

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293062

研究課題名(和文) Bリンパ球に発現するシグレックとその糖鎖リガンドについての研究

研究課題名(英文) Studies on Siglecs expressed on B lymphocytes and their glycan ligands

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) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：Siglecファミリーの分子は種々の免疫細胞に発現し、シアル酸を認識して主に細胞の活性化を抑制する。本研究では、Siglecの1つCD22が糖鎖依存的に結合する同じ細胞上の分子(シスリガンド)を、近傍の分子を標識する手法を用いて同定した。ついで、CD22のシスリガンドCD45の機能解析により、シスリガンドによるSiglec制御の本態を明らかにした。さらに、シアル酸含有糖脂質ガングリオシドへの自己抗体を伴うギラン・バレー症候群に関連するSiglec-10多型の解析により、Siglec-10の機能低下がガングリオシドへの免疫応答を誘導し、本症候群の発症に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Siglecs expressed in various immune cells recognize sialic acids and mostly inhibit cell activation. In this study, we demonstrated that sialic acid-containing Siglec ligands expressed on the same cell (cis-ligands) can be efficiently labeled by proximity labeling. We elucidated how cis-ligands regulate Siglecs by analyzing CD45 that was isolated as a cis-ligand of CD22, a Siglec. Moreover, we demonstrated that the polymorphism of Siglec-10 associated with Guillain-Barre syndrome in which autoantibodies to gangliosides, sialic acid-containing glycolipids, are produced regulates binding of Siglec-10 to gangliosides. This result suggests that decreased activity of Siglec-10 allows immune responses to gangliosides, resulting in development of this syndrome.

研究分野：生化学、免疫学

キーワード：シグレック CD22 Siglec-10 シスリガンド CD45 シアル酸 シグナル伝達 ギラン・バレー症候群

1. 研究開始当初の背景

Siglec ファミリーの分子はシアル酸を認識し、種々の免疫細胞に発現して主に抑制性の機能を持つ。シアル酸は動物細胞に多量に発現するがそれ以外での発現はまれであるため、Siglec がシアル酸に反応して免疫細胞の活性化を抑制することにより、微生物への免疫応答を保ちつつ自己抗原への応答を抑制する機能があると考えられている。一方、Siglec は同じ細胞に発現するリガンド(シスリガンド)と構成的に会合することが示されているが、シスリガンドの役割には不明な点が多い。

CD22 は主に B リンパ球に発現する Siglec ファミリーの分子で、シアル酸の中でも 2,6 シアル酸を特異的に認識する。我々は、2,6 シアル酸に比べて 1 万倍高い親和性で CD22 に結合するシアル酸誘導体 GSC718 を開発した。また、2,6 シアル酸合成に必須のシアル酸転移酵素 ST6GalI を欠損するマウスが作出されており、このマウスの解析から内因性リガンドが CD22 の機能を抑制することが知られていた。

B リンパ球に発現する Siglec はシアル酸を含有する自己抗原への自己抗体産生を抑制すると予想されるが、実際に Siglec が自己抗体産生や自己免疫疾患の発症に関連するかは明らかではなかった。我々は、シアル酸を含有するガングリオシドへの自己抗体を産生す神経免疫疾患であるギラン・バレー症候群患者の Siglec 遺伝子配列の解析を行い、Siglec-10 のリガンド結合ドメインにギラン・バレー症候群に関連する多型を同定した。

2. 研究の目的

B リンパ球をはじめ動物細胞はシアル酸が付加された種々の糖タンパク質や糖脂質を発現する。シスリガンドによる CD22 機能制御の解明を行うために、まず、B リンパ球表面で CD22 に 2,6 シアル酸依存的に会合する糖タンパク質を同定する手法の開発を行う。

CD22 のシスリガンドとして同定された糖タンパク質を欠損する B リンパ球を用いて、シスリガンドがどのように CD22 の機能を制御するか明らかにする。

ギラン・バレー症候群に関連する Siglec-10 の遺伝子多型がリガンド結合ドメインに存在することから、この多型が Siglec-10 による本症候群の自己抗原であるガングリオシドへの反応性に影響することが予想される。そこで、この遺伝子多型が Siglec-10 のガングリオシドへの結合を変化させるかを明らかにする。

3. 研究の方法

一般にレクチンと糖鎖の結合は弱く、免疫沈降によるリガンドの同定は困難である。そこ

で、ごく近傍の分子を同定する手法である Proximity labeling 法を用いて CD22 の近傍の分子を同定する。Proximity labeling 法で同定されたい分子のうち CD22 の機能を制御することが予想される分子について、その欠損 B リンパ球での CD22 の機能が正常 B リンパ球と違いがあるかを明らかにする。

ギラン・バレー症候群に関連する Siglec-10 の遺伝子多型をもつ Siglec-10 と正常 Siglec-10 の組み換えタンパク質を作成し、種々のガングリオシドへの反応性を比較する。

4. 研究成果

マウス脾臓 B リンパ球に Horse Radish Peroxidase (HRP) で標識した抗 CD22 抗体を反応させた後に Selective Proteomic Proximity Labeling Assay Using Tyramide (SPPLAT) 法で CD22 の近傍の分子をビオチン標識し、Western blot 法で解析したところ、標識されたタンパク質の存在が明らかとなった。これのタンパク質の多くは、リガンドを欠損する ST6GalI 欠損 B 細胞や、GSC718 で処理することでリガンドとの結合を阻害した B 細胞では標識されなかった。さらに、特異抗体を用いた Western blot 法により、CD22、IgM および CD45 がリガンド依存的に CD22 に会合していることが明らかとなった。

B 細胞株を用いた解析から CD45 が CD22 の機能を抑制することが示唆されたため、CD22 シスリガンドによる CD22 機能抑制に CD45 がシスリガンドとして関与することが予想された。そこで、CD45 欠損マウスの脾臓 B 細胞の解析を行なった。CD45 欠損 B 細胞では、B 細胞を用いた先行論文の結果とは正反対に CD22 の機能がむしろ抑制されていた。また、CD45 欠損 B 細胞でも正常 B 細胞と同様にシスリガンドによる CD22 の機能抑制がおこっていた。これらの結果は、CD45 が CD22 のシグナル抑制機能発現で重要な役割を果たすことを示すとともに、CD22 の機能抑制に関わる主要なシスリガンドではないことを示している。

通常 CD22 の機能解析は、B 細胞抗原受容体 (BCR) を架橋した際のシグナル伝達を CD22 が抑制することを指標として行なっている。一方、我々は BCR を架橋しない状態で B 細胞を GSC718 で処理し、CD22 とシスリガンドの作用を阻害すると、低いレベルではあるが細胞内 Ca²⁺イオン濃度が上昇することから、CD22 のシスリガンドが B 細胞の基礎シグナルレベル(トニックシグナル)を制御することを明らかにした。また、この CD22 シスリガンドによる B 細胞トニックシグナルの制御は、ST6GalI 欠損マウスを用いた知見によっても確認することができた。一方、CD45 欠損 B 細胞では GSC718 による細胞内 Ca²⁺イオン濃度

の上昇が増強していた。この結果は、CD45 が BCR 架橋のない状態で CD22 の機能をシスリガンドとして抑制することを示している。これらの結果から CD45 が CD22 を機能的に制御するシスリガンドであることが明らかとなった。

種々の組み換え Siglec-10 タンパク質のコンストラクトを作成し、最終的に組み換え Siglec-10 タンパク質の産生に成功した。種々のガングリオシドへの反応性を ELISA で解析したところ、ギラン・バレー症候群に関連する Siglec-10 は正常 Siglec-10 に比べてガングリオシドへの結合性が顕著に低下していた。この結果から、Siglec-10 がガングリオシドに結合して B リンパ球の機能を抑制することで、ガングリオシドへの自己抗体の産生を抑制し、ギラン・バレー症候群の発症を抑制す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 10 件)

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., CD22-binding synthetic sialosides regulate B lymphocyte proliferation through CD22 ligand-dependent and independent pathways, and enhance antibody production in mice., *Front. Immunol.*, 査読有, 9, 2018, 820.

Alborzian Deh Sheikh, A., Akatsu, C., Imamura, A., Abdu-Allah, H. H. M., Takematsu, H., Ando, H., Ishida, H. and Tsubata, T., Proximity labeling of cis-ligands of CD22/Siglec-2 reveals stepwise α 2,6 sialic acid-dependent and -independent interactions., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 査読有, 495, 2018, 854-859.

Tsubata, T., Negative regulation of B cell responses and self-tolerance to RNA-related lupus self-antigen., *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 査読有, 94, 2018, 35-44.

Tsubata, T., B cell tolerance and autoimmunity., *F1000Research (F1000 Faculty Rev.)*, 査読有, 6, 2017, 391.

Akatsu, C., Shinagawa, K., Numoto, N., Liu, Z., Konuscan, A.U., Aslam, M., Phoon, S., Adachi, T., Furukawa, K., Ito, N. and Tsubata, T., CD72 negatively regulates B lymphocyte responses to the lupus-related endogenous Toll-like receptor 7 ligand Sm/RNP., *J. Exp. Med.*, 査読有, 213, 2016, 2691-2706.

Muro, R., Nitta, T., Okada, T., Ideta, H., Tsubata, T. and Suzuki, H., The Ras GTPase-activating protein Rasal3 supports survival of naive T cells., *PLoS ONE*, 査読有, 10, 2015, e0119898.

Ouchida, R., Lu, Q., Liu, J., Li, Y., Chu, Y., Tsubata, T. and Wang, J.-Y., Fc μ R interacts and cooperates with the B cell receptor to promote B cell survival., *J. Immunol.*, 査読有, 194, 2015, 3096-3101.

Kawai, Y., Ouchida, R., Yamasaki, S., Dragone, L., Tsubata, T. and Wang, J.-Y., LAPTM5 promotes lysosomal degradation of intracellular but not the cell surface CD3 ζ . *Immunol. Cell Biol.*, 査読有, 92, 2014, 527-534.

Naito-Matsui, Y., Takada, S., Kano, Y., Iyoda, T., Sugai, M., Shimizu, A., Inaba, K., Nitschke, L., Tsubata, T., Oka, S., Kozutsumi, Y. and Takematsu, H., Functional evaluation of activation-dependent alterations in the sialoglycan composition of T cells., *J. Biol. Chem.*, 査読有, 289, 2014, 1564-1579.

Aslam, M., Kishi, Y. and Tsubata, T., Excess CD40L does not rescue anti-DNA B cells from clonal anergy., *F1000Research*, 査読有, 2, 2014, 218.

[学会発表](計 29 件)

Tsubata, T., Role of CD45 (PTPRC) in the regulation of SHP-1 (PTPN6)-activating receptor CD22., The 3rd Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, 2017

Tsubata, T., The Inhibitory B Cell Co-Receptor CD72 Regulates B Cell Response to Self Nucleic Acids Crucial for Development of SLE., Korean Association of Immunologists (KAI) International Meeting 2017, Korea, 2017

鏑田 武志, B リンパ球に発現する CD22/Siglec-2 を標的とした免疫増強化合物の開発, 第 8 回次世代アジュバント研究会, 2015

Tsubata, T., Role of CD22/Siglec2 and its ligand in B lymphocyte activation., Joint annual meeting of SFG &JSCR, Integrating Glycoscience from Biology and Chemistry to Medicine, USA, 2014

Tsubata, T., Synthetic sialosides that regulate CD22/Siglec-2, a B lymphocyte membrane molecule activating SH2containing phosphatases., 11th International Conference on Protein Phosphatas, 2014

〔図書〕(計1件)

Tsubata, T., et al., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Siglecs and B cell regulation. (Glycoscience: Biology and Medicine), 2014, 400

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 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