

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06513

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸による免疫応答制御：糖鎖構造とシグナル伝達機構

研究課題名(英文)Regulation of immune response by chondroitin sulfate

研究代表者

幡野 その子(Hatano, Sonoko)

愛知医科大学・分子医科学研究所・助教

研究者番号：40434625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：免疫応答では樹状細胞などの抗原提示細胞が重要な役割を担っているが、この機構にコンドロイチン硫酸が関わっていることがわかってきた。コンドロイチン硫酸は特定の二糖単位が数十回繰り返し連なった直鎖上の糖鎖で、硫酸基の修飾を受けて多様な構造をとり、結合する生理活性因子の機能を制御する。本研究では、硫酸化度の高いコンドロイチン硫酸が30%を占める場合、樹状細胞の活性化持続時間が長いことがわかった。また、硫酸化度の高いものの割合が60%では未処理群との差はなかった。以上の結果から、コンドロイチン硫酸の硫酸化度を変化させることによって、樹状細胞の活性化を制御できる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コンドロイチン硫酸は軟骨の主成分として広く知られているが、自己免疫疾患の動物モデル実験でコンドロイチン硫酸が関わっていることがわかってきた。これはコンドロイチン硫酸が免疫応答を制御する可能性を示唆している。そこで私達はコンドロイチン硫酸を用いて樹状細胞の反応を制御することを目標とした。樹状細胞は体内に侵入してきた細菌やウイルス感染した細胞の断片を認識し、それを他の免疫系の細胞に伝える司令塔のような役割を持つ。従って樹状細胞が過剰に反応すると自己免疫疾患につながる恐れがある。私達の研究成果から、免疫応答に対するコンドロイチン硫酸の硫酸化度による制御は今後大いに期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Antigen-presenting cells, such as dendritic cells, play an important role in the immune response, and it is now known that chondroitin sulfate is involved in this mechanism. Chondroitin sulfate is a linear sugar chain consisting of dozens of repeating disaccharide units that can be modified with sulfate groups to assume a variety of structures and regulate the functions of the bioactive factors to which it binds. In this study, it was found that when chondroitin sulfate with a high degree of sulfation accounted for 30%, the duration of dendritic cell activation was longer. There was no difference from the untreated group when the percentage of highly sulfated material was 60%. These results suggest the possibility of controlling dendritic cell activation by changing the degree of sulfation of chondroitin sulfate.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 免疫 樹状細胞

## 1. 研究開始当初の背景

生体防御機構は、自然免疫と獲得免疫の複合的な免疫応答が担っている。自然免疫は局所で即時に反応し、病原体や腫瘍細胞などの増殖に対する初期防御として機能しているが、最終的な病原体などの排除と免疫学的記憶の形成には獲得免疫が必要である。自然免疫の活性化による獲得免疫の誘導には、マクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が中心的な役割を担っている。近年、抗原提示細胞の機能制御にコンドロイチン硫酸 (chondroitin sulfate, CS) が関わっていることがわかってきた。CS はグルクロン酸 (GlcA) と N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) の二糖単位が数十回繰り返し連なった直鎖上の糖鎖で、硫酸基の修飾を受けて多様な構造をとり、コアタンパク質と共有結合しプロテオグリカン(PG)として存在する。その分布は全身にわたり、組織の線維間隙を充填して単に保水作用を担う分子と考えられてきたが、CS 結合性生理活性分子や受容体が発見されたことから、CS は細胞挙動を制御する分子として注目されている。申請者らは長年、遺伝子改変マウスを用いてコンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG)の生体内機能を研究し、CSPG が細胞外において transforming growth factor (TGF) - $\beta$  の供給を制御していることを報告してきた。本研究の予備実験では、GalNAc の 4 位と 6 位が硫酸化された E 構造の CS 存在下で樹状細胞を活性化したところ、炎症性サイトカイン IL-6 の発現が濃度依存的に抑制されたことを見出している。このように CS の微細構造が同分子の機能の特異性を規定していることを示す研究成果が次々と報告され、現在の CS 研究は構造と機能の関連に焦点が絞られつつある。しかし、そのほとんどが天然物を用いた研究のため、確立した見解を得るのは難しいため、CS 機能の解明には糖鎖長と硫酸基修飾部位の判明している単一標品としての CS が必要となる。

## 2. 研究の目的

抗原提示細胞の制御に必要な CS 構造の同定と制御発現機構の解明を目的とする。そのために、糖鎖長と硫酸基修飾部位の規定されたコンドロイチン硫酸を酵素化学的に合成する当研究室独自の技術を用いる。

## 3. 研究の方法

本研究では、抗原提示細胞のうち樹状細胞の活性化を制御する CS 構造とその制御機構を以下の方法によって明らかにした。

### 3-1. 糖鎖長と硫酸基修飾部位の規定された CS の合成

コンドロイチン 6 糖を出発基質として変異型大腸菌 K4 株由来ポリメラーゼによって糖鎖を伸長し、糖鎖長が一定のコンドロイチンを合成する。次に各種組換え CS 硫酸基転移酵素を用いて糖鎖の特定部位に硫酸基修飾を行い、多様な構造の CS を調製する。CS の還元末端をホスファチジルエタノールアミンまたはビオチンにて修飾し、培養皿底面に固相化し実験に用いる。

### 3-2. CS による樹状細胞活性化制御の解析

#### A) 樹状細胞の樹立

生後 8 週齢のマウス大腿骨および脛骨から骨髄を採取し、顆粒球単球コロニー刺激因子(GM-CSF)を加えた培地で樹状細胞への分化を誘導する。約 1 週間後、樹状細胞の表面マーカーである CD11c に対する抗体と反応させ、フローサイトメーターを用いて非活性の樹状細胞を単離し、以下の実験で使用する。

#### B) リポ多糖 (LPS) 刺激による樹状細胞活性化を制御する CS 構造の決定

非活性の樹状細胞を各種 CS を固相化した培養皿で培養し、LPS を添加する。刺激開始 3 および 6 時間後に細胞を回収後、RNA を抽出し、サイトカインやケモカイン、受容体など CS 関連分子の発現量を qRT-PCR 法を用いて定量する。また、刺激後における樹状細胞の表面マーカー CD86、CD80 などをフローサイトメーターにて測定することによって、各種 CS による樹状細胞の活性化の度合いを解析する。

#### C) LPS 刺激後サイトカイン発現に至るシグナル伝達経路の解析

すでに報告されている NF- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B)シグナル伝達経路の他、樹状細胞の分化・成熟に関与する様々なシグナル伝達経路に関して、ウェスタンブロット法や蛍光免疫染色による核移行シグナルの観察などにて検討する。

## 4. 研究成果

### 4-1. CS の固相化条件の検討

CS を効率よく培養皿に固相化するため、プラスチックに固相化可能なホスファチジルエタノールアミン(PE)と、市販のストレプトアビジンプレートに結合するビオチンをそれぞれ CS の還元末端に修飾し、培養皿を固相化した。ビオチン化 CS の方が培養皿への固相化効率は良好で

あったが、以下の LPS による刺激実験において、LPS 未処理群でも樹状細胞が非特異的な活性化を示したため、PE 化 CS を用いることとした。

#### 4-2. LPS 刺激による樹状細胞活性化を制御する CS 構造の決定

##### A) CS の調整

CS の主な二糖構造は、非硫酸化単位 (CH)、GalNAc 残基 C-4 位 (CSA) および C-6 位 (CSC) の一硫酸化単位、GalNAcC-4 位と C-6 位の二硫酸化単位 (CSE)、GlcAC-2 位と GalNAcC-6 位の二硫酸化単位 (CSD)、および GlcAC-2 位と GalNAcC-4 位と C-6 位の三硫酸化単位 (TriS) となっている。このような硫酸化度の違いに応じて相互作用する生理活性因子の種類や機能を細胞外で調整することによって、細胞の挙動を制御すると考えられている。本研究では硫酸化度の違うコンドロイチン硫酸を用いて樹状細胞の活性化を制御することを試みたところ、二硫酸化単位の CSE の存在化で活性化が有意に高くなった。そこで CSE を用いて実験を進めることにしたが、CSE の酵素化学的調整は難しいため、予備実験としてイカ軟骨から CSE を抽出して用いることとした。

##### B) LPS 刺激による樹状細胞活性化

今回、イカ由来 CS には CSE の割合が 60% と 30% を占める画分があることがわかり、CSE が 60% を占める CS より、30% を占める CS を塗布した条件の方が LPS による樹状細胞の活性化を示す IL-6 などの炎症性サイトカイン (図 1) および免疫を調節する役割を持つ IL-12 の発現が有意に高くなり、その持続時間も長いことがわかった。従って、以下に記述する CS 塗布群は CSE 含量が 30% のものとする。上記条件で得られた培養上清から細胞の遊走に関連する単球走化性促進因子 (MCP-1) 量が高いことが明らかになったので、ケモカイン受容体の発現を確認した。

MCP-1 の受容体である CCR2 の発現は LPS 刺激前において CS 塗布群で高かったが、LPS 刺激後はコントロールと同様に抑制された。他のケモカイン受容体である CCR5 は LPS 刺激前後共に CS 塗布群でコントロールに比べ高発現であった (図 2)。また、CS の細胞膜受容体として知られている RPTP $\sigma$  の樹状細胞における変化は見られなかった。

樹状細胞の活性化は、LPS が細胞表面にある Toll-like receptor 4 (TLR4) と MD2 の複合体の二量体に結合することによって始まるが、この二量体が細胞表面に留まったままだと MyD88 を介して IL-6 などの炎症性サイトカインの産生が促進されるが、エンドサイトーシスによって細胞内へ TLR4-MD2 複合体が入ると 1 型インターフェロン産生が促進されることがわかっている。CS 塗布群では LPS 刺激前から TLR4 および MD2 の発現が高いことが qRT-PCR の結果から明らかになった。インターフェロン $\beta$  の産生はコントロールに比べ低い傾向にあったが有意差はなかった。

##### C) シグナル伝達経路の解明

LPS 刺激後の TLR4-MD2 を介したシグナル伝達は下流の NF- $\kappa$ B がリン酸化され、細胞核へ移行することによって IL-6 などの炎症性サイトカインの発現が促進される。本研究で NF- $\kappa$ B のリン酸化と核移行をウェスタンブロット法によって確認したが、CS 塗布群とコントロールの間に有意な差は得られなかった。

##### D) 成果のまとめ

以上より、IL-6、TLR4 および MD2 の高発現とインターフェロン $\beta$  の産生低下傾向により、CS が TLR4-MD2 複合体を細胞膜に留めておく可能性が示唆されるが、本研究では確定的な結果を得るまでに至らなかった。また、樹状細胞の走化性は LPS 刺激前から CS によって活性化されていることから、感染などに対し CS を用いることによってより迅速な免疫応答ができると考えられる。本研究を基に更なるデータを積み重ねることによって、コンドロイチン硫酸を用いた免疫応答の制御は今後大いに期待できると考えられる。

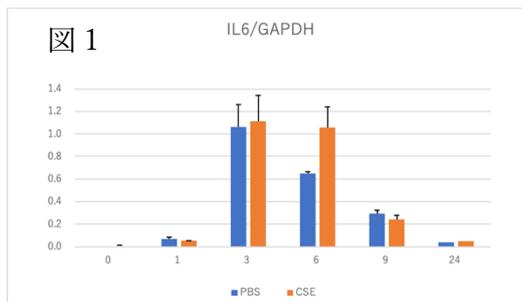
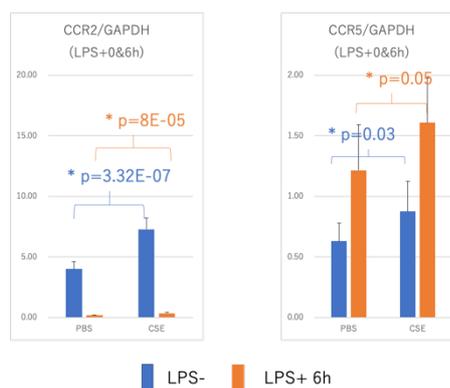


図 2 Chemokine receptors



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 幡野その子
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞の分化を制御するコンドロイチン硫酸の構造
3. 学会等名 骨免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 幡野 その子
2. 発表標題 Chondroitin sulfate regulates bone marrow mesenchymal stem cell differentiation.
3. 学会等名 89th Harden Conference - Proteoglycans: Matrix Master Regulators 2023, London, UK (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------