

新規抗糖鎖モノクローナル抗体を用いたリンパ球体内動態の解析

平川 城太郎, 川島 博人

1. はじめに

免疫系では数多くの免疫細胞が血液・リンパを介して生体内を循環し、外来抗原に対する監視を行っている。なかでも末梢血を循環するリンパ球が、二次リンパ組織へと遊走する現象はリンパ球ホーミングと呼ばれ、多段階の接着分子カスケードにより厳密に制御されている。そのため、これら接着分子カスケードを理解することは、リンパ球の体内動態と組織指向性を理解するために重要である。接着分子カスケードにおいて、硫酸化糖鎖である6-スルホシアリルルイスX（後述）は、リンパ球の浸潤を媒介する高内皮細静脈への初期接着を担うことから、リンパ球ホーミングに必須な糖鎖構造である。生体内に発現する糖鎖は微量かつ多様な結合形式を持つため、特定の構造を持つ糖鎖の発現を *in vivo* で解析することは難しい。そこで我々は、糖鎖合成酵素欠損マウスと抗糖鎖モノクローナル抗体を作製し、リンパ球ホーミングにおける糖鎖の機能解明を試みてきた。本稿では、新規に樹立したリンパ球ホーミング阻害作用を持つ抗糖鎖モノクローナル抗体を用いて行ったリンパ球ホーミングにおける糖鎖の機能解明に関する研究成果と、それら抗体のアレルギー疾患の抑制・治療への応用の可能性について紹介したい。

2. リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能

リンパ球ホーミングは効率よく免疫応答を誘導するために備わった生体防御機構である¹⁻³⁾。リンパ球が末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、パイエル板などの二次リンパ組織へと移行する際には、“サイコロ状”の特殊な形態の内皮細胞からなる高内皮細静脈（high endothelial venule：HEV）に接着した後に組織内へと浸潤する（脾臓も二次リンパ

組織ではあるが、ホーミングメカニズムが異なるため本稿では割愛する）。末梢リンパ節へのリンパ球ホーミングは以下の三つのステップで制御されている（図1⁴⁾。すなわち、ステップ1：リンパ球上に発現するL-セレクチンとHEV内腔に発現する硫酸化糖鎖6-スルホシアリルルイスXとの結合を介したリンパ球ローリング、ステップ2：HEV内腔のヘパラン硫酸に提示されたケモカインとケモカイン受容体との結合を介したシグナル伝達による接着分子インテグリンの活性化、ステップ3：活性化インテグリンと免疫グロブリンスーパーファミリーの接着分子ICAM-1（intercellular adhesion molecule-1）、VCAM-1（vascular cell adhesion molecule-1）との強固な接着とリンパ組織への浸潤であり、これら三つのステップを経てリンパ球はリンパ組織実質へと移行する。このうちステップ1では、HEV内腔に発現する硫酸化糖鎖6-スルホシアリルルイスXが、ステップ2ではヘパラン硫酸が重要な機能を担っている⁵⁻¹⁰⁾。

3. *N*-アセチルグルコサミン6位硫酸基転移酵素

6-スルホシアリルルイスXはガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン（GlcNAc）で構成される*N*-アセチルラクトサミン（LacNAc）構造にシアル酸、フコースおよび硫酸基が付加した糖鎖である（図2）。6-スルホシアリルルイスXの生合成には、*N*-アセチルグルコサミンの6位の硫酸化が必要であり、硫酸化を触媒する硫酸基転移酵素（ST）としてマウスでは*N*-アセチルグルコサミン-6-*O*-スルホトランスフェラーゼ（GlcNAc6ST）-1～GlcNAc6ST-4がクローニングされている。四つの硫酸基転移酵素のうち、末梢リンパ節のHEVにはGlcNAc6ST-1、GlcNAc6ST-2、GlcNAc6ST-4の三つの硫酸基転移酵素が発現し、そのうちGlcNAc6ST-1およびGlcNAc6ST-2がHEVに発現するシアリルルイスXの硫酸化を担っていることが、GlcNAc6ST-1とGlcNAc6ST-2を欠損するマウスを用いた解析により示されている^{9,10)}。GlcNAc6ST-2はHEV特異的に発現する硫酸基転移酵素としてこれまでに同定され、別名LSST（L-selectin ligand sulfotransferase）もしくはHEC-GlcNAc6ST（high endothelial cell GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase）とも呼ばれる¹⁰⁾。我々はこれまでにGlcNAc6ST-2の遺伝子座にCreリコンビナーゼをコードする遺伝子を挿入した細菌人工染色体（BAC）を用いて、新規トランスジェニック

千葉大学大学院薬学研究院免疫微生物学研究室（〒260-8675 千葉県千葉市中央区亥鼻1-8-1）

Functional analysis of sulfated glycans in lymphocyte homing using novel anti-carbohydrate monoclonal antibodies

Jotaro Hirakawa and Hiroto Kawashima (Laboratory of Microbiology and Immunology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan)
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900221

© 2018 公益社団法人日本生化学会

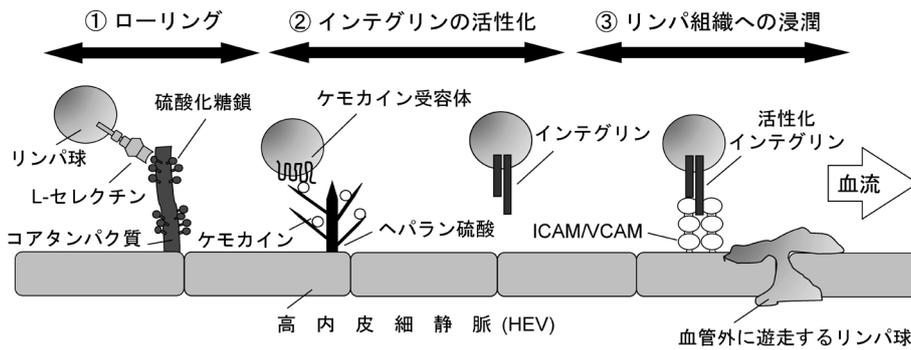


図1 リンパ球ホーミングカスケード

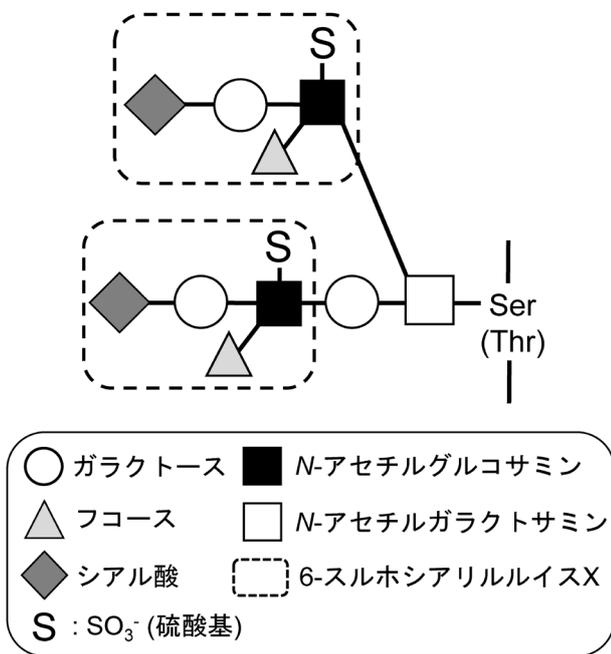


図2 L-セレクチンが認識する糖鎖構造
リンパ球上に発現するL-セレクチンはHEV内腔のコアタンパク質に付加している硫酸化糖鎖6-スルホシアリルルイスXを認識する。6-スルホシアリルルイスXはN型糖鎖およびO型糖鎖上に存在するが、図ではO型糖鎖のみを示している。

ク (Tg) マウスであるGlcNAc6ST-2-Cre Tgマウスを作製した。Rosa26レポーターマウスとの掛け合わせにより、GlcNAc6ST-2-Cre Tgマウスは、末梢リンパ節HEVにおいてCreリコンビナーゼを強発現することを確認した¹¹⁾。HEV内腔に発現するヘパラン硫酸の機能を解析するため、このGlcNAc6ST-2-Cre Tgマウスとヘパラン硫酸鎖伸長酵素EXT-1^{lox/lox}マウスとの交配を行い、HEV特異的ヘパラン硫酸欠損マウスを作製した⁸⁾。同変異マウスの詳細な解析の結果、HEV内腔に発現するヘパラン硫酸はケモカインをリンパ球に提示することで、リンパ球ホーミングを促進することが明らかとなった⁸⁾。

また我々は、GlcNAc6ST-1、GlcNAc6ST-2二重欠損 (DKO)

マウスを用いて、DKOマウスでは末梢リンパ節、腸間膜リンパ節、鼻咽頭関連リンパ組織 (nasal-associated lymphoid tissue : NALT) へのリンパ球ホーミングが著しく減少することを明らかにしてきた^{5, 12)}。NALTは鼻腔から侵入した抗原に対する免疫をつかさどる粘膜リンパ組織で、マウスではアレルギー性鼻炎の誘導部位となるリンパ組織である。DKOマウスを用いてNALTへのリンパ球ホーミングを解析すると、DKOマウスのNALTではリンパ球ホーミングが抑制され、NALTを構成するリンパ球数が減少した。DKOマウスに抗原を経鼻投与して解析を行ったところ、抗体のクラススイッチに関与するIL-4の発現誘導が抑制され、野生型マウスと比較して血清中の抗原特異的IgE量が低下した。また抗原投与の直後にみられるくしゃみ・鼻かき行動などのアレルギー症状が緩和されることが明らかとなった¹²⁾。一方で、免疫抑制性のT細胞として知られる制御性T細胞のNALTへのホーミングはDKOマウスでは抑制されないことを見いだした。さらなる解析の結果、制御性T細胞のNALTへのホーミングには硫酸化糖鎖だけでなく、P-セレクチン/PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) 相互作用およびCD44/ヒアルロン酸相互作用が関与することが明らかとなった¹²⁾。

4. 新規抗糖鎖モノクローナル抗体の作製

糖鎖は生体内に広く存在することから、一般的にその免疫原性は低く、糖鎖に対するモノクローナル抗体を作製することは非常に難しい。我々はこの問題を解決するために、硫酸基転移酵素DKOマウスに硫酸化糖鎖を発現するCHO-K1細胞を免疫することで、新たにヒトおよびマウスに反応できる抗糖鎖モノクローナル抗体S1とS2を樹立した (S1およびS2の頭文字のSは硫酸基を認識するクローンであるという意味を持つ)¹³⁾。両クローンはHEV内腔に発現する6-スルホシアリルルイスX (および6-スルホシアリルLacNAc) を特異的に認識する (図3A)。S1はO型糖鎖上の6-スルホシアリルルイスXへの結合性が強く、

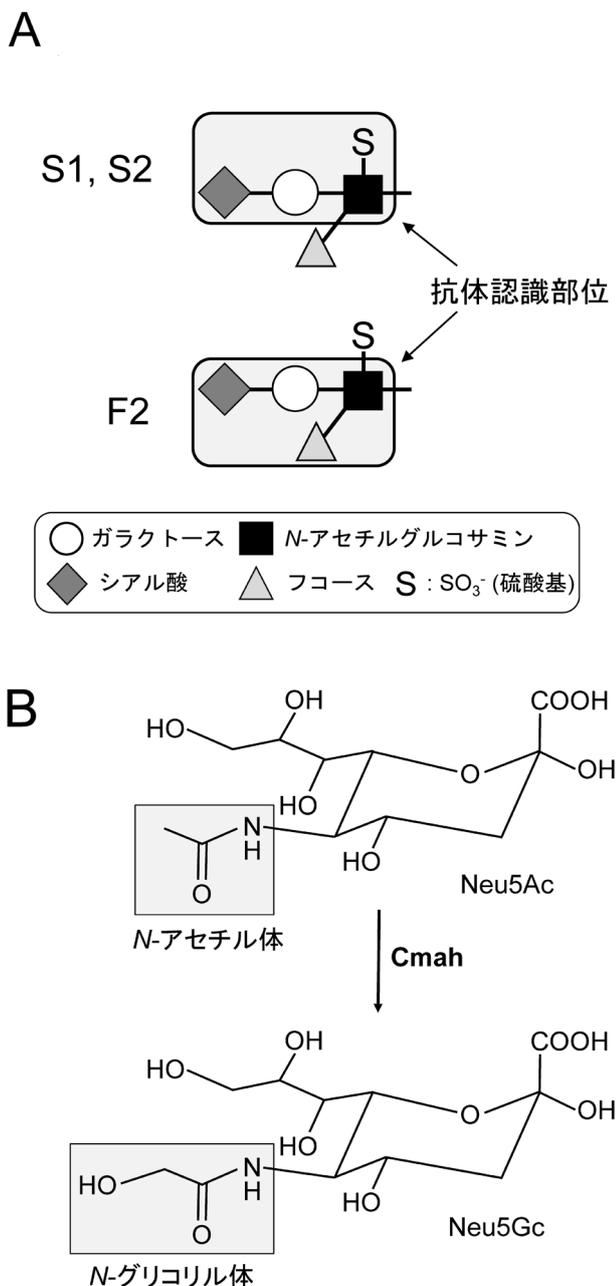


図3 モノクローナル抗体が認識する糖鎖構造
(A) S1, S2は6-スルホシアリルルイスXおよびフコース残基を欠く6-スルホシアリルLacNAcを認識する。F2はシアリルルイスXを認識する。(B) 糖鎖の非還元末端に付加するシアル酸には、アシル基の修飾が異なる分子種が存在し、マウスではN-アセチル体 (Neu5Ac) とN-グリコリル体 (Neu5Gc) が存在する。ヒトではN-アセチル体からN-グリコリル体に変換する水酸化酵素であるCMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (Cmah) が欠損しているため、N-アセチル体 (Neu5Ac) のみが存在する。

S2はS1に比べ認識する糖鎖構造が広く、N型およびO型糖鎖上の6-スルホシアリルルイスXを認識できる違いがある。そのため野生型マウスにS2を投与すると、上述の

DKOマウスでみられたようなリンパ球ホーミングのほぼ完全な抑制がみられるが、S1では部分的な抑制効果のみがみられる。さらに接触性皮膚炎モデルマウスにS2を投与すると、マウスの耳介腫脹が有意に抑制された¹³⁾。6-スルホシアリルルイスXを構成するシアル酸は、ヒトとマウスではアシル基の修飾が異なることが知られている。マウスでは、シアル酸はN-アセチル体 (Neu5Ac) およびN-グリコリル体 (Neu5Gc) として存在するが、ヒトではN-アセチル体からN-グリコリル体へ変換する水酸化酵素であるCMP-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (Cmah) が欠損するため、シアル酸はN-アセチル体 (Neu5Ac) として存在する (図3B)。そのためげっ歯類をヒト型糖鎖で免疫して作製された抗糖鎖モノクローナル抗体は、しばしばN-アセチル体のシアル酸を選択的に認識し、マウスを用いた研究に利用できないものが多い。この問題を解決するために我々は、一過性にCmahを発現させたCHO-K1細胞を免疫原として用いた。数回免疫後に脾細胞を調製し、ポリエチレングリコール (PEG) 法を用いて細胞融合を行った。抗体のスクリーニングには、野生型およびDKOマウスの末梢リンパ節を用いた免疫組織染色を使用した。スクリーニングとクローニングを重ねた結果、マウスIgMモノクローナル抗体である上述のS1およびS2の樹立に成功した。S1およびS2は疾患モデルマウスを用いた解析だけでなく、ヒト潰瘍性大腸炎や慢性胃炎で誘導されるHEVを検出できるため、ヒトを対象とした臨床研究にも利用可能な、汎用性の高い抗糖鎖モノクローナル抗体である¹³⁾。

5. 抗糖鎖モノクローナル抗体を用いたアレルギー疾患の抑制・治療への応用に向けて

上述のように二次リンパ組織である末梢リンパ節や鼻咽頭関連リンパ組織へのリンパ球ホーミングには硫酸化糖鎖が必須であることから、硫酸化糖鎖を欠損したマウスでは著しくリンパ球ホーミングが抑制される。すなわち、リンパ球ホーミングを阻害する抗糖鎖モノクローナル抗体を用いることで、硫酸基転移酵素欠損マウスでみられたような免疫抑制が可能となる。これまでに接触性皮膚炎ではS2による抑制効果が示されているが、さらにアレルギー性鼻炎等のアレルギー疾患をターゲットとした治療が可能であると考えられる。実際に、S2を野生型マウスに投与するとDKOマウスでみられたようなリンパ球ホーミングの抑制がみられ、抗原特異的なIgE産生が低下するとともに、くしゃみなどの鼻炎症状が緩和されることがわかってきた (未発表データ)。

我々はさらに、S1およびS2を作製した際と同様な手法を用いて、フコース転移酵素欠損マウスの免疫を行い、新たにシアリルルイスXに対するモノクローナル抗体である

F2を樹立した¹⁴⁾(図3A)。F2はヒトおよびマウスのシアリルルイスXを認識するマウスIgG₁抗体で、リンパ球ホーミングを強く抑制する。シアリルルイスXはHEV内腔だけでなく、白血球上にも発現することから、F2は気管支喘息の治療等に利用できるのではないかと考えられる。

6. おわりに

糖鎖は生体内で多様な機能を担っていることから、糖鎖の機能を明らかにすることは重要な研究課題であるが、微量の糖鎖を高感度に検出し、かつ、その機能を解析することはとても難しい。我々は、免疫系における糖鎖の機能に着目し、生体防御機構であるリンパ球ホーミングにはHEV内腔に発現する硫酸化糖鎖が必須の役割を果たすことを、糖鎖合成酵素欠損マウスおよび抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた研究により明らかにしてきた。抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた応用研究の一例として、S2を用いてセルソーティングしたHEVのトランスクリプトーム解析から、特殊な血管であるHEVの機能も徐々にわかってきた¹⁵⁾。新たな応用として、抗糖鎖モノクローナル抗体を治療抗体として投与し、リンパ球ホーミングに関与する糖鎖の機能を阻害することで、接触性皮膚炎だけでなくアレルギー性鼻炎、気管支喘息などのアレルギー疾患の新しい治療法の開発に道が開かれることが期待される。

文 献

1) von Andrian, U.H. & Mempel, T.R. (2003) *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 867-878.

- 2) Rosen, S.D. (2004) *Annu. Rev. Immunol.*, **22**, 129-156.
- 3) Kawashima, H. (2006) *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 2343-2349.
- 4) Springer, T.A. (1994) *Cell*, **76**, 301-314.
- 5) Kawashima, H., Petryniak, B., Hiraoka, N., Mitoma, J., Huckaby, V., Nakayama, J., Uchimura, K., Kadomatsu, K., Muramatsu, T., Lowe, J.B., & Fukuda, M. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1096-1104.
- 6) Uchimura, K., Gauguet, J.M., Singer, M.S., Tsay, D., Kannagi, R., Muramatsu, T., von Andrian, U.H., & Rosen, S.D. (2005) *Nat. Immunol.*, **6**, 1105-1113.
- 7) Mitoma, J., Bao, X., Petryniak, B., Schaerli, P., Gauguet, J.M., Yu, S.Y., Kawashima, H., Saito, H., Ohtsubo, K., Marth, J.D., Khoo, K.H., von Andrian, U.H., Lowe, J.B., & Fukuda, M. (2007) *Nat. Immunol.*, **8**, 409-418.
- 8) Tsuboi, K., Hirakawa, J., Seki, E., Imai, Y., Yamaguchi, Y., Fukuda, M., & Kawashima, H. (2013) *J. Immunol.*, **191**, 448-455.
- 9) Uchimura, K., Kadomatsu, K., El-Fasakhany, F.M., Singer, M.S., Izawa, M., Kannagi, R., Takeda, N., Rosen, S.D., & Muramatsu, T. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 35001-35008.
- 10) Hiraoka, N., Kawashima, H., Petryniak, B., Nakayama, J., Mitoma, J., Marth, J.D., Lowe, J.B., & Fukuda, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 3058-3067.
- 11) Kawashima, H., Hirakawa, J., Tobisawa, Y., Fukuda, M., & Saga, Y. (2009) *J. Immunol.*, **182**, 5461-5468.
- 12) Ohmichi, Y., Hirakawa, J., Imai, Y., Fukuda, M., & Kawashima, H. (2011) *J. Exp. Med.*, **208**, 1015-1025.
- 13) Hirakawa, J., Tsuboi, K., Sato, K., Kobayashi, M., Watanabe, S., Takakura, A., Imai, Y., Ito, Y., Fukuda, M., & Kawashima, H. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 40864-40878.
- 14) Matsumura, R., Hirakawa, J., Sato, K., Ikeda, T., Nagai, M., Fukuda, M., Imai, Y., & Kawashima, H. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 15313-15326.
- 15) Lee, M., Kiefel, H., LaJevic, M.D., Macauley, M.S., Kawashima, H., O'Hara, E., Pan, J., Paulson, J.C., & Butcher, E.C. (2014) *Nat. Immunol.*, **15**, 982-995.

著者寸描

●平川 城太郎 (ひらかわ じょうたろう)



千葉大学大学院薬学研究院免疫微生物学研究室助教。博士(薬学)。

■略歴 2006年静岡県立大学薬学部卒業、10年日本学術振興会特別研究員、11年静岡県立大学大学院薬学研究所博士課程修了、同年4月より同大学薬学部助教、14年星薬科大学薬学部助教、16年より現職。

■研究テーマと抱負 免疫に関与する糖鎖に着目した研究を行っている。糖転移酵素欠損マウス、抗糖鎖モノクローナル抗体の作製を通して創薬につながるよう研究を進展させ社会に貢献したい。

■趣味 登山、スキー、ゴルフ。

●川島 博人 (かわしま ひろと)



千葉大学大学院薬学研究院免疫微生物学研究室教授。博士(薬学)。

■略歴 1988年東京大学薬学部卒業、93年同大学院薬学系研究科博士課程修了、同年東京都臨床医学総合研究所研究員、94年大阪大学大学院医学系研究科助手、2001年米国The Burnham Institute研究員、05年静岡県立大学薬学部准教授、14年星薬科大学薬学部教授、15年より現職。

■研究テーマと抱負 リンパ球ホーミングにおける糖鎖の機能解明。リンパ球ホーミングを阻害する抗糖鎖抗体を創薬につなげたい。

■ウェブサイト <http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/index.html>