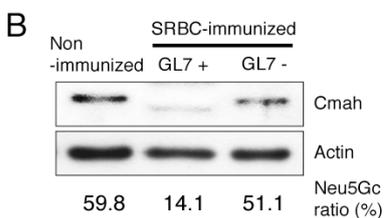
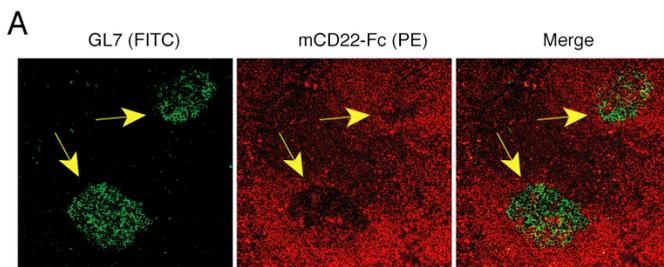


図5 ヒツジ赤血球免疫マウスの脾臓切片における胚中心染色 (A) ヒツジ赤血球で免疫後、10日経た野生型マウスの脾臓の凍結切片を作成し、免疫組織化学染色を行った。プローブには FITC ラベルしたラットモノクローナル抗体 GL7 (胚中心を染める、緑色) とマウス CD22 のレクチンドメインとヒト IgG の Fc 領域を融合させた融合タンパクプローブ (mCD22-Fc) (二次抗体には PE 標識

抗ヒト IgG を使用、赤色) を用い、Merge では両者を合成した。mCD22-Fc 染色で CD22 のリガンドの発現を観察すると B 細胞領域が全体的に染まるが、胚中心 (GL7 陽性細胞) では、CD22 リガンドの発現が抑制されていることがわかる。(B) 免疫した脾臓より胚中心 B 細胞 (GL7+ 細胞) とコントロール B 細胞 (GL7- 細胞) および非免疫マウスの脾臓 B 細胞を分離し、CMP-Neu5Ac 水酸化酵素 (Cmah) の発現をウエスタンブロット解析した。胚中心 B 細胞 (GL7+ 細胞) では CMP-Neu5Ac 水酸化酵素の発現が抑制されており、それに応じて Neu5Gc の発現が低下していることが明らかとなった。

パク質で染色すると、胚中心 B 細胞において特異的に染色シグナルが抑制していることが示された。また、胚中心 B 細胞において確かにシアル酸分子種のうち Neu5Gc の含量が低下していた。これらの結果から、胚中心 B 細胞では、シアル酸の α 2,6 結合は変化させずに CD22/Siglec-2 のリガンドを特異的に抑制する機構をもって、そのリガンド発現を制御していることが明らかとなった。GL7 エピトープは、LPS により *in vitro* で活性化した細胞でも、その発現が誘導される。そこで、この細胞

における活性化依存的な遺伝子変化を調べると、活性化細胞では GL7 エピトープの誘導にともなって *Cmah* 遺伝子の発現が 1/10 程度に抑制されると共に、*ST6GAL1* の発現は 2 倍程度誘導されることが明らかとなった。つまり、*Cmah* の発現が CD22/Siglec-2 リガンドの発現を活性化依存的に制御していることが明らかとなった (図5) (Naito et al. Mol Cell Biol 2007)。また、共同研究により、神奈木らはヒトにおいても胚中心 B 細胞で CD22/Siglec-2 と競合しその糖鎖リガンドと結合する活性を持つ抗糖鎖抗体 KN343 での染色が抑制されることを示しており (Kimura et al. J Biol Chem 2007)、これらの研究から、CD22/Siglec-2 リガンドの発現は一定しているのではなく、動物種を問わず、活性化状態に応じて胚中心 B 細胞ではその発現が抑制されていることが明らかとなった。これは、Siglec リガンド発現が内在性にその細胞の活性化状態に応じて制御されていること示した初めての研究であり、今後の研究の指針になるものである。また、Neu5Gc 含有糖鎖は、リンパ球において、活性化されると発現が抑えられるが、これは細胞活性化において抑制的に機能しており、一種のポジティブフィードバック的にリンパ球の活性化に関わることが考えられ、糖鎖の細胞機能制御において重要な知見を与えた物であると考えられる。

DNA マイクロアレイを用いた新たな責任遺伝子同定法の確立

cDNA マイクロアレイは、網羅的に遺伝子発現を検証できる系として明白なる有用性を有する。しかしその一方で、特定の遺伝子に興味がある場合には、シグナル強度のダイナミックレンジの広さ、定量性については Realtime-PCR などの手法を用いた方が正確性が上がると一般的には考えられている。そこで、cDNA マイクロアレイを用いるメリットについては、その網羅性を損なわずに解析することが指針となると考えられる。既述のように、多細胞間で、スタンダードの RNA に対するそれぞれの細胞での糖鎖

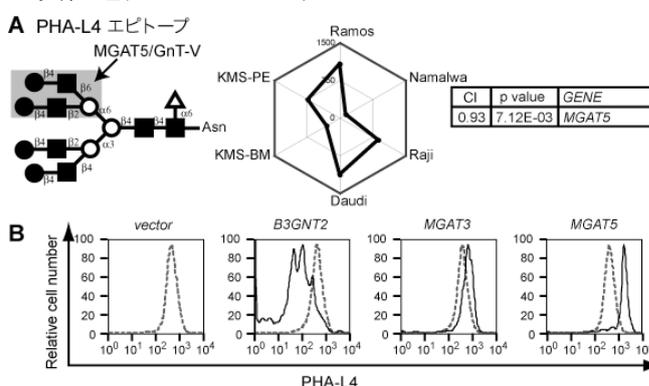


図6 トランスクリプトームと細胞表面糖鎖発現表現型の相関解析法の検証 (A) PHA-Lレクチンのエピトープ(左)とこのエピトープを生合成するGnT-V/MGAT5の反応様式。ウェブグラフによるPHA-Lレクチンによる6種類のB細胞株の染色プロファイルと(中)相関した遺伝子及びその相関強度(右)。(B) コントロールベクター、コントロール遺伝子(B3GNT2, GnT-III)及びGnT-Vを Namalwa細胞に導入し、PHA-Lエピトープ発現強度変化を検証した。正に相関したGnT-V遺伝子導入細胞においてPHA-Lエピトープの発現量が増加した。

関連遺伝子発現のプロファイルを構築し、これに対して、それぞれの細胞における糖鎖発現強度という表現型を統計解析することにより、エピトープ未知であった GL7 のエピトープの生合成を律速的に制御する遺伝子として、*ST6GAL1* を同定することができた。これまでこのような手法で、遺伝子発現パターンから糖鎖生合成を解析することが可能であるとはあまり考えられてこなかった。これは、糖鎖生合成が非常に多くの酵素の逐次反応を介しておこるために、必ずしもその生合成経路中の酵素の発現が産物の量を調節するとは限らない、といった理由からである。ただ、糖鎖発現は細胞においては酵素遺伝子群の発現を制御することで調節されていることが考えられ、これまでその検出網羅性に問題があるため、従来法では限界があった可能性も考えられる。そこで、GL7 エピトープ発現制御を明らかとした手法を用いて、細胞表面糖鎖エピトープ発現制御遺伝子がどの程度一般的に同定可能であるかを調べることに意義があると考えた。植物レクチンは、古くから糖鎖プローブとして利用され、その認識糖鎖構造の生合成に関わる酵素が同定されているものも多い。そのため、ランダムに選定された植物レクチンを用い、上述の6種類のヒト由来 B 細胞株を染色することで、それぞれの植物レクチンエピトープ発現強度のプロファイルを作製した。エピトープ発現プロファイルと相関する糖鎖発現遺伝子は Pearson の相関係数にて検証した。Pearson の相関係数は、プロファイルが一致する場合に +1、全く逆相関する場合に -1 をとる連続的な係数で、正の相関から負の相関までを検証することができる。PHA-L は GnT-V/MGAT5 により分岐した N-結合型糖鎖を認識することが知られているが、

PHA-L 染色強度は GnT-V/MGAT5 遺伝子の発現強度と正に相関していた。GnT-V/MGAT5 発現が PHA-L 染色に律動的に働くかどうかを調べるために、これをレトロウイルスで Namalwa 細胞に導入すると、期待通り PHA-L エピトープの誘導がみられた(図6)。PHA-L のほかに、同様に、SSA, MAM, WGA,

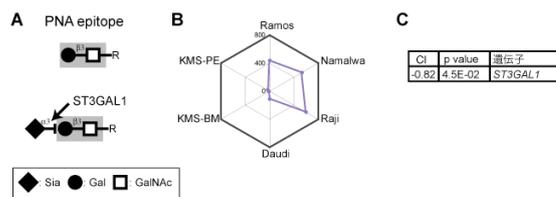


図7 トランスクリプトームと表現型が逆相関を示す例
(A) PNAレクチンのエピトープ(上)とこのエピトープをマスクするST3GAL1の反応様式。
(B) PNAレクチンの染色プロファイルと(C) 相関遺伝子。このエピトープをマスクするST3GAL1はPNAレクチンのエピトープ発現プロファイルと逆相関した。

LCA, DSA において責任酵素の遺伝子が正に相関する遺伝子として同定された。一方、PNA に関しては、古くから T 細胞成熟時において O-結合型糖鎖の core-1 鎖のガラクトース上に ST3GAL1 がシアル酸を付加することで、エピトープの発現を抑制することが明らかになっている。PNA 染色プロファイルは、ST3GAL1 遺伝子発現プロファイルと逆相関することが明らかとなった。このことから、プロファイル相関を調べることで、糖鎖エピトープの発現を負に制御する遺伝子も正に制御する遺伝子と同様に同定可能であることが明らかとなった(図7)。PNA のほか、ABA, UEA-I に関しては、同様な負の制御に関わると考えられる遺伝子が逆相関する酵素遺伝子として同定された。糖鎖発現には非常に多岐にわたる酵素を含む合成系が関わるにもかかわらず、本実験手法の検証に用いた11種類のレクチンのうち9種類についてはエピトープ発現に関わる遺伝子が同定されたため、プロファイルの相関計算を用いた本法は、細胞表面における糖鎖発現制御遺伝子同定手法として有用性があると考えられ、Correlation index-based responsible enzyme gene screening (CIRES)法として報告した(図8)(Yamamoto et al. PLoS ONE 2007)。本法が一定の成功を収めた理由としては、多くの植物レクチンエピトープは比較的少数の糖転移酵素の発現にコントロールされていることが考えられる。また、プロファイルを統計計算することで、マイクロアレイ解析の際によく問題となるデータの振れに対しても左右されにくくなることが考えられた。CIRES 法の特筆すべき点としては、本方法が糖鎖発現を負に制御する酵素遺伝子を系統的に検索することができる唯一の手法として位置づけられることが挙げられる。

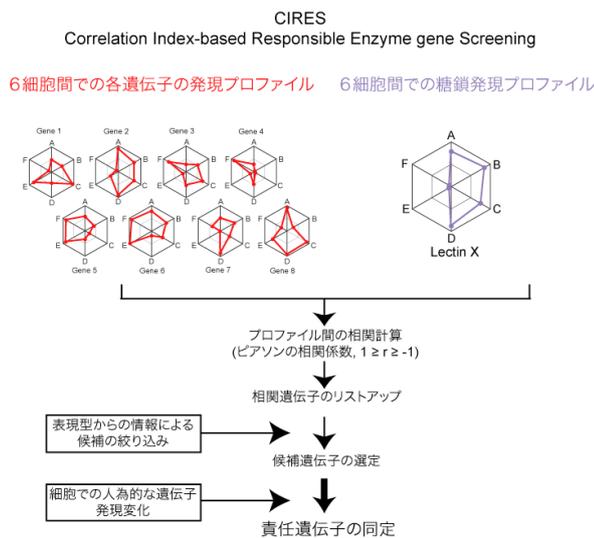


図8 Correlation Index-based Responsible Enzyme gene Screening (CIRES)法
CIRES法を模式的に示す。本法は大きく分けて多細胞を用いたプロファイルの作製、トランスクリプトーム-糖鎖発現強度プロファイル間の相関解析、相関した遺伝子の細胞レベルでの表現型発現に対する検証の3段階からなる。

(2)研究成果の今後期待される効果

細胞表面におけるシアル酸分子種を変化させることでリンパ球の活性化が変化することは、これを細胞表面で非侵襲的に人為的に制御できる可能性を示唆している。このため、当初期待していたように、リンパ球活性化を人為的に制御する研究、技術へと結びつくものである。

近年、DNA マイクロアレイをはじめとするトランスクリプトーム解析は、技術進歩のおかげで飛躍的に容易になってきている。CIRES 法は細胞における遺伝子発現プロファイルを表現型とつなぐ非常に基盤的な手法であると位置づけられ、その主要な特長として、他の手法では不可能に近い、表現型を負に制御する遺伝子の同定が簡便に行える点があげられる。この手法は、多

岐にわたる酵素反応の組み合わせであるため、まだ未解明な部分も多い糖鎖生合成経路の制御段階の解析に用いることができる。さらに、糖鎖に限らず、細胞レベルでの表現型を担う遺伝子の同定法としても威力を発揮することが期待され、その波及効果は大きい。

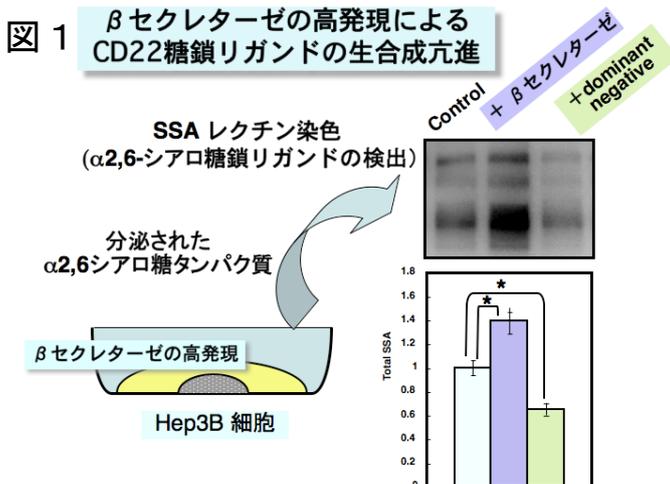
[3] リガンド代謝グループ (公立大学法人福島県立医科大学 橋本グループ)

(1) 研究実施内容及び成果

Siglec2/CD22 糖鎖リガンド発現制御機構の解明

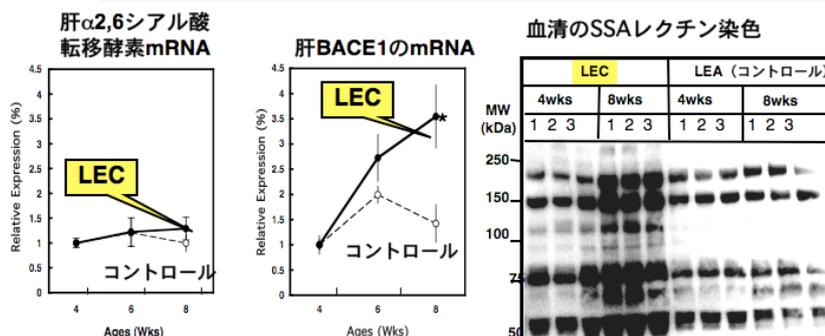
1.1 β セクレターゼによる *in vitro* 及び *in vivo* での糖鎖リガンド発現調節の解析

β セクレターゼによる Siglec2/CD22 糖鎖リガンドの発現調節の検証をめざした。具体的には、培養細胞株である Hep3B 細胞 (肝癌由来) に β セクレターゼを過剰発現させたときの分泌糖タンパク質の CD22 リガンド (α 2,6 シアロ糖鎖) の変化を検討した。この糖鎖エピトープを認識する SSA レクチンによるブロット解析の結果、Hep3B から分泌される糖タンパク質の α 2,6 シアロ糖鎖エピトープ量は β セクレターゼ発現によって有意に増加することが明らかになった (図1) (1, 6)。一方、コアタンパク質量は変化しなかった。93 番目のアスパラギン酸に変異を加えたドミナントネガティブ・ β セクレターゼを高発現させると分泌糖タンパク質の α 2,6-シアル化は減少した。さらに、Hep3B に siRNA を投与して β セクレターゼ発現を抑制した場合においても分泌糖タンパク質の α 2,6-シアル化の減少が見出された。従って、本実験系において、 β セクレターゼが分泌糖タンパク質の α 2,6 シアロ糖鎖を調節していることが明らかとなった。



血清糖タンパク質の多くは肝臓に由来し、 α 2,6-シアル酸化されているものシアル酸転移酵素レベルは極めて高いことが知られている肝臓の β セクレターゼ発現が上昇する動物モデルでは、血中に分泌される可溶性 α 2,6-シアル酸転移酵素及び α 2,6-シアロ糖タンパク質が増加することを明らかにした(6, 11)。例えば、LEC ラットはヒトのウィルソン病のモデルであり、成長とともに肝炎を起こし、最終的には肝ガンを発症する。この肝障害モデルでは、 β セクレターゼのメッセージが 6-8 週齢で増加するが、 α 2,6-シアル酸転移酵素メッセージは変化しない (図2)。また、8 週齢では、 α 2,6-シアル酸転移酵素及び α 2,6-シアロ糖タンパク質が増加する。従って、培養細胞と同様に、 β セクレターゼ高発現が α 2,6-シアロ糖タンパク質の増加を誘導することが示された。これとは逆に、 β セクレターゼを欠損したノックアウトマウス (129Sv 系統と C57BL/6 系統間の交雑系) においては、血清中の α 2,6-シアロ糖タンパク質は低下していた。即ち、BACE1 の欠損が α 2,6-シアロ糖タンパク質の減少を誘導することが *in vivo* でも示された。

図2 LEC ラットでは加齢と共に肝臓の β セクレターゼ mRNA の上昇により可溶性 α 2,6シアル酸転移酵素の分泌が増加する



1.2 β セクレターゼ・

ノックアウトマウスの作製

全身性βセクレターゼ・ノックアウトマウスは既に報告されている。このマウスを清浄な (SPF) 環境から、通常の (conventional) 飼育環境に移すと死亡する個体が多いことから、免疫異常が関与すると考えられている (Dominguez et al, *J Biol Chem*, 280: 30797, 2005)。しかし、彼らの使用したノックアウトマウスは、129Sv 系統と C57BL/6 (B6) 系統間の交雑系であり、遺伝的な背景が不均一なために厳密な免疫学的解析が難しい。我々はこの問題点を解決するために、129Sv 系統 ES 細胞由来のβセクレターゼ欠損マウスを、C57BL/6 系統に戻し交配し、遺伝的背景の均一化を目指した。この戻し交配では6世代の戻し交配後に、リッターサイズが小さくなり、得られる個体数が減少した。そこで、B6 由来の ES 細胞を使って全身性ノックアウトマウスの作製をめざした。期待どおりのゲノム構造を持つヘテロマウスを得ることができたが、ヘテロマウス同士の交配によって得られるホモの個体数はメンデル則より少なかった。また、得られたホモ個体は体重が少なめであり、成長がよくなかった。成長した一部のマウスについて B 細胞上のα2,6-シアロエピトープを SSA レクチンで定量したが、コントロールとの差は認められなかった。また、年齢を揃えて多数例の解析を行うことができなかったので結論を得るに至らなかった。

このため、新たにコンディショナル・の作製をめざした。得られたノックアウトマウスは期待どおりのゲノム構造を持っていた。このマウスの floxed BACE1 の切り出しを確認する為に神経特異的に Cre リコンビナーゼを発現するマウス (Emx1-Cre) との交配を行った (図3)。神経特異的なノックアウトを行ったのは、内因性の BACE1 の発現レベルが他臓器に比べ10倍以上高く、ノックアウト効果を検出し安い為である。図3の赤い四角で囲った遺伝子型を持つ個体、即ちコンディショナル・βセクレターゼ・ノックアウトマウス (Cre+) とコントロールマウス (Cre-) が、メンデル則に従って得られた。また、すべてのマウスは異常なく成長した。ノックアウトマウスでは大脳や海馬において BACE1 タンパク質の発現が殆ど消失していた (未発表データ)。従って、得られた Floxed BACE1 マウスの使用により各種臓器でのβセクレターゼ・ノックアウトマウス作製が可能であることが示された。今後 B 細胞特異的に Cre を発現するマウスと交配することにより、βセクレターゼ活性を失わせた B 細胞の作製を行う予定である。

図3 βセクレターゼ・ノックアウトマウス (BACE1-KO) の作製

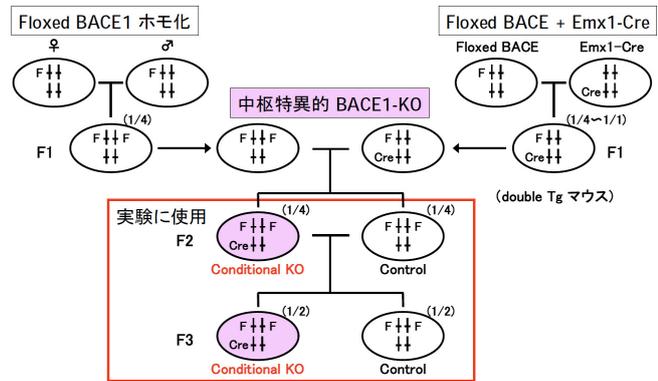
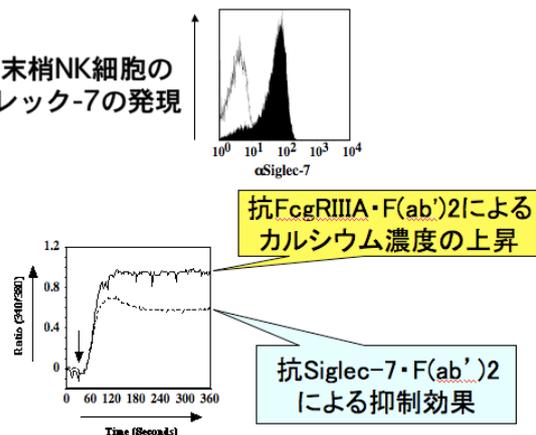


図4 ヒト末梢NK細胞のシグレック-7

2. ヒト CD33 ファミリーに属する Siglec7 の ITIM 依存性シグナルの解析

我々は、CREST 研究開始以前に Siglec-7 がガン関連糖鎖 (α2,8-ジシアロ糖鎖や分枝型α2,6-シアロ糖鎖など) に強く結合することを見出していた。がん細胞が発現するガン関連糖鎖が Siglec-7 に結合して抑制シグナルを NK 細胞へ伝えれば、ガンにとって有利な状況となる。そこで、Siglec-7 の抑制シグ

ヒト末梢NK細胞のシグレック-7の発現



ナルナルについての解析を行った。なお、Siglec-7 糖鎖結合特異性は我々が開発したプローブによって解析されたが、このプローブは内藤らによる GL-7 抗体の糖鎖結合特異性の決定にも利用された(5)。

我々は、Siglec-7 高発現株細胞を用いた実験により、Siglec-7 がカルシウム流入シグナルを ITIM 依存的に抑制することを示した(12)。この実験は株化細胞を用いた実験だったので、生理的条件に近いヒト末梢 NK 細胞を使つての検討を行った(図 4)。得られた NK 細胞の FcγRIIIA レセプター刺激 (抗 FcγRIIIA・F(ab')₂ による架橋) によるカルシウム流入に対する Siglec-7 刺激 (抗 Siglec-7・F(ab')₂ による架橋)

の抑制効果を調べた。この実験で使用した NK 細胞画分では 84% の細胞が Siglec-7 陽性であるにもかかわらず、Siglec-7 は部分的な抑制効果しか示さなかった。そこで、この実験条件下での Siglec-7 のリン酸化と SHP-1 ホスファターゼのリクルートを検討した。ポジティブ・コントロールとして、MHC class I 抗原を認識する抑制性レセプターである LAIR のリン酸化と SHP-1 ホスファターゼのリクルートも同時に解析した。図 5 に示されるように、Siglec-7 は LAIR に比べても強いチロシン・リン酸化を受けていることがわかる (両者ともに脱リン酸化反応を抑制するための pervanadate 処理でシグナルが観察されている)。しかし、Siglec-7 にリクルートされる SHP-1 ホスファターゼの量はごく僅かであり、LAIR と比べるとそのリクルート能が著しく低いことが示された。なお、SHP-2 ホスファターゼのリクルートも SHP-1 と同様の傾向を示した。また、Siglec-9 は Siglec-7 と高いホモロジー (83% 以上) を示すにもかかわらず、LAIR と比べて遜色のないリクルート効率示すことが別の実験から明らかとなった。ITIM のチロシン残基の周囲アミノ酸がリクルート効率に影響することが知られているので、Siglec-7 と Siglec-9 の ITIM を比較すると、両者で異なっているのは 3 アミノ酸 (Pro-439, I-435, N-458) のみであ

図 5 ヒト末梢NK細胞のシグレック-7のシグナル伝達

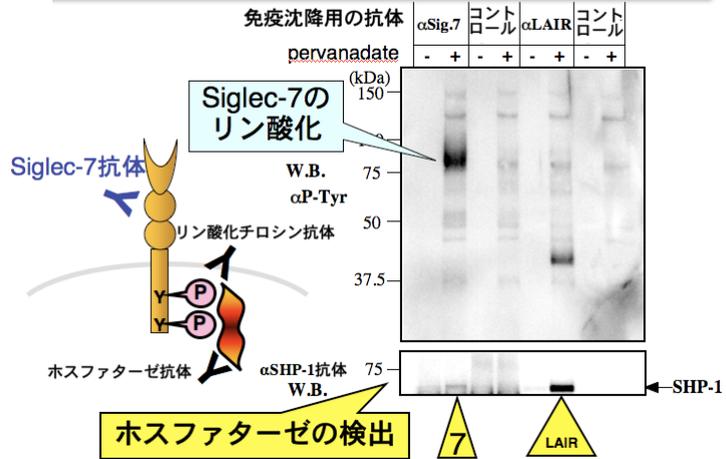
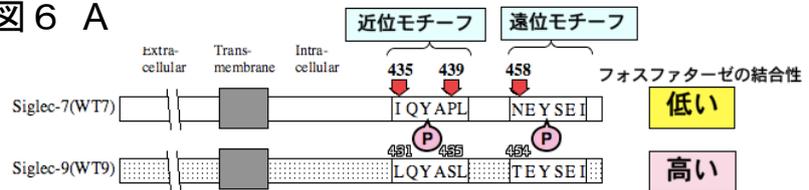
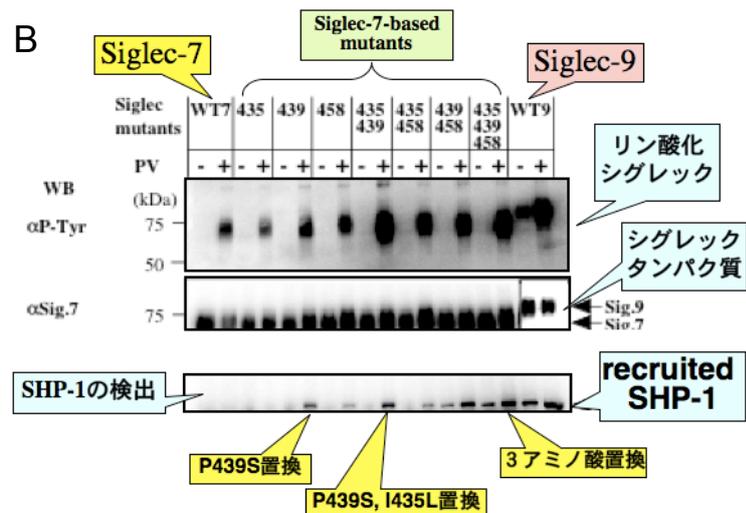


図 6 A



B



Pro-439とAsn-458がSHP-1の結合に重要である

った (図 6)。この 3 アミノ酸の違いのいずれかが Siglec-7 と Siglec-9 のリクルート効率に影響すると考えて、アミノ酸の置換実験を行った。すなわち、Siglec-7 の 3 アミノ酸を 1 カ所ずつ Siglec-9 型に置き換えた変異体、2 カ所を置換したもの、3 カ所全てを置換したものを作製し、その SHP-1 ホスファターゼに対するリクルート能を検討した。図 6 B の最下段のパネルの両端に野生型の Siglec-7 (WT7) と Siglec-9 (WT9) による SHP-1 リクルートの結果を示している。Siglec-9 は非常に効率よく SHP-1 をリクルートしているのに対し、Siglec-7 ではほとんどリクルートが観察されない。Siglec-7 の 3 アミノ酸をすべて Siglec-9 型に変えた変異体 (I435L, P439S, N458T) では、予想通り野生型の Siglec-9 と遜色のないリクルート効率を示した。3 アミノ酸を 1 カ所ずつ置換した変異体では、置換位置に依存したリクルート効率の増強が見られた。P439S 置換体での増強が最も顕著であり、N458T 置換体がそれに次いでいる。I435L 置換体ではほとんどリクルート効率の増強が認められない。ちなみに P439S, N458T の 2 アミノ酸置換体では相加的な効果が認められた(12)。

池原らは Siglec-7 及び最もホモロジーの高い Siglec-9 を Jurkat T cell に発現し、T 細胞レセプター刺激による nuclear factor of activated T cells (NFAT) の転写活性の促進に対する抑制機能を示した (*J Biol Chem*, 279: 43117, 2004)。また Avril らは、Siglec-7 と Siglec-9 を rat basophilic leukemia (RBL) 細胞に発現して、Fce レセプターに依存する活性化シグナルとそれによるセロトニンの放出に対する抑制活性を調べた。彼らは、両 Siglec の持つ 2 つの ITIM のうち膜の近位側にあるモチーフの重要性を明らかにしている (Avrilet al, *J Immunol*, 1730: 6841, 2004)。以上の結果は Siglec-7 の ITIM が機能を持ちうることを示している。しかし Siglec-7 は、LAIR と比較すると SHP ホスファターゼのリクルート能が著しく低い。この事実は、生理的条件下で NK 細胞による有害な細胞障害を抑制しているのは、LAIR のような MHC class I を認識するレセプターであることを示唆している。正常細胞のほとんどは MHC class I 抗原を発現しており、その発現を失うと NK 細胞による殺傷を受けやすくなることもこの仮説を支持している。発生過程のような特別な時期においては MHC class I 依存性の抑制性シグナル系が未発達な可能性があり、このような場合には、Siglec-7 依存性の抑制性シグナルが重要なものかもしれない。この観点から、Siglec-7 の強力なリガンドであるジシアル酸構造 (例えば GD3 ガングリオシド) が成人にはまれにしか発現しないにもかかわらず、胎児期には発現が多いことは興味深い現象である。また、Miyazaki らは Siglec-7 のよいリガンドである分枝型 α 2,6 シアル酸残基が正常ヒト腸管上皮細胞に発現されており、この糖鎖が Siglec-7 陽性細胞との接着に関与することを示唆している(14)。

(2)研究成果の今後期待される効果

「成果の今後の展開見込、想定される科学技術や社会への波及効果についても記述してください。」

1. コンディショナル・βセクレターゼ・ノックアウトマウス作製の意義

βセクレターゼはアルツハイマー病の原因酵素と考えられている。従ってこの酵素阻害剤を治療薬として利用する試みがなされている。病気の原因となっている酵素反応、すなわちアミロイド前駆体タンパク質 (APP) の切断を阻害することがアルツハイマー病の治療面からは重要なターゲットである。しかし、BACE1 はα2,6-シアル酸転移酵素を初めとして数種類の生理的な基質の切断を行っている。BACE1 阻害剤が APP 切断以外の生理的プロセッシングも同様に抑制するか否かは副作用を予測する上で極めて重要である。APP のシアル酸化が病原ペプチド (Abeta) の産生効率に影響することから (21) BACE1 阻害剤のα2,6-シアル酸転移酵素プロセッシングへの影響を調べることは重要である。ごく最近我々は、BACE1 阻害剤である KMI シリーズ(20)の中に、BACE1 とα2,6-シアル酸転移酵素の両者を同様に阻害する薬剤と APP の切断のみを選択的に阻害する薬剤の2種類を見出している。すなわち後者の薬剤は、α2,6-シアル酸転移酵素の切断やα2,6-シアロ糖鎖の変化を引き起こすことなく、選択的に APP を切断する優れた薬剤になりうる。全身性のβセクレターゼ・ノックアウトマウスは繁殖が極めて難しいのに対して、今回作られた Floxed BACE1 マウスの利用により免疫細胞をはじめとする各種の細胞臓器での選択的 BACE1 ノックアウトマウスを作製することが可能となった。βセクレターゼ阻害剤 (アルツハイマー病治療薬) の副作用を解析する観点から、我々の作出したノックアウトマウスの利用が期待される。

§ 5 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌0件、国際(欧文)誌50件)

「免疫シグナル制御」グループ

1. Hirai, H., Adachi, T., and **Tsubata, T.** (2004): Involvement of cell cycle progression in survival signaling through CD40 in B lymphocyte line WEHI-231. *Cell Death Differ.* 11: 2,61-2,69.
2. Kawamura, T., Kanai, T., Dohi, T., Uraushihara, K., Totsuka, T., Iiyama, R., Taneda, C., Yamazaki, M., Nakamura, T., Higuchi, T., Aiba, Y., **Tsubata, T.** and Watanabe, M. (2004): Ectopic CD40 ligand expression on B cells trigger intestinal inflammation. *J. Immunol.* 172,6388-6397.
3. Nitschke, L. and **Tsubata, T.** (2004): Molecular interactions regulate BCR signal inhibition by CD22 and CD72. *Trends Immunol.* 25: 543-550.
4. **Tsubata, T.** (2005): B cell abnormality and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 38: 331-337.
5. Devi, S. S., Hagiyaama, H., Adachi, T., Miyasaka, N. and **Tsubata, T.** (2006): The tumor suppressor p53 is not required for antigen receptor-mediated apoptosis of B lymphocytes. *Signal Transduction* 6: 54-61.
6. Akagawa, M., Ito, S., Toyoda, K., Ishii, Y., Tatsuda, E., Shibata, T., Kawai, Y., Ishino, K., Kishi, Y., Adachi, T., **Tsubata, T.**, Takasaki, Y., Hattori, N., Matsuda, T. and Uchida, K. (2006): Bispecific antibodies against modified protein and DNA with oxidized lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 6160-5.
7. **Tsubata, T.** (2006): B cell abnormality and systemic lupus erythematosus. *APLAR J. Rheum.* 9: 372-376
8. Sato, M., Adachi, T. and **Tsubata, T.** (2007): Augmentation of signaling through BCR containing IgE but not that containing IgA due to lack of CD22-mediated signal regulation. *J. Immunol.* 178: 2901-2907.
9. Yu, J., Sawada, T., Adachi, T., Gao, X., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Ishida, H., Kiso, M. and **Tsubata, T.** (2007): Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 360: 759-764
10. Adachi, T., Wienands, J., **Tsubata, T.** and Kurosaki, T. (2007): Interdomain A is crucial for ITAM-dependent and -independent regulation of Syk. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 364: 111-7

11. Yan, B.-C., Adachi, T. and **Tsubata, T.** (2008) : ER stress is involved in B cell antigen receptor ligation-induced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365:143-148.
12. Onodera, T., Poe, J. C., Tedder, T. F. and **Tsubata, T.** (2008): CD22 regulates time course of both B cell division and antibody response. *J. Immunol.* 180: 907-913.
13. Zhu, C., Fujimoto, M., Sato, M., Yanagisawa, T. and **Tsubata, T.** (2008): Novel binding site for SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1 in CD22 activated by B Lymphocyte stimulation with antigen. *J. Biol. Chem.* 283: 1653-1659.
14. Adachi, T. and **Tsubata, T.** (2008): FRET-based Ca²⁺ measurement in B lymphocyte by flow cytometry and confocal microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 367: 377-382.
15. Watanabe, K., Ichinose, S., Hayashizaki, K. and **Tsubata, T.** (2008): Induction of autophagy by B cell antigen receptor stimulation and its inhibition by costimulation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 374: 274-281
16. Abdu-Allah, H. H. M., Tamanaka, T., Yu, J., Lu, Z., Sadagopan, M., Adachi, T., **Tsubata, T.**, Kelm, S., Ishida, H. and Kiso, M. (2008): Design, synthesis, and structure-activity relationships of novel series of sialosides as CD22-specific inhibitors. *J. Med. Chem.* 51: 6665-6681.
17. Watanabe, K. and **Tsubata, T.** (2009): Autophagy connects antigen receptor signaling to costimulatory signaling in B lymphocytes. *Autophagy*.5: 108-110.
18. Toda, M., Hisano, R., Yurugi, H., Akita, K., Maruyama, K., Inoue, M., Adachi, T., **Tsubata, T.** and Nakada, H. (2009): Ligation of tumor-produced mucins to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. *Biochem J.* 417:673-683.
19. Hou, R., Ohtsuji, M., Ohtsuji, N., Zhang, L., Adachi, T., Hirose, S. and **Tsubata, T.** (2009): The centromeric interval of chromosome 4 derived from C57BL/6 mice accelerates type 1 diabetes in NOD.CD72^b congenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 380: 193-197.
20. Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Matsushita, T., **Tsubata, T.**, and Tedder, T. F. (2009): The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol.* 182: 7459-7472.
21. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Iwayama, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., **Tsubata, T.**, Ishida, H. and Kiso, M (2009): Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions. *Tetrahedron Lett.* 50: 4488-4491.
22. Engels, N., König, L. M., Heemann, C., Lutz, J., **Tsubata, T.**, Griep, S., Scharader, V. and Wienands, J. (2009): Recruitment of the cytoplasmic adaptor Grb2 to surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells. *Nature*

Immunol. 10: 1018-25.

23. Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., **Tsubata, T.**, Ishida, H. and Kiso, M. (2009): Potent small molecule mouse CD22 inhibitors: exploring the interaction of the residue at C-2 of sialic acid scaffold. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19:5573-75.

「リガンド代謝」グループ

1. Shinobu Kitazume, Kazuko Ogawa, Satoshi Futakawa, Yoshiaki Hagiwara, Hajime Takikawa, Michio Kato, Akinori Kasahara, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, **Yasuhiro Hashimoto**. "Molecular insights into b-galactoside α 2,6-sialyltransferase secretion in vivo" *Glycobiology*, 19:479-487, 2009
2. Satoshi Futakawa, Shinobu Kitazume, Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa, Yoshiaki Hagiwara, Akinori Kinoshita, and Kazuya Miyashita and **Yasuhiro Hashimoto**. "Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay systems for plasma b-galactoside α 2,6-sialyltransferase, a possible hepatic disease biomarker" *Analytica Chimica Acta*, 631,116-120, 2009
3. Yuriko Tachida, Kazuhiko Nakagawa, Takashi Saito, Takaomi C. Saido, Gaku Sakaguchi, Akira Kato, Shinobu Kitazume, and **Yasuhiro Hashimoto**. "Interleukin-1beta upregulates TACE to enhance alpha-cleavage of APP in neurons: Resulting decrease of Abeta producton." *J. Neurochem*, 104:1387-1393, 2008
4. Shinobu Kitazume, Shou Takashima and **Yasuhiro Hashimoto**. "Processing of glycosyltransferases by Alzheimer's bsecretase(BACE1)" *Experimental Glycoscience, Glycobiology*, 192-194, 2008
5. Yuko Naito, Hiromu Takematsu, Susumu Koyama, Shizu Miyake, Harumi Yamamoto, Reiko Fujinawa, Manabu Sugai, Yasushi Okuno, Gozoh Tsujimoto, Toshiyuki Yamaji, **Yasuhiro Hashimoto**, Shigeyoshi Itohara, Toshisuke Kawasaki, Akemi Suzuki, and Yoasunori Kozutsumi. "Germinal Center Marker GL7 Probes Activation-Dependent Repression of N-Glycolylneuraminic Acid, a Sialic Acid Species Involved in the Negative Modulation of B-Cell Activation" *Molecular and Cellular Biology*, 27: 3008-3022, 2007
6. Ichiro Sugimoto, Satoshi Futakawa, Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa, Jamey D. Marth, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, **Yasuhiro Hashimoto** amd Shinobu Kitazune. "Beta-Galactoside alpha 2,6-sialyltransferase I Cleavage by BACE1 Enhances the sialylation of soluble glycoproteins -a Novel Regulatory mechanism for alpha 2,6-sialylation" *J. Biol. Chem*, 282: 34896 – 34903, 2007
7. Naoko Nagai , Hiroko Habuchi , Shinobu Kitazume , Hidenao Toyoda , **Yasuhiro Hashimoto** and Koji Kimata. "Regulation of heparan sulfate 6-O- sulfation by b-secretase

- activity” *J. Biol. Chem.*, 282: 14942 – 14951, 2007
8. S. Kitazume, R. Oka, Y. Tachida, K. Ogawa, K. Nakagawa, S. Takashima, **Y. Hashimoto**. “Screening a series of sialyltransferases as possible BACE1 substrates.” *Glycoconjugate J.*, 23: 437-441, 2006
 9. M. Asai, C. Hattori, N. Sasagawa, T. Kobayashi, K. Maruyama, Y. Kiso, S. Ishiura, **Y. Hashimoto**, T.C. Saido. “A novel beta-secretase inhibitor KMI-429 reduces amyloid beta-peptide (A β) production in amyloid precursor protein (APP) transgenic and wild-type mice.” *J. Neurochem.*, 96: 533-540, 2006
 10. K. Nakagawa, S. Kitazume, R. Oka, K. Maruyama, T.C. Saido, Y. Sato, T. Endo, **Y. Hashimoto** “Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptides.” *J. Neurochem.*, 96: 924-933, 2006
 11. S. Kitazume, R. Oka, Y. Tachida, K. Ogawa, K. Nakagawa, Y. Luo, M. Citron, H. Shitara, C. Taya, H. Yonekawa, J.C. Paulson, E. Miyoshi, N. Taniguchi, **Y. Hashimoto**. “In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer’s beta-secretase (BACE1).” *J. Biol. Chem.*, 280: 8589-8595, 2005
 12. T. Yamaji, M. Mitsuki, T. Teranishi, **Y. Hashimoto** “Characterization of inhibitory signaling motifs of the natural killer cell receptor Siglec-7: Attenuated recruitment of phosphatases by the receptor is attributed to two amino acids in the motifs.” *Glycobiology*, 15, 667-676, 2005
 13. N. Kotani, S. Kitazume, K. Kamimura, S. Takeo, T. Aigaki, H. Nakato, **Y. Hashimoto**. “Characterization of Drosophila aspartic proteases that induce the secretion of a Golgi-resident transferase, heparan sulfate 6-O-sulfotransferase.” *J. Biochem.*, 137, 315-322, 2005
 14. K. Miyazaki, K. Ohmori, M. Izawa, T. Koike, K. Furukawa, T. Yamaji, **Y. Hashimoto**, A. Suzuki, R. Kannagi. “Loss of disialyl Lewis^a, the ligand for lymphocyte inhibitory receptor Siglec-7, associated with increased sialyl Lewis^a expression on human colon cancers.” *Cancer Res.*, 64, 4498-4505, 2004
 15. S. Kitazume, M. Suzuki, T.C. Saido, **Y. Hashimoto**. “Involvement of proteases in glycosyltransferase secretion: Alzheimer’s beta-secretase-dependent cleavage and a following processing by an aminopeptidase.” *Glycoconjugate J.*, 21, 25-29, 2004
 16. S. Kitazume, T.C. Saido, **Y. Hashimoto**.” Alzheimer’s beta-secretase cleaves a glycosyltransferase as a physiological substrate.” *Glycoconjugate J.*, 20, 59-62, 2004

「糖鎖リガンド」グループ

1. Ide Y, Miyoshi E, Nakagawa T, Gu J, Tanemura M, Nishida T, Ito T, Yamamoto H, **Kozutsumi Y**, Taniguchi N. “Aberrant expression of *N*-acetylglucosaminyltransferase-IVa and IVb (GnT-IVa and b) in pancreatic cancer.” *Biochem Biophys Res Commun*. 2006, 341:478-82.
2. Naito Y, Takematsu H, Koyama S, Miyake S, Yamamoto H, Fujinawa R, Sugai M, Okuno Y, Tsujimoto G, Yamaji T, Hashimoto Y, Itohara S, Kawasaki T, Suzuki A, **Kozutsumi Y**. “Germinal center marker GL7 probes activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid, a sialic acid species involved in the negative modulation of B-cell activation.” *Mol Cell Biol*. 2007, 27:3008-22.
3. Hedlund M, Tangvoranuntakul P, Takematsu H, Long JM, Housley GD, **Kozutsumi Y**, Suzuki A, Wynshaw-Boris A, Ryan AF, Gallo RL, Varki N, Varki A. “N-glycolylneuraminic acid deficiency in mice: implications for human biology and evolution.” *Mol Cell Biol*. 2007, 27:4340-6.
4. Yu J, Sawada T, Adachi T, Gao X, Takematsu H, **Kozutsumi Y**, Ishida H, Kiso M, **Tsubata T**. “Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts.” *Biochem Biophys Res Commun*. 2007, 360:759-64.
5. Kimura N, Ohmori K, Miyazaki K, Izawa M, Matsuzaki Y, Yasuda Y, Takematsu H, **Kozutsumi Y**, Moriyama A, Kannagi R. “Human B-lymphocytes express alpha 2,6 sialyl 6-sulfated LacNAc serving as a preferred ligand for CD22/Siglec-2.” *J Biol Chem*. 2007, 282:32200-7.
6. Yamamoto H, Takematsu H, Fujinawa R, Naito Y, Okuno Y, Tsujimoto G, Suzuki A, **Kozutsumi Y**. “Correlation Index-Based Responsible-Enzyme Gene Screening (CIRES), a Novel DNA Microarray-Based Method for Enzyme Gene Involved in Glycan Biosynthesis.” *PLoS ONE*. 2007, 2: 232.
7. Takano H, Nakazawa S, Okuno Y, Shirata N, Tsuchiya S, Kainoh T, Takamatsu S, Furuta K, Taketomi Y, Naito Y, Takematsu H, **Kozutsumi Y**, Tsujimoto G, Murakami M, Kudo I, Ichikawa A, Nakayama K, Sugimoto Y, Tanaka S. “Establishment of the culture model system that reflects the process of terminal differentiation of connective tissue-type mast cells.” *FEBS Lett* 2008, 582: 1444-50.
8. Kanazawa T, Takematsu H, Yamamoto A, Yamamoto H, **Kozutsumi Y**. “Wheat germ agglutinin stains dispersed post-Golgi vesicles after treatment with the cytokinesis inhibitor psychosine.” *J Cell Physiol*. 2008, 215:517-25.
9. Tatano Y, Fujinawa R, **Kozutsumi Y**, Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Tsuta K, Takada G, Sakuraba H, Itoh K. “Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in

Costello syndrome.” *Biochem Biophys Res Commun*. 2008, 372,681-7.

10. Kondo Y, Tokuda N, Fan X, Yamashita T, Honke K, Takematsu H, Togayachi A, Ohta M, **Kozutsumi Y**, Narimatsu H, Tajima O, Furukawa K, Furukawa K.” Glycosphingolipids are not pivotal receptors for Subtilase cytotoxin in vivo: Sensitivity analysis with glycosylation-defective mutant mice.” *Biochem Biophys Res Commun* 2009, 378:179-81.
11. Abdu-Allah HH, Watanabe K, Hayashizaki K, Iwayama Y, Takematsu H, **Kozutsumi Y**, Tsubata T, Ishida H, Kiso M.” Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions.” *Tetrahedron Lett*. 2009, 50:4488-91.

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

「免疫シグナル制御」グループ

1. 鏝田武志：「B細胞自己トレランスのメカニズムとその破綻」 *Molecular Medicine* 41:150-156, 2004.
2. 鏝田武志：「免疫疾患とB細胞の役割」内科診療Q&A 免疫疾患 39号 p.50-51, 六法出版社 東京 2004.
3. 鏝田武志：「リンパ球選択とアポトーシス」 *実験医学* 22:163-169, 2004.
4. 鏝田武志：「成熟B細胞の活性化と自己免疫」 *医学のあゆみ* 211:675-679, 2004.
5. 鏝田武志：「免疫グロブリンクラス特異的なBリンパ球活性化制御機構—ワクチンによる感染防御を支える分子機構—」 *炎症と免疫* 株式会社先端医学社 13：83 - 87, 2005.
6. 鏝田武志：「獲得免疫と抗原認識（免疫系のしくみとその制御）」 *わかりやすい免疫疾患 第一章 免疫の基礎* 日本医師会雑誌 134 特別号:36-39, 2005.
7. 鏝田武志：「Bリンパ球アポトーシスの制御機構と免疫応答」 *細胞工学* 24：934-938, 2005.
8. 鏝田武志：「抗体応答の鍵を握る分子シグレック2」 *未来を拓く糖鎖科学* 金芳堂 228-230, 2005.
9. 鏝田武志：「Bリンパ球活性化におけるアポトーシスシグナルと生存シグナル」 *炎症と免疫* 先端医学社 14:19-25, 2006.
10. 鏝田武志：獲得免疫応答の鍵を握る分子シグレック *細胞工学* 2,6: 653-657, 2007.

11. 鏝田武志：シアル酸とその機能の多様性：感染と免疫の進化的相互作用 細胞工学 2,6: 62,6-628, 2007.
12. 鏝田武志：ワクチン効果のメカニズム 日本医事新報 4359: 70-73, 2007
13. 鏝田武志：B細胞共受容体CD22とCD72の機能と糖鎖リガンド Annual Review 免疫 2008 中外医学社 18-25, 2007
14. Tsubata, T (2008). Siglec-2 is a key molecule for immune response. In “Experimental Glycoscience, Glycobiology” (ed by N. Taniguchi, A. Suzuki, Y. Ito, H. Narimatsu, T. Kawasaki and S. Hase) p. 167-170, Springer.

「リガンド代謝」グループ

著書

1. Shinobu Kitazume, Shou Takashima and Yasuhiro Hashimoto. “Processing of glycosyltransferases by Alzheimer’s β secretase (BACE1)” in *Experimental Glycoscience*, edited by N. Taniguchi et al. 192-194, 2008
 2. 北爪しのぶ, 橋本康弘, “糖転移酵素の修飾機構と意義” 蛋白質核酸酵素 増刊号 糖鎖情報の独自性と普遍性, 2008年9月号増刊, 53: 1456-1459
 3. 北爪しのぶ, “アルツハイマー病と糖鎖,” 糖鎖科学の新展開, 谷口直之、伊藤幸成 監修, (株) エヌ・ティー・エス, 東京, p.201-205, 2005
 4. 山地俊之, 三ツ木元章, 橋本康弘, “Natural killer (NK)細胞の活性化レセプターと抑制性レセプター,” 糖鎖科学の新展開, 伊藤幸成, 谷口直之監修, (株) エヌ・ティー・エス, 東京, p.274-280, 2005
 5. 北爪しのぶ, 橋本康弘, “アルツハイマー病 β セクレターゼによる糖転移酵素のプロセッシング,” 未来を拓く糖鎖科学, 永井克孝監修, 金芳堂, 京都, p.250-252, 2005
- 総説・解説
1. 北爪しのぶ, 橋本康弘, “アルツハイマー病 β セクレターゼによる糖転移酵素のプロセッシングによる糖鎖発現の調節”, 遺伝子医学MOOK 11「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」 2008
 2. 北爪しのぶ, 橋本康弘, “糖転移酵素の修飾機構と意義” 蛋白質核酸酵素 増刊号 糖鎖情報の独自性と普遍性, 53: 1456-1459, 2008
 3. 北爪しのぶ, 中川和博, 山本正雅, 樋口真人, 西道隆臣, 橋本康弘, “アルツハイマー病 β セクレターゼによるシアル酸転移酵素切断のpathophysiology,” 日本血清止血学会誌, 17: 78-82, 2006
 4. 山地俊之, 北爪しのぶ, 中川和博, 橋本康弘, “シグレック：抑制性シグナルを伝え

るレクチン分子,” 遺伝子医学MOOK 3 「糖鎖と病気」, 谷口直之編, (株) メディカルドゥ, 130-137, 2005,

5. 北爪しのぶ、小谷典弘、中藤博志、西道隆臣、橋本康弘：アルツハイマー病βセクレターゼの基質としての糖転移酵素. 蛋白質核酸酵素, 49: 2468-2472, 2004

「糖鎖リガンド」グループ

1. 竹松 弘、小堤 保則：シアル酸代謝の多様性と生命機能：細胞工学 Vol2,6, No.6, 640-643 (2007)
2. Kozutsumi Y, Takematsu H.: DNA microarray in Glycobiology, in Comprehensive Glycoscience vol.2(2007)p428 – 448 : Boons Geert-Jan, Lee Yuan Chuan, Suzuki Akemi, Taniguchi Naoyuki, Voragen Alphons G.J.(編)
3. 内藤 裕子、竹松 弘、小堤 保則：B細胞機能調節における糖鎖認識の重要性-B細胞活性化に伴う糖鎖の変化：蛋白質核酸酵素 53: 1630-1635 (2008) 共立出版

(3)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 18 件、国際会議 13 件)

[国際学会]

「免疫シグナル制御」グループ

1. Tsubata, T. : B cell tolerance and autoimmunity. FIMSA/IIS Advanced Course on Immunology, March 1-5, 2006, New Delhi, India
2. Tsubata, T.: Immunoglobulin isotype-dependent regulation of B cell antigen receptor signaling mediated by CD22/Siglec-2. The 5th Sialoglycoscience 2006 International Conference, August 27-30, 2006, Mishima, Japan
3. Tsubata, T.: Functional role of inhibitory BCR Co-receptors CD22 and CD72. 1st International Singapore Symposium of Immunology. January 12-16, 2008, Biopolis, Singapore.
4. Tsubata, T.: Endoplasmic reticulum stress and autoimmune diseases: 36.Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 24-27 September, 2008, Berlin, Germany
5. Tsubata, T.: Cell death, autophagy, cell senescence and their roles in diseases: 7th Surugadai International Symposium, 16-18 November, 2008, Tokyo, Japan
6. Tsubata, T.: Membrane-bound lectins and humoral immunity: CREST International Symposium “Acquired Immunity and Glycobiology”, 23-24 March, 2009, Kazusa, Japan
7. Tsubata, T.: How unresponse, slow response and rapid response of humoral immunity is

determined? : ZIBI International Summer School on Pathogen-Host-Interplay, 19-26 July, 2009, Berlin, Germany

8. Tsubata, T.: B cell response augmentation by expression of IgG and deficiency in CD22: Annual Symposium of the Korean Association of Immunologists, 9-10 November, 2009, Seoul, Korea

「リガンド代謝」グループ

1. Yasuhiro Hashimoto, Keiro Shirotani, Kiyomitsu Nara and Satoshi Futakawa: “Siglec-7-dependent inhibitory signaling”, CREST International Symposium "Acquired Immunity and Glycobiology", Kazusa, Japan (March 23-24, 2009)
2. Shinobu Kitazume, Shou Takashima, Satoshi Futakawa, Yuriko Tachida, Kazuko Ogawa¹ and Yasuhiro Hashimoto. “Plasma ST6Gal I as a marker of hepatic disease. Frontiers in Glycomics.” Bioinformatics and Biomarkers in Disease (National Institutes of Health), Bethesda, MD, U.S.A. (September 11-13, 2006)
3. S. Kitazume, K. Nakagawa, Y. Hashimoto. “Alzheimer b-secretase (BACE1 protease) is responsible for the cleavage and secretion of alpha2,6-sialyltransferase in vivo”, 2nd Workshop the Netherlands-Japan on Recent Advances in Glycobiology, Utrecht, The Netherlands, (April, 2005)

「糖鎖リガンド」グループ

1. Kozutsumi Y. “Dynamic change in sialic acid species in mouse germinal center B cells”, 18th International Symposium on Glycoconjugates, Firenze, Italy, Sep 4-9 (2005)
2. Hiromu Takematsu. “Change of Neu5Gc modification of Sialic Acid in Activated B cells and Its Biological Significance”, Sialoglycoscience 2006 (第5回国際シアロ糖鎖科学会議 2006) , Mishima, Japan, Aug 27-30 (2006)

〔国内学会〕

招待講演

「免疫シグナル制御」グループ

1. 鏝田武志「抗原シグナル伝達を標的とした液性免疫応答の制御」2006年1月27日、第3回ケムバイオシンポジウム、東京
2. 鏝田武志「抗原受容体を介するBリンパ球アポトーシスにおける小胞体ストレスの役割」2006年10月31日—11月1日、岡崎生理学研究所生理学研究会、東岡崎
3. 鏝田武志「CD22/Siglec-2によるBリンパ球活性化制御」2006年10月23日—10月24日、第4回糖鎖科学コンソ-シウムシンポジウム、東京
4. 鏝田武志「膜型レクチン分子による免疫応答制御」2007年1月26日、理研シンポ

ジウム 第10回 生体分子の化学、和光市

5. 鏝田武志「膜型レクチン分子における液性免疫応答の制御」2007年3月3日、第31回皮膚科免疫セミナー、東京
6. 鏝田武志「抗原受容体を介するBリンパ球アポトーシスの分子メカニズム」2007年8月15日-16日、2007年度生理学研究会、東岡崎
7. 鏝田武志：「免疫応答と組織細胞ストレス」2008年12月19日、第一回センシングバイオロジー・シンポジウム（第5回IBBフロンティアシンポジウム）、東京
8. 鏝田武志：「膜型レクチンCD72とBリンパ球アポトーシス」2009年3月17日-18日、2008年度生理学研究会、東岡崎
9. 鏝田武志：「膜型レクチン分子と獲得免疫」2009年9月9日-11日、第29回糖質学会年会、高山
10. 鏝田武志：「チロシンフォスファターゼSHP-1を活性化するBリンパ球膜分子CD22とCD72と免疫制御」2009年10月21日-24日、第82回日本生化学会、神戸
11. 鏝田武志：「IgGおよびIgE産生B細胞に特異的な活性化制御メカニズム」2009年10月29日-31日、第59回日本アレルギー学会秋季学術大会、秋田

「リガンド代謝」グループ

1. 二川了次、奈良清光、星京香、遠山ゆり子、亀高愛、城谷圭朗、本多たかし、今牧理恵、北爪しのぶ、湯浅龍彦、宮嶋雅一、新井一、古川勝敏、荒井啓行、伊藤浩美、久野敦、成松久、橋本康弘：「特発性正常圧水頭症の髄液中の糖鎖マ-カ-」、日本ヒトプロテオーム機構（JHUPO）第7回大会、東京（2009年7月27日～28日）
2. 城谷圭朗、奈良清光、二川了次、橋本康弘：「疾患の解明と治療・創薬のための糖鎖科学—1（疾患と糖鎖）」、財団法人神奈川科学技術アカデミー（KAST）2008年度教育講座「糖鎖科学・糖鎖工学への招待」、川崎（2009年1月22日）
3. 橋本康弘、星京香、遠山ゆり子、亀高愛、二川了次、奈良清光、城谷圭朗、本多たかし、今牧理恵、北爪しのぶ、萩原良明、木下憲明、新井一、宮嶋雅一、湯浅龍彦、久野敦、平林淳、伊藤浩美、梶裕之、成松久、荒井啓行：「アルツハイマー病βセクレターゼとシアロ糖鎖」、第31回日本神経科学学会大会、シンポジウム「糖鎖による神経機能と疾患」、東京、（2008年7月10日）
4. 橋本康弘（福島医大・生化、CREST,JST）：「アルツハイマー病と糖鎖」、第1回KSGCシンポジウム『糖鎖医学の曙光』、南国市、高知県（2008年3月21日）
5. 橋本康弘、北爪しのぶ：アルツハイマー病βセクレターゼ（BACE1）による糖鎖発

現の調節：可溶性 α 2,6 シアル酸転移酵素による糖鎖の生合成、第1回東北糖鎖研究会、仙台（2007年12月22日～23日）

6. 橋本康弘, 中川和博, 北爪しのぶ：“アルツハイマー病 β セクレターゼによる糖転移酵素の切断” 第2回理化学研究所・実験動物懇談会, つくば研究所, つくば(2005年1月)

「糖鎖リガンド」グループ

1. 小堤保則, 山本晴美, 藤縄玲子, 竹松 弘：相関解析と DNA マイクロアレイを組み合わせた遺伝子特定の試み：第6回長井記念シンポジウム（徳島 2005年7月8日）

② 口頭発表（国内会議 29 件、国際会議 12 件）

国際

「免疫シグナル制御」グループ

1. Toda M, Takeuchi N, Inoue M, Adachi T, Matsubara J, Taketani S, Tsubata T, Murata T and 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. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006.
2. Zhu C, Tsubata T and Adachi T. : The single immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif surrounding the tyrosine 783 in CD22 (siglec2) is sufficient for negative regulation of BCR signaling. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006.
3. Mohamed, A, A, H, H., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.: Design and synthesis of novel sialosides as potential CD22-specific inhibitors. XIX International Symposium on Glycoconjugates. (Glyco-19). Cairns, Australia, July 15-20, 2007.
4. N. Engels, C. Heemann, L. Koenig, Tsubata, T., S.Griep, V. Schrader, J. Wienands.: Antigen receptor tail clue of class-switched memory B cells: Joint Annual Meeting of Immunology of the Austrian and German Societies, 3-6 September 2008, Vienna, Austria
5. Tsubata, T.: Membrane-bound lectins and humoral immunity: 2nd European Congress of Immunology, 13-16 September, 2009, Berlin, Germany
6. N. Engels, L. M. Koenig, C. Heemann, J. Lutz, Tsubata, T., S.Griep, V. Schrader, J. Wienands: The immunoglobulin tail tyrosine of surface IgG and IgE provides antigen receptor-intrinsic costimulation to class-switched B cells: 2nd European Congress of Immunology, 13-16 September, 2009, Berlin, Germany

「リガンド代謝」グループ

1. Shinobu Kitazume, Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa, Yosiaki Hagiwara, Noriaki Kinoshita, Hajime Takikawa and Yasuhiro Hashimoto. "Plasma sialyltransferase: its formation mechanism and application to hepatitis diagnosis." 5th International Symposium on Glycosyltransferases, Tsukuba, Japan (June 25-28, 2006)
2. K. Nakagawa, S. Kitazume, K. Maruyama, T.C. Saido, Y. Hashimoto. "Sialylation enhances the secretion of APP", Gordon Research Conferences on Glycobiology, Ventura, California, USA (March, 2005)
3. S. Kitazume, R. Oka, Y. Tachida, K. Ogawa, I. Sugimoto, S. Takashima, M. Higuchi, H. Arai, T. Saido, E. Miyoshi, N. Taniguchi, Y. Hashimoto. "Quantitative analysis of plasma alpha2,6-sialyl epitopes (St6Gal I products) on upregulation of BACE1", The 6th Japan-Korea Symposium for Glycobiology, Wako-shi, Saitama, Japan (July, 2005)
4. T. Yamaji, M. Mitsuki, S. Takashima, M. Tsujimoto, Y. Hashimoto. "Inhibitory signaling of natural killer cell receptor, Siglec-7", The 6th Japan-Korea Symposium for Glycobiology, Wako-shi, Saitama, Japan (July, 2005)

「糖鎖リガンド」グループ

1. Yamamoto Y, Takematsu H, Okuno Y, Suzuki A and Kozutsumi Y. "DNA microarray analysis of genes responsible for the expression of carbohydrate antigens", The 2nd Glycobiology Workshop The Netherlands-Japan, Utrecht, Netherland, Apr 18-20 (2005)
2. Kozutsumi Y. "Activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid in mouse lymphocytes", CREST International Symposium "Acquired Immunity and Glycobiology", Chiba, Japan, Mar 23-24 (2009)

国内

「免疫シグナル制御」グループ

1. 巖斌成、安達貴弘、鏝田武志 「B 細胞抗原受容体を介したアポトーシスにおける ROS の解析」2006 年 5 月 8 日-9 日 日本ケミカルバイオロジー研究会第一回年会、東京
2. 于潔、澤田敏彦、安達貴弘、Xiaoming Gao, 石田秀治、木曾真、鏝田武志 「マウス CD22 阻害剤のスクリーニング系の構築」2006 年 5 月 8 日-9 日 日本ケミカルバイオロジー研究会第一回年会、東京
3. Adachi, T., Bin-Cheng Yan., Tsubata, T.: Cell cycle arrest induces ROS-mediated apoptosis in B cells. 2006 年 12 月 11 日-13 日 第 36 回日本免疫学会総会学術集会、大阪
4. 巖斌成、安達貴弘、鏝田武志 「B 細胞抗原受容体を介したアポトーシスにおける

ROS の役割」 2006 年 12 月 11 日-13 日 第 36 回日本免疫学会総会学術集会、大阪

5. Yu J, Adachi T, Gao X, Tsubata T. : Establishment of the screening for mouse CD22 inhibitors. 2006 年 12 月 11 日-13 日 第 36 回日本免疫学会総会学術集会、大阪
6. 渡辺幸造「B 細胞抗原受容体刺激によるオートファジーの誘導と補助シグナルによるその抑制」 2006 年 12 月 11 日-13 日 第 36 回日本免疫学会総会学術集会、大阪
7. 佐藤元彦、安達貴弘、鏝田武志「免疫グロブリンアイソタイプ特異的な B 細胞反応性差異のメカニズムに関する研究」2006 年 12 月 11 日-13 日第 36 回日本免疫学会総会学術集会、大阪
8. Hitomi, Y., Adachi, T., Tsuchiya, N., Honda, Z., Tokunaga, K., Tsubata, T. (2007): The alternatively spliced isoform of human CD72 that confers resistance against systemic lupus erythematosus regulates B lymphocyte apoptosis. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、2007 年 11 月 20 日-22 日、東京
9. Onodera, T., Poe, J, C., Tedder, T, F., Tsubata, T. (2007): The kinetics of antibody response is regulated by CD22. 第 37 回日本免疫学会総会・学術集会、2007 年 11 月 20 日-22 日、東京
10. Toda, M., Sonoyama, K., Maki, H., Akita, K., Inoue, M., Takeuchi, N., Adachi, T., Tsubata, T., Nakata, H.: Ligation of tumor-produced mucin to CD22 dramatically impairs splenic marginal zone B cells. 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会、2007 年 12 月 11 日-15 日、横浜
11. 渡辺幸造、中島権一、今井有香、安達貴弘、佐藤元彦、林崎浩史、戸谷希一郎、伊藤幸成、鏝田武志「B 細胞特異的 C 型レクチン様分子 CD72 はオリゴマンノースに対して Ca²⁺非依存性のレクチン活性を有する」、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸
12. Man, R., Onodera, T., Tsubata, T.: Increased tonic B cell antigen receptor signaling but reduced antigen-induced B cell response in transgenic B cells expressing IgG : 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日-3 日、京都
13. 人見祐基、安達貴弘、岩井佳子、土屋尚之、本田善一郎、徳永勝士、鏝田武志「SLE 抵抗性を有するヒト CD72 選択的スプライシングアイソフォームは小胞体ストレスによるアポトーシスを惹起する」、第 38 回日本免疫学会総会・学術集会、2008 年 12 月 1 日-3 日、京都
14. 渡辺幸造、土屋祐美子、河口佳典、菖蒲弘人、澤田晋一、秋吉一成、鏝田武志「CHP-NH2 ナノゲルを用いたタンパク導入によるがん細胞と T 細胞の細胞死制御」日本ケミカルバイオロジー学会第四回年会、2009 年 5 月 18 日-19 日、神戸

「リガンド代謝」グループ

1. 橋本康弘、菅野真由美、山口芳樹、奈良清光：「Siglec-7によるITIM依存性および非依存性の新規シグナル伝達」、第29回日本糖質学会年会、高山市、2009年9月9日-11日
2. 橋本康弘、奈良清光、二川了次、亀高愛、遠山ゆり子、星京香、杉本一路、今牧理恵、岡律子、小川加寿子、三善英知、谷口直之、北爪しのぶ：「疾患マーカーとしての α 2,6-シアロ糖タンパク質」、第28回日本糖質学会年会、つくば市、2008年8月18日-20日
3. 二川了次、北爪しのぶ、岡律子、小川加寿子、萩原良明、木下憲明、橋本康弘：「ヒト・マウス・ラットにおける血漿中のST6Gal 1の定量：サンドイッチELISAの開発」、第1回東北糖鎖研究会、仙台、2007年12月22日-23日
4. 北爪しのぶ、杉本一路、岡律子、二川了次、小川加寿子、三善英知、谷口直之、橋本康弘：「BACE1によるST6Gal I切断が細胞内のシアリル化に及ぼす影響」、第27回日本糖質学会年会、福岡、2007年8月1日-3日
5. 中川和博¹、北爪しのぶ、岡律子、西道隆臣、佐藤雄治、遠藤玉夫、橋本康弘：「アミロイド前駆体タンパク質のシアリ酸化による神経毒性ペプチドA β の産生促進」第2,6回日本糖質学会年会、仙台、2006年8月23日-25日
6. 高島晶、北爪しのぶ、橋本康弘：「D22-Siglec-2リガンド生合成に係わるシアリ酸転移酵素のプロセッシング」、東京医科歯科大学・難治研セミナー、東京、2005年8月25日
7. 三ツ木元章、山地俊之、橋本康弘：「Siglec-7の機能」、東京医科歯科大学・難治研セミナー、東京、2005年8月25日
8. 橋本康弘：「糖鎖とは」、東京医科歯科大学・難治研セミナー、東京、2005年8月25日
9. 山地俊之、三ツ木元章、高島晶、辻本雅文、橋本康弘：「シグレック-7（ナチュラルキラー細胞レセプター）の糖鎖認識と細胞内シグナル伝達」、第25回日本糖質学会年会、大津市、滋賀県、2005年7月
10. 北爪（川口）しのぶ、杉本一路、岡律子、立田由里子、小川加寿子、三善英知、谷口直之、橋本康弘：「アルツハイマー病 β セクレターゼによる可溶性シアリ酸転移酵素の産生」、第15回LECラット研究会大会、東京、2005年5月

「糖鎖リガンド」グループ

1. 山本晴美、藤縄玲子、奥野恭史、竹松弘、小堤保則：「DNAマイクロアレイ相関解

- 析法による糖脂質関連遺伝子の発現解析」、第 49 回日本脂質生化学会（札幌 2007 年 6 月 5 日）
2. 藤縄玲子、竹松弘、奥野恭史、小堤保則：「DNA マイクロアレイデータと細胞表面糖鎖発現の相関法の開発および検証」、第 27 回日本糖質学会年会（福岡 2007 年 8 月 1 日）
 3. 竹松弘、山本晴美、藤縄玲子、奥野恭史、辻本豪三、小堤保則：「糖鎖関連遺伝子マイクロアレイを用いた植物レクチン反応性糖鎖生合成調節遺伝子の同定、CIRESE 法を用いて」、第 80 回日本生化学会大会（横浜 2007 年 12 月 14 日）
 4. 竹松弘、内藤裕子、村田恵祐、小堤保則：「マウスリンパ球における活性化依存的なシアル酸分子種の変化とその意義」、第 28 回日本糖質学会年会（茨城 2008 年 8 月 18～20 日）
 5. 内藤裕子、竹松弘、村田恵祐、小堤保則：「活性化 T 細胞におけるシアル酸分子種の機能的変化」、第 38 回日本免疫学会学術集会（京都 2008 年 12 月 1～3 日）

③ ポスター発表（国内会議 27 件、国際会議 15 件）

国際

「免疫シグナル制御」グループ

1. Watanabe, K., Tsuchiya, Y., Kawaguchi, Y., Ayame, H., Sawada, S., Akiyoshi, K., Tsubata, T. “Self-assembled cationic nanogel-mediated efficient protein delivery in mouse primary T cells”, The 5th international Workshop of Kyoto T cell conference, Kyoto, Japan, 1-4 June, 2009

「リガンド代謝」グループ

1. Shou Takashima, Shinobu Kitazume, Motoaki Mitsuki, Yuriko Tachida, Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa and Yasuhiro Hashimoto. “Characterization of mouse BACE1 and 2 genes”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan (June 18-23, 2006)
2. Ritsuko Oka, Shinobu Kitazume, Yuriko Tachida, Kazuko Ogawa, Yoshiaki Hagiwara, Noriaki Kinoshita, Hajime Takikawa, and Yasuhiro Hashimoto. “Quantification of plasma alpha2,6-sialyltransferase by sandwich-ELISA”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan (June 18-23, 2006)
3. Shinobu Kitazume, Naomasa Yamamoto, Ritsuko Oka, Yuriko Tachida, Kazuko Ogawa, Jamey D. Marth, Yasuhiro Hashimoto. “ST6Gal I regulates the cellular level of PECAM”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Kyoto, Japan (June 18-23, 2006)

4. T. Yamaji, M. Mitsuki, S. Takashima, M. Tsujimoto and Y. Hashimoto. “Inhibitory signaling of natural killer cell receptor, Siglec-7”, XVIII International Symposium on Glycoconjugates, Firenze, Italy (September, 2005)
5. S. Kitazume, K. Nakagawa, R. Oka, Y. Tachida, K. Ogawa, Y. Luo, M. Citron, H. Shitara, C. Taya, H. Yonekawa, J.C. Paulson, E. Miyoshi, N. Taniguchi, Y. Hashimoto. “In vivo cleavage of alpha2,6-sialyltransferase by Alzheimer’s BACE1”, Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research (US/Japan Glyco 2004), Honolulu, Hawaii, U.S.A. (November, 2004)
6. N. Kotani, S. Kitazume, K. Kamimura, S. Takeo, T. Aigaki, H. Nakato, Y. Hashimoto. “Drosophila orthologues of human Alzheimer’s b-secretase induce the secretion of a Golgi-resident transferase”, Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research (US/Japan Glyco 2004), Honolulu, Hawaii, U.S.A. (November, 2004)
7. K. Nakagawa, S. Kitazume, K. Maruyama, T.C. Saido, Y. Hashimoto. “Sialylation enhances the secretion of neurotoxic amyloid-beta peptide: Regulatory role of Alzheimer’s beta-secretase for APP sialylation”, Joint Meeting of the Society for Glycobiology and the Japanese Society of Carbohydrate Research (US/Japan Glyco 2004), Honolulu, Hawaii, U.S.A. (November, 2004)

「糖鎖リガンド」グループ

1. Naito Y, Takematsu H, Yamamoto H, Sugai M, Okuno Y, Tsujimoto G, Kozutsumi Y. “Identification of GL7-epitope, the antigen on germinal center B cells”, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, Jun 18-23 (2006)
2. Naito Y, Takematsu H, Yamamoto H, Fujinawa R, Sugai M, Okuno Y, Tsujimoto G, Kozutsumi Y. “Identification of GL7-epitope, the antigen on germinal center B cells in mice”, FASEB Summer Research Conferences “Lymphocytes & Antibodies” Indian Wells, U.S.A. Aug 14 (2006)
3. Takematsu H, Naito Y, Yamamoto H, Okuno Y, Kozutsumi Y. “A germinal center marker, GL7 probes loss of CD22 ligand expression in activated B cells by means of the change in sialic acid species Neu5Gc to Neu5Ac”, FASEB Summer research conferences 2007 Lymphocytes and the immune system: Molecular, Cellular and Integrative Mechanism, Tucson, Arizona, U.S.A. July 7-12 (2007)
4. Kozutsumi Y, Kanazawa T, Takematsu H. “Arf6 is required for psychosine-induced multinuclear cell formation associated with globoid cell leukodystrophy”, Annual Conference of the Society for Glycobiology, Fort Worth, U.S.A. Nov 12-15 (2008)

5. Naito Y, Takematsu H, Murata K, Kozutsumi Y. “Activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid in mouse B- and T-lymphocytes”, Annual Conference of the Society for Glycobiology, Fort Worth, U.S.A. Nov 12-15 (2008)
6. Naito Y, Takematsu H, Murata K, Kozutsumi Y. “Exploration of functional significance of the activation-dependent repression of N-glycolylneuraminic acid in mouse lymphocytes” International Symposium on Systems Glycobiology, Tokyo, Japan. Dec. 5 (2008)
7. Naito Y, Takematsu H, Murata K, Kozutsumi Y. “N-glycolylneuraminic acid-mediated regulation of lymphocyte activation”, CREST International Symposium “Acquired Immunity and Glycobiology”, Chiba, Japan, Mar 23-24 (2009)

国内

「免疫シグナル制御」グループ

1. Zhu, C., Sato, M., Fujimoto, M. and Tsubata, T.: The signal immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif containing the tyrosine 783 in CD22 is sufficient for negative regulation of BCR signaling. 2006年12月11日-13日、第36回日本免疫学会総会学術集会、大阪
2. A, A, H, H, Mohamed., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M. : Design and synthesis of novel sialosides as potential CD22-specific inhibitors. The 2nd Annual meeting of Japanese society for chemical biology, May 9-10, 2007, Kyoto
3. Yu, J.: 糖鎖リガンド類似化合物によるBリンパ球活性化制御分子CD22の機能制御、2007年5月9日-10日、日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、京都
4. Yu, J., Adachi, T., Gao, X., Takematsu, H., Tsubata, T. (2007) : Synthetic glycan ligand excludes CD22 from antigen receptor-containing lipid rafts. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、東京
5. Yan, B., Adachi, T., Tsubata, T. (2007): Unfolded protein response is involved in B cell antigen receptor-mediated apoptosis. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、東京
6. Zhu, C., Adachi, T., Sato, M., Fujimoto, M., Tsubata, T. (2007): An ITAM-like motif containing tyrosine 817 in CD22 together with an ITIM containing tyrosine 783 is sufficient for negative regulation of BCR signaling. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、東京
7. Adachi, T., Yu, J., Onda, T., Man, R., Tsubata, T. (2007): CD22-mediated isotype specific B cell antigen receptor signaling regulation requires multivalent haptenated antigen. 第37回日本免疫学会総会・学術集会、2007年11月20日-22日、東京

8. 渡辺幸造、安達貴弘、鏝田武志：B細胞特異的C型レクチン様分子CD72のオリゴマンノースに対するCa²⁺非依存性のレクチン活性、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1日-3日、京都
9. 玉中大智、Hajjaj H. M. Abdu-Allah、Jie Yu、Lu Zhuoyuan、Magesh Sadagopan、安達貴弘、鏝田武志、Soerge Kelm、石田秀治、木曾眞：CD22阻害化合物の構造活性相関、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1日-3日、京都
10. 安達貴弘、満栄勇、矢倉英隆、鏝田武志：CD22による糖鎖リガンド依存のおよび非依存的なB細胞抗原受容体シグナル伝達制御、第38回日本免疫学会総会・学術集会、2008年12月1日-3日、京都

「リガンド代謝」グループ

1. Shizuka Ito, Nobuhito Ito, Akiko Tsuchida, Noriyo Tokuda, Hirokazu Yagi, Koichi Kato, Motoyuki Mitsuki, Toshiyuki Yamaji, Yasuhiro Hashimoto, Crocker Paul R., Koichi Furkawa. “Binding specificity of siglec-7-Fc prepared from various animal cell lines”, 81th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan, December 9-12, 2008
2. 二川了次、北爪しのぶ、岡律子、小川加寿子、萩原良明、木下憲明、橋本康弘 “ヒト・マウス・ラットにおける血漿中のST6Gal 1の定量：サンドイッチELISAの開発”，第80回日本生化学会大会、横浜（2007年12月11日～15日）
3. 杉本一路、二川了次、岡律子、小川加寿子、Marth D.Jamey、三善英知、谷口直之、橋本康弘、北爪しのぶ “BACE1によるST6Gal 1切断が細胞内のシアリル化に及ぼす影響”，第80回日本生化学会大会、横浜（2007年12月11日～15日）
4. Shinobu Kitazume, Naomasa Yamamoto, Ritsuko Oka, Yuriko Tachida, Kazuko Ogawa, Jamey Marth and Yasuhiro Hashimoto. “St6Gal-1 regulates the cellular level of PECAM”, 79th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Kyoto, Japan, June 18-23, 2006
5. Ritsuko Oka, Shinobu Kitazume, Kazuko Ogawa, Yoshiaki Hagiwara, Noriaki Kinoshita, Hajime Takikawa and Yasuhiro Hashimoto. “Quantification of plasma ST6Gal-1 in rat hepatitis model”, 79th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Kyoto, Japan, June 18-23, 2006
6. Shou Takashima, Shinobu Kitazume, Motoaki Mitsuki, Yuriko Tachida, Ritsuko Oka Kazuko Ogawa and Yasuhiro Hashimoto. “Characterization of mouse BACE1 and 2 genes”, 79th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Kyoto, Japan, June 18-23, 2006
7. 橋本康弘 “アルツハイマー病βセクレターゼによる糖転移酵素のプロセッシングとその病理学的意義”，第4回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム、東京、(October 23-24,2006)

8. Ritsuko Oka, Shinobu Kitazume, Yuriko Tachida, Kazuko Ogawa, Ichiro Sugimoto, Shou Takashima, Makoto Higuchi, Hiroyuki Arai, Takaomi Saido, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi and Yasuhiro Hashimoto. “Quantitative analysis of plasma alpha2,6-sialyl epitopes (ST6Gal I products) on upregulation of BACE1”, 78th Annual Meeting of Japanese Biochemical Society, Kobe, Japan, October 19-22, 2005
9. 山地俊之、三ツ木元章、高島 晶、辻本雅文、橋本康弘 “シグレック-7の糖鎖認識と細胞内シグナル伝達” 特定研究第3回夏期シンポジウム, 岐阜市 (August, 2005)
10. 北爪しのぶ、岡 律子、立田由里子、小川加寿子、杉本一路、樋口真人、荒井啓行、西堂隆臣、三善英知、谷口直之、橋本康弘 “SNAレクチンを用いた生体内のST6Gal I反応産物の定量” 第25回日本糖質学会年会, 大津市 (July, 2005)
11. Shinobu Kitazume, Ritsuko Oka, Yuriko Tachida, Kazuko Ogawa, Kazuhiro Nakagawa, Yi Luo, Martin Citron, and Yasuhiro Hashimoto. “Secretion of alpha-2,6sialyltransferase (ST6Gal I) in the mice deficient in Alzheimer’s beta-secretase (BACE1)”, The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama, (October, 2004)
12. Yuriko Tachida, Shinobu Kitazume, Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa, Kazuhiro Nakagawa, Shou Takashima, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, James C. Paulson, Yasuhiro Hashimoto. “Elevation of serum alpha-2,6-sialyltransferase level in a hepatopathological model, Long-Evans Cinnamon Rat”, The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama (October, 2004)
13. Ritsuko Oka, Kazuko Ogawa, Shinobu Kitazume, Kazuhiro Nakagawa, Shou Takashima, Yasuhiro Hashimoto. “Preparation of soluble form of recombinant alpha-2,6-sialyltransferase that has the same amino-terminus that detected in vivo” The 77th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society, Yokohama (October, 2004)

「糖鎖リガンド」グループ

1. Naito Y, Takematsu H, Yamamoto H, Fujinawa R, Sugai M, Okuno Y, Tsujimoto G, Kozutsumi Y. “Germinal Center B Cells Suppress CD22-Ligand Expression by Means of CMP-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase Downregulation” Sialoglycoscience 2006, Mishima, Japan, Aug 27-30 (2006)
2. 金沢崇之、竹松弘、山本章嗣、小堤保則 「クラッベ病における蓄積脂質ガラクトシル-スフィンゴシン (サイコシン) の細胞質分裂阻害機構の解析」、第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜 2007年12月11-15日)
3. 村田恵祐、内藤裕子、竹松弘、小堤保則 「マウスにおけるT細胞の活性化とシアル酸分子種の変化の関連」、第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜 2007年12月11-15日)

4. 内藤裕子、竹松弘、村田恵祐、小堤保則「活性化 T 細胞における N- グリコリルノイラミン酸の発現抑制とその機能的な意義の探索」、第 28 回日本糖質学会年会（茨城 2008 年 8 月 18～20 日）

(4)知財出願

①国内出願 (2 件=下記 1 件+非公開 1 件)

発明の名称:B 細胞における CD22 機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法

発明者: 鏑田武志 小野寺大志

出願人: 科学技術振興機構

出願番号: 2006-349458

出願日: 2006. 12. 2, 6

②海外出願 (1 件)

発明名称 : B 細胞における CD22 機能を抑制することから成る免疫応答の促進方法

発明者 : 鏑田武志小野寺大志

出願人 : 独立行政法人科学技術振興機構

出願番号:PCT/JP2007/74634

出願日 : 2007/12/21

出願国 : 日本

③その他の知的財産権

その他 1 件 《特許権実施許諾》

可溶性シアル酸転移酵素を定量するためのサンドイッチ ELISA システム (特願 2002-141438: シアル酸転移酵素の切断部位認識抗体及びそれを用いたスクリーニング方法) の特許実施許諾権が日本免疫生物研究所により購入され、それに基づいた製品が発売されている(E41-ELISA)。また、ヒト、ラット、マウスの可溶性シアル酸転移酵素を定量するための ELISA も発売されている(M2-ELISA)。さらに、これらの ELISA に用いられた三種類の抗体も発売されている。

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 鏑田武志: フィリップ・フランツ・フォン・ジーボルト賞 平成 17 年 7 月 1 日 (ドイツ連邦共和国大統領)
2. 川口しのぶ: 「医学分野におけるアルツハイマー病 β セクレターゼの研究」 文部科学大臣表彰若手科学者賞 (FY2005 Minister of Education, Culture, Sports, Science and Technology Prize) 平成 17 年 4 月 20 日 (文部科学省)
3. 北爪しのぶ: 「Cleavage of a sialyltransferase by Alzheimer's secretase」 日本生化学会奨

- 励賞 平成 17 年 10 月 19 日 (日本生化学会)
4. 高島 晶: 「有用糖質関連酵素遺伝子の構造と機能に関する研究」 農芸化学奨励賞 2007 年 3 月 24 日 (日本農芸化学会)
 5. 内藤裕子: 日本糖質学会第 12 回ポスター賞 (日本糖質学会)

②マスコミ (新聞・TV 等) 報道

新聞報道

- 1 毎日新聞・2005 年 11 月 28 日 「アルツハイマー治療薬実用化に光り: 原因タンパク質減らす物質」
- 2 産経新聞・2005 年 11 月 28 日 「アルツハイマー治療へ化合物開発」
- 3 読売新聞・2005 年 11 月 28 日 「アルツハイマー病原因物質生成防ぐ化合物確認: 治療薬開発に可能性」
- 4 毎日新聞・2007 年 12 月 8 日 「アルツハイマー病早期発見の目安/たんぱく質の関連解明」
- 5 福島民報・2007 年 12 月 8 日 「アルツハイマーの指標発見/酵素で早期診断」
- 6 福島民友・2007 年 12 月 8 日 「アルツハイマー病早期発見に光/有効な診断指標特定」
- 7 朝日新聞 (東北版)・2007 年 12 月 13 日 「アルツハイマー/早期診断近づく」

その他

- 1 以下の 3 製品が IBL 社より発売されている。
 製品番号 27408 Rat α 2,6-sialyltransferase (E41 form) Assay Kit – IBL 96Well
 製品番号 18983 Anti-Rat soluble α 2,6-sialyltransferase (rST6Gal I-E41) Rabbit IgG Affinity Purify
 製品番号 18985 Anti-Rat α 2,6-sialyltransferase (rST6Gal I) Rabbit IgG Affinity Purify

(6)成果展開事例

①実用化に向けての展開

②社会還元的な展開活動

市民向けの科学イベント「免疫ふしぎ未来」でショートトークを行った。(鏑田武志)
(平成 21 年 5 月 2 日-3 日 日本科学未来館)

§ 6 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		場所	人数	内容
H17.7.25	Japan-Korea Symposium for Glycobiology	理化学研究所	30 人	日韓における糖鎖生物学者によるシンポジウム
H.18.3.7	フロンティアシンポジウム	理化学研究所	10 人	β セクレターゼ研究の情報交換
H18.10.23	第 4 回糖鎖科学コ	虎ノ門パストラル	600 人	理化学研究所の

	ンソーシウムシン ポジウム			研究活動報告を 中心にシンポジ ウムを行った
H18.12.19	レクチンマイクロ アレイシンポジウ ム	理化学研究所	20 人	レクチンアレイ の原理と応用の 可能性について
H19.3.9	理研・福島県立医 科大学学生体情報伝 達研究所合同シン ポジウム	福島県立医科大学	50 人	糖鎖と細胞内シ グナルについて
H19.9.20	理研・フロンティ ア研究システム成 果発表シンポジウ ム	虎ノ門パストラル	200 人	理化学研究所で の研究の全体的 な業績発表と総 括
H20.7.10	第 31 回日本神経科 学会大会、シンポ ジウム「糖鎖によ る神経機能と疾患	東京国際フォーラム	50 人	神経科学会にお ける糖鎖の重要 性を示す為のシ ンポジウムをオー ガナイズした
H21.3.23-24	CREST International Symposium “Acquired Immunity and Glycobiology”	かずさアカデミアホール	100 人	CREST 国際シン ポジウムをオーガ ナイズした

§ 7 結び

本研究では、CD22/Siglec-2 とその糖鎖リガンドおよび CD72 が獲得免疫応答で重要な役割を果たすことが明らかとなり、さらに CD22/Siglec-2 を標的としてその機能を阻害することにより、ナイーブ B 細胞の機能を記憶 B 細胞様に変換してワクチンと同様の感染防御効果を発揮することを、実際のマウス感染系を用いて実証した。さらに、CD22/Siglec-2 の有効な阻害薬を改変糖鎖リガンド合成により開発し、これまでの抗菌剤／抗ウイルス薬と全く作用機序が異なる糖鎖医薬が開発できることを示した。この医薬は、ホストの免疫系を標的とするため耐性菌／耐性ウイルスの出現の心配はなく、また、抗原性を変異させる微生物にも有効と考えられる。さらに、病原微生物を同定する必要がないために新興感染症などの対策に有用である。今後は基礎研究とともにこのような画期的な医薬品を実用化するための研究を推進していきたい。

さらに、本研究では、糖鎖リガンドの機能やその代謝等についての知見も多く得られた。種々の変異マウスを何重にも交配して用いる必要があったために解析が終了しなかった部分も若干あるものの、これまでにあまり研究されてこなかった獲得免疫系での糖鎖シグナルの理解が進んだことは今後の糖鎖生物学および免疫学の研究の進展で重要である

と考えられる。また、本年3月におこなった国際シンポジウム「獲得免疫と糖鎖生物学」も国際的な情報発信や共同研究推進の場となった。このような多層的でかつ柔軟性の高いサポートを頂き、おおいに研究が進んだと大変感謝しています。



鏑田グループ