

平成 23 年 4 月 25 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790371

研究課題名（和文） B細胞共受容体CD72による自己免疫制御機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of autoimmunity by B lymphocyte coreceptor CD72

研究代表者

渡邊 幸造（WATANABE KOZO）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：20376718

研究成果の概要（和文）：

精製組換え CD72 タンパクを用いた糖鎖アレイと表面プラズモン共鳴解析により CD72 が糖鎖と結合するレクチンとして機能すること、糖鎖アレイにより同定した糖鎖と CD72 欠失マウスの B 細胞を用いることにより、CD72 はその糖鎖リガンド存在下で抗原受容体架橋による B 細胞の増殖を抑制する働きをもつことが示唆された。これらの結果によりこれまで明らかになっていなかった糖鎖シグナルによる CD72 を介した B 細胞免疫応答制御機構、自己免疫抑制機構が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, I suggested that CD72 interacts with glycan by glycan array analysis and surface plasmon resonance analysis using purified recombinant CD72 protein. I also suggested that CD72 negatively regulates B cell proliferation by B cell antigen receptor ligation in the presence of CD72 glycan ligand by the experiments using purified B cells from CD72 deficient mice. These results suggest a new mechanism of negative regulation of a B cell immune response by the CD72 glycan ligand-CD72 interaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学

キーワード：免疫寛容・自己免疫

1. 研究開始当初の背景

自己免疫疾患は多数の要因により引き起

こされるが、自己免疫疾患のマウスモデルである MRL/lpr マウスの解析から、CD72 を含

む領域が自己免疫発症の原因領域であることが明らかにされている。

CD72 は細胞外領域に C 型レクチン様領域 (CTLD) 細胞内領域に ITIM を有しており、ITIM を介して SHP-1 と結合することで B 細胞抗原受容体 (BCR) シグナルを負に制御することが明らかにされている。また CD72 ノックアウトマウスで自己抗体の産生や自己免疫病が観察されることが報告されており、CD72 は自己免疫発症の抑制に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし CD72 の CTLD を含む細胞外領域が自己免疫発症の抑制にどのような役割を果たしているかは明らかになっていない。また CD72 の CTLD は C 型レクチンに典型的な Ca^{2+} 結合サイトを欠いていることから糖鎖と結合する活性を有しているかどうか明らかになっておらず、その機能も明らかになっていない。

2. 研究の目的

CD72 の C 型レクチン様領域 (CTLD) を有する細胞外領域がどのような糖鎖と特異的に結合するか網羅的に解析により明らかにする。また CD72 と CD72 リガンドによって B 細胞免疫応答がどのように制御されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 600 種以上の糖鎖をスポットしたチップと精製組換え CD72 タンパク (sCD72-CD8)、ビオチン標識抗 CD8 抗体、蛍光標識ストレプトアビジンを用いて CD72 糖鎖リガンドを網羅的に解析する糖鎖マイクロアレイを行い、CD72 と相互作用する糖鎖の同定を海外の共同研究者との共同研究で行った。

(2) レクチンとそのリガンドの結合は親和性が弱く検出が困難なことがしばしばある。そこで弱い相互作用や結合・解離の動態が早い相互作用の検出に優れ、レクチンの解析によく用いられる表面プラズモン共鳴 (SPR) による解析を行う。具体的には CD72 糖鎖リガンドをリポソームに取り込ませて疎水性のセンサーチップに固定化して組換え CD72 タンパク、sCD72-CD8 との相互作用を観察する。

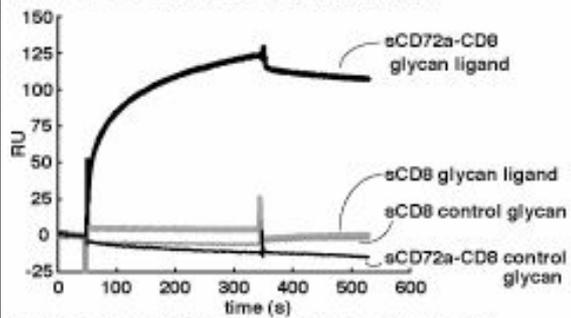
(3) 野生型または CD72 ノックアウトマウス由来の脾臓 B 細胞を用いて、B 細胞抗原受容体 (BCR) 架橋により誘導される B 細胞の増殖を解析することで、糖鎖リガンドが B 細胞免疫応答にどのような影響を与えるか解析を行った。

4. 研究成果

糖鎖マイクロアレイにより複数の CD72 糖鎖リガンドが CD72 と相互作用する事が示唆された。さらに糖鎖アレイで同定された CD72 リガンドについて表面プラズモン共鳴を行

った所、CD72 と特異的に相互作用する事が明らかとなった (図 1)。

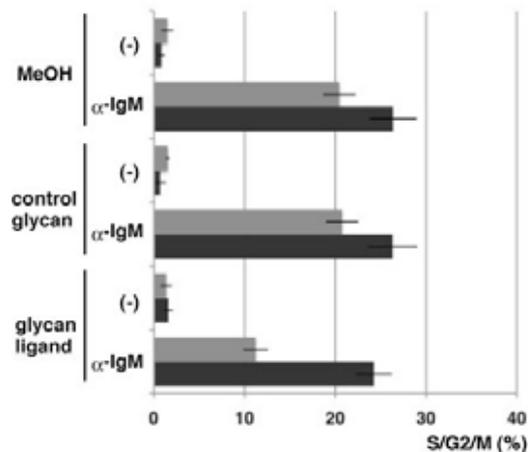
図 1 CD72 と糖鎖リガンドの相互作用解析



表面プラズモン共鳴解析により、L1 チップに固定化した CD72 糖鎖リガンドとコントロール糖鎖への sCD72a-CD8 (500 nM) とコントロールタンパク sCD8 (500 nM) の結合を解析した。

C57BL6 マウスと C57BL/6 CD72^{-/-} マウスから調整した正常 B 細胞に CD72 糖鎖リガンドをコーティングしたプレートで抗原受容体架橋によって増殖を誘導することで、CD72 糖鎖リガンド存在下では抗原受容体架橋による増殖が抑制されること、一方で CD72 欠失マウスでは CD72 糖鎖リガンドによる増殖抑制が起きないことが明らかとなった (図 2)。

図 2 CD72 糖鎖リガンドによる CD72 を介した B 細胞増殖抑制



メタノールに可溶化した CD72 糖鎖リガンド (glycan ligand) とコントロール糖鎖 (control glycan) を乾燥することによりコーティングしたプレートで C57BL/6 (薄灰色) あるいは C57BL6 CD72^{-/-} (濃灰色) マウスの脾臓 B 細胞に抗 IgM 抗体により抗原受容体架橋を行い (IgM)、48 時間培養後にヨウ化プロピジウム染色で DNA 量を測定することにより S/G2/M 期の細胞 (増殖中の細胞) の割合を解析した。

これらの結果から CD72 の細胞外領域は糖鎖と結合するレクチンとして機能すること、CD72 糖鎖リガンド存在下では CD72 の働きによって抗原受容体架橋による B 細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。CD72 糖鎖リガンドと CD72 の相互作用は B 細胞の増殖

を抑えることで自己抗原に対する免疫応答を抑制している可能性が考えられる。

CD72 糖鎖リガンドによる CD72 を介した B 細胞免疫応答の抑制はこれまで明らかになっていない自己免疫抑制機構であり、自己免疫病発症の理解に寄与する成果である。また本研究の成果はこれまであまり明らかになっていない糖鎖シグナルによる B 細胞免疫応答、獲得免疫の制御を明らかにしている点においても意義深い研究成果と考えられる。

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 6 件)

(1) Kozo Watanabe, Yumiko Tsuchiya, Yoshinori Kawaguchi, Shin-ichi Sawada, Hirohito Ayame, Kazunari Akiyoshi, Takeshi Tsubata

The use of cationic nanogels to deliver proteins to myeloma cells and primary T lymphocytes that poorly express heparan sulfate

Biomaterials. (in press)

(2) Hajjaj H. M. Abdu-Allah, Kozo Watanabe, Gladys C. Completo, Magesh Sadagopan, Koji Hayashizaki, Chiaki Takaku, Taichi Tamanaka, Hiromu Takematsu, Yasunori Kozutsumi, James C. Paulson, Takeshi Tsubata, Hiromune Ando, Hideharu Ishida, Makoto Kiso

CD22-Antagonists with nanomolar potency: The synergistic effect of hydrophobic groups at C-2 and C-9 of sialic acid scaffold

Bioorg. Med. Chem. 19:1966-71(2011)

(3) Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H., Kiso, M.

Potent Small Molecule Mouse CD22 Inhibitors: Exploring the Interaction of the Residue at C-2 of Sialic Acid Scaffold

Bioorg. Med. Chem. Lett. 19:5573-5.(2009)

(4) Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Hayashizaki, K., Iwayama, Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Tsubata, T., Ishida, H. and Kiso, M.

Synthesis of biotinylated sialoside to probe CD22-ligand interactions

Tetrahedron Lett. 50:4488-91.(2009)

(5) Watanabe, K. and Tsubata, T. Autophagy connects antigen receptor signaling

Autophagy 5: 108-110. (2009)

(6) Watanabe, K., Ichinose, S.,

Hayashizaki, K. and Tsubata, T. Induction of autophagy by B cell antigen receptor stimulation and its inhibition by costimulation

Biochem Biophys Res Commun. 374(2):274-81.(2008)

[学会発表](計 5 件)

(1) 渡辺幸造, 安達貴弘, 鐔田武志 B細胞特異的 C 型レクチン様分子 CD72 のオリゴマンノースに対する Ca²⁺ 非依存性のレクチン活性 日本免疫学会総会 (2008 年京都)

(2) 渡辺幸造, 中島権一, 今井有香, 安達貴弘, 佐藤元彦, 林崎浩史, 戸谷希一郎, 伊藤幸成, 鐔田武志

B細胞特異的 C 型レクチン様分子 CD72 はオリゴマンノースに対して Ca²⁺ 非依存性のレクチン活性を有する 日本分子生物学会年会・日本生化学会大会 合同大会 (2008 年神戸)

(3) Kozo Watanabe, Kenichi Nakajima, Yuka Imai, Motohiko Sato, Koji Hayashizaki, Takahiro Adachi, Kiichiro Totani, Yukishige Ito and Takeshi Tsubata

The C-type lectin-like domain-containing B lymphocyte membrane molecule CD72 carries a Ca²⁺-independent lectin activity to oligomannose CREST 国際シンポジウム (2009 年千葉)

(4) 渡辺幸造, 土屋祐美子, 河口佳典, 菖蒲弘人, 澤田晋一, 秋吉一成, 鐔田武志

CHP-NH₂ ナノゲルを用いたタンパク導入によるがん細胞と T 細胞の細胞死制御

ケミカルバイオロジー学会 (2009 年神戸)

(5) 渡辺幸造, 竹松弘, 鐔田武志 合成ビオチン化 CD22 リガンドを用いた競合阻害 ELISA による新規合成 CD22 リガンドの活性評価 日本免疫学会総会 (2009 年大阪)

[図書](計 1 件)

Watanabe, K. and Tsubata, T. Chapter 7: Self- and non-self recognition by coreceptors on B lymphocytes: Regulation of B lymphocytes by CD19, CD21, CD22 and CD72. In: D Kitamura, editor. How the Immune System Recognizes Self and Nonself Springer-Verlag Tokyo, Inc. pp199-220. (2008)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 幸造 (WATANABE KOZO)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：20376718

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし