

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790063  
 研究課題名(和文) 糖鎖改変マウスを用いた、シアル酸分子種変化によるB細胞活性化調節機構の解明  
 研究課題名(英文) Elucidation of regulatory mechanism of B cell activation by the change in sialic acid species  
 研究代表者  
 内藤 裕子 (NAITO YUKO)  
 京都大学・生命科学研究所・助教  
 研究者番号：10456775

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでに、T細胞依存性抗原による免疫後に生じる胚中心の活性化B細胞において、主要シアル酸分子種が大きく変化することを明らかにしてきた。本研究では、この活性化依存的なシアル酸分子種の発現変化がもたらす生理的意義の解明を目的とし、研究代表者らが作製した、シアル酸分子種変化の抑制が期待される糖鎖改変マウスのB細胞における解析を行った。この糖鎖改変マウスにおいても胚中心の形成が見られたことから、さらに抗体産生能について検討した。

研究成果の概要(英文)：I have reported that major sialic acid species is dramatically changed in activated B cells in germinal centers, the formation of which is triggered by immunization with thymus-dependent (TD) antigen. In this project, I established genetically modified mice that were expected to cancel the activation-dependent change in sialic acid species, and analyzed B cell phenotypes of these mice. Since these mice formed germinal centers upon TD antigen immunization, I examined antibody production in TD response.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,500,000 | 750,000   | 3,250,000 |
| 2009年度 | 900,000   | 270,000   | 1,170,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：糖鎖生物学、免疫学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：シアル酸、B細胞、胚中心

## 1. 研究開始当初の背景

胚中心は、T細胞依存性抗原による免疫後に脾臓などの二次リンパ器官内に生じる組織構造である。活性化B細胞は、胚中心を経て抗体産生細胞や記憶B細胞へと分化し、体

液性免疫応答に関わる。正常な免疫応答を引き起こすためにはB細胞活性化の制御が非常に重要であり、B細胞抗原受容体刺激によるシグナル伝達は、B細胞表面上に発現する様々な共受容体によって調節されている。

そのような共受容体の一つである CD22 は、細胞内領域中のチロシンのリン酸化を介して B 細胞の活性化を負に制御すると考えられている。一方、CD22 の細胞外領域はシアル酸を含む糖鎖リガンドと結合することが知られており、近年、糖鎖リガンドとの相互作用が CD22 の機能に果たす役割に関心が持たれている。シアル酸は細胞表面を覆う糖鎖の末端に存在する酸性糖であり、生体内には主に *N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac) と *N*-グリコシルノイラミン酸 (Neu5Gc) の 2 つの分子種が存在する。マウスにおいて、CD22 は Neu5Gc に特異性を示し、Neu5Gc  $\alpha$ 2-6Gal という末端糖鎖構造をリガンドとして認識する。

研究代表者はこれまでに、胚中心の特異的マーカーとして、抗原未知のまま広く用いられてきた単クローン抗体、GL7 が Neu5Ac  $\alpha$ 2-6Gal  $\beta$ 1-4GlcNAc という糖鎖構造をエピトープとして認識すること、そして通常の非活性化 B 細胞では Neu5Gc が主なシアル酸分子種であるが、GL7 陽性の胚中心 B 細胞では、Neu5Gc の生合成を担う酵素、*Cmah* の発現抑制により主要シアル酸分子種が Neu5Gc から Neu5Ac へと変化し、この変化を GL7 が検出することを明らかにした。さらに、Neu5Gc を発現しない *Cmah* 欠損マウスは B 細胞の増殖や抗体産生の亢進を示したことから、Neu5Gc が B 細胞の活性化に対し負に働くことが示唆された。しかし、胚中心の B 細胞において活性化依存的に Neu5Gc の発現が抑制されることの生理的意義を個体レベルで解明することは、活性化 B 細胞に限らず全身で Neu5Gc の発現を欠く *Cmah* 欠損マウスの解析だけでは難しく、新たな糖鎖改変マウスを用いた検証系が必要であった。

また、胚中心における Neu5Gc から Neu5Ac へと主要シアル酸分子種の変化は、CD22 のリガンド減少を意味する。つまり、B 細胞は、活性化された時にのみ Neu5Gc の発現を抑制することで CD22 のリガンド量を減少させ、CD22 を介した抑制シグナルから逃れている可能性が示唆された。これまで、このような *in vivo* における CD22 リガンドの発現制御については報告がなく、活性化 B 細胞におけるリガンド発現変化の生理的意義を明らかにすることは、未だ不明な点が多かった CD22 の機能の解明にも貢献すると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、B 細胞活性化時における Neu5Gc の特異的な発現抑制の生理的意義、特に個体レベルでの免疫形成における意義を明らかにすることを目的として行った。

B 細胞では活性化に伴い *Cmah* の発現が抑制され Neu5Gc が減少することから、*Cmah* 欠損

マウスと野生型マウスの活性化 B 細胞は同じ状態となり、*Cmah* 欠損マウスの解析のみではこの活性化 B 細胞特異的なシアル酸分子種変化の意義を解明することは難しい。このため、B 細胞が活性化しても Neu5Gc の発現が抑制されない糖鎖改変マウスにおける解析が必要であると考えられた。研究開始時点において、研究代表者らは、本来、胚中心で起こるシアル酸分子種の変化が抑制されると期待される *Cmah* トランスジェニックマウス (Tg マウス) の作製にすでに着手していた。そこで、本研究では、この Tg マウスの B 細胞応答について、特に胚中心反応に注目して検証することにより、Neu5Gc の減少が B 細胞の活性化において果たす機能的役割の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

B 細胞における活性化特異的な Neu5Gc 発現抑制の生理的意義の解明には、*Cmah* を強制的に発現する Tg マウスの解析が有効であると考えられた。そこで、B 細胞特異的に *Cmah* 遺伝子を発現する Tg マウスとして、B 細胞特異的なプロモーターとして実績のある免疫グロブリン遺伝子の可変領域 (IgVH) プロモーターを用いた Tg マウスを作製した。また、胚中心 B 細胞特異的に *Cmah* を発現させることができれば、活性化 B 細胞におけるシアル酸分子種の変化がもたらす影響を、より正確に検証することができると考えられる。このため、胚中心 B 細胞で特異的に発現する Activation-induced cytidine deaminase (AID) 遺伝子のプロモーターを使用した Tg マウスも作製した。本研究開始時点では、すでにこれらのマウスの作製は終了しており、*Cmah* 遺伝子が挿入された複数の系統のマウスの中から、*Cmah* の発現強度の異なる複数のマウス系統の樹立を行っている段階であった。そこで、本研究ではまず、Tg マウスにおいて B 細胞が活性化しても Neu5Gc が減少しないことを確認し、さらに、マウス個体レベルでの免疫応答として抗体産生の測定を行った。また、以下の解析においては、内在性 *Cmah* の発現制御に左右されずに Tg 由来 *Cmah* の機能を見るため、*Cmah* 欠損マウスと掛け合わせた、内在性の *Cmah* を持たないマウスを用いた。

### AIDプロモーターの検証

胚中心 B 細胞特異的な *Cmah* 発現を期待している AID プロモーターを使用した *Cmah* Tg マウスについては、研究開始時点において、導入遺伝子が組み込まれた複数の系統のマウスが得られていたものの、発現を確認する段階には至っていなかった。そこで、ウエスタンブロッティング法により、導入した Tg 遺伝子由来 *Cmah* の発現の確認を行った。

IgVH-*Cmah* Tg マウスの活性化 B 細胞における

#### Tg由来Cmahの発現の検証

B細胞における恒常的なCmah発現が期待される、IgVHプロモーターを用いたTgマウスは、すでに導入遺伝子を異なる発現強度で発現する複数の系統の確立に成功していた。そのため、本研究ではまず、内在性のCmahの発現を抑制する条件である、脾臓B細胞を*in vitro*でLPS（リポ多糖）により活性化させたときにNeu5Gcの発現が期待通り減少しないことを、HPLCおよびフローサイトメトリーを用いて確認した。

#### 胚中心形成能の検証

胚中心で特異的に生じるシアル酸分子種の変換ができないTgマウスでは、胚中心の形成そのものが正常に起こるのか検討するため、T細胞依存性抗原であるヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾臓凍結切片を、シアル酸分子種の影響を受けない胚中心マーカー、PNAレクチンで染色し、顕微鏡観察を行った。

#### 抗体産生の測定

マウスの個体レベルでの応答に野生型マウスと比較して差が見られるか調べるため、T細胞依存性抗原である、ハプテンとしてパラニトロフェニル基（NP）を結合させたウサギガンマグロビンでマウスを免疫し、血中のNP特異的な抗体量を、サンドイッチELISA法を用いて測定した。

#### 4. 研究成果

本研究では、胚中心におけるシアル酸分子種変化の生理的意義の解明を目的として、研究代表者らが作製した、B細胞が活性化してもNeu5Gcの発現が抑制されないことが期待される2種類の糖鎖改変マウス、IgVH-Cmah TgマウスおよびAID-Cmah Tgマウスについて解析を行った。また、表現型の解析にあたり、内在性Cmahの発現制御に左右されずにTg由来Cmahの機能を検証するため、Cmah欠損マウスと掛け合わせることで得られた、内在性のCmahを持たないマウスを用いた。

AID遺伝子のプロモーターを使用した、胚中心B細胞特異的な導入遺伝子発現が期待されるTgマウスについては、すでに得られていた複数の系統のマウスについて、導入したCmah遺伝子の発現の確認を行った。AIDプロモーターは、AID遺伝子の発見から比較的に日が浅く、まだTgマウス作製用プロモーターとしての実績がないことから、本研究で活性化B細胞特異的な遺伝子発現を誘導するプロモーターとして機能することが示されれば、今後の研究に応用されることが期待された。しかし、*in vitro*で内在性のAIDの発現を誘導する条件である、LPSおよびIL-4で脾臓B細胞を刺激し活性化させたところ、Tg由来Cmahの発現は認められなかった。

一方、B細胞特異的な恒常性のプロモーターとして実績のある免疫グロブリン遺伝子

の可変領域（IgVH）プロモーターを用いたTgマウスに関しては、導入遺伝子を異なる発現強度で発現する複数の系統をすでに確立していた。また、タンパク質レベルでのTg由来Cmahの発現があることはすでに確認済みであったが、これがB細胞で酵素量として内在性のCmahと同様の十分な機能を有するか調べるため、産物であるNeu5Gcの発現をHPLCにより確認した。その結果、Cmah欠損マウス（Neu5Gc: 0%）にTg由来Cmahを発現させることにより、B細胞において、野生型マウスに比べやや多い程度のNeu5Gcの発現が確認された。このことから、Tg由来Cmahは、細胞質におけるシアル酸代謝において十分な活性を持つことが明らかとなった。

そこで、次に、B細胞活性化時にNeu5Gcが減少しないことを確認するため、脾臓B細胞を*in vitro*でLPSにより刺激し、Neu5Gcの発現量を調べたところ、活性化による減少は見られなかった。また、研究代表者により $\alpha$ 2-6結合のNeu5Acをエピトープとして認識することが明らかとなったモノクローナル抗体、GL7による染色を行い、細胞表面におけるシアル酸分子種の変化についても検討を行ったところ、Tgマウスでは期待通りB細胞が活性化してもNeu5Gcの発現が抑制されないことが確認された。これらの結果から、活性化B細胞におけるNeu5GcからNeu5Acへのシアル酸分子種の変化は、Cmahの発現抑制単独で十分に起こることが明らかとなったのと同時に、IgVH-Cmah Tgマウスについては期待通り活性化依存性のNeu5Gcの発現抑制が欠損するマウスであることが明らかとなった。

そこで、次に、このマウスを用いて個体レベルでの免疫応答について検討した。Tgマウスでは、本来、野生型マウスの胚中心で生じるNeu5Gcの発現抑制が起こらないことから、まず胚中心の形成が正常に起こるか調べた。胚中心を特異的に染色する抗体として広く用いられているGL7はNeu5Acを認識するため、Neu5Gcを恒常的に発現するTgマウスではGL7エピトープは発現しないと考えられ、このプローブによる染色では胚中心形成における検証は行えない。そこで、別の胚中心マーカーであるピーナッツ由来レクチン、PNAを用いて、T細胞依存性の免疫応答を惹起することが知られているヒツジ赤血球で免疫したマウスの脾臓凍結切片の染色を行ったところ、Tgマウスにおいても胚中心と考えられるPNA陽性領域の形成が認められた。厳密な検証のためには、胚中心の大きさや出現頻度、またその持続期間についても詳細に検討する必要があるものの、この結果から、Neu5Gcの発現抑制が胚中心反応を引き起こすのではなく、胚中心反応の結果としてNeu5Gcの抑制が起こることが明らかとなっ

た。

活性化 B 細胞は、胚中心反応を経て抗体産生細胞や記憶 B 細胞へと分化する。Tg マウスにおいても胚中心が形成されることが明らかとなったので、次に、胚中心反応の際に起こる B 細胞応答に対する影響を調べるため、下流のイベントと考えられる抗体産生について検討を行った。B 細胞活性化の負の制御因子と考えられる Neu5Gc の発現が抑制される T 細胞依存性抗原に対する野生型マウスでの応答が、Tg マウスにおいては Neu5Gc の発現抑制がかからないことにより減弱し、抗体産生量が減少することが予想された。しかし、予想に反し、野生型マウスとの顕著な差は見られなかった。本研究では、内在性 *Cmah* の発現制御の影響を排除するために、*Cmah* 欠損マウスと掛け合わせた Tg マウスを用いたが、この系は Tg の機能に注目できる反面、B 細胞以外の細胞も遺伝子改変による Neu5Gc 発現変化の影響を受けることになる。このことが表現型の発現に影響している可能性も十分考えられることから、今後、内在性の *Cmah* がある状態での比較検討を行う予定である。また、胚中心反応を経て、B 細胞は抗体産生細胞や記憶 B 細胞へと分化することから、胚中心において Neu5Gc の発現が抑制されないことがこの分化に影響するか、*in vivo* および *in vitro* の系を用いた検討を行っている。

今回作製した Tg マウスは、生化学的な解析の結果、B 細胞において Neu5Gc を恒常的に発現することが明らかになった。このため、このマウスは Neu5Gc の機能の解明のために必要であることに加え、CD22 リガンドを恒常的に発現することから、リガンドの発現制御も考慮に入れた CD22 の機能解明に向けての研究においても必須のツールとなると期待される。また、B 細胞特異的な発現を期待して作製した Tg マウスであるが、研究代表者の関連研究により、T 細胞においても Tg 由来 *Cmah* が発現しており、その産物である Neu5Gc もこれに応じて発現していることが明らかとなった。さらに、T 細胞においても活性化に伴い Neu5Gc の発現が減少するという予備的知見も得られており、この Tg マウスは、T 細胞における Neu5Gc の発現制御の生理的意義の解明においても重要なツールとなると考えられ、リンパ球における Neu5Gc の機能の解明に大きく貢献すると期待される。

## 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 1 件)

- ① 内藤 裕子、「Activation-dependent change in sialic acid species in mouse B cells (マウス B 細胞の活性化に伴う

シアル酸分子種の変化)」、Trends in Glycoscience and Glycotechnology、査読無、21 巻 237~246 頁、2009 年

[学会発表] (計 3 件)

- ① 内藤 裕子、竹松 弘、村田 恵祐、小堤 保則、「*N*-glycolylneuraminic acid-mediated regulation of lymphocyte activation」、CREST International Symposium 「Acquired Immunity and Glycobiology」、2009 年 3 月 24 日、Kazusa Akademia Hall (千葉)
- ② 内藤 裕子、竹松 弘、村田 恵祐、小堤 保則、「Exploration of functional significance of the activation-dependent repression of *N*-glycolylneuraminic acid in mouse lymphocytes」、International Symposium on Systems Glycobiology、2008 年 12 月 5 日、Tokyo Conference Center (東京)
- ③ 内藤 裕子、「Activation-dependent repression of *N*-glycolylneuraminic acid in mouse B- and T-lymphocytes」、2008 Annual Conference of the Society for Glycobiology、2008 年 11 月 14 日、Fort Worth (Texas, USA)

[図書] (計 1 件)

- ① 内藤 裕子、竹松 弘、小堤 保則、共立出版、糖鎖情報の独自性と普遍性「B 細胞の機能調節における糖鎖認識の重要性-B 細胞活性化に伴う糖鎖の変化-」、2008 年、298 頁 (内、1630 頁~1635 頁)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

内藤 裕子 (NAITO YUKO)  
京都大学・生命科学研究科・助教  
研究者番号：10456775

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：