

令和 2 年 4 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19542

研究課題名(和文)糖鎖を標的とした制御性T細胞動態制御法の開発

研究課題名(英文)Regulation of regulatory T cell trafficking by targeting glycans

研究代表者

川島 博人(KAWASHIMA, Hiroto)

千葉大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：50260336

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文):制御性T細胞は免疫制御の鍵となる細胞であり、その体内動態を人為的に制御することができれば、アレルギー性疾患等の有効な治療法の確立につながることを期待される。本研究では、独自に樹立した抗糖鎖抗体を用いた制御性T細胞の体内動態制御法の開発を試みた。その結果、抗糖鎖抗体S2が、制御性T細胞の鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)への選択的な蓄積を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自開発したS2抗体が、NALTへの制御性T細胞の選択的な蓄積を誘導するとともにマウスアレルギー性鼻炎を有意に抑制するユニークな活性を持つ抗糖鎖抗体であることを見出した。アレルギー性鼻炎の治療には対症療法が広く用いられているが、本研究の成果は、制御性T細胞の体内動態の人為的制御に基づくアレルギー性疾患の根本的な治療法の開発に繋がる知見として重要と考えられる。

研究成果の概要(英文):Nasal-associated lymphoid tissue (NALT) is a mucosal lymphoid tissue that functions as a border of defense against inhaled antigens as well as nasal allergic responses. Lymphocyte homing to NALT is mediated by the interaction between L-selectin on lymphocytes and specific glycans on high endothelial venules (HEV) in NALT. We previously generated an anti-glycan monoclonal antibody S2 which recognizes glycans specifically expressed on HEV. In this study, we found that S2 administration suppressed homing of naive lymphocytes and induced the accumulation of Treg cells in NALT. Consequently, S2 administration to ovalbumin (OVA)-immunized mice resulted in the amelioration of nasal symptoms and reduction of OVA-specific serum IgE. The expression of Th2-related cytokines was also significantly diminished after S2 administration in the OVA-immunized mice. Taken together, these results suggest that S2 would be useful for the treatment of allergic rhinitis.

研究分野：免疫学、生化学

キーワード：制御性T細胞 リンパ球ホーミング アレルギー性疾患 抗糖鎖抗体 L-セレクチン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アレルギー性鼻炎は、経鼻的に侵入する抗原に対して感作された個体が、同一抗原に再暴露されることにより発症する。現在、その治療には鼻炎症状を緩和する対症療法が広く用いられているが、抗原への感作を阻害することができればアレルギー性鼻炎の原因療法が可能になると期待される。抗原感作過程においては、血流中を循環するリンパ球が、高内皮細静脈(**high endothelial venule; HEV**)とよばれる丈の高い特殊な血管と特異的に相互作用し、図1に示す一連の分子間相互作用を介して、リンパ組織の実質に浸潤する。このリンパ球と HEV との特異的な接着を抑制することができれば、生体のアレルギー応答を効果的に制御できると考えられる。リンパ球がこの特殊な血管である HEV を介してリンパ節実質へと浸潤する際には、多段階の分子間相互作用が関与する。その最も初期の段階では、血流による強いずり応力のもとで作用することのできる糖鎖と糖鎖認識分子 L-セレクチンの相互作用が関与する。実際に我々はこれまでに、独自に樹立した硫酸基転移酵素欠損マウスを用いて、HEV に特異的に発現する特殊な硫酸化糖鎖がリンパ球の二次リンパ組織への浸潤(ホーミング)およびアレルギー性皮膚炎に必須の役割を果たすことを証明してきた。本研究で着目する制御性 T 細胞は免疫制御の鍵となる細胞であり、その体内動態を人為的に制御することができれば、アレルギー等の免疫関連疾患の有効な治療法の確立につながる事が期待される。しかし、制御性 T 細胞の体内動態を規定する分子機構に関しては不明な点が多い。

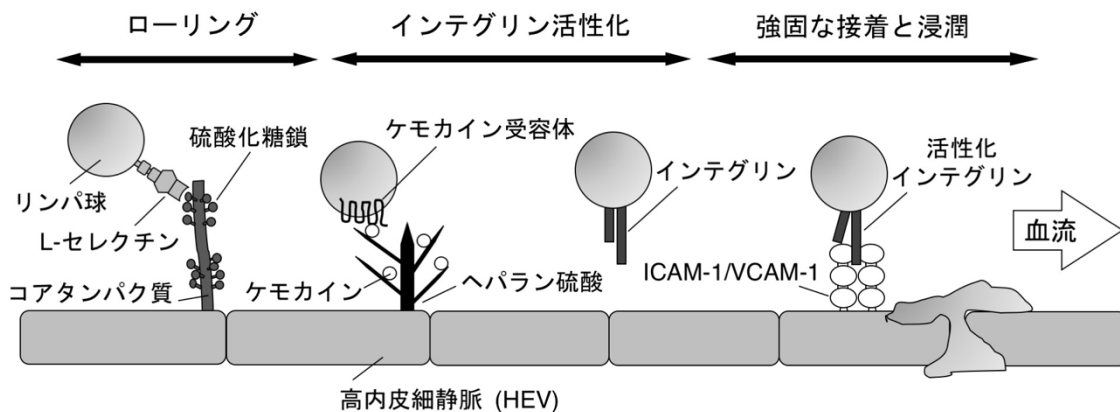


図1. リンパ球と HEV の相互作用 リンパ球は、HEV との一連の相互作用を介して免疫応答の起こる場であるリンパ組織の実質へと浸潤する。

2. 研究の目的

糖鎖は、細胞間認識や細胞接着、細胞間シグナル伝達等の多様な機能を発揮し、新規創薬標的として有望視されている。しかし、質の良い抗糖鎖抗体の樹立は困難であり、これまでに抗糖鎖抗体医薬開発の前例はない。このような状況のもと我々は、糖鎖合成酵素欠損マウスを同酵素の強制発現株で免疫することにより、効率良く抗糖鎖抗体を作製する新しい方法論を開発し、リンパ球のリンパ組織への移行(リンパ球ホーミング)に関与する様々な糖鎖に対する新規抗糖鎖抗体の樹立に成功した。この方法論を記述した論文は、"JBC Papers of the Week"に選定され、独創性が高く評価されている。本研究では、これまでに開発した抗体のうち、図2に示す HEV に特異的に発現する糖鎖を認識する S2 抗体を用いたマウスアレルギー性鼻炎モデルの解析により、糖鎖のアレルギー性疾患発症における機能と同抗体による疾患治療効果を解明し、免疫アレルギー疾患に対する、糖鎖を標的とした新規治療の分子基盤の確立を目的とする。

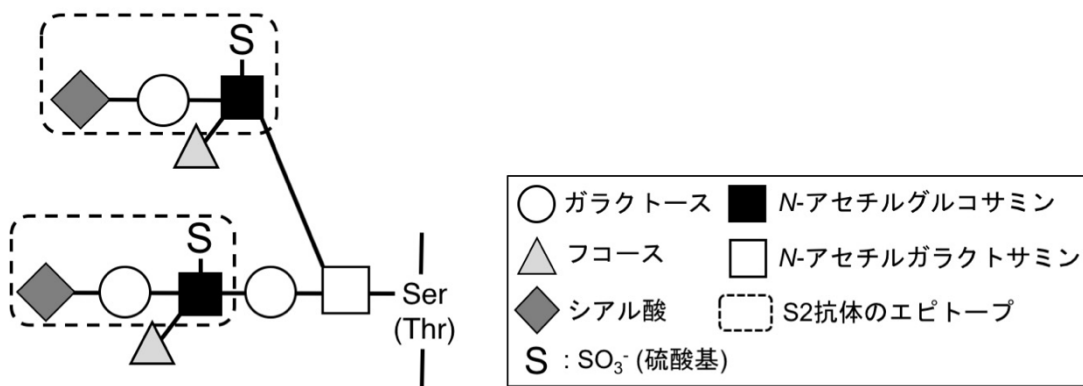


図2. S2 抗体の認識糖鎖の構造 S2 抗体は、HEV に特異的に発現する糖鎖構造中の破線で囲んだ部分の構造を認識する。

3. 研究の方法

(1)二次リンパ組織 HEV における糖鎖発現の解析

マウス末梢リンパ節(PLN)およびマウス鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)を採取し、抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 を用いた蛍光免疫染色により、リンパ球ホーミングを司る血管である高内皮細胞静脈(HEV)における糖鎖発現を解析した。

(2)NALT へのホーミングに対する S2 抗体の効果の解析

野生型 C57BL/6 マウスに抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 を尾静注した。続いて蛍光標識した抗原未刺激のリンパ球を尾静注し、2 時間後に NALT にホーミングした蛍光標識リンパ球をフローサイトメトリーで解析した。また、S2 抗体もしくは PBS 投与 2 日後に NALT を採取し、NALT における通常型 T 細胞および制御性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析した。

(3)S2 抗体を用いたマウスアレルギー性鼻炎の発症抑制

抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 投与マウスおよび無処置マウスを、卵白アルブミン(OVA)の経鼻投与により抗原感作した。再度 OVA を経鼻投与した後に、静粛な実験室内で一定時間内におけるくしゃみおよび鼻かき行動の回数を計測した。また、血清中の OVA 特異的 IgE 量をサンドイッチ ELISA により測定した。

(4)サイトカインおよび転写因子 FoxP3 の発現に及ぼす S2 抗体投与の影響

抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 投与マウスおよび無処置マウスを、OVA の経鼻投与により抗原感作したのちに、NALT から total RNA を回収し、リアルタイム PCR により、サイトカイン IL-5, IL-10, IL-13 および転写因子 FoxP3 の発現を解析した。

4. 研究成果

(1)マウス二次リンパ組織 HEV における糖鎖発現の解析

抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 により、マウス PLN および NALT の HEV に対する強い染色が認められた。この染色は硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1/-2 ダブルノックアウトマウスにおいて完全に消失したことから、硫酸化糖鎖特異的であることが示された。

(2)NALT へのホーミングに対する S2 抗体の効果の解析

S2 抗体は NALT への抗原未刺激のリンパ球のホーミングを有意に抑制した。次に S2 抗体投与 2 日目の時点で NALT を採取し、NALT における通常型 T 細胞および制御性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーで解析したところ、NALT における制御性 T 細胞の蓄積が起こることを見出した。

(3)S2 抗体を用いたマウスアレルギー性鼻炎の発症抑制

OVA をモデル抗原として用いたマウスアレルギー性鼻炎において、S2 抗体の投与により抗原特異的 IgE 抗体産生およびくしゃみ・鼻かき行動の回数が有意に低下した。また、この S2 抗体の投与によって、OVA 特異的な IgE の産生が有意に減少した。

(4)サイトカインおよび転写因子 FoxP3 の発現に及ぼす S2 抗体投与の影響

上記の OVA を用いたマウスアレルギー性鼻炎モデルにおいて、S2 抗体を投与した結果、NALT における制御性 T 細胞特異的転写因子 FoxP3 の発現の上昇が認められた。これは、上記(2)の S2 抗体投与による NALT への制御性 T 細胞の蓄積と一致する結果である。また、制御性 T 細胞から産生される抑制性サイトカイン IL-10 の発現は亢進し、アレルギー反応に関与する Th2 免疫応答において重要な役割を果たす IL-5, および IL-13 の発現の低下が認められた。

以上の結果より、抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、抗原未刺激のリンパ球の NALT へのホーミングを選択的に抑制するとともに制御性 T 細胞の蓄積を誘導し、マウスアレルギー性鼻炎を抑制するユニークな活性を持つ抗体であると考えられた。この NALT における制御性 T 細胞の蓄積の少なくとも一部は、S2 によって認識される糖鎖とは異なる糖鎖を介した制御性 T 細胞の NALT へのホーミングによるものである可能性があり、今後のさらなる解析が必要と考えられる。本研究により、抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 を用いて、リンパ球サブセット特異的に体内動態を制御することにより、アレルギー疾患の発症を効果的に抑制できる可能性が示された。本研究で用いた抗糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、アレルギー疾患治療への応用の可能性を持つ有用な抗体であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takaya Akiko, Takeda Hikari, Tashiro Shogo, Kawashima Hiroto, Yamamoto Tomoko	4. 巻 294
2. 論文標題 Chaperone-mediated secretion switching from early to middle substrates in the type III secretion system encoded by Salmonella pathogenicity island 2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 3783 ~ 3793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA118.005072	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 Kikuchi Norihito, Ye Jiabin, Hirakawa Jotaro, Kawashima Hiroto	4. 巻 42
2. 論文標題 Forced Expression of CXCL10 Prevents Liver Metastasis of Colon Carcinoma Cells by the Recruitment of Natural Killer Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 57 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-00538	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 平川城太郎、川島博人	4. 巻 90
2. 論文標題 新規抗糖鎖モノクローナル抗体を用いたリンパ球体内動態の解析	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 231-134
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Uchida Tomomi, Ueta Hisashi, Xu Xue-Dong, Hirakawa Jotaro, Tahara Kazunori, Zhou Shu, Sawanobori Yasushi, Simmons Szandor, Kitazawa Yusuke, Kawashima Hiroto, Matsuno Kenjiro	4. 巻 30
2. 論文標題 Rapid immunosurveillance by recirculating lymphocytes in the rat intestine: critical role of unsulfated sialyl-Lewis X on high endothelial venules of the Peyer's patches	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 23 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1093/intimm/dxx072	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 Low Shulin、Hirakawa Jotaro、Hoshino Hitomi、Uchimura Kenji、Kawashima Hiroto、Kobayashi Motohiro	4. 巻 1:22155417753363
2. 論文標題 Role of MAdCAM-1-Expressing High Endothelial Venule-Like Vessels in Colitis Induced in Mice Lacking Sulfotransferases Catalyzing L-Selectin Ligand Biosynthesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Histochemistry & Cytochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1369/0022155417753363	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29件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Hirakawa J and Kawashima H
2. 発表標題 Anti-sulfated-glycan monoclonal antibody S2 inhibits lymphocyte recruitment to nasal-associated lymphoid tissues and attenuates allergic rhinitis.
3. 学会等名 AAI Annual Meeting (IMMUNOLOGY 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中井克也、堀本義哉、荒川敦、齊藤光江、川島博人、入村達郎
2. 発表標題 乳癌における高内皮細静脈の発現状況について
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 糖鎖分子を標的とした新規アレルギー疾患治療抗体の開発
3. 学会等名 第19回Pharmaco-Hematology symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 抗糖鎖抗体S1を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析
3. 学会等名 第37回 日本糖質学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島博人
2. 発表標題 糖と免疫
3. 学会等名 TIAナノバイオサマースクール(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 抗糖鎖抗体S1を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析
3. 学会等名 第91 回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊偉、劉偉、松岡美紗、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 新規抗糖鎖モノクローナル抗体F2を用いた気管支喘息モデルの治療効果の検討
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菊池紀仁、葉家斌、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 ケモカインCXCL10による大腸がん細胞の肝転移の抑制
3. 学会等名 第62回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川島博人
2. 発表標題 L-セレクチンのリガンド糖鎖を標的とする抗糖鎖抗体の開発と医療応用への可能性
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根成隆、竹添智宏、西田匠吾、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 HEVにおける硫酸化ガラクトースを含む糖鎖の発現解析
3. 学会等名 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊偉、劉偉、松岡美紗、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 気管支喘息モデルにおける抗シアリルルイスX糖鎖抗体の治療効果の検討
3. 学会等名 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 抗糖鎖抗体S1を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析
3. 学会等名 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山崎郁弥、泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、神谷映里、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 抗糖鎖抗体S1を用いた中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊偉、劉偉、松岡美紗、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 気管支喘息モデルにおける抗シリアルルイスX糖鎖抗体の治療効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池紀仁、叶家斌、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 ケモカインCXCL10の過剰発現によるNK細胞浸潤の誘導と大腸がん細胞の肝転移の抑制
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 抗糖鎖モノクローナル抗体によるアレルギー性免疫応答の抑制
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、梶谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人
2. 発表標題 マウス卵管におけるフコシル化糖鎖sialyl Lewis Xの生合成経路の解析
3. 学会等名 第36回日本糖質学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsumura R, Hirakawa J, Fukuda M, Imai Y and Kawashima H
2. 発表標題 Detection and functional characterization of sialyl Lewis X antigen in mice using novel anti-carbohydrate monoclonal antibodies.
3. 学会等名 24th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXIV) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirakawa J and Kawashima H
2. 発表標題 Inhibition of allergic rhinitis by anti-sulfated-glycan monoclonal antibodies.
3. 学会等名 24th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXIV) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kimura N, Yamamoto T, Kawashima H, Takaya A
2. 発表標題 RNA chaperons, CspC and CspE regulate mRNAs induced in Salmonella surviving in macrophages after phagocytosis.
3. 学会等名 5th ASM Conference on Salmonella (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、梶谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人
2. 発表標題 マウス卵管におけるフコシル化糖鎖sialyl Lewis Xの生合成経路の解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 マウスB細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイスXの発現解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、梶谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人
2. 発表標題 マウス卵管におけるsialyl Lewis X生合成経路の解析
3. 学会等名 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 泉水友洋、岩崎藍花、大八木真浩、山崎郁弥、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 中枢神経系における硫酸化糖鎖の発現解析
3. 学会等名 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 マウスB細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイスXの発現解析
3. 学会等名 グローバルプロミネント研究基幹シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島博人
2. 発表標題 リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解明：遺伝子欠損マウスを用いた解析
3. 学会等名 名城大学組換えDNA講演会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川島博人
2. 発表標題 リンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解明
3. 学会等名 糖鎖免疫研究会Glyco-immunology 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤裕之、松浦寛明、小林純子、梶谷内晶、成松久、Kay-Hooi Khoo、川島博人
2. 発表標題 フコシル化糖鎖sialyl Lewis Xの新規生合成経路の解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹添智宏、松村龍志、関根成隆、平川城太郎、川島博人
2. 発表標題 マウスB細胞におけるフコシル化糖鎖抗原シアリルルイスXの発現解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 谷口直之、遠藤玉夫 他（編集）、川島博人 他（分担執筆）	4. 発行年 2018年
2. 出版社 日本糖質科学コンソーシアム	5. 総ページ数 334
3. 書名 未来を創るグライコサイエンス - 我が国のロードマップ -	

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院薬学研究院 免疫微生物学研究室 http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/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
--	---------------------------	-----------------------	----