

令和 2 年 11 月 19 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15235

研究課題名（和文）「異種自己抗原」に対する免疫応答を惹起したマウスモデルの構築

研究課題名（英文）Model mouse for human specific xeno-autoantigen inflammation

研究代表者

竹松 弘 (Takematsu, Hiromu)

京都大学・医学研究科・特定教授

研究者番号：80324680

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：シアル酸は細胞の一番外側を占める糖であるが、このシアル酸の分子種がヒトと動物で異なる。このため、ヒトはN-グリコリルノイラミン酸という動物型のシアル酸に対して、異種抗原として免疫応答する。ところが、ヒトはN-グリコリルノイラミン酸があると、これを自己抗原として発現する。そこで、ヒトでは異種自己抗原免疫応答をおこすが、本研究ではこの慢性免疫状態をマウスモデルで達成するための基盤となる知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、未だ、謎の多い、ほぼヒトでしかおこらない異種自己抗原応答状態をマウスで再現するために基盤的な結果を得た。現在まで、様々なマウスを使った実験系が、ヒトの病気との関連で解析されている。今回つくったマウスは、ヒト疾患を念頭に置いてマウスモデルを使用する際には、幅広く標準的背景となるべき状態であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Sialic acid occupies outmost surface of cells, which would be direct access to the extracellular space to the cell. Human lacks N-glycolylneuraminic acid, a molecular species of sialic acid. Although humans are not able to make N-glycolylneuraminic acid, they could utilize it when supplied. Thus N-glycolylneuraminic acid could cause a autoimmunity. Here, fundamental experiments are carried out to develop human model of this auto antigen immunity in mice.

研究分野：生化学

キーワード：シアル酸 自己抗原免疫応答 異種抗原 ヒト 動物 慢性炎症 病態モデル

1. 研究開始当初の背景

慢性免疫状態が様々な疾患の改悪因子であることが次々に明らかにされ、医学的にも重視されている。該当疾患には、自己免疫疾患のみならず、動脈硬化、ガンなども含まれる (Hansson, *N Eng J Med*, 352 (2005))。炎症は免疫系の活性化が起因であるが、慢性炎症を引き起こす抗原にはバリエーションが存在する。申請研究ではヒトで自己免疫応答状態を引き起こす抗原のうち、「異種自己抗原」であるシアル酸分子種の N-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc) を含む糖鎖抗原について注目した。

シアル酸は細胞の産生する糖鎖末端を占める酸性糖であり、これには様々な分子種が存在する。Neu5Gc はシアル酸の一種であり、別の分子種の N-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) からモノオキシゲナーゼ反応を経て生合成されるため、Neu5Ac と Neu5Gc の違いは C5 位における酸素原子ひとつである。ヒトは約 2-300 万年前に Neu5Gc を生合成する CMP-Neu5Ac 水酸化酵素 (CMAH) 遺伝子欠損を起こしており (Chou HH, et al. *PNAS* 95:11751- (1998))、CMAH ノックアウトマウスと同様、Neu5Gc を生合成することが出来ない (Naito Y, et al, *Mol Cell Biol* 27:3008- (2007))。一方、ヒト以外の脊椎動物では Neu5Gc は発現しており、Neu5Gc はヒトにとっては異種性の抗原である。

ヒトのシアル酸の代謝経路の酵素は異種性の Neu5Gc を利用できる。このため、ヒトが Neu5Gc を食餌より取り込むと、最終的に糖鎖末端のシアル酸として発現する。つまり、Neu5Gc は自己抗原にもなり得る。すなわち、Neu5Gc はヒトでは「異種自己抗原」と称すべき稀な抗原であり、これに対する免疫応答は、ヒトの遺伝学的な背景、生化学的なシアル酸代謝酵素の性質および、食餌などを含むヒトを取り巻く環境要因がもたらすヒトに特異的な現象であると考えられる。これが、上述の慢性炎症の原因であるとも考えられ、その状態をマウスで誘導する事が出来れば、マウスをヒト病態モデルにも使用できる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

マウスとヒトのこの生化学的な差異をもたらす遺伝子の違いに着目し、マウスを真のヒトモデルとして改変する研究は容易ではない。ここで難しい問題となるのが、ヒトでは長年かけて Neu5Gc を食餌から取り込むことで、Neu5Gc を異種自己抗原発現するが、一方で、マウスは短命であり、Neu5Gc を短期的に効率よく取り込ませる必要があることである。このため、本研究では、具体的な研究目的として、Neu5Gc を効率よく発現させるための手段の開発をあげた。

また、自己抗原として Neu5Gc が発現するだけでは問題にならず、さらに Neu5Gc

に対する抗体が存在することが、慢性免疫状態を達成するために必要であるが、これを達成する事も目標とした。具体的には、マウスに免疫するための免疫源の検討と、マウスモノクローナル抗体の検討を試みた。これら両者を組み合わせることで、有効なヒトの病態モデルになることが考えられるが、以下の2点が、そのために重要なマイルストーンとなると考えられた。

3. 研究の方法

(A) Neu5Gc 発現の誘導について

1) 化合物による Cmah 反応非依存的な Neu5Gc 発現

Cmah は CMP 化された Neu5Ac を Neu5Gc へと変換する酵素である。そこで、研究では、Cmah 反応をバイパスすることで、Neu5Gc を発現させる方法を検証した。化合物としては、N-グリコリルマンノサミンを使用した。通常シアル酸生合成経路では、N-アセチルマンノサミンが N-アセチル基はそのまま、N-アセチルノイラミン酸へと生合成される。そこで、N-グリコリルマンノサミンを使用してシアル酸へと変換させる経路に関して、Cmah 欠損マウスに静脈投与して、Neu5Gc への変換を検討した。

2) シアル酸トランスポーター Sialin の解析

シアル酸は、通常、細胞が取り込むためのトランスポーターを細胞表面には発現しておらず、細胞外からの取り込みは多くない。一方で、通常、リソゾーム膜上に存在し、リソゾームから細胞質へとシアル酸を放出するトランスポーターとして、Sialin が知られている。この Sialin は母乳からシアル酸を効率よく取り込む新生時に腸管の上皮細胞表面に発現するなど、状況に応じて、シアル酸取り込みトランスポーターとして機能する可能性が示唆されている。そこで、シアル酸を取り込ませるための検討として、Sialin の細胞表面発現を変化させる研究を行った。

(B) 抗 Neu5Gc 免疫応答の誘導について

1) Neu5Gc 含有免疫源での免疫

Neu5Gc は Cmah 欠損マウスにとっては非自己抗原である。そこで、Cmah 欠損マウスで Neu5Gc 抗体を誘導させるための抗原を検討した。具体的には、Neu5Gc しか違わない、野生型マウスの血清、赤血球および生物種が変わる CHO 細胞に Cmah 遺伝子を強制発現させ、Neu5Gc の細胞表面量を強化した CHO-Cmah を免疫源として、血清中の抗 Neu5Gc 活性を検証した。

2) Neu5Gc 抗体のエピトープ解析

共同研究者の樹立した、抗 Neu5Gc 単クローン抗体について、そのエピトープの検証を行った。

4. 研究成果

(A) Neu5Gc 発現の誘導について

ヒト培養細胞での検討から、確かに、培地中に Neu5Gc を添加しても、これの取り込みは多くなかった。そこで、N-グリコリルマンノサミンを使用すると、効率よく Neu5Gc 発現細胞を作成することが出来た。この際には、細胞膜通過を容易にするために、この化合物を過アセチル化したものを使用した。この取り込みは、24 時間程度で十分見られることから、非常に早い取り込みであることが考えられた。

この HeLa 細胞にシアル酸トランスポーター Sialin の遺伝子を導入して、その細胞内発現部位を検討すると、リソゾームらしい、細胞内小胞への局在が見られた。Sialin のリソゾーム局在化には、Dileucine モチーフが関わりとされており、このモチーフをアラニン変異した Sialin を発現させると、細胞表面へとその局在が変化した。変異体 Sialin 発現 HeLa 細胞では、培地中に Neu5Gc があると、これが協力に取り込まれることが分かった。すなわち、Sialin の局在を人為的に変化させることで、シアル酸取り込みトランスポーターへと変化させることが出来ることが明らかになった。現在は、この局在を Dileucine ペプチド性の化合物で変化させることを検討しており、条件によっては、一部、細胞表面に送ることが可能となった。しかしながらこの研究は、まだ検討が必要であると考えられる。

これらの研究結果を受け、Cmah 欠損マウスに Neu5Gc を投与することを考えたが、現在までの所、過アセチル化 N グリコリルマンノサミンが一番効率よく、血管内皮細胞に Neu5Gc 発現を誘導させることが明らかになった。

(B) 抗 Neu5Gc 免疫応答の誘導について

Cmah マウスにとって、Neu5Gc は非自己抗原であり、これに対する抗体を誘導する事が出来ると考えられる。そこで、様々な免疫源を使用して、抗 Neu5Gc 抗体産生を検討した。Neu5Gc は非自己抗原でありながら、これを可溶性タンパク質抗原として免疫しても強い抗体産生はおこらなかった。また、Neu5Gc だけが非自己である細胞として、野生型マウスの赤血球細胞を免疫源に用いても、抗体誘導能は高くなかった。このため、ペプチド部分にも少し違いのあるハムスターの細胞を使用することにした。CHO 細胞に Cmah 遺伝子を導入して、Neu5Gc 強発現とした細胞を免疫源とすると、非常に高親和性の抗 Neu5Gc 抗体が誘導できた。追加免疫に関しては、野生型マウス赤血球細胞でも効果を示したため、免疫のタイミングにおいて、異なる抗原を使用することが、より Neu5Gc に特異的な抗体を誘導するには有効であると考えられる。また、現在までに取得されている、単クローン抗体に対して、さらなるエピトープ解析を

行ったが、得られたものは、2 つが alpha2-3 結合した Neu5Gc と一つは alpha2-8 結合した Neu5Gc との結合特異性を示すことが明らかになった。これら異なる抗体を(A)で自己抗原として、動脈内皮細胞へと発現誘導したマウス組織を染色すると、alpha2-8 結合に特異性を示す抗体がより強い染色像を示した。つまり、この抗体を投与することで、当初の目的である慢性の血管炎様の病態を誘導できる事が考えられるため、さらに研究を進展させていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Tomioka M, Shimobayashi M, Kitabatake M, Ohno M, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H. Ribosomal protein uS7/Rps5 serine-223 in protein kinase-mediated phosphorylation and ribosomal small subunit maturation. *Sci Rep*. Jan 19;8(1):1244. (2018) doi: 10.1038/s41598-018-19652-z.
2. Alborzian Deh Sheikh A, Akatsu C, Imamura A, Abdu-Allah HHM, Takematsu H, Ando H, Ishida H, Tsubata T. Proximity labeling of cis-ligands of CD22/Siglec-2 reveals stepwise 2,6 sialic acid-dependent and -independent interactions. *Biochem Biophys Res Commun*. Jan 1;495(1):854-859. (2018) doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.086. Epub 2017 Nov 14.
3. Umekawa M, Ujihara M, Nakai D, Takematsu H, Wakayama M. Ecm33 protein is a novel factor involved in efficient glucose uptake for nutrition-responsive TORC1 signaling in yeast *FEBS Lett* Nov;591(22):3721-3729 (2017) DOI: 10.1002/1873-3468.12882. Selected as an Editor's choice article.
4. Takagi H, Nishibori Y, Katayama K, Katada T, Takahashi S, Kiuchi Z, Takahashi SI, Kamei H, Kawakami H, Akimoto Y, Kudo A, Asanuma K, Takematsu H, Yan K. USP40 gene knockdown disrupts glomerular permeability in zebrafish. *Am J Physiol Renal Physiol*. Apr 1;312(4):F702-F715. (2017) doi: 10.1152/ajprenal.00197.2016.
5. Naito-Matsui Y, Davies LR, Takematsu H, Chou HH, Tangvoranuntakul P, Carlin AF, Verhagen A, Heyser CJ, Yoo SW, Choudhury B, Paton JC, Paton AW, Varki NM, Schnaar

RL, Varki A.
Physiological Exploration of the Long-term Evolutionary Selection Against Expression of N-glycolylneuraminic Acid in the Brain.

J Biol Chem. Feb 17;292(7):2557-2570. (2017) doi: 10.1074/jbc.M116.768531. Epub 2017 Jan 3.

Selected as a JBC Editor's "Recommended read" article.

6. Watanabe H, Okahara K, Naito-Matsui Y, Abe M, Go S, Inokuchi J, Okazaki T, Kobayashi T, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H.

Psychosine-triggered endomitosis is modulated by membrane sphingolipids through regulation of phosphoinositide 4,5 biphosphate production at the cleavage furrow.

Mol Biol Cell. 27(13):2037-50. (2016) doi: 10.1091/mbc.E15-08-0555.

7. Umekawa M, Ujihara M, Makishima K, Yamamoto S, Takematsu H, Wakayama M.

The signaling pathways underlying starvation-induced upregulation of -mannosidase Ams1 in *Saccharomyces cerevisiae*.

Biochim Biophys Acta. 1860(6):1192-1201. (2016) doi: 10.1016/j.bbagen.2016.02.018.

[学会発表](計 14 件)

1. IGBMC seminar (Invited speaker)

Takematsu H

The role of unusual glycolipid on the development of a genetic demyelinating disorder

2017.9.20, Meeting room 1005, IGBMC Univ Strasbourg, Strasbourg, France

2. 2017 Sphingolipid club meeting XII (Oral)

Watanabe H, Itani Y, Kobayashi T. Oka S. Takematsu H

Induction of "endomitosis" by psychosine is controlled by membrane glycosphingolipids and cluster of sphingomyelin

2017.9.7, Torre Artale Residence Hotel, Trabia, Italy

3. 2017 FASEB symposium on Lysophospholipid and related mediators (poster)

Watanabe H, Itani Y, Kobayashi T. Oka S. Takematsu H

Psychosine-mediated "endomitosis" induction is controlled by membrane glycosphingolipid and sphingomyelin

cluster

2017. 8. 21, Marriott Hotel, New Orleans, USA

4. 2016 International Carbohydrate Symposium (Oral)

Kano Y, Fujinawa R, Kitagawa H, Okuno Y, Kannagi R, Oka S and Takematsu H

Identification of Modifier Gene That Modulate Cell Surface P-selectin Ligand Expression

2016. 7. 18, Marriott Hotel, New Orleans, USA

5. 2016 Korea-Japan Bioactive Lipid Joint Symposium (Invited Speaker)

Takematsu H

Psychosine-triggered endomitosis to produce multiploid cells

2016. 5. 12 Bereve Hotel, Jeju, Korea

6. Glycoscience Japan-The Netherlands Joint Seminar (Invited Speaker)

Takematsu H

Dynamic regulation of Siglec-ligands on activated lymphocytes

2016. 4. 20 Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands

7. 3rd International Symposium on

Glyco-Neuroscience (Invited Speaker)

Takematsu H

Membrane glycosphingolipids modulate psychosine-triggered multiploid cell formation

2016. 1. 15 Awaji Yumebutai, Hyogo

8. 第19回関西グライコサイエンスフォーラム(招待講演)

竹松弘

リゾ型糖脂質が誘導するエンドマイトーシス

2018.5.19 大阪市立大学・大阪

9. 糖鎖免疫 Glyco-Immunology2018(口頭)

竹松弘

P-selectin リガンド糖鎖発現を負に制御する ppGalNAc 転移酵素

2018.2.19 東京医科歯科大学・東京

10. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第90回日本生化学大会)(口頭・ポスター)

糸瀬邦之 山銅ゆかり 谷元洋 岡昌吾 竹松弘

スフィンゴ脂質を介した熱ストレス細胞での転写制御メカニズム

2017.12.7 ポートアイランド・神戸

11. 第12回スフィンゴテラピィ研究会(口頭)

富岡真 下林貢 小堤保則 岡昌吾 竹松弘

スフィンゴ脂質シグナル伝達キナーゼ YPK1 はリボソーム小サブユニットをリン酸化する

2017.7.15 能登ロイヤルホテル・石川県

12. 糖鎖免疫 Glyco-Immunology2017 (口頭)

竹松弘

胚中心 B 細胞による糖鎖変化の意義

2017.1.25 東京医科歯科大学・東京

13. 第 89 回日本生化学大会 (口頭・ポスター)

渡邊寛, 小林俊秀, 岡昌吾, 竹松弘

リゾスフィンゴ糖脂質サイコシンは、分裂溝における PIP₂ の産生を抑制することでエンドサイトーシスを誘導する

2016.6.26 東北大学・仙台市

14. 生化学会近畿支部会 (口頭)

渡邊寛, 小林俊秀, 岡昌吾, 竹松弘

リゾスフィンゴ糖脂質サイコシンは、分裂溝における PIP₂ の産生を抑制することでエンドサイトーシスを誘導する

2016.5.15 神戸薬科大学・神戸市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://oka-lab.hs.med.kyoto-u.ac.jp/>

その他の本研究に関わる活動として、一般社会に対する研究の紹介を兼ねて、テレビ番組への取材を受け、番組中では一般的に食される食材中のシアル酸の定量解析を行い、その結果を紹介した。ただし、当該番組での「シアル酸が免疫細胞のアンテナとして働き、食材でシアル酸を摂取することで、アンテナ機能を強化する」と言った説については、必ず

しも合意しているわけではない。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹松 弘 (たけまつ ひろむ)

京都大学 医学研究科 特定教授

研究者番号: 80324680

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 海外研究協力者

Prof. Roger Laine

(Louisiana State University)