

平成 22 年 6 月 28 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890255

研究課題名（和文）樹状細胞上の C 型レクチン DC-SIGN による腫瘍免疫の制御に関する研究

研究課題名（英文）Immune regulatory effect of C-type lectin DC-SIGN on colorectal tumors.

研究代表者

野中 元裕（NONAKA MOTOHIRO）

立命館大学・総合理工学研究機構・研究員

研究者番号：70514173

研究成果の概要（和文）：

我々は、樹状細胞上に発現する C 型レクチン DC-SIGN により結腸癌細胞株 COLO205 上の結腸がん関連 Le 型糖鎖抗原が認識されることで腫瘍免疫の抑制が導かれることを明らかにし、結合に関わる癌細胞上の DC-SIGN リガンドを新たに同定した。また C 型レクチン MBP が細菌由来ゲノム DNA を始めとする種々の DNA にカルシウム依存的に結合することを発見する等、糖鎖受容体であるレクチンの免疫系における機能を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We found that C-type lectin DC-SIGN expressed on dendritic cells recognized colorectal tumor-associated Lewis glycans expressed on colorectal carcinoma COLO205 cells, which contributed to tolerogenic immunity for tumor cells. We identified DC-SIGN ligands which were involved in the interaction with DC-SIGN. Moreover, we revealed that mannan binding protein interacted with DNA derived from various origins in a calcium dependent manner.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：糖鎖免疫学

科研費の分科・細目：薬物学・生物系薬学

キーワード：樹状細胞、結腸がん、免疫制御

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 樹状細胞上に発現する C 型レクチンは、現在まで 10 種類余りが同定されており、自己抗原や外来異物表面上に特異的に存在す

る糖鎖構造を認識することが知られている。しかし、C 型レクチンの研究は、それらのリガンド認識、取り込み機構、および認識に伴う免疫応答機構の詳細については不明な点

が多い。DC-SIGNは樹状細胞上に発現するII型膜貫通C型レクチン的一种であり、以前まで、ウイルス(HIV、HCV)や細菌などの病原微生物との結合や細胞内への取り込みに関与するという報告があったが、腫瘍免疫との関連性は指摘されていなかった。我々は、DC-SIGNが結腸がん細胞と接着すること、接着には結腸がん細胞上の数種類の糖タンパク質が関与していること、およびその接着によって樹状細胞の成熟やT細胞による細胞性免疫応答が抑制されることを初めて明らかにした。

(2)C型レクチン的一种、血清マンナン結合タンパク質(mannan binding protein、MBP)は外来異物の細胞表面に存在するマンノースを始めとする糖鎖をパターン認識し、レクチン経路と呼ばれる補体系の活性化や、貪食細胞による異物の細胞内への取り込みに深く関与していることが明らかとされている。また近年当研究室において血清型MBPが補体系に依存しないメカニズムでがん細胞の増殖抑制作用を示すことも発見されている。しかしながら、これまで血清マンナン結合タンパク質が核酸成分と相互作用するという報告は無かった。

## 2. 研究の目的

(1)本研究では、まず、結腸がん細胞上に発現する複数のDC-SIGNリガンドの同定および結合に関連する糖鎖構造の詳細を明らかにする。一方、HIVとの結合により惹起されるDC-SIGNからのシグナルはRafキナーゼのリン酸化、NF- $\kappa$ Bのアセチル化を通して、LPSによるToll様受容体からのシグナルを増強するといったごく最近の報告がある。このことは、細胞内においてToll様受容体とDC-SIGNのシグナル経路が密接に関連し合うことを示す。従って本研究では結腸がん細胞の認識時におけるDC-SIGNの細胞内へのシグナル伝達について、Toll様受容体との関連性の角度から調べる。

(2)血清マンナン結合タンパク質が核酸成分と相互作用することを調べる。またアポトーシス細胞の一部はDNAを露出しているとの報告がある。そこでまずMBPによって認識される核酸の特徴付けを行い、認識によってもたらされる生理的意義をDNAのクリアランスという観点から調べる。

## 3. 研究の方法

(1)DC-SIGNを介した樹状細胞と結腸がん細胞の相互作用に関与する糖鎖についての基本的な情報を得る。まず、組換え体DC-SIGNアフィニティークラムを用いて、結腸がん細胞由来の膜タンパク質可溶化物からDC-SIGNリガンドを精製する。得られた画分を質量分析にかけ、新規DC-SIGNリガンドを同定する。

DC-SIGNと結合することが明らかにされ

た、結腸がん細胞株上の糖タンパク質を含む画分を得る。次にPNGase Fや $\alpha$ -1,3/4-フコシダーゼといったグリコシダーゼを用いて糖鎖消化実験を行い、DC-SIGNとの結合にはN型糖鎖が関与しているか、特にルイス糖鎖が必要かどうかを明らかにする。

DC-SIGNを安定発現させた単球系細胞株U937(U937-DC-SIGN)を作製する。またU937-DC-SIGNまたはU937にLPS及びDC-SIGNリガンドを添加し、分泌されるサイトカインの変化をみる。

(2)MBPとDNAの相互作用はゲルシフトアッセイおよび表面プラズモン共鳴法を用いる。DNAにはプラスミドDNAの他、合成二本鎖DNA、一本鎖RNA、一本鎖DNAを用いる。相互作用の生理的意義については、DNAコーティングプレートにおけるMBPの補体活性化を調べる。また、DNAコーティングビーズのファゴサイトーシスにMBPが関与するかどうかをフローサイトメトリーを用いて計測する。

## 4. 研究成果

(1)アフィニティークロマトグラフィー、質量分析法を用いて結腸がん細胞株COLO205上に発現する主要なDC-SIGNリガンドを数種類同定した。その中にはMac-2 binding proteinが含まれていることが明らかになった。またDC-SIGNとリガンドの結合には従来血液型関連糖鎖として知られているルイス型糖鎖が重要であることを $\alpha$ -N-グリコシダーゼ、フコシダーゼ等を用いた糖鎖消化実験にて明らかにした。次に、DC-SIGNを安定発現させた単球系細胞株U937を用い、LPS添加時におけるサイトカイン分泌へのDC-SIGNの寄与を明らかにした。この結果は細胞内においてToll様受容体とDC-SIGNのシグナル経路がクロストークすることを示唆する。その他、結腸がん患者由来の組織を染色することにより、DC-SIGNリガンドの発現パターンを詳細に明らかにした。以上の結果はDC-SIGNが結腸がんの診断に応用できる可能性を示すものであり、現在複数の患者由来の組織を染色することで有意差判定を試みている。

(2)我々は、MBPが、細菌由来ゲノムDNAを始めとする種々のDNAにカルシウム依存的に結合することを明らかにした。分子間相互作用解析により、MBPは二本鎖DNA、一本鎖RNA、一本鎖DNAの順に高い親和性を示すことが明らかとなった。また、MBPとDNAの複合体はレクチン経路による補体系の活性化を引き起こさず、DNAをコートしたビーズはファゴサイトーシスの促進を受けないことから、補体成分の沈着がファゴサイトーシスには重要であることを示した。さらに、MBPはアポトーシス細胞表面に露出したDNAを認識することから、この機構が生細胞とアポトーシス

細胞の識別に寄与している可能性が考えられた。以上の結果はDNAのクリアランス機構および生体防御におけるMBPの機能を考える上で重要である。

#### 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3件)

- 1) 著者名: Motohiro Nonaka, Bruce Yong Ma and Toshisuke Kawasaki, 論文表題: Colorectal carcinoma-associated carbohydrate recognition and tumor-immunological regulation by C-type lectin DC-SIGN, 雑誌名: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 査読: 無、第21巻、第120号、pp228-236、2009年
- 2) 著者名: Natsuko Nakamura\*, Motohiro Nonaka\*, Bruce Yong Ma\*, Shogo Matsumoto, Nobuko Kawasaki, Shinji Asano and Toshisuke Kawasaki, 論文表題: Characterization of the interaction between serum mannan-binding protein and nucleic acid ligands, 雑誌名: *Journal of Leukocyte Biology*, 査読: 有、第86巻、pp737-748、2009年、\*These authors contributed equally to this work.
- 3) 著者名: Bruce Yong Ma, Kaori Yoshida, Makoto Baba, Motohiro Nonaka, Shogo Matsumoto, Nobuko Kawasaki, Shinji Asano and Toshisuke Kawasaki, 論文表題: The lectin Jacalin induces human B lymphocyte apoptosis through glycosylation-dependent interaction with CD45, 雑誌名: *Immunology*, 査読: 有、第127巻、pp477-488、2009年

[学会発表](計10件)

- 1) 発表者名: Motohiro Nonaka, Bruce Yong Ma, Shogo Matsumoto, Nobuko Kawasaki and Toshisuke Kawasaki, 発表表題: Characteristic interaction of serum mannan-binding protein with nucleic acids, 学会名: 2009 Annual Meeting of the Society for Glycobiology, 発表年月日: 2009年11月13日、San Diego(USA)
- 2) 発表者名: 野中元裕, Ma Bruce Yong, 松本尚悟、川寄伸子、川寄敏祐, 発表表題: 血清型マンナン結合タンパク質と核酸の相互作用の解析とその生物学的意

義、学会名: 第82回日本生化学会大会、発表年月日: 2009年10月24日、神戸国際展示場(兵庫県)

- 3) 発表者名: 野中元裕, Ma Bruce Yong, 中村奈都子、松本尚悟、川寄伸子、川寄敏祐, 発表表題: 血清型マンナン結合タンパク質による核酸の認識とその意義、学会名: 第29回日本糖質学会年会、発表年月日: 2009年9月11日、飛騨・世界生活文化センター(岐阜県)
- 4) 発表者名: Motohiro Nonaka, Bruce Yong Ma, Shogo Matsumoto, Nobuko Kawasaki and Toshisuke Kawasaki, 発表表題: Characteristic recognition and biological significance of the interaction between serum mannan-binding protein and nucleic acids, 学会名: 21st IUBMB & 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 発表年月日: 2009年8月5-6日、Shanghai, (China)
- 5) 発表者名: 野中元裕, Ma BY, 川寄伸子、川寄敏祐, 発表表題: 樹状細胞C型レクチン DC-SIGN による結腸がん細胞表面糖鎖の認識と腫瘍免疫の調節機構、学会名: 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会合同大会(BMB2008), 発表年月日: 2008年12月12日、神戸国際展示場(兵庫県)
- 6) 発表者名: Ma BY, 野中元裕, 川寄敏祐, 発表表題: レクチン Jacalin によるBリンパ球のアポトーシスの誘導、学会名: 第38回日本免疫学会総会・学術集会、発表年月日: 2008年12月3日、国立京都国際会館(京都府)
- 7) 発表者名: Motohiro Nonaka, Bruce Yong Ma, Nobuko Kawasaki and Toshisuke Kawasaki, 発表表題: Functional Recognition of Colorectal Tumor-associated Lewis Glycans by C-type Lectin DC-SIGN, 学会名: Annual Conference of the Society for Glycobiology, 発表年月日: 2008年11月14日、Texas (USA)
- 8) 発表者名: Motohiro Nonaka, Bruce Yong Ma, Nobuko Kawasaki, and Toshisuke Kawasaki, 発表表題: Jacalin-induced diverse immune responses through glycosylation-dependent interaction with CD45 on lymphocytes, 学会名: 8th Human Disease Glycomics/ Proteome Initiative (HGPI) meeting, 発表年月日: 2008年11月13日、Texas (USA)
- 9) 発表者名: 松本尚悟, Ma BY, 野中元裕, 吉田香織、馬場亮人、川寄伸子、浅野真司、川寄敏祐, 発表表題: CD45 を標的

とする Jacalin による B リンパ球のアポ  
トーシスの誘導、学会名：第 28 回日本  
糖質学会年会、発表年月日：2008 年 8  
月 19 日、つくば（茨城県）

- 10) 発表者名：Motohiro Nonaka, Bruce  
Yong Ma, Nobuko Kawasaki and Toshisuke  
Kawasaki、発表表題：Functional  
Implications for C-type Lectin  
DC-SIGN Recognizing Colorectal  
Tumor-Associated Lewis Glycans、学会  
名：The 23rd International Lectin  
Conference (Interlec-23)、発表年月  
日：2008 年 7 月 14 日、Edinburgh,  
(Scotland)

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 著書名：野中元裕、Bruce Yong Ma、川  
寄敏祐、出版社名：共立出版、書名：蛋  
白質核酸酵素、発行年：2008 年、第 53  
巻、pp1649-1654
- 2) 野中元裕・Bruce Yong Ma・川寄敏祐、  
出版社名：メディカルドゥ、書名：遺伝  
子医学 MOOK 別冊「ますます重要になる  
細胞周辺環境(細胞ニッチ)」、発行年、  
2009 年、pp257-262

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.glyco2.is.ritsumei.ac.jp/RCG/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 元裕 (NONAKA MOTOHIRO)

立命館大学・総合理工学研究機構・研究員

研究者番号：70514173