

「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

鏑田 武志

東京医科歯科大学大学院疾患生命科学研究所

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

## 1. 研究実施の概要

本研究においては、種々の遺伝子改変マウスを用いて糖鎖シグナルによる獲得免疫応答の制御機構を解明し、その制御法の開発を行う。本年度は、昨年度に引き続きこれまでに確立した種々の遺伝子改変マウスのコロニーを用いて B 細胞に発現する膜型レクチン分子 Siglec2/CD22 とその糖鎖リガンドの液性免疫応答における機能解明を行った。Siglec 2/CD22 が B リンパ球の細胞分裂の速度を制御することにより、液性免疫応答のタイムコースを制御することを明らかにしたので、Siglec2/CD22 の機能制御により感染免疫を増強できるか明らかにするために、マウスを用いたインフルエンザウイルス感染の系を樹立した。さらにこの系を用いて B リンパ球および抗体産生がインフルエンザ感染防御で重要な役割を果たすことを明らかにした。また、Neu5Ac を Neu5Gc に変換することにより Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド産生に必須の酵素 CMP-Neu5Ac 水酸化酵素が、B 細胞活性化時に転写レベルの制御により Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの発現が低下し、また、Siglec2/CD22 糖鎖リガンドの発現が BACE1 により制御されるなど、リガンド発現がダイナミックに制御されていることを明らかにしていたが、その意義を解明するために、CMAH を B リンパ球で構成的に発現するマウスや、BACE1 コンディショナルノックアウトマウスを樹立した。また、Siglec2/CD22 および CMAH ダブル欠損マウスを樹立した。次いで、Siglec2/CD22 に高親和性で結合する改変糖鎖リガンドの同定を進め、改変糖鎖リガンド等により Siglec2/CD22 の機能制御の基盤形成を行った。さらに、Siglec2/CD22 と機能重複のある CD72 の C 型レクチンドメインがオリゴマンノースに結合するなどレクチン活性を持つことを明らかにした。さらに、CD72 コンジェニックマウスや遺伝子改変マウスを樹立し、CD72 が 1 型糖尿病の発症を制御することを示唆する知見を得るなど、免疫応答における CD72 の重要性を明らかにした。今後は、Siglec2/CD22 や CD72 とその糖鎖リガンドの生体内での機能解明をさらに進めることにより、免疫応答におけるこれらの分子の役割をさらに明らかにし、改変糖鎖リガンドなどを用いた Siglec2/CD22 および CD72 を標的とした免疫制御法の開発を行っていく。

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

### 1. 免疫応答における Siglec2/CD22 の機能解明

我々は Siglec2/CD22 を欠損し、ハプテンニトロフェノールに反応する免疫グロブリンを産生する B 細胞をレシピエントマウスに移入したのちにニトロフェノールで免疫し、移入した B 細胞の増殖、分化をモニターする系をもちいて免疫応答の際の Siglec2/CD22 の機能解明を行った。その結果、Siglec2/CD22 欠損 B 細胞では免疫応答の際に細胞分裂が亢進し、その結果抗体産生細胞等への分化が早期化するなど、記憶 B 細胞様の反応を示すことを明らかにした (2)。そこで、Siglec2/CD22 の機能制御によりウイルス等への感染防御を増強できるかを明らかにするために、今年度はインフルエンザウイルス感染の実験系を確立した。インフルエンザウイルスは発現する HA や NA 抗原により複数のサブタイプが存在するが、我々は、H1N1 の PR8 株と H3N2 の X31 株を導入し、ウイルスの精製やタイター測定、さらに、正常マウスへの接種、感染樹立の系を確立した。免疫グロブリン  $\mu$  鎖の膜エクソンを欠失するために B リンパ球を欠損するマウスでは、インフルエンザウイルスへの感染抵抗性が減弱していたことから抗体応答がインフルエンザウイルス感染抵抗で重要な役割を果たすことが確認できた。また、ウイルスへの抗体産生測定を ELISA で行うために、ウイルス抗原の精製を行った。なお、CD22 の細胞内領域の解析により新たなシグナル抑制モチーフを同定した (3)。今後は、この系を用いてインフルエンザウイルスへの免疫応答における Siglec2/CD22 の役割を明らかにするとともに、Siglec2/CD22 の機能抑制によりインフルエンザウイルスへの感染抵抗性が増強するかを明らかにしていく。

### 2. Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明

BACE1 は、 $\alpha 2,6$  シアル酸転移酵素のプロセッシング酵素である (13) ことから、転移酵素の産物である CD22 リガンドエпитープ ( $\alpha 2,6$  シアロ糖鎖) の発現を調節することが期待された。事実、20 年度に培養細胞と動物実験モデルを用いて BACE1 が CD22 リガンドの発現調節を行っていることを明らかにした (11, 12)。培養細胞で観察された BACE1 依存性の CD22 リガンド発現の調節機構を *in vivo* でさらに詳細に明らかにする為に BACE1 ノックアウトマウスの作製を行った。当初は全身性ノックアウトマウスを作製したが、この系統は生まれてくるマウス個体数が少なく、繁殖力が悪い為に実験に使用できる個体数を得ることが困難であった。そこで、新たにコンディショナル BACE1 ノックアウトマウスを作製した。ゲノム構造上は予想した構造を持っていたが、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 を発現するマウスとの交配を行った。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。事実、神経特異的な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著しく低下していた

### 3. Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの機能解明

我々は、Siglec-2/CD22 による糖鎖リガンド認識が B 細胞においてどのように制御され、どのような役割をはたしているのかについて、研究を行ってきている。これまでに、*in vivo*

では遺伝子欠損マウス（8）の実験系を、*in vitro*では糖鎖の変化に対応したマイクロアレイ実験系（9）および細胞におけるレクチンリガンド（10）の研究を進展させてきた。CMP-Neu5Ac 水酸化酵素(Cmah)は Siglec-2 の高親和性のリガンドエピトープであるシアル酸分子種の N-グリコシルノイラミン酸(Neu5Gc)の生合成に関わる。Cmah 欠損マウスでは Neu5Gc の発現はみられず、B 細胞においては Siglec-2 の高親和性リガンドが消失していた。一方、Cmah 欠損マウスにおいては B 細胞活性化の亢進を示唆する表現型がみられた。このことから、B 細胞の活性化においては、Cmah の制御を介したネガティブフィードバック的な機構が働いていることが考えられた。

Cmah の活性化依存的な抑制の生理的意義を明らかにするため、活性化しても発現抑制のおこらないマウスモデルとして Cmah トランスジェニックマウスを作成した。現在までの解析の結果、実際に B 細胞において Cmah 及び、その産物である Neu5Gc を含む Siglec-2/CD22 糖鎖リガンドを発現する系統が複数得られた。これまで、Neu5Gc と Siglec-2/CD22 が機能的にどのように関わっているかに関しては不明であった。そこで、Cmah と Siglec-2/CD22 を共に欠損するダブルノックアウトマウスを作成し、その機能重複に関し明らかにすることを試みた。現在までの解析の結果、Siglec-2/CD22 欠損と Cmah 欠損で、B 細胞抗原受容体刺激時のカルシウム流入に関しては、個々の欠損とダブルノックアウトマウスで表現型が異なり、機能重複があることが明らかとなった。

#### 4. Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの反応様態の解明

Siglec2/CD22 がどのようなリガンドとの反応により特異的な機能を発揮するのかを明らかにするために、B リンパ球での FRET による細胞内カルシウムシグナル計測法を開発する（4）とともに、Siglec2/CD22 糖鎖リガンド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を交配し、すべての B 細胞が特定の抗原に反応する Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損マウスを樹立した。さらに、免疫グロブリントランスジェニックマウスまたは Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損免疫グロブリントランスジェニックマウスの骨髄細胞を放射線照射した正常マウスまたは Siglec2/CD22 糖鎖リガンド欠損マウスに移入し、血液細胞でのみ Siglec2/CD22 糖鎖リガンドを発現するマウスや血液細胞でのみ Siglec2/CD22 糖鎖リガンド発現を欠損するマウスを作成した。このマウスの解析を行った結果、トランスリガンドが B 細胞分化を制御する証拠が得られた。なお、外因性の糖鎖リガンドにより辺縁帯 B 細胞に影響があることも明らかにした（6）。

#### 5. 改変糖鎖リガンドによる Siglec2/CD22 の機能制御法の開発

$\alpha$ 2,6 シアル酸転移酵素欠損ミエローマ細胞を利用して、Siglec2/CD22 とその糖鎖リガンドの反応阻害を計測する系を樹立した。この系を利用して岐阜大学木曾教授の研究室と共同で約 40 の合成 Neu5Gc a2-6Gal 誘導体をスクリーニングし、Neu5Gc a2-6Gal よりも数百倍高い親和性で Siglec2/CD22 に結合する誘導体を同定した（5）。さらに、ヒト Siglec2/CD22 とマウス Siglec2/CD22 では高親和性で結合する誘導体が異なることを明らかにした。しかしながら、これらの化合物は、すでに Siglec2/CD22 と高親和性で結合することが報告されている化合物 BPA-Neu5Gc および BPC-Neu5Gc に比べて顕著に親和性が高い

訳ではなかった。そこで、さらに、化合物の設計と合成を行い、さらに10倍以上 Siglec2/CD22 に親和性の高い化合物を得ることができた。

#### 6. CD33 ファミリーSiglecs と CD72 の機能の解明

CD72 は Siglec2/CD22 と同様に B 細胞シグナルを負に制御するが、Siglec2/CD22 とは異なる C 型レクチン様ドメインを持つが、CD72 にはカルシウムイオン結合に関わる保存されたアミノ酸配列がなく、また、これまでレクチン活性を持つかは不明であった。我々はマウスミエローマ細胞あるいは大腸菌の系を用いて可溶性 CD72 タンパクを多量に産生することに成功した。さらに、この CD72 タンパクを用いてカラムを作成し、結合分子の解析を行ったところ、CD72 がオリゴマンノースに結合することが明らかとなり、さらに、この結合をピアコアを用いて確認することができた。これらの結果は CD72 がレクチン活性を持つことを明確に示すものである。

ヒトおよびマウス CD72 には多型があり、ヒト CD72 は SLE の発症を制御することが知られている。また、マウス CD72 の多型は C 型レクチンドメインに集積している。1 型糖尿病自然発症モデル NOD マウスは CD72c ハプロタイプを持つので、CD72b を持つ C57BL/6 マウスを NOD に繰り返しバッククロスすることにより NOD.CD72b コンジェニックマウスを樹立した。このマウスでは、ラ氏島炎や糖尿病の発症が顕著に亢進していた(7)。この結果は、CD72 が自己免疫反応を制御することにより 1 型糖尿病の発症を制御していることが明らかとなった。NOD マウスは 1 型糖尿病のモデルとして広く用いられているが、発症の頻度や程度は決して高くなく、しばしば薬剤により発症を増強させて用いられている。NOD.CD72b マウスは薬剤処理を行わなくても糖尿病の発症が亢進しているために、1 型糖尿病研究のより材料になると考えられる。また、我々の結果から、CD72 が 1 型糖尿病の治療薬開発のより標的になると期待される。なお、CD72 のコンジェニックマウス以外にも、CD72 の欠損マウスおよび、CD72 の ITIM に変異を導入したノックインマウスを樹立した。今後は、これらのマウスを用いて、液性免疫応答制御における CD72 の機能を解明する。さらに、B リンパ球アポトーシスに小胞体ストレスが関与し(1)、小胞体ストレスを介したヒト CD72 がアポトーシス制御に関わることを明らかにした。

我々は、シグレック 7 の ITIM モチーフは、SHP-1 ホスファターゼに対するリクルート能が非常に低いにもかかわらず、活性化に伴いある種の細胞機能の抑制をすることを見いだした。20 年度は、シグレック 7 が活性化されるとある種の細胞活性が抑制されることを見いだした。予備的な実験からこの抑制機能は ITIM に依存しておらず、新規のシグナル伝達系であることが示唆された。

### 3. 研究実施体制

#### (1)「免疫シグナル制御グループ」

① 研究分担グループ長： 鏑田武志(東京医科歯科大学 大学院疾患生命科学研究所 教授)

#### ② 研究項目

免疫応答における Siglec2/CD22 の機能解明

Siglec2/CD22 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 Siglec2/CD22 の機能制御法の開発

(2) 「糖鎖リガンド」グループ

① 研究分担グループ長： 小堤保則(京都大学 生命科学研究科 高次生命科学専攻 教授)

② 研究項目

Siglec2/CD22 の糖鎖リガンドの機能解明  
Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明  
CD33 ファミリーSiglecs の機能の解明

(3) 「リガンド代謝」グループ

① 研究分担グループ長 橋本 康弘(福島県立医科大学・医学部 教授)

② 研究項目

Siglec2/CD22 の糖鎖リガンド発現制御機構の解明  
CD33 ファミリーSiglecs の機能の解明

#### 4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

「免疫シグナル制御」グループ

1. 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.  
\* 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.
2. Siglec2/CD22 欠損 B 細胞では免疫応答の際に細胞分裂が亢進し、その結果抗体産生細胞等への分化が早期化するなど、記憶 B 細胞様の反応を示すことを明らかにした
3. 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.
4. Adachi, T. and Tsubata, T. (2008): FRET-based  $Ca^{2+}$  measurement in B lymphocyte by flow cytometry and confocal microscopy. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 367: 377-382.
5. 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.
6. 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.

7. 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<sup>b</sup> congenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 380: 193-197.

「糖鎖リガンド」グループ

8. Kondo Y, Tokuda N, Fan X, Yamashita T, Honke K, Takematsu H, Togayachi A, Ohta M, Kotzusumi 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.* (in press)
9. Tatano Y, Fujinawa R, Kozutsumi Y, Takahashi T, Tsuji D, Takeuchi N, Tsuta K, Takada G, Sakuraba H, Itoh K. (2008): Tropoelastin regulates chemokine expression in fibroblasts in Costello syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 372: 681- 7.
10. Yamamoto, H, Takematsu, H, and Kozutsumi, Y. DNA Microarray in Glycobiology, in *Experimental Glycoscience Glycobiology*, 2008, 447-450, Springer Japan

「リガンド代謝」グループ

11. Shinobu Kitazume, Kazuko Ogawa, Satoshi Futakawa, Yoshiaki Hagiwara, Hajime Takikawa, Michio Kato, Akinori Kasahara, Eiji Miyoshi, Naoyuki Taniguchi, Yasuhiro Hashimoto, “ Molecular insights into  $\beta$ -galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase secretion in vivo” , *Glycobiology*, in press
12. 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 beta-galactoside  $\alpha$ -2,6-sialyltransferase, a possible hepatic disease biomarker", *Analytica Chimica Acta*, 2009, 631,116-120
13. Shinobu Kitazume, Shou Takashima and Yasuhiro Hashimoto.” Processing of glycosyltransferases by Alzheimer’s  $\beta$ -secretase( BACE1)”, *Experimental Glycoscience*, 2008,Glycobiology, 192-194,

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 0 件 (CREST 研究期間累積件数 : 2 件)