

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6 月 6日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790631

研究課題名（和文）糖鎖によるNK細胞の活性化制御

研究課題名（英文）Regulation of NK cell activation by glycan

研究代表者

梶貝 孝慈 (HIGAI KOJI)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：70297711

研究成果の概要（和文）：本研究では、NK細胞に対する多糖類による免疫機能活性化の制御メカニズムを明らかにすべく研究を遂行した。その結果、我々が見出した糖鎖リガンドが、細胞傷害に影響を与えることやCD3zetaのリン酸化を介してシグナル伝達されていることを見出した。以上の結果から、標的細胞の糖鎖がNCR1やNCR3を介してNK細胞の活性化に影響をあたえることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we tried to clarify the regulation of activation of NK cells by polysaccharides. The reported glycan ligands of NKR and NCRs affected the cytotoxicity by NK cells and up-regulation of CD3zeta phosphorylation. These results suggested that the specific glycan of target cells affected the NK activation via NCR1 or NCR3 molecules.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：NK細胞、細胞傷害、糖鎖リガンド

1. 研究開始当初の背景

NK細胞は、癌細胞を異物として認識し排除する細胞であるが、近年糖鎖を認識するレクチンレセプターの発現が報告されている。そこで、以前NK細胞の細胞傷害性に及ぼす4糖（sLeX）の影響を検討した結果、NK細胞は、sLeX高発現細胞を強く認識し、その傷害性はsLeXを発現した分泌タンパク質で抑制された。NK細胞上のsLeX認識タンパクの解析を行った結果、CD94やNKG2DなどのKLRs（Killer lectin receptors）と呼ばれるNK受容体の関与することを明らかにした。また、NK細胞上のどのような分子に結合してNK活性を抑制するのかは、明らかとなっていない。そこで、平成19-20年度および平

成21-22年度(独)日本学術振興会科学研究費補助金により、Heparinやheparan sulfateなどのグルコサミノグリカンやFucoidanやλ-carrageenanといった硫酸化多糖類を新規糖鎖リガンドとして同定することに成功した。このことは、近年がんの治療法に用いられている、LAK療法に代表される免疫療法への応用が期待される重要な結果であると考えている。しかしながら、抗CD3抗体やIL-2が高価であり、保険適応がないため高額な治療費となることから患者の負担が大きくなり、すべてのがんに対して効果が見出せないという欠点がある。

2. 研究の目的

本研究では、平成 19-20 年度および 21-22 年度(独) 日本学術振興会科学研究費補助金(若手研究(B) 課題番号: 19790398、21790544)の援助により同定した、新規糖鎖リガンドである Heparin や Fucoidan)による、NK 細胞上に存在する CD94 や NKG2s などを介した免疫賦活療法などの治療戦略への応用を踏まえ、同定糖鎖とそれら受容体の相互作用や細胞応答、NK 細胞機能制御機構を解析した。

3. 研究の方法

本研究では、H21-22 年度の(独) 日本学術振興会科学研究費の補助による分子レベルの解析により得た知見をもとに、以下の研究を行った。

(1) 人工的な過硫酸化 GAGs の作製。

Heparin や硫酸化度の低い Chondroichin sulfate を化学的に硫酸化 (Maruyama et al., 1998) し、過硫酸化 GAGs および部位特異的脱硫酸化、低分子化体を人工的に作製した (2) heparan sulfate および α 2,6 シアリル化糖鎖高発現細胞の作製および NK 細胞による認識・細胞傷害

hST6Gal I および hSulf-1 を高発現させた糖鎖改変 K562 細胞を作成し、NK 細胞株 KHYG による細胞傷害を LDH Cytotoxicity Assay により解析した。

(3) 作成した過硫酸化 GAGs によるレクチンへの結合と NK 細胞の増殖・活性化

(1) で作成した人工的な過硫酸化 GAGs による NK 細胞の増殖を WST-1 assay により、NK 細胞の活性化の状態を、CD107a(LAMP-1)の細胞膜上への発現をフローサイトメトリにより解析した、また、リコンビナント受容体への結合を EIA により解析した。

(4) 同定した GAGs の固相化プレートによる細胞傷害を引き起こす NK 細胞上のレクチン受容体の同定

NCRs や KLRs のアダプター分子である DAP10, DAP12 および CD3zeta のチロシン酸化を免疫沈降およびウェスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

本研究では、KLRs や NCRs などのレクチン-糖鎖の結合活性が、細胞レベルにおいてどのように機能するのか、NK 細胞に対する多糖類による免疫機能活性化の制御メカニズムを明らかにすべく研究を遂行した。

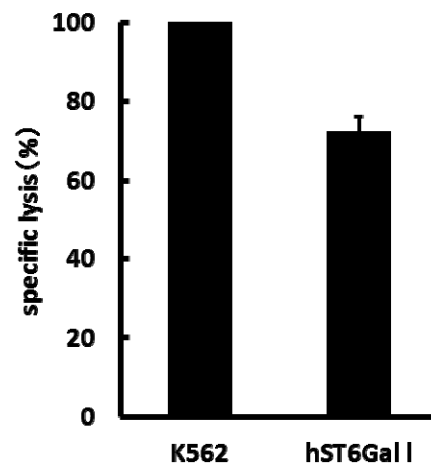
(1) 人工的な過硫酸化 GAGs の作製。

Heparin や硫酸化度の低い Chondroichin sulfate を化学的に硫酸化 (Maruyama et al., 1998) し、過硫酸化 GAGs および部位特異的脱硫酸化、低分子化体を人工的に作製した

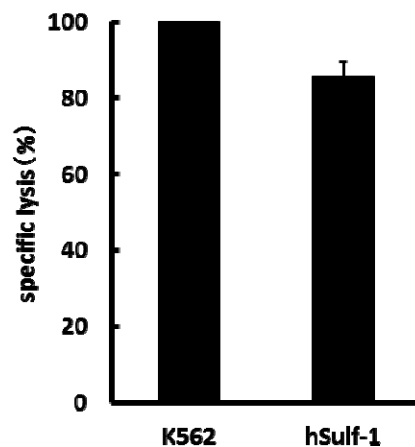
(2) heparan sulfate および α 2,6 シアリル化糖鎖高発現細胞の作製および NK 細胞による認識・細胞傷害

K562 細胞に対して、細胞表面の heparan sulfate を分解する hSulf-1、 α 2, 3-シアリル酸を減少させる hST6Gal I 高発現株を作成した。樹立した高発現株の遺伝子発現を RT-PCR、および細胞表面糖鎖をフローサイトメトリにて確認を行った。そして、NK 細胞による細胞傷害活性を測定した結果、hST6Gal I を高発現させた K562/pEB-Multi/hST6Gal I 細胞に対する細胞傷害活性は、K562/wild と比較して約 75%にまで低下した。同様に、hSulf-1 を高発現させた K562/pIRES/hSulf-1 細胞に対する細胞傷害活性は、弱いながらも約 85%程度に低下が認められた(図 1)。このことは、細胞表面の α 2, 3-シアリル酸やヘパラン硫酸発現により細胞傷害が制御されていることを示唆しているものと考えられる。

(A) K562/pEB-Multi/hST6Gal I



(B) K562/pIRES/hSulf-1



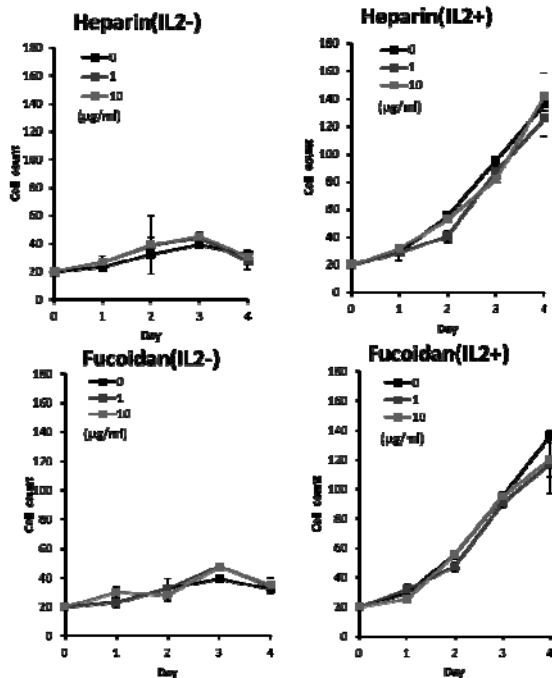
(図 1) 糖鎖改変 K562 細胞に対する KHYG による細胞傷害活性

(A) hST6Gal I K562

(B) hSulf-1 高発現 K562

(3) 作成した過硫酸化 GAGs によるレクチンへの結合と NK 細胞の増殖・活性化

Heparin の部位特異的脱硫酸化体および Chondroitin sulfate-B (CS-B) を化学的に硫酸化し、KLRs や NCR に対する結合を EIA により解析した。その結果、NKG2D は CS-B に結合しなかったが、過硫酸化 CS-B に対して強い結合を見出すことができた。しかしながら、部位特異的脱硫酸化 Heparin や過硫酸化 CS-B による NK 細胞の細胞増殖 (図 2) と Lamp-1 発現 (図 3) には変化は認められなかったことから、Ca 流入を介した細胞内イベントには関与しないものと思われるが、fucoidan による前処理によりわずかながら細胞傷害活性の上昇が見出されたことから、NK 受容体を介したシグナル伝達が起きている可能性が示唆された。



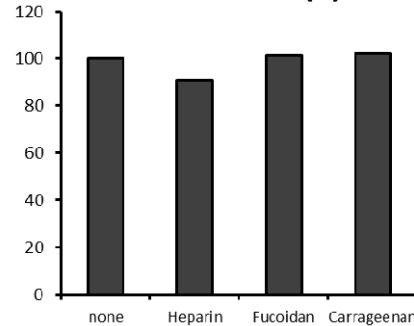
(図 2) 可溶性糖鎖による NK 細胞の細胞増殖

(4) 同定した GAGs の固相化プレートによる細胞傷害を引き起こす NK 細胞上のレクチン受容体の同定

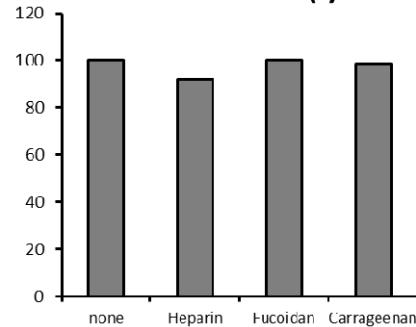
NCRs や KLRs のアダプター分子である DAP10, DAP12 および CD3zeta のチロシンリン酸化を免疫沈降およびウェスタンブロットにより解析した。細胞傷害を引き起こす NK 細胞における、可溶性の糖鎖による KHYG 細胞内 DAP10 や DAP12, CD3zeta のリン酸化は認められなかった。一方、heparin-BSA および fucoidan-BSA を固相化したプレートによる KHYG 細胞の刺激では、CD3zeta のリン酸化の上昇が認められた (図 4)。しかし、DAP10

および DAP12 のチロシンリン酸化の増加は認められなかった。CD3zeta は NCR1 および NCR3 のアダプター分子であることが報告されているので糖鎖を介した細胞傷害は、これらの分子を介して制御されている可能性が示唆された。

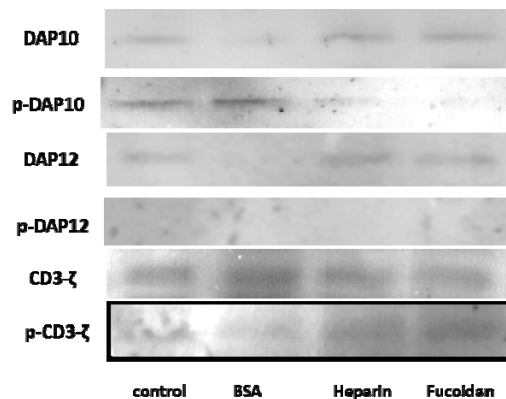
可溶性 IL2(+)



可溶性 IL2(-)



(図 3) 可溶性糖鎖による NK 細胞上 Lamp-1 発現



(図 4) GAGs 固相化プレート刺激による DAP10, 12, CD3 のリン酸化

以上の解析から、標的細胞の糖鎖が NK 細胞に認識されることが明らかとなり、その候補として NCR1 および NCR3 を考えられる。また、NKG2D や NCR2 などの他の分子が、細胞傷害活性を示すためには異なる分子との細胞間相互作用が必要であることが示唆された

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 7 件)

1) Higai K., Matsumoto K.: Glycan ligand specificity of killer lectin receptors. Yakugaku Zasshi. 132(6):705-12 2012.

(査読なし)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/132/6/132_705/article

2) Ito K., Higai K., Shinoda C., Sakurai M., Yanai K., Azuma Y., Matsumoto K.: Unlike NKp30, natural cytotoxicity receptor NKp44 binds to multimeric alpha2,3-NeuNAc-containing N-glycans. Biol. Pharm. Bull. 35 (4), 1-7 2012

(査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/35/4/35_4_594/article

3) Higai K., Matsumoto S., Kimura M., Imaizumi Y., Yanai K., Azuma Y., Matsumoto K.: Binding properties of CD94 to sulfated glycans and alpha2,3-NeuAc-containing glycoprotein and its mutagenesis analysis. The Open Biotechnology Journal, 5, 33-38, 2011

(査読有)

<http://www.benthamscience.com/open/tobiotj/articles/V005/33TOBIOTJ.pdf>

4) Higai K., Itoh A., Imaizumi Y., Suzuki C., Xin X., Azuma Y. and Matsumoto K.: Binding properties of CD94 to sulfated glycans and alpha2,3-NeuAc-containing glycoprotein and its mutagenesis analysis. The Open Biotechnology Journal, 5, 14-20, 2011

(査読有)

<http://www.benthamscience.com/open/tobiotj/articles/V005/14TOBIOTJ.pdf>

5) Ito K., Higai K., Sakurai M., Shinoda C., Yanai K., Azuma Y. and Matsumoto K.: Binding of Natural cytotoxicity receptor NKp46 to sulfate- and alpha2,3-NeuAc-containing glycans and its mutagenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 406 (3):377-82 2011

(査読有)

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X11002427>

6) Xin X, Higai K., Imaizumi Y., Suzuki

C., Ito K., Itoh A., Matsumoto S., Azuma Y., and Matsumoto K.: NKG2A and NKG2C bind to sulfated glycans and alpha2,3-NeuAc-containing glycoproteins. Biol. Pharm. Bull. 34(4):480-485 2011.

(査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/4/34_4_480/article

7) Higai K., Suzuki C., Imaizumi Y., Xin X., Azuma Y. and Matsumoto K.: Binding affinities of NKG2D and CD94 to sialyl Lewis X-expressing N-glycans and heparin. Biol. Pharm. Bull. 34(1): 8-12 2011

(査読有)

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/34/1/34_1_8/article

[学会発表] (計 5 件)

1) 今泉 雄三、小松 由佳、桧貝 孝慈、東 祐太郎、松本 宏治郎 : KillerLectin-likeReceptors (KLRs) の糖鎖リガンド特異性(第 133 回日本薬学会年会, 2013. 3. 29, パフィシコ横浜)

2) 伊藤 健一郎、高橋 真美子、桧貝 孝慈、東 祐太郎、吉田 直弘、松本 宏治郎 : Naturalcytotoxicityreceptors (NCRs) の糖鎖リガンド特異性(第 133 回日本薬学会年会, 2013. 3. 29, パフィシコ横浜)

3) 伊藤 健一郎、篠田 千尋、桧貝 孝慈、松本 宏治郎 : NCRsの糖鎖リガンドの解析(第 85 回日本生化学会大会, 2012. 12. 16, 福岡マリンメッセ)

4) 桧貝 孝慈、今泉 雄三、Xin Xin、松本 早代、伊藤 あゆみ、木村 恵、柳内 和幸、東 祐太郎、松本 宏治郎 : キラーレクチン様受容体の糖鎖リガンドの解析(第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 24, 京都国際会議場)

5) 篠田 千尋、桧貝 孝慈、伊藤 健一郎、櫻井 瑞葉、柳内 和幸、東 祐太郎、松本 宏治郎 : NCRsの糖鎖リガンドの解析(第 84 回日本生化学会大会, 2011. 9. 24, 京都国際会議場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桧貝 孝慈 (HIGAI KOJI)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 70297711

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし