

令和元年6月13日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17695

研究課題名(和文) CD72によるDAMP認識におけるヘパラン硫酸/ヘパリンの結合性の役割の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of heparin/heparan sulfate on regulation of B cell inhibitory receptor CD72

研究代表者

赤津 ちづる (AKATSU, Chizuru)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60735984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CD72は主にB細胞に発現する抑制性の膜型レクチンであり、代表的な自己免疫疾患である全身性エリテマトーデス(SLE)の発症に重要な自己抗原Sm/RNPを認識しSm/RNPに対するB細胞応答を抑制することでSLEの発症を抑制している。本研究では、CD72がSm/RNPの他に種々の硫酸化糖鎖に結合し、硫酸化糖鎖への自己抗体産生を抑制することを示し、また、硫酸化糖鎖がCD72の細胞内移行を制御する可能性が示唆された。さらに、Sm/RNP以外にも種々の自己の核抗原を認識することを示した。したがってCD72は硫酸化糖鎖を認識することで、B細胞の抑制性機能を制御している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CD72はB細胞上に発現する抑制性の分子であり、日本での患者数が6-10万人と比較的有病率の高い自己免疫疾患であるSLEの発症を抑制する分子である。本研究によりCD72が硫酸化糖鎖を認識し、硫酸化糖鎖による機能制御を受けることが示唆されたことで、SLEの新たな治療法の開発に向けてCD72の機能を人為的に制御するための新たなターゲットが示された。

研究成果の概要(英文)：CD72 is an inhibitory receptor mainly expressed in B cells and contains C-type lectin-like domain (CTLD) in its extracellular region. CD72 recognizes Sm/RNP, an SLE-related self antigen, through its CTLD and negatively regulates B cell response to Sm/RNP and inhibits SLE development. In this study, we revealed that CD72 recognizes various sulfated glycans besides Sm/RNP, and inhibits antibody production to the glycans. Furthermore, endocytosis of CD72 was regulated by the glycan ligands. These results suggested that inhibitory function of CD72 is regulated by its sulfated glycan ligands in B cells.

研究分野：糖鎖生物学、免疫学

キーワード：免疫学 B細胞 自己免疫 レクチン CD72 硫酸化糖鎖

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

CD72 は主に B リンパ球 (B 細胞) に発現し、細胞内に有する抑制性モチーフ ITIM を介して B 細胞の細胞応答を負に制御する抑制性分子である。CD72 欠損マウスは、全身性エリテマトーデス (SLE) 様の自己免疫疾患を自然発症することが知られていたが、申請者らは、CD72 が細胞外の C 型レクチン様領域 (CTLD) を介して SLE 発症に重要な RNA 関連自己抗原 Sm/RNP を認識し、Sm/RNP に対する B 細胞の自己免疫応答を抑制することで SLE の発症を抑制するという機構を明らかにした (Akatsu et al, J Exp Med, 2016)。一方、CD72 の CTLD を含む細胞外領域が糖鎖と結合するレクチン活性を有するかは不明であったため、CTLD 領域の組換えタンパク質を作製し、英国 Imperial College London の Feizi 博士らとの共同研究で糖鎖マイクロアレイを行ったところ、CD72 の CTLD がヘパリン (Hep) を始めとするいくつかの硫酸化糖鎖に対する結合性を持つことが示唆された。

### 2. 研究の目的

CD72 の糖鎖リガンドとの結合性を詳しく調べ、CD72 がどのような糖鎖を認識するかを明らかにする。また、CD72 による硫酸化糖鎖認識が、Sm/RNP などの自己抗原に対する B 細胞応答への抑制機能の制御にどのような役割を担うかを明らかにする。さらに、マウスの CD72 には多型があり、正常型の CD72a に比べて疾患発症関連型の CD72c の Sm/RNP への反応性が低下していることを見出している (Akatsu et al, J Exp Med, 2016) が、糖鎖リガンドの認識や B 細胞制御機能における CD72a と CD72c の違いについても明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1)糖鎖マイクロアレイで CD72 が硫酸化糖鎖と結合することが示唆されたので、新たな組換え CD72CTLD タンパク質を開発し、このタンパク質を用いて種々の硫酸化糖鎖への反応性を ELISA や表面プラズモン共鳴 (SPR) により解析した。

(2)CD72 が硫酸化糖鎖に対する B 細胞応答を制御するかを明らかにするため、CD72 との結合性が明らかになった硫酸化糖鎖について、C57BL/6 および CD72 欠損 C57BL/6 マウス血清中の抗硫酸化糖鎖抗体価を調べた。

(3)Sm/RNP は、エンドソームに局在する RNA センサーである Toll 様受容体 7 (TLR7) の内因性リガンドとして知られ、TLR7 を介した B 細胞の活性化が SLE に発症に関わることが知られる。そこで CD72 が硫酸化糖鎖を介して細胞内移行されることで TLR7 シグナル伝達を制御するかを明らかにするため、FLAG タグ付の CD72a と CD72c を強制発現させたミエローム細胞を作製し、硫酸化阻害剤である塩素酸ナトリウムで処理した際の細胞表面 CD72 の発現を解析した。

(4)SLE 患者血清中には、Sm/RNP の他にも様々な自己抗体が検出されることが知られる。そこで、組換え CD72CTLD タンパク質を用いて自己抗原アレイを行い、Sm/RNP 以外に CD72 により認識される自己抗原のスクリーニングを行った。

### 4. 研究成果

(1)本研究開始当初、CD72 の CTLD に His タグと Avi タグを付加した組換えタンパク質を発現するプラスミドを構築した。Avi タグは、ビオチン化酵素である BirA の標的となる配列であり、大腸菌の中で BirA と共に Avi タグ付の CD72CTLD タンパク質を共発現させることで、ビオチン化 CD72CTLD タンパク質を作製できる。こうして作製した His タグ付ビオチン化 CD72CTLD タンパク質を用いて ELISA および表面プラズモン共鳴により CD72CTLD がヘパリンやコンドロイチン硫酸などの種々の硫酸化糖鎖との結合することを示し、さらにその結合性は CD72aCTLD に比べて CD72cCTLD で低下していることを示した。しかし、His タグと硫酸化糖鎖との非特異的結合を除外するため、本研究期間の後期において His タグを除去したビオチン化 CD72CTLD を新たに作製し、ELISA により硫酸化糖鎖との結合性を解析したところ、結合性が検出されなかったため、His タグ付 CD72CTLD タンパク質で見いだされた硫酸化糖鎖への結合性は、再

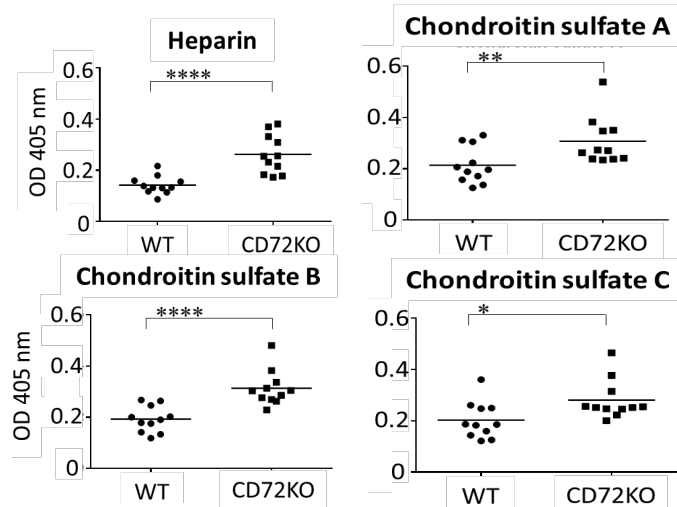


図 1. C57BL/6 および CD72 欠損 C57BL/6 マウス血清中の各種硫酸化糖鎖に対する IgM 抗体価

検証の必要がある。

(2)C57BL/6 および CD72 欠損 C57BL/6 マウスの血清中の硫酸化糖鎖に対する抗体価を ELISA 法により調べると、CD72 欠損マウスにおいてヘパリン、コンドロイチン硫酸などへの高い IgM 抗体価を示した。これより、CD72 が硫酸化糖鎖に対する抗体産生を負に制御することが明らかとなった(図 1)。

(3)CD72a-FLAG を発現させたミエローマ細胞を塩素酸ナトリウム処理することで細胞表面の硫酸化を阻害すると、細胞表面の CD72 の発現量が増強し、その増強の割合は CD72a において CD72c よりも高くなっていった(図 2)。また、塩素酸ナトリウム処理した細胞から調製した細胞ライセートを Optiprep™ 密度勾配遠心で分画すると、塩素酸ナトリウム未処理の場合に比べて CD72a、CD72c 共に細胞膜画分に分画される CD72 の割合が増加していた。His タグ付 CD72CTLD を用いた ELISA 解析により CD72aCTLD に比べて CD72cCTLD の硫酸化糖鎖への結合性が低かったことから、CD72 は硫酸化糖鎖、もしくは細胞表面の硫酸基を有する分子により細胞内移行が制御されており、CD72c の場合には硫酸基との結合性が低下しているため、細胞内移行の割合が低くなり、細胞表面での発現量が高く、塩素酸ナトリウム処理時の細胞表面の発現増強の割合が低くなっている可能性が示唆された。

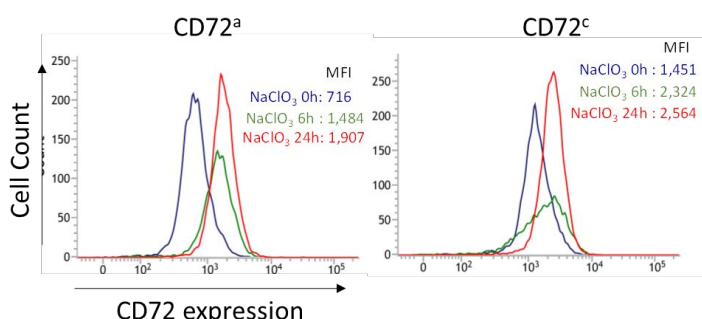


図 2. 塩素酸ナトリウム処理による細胞表面 CD72 発現量の変化

(4)His タグ除去したビオチン化マウス CD72aCTLD 組換えタンパク質を用いて、米国 UT Southwestern Medical Center の Li 博士らとの共同研究により、各種自己抗原に対するプロテインアレイを行った。その結果、RNA とタンパク質の複合体である Sm/RNP のタンパク質成分と結合性を示したことから、CD72 は Sm/RNP のタンパク質成分を認識している可能性が示唆された。また、Sm/RNP に加えて、さらに CD72 に認識されるいくつかの核酸関連自己抗原を見出した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Hishinuma S, Tamura Y, Kobayashi C, Akatsu C, Shoji M; Differential Regulation of Thermodynamic Binding Forces of Levocetirizine and (S)-Cetirizine by Lys191 in Human Histamine H<sub>1</sub> Receptors. *Int J Mol Sci.* 2018, 19(12). doi: 10.3390/ijms19124067, 査読有

Matsubara N, Imamura A, Yonemizu T, Akatsu C, Yang H, Ueki A, Watanabe N, Abdu-Allah H, Numoto N, Takematsu H, Kitazume S, Tedder TF, Marth JD, Ito N, Ando H, Ishida H, Kiso M, Tsubata T; CD22-Binding Synthetic Sialosides Regulate B Lymphocyte Proliferation Through CD22 Ligand-Dependent and Independent Pathways, and Enhance Antibody Production in Mice.; *Front Immunol.* 2018, 9:820. doi: 10.3389/fimmu.2018.00820., 査読有

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.* 2018;495(1):854-859, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.086, 査読有.

〔学会発表〕(計 17 件)

Amin Alborzian Deh Sheikh, 赤津ちづる、鏑田武志; 内因性糖鎖リガンドによる CD22/Siglec-2 の機能制御; 第 5 回糖鎖免疫研究会, 2019.

Amin Alborzian Deh Sheikh, Chizuru Akatsu, Hideharu Ishida and Takeshi Tsubata; The role of CD22 glycan cis-ligands in the regulation of B cell tonic signaling; 2018 年度日本生化学会関東支部例会, 2018.

赤津ちづる、Alborzian-Deh-Sheikh Amin、石田秀治、鏑田武志; CD22 の糖鎖リガンドは B 細胞抗原受容体 (BCR) の機能変化依存的に CD22 の BCR 抑制機能を制御する; 第 91 回日本生化学会大会, 2018.

沼本修孝, 赤津ちづる, 品川健朗, 鏑田武志, 伊藤暢聡; B 細胞抑制性因子 CD72 と Sm/RNP の複合体形成様式の推測; 第 91 回日本生化学会大会, 2018.

Chizuru Akatsu, Quan-Zhen Li, and Takeshi Tsubata; Roles of CD72 in the regulation of

autoantibody production and type 1 interferon production in autoimmune disease; The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2018.

Chizuru Akatsu, Xuexin Li, Susumu Kusunoki, Takeshi Tsubata; SHP-1-activating B lymphocyte co-receptors and autoimmune diseases; The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, 2018.

Chizuru Akatsu, Xuexin Li, Susumu Kusunoki, Takeshi Tsubata; SHP-1-activating B lymphocyte co-receptors and autoimmune diseases; Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13), 2018.

Moe Endo, Chizuru Akatsu, Quan-Zhen Li, Chengsong Zhu, Teizo Fujita, Hideharu Sekine, Takeshi Tsubata; Ligand recognition of the SHP-1-activating inhibitory B cell co-receptor CD72; Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13), 2018.

Amin Alborzian Deh Sheikh, Chizuru Akatsu, Hideharu Ishida and Takeshi Tsubata; The role of ligand recognition of SHP-1 activating receptor CD22 in the regulation of B cell tonic signaling; Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13), 2018.

赤津ちづる、Amin Alborzian Deh Sheikh、鏗田武志; CD22 糖鎖リガンドによる CD22 の機能制御; 糖鎖免疫研究会 2018, 2018.

沼本修孝, 赤津ちづる, 品川健朗, 劉志紅, Aslam Mohanmmad, 鏗田武志, 伊藤暢聡; 結晶構造による B 細胞抑制性因子 CD72 のリガンド結合部位の推測; 第 17 回日本蛋白質科学会, 2017.

Amin Alborzian-Deh-Sheikh, Chizuru Akatsu, Hideharu Ishida2, and Takeshi Tsubata; Cis-ligand dependent and independent interaction of receptor type protein tyrosine phosphatase CD45 with B cell inhibitory receptor CD22; 平成 29 年度日本生化学会関東支部例会; 2017.

赤津ちづる、沼本修孝、伊藤暢聡、鏗田武志; 抑制性受容体 CD72 による RNA 関連自己抗原への自己免疫応答の制御; 第 32 回自己免疫研究会, 2017.

Nobutaka Numoto, Chizuru Akatsu, Kenro Shinagawa, Takeshi Tsubata, Nobutoshi Ito; Charge distribution regulates the ligand-binding affinity of B cell inhibitory receptor CD72; 第 55 回日本生物物理学会, 2017.

Chizuru Akatsu, Hongrui Yang and Takeshi Tsubata; The Inhibitory B Cell Co-Receptor CD72 Regulates B Cell Response to Self Nucleic Acids Crucial for Development of SLE; Korean Association of Immunologists (KAI) International Meeting 2017, 2017.

Chizuru Akatsu, Amin Alborzian Deh Sheikh, Takeshi Tsubata; Role of CD45 (PTPRC) in the regulation of SHP-1 (PTPN6)-activating receptor CD22; The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, 2017.

赤津ちづる、Amin Alborzian-Deh-Sheikh、石田秀治、鏗田武志; CD45 は糖鎖シスリガンドとして CD22/Siglec-2 を抑制することで B リンパ球分化を促進する; 第 90 回日本生化学会大会, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。