

「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

高知大学教育研究部医療学系医学部門・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(脂質ラフト)に対する抗体の作製や膜マイクロドメイン指向性プローブによる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。

本家グループは、膜マイクロドメイン免疫法により、神経細胞突起先端の膜マイクロドメインに局在する脂質を認識する単クローン抗体を得たので、平成 21 年度までに抗原脂質の構造を決定する。また、精巣由来の膜マイクロドメインを免疫することにより、精子形成細胞と反応する単クローン抗体を得、これら抗体が認識するタンパク質抗原を数種類決定してきているが、さらに、新奇の膜分子に対する抗体を検索する。さらに、同グループで発見した Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を利用して生細胞の細胞膜上における分子クラスターを同定する方法を国際学術誌に発表した(PNAS 105: 7405-7409, 2008)。この方法の応用例として、同一の抗原に対する2種類の単クローン抗体を作用させたときに集積してくる分子群が異なることを見出した。これまで検出に細胞表面抗原に対する抗体アレイを用いてきたが、今後、質量分析装置を用いて網羅的に解析できるようにする。

宇高グループは、糖脂質マイクロドメインを場とする T 細胞の抗原認識機構を理解し、がんの免疫療法や、抗アレルギー療法の開発を目指し、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能の解明と脂質ラフト会合性百日咳菌を免疫賦活剤として利用した Th1 誘導型ペプチドワクチンの開発を達成した。これらの成果をもとに悪性腫瘍の免疫療法の臨床研究を進めており、従来のペプチド単独治療で2割程度であった腫瘍制御率を4割強に改善できた。脂質ラフトを抗原認識の場とするもうひとつの免疫反応として、NK 細胞がストレスを受けた細胞を排除する機構について、子宮内膜症に関連した遺伝子多型の偏りを調べている。今後、症例数を増やし、メカニズム解明したい。さらに、成熟 T 細胞の抗原認識における糖脂質マイクロドメインの役割を調べるため、東北薬科大の井ノ口仁一教授と共同で、SAT-1(GM3 合成酵素) KO、GalNAcT (GM2 合成酵素) KO マウスにおける T 細胞の機能の解析を始め、ヘルパー T 細胞、細胞傷害性 T 細胞に特異的な機能不全が見つかった。今後、その機構を解明し治療に繋げたい。

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が誘導可能

という膜マイクロドメイン(ラフト)免疫法の利点を生かして、ラフト免疫の抗腫瘍効果を検証してきた。昨年度は、ユニークな抗原性を示すヒト腎ガン由来細胞株 ACHN のラフト免疫は抗原非特異的な抗腫瘍効果を有し、被免疫マウスでは脾臓の樹状細胞や γ δ T 細胞が活性化されることを報告した。非特異的な細胞性免疫の関与が示唆され、自然免疫の亢進が考えられたので、今年度は、ラフト被免疫マウスの腹腔内細胞の活性化状態を FCM 法で解析したところ、ラフト投与 24 時間後に腹腔内マクロファージが活性化することがわかった。また、ラフト投与 24 時間後に血清中の L-6 及び IL-17 も増加しており、免疫応答が惹起されていることが示された。今後、腹腔内細胞の腫瘍細胞に対する傷害活性の有無を検討する。一方、抗-ACHN ラフト単クローン抗体 Raft.2 (抗-sialylGb5) の抗原解析の過程でマウス初期発生における Stage-Specific Embryonic Antigen-4 (SSEA-4) の重要性が示唆された。昨年より、汎用の期待される新規抗-SSEA-4 単クローン抗体 6E2 を用い、マウス着床前胚の膜マイクロドメインの動態解析をおこなってきた。今年度は、6E2 でパルス染色した8細胞期胚の SSEA-4 の変化を観察し、SSEA-4 は割球表面から界面へと移動することを明らかにした。さらに、6E2 存在下での培養は着床前胚の卵割の遅延を誘導し、SSEA-4 の強い継続した架橋は、着床前胚の正常な発生を阻害することを明らかにした。今後、初期発生における膜マイクロドメインの機能を解明したい。

2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

A 本家グループ

1) 神経細胞突起先端膜マイクロドメイン脂質に対する単クローン抗体の作製

本家らは、ラット脳の性分化に関わる分子として、テストステロンを投与した雌の視床下部前思索野領域で発現する Masculin を見出している。この Masculin 遺伝子を PC12 細胞に強制発現させると、神経様突起が伸長し、Masculin は突起先端の膜マイクロドメインに集積する。この状態の細胞から膜マイクロドメインを単離して免疫し、突起先端と反応する抗体#15 を得た。#15 が認識する抗原 Ag15 の発現は神経成長因子 NGF により誘導された。Ag5 は、ラット脳組織の神経細胞に存在し、マウス脳海馬の初代培養神経細胞にも存在していた。免疫組織化学において、Ag15 はメタノール処理で消失することから脂質様物質と推定された。パラホルムアルデヒド固定後メタノール処理すると、細胞体内部の Ag5 は消失したが、突起先端に局在する Ag5 は残存することから、突起先端の Ag5 は何らかの修飾を受けている可能性が高い。生化学的解析では、脳組織由来の Ag5 は、ラット、マウス、ウシ、ブタの全てに存在しており、Folch 分配下層に分画され、DEAE カラムクロマトで酸性画分に分画され、proteinase K 耐性、アルカリ処理耐性であった。脳組織由来の Ag5 は、TLC では sulfatide とほぼ同じ移動度を示したが、移動度の近い sulfatide、GD3 lactone、PC、PI、lysoPE のいずれでもなかった。今後、Ag15 抗原脂質の構造を決定すべく、sulfatide 欠損マウスの脳組織と NGF 処理した PC12 細胞を集めている。

2) 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の作製

マウス精巣から分画した膜マイクロドメイン画分(DRM)を、マウスに2回免疫して、DRM と反応する 192 クローンのハイブリドーマを得た。これら抗体をさらに、ウェスタンブロットティングで DRM タンパク質に対する反応性と免疫組織化学で精細管に対する染色性を調べた。これらスクリーニングで

の陽性クローンについて、抗原エピトープの決定を試みているが、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は無効なことが多い。精製できたものは、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、マスペクトルメトリーを用いて解析した。これまで、膜マイクロドメインを裏打ちする細胞骨格タンパク質やミトコンドリア酵素など予期されないものが同定されている(山下竜幸ら、BMB2008にて発表)。現在は、成獣マウス精巣と子マウス精巣あるいは CST KO 成獣マウス精巣でサイズが大きく異なる分子を認識する抗体の認識抗原を追っている。このほか、アクロソームを染める興味深い染色像を示す抗体を得ており、この抗体の抗原分子の同定も21年度中に行いたい。

3) EMARS 法の応用

同グループが発見した Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を利用して、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方法を開発し報告した¹⁾。この方法の応用例として、Bリンパ球の細胞表面マーカーである CD20 分子に対する2種類の単クローン抗体を作用させたとき、CD20 の周囲に集積してくる分子群が異なることを見出した。これが抗体間の作用の違いを説明できると推測している。これまで、EMARS 反応で標識される分子の検出に細胞表面抗原に対する抗体アレイを用いてきたが、次のステップとして、質量分析装置を用いて網羅的に解析できるようにしたいと考えている。このためには、内在性ペルオキシダーゼの影響を抑える必要があるので、いろいろなアフィニティーリガンドを試している。これまでに一つ良さそうな候補を見出したが、さらに検索を続ける。

4) その他

静岡県立大学の鈴木隆教授のグループとの共同研究で、硫酸化糖脂質の sulfatide がインフルエンザ A ウイルスの複製の制御に関わっていることを示した²⁾。

B 宇高グループ

1) 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能の解明

未熟胸腺細胞は、胸腺上皮細胞に提示される MHC class II 分子を認識すると、ヘルパー T 細胞(Th)に分化するが、未熟胸腺細胞がいかにして自らの T 細胞レセプター(TCR)が、認識しているのは、MHC class II 分子である、ということを知るのかは明らかになっていない。我々は、MHC class II 分子の膜貫通部に存在する Cys に palmitoyl 化が起こり、ラフト会合性に提示されることが、胸腺細胞の Th への分化に重要で、この Cys を置換すると、本来 Th へ分化するはずの胸腺細胞の多くが、細胞傷害性 T 細胞(CTL)に分化することを示した⁵⁾。

2) 脂質ラフト会合性百日咳菌を免疫賦活剤として利用した Th1 誘導型ペプチドワクチンの開発

我々は、我々が日本電気株式会社と共同で開発してきた、HLA 結合性ペプチド予想プログラムを活用して、HLA class I 分子結合性ペプチドを同定し、悪性腫瘍や難治性ウイルス感染症を制御するペプチド免疫療法の開発を進めている^{3)、6)}。悪性腫瘍に対しては、WT1 腫瘍抗原を標的として WT1 ペプチド、難治性ウイルス感染症では、C 型肝炎ウイルス(HCV)の全ゲノムを標的としたスクリーニングを行い、標的ペプチドを同定した。それらのペプチドを使って臨床研究を進めた

ところ、現状のペプチド免疫療法では、ペプチド単独投与では、ペプチド反応性の細胞傷害性 T 細胞(CTL)の数は増えても、それらの細胞傷害活性が乏しいことがわかった。

そこで、CTL を活性化する能力の高いTh1タイプのヘルパーT 細胞を活性化する免疫賦活剤の開発を進めていたところ、抗原提示細胞のラフトに結合して抗原提示される百日咳全菌体ワクチンに、Th1 誘導活性が高く、また、過去に使われていたワクチンであるために、人体への投与に関するハードルが低いことがわかった。この免疫方法では、第3者抗原である百日咳菌の蛋白質に対する Th1 が誘導されるため、ペプチドと混合して投与することにより、所属リンパ節において、百日咳特異的 Th1 がペプチド特異的 CTL の増殖や活性化を促す(Yano et al., 2007)。

この結果から、昨年度後半より、百日咳全菌体ワクチン(Wc)を免疫賦活剤としてペプチドに添加して免疫をする臨床研究を開始した。その結果、固形悪性腫瘍に対する免疫療法においては、WT1 ペプチドを徐放剤である Montanide に懸濁して投与する方法では、高知大症例においては、2割程度(4/19症例)に、RECIST 基準によりSD (stable disease; 腫瘍の増大が抑制された)がみられたのみであったが、百日咳全菌体ワクチンの添加により、4割強(8/18症例)がSDと判定される治療効果が得られた(論文準備中)。

C 藤本グループ

1) 膜マイクロドメイン免疫で誘導される免疫応答の解析

ヒト ACHN 細胞のラフトを免疫されたマウスは、移入された腫瘍の増殖に抗原非特異的な抵抗性を示す⁷⁾。被免疫マウスの自然免疫が賦活化されていると考えられ、腹腔内細胞の活性化を検討した。C57BL/6 マウス(n=3)に、ACHN ラフトのPBS 懸濁液を腹腔内投与し、24時間後、48時間後の腹腔内細胞を FITC 標識抗-B220、APC 標識抗-CD11b、PE 標識抗-CD11c または PE 標識抗-F4/80 で三重染色し、マクロファージ、B1 細胞、CD11b⁺/Gr-1⁺細胞集団の CD40、CD86 の発現の変化をフローサイトメトリーで解析した。また、 $\gamma\delta$ -T 細胞の細胞質内の IFN- γ 及び IL-17 を染色して発現の変化をフローサイトメトリーで解析した。B220⁻/CD11b⁺/F4/80⁺マクロファージ上には24時間後にはCD40が発現し、48時間後も発現は持続していた。CD86は24時間後に一過性に発現が増強した。腹腔内マクロファージは ACHN ラフト投与により活性化することが示された。B220⁺/CD11b⁺B1 細胞や B220⁻/CD11b⁺/Gr-1⁺細胞は24時間後に一過性の CD86 の発現亢進がみられた。B220⁻/CD11c⁺樹状細胞、 $\gamma\delta$ -T 細胞の活性化は確認されなかった。ラフト投与24時間後で倍増する B220⁻/CD11b⁺/Gr-1⁺細胞集団は未同定であるが、好中球、単球、未熟ミエロイド細胞のいずれかと考えられる。ラフト投与24時間後、48時間後のマウス血清内の IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-17、IFN- γ 、GM-CSF、TNF- α を ELISA 法により測定したところ、IL-6 及び IL-17 の産生が一過性に亢進していた。

ACHN ラフト腹腔内投与で腹腔内マクロファージは活性化することが示され、抗原非特異的抗腫瘍効果への関与が示唆された。

2) マウス着床前胚の膜マイクロドメイン解析

SSEA-4 を担う糖脂質 sialylGb5 は、マウス着床前胚の膜マイクロドメインの構成分子である⁸⁾。着床前胚における膜マイクロドメインの機能を抗-SSEA-4 単クローン抗体 6E2(マウス IgG3 κ)を

用いて解析してきた。6E2 はフローサイトメトリー、免疫組織染色、TLC 免疫染色いずれにも使用でき、Alexa などの蛍光標識も可能で、ES 細胞の品質管理などへの汎用が期待される。昨年度は、Alexa488 標識 6E2 で未固定のマウス着床前胚を染色すると割球界面の SSEA-4 が濃染されることを報告した。今年度は SSEA-4 の動態観察と、6E2 の初期発生に与える影響を詳細に検討した。

Alexa488 標識 6E2 でマウス8細胞期胚を15分間パルス染色し洗浄後培養を続け SSEA-4 の動態を観察したところ、割球全面に均一に分布していた SSEA-4 は10分経過後はまだ均一だが、30分後には界面への集積が始まり、90分ではほぼ完全に界面へと移行していた。さらに培養を続けると SSEA-4 は割球内部へと取り込まれて行った。SSEA-4 は活発に割球表面上を割球界面へと移動していることが示唆された。

15B2(マウス IgG3 κ コントロール抗体)や抗-E カドヘリン抗体存在下で2細胞期胚を培養しても胚は正常に発生したが、6E2 存在下では50 μ g/ml で卵割が遅延し始め、100 μ g/ml では卵割が停止し、発生は完全に阻害された。SSEA-4 の継続した強力な架橋は、着床前胚の正常な発生を阻害することが明らかとなった。SSEA-4 は単なる未分化表面マーカーではなく、初期発生に積極的に関与する機能分子である可能性が示唆された。

3. 研究実施体制

(1)「糖鎖機能解析法研究」グループ

①研究分担グループ長： 本家 孝一（高知大学教育研究部、医療学系医学部門 生化学講座 教授）

②研究項目

(ア)膜マイクロドメイン抗体の作製とエピトープの決定

(イ)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研究分担グループ長： 宇高 恵子（高知大学教育研究部 医療学系医学部門 免疫学講座 教授）

②研究項目

(ア)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

(イ)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

(ア)膜マイクロドメインに対する単クローン抗体の作製

(イ)膜マイクロドメインに対する免疫応答を利用した治療戦略の構築

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. Kotani N, Gu J, Isaji T, Udaka K, Taniguchi N, Honke K.: Biochemical visualization of cell surface molecular clustering in living cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105(21), 7405-7409, 2008
2. Takahashi T, Murakami K, Nagakura M, Kishita H, Watanabe S, Honke K, Ogura K, Tai T, Kawasaki K, Miyamoto D, Hidari KI, Guo CT, Suzuki Y, Suzuki T.: Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus. J. Virol. 82(12), 5940-5950, 2008
3. Sera T., Hiasa Y., Mashiba T., Tokumoto Y., Hirooka M., Konishi I., Matsuura B., Michitaka K., Udaka K. and Onji M.: Wilms' tumor 1 gene expression is increased in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis. Eur. J. Cancer 44(4), 600-608, 2008.
4. Kawashima M., Maeda N., Adachi Y., Takeuchi T., Yamamoto Y., Izumiya C., Hayashi K., Furihata M., Udaka K. and Fukaya T.: Human leukocyte antigen-G, a ligand for the natural killer receptor KIR2DL4, is expressed by eutopic endometrium only in the menstrual phase. Fertil. Steril. 2008 [Epub ahead of print]
5. Komaniwa S., Hayashi H., Kawamoto H., Sato S.B., Ikawa T., Katsura Y. and Udaka K.: Lipid-mediated presentation of MHC class II molecules guides thymocytes to the CD4 lineage. Eur. J. Immunol. 39,1-7, 2009.
6. Li Z., Oka Y., Tsuboi A., Fujiki F., Harada Y., Nakajima H., Masuda T., Fukuda Y., Kawakatsu M., Morimoto S., Katagiri T., Tatsumi N., Hosen N., Shirakata T., Nishida S., Kawakami Y., Udaka K., Kawase I., Oji Y., and Sugiyama H.: Identification of a WT1 protein-derived peptide, WT1₁₈₇ as an HLA-A*0206-restricted, WT1-specific CTL epitope. Microbiol. Immunol. (in press)
7. Katagiri YU, Nakajima H, Sato B, Miyagawa Y, Horiuchi Y, Okita H, Fujimoto J, Kiyokawa N. The detergent-insoluble microdomains, rafts, can be used as an effective immunogen. Glycoconj. J. 25(6), 495-501, 2008
8. Katagiri YU, Sato B, Miyado K, Akutsu H, Okita H, Umezawa A, Fujimoto J, Kiyokawa N. Functional significance of stage-specific embryonic antigens in the development of preimplantation embryos. Trends Glycosci. Glycotech. 20, 131-139, 2008

(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 : 1 件)