

「糖鎖の生物機能の解明と利用技術」

平成 16 年度採択研究代表者

本家 孝一

(高知大学医学部生化学講座 教授)

「病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明」

## 1. 研究実施の概要

本研究課題は、膜マイクロドメインに対する抗体の作製やマイクロドメイン指向性プローブの開発を通して膜マイクロドメインの可視化を目指すとともに、ウイルス感染や免疫における膜マイクロドメインの機能に関わる糖鎖の役割を解明することを目的とする。この統一的目的の下に、各研究グループが互いに連携しながら独自の研究を推進した。

本家グループは、マウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する単クローン抗体が認識する抗原分子をこれまで2種類同定した。また、脳の雄化に関与するマスキュリン遺伝子を神経系細胞株 PC12 に強制発現させた細胞の膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、NGF 処理時に神経突起先端と反応する単クローン抗体を得た。一方、生細胞における細胞膜上分子の相互作用を解析するための **Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)** 法を開発し、特許出願した。本法により、膜マイクロドメイン指向性プローブの開発が可能となった。

宇高グループは、T 細胞の細胞膜糖脂質マイクロドメインを反応場とする T 細胞レセプターによる MHC 分子の認識機構を解析し、反応場を操作することにより、抗原特異的に T 細胞の反応をポジティブに、あるいはネガティブに制御する方法を開発した。一方、アレルギーや自己免疫疾患の原因となる抗原に対する抗原特異的 T 細胞応答を、糖脂質マイクロドメインの脂質を操作することにより抑制できることがわかったので、今後は、糖脂質の糖鎖の役割に注目して研究を進める。

藤本グループは、アジュヴァントとの混合が不要で、同系抗原に対しても免疫応答を誘導できるという膜マイクロドメイン（脂質ラフト）免疫法の利点を生かして、抗腫瘍免疫療法への応用を目標とした基礎実験に取り組んだ。様々なマウス腫瘍細胞株と同系マウスの組み合わせで、脂質ラフト免疫が抗腫瘍効果を発揮すること、この効果には抗原特異性があること、NK 細胞関与の可能性は低いことなどを明らかにした。

今井グループは、EB ウイルスの潜伏感染膜タンパク質 LMP1 および LMP2A が、膜マイクロドメインに発現することを確認した。LMP1 発現による膜マイクロドメインの攪乱について検討するために、GM1 の近傍分子を EMARS 法で解析したところ、LMP1 発現細胞

で、GM1 の近傍に寄ってくる分子を見出したが、同分子は無刺激時には DIM 画分に回収されなかった。今後、EMARS 法と同じ条件で GM1 をコレラ毒素で架橋した場合に、DIM 画分に回収されるかどうかを検討する。

## 2. 研究実施内容

1) 平成 17 年度に引き続いて、マウス精子形成細胞膜マイクロドメイン画分に対する単クローン抗体が認識する抗原分子の同定を進めた。ドットブロットで陽性であった抗体クローンのうち、ウエスタンブロッティングでタンパクバンドを呈するものは数%にとどまった。これらの抗体を固相化したイムノアフィニティークロマトを用いて抗原を精製した後、電気泳動にかけて銀染色したバンドを切り出し、ゲル内消化の後、PMF 法で解析した。この結果、2 種類の抗体が認識する抗原分子が同定された。

2) 脳の雄化に関与するマスキュリン遺伝子を神経系細胞株 PC12 に強制発現させた細胞の膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製した。マスキュリン発現膜マイクロドメイン画分に強く反応する抗体クローンスクリーニングしたところ、NGF 処理後の神経突起先端を認識する単クローン抗体が得られた。一方、PC12 細胞に強制発現したマスキュリンは、N-グリコシド型糖鎖を 3 本付加していることを証明した。

3) 生細胞における細胞膜上分子の相互作用を解析するための **Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)** 法を開発した。これは、アリアルアジド基をペルオキダーゼで活性化してラジカルを生じさせることにより、標的分子の近傍に存在する分子を同定する新奇の方法で、既に特許出願を完了した。この方法を用いることにより、膜マイクロドメイン指向性プローブの開発が可能となった。

4) 独自に開発した HLA 結合性ペプチド自動予測プログラムを用いて C 型肝炎ウイルスの抗原ペプチドを探索し、これに対する患者 T 細胞の応答性を調べた。その結果、T 細胞誘導活性が高く、かつ、3 つの HLA 型に共通に提示されるペプチドワクチンがデザインできたので、臨床試験を開始する。さらに、これまでペプチド免疫治療で達成できていなかった強い細胞傷害活性を誘導する免疫賦活剤を開発したので、これを添加する臨床試験も続いて開始する。同様に、WT1 腫瘍抗原についても、ペプチドワクチンをデザインし、担がん患者を対象とする臨床試験を行う。

5) 上記ペプチド免疫療法の標的抗原は、反応性の T 細胞レセプター (TCR) のレパトリーが自己寛容に傾き、自然には細胞傷害活性を誘導しにくい抗原である。そこで、強い細胞傷害活性を誘導する免疫方法を開発するため、TCR による抗原認識機構を調べている。特定の脂質を添加することにより、TCR に抗原認識の“場”を提供している糖脂質膜マイクロドメイン (脂質ラフト) を乱すと、ラフト会合性蛋白質の局在化が解消されることがわかった。さらに、同脂質を投与したマウスでは、実験的アトピー性皮膚炎が起きにくいことから、*in vivo* においても膜マイクロドメイン環境が TCR の抗原認識に重要な役割をはたしていることが示唆された。

6) 膜マイクロドメイン (脂質ラフト) 免疫法の“アジュヴァントとの混合が不要で、同系抗原に対しても免疫応答を誘導できる”という利点は、抗腫瘍免疫療法に応用可能と考え、Balb/c 及び C57BL/6 純系マウスを同系由来腫瘍細胞株の膜マイクロドメインであらかじめ免疫し、その細胞株を移植するという実験系で、脂質ラフト免疫法の同系腫瘍に対する抗腫瘍効果を検証した。Balb/c 由来骨髄腫 P3U1 から調製した膜マイクロドメインを Balb/c マウスに免疫した後、P3U1 細胞を腹腔移植すると、担癌率はラフト免疫マウスで抑制された。

7) C57BL/6 マウス由来の黒色腫 B16BL6 とリンパ腫 EL4 でも同様の実験を行った。B16BL6 から調製した膜マイクロドメインで免疫された C57BL/6 マウスに B16BL6 を腹腔移植したところ、コントロールでは全マウスが死亡したのに対し、ラフト免疫マウスでは明らかに延命効果がみられ、1/3 は寛解した。また、EL4 から調製した膜マイクロドメインで免疫した場合も 2/3 は寛解した。一方、B16BL6 から調製したラフトマイクロドメインを免疫した場合は免疫効果がみられなかったことから、脂質ラフト免疫法は抗原特異性を有していることが示唆された。

8) 抗腫瘍効果の作用機序を明らかにするため、*in vitro* の実験を行った。EL4 細胞のラフトマイクロドメインで免疫されたマウスの抗血清存在下で EL4 細胞を培養しても増殖に影響はなく、さらに補体を添加しても細胞傷害効果は観察されなかった。一方、免疫マウス脾臓から CD49b<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup> の NK 細胞を単離し、NK 細胞数、real time PCR による PMA 刺激後の INF $\gamma$  産生を測定したところ、細胞数の増加も INF $\gamma$  産生の上昇も観察されなかった。以上の結果から、液性免疫や NK 細胞の関与は否定的であり、現時点では、細胞傷害性 T リンパ球や樹状細胞の関与の可能性を考えている。

9) EB ウイルス (EBV) 潜伏感染膜タンパク質 LMP1 および LMP2A は、宿主細胞膜マイクロドメインに発現する。LMP1 と LMP2A の発癌機構への関与を明らかにするために、レトロウイルスベクター (SIN-RV) に組み込んで導入した LMP1、LMP2A 発現上皮細胞株を用い、糖脂質マイクロドメインの攪乱について検討した。GM1 の近傍分子を EMARS 法で解析したところ、LMP1 発現細胞で、ある分子が GM1 の近傍に寄ってくるのがわかったが、この分子は無刺激時には DIM 画分に回収されなかった。次に、EMARS 法を用いて LMP1 の近傍分子を同定する目的で、LMP1 の細胞外ドメインに FLAG タグを導入した改変 LMP1 発現細胞を樹立したが、FLAG タグに対する抗体で改変 LMP1 を認識できなかった。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「糖鎖機能解析法研究」グループ

##### ①研究者名

本家 孝一 (高知大学医学部生化学講座 教授)

##### ②研究項目

・膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定

- ・膜マイクロドメイン指向性プローブの開発と応用

(2)「免疫制御研究」グループ

①研究者名

宇高 恵子(高知大学医学部免疫学講座 教授)

②研究項目

- ・胸腺細胞分化決定機構における膜マイクロドメイン糖鎖機構の解明
- ・T細胞の抗原認識における糖脂質の機能解析

(3)「抗体産生」グループ

①研究者名

藤本 純一郎(国立成育医療センター研究所 副所長)

②研究項目

- ・膜マイクロドメイン調製と免疫及び抗体作成
- ・膜マイクロドメイン免疫の抗腫瘍活性
- ・膜マイクロドメイン免疫により惹起される免疫反応の検討

(4)「ウイルス感染制御研究」グループ

①研究者名

今井 章介(高知大学医学部微生物学講座 教授)

②研究項目

- ・EBウイルス関連腫瘍における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明

## 4. 研究成果の発表等

### (1)論文発表(原著論文)

- Marcus, J., Honigbaum, S., Shroff, S., Honke, K., Rosenbluth, J., Dupree, J. L.: Sulfatide is essential for the maintenance of CNS myelin and axon structure., *Glia* **53**, 372-381 (2006).
- Wang, X., Gu, J., Ihara, H., Miyoshi, E., Honke, K., Taniguchi, N.: Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling., *J. Biol. Chem.* **281**, 2572-2577 (2006).
- Watanabe, T., Ihara, H., Miyoshi, E., Honke, K., Taniguchi, N., Taguchi, T.: A specific detection of GlcNAc $\beta$ 1-6Man $\alpha$ 1 branches in N-linked glycoproteins based on the specificity of N-acetylglucosaminyltransferase VI. *Glycobiology* **16**, 431-439 (2006).
- Yamamoto, K., Higashi, S., Kioi, M., Tsunozumi, J., Honke, K., Miyazaki, K.: Binding

of active matrilysin to cell surface cholesterol sulfate is essential for its membrane-associated proteolytic action and induction of homotypic cell adhesion. *J. Biol. Chem.* **281**, 9170-9180 (2006).

- Greimel, P., Jabs, S., Storch, S., Cherif, S., Honke, K., Braulke, T., Thiem, J.: In vitro sulfation of N-acetyllactosaminide by soluble recombinant human  $\beta$ -Gal-3'-sulfotransferase. *Carbohydr. Res.* **341**, 918-924 (2006).
- Lee, S.H., Takahashi, M., Honke, K., Miyoshi, E., Osumi, D., Sakiyama, H., Ekuni, A., Wang, X., Inoue, S., Gu, J., Kadomatsu, K., Taniguchi N.: Loss of core fucosylation of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 impairs its function, leading to the upregulation of serum levels of insulin-like growth factor-binding protein 3 in *Fut8<sup>-/-</sup>* mice. *J. Biochem.* **139**, 391-398 (2006).
- Li, W., Nakagawa, T., Koyama, N., Wang, X., Jin, J., Mizuno-Horikawa, Y., Gu, J., Miyoshi, E., Kato, I., Honke, K., Taniguchi, N., Kondo, A.: Down-regulation of trypsinogen expression is associated with growth retardation in alpha1,6-fucosyltransferase-deficient mice: attenuation of proteinase-activated receptor 2 activity. *Glycobiology* **16**, 1007-1019 (2006).
- Zhu, S., Udaka, K., Sidney, J., Sette, A., Aoki-Kinoshita, K.F., and Mamitsuka, H.: Improving MHC binding peptide prediction by incorporating binding data of auxiliary MHC molecules. *Bioinformatics* **22**, 1648-1655 (2006).
- Morita, S., Oka, Y., Tsuboi, A., Kawakami, M., Maruno, M., Izumoto, S., Osaki, T., Taguchi, T., Ueda, T., Myoui, A., Nishida, S., Shirakawa, T., Ohno, S., Oji, Y., Aozasa, K., Hatazawa, J., Udaka, K., Yoshikawa, H., Yoshimine, T., Noguchi, S., Kawase, I., Nakatsuka, S., Sugiyama, H. and Sakamoto, J.: Phase I/II trial of a WT1(Wilms' tumor gene) peptide vaccine in patients with solid malignancy: Safety assessment based on the Phase I data. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **36**, 231-236 (2006).
- Mashiba, T., Udaka, K., Hirachi, Y., Hiasa, Y., Miyakawa, T., Satta, Y., Osada, T., Kataoka, S., Kohara, M. and Onji, M.: Identification of CTL epitopes in hepatitis C virus by a genome-wide computational scanning and a rational design of peptide vaccine. *Immunogenetics* **59**, 197-209 (2007).
- Taguchi, T., Takenouchi, H., Matsui, J., Tang, W.R., Itagaki, M., Shiozawa, Y., Suzuki, K., Sakaguchi, S., Katagiri, Y.U., Takahashi, T., Okita, H., Fujimoto, J., and Kiyokawa, N.: Involvement of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding proteins in pro-B-cell development. *Exp Hematol* **34**, 508-518 (2006)
- Maeda, M., Tsuda, A., Yamanishi, S., Uchikoba, Y., Fukunaga, Y., Okita, H., and Hata, J.: Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor of the kidney in a child. *Pediatric Blood and Cancer* Mar 16 [**Epub ahead of print**] (2006).

- Watanabe, N., Nakadate, H., Haruta, M., Sugawara, W., Sasaki, F., Tsunematsu, Y., Kikuta, A., Fukuzawa, M., Okita, H., Hata, J., Soejima, H., and Kaneko, Y.: Association of 11q loss, trisomy 12, and possible 16q loss with loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms tumor. *Genes Chromosomes Cancer*. **45**, 592-601 (2006).
- Hamazaki, M., Okita, H., Hata, J., Shimizu, S., Kobayashi, H., Aoki, K., Nara, T.: Desmoplastic small cell tumor of soft tissue: Molecular variant of EWS-WT1 chimeric fusion. *Pathol Int*. **56**, 543-548 (2006).
- Kiuchi, S., Yamada, T., Kiyokawa, N., Saito, T., Fujimoto, J., and Yasue, H.: Genomic structure of swine taste receptor family 1 member 3, TAS1R3, and its expression in tissues. *Cytogenet Genome Res*. **115**, 51-61 (2006).
- Kato, I., Manabe, A., Aoyama, C., Kamiya, T., Morimoto, T., Matsufuji, H., Suzuki, K., Kitagawa, Y., Hori, T., Tsurusawa, M., Kiyokawa, N., Fujimoto, J., and Hosoya, R.: Development of diffuse large B cell lymphoma during the maintenance therapy for B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* Jun 8 [**Epub ahead of print**] (2006).
- Kosaka, T., Miyajima, A., Takayama, E., Kikuchi, E., Nakashima, J., Ohigashi, T., Asano, T., Sakamoto, M., Okita, H., Murai, M., Hayakawa, M.: Angiotensin II type 1 receptor antagonist as an angiogenic inhibitor in prostate cancer. *Prostate* **67**, 41-49, (2007).
- Daibata, M., Nemoto, Y., Togitani, K., Fukushima, A., Ueno, H., Ouchi, K., Fukushi, H., Imai, S., Taguchi, H.: Absence of *Chlamydia psittaci* in ocular adnexal lymphoma from Japanese patients. *Brit J Haematol*, **132**, 651-652 (2006).
- Uehara, Y., Agematsu, K., Kikuchi, K., Matsuzaki, S., Imai, S., Takamoto, K., Sugane, K., Sugiura, T., Konishi, Y., Yoshino, N., Takeuchi, S., Seo, H., Kuramoto, S., Sugai, M.: Secretory IgA, peroxidase, and catalase-mediated microbicidal activity during H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> catabolism in viridans streptococci pathogen co-aggregation. *J Infect Dis*, **194**, 98-107 (2006).
- Fukushima, A., Yamaguchi, T., Fukuda, K., Sumi, T., Kumagai, N., Nishida, T., Imai, S., Ueno, H.: CD8<sup>+</sup> T cells play disparate roles in the induction and the effector phases of murine experimental allergic conjunctivitis. *Microbiol Immunol*, **50**, 719-728 (2006).
- Watanabe, R., Matsumoto, T., Sano, G., Ishii, Y., Tateda, K., Uchiyama, J., Sakurai, S., Matsuzaki, S., Imai, S., Yamaguchi, K.: The Efficacy of bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* gut-derived sepsis in mice. *Antimicrobial Agents Chemother*, **51**, 446-452 (2007).

**(2) 特許出願**

平成 18年度特許出願:1 件 (CREST 研究期間累積件数:1 件)