

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02610

研究課題名(和文) Glycocalyx (細胞表面糖鎖層) によるBリンパ球活性化制御の研究

研究課題名(英文) Regulation of B lymphocyte activation by molecular interactions in glycocalyx

研究代表者

鏑田 武志 (Tsubata, Takeshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80197756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面には糖タンパク質や糖脂質が存在し、これらの糖鎖からなる糖鎖の層が形成される。この糖鎖の層は糖皮(Glycocalyx)と呼ばれる。Glycocalyx内では特定の糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンと糖鎖が会合する。本研究では、B細胞に発現する抑制性の受容体でシアル酸を認識するレクチンであるCD22が複数の異なるシアル酸含有分子と会合することで、B細胞抗原受容体の機能を正または負に制御し、B細胞のクオリティコントロールに関わることを示し、Glycocalyx内での分子間相互作用の重要性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レクチンは種々の異なる糖タンパク質や糖脂質に結合し、その結合はタンパク質同士の結合に比べて弱い場合が多いため、レクチンの役割には不明な点が多い。本研究では、種々の新規ツールを駆使することで、レクチンの1つであるCD22とその糖鎖リガンドとの相互作用がどのようにCD22の機能を制御し、細胞機能を制御するかを明らかにした。このことで、レクチンと糖鎖の相互作用の重要性を明らかにするとともに、その解析法を進歩させた。また、CD22が免疫不全B細胞の機能を回復させることを明らかにしたことは、免疫不全症の新たな治療法の開発に結びつくこと期待される。

研究成果の概要(英文)：Glycans in glycoproteins and glycolipids on the cell surface form a layer rich in glycans called glycocalyx. In glycocalyx, lectins, proteins recognize specific glycans, interact with corresponding glycan ligands. In this study, we demonstrate that CD22, an inhibitory receptor and a sialic acid-binding lectin expressed in B lymphocytes, positively and negatively regulate BCR signaling by interacting with different sialic acid-containing ligands, thereby contributing to the quality control of B lymphocytes. This result suggests a crucial role of molecular interaction in glycocalyx in the regulation of cellular functions.

研究分野：生化学

キーワード：Glycocalyx レクチン シスリガンド Bリンパ球 免疫不全 シグナル伝達 シアル酸 Siglec

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の表面は流動モザイクモデルでしばしば示される図とは異なり、糖脂質や糖タンパク質の糖鎖からなる糖鎖を主体とする層でできている。このような細胞表面上の糖鎖層は Glycocalyx (糖皮)と呼ばれる。リンパ球にも厚さが 50 nm 程度の Glycocalyx がある。Glycocalyx 内で糖鎖とレクチンが会合すると考えられるが、このような分子間相互作用の役割については、未解明な点が多い。

CD22 は、主に B リンパ球 (B 細胞) に発現する sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin (Siglec) ファミリーの分子で、細胞外領域のレクチンドメインで 2,6 シアル酸を認識する。また、細胞内領域には immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) が存在し、チロシンリン酸化するとチロシンホスファターゼ SHP-1 と会合し、SHP-1 を活性化することで細胞の活性化を抑制する。CD22 は Glycocalyx 内で同じ細胞が発現するシアル修飾された分子 (シスリガンド) と会合することが知られている。さらに、CD22 は B 細胞が発現するリガンドによってその機能が制御されることが知られている。しかしながら、どのようなメカニズムで Glycocalyx 内での分子間相互作用が CD22 の機能を制御するのか、さらにその B 細胞機能での役割について不明な点が多かった。

シスリガンドによる CD22 の機能制御の解明にはどのようなシスリガンドが CD22 に会合するのかを明らかにする必要がある。一般にレクチンと糖鎖の反応は親和性とりわけ Off-rate が早い免疫沈降などで会合する分子を同定することは困難な場合が多い。CD22 についても免疫沈降などの従来の方法でシスリガンドを同定することは難しい。Han らは光親和性標識により CD22 のシスリガンドがもっぱら CD22 であることを示した(1)。一方、我々は、ビオチン化チラミドを用いた Proximity labeling により正常マウス脾臓 B 細胞表面上で CD22 近傍の分子をビオチン化し、さらに、正常 B 細胞と CD22 とシアル酸の会合を阻害した細胞とを比較することで、CD22 以外にも CD45 や B 細胞抗原受容体を構成する IgM などがシスリガンドとして働くことを明らかにした(2)。

### 2. 研究の目的

CD22 が Glycocalyx 内でどのようなシスリガンドとシアル酸依存的に会合するのかを明らかにし、さらに、この会合により CD22 がどのように制御されるのか、また、その制御のメカニズムを明らかにする。さらに、シスリガンドによる CD22 制御が B 細胞の機能でどのような役割を果たすのかを明らかにする。これらを明らかにすることで Glycocalyx 内での分子間相互作用の重要性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

CD22 を含め多くのレクチンでは、免疫沈降などの通常の方法でリガンドを同定することは困難である。そこで、ある分子の近傍の分子をラベルする Proximity labeling 法を用いて CD22 の近傍の分子をラベルし、同定する。さらに、このラベルが CD22 とシアル酸の結合を阻害する合成シアル酸誘導体 GSC718 および GSC836 によって、また、2,6 シアル酸欠損 B 細胞で消失するかを調べることで、その会合がシアル酸依存的であるかを解析した。

シスリガンドによる CD22 の機能制御については、2,6 シアル酸を欠損する ST6Gal 欠損マウスの B 細胞で、B 細胞抗原受容体 (BCR) シグナル伝達、CD22 のリン酸化や SHP-1 との会合を生化学的に解析し、正常 B 細胞との違いを明らかにした。また、正常マウス B 細胞やマウス B 細胞株を GSC718 および GSC836 で処理し、CD22 とシスリガンドとの会合を阻害した際の BCR シグナル伝達や CD22 の活性化の解析を行なった。

### 4. 研究成果

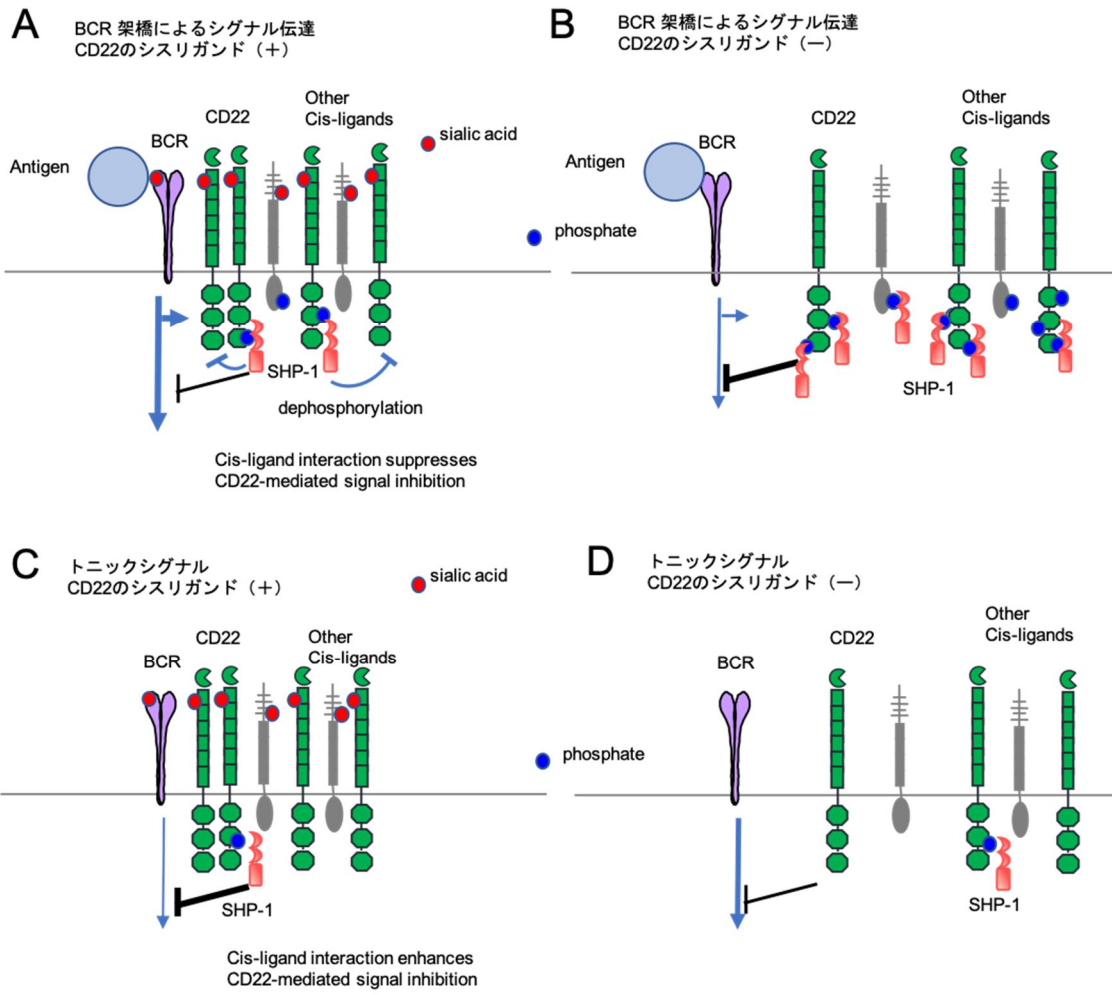
GSC718 の存在下で正常マウス脾臓 B 細胞の BCR を架橋した際の  $Ca^{2+}$  シグナル伝達は、GSC718 非存在下に比べてやや減弱した。この結果は、CD22 のリガンドが CD22 の機能を抑制することで BCR シグナル伝達を増強することを示唆し、先行研究の結果と合致した。一方、ST6Gal 欠損マウスの脾臓 B 細胞では、トニックシグナルが上昇した際にみられる、脾臓 B-1 細胞の増加と辺縁帯 B 細胞の減少、濾胞 B 細胞での細胞表面 IgM の減少などがみられた。さらに正常 B 細胞に GSC718 を加えると細胞内  $Ca^{2+}$  の上昇を認めた。これらの結果から BCR 架橋のない状態では、CD22 がリガンドと会合することで CD22 の機能が増強し、トニックシグナルを減弱することが明らか

となった。したがって、糖鎖リガンドは BCR 架橋時には CD22 の機能を抑制し、BCR 架橋のない状態では CD22 の機能を増強することが明らかとなった。

糖鎖リガンドにより CD22 の機能が制御されるメカニズムの解明を行った。まず、CD22 が SHP-1 の基質となることを明らかにし、さらに、BCR 架橋時のリガンドによる CD22 機能抑制に SHP-1 が必須であることを明らかにした。この結果から、CD22 が他の CD22 分子をリガンドとして認識することで、CD22 のクラスターを形成し、BCR 架橋により CD22 のリン酸化が強く誘導されると、CD22 の ITIM にリクルートされた SHP-1 が近傍の CD22 の ITIM を脱リン酸化することで、CD22 の機能を抑制することが示唆された。一方、CD22 非架橋時には CD22 のリン酸化のレベルは低く、CD22 の ITIM にリクルートされた SHP-1 の近傍にリン酸化 CD22 が存在する確率は低い。このため、CD22 非架橋時には、CD22 クラスターによる CD22 の機能抑制は起こらず、さらに、CD22 が BCR の IgM をリガンドとの認識することで、CD22 による BCR シグナル抑制が増強し、トニックシグナルが低下することが示唆された。以上の結果から、BCR 架橋の有無に依存した CD22 のリガンド認識による CD22 の機能制御のメカニズムを明らかにすることができた (図)。

CD45 は受容体型チロシンホスファターゼで、Src ファミリーのプロテインチロシンキナーゼの抑制性チロシンを脱リン酸化することで、Src ファミリーキナーゼの活性化に必須である。CD45 欠損により T 細胞を欠損する重症免疫不全を呈する。Src ファミリーキナーゼは BCR シグナル伝達にも必須であることが示されているが、CD45 欠損マウス B 細胞の BCR 架橋時の  $Ca^{2+}$ シグナル伝達はほぼ正常である。CD45 欠損 B 細胞で、CD22 とリガンドとの結合を GSC718 で阻害しても、BCR 架橋による  $Ca^{2+}$ シグナル伝達に変化はなかった。一方、CD45 欠損 ST6GalI 欠損 B 細胞では BCR 架橋時の  $Ca^{2+}$ シグナル伝達が顕著に抑制された。GSC718 は BCR 架橋時にのみ CD22 のリガンド結合を阻害するが、ST6GalI 欠損 B 細胞では、B 細胞の分化過程を通して CD22 がリガンドと結合できない。したがって、今回の結果は、リガンドによる CD22 制御が CD45 欠損 B 細胞の分化過程で BCR シグナル伝達を回復させることを示している。

CD22 のリガンドが CD45 欠損細胞の BCR シグナル伝達を回復するメカニズムの解析を行った。CD45 欠損 B 細胞では、細胞表面の BCR のレベルが増加していたが、ST6GalI 欠損 CD45 欠損 B 細胞では細胞表面の BCR の発現は正常 B 細胞と同程度であった。さらに、細胞表面 BCR 発現の高い細胞と低い細胞で BCR シグナル伝達を比較したところ、BCR 発現の高い細胞でのシグナル伝達は BCR 発現の低い B 細胞に比べて顕著に増強していた。これらの結果から、CD22 のリガンドが B 細胞分化過程で BCR 発現レベルを増加させ、BCR シグナル伝達を回復することが明らかとなった。トニックシグナルは B 細胞の生存に必要であることが示されている。BCR 架橋非存在下で CD22 がリガンド依存的にトニックシグナルを減弱させることで、CD45 欠損により低下していたトニックシグナルがさらに低下し、その結果、BCR の発現が高くトニックシグナルが比較的高い細胞のみが選択的に生存することが示唆される。したがって、BCR の発現が高い B 細胞が選択的に生存することで、CD45 欠損による Src ファミリーキナーゼ活性化の障害にも関わらず、BCR シグナル伝達が回復することが明らかとなった。リガンドによる CD22 の制御が、BCR シグナル伝達に障害のある B 細胞が分化過程で排除され、BCR シグナル伝達が正常な B 細胞だけが分化するというクオリティコントロールに関わることが明らかとなった。



引用文献

1. S. Han, B. E. Collins, P. Bengtson, J. C. Paulson, Homomultimeric complexes of CD22 in B cells revealed by protein-glycan cross-linking. [see comment]. *Nat. Chem. Biol.* **1**, 93-97 (2005).
2. Alborzian, D. S. A, Akatsu, C, Imamura, A, Abdu-Allah, HHM, Takematsu, H, Ando, H, Ishida, H, Tsubata, T. (*Biochem Biophys Res Commun*, 2018), vol. 495, pp. 854-859.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tsubata, T	4. 巻 42
2. 論文標題 Inhibitory B cell co-receptors and autoimmune diseases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Immunol. Med.	6. 最初と最後の頁 108-116
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Feng, Y.-y., Tang, M., Suzuki, M., Gunasekara, C., Anbe, Y., Hiraoka, Y., Liu, J., Grasberger, H., Ohkita, M., Matsumura, Y., Wang, J.-y. and Tsubata, T.	4. 巻 202
2. 論文標題 Essential role of NADPH oxidase-dependent production of reactive oxygen species in maintenance of sustained B cell receptor signaling and B cell proliferation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Immunol.	6. 最初と最後の頁 2546-2557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsubara, N., Imamura, A., Yonemizu, T., Akatsu, C., Yang, H., Ueki, A., Watanabe, N., Abdu-Allah, H., Numoto, N., Takematsu, H., Kitazume, S., Tedder, T. F., Marth, J. D., Ito, N., Ando, H., Ishida, H., Kiso, M. and Tsubata, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 CD22-binding synthetic sialosides regulate B lymphocyte proliferation through CD22 ligand-dependent and independent pathways, and enhance antibody production in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Immunol.	6. 最初と最後の頁 820
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsubata, T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Ligand recognition determines the role of inhibitory B cell co-receptors in the regulation of B cell homeostasis and autoimmunity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Immunol.	6. 最初と最後の頁 2276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Akatsu Chizuru, Alborzian Deh Sheikh Amin, Matsubara Naoko, Takematsu Hiromu, Schweizer Astrid, Abdu-Allah Hajjaj H. M., Tedder Thomas F., Nitschke Lars, Ishida Hideharu, Tsubata Takeshi	4. 巻 15
2. 論文標題 The inhibitory coreceptor CD22 restores B cell signaling by developmentally regulating <i>Cd45</i> <sup>?/?</sup> </i> immunodeficient B cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 eabf9570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scisignal.abf9570	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Alborzian Deh Sheikh Amin, Akatsu Chizuru, Abdu-Allah Hajjaj H. M., Suganuma Yuki, Imamura Akihiro, Ando Hiromune, Takematsu Hiromu, Ishida Hideharu, Tsubata Takeshi	4. 巻 206
2. 論文標題 The Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 (PTPN6) but Not CD45 (PTPRC) Is Essential for the Ligand-Mediated Regulation of CD22 in BCR-Ligated B Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 2544 ~ 2551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4049/jimmunol.2100109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ballet Romain, Brennan Martin, Brandl Carolin, Feng Ningguo, Berri Jeremy, Cheng Julian, Oc?n Borja, Alborzian Deh Sheikh Amin, Marki Alex, Bi Yuhan, Abram Clare L., Lowell Clifford A., Tsubata Takeshi, Greenberg Harry B., Macauley Matthew S., Ley Klaus, Nitschke Lars, Butcher Eugene C.	4. 巻 22
2. 論文標題 A CD22/Shp1 phosphatase axis controls integrin 7 display and B cell function in mucosal immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Immunology	6. 最初と最後の頁 381 ~ 390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41590-021-00862-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tsgawa Naoya, Yamada Daiki, Watabe Taro, Onizawa Michio, Wang Shuang, Nemoto Yasuhiro, Oshima Shigeru, Tsubata Takeshi, Adachi Takahiro, Kawano Yohei, Watanabe Mamoru, Blumberg Richard S., Okamoto Ryuichi, Nagaishi Takashi	4. 巻 535
2. 論文標題 CEACAM1 specifically suppresses B cell receptor signaling-mediated activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 99 ~ 105
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Long Wang, Endo Ayaka, Takematsu Hiromu, Fedder Thomas, Tsubata Takeshi.
2. 発表標題 Development of anti-CD22 antibody that inhibits ligand binding of CD22.
3. 学会等名 The Regular Meeting of the Japanese Biochemical Society Kanto Branch
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 赤津ちづる、遠藤萌恵、沼本修孝、Quan-Zhen Li、関根英治、藤田禎三、伊藤暢聡、鏑田武志 .
2. 発表標題 抑制性 B 細胞共受容体 CD72 による SLE 関連自己抗原への自己免疫応答の抑制
3. 学会等名 第 34 回自己免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Tsubata
2. 発表標題 The Inhibitory B Cell Co-Receptor CD72 Regulates Tolerance to Self Nucleic Acids Crucial for Development of Systemic Lupus Erythematosus.
3. 学会等名 Keystone Symposia, B cells: Mechanisms in Immunity and Autoimmunity (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Amin Alborzian Deh Sheikh, Chizuru Akatsu, Hideharu Ishida and Takeshi Tsubata.
2. 発表標題 The role of CD22 glycan cis-ligands in the regulation of B cell tonic signaling.
3. 学会等名 The Regular Meeting of the Japanese Biochemical Society Kanto Branch
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Amin Alborzian Deh Sheikh, Chizuru Akatsu, Hideharu Ishida and Takeshi Tsubata.
2. 発表標題 The role of ligand recognition of SHP-1 activating receptor CD22 in the regulation of B cell tonic signaling.
3. 学会等名 Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICPP13) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeshi Tsuabta.
2. 発表標題 Ligand recognition determines functional properties of inhibitory B cell co-receptors.
3. 学会等名 International Symposium on B cells (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chizuru Akatsu, Quan-Zhen Li, and Takeshi Tsubata
2. 発表標題 Roles of CD72 in the regulation of autoantibody production and type 1 interferon production in autoimmune disease.
3. 学会等名 The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 赤津ちづる、Alborzian-Deh-Sheikh Amin、石田秀治、鐔田武志
2. 発表標題 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.
3. 学会等名 第 91 回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Amin Alborzian Deh Sheikh, 赤津ちづる、鐔田武志.
2. 発表標題 内因性糖鎖リガンドによる CD22/Siglec-2 の機能制御.
3. 学会等名 第 5 回糖鎖免疫研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takeshi Tsubata
2. 発表標題 Inhibitory B cell co-receptors and autoimmune diseases
3. 学会等名 Mini-symposium on Protein Structure and Function (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chizuru Akatsu, Amin Alborzian Deh Sheikh and Takeshi Tsubata.
2. 発表標題 The SHP-1-activating inhibitory co-receptor CD22 paradoxically augments BCR signaling in immunodeficient B cells.
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鐔田武志
2. 発表標題 抑制性B細胞共受容体のリガンド認識によるSHP-1の機能発現
3. 学会等名 第10回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤津ちづる、Alborzian-Deh-Sheikh Amin、鏑田武志
2. 発表標題 抑制性B細胞共受容体 CD22(Siglec-2) による糖鎖依存的な免疫不全B細胞の機能回復.
3. 学会等名 第 94 回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Alborzian Deh Sheikh, A., Akatsu, C. and Tsubata, T.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 693 (p.75-83)
3. 書名 Identification of Siglec Cis-ligands by Proximity Labeling. In "Lectin Purification and Analysis: Methods and Protocols" ed. by Jun Hirabayashi	

1. 著者名 Tsubata, T	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 405 (p.170-171)
3. 書名 Development of Siglec Regulators. In "Glycoscience: Basic Science to Applications" ed. by Naoyuki Taniguchi, Tamao Endo, Jun Hirabayashi, Shoko Nishihara, Kenji Kadomatsu, Kazunari Akiyoshi and Kiyoko F. Aoki-Kinoshita	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	赤津 ちづる  (Akatsu Chizuru)  (60735984)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教    (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	王 継揚  (Wang Ji-yang)  (80231041)	東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師    (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Duke University	Stanford University	Harvard Medical School	
ドイツ	Erlangen University			