

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06074

研究課題名(和文) CD77によるヒトBリンパ球の活性化制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanism(s) of CD77-mediated BCR activation

研究代表者

竹松 弘 (Takematsu, Hiromu)

藤田医科大学・医療科学部・教授

研究者番号：80324680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：胚中心B細胞で特異的に発現誘導される糖脂質CD77に関して、その機能的な解析を行うため、B細胞抗原受容体(BCR)シグナル伝達に対する影響を調べた。細胞には、CD77合成酵素遺伝子A4GALTの野生型や変異型を用いて、異なる糖脂質発現プロファイルを持つ細胞を樹立し、その糖脂質の違いを元に、機能を解析した。

CD77はSignal capacitorとされるアダプター分子であるが、ヒトB細胞のBCRシグナルにおいては、CD19の糖鎖発現を変化させ、CD19およびその下流でのシグナル伝達を抑制する活性を持つことが明らかとなり、そのために必要となるN結合型糖鎖付加部位も明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚中心においてB細胞は活性化して、抗原特異的な獲得免疫応答がおこる。そのため、胚中心でのB細胞活性化の制御が、獲得免疫応答の制御であるとも言える。本研究では、これまで機能的な裏付けはないものの、胚中心B細胞の検出に用いられてきたCD77の機能的な解析を行った。CD77はBCRシグナル伝達制御因子であり、その制御がシグナル伝達におけるアダプター分子として働くCD19を介する者であることを明らかとした。CD19の糖鎖がその制御活性に関わる事など新たな制御機構の解明にも繋がったので、獲得免疫応答の制御に関わる重要な知見であると言える。

研究成果の概要(英文)：CD77 is a glycosphingolipid molecule induced in the germinal center B cells.

CD77 has been used to mark activated B cells in the germinal centers, very important microenvironment arose in the secondary lymphoid organs such as lymph nodes during acquired immunity response to T-cell dependent antigens. CD77 is biosynthesized from lactosylceramide with A4GALT reaction, transferring galactose in alpha1-4 linkage. We developed model B cell system, in which only glycosphingolipid species are differently expressed due to the introduction of various A4GALT cDNA or control vector. Using this cellular model, effect of CD77 on the B cell antigen receptor (BCR) signaling, activation signal for B cells exposed to the antigen for clonal selection, was analyzed. CD77 regulated CD19, a adaptor molecule downstream of BCR, activating PI3Kinase and PH-domain regulated serine/threonine protein kinases such as PDK1 and Akt1. For such regulation, CD19 glycan played important role.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：B細胞 胚中心 獲得免疫 糖脂質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

胚中心反応は、獲得免疫の要となる免疫応答に重要な反応である。胚中心はリンパ節などの二次リンパ器官内に形成される微小領域と定義され、外来抗原に反応して B リンパ球が活性化する場合である。このため、胚中心反応なしでは高親和性の抗体を作れず、長期の免疫記憶も成立しない。胚中心は現在も免疫学研究の焦点であり続けており、最近でも、COVID-19 重症患者での胚中心形成不全が病態の進行に関わる可能性が報告されているように (Kaneko et al., *Cell* (2020))、胚中心反応を制御することは免疫応答の成立にとって重要なプロセスである。これが SARS-CoV-2 の自然感染で起こらないとなると、自然感染による集団免疫の形成が起こらない可能性が高く、公衆衛生対策にも直結する重要な問題である。

歴史的に、その胚中心で活性化した B 細胞は、細胞表面糖鎖が変化することを目印に検出されてきた。すなわち、B 細胞は胚中心において活性化する際に細胞表面上の糖鎖をドラスティックに変化させ、これを検出するレクチンや抗体が単クローン抗体全盛の現在でも使用されている。その一方で、胚中心で糖鎖を変化させることが、B 細胞にどのような機能的変化をもたらしているかについての情報が欠けていた。リンパ球が糖鎖を使ってその制御を行う必然性として、免疫系のシグナル伝達の強度制御や経路特異的な細胞表面での制御の重要性が考えられる。B 細胞の抗原受容体(BCR)を介した抗原認識を起点とするシグナル伝達を例にとると、弱すぎると免疫不全となり、強すぎると自己免疫疾患となる。このため、正・負の制御活性を持つ共受容体群が応答制御を行い、適切な応答を可能にしている。糖鎖の付加は、一つのタンパク質に構造多様性をもたらすことができ、これら制御因子の翻訳後修飾として、その活性をリアルタイムで変化させるのに最適である。つまり、胚中心でのドラスティックな糖鎖変化も、B 細胞が活性化していく中で必要な応答を変化させていくための修飾として機能することが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、応募者が考案した、特定の糖鎖の発現を量的に制御できる研究法(CIRES 法)により、意図する胚中心 B 細胞糖鎖のみを的確に変化させた細胞系を用い、糖鎖の機能や作用機序を明らかにする事を目的とした。特に、胚中心 B 細胞で起こる糖鎖変化の免疫学的意義を解明するため、BCR シグナル伝達経路に対する制御活性を検証することを考えた。BCR に着目する理由は、胚中心が抗原特異的な獲得免疫における重要な反応であるため、抗原からのシグナルとの関連を検証する必要性を感じるからである。一方で、BCR シグナル伝達は複雑な下流経路を持ち、細胞増殖と細胞死など、一見正反対とも取れる様々な B 細胞応答を引き起こす。多彩な制御因子がこれを可能にしていると思われ、これは獲得免疫応答の中心をなす問いの一つであると考えが、その全貌が明らかになっているとは言い難い。今回の研究では、ヒト胚中心で特異的に誘導される CD77 抗原の、特に CD19 アダプター糖タンパク質を介した制御の機序を明らかにする事を具体的な目的とした。糖鎖の構造は動物種により大きく異なる。本研究では、糖鎖が細胞表面にあり、これを静脈注射などにより人為的に制御できる可能性も視野に入れ、ヒトでおこる糖鎖発現に着目して研究を進めることとした。

3. 研究の方法

以下の 2 点を重点的に解析した。

CD77 発現による、BCR シグナル伝達アダプター分子 CD19 の機能調節

BCR 下流で抗原により活性化されるアダプター分子には、CD19-PI3K 経路と BLNK-PLC 経路がある。そこで、胚中心 B 細胞マーカー CD77 の発現を誘導した A4GALT 発現細胞を作製し、その細胞を用いてそれぞれの経路の活性化を検討することを考えた。BCR 下流では主にシグナル伝達を担当するタンパク質のリン酸化の変化として検証できる。PLC 経路に関しては、その下流にカルシウムイオンの流入があり、BLNK のチロシンリン酸化と共に、カルシウムイオンの流入量で、細胞活性化の指標とすることを考えた。CD19 は、BCR からのシグナル伝達を、特に PI3 キナーゼに対するアダプターとしてシグナル伝達を正に制御する重要な因子である。本研究では、CD19 分子の下流シグナル伝達に及ぼす影響を、糖鎖発現変化との関連から明らかにしていくため、CD77 など糖脂質の発現を改変した各種 Namalwa 細胞(ヒト B 細胞株)を用い、抗原を模した anti-BCR 抗体を用いて、BCR シグナル伝達を活性化し、下流経路の細胞内因子のリン酸化状態の変化を中心に、その影響を検証した。この際、PI3 キナーゼ下流の因子群・アポトーシスに関わるとされる Akt や、胚中心で重要とされる高頻度突然変異体細胞による抗体の親和性成熟に関わる AID にも着目して解析を進めた。

CD19 の機能の糖鎖による制御

予備的研究から、CD77 を発現誘導すると、CD19 分子の N 結合型糖鎖が変化することが考えられた。しかしながら、どの糖鎖がどう変化するか、この糖鎖変化とシグナル伝達調節活性との因果関係など、不明な点は多かった。そこで、点変異導入によって複数ある糖鎖結合配列を欠損させた CD19 分子シリーズを作製し、CRISPR-Cas9 システムで CD19 を欠損させた糖脂質改変細胞に再導入して、実際に CD19 上の糖鎖の変化が CD19 の BCR シグナル伝達制御因子としての活性にどのように関わるのか、機能的に重要で変化する糖鎖はどの結合部位に存在するのか等を具体的に解明する事を考えた。

4 . 研究成果

糖脂質改変細胞の作製

現在までに、研究に用いる糖脂質改変 Namalwa 細胞が作製された。胚中心 B 細胞を模して CD77 の発現を誘導した A4GALT 細胞のほか、A4GALT の活性に必要な Dx/D モチーフを Tx/T に改変した細胞では、糖脂質プロファイルを検討すると、変異体であるため、CD77 生合成はおこなうだけでなく、同じラクトシルセラミドを基質とする GM3 生合成も阻害しており GM3 も抑制するラクトシルセラミド以降の糖脂質抑制細胞として使用できることが分かった。

シグナル伝達経路の解析

成熟 B 細胞は抗原と出会うことで、クローナルな細胞増殖をして、液性免疫応答に繋がる抗体を産生する。このため、獲得免疫応答は抗原特異的であり、異なる抗原を区別する。細胞表面の BCR は抗原と結合することで、チロシンリン酸化をとともなう細胞活性化応答を示す。使用した Namalwa 細胞は、IgM 型の BCR を発現する細胞であり、抗ヒト IgM 抗体 (実際には F(ab)₂ フラグメントを使用する) で活性化し、B 細胞に特徴的なシグナル伝達経路を活性化できる B lymphoma 細胞であった。そこで BCR を起点とした細胞内シグナル伝達経路について、抗チロシンリン酸抗体(4G10)での経時的なリン酸化の変化を調べた。その結果、刺激していない細胞ではほぼ見られないチロシンリン酸化されたタンパク質のバンドがウエスタンブロット解析で幅広く見られ、BCR シグナル伝達を解析するのにふさわしい細胞であった。4G10 での解析で

は、サイズが変化している主要(バンドがしっかり見える)タンパク質があり、分子量から CD19 であることが明らかとなった。A4GALT を導入することで CD77 の発現を誘導した細胞では、CD19 のチロシンリン酸化バンドでサイズのシフトなどの変化が見られた。このため、CD19 が CD77 の下流の因子として関わる可能性が考えられた。CD19 の 531 番目のチロシンのリン酸化 (p-Y531) を検出する抗体で解析すると、この部位での ITAM(immune-receptor tyrosine activation motif)と呼ばれるリン酸化が CD77 の発現で低下している事が明らかとなった。CD19 を含む多くのチロシンリン酸化バンドは A4GALT 変異 (糖脂質抑制) 細胞では亢進していた。

BCR 下流のもう一つの経路、BLNK-PLC 経路の解析では、CD19 と対照的に、A4GALT 細胞はコントロール細胞と変わらない BLNK チロシンリン酸化、カルシウムイオンの流入であった。一方で、A4GALT-TxT 細胞では BLNK リン酸化の亢進、その下流でのカルシウムイオンの流入亢進が見られた。すなわち、糖脂質は全体として BCR シグナル伝達を抑制する機能があるが、CD77 は経路特異的に CD19 のリン酸化に伴うその下流でのシグナル伝達に負の制御活性を持つことが明らかとなった。

糖鎖の解析

この CD77 による CD19 制御活性であるが、A4GALT 発現は CD19 の糖鎖変化を惹起していた。興味深いことに、CD19 以外の糖タンパク質の糖鎖は変化していないようであった。現在まで、CD19 の糖鎖変化については、糖鎖変化する糖鎖付加部位は膜から離れた部分であり、その部位を変異した糖鎖変異変異 CD19 ではその変化は起こらない。また、糖鎖変化のためには、CD19 の細胞内領域が必要であり、CD19 の糖鎖に A4GALT による P1 糖鎖が付いているわけでもなかった。また、バンドのシフトから考えられるようなシアル酸の付加の違いだけの問題ではないようで、シアリダーゼ処理をしても、泳動度の変化は起こるものの、A4GALT ありとなしではサイズが違っていた。また、糖鎖付加部位と Y531 のリン酸化との関連を調べると、その CD19 の糖鎖がリン酸化の程度を制御している事が考えられた。つまり、CD77 発現は、CD19 の糖鎖を変化させることで、CD19 のシグナル伝達のためのアダプター分子としてのリン酸化が制御されていることが明らかになった。

考察

近年、CD77 がマウスの系で、アジュバント活性をもつという研究が報告された。(Sharma P et al., *Science* (2024)) この報告のストーリーからすると、CD77 は免疫賦活活性があり、CD77 を投与することで、胚中心 B 細胞の活性化を強化する、とされる。使っている系が異なるため、直接の比較は出来ないが、我々の研究結果からは、CD77 は胚中心 B 細胞の活性化を抑制する活性があることが考えられた。現在の所、一見異なる結果が何に起因するのかは分からないが、糖脂質が B 細胞にとって、重要な分子であり、これが、人為的な B 細胞活性化制御にとって鍵となる可能性のある分子であることだけは確かなようである。さらなる研究の推進が望まれる。

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 4件／うちオープンアクセス 3件）

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 CD45 in immunodeficient B cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 723
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 Takahashi Shohei, Fukuhara Daisuke, Kimura Toru, Fukutomi Toshiyuki, Tanaka Eriko, Mikami Naoaki, Hada Ichiro, Takematsu Hiromu, Nishibori Yukino, Akimoto Yoshihiro, Kiyonari Hiroshi, Abe Takaya, Huber Otmar, Yan Kunimasa	4. 巻 614
2. 論文標題 USP40 deubiquitinates HINT1 and stabilizes p53 in podocyte damage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 198 ~ 206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.05.043	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 Hada Ichiro, Shimizu Akira, Takematsu Hiromu, Nishibori Yukino, Kimura Toru, Fukutomi Toshiyuki, Kudo Akihiko, Ito-Nitta Noriko, Kiuchi Zentaro, Patrakka Jaakko, Mikami Naoaki, Leclerc Simon, Akimoto Yoshihiro, Hirayama Yoshiaki, Mori Satoka, Takano Tomoko, Yan Kunimasa	4. 巻 33
2. 論文標題 A Novel Mouse Model of Idiopathic Nephrotic Syndrome Induced by Immunization with the Podocyte Protein Crb2	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Society of Nephrology	6. 最初と最後の頁 2008 ~ 2025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1681/ASN.2022010070	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 Takada Masaru, Fukuhara Daisuke, Takiura Toshihiko, Nishibori Yukino, Kotani Masashi, Kiuchi Zentaro, Kudo Akihiko, Beltcheva Olga, Ito Nitta Noriko, Nitta Kazuhiro R., Kimura Toru, Suehiro Jun Ichi, Katada Tomohisa, Takematsu Hiromu, Yan Kunimasa	4. 巻 37
2. 論文標題 Involvement of <sc>GLCC1</sc> in mouse spermatogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 e22680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202101667RR	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 Suganuma Yuki, Imamura Akihiro, Ando Hiromune, Kiso Makoto, Takematsu Hiromu, Tsubata Takeshi, Ishida Hideharu	4. 巻 40
2. 論文標題 Improved synthesis of CD22-binding sialosides and its application for further development of potent CD22 inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 225 ~ 246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-023-10098-8	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 Enterina Jhon R., Sarkar Susmita, Streith Laura, Jung Jaesoo, Arlian Britni M., Meyer Sarah J., Takematsu Hiromu, Xiao Changchun, Baldwin Troy A., Nitschke Lars, Shlomchick Mark J., Paulson James C., Macauley Matthew S.	4. 巻 38
2. 論文標題 Coordinated changes in glycosylation regulate the germinal center through CD22	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110512 ~ 110512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110512	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 Doi Hiroki, Matsui Taei, Dijkstra Johannes M., Ogasawara Atsushi, Higashimoto Yuki, Imamura Seiji, Ohye Tamae, Takematsu Hiromu, Katsuda Itsuro, Akiyama Hidehiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Andrographolide, isolated from Andrographis paniculata, induces apoptosis in monocytic leukemia and multiple myeloma cells via augmentation of reactive oxygen species production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 F1000Research	6. 最初と最後の頁 542 ~ 542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12688/f1000research.53595.2	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 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 -

[学会発表] 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Naito-Matsui Y., Asano H., Hamano-Takada K., Tsubata T., Oka S., Takematsu H.
2. 発表標題 Modulation of B cell receptor signaling in germinal center B cells by PNA epitope
3. 学会等名 Sialoglyco2022 (Oral) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯浅大史、内藤裕子、竹松弘
2. 発表標題 ヒト胚中心B細胞マーカーであるスフィンゴ糖脂質CD77はB細胞抗原受容体シグナル伝達を抑制する
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会 (口頭/ポスター)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯浅大史、内藤裕子、竹松弘
2. 発表標題 スフィンゴ糖脂質CD77によるCD19上のN型糖鎖構造の変化はB細胞抗原受容体シグナル伝達の抑制に関わる
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点第18回若手のカフォーラム (口頭)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊寛、井谷有希、岡昌吾、岩淵和久、小林俊秀、内藤裕子、竹松弘
2. 発表標題 サイコシンによるエンドサイトーシス誘導時の細胞膜陥入
3. 学会等名 第15回スフィンゴセラピー研究会（口頭）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯浅大史、濱野久美子、関亮佑、岡昌吾、内藤裕子、竹松弘
2. 発表標題 ヒト胚中心B細胞マーカーであるスフィンゴ糖脂質CD77はCD19のN型糖鎖付加を亢進させると共にB細胞抗原受容体シグナル伝達を抑制する
3. 学会等名 第63回日本脂質生化学会（口頭）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯浅大史、濱野久美子、関亮佑、岡昌吾、Nursha Ertunc、内藤裕子、竹松弘
2. 発表標題 ヒト胚中心B細胞マーカーCD77はB細胞抗原受容体シグナル伝達を抑制する
3. 学会等名 第85回生化学会中部支部例会（ショートトーク）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

免疫医科学分野 http://info.fujita-hu.ac.jp/~yuko.naito/index.html
--

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			
カナダ	University of Albarta			