

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 5 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659018

研究課題名（和文） 抗糖鎖抗体作製のための新しいストラテジーとその応用

研究課題名（英文） A novel strategy for the generation of anti-glycan antibodies and its application

研究代表者

川島 博人（KAWASHIMA HIROTO）

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：50260336

研究成果の概要（和文）：抗糖鎖モノクローナル抗体(mAb)は生体内における複合糖質の機能解析に非常に有用であるが、その作製は困難である。その主な理由として、多様な複合糖質がマウスおよびラットに内在性に発現するため糖鎖の抗原性は一般的に低いことがあげられる。本研究で我々は、糖鎖合成酵素欠損マウスにおいてはその欠損している酵素で合成される糖鎖が高い抗原性を示すという原理に基づく効率の良い抗糖鎖 mAb 作製法を樹立した。その応用例として、硫酸基転移酵素欠損マウスを用いて抗硫酸化糖鎖 mAb を作製し、同抗体を用いて硫酸化 N-型糖鎖および硫酸化 O-型糖鎖がリンパ球ホーミングと免疫監視に協調的に機能することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Anti-carbohydrate monoclonal antibodies (mAbs) are very useful in the functional analysis of complex carbohydrates *in vivo*. However, such mAbs are difficult to generate, largely because a wide variety of complex carbohydrates is intrinsically expressed in mice and rats and because the antigenicities of glycans are generally poor. In this study, we developed an efficient method for generating anti-carbohydrate mAbs using glycan-synthesizing enzyme-knockout mice in which the glycan structures formed by the missing enzymes should be highly antigenic. As an application of this method, we generated anti-sulfated glycan mAbs using sulfotransferase-deficient mice and found that sulfated N- and sulfated O-glycans function cooperatively in lymphocyte homing and immune surveillance using those mAbs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	0	1,400,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	390,000	3,090,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：リンパ球ホーミング、L-セレクチン、高内皮細静脈、硫酸化糖鎖、抗糖鎖抗体

1. 研究開始当初の背景

糖鎖は、分化・発生、免疫、癌化、タンパク

質品質管理などにおいて様々な役割を果たし、近年、第三の生命鎖として注目されている。糖鎖の生体内における機能を解明するためには、生体において、いつ・どこで・どのような糖鎖が発現するのかを知る必要がある。そのためには、特定の糖鎖構造のみを特異的に認識する抗糖鎖抗体は極めて有用であるが、糖鎖は抗原性が低いため抗糖鎖抗体を得るのは一般的に困難であり、限られた数の抗糖鎖抗体しか存在しないという状況にあった。

2. 研究の目的

本研究課題では、抗糖鎖抗体を効率よく作製するための新しい方法論を樹立し、それを糖鎖の生理機能の解明に役立てることを目的として研究を行った。本研究課題で提示する新しい方法論のポイントは、糖鎖合成酵素遺伝子欠損マウスをその糖鎖合成酵素遺伝子の強制発現株で免疫することにより、糖鎖の抗原性が一般的に低いという問題点を解決し、効率よく抗糖鎖抗体を得ることにある。本研究課題では、その具体例として、我々が独自に樹立した硫酸基転移酵素欠損マウス (Kawashima *et al.*, *Nature Immunology*, 6:1096-1104, 2005) を硫酸基転移酵素の強制発現細胞株で免疫することにより抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体を樹立しその有用性を実証するとともに、同抗体を用いてリンパ球ホーミングおよび接触性皮膚炎における硫酸化糖鎖の機能解明を行った。

3. 研究の方法

(1) 抗硫酸化糖鎖抗体産生ハイブリドーマの樹立

はじめに、硫酸基転移酵素を安定発現する遺伝子導入株をアジュバントとともに腹腔内注射することにより、硫酸基転移酵素欠損マウスを免疫した。常法に従って脾臓 B 細胞とマウスミエローマとのハイブリドーマを作製した後に、野生型マウスの高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) に反応するが、硫酸基転移酵素欠損マウスの HEV には反応しない抗硫酸化糖鎖抗体産生クローンを組織染色により選別し、陽性クローンを得た。末梢リンパ節 (peripheral lymph node; PLN) に存在する HEV はリンパ球がリンパ節にホーミングする際の“入り口”となる特殊な血管で、野生型マウスにおいてはリンパ球ホーミン

グレセプター・L-セレクトインと特異的に結合する硫酸化糖鎖を豊富に発現することが知られている。次に、各々の抗硫酸化糖鎖抗体産生クローンを腹水化し、常法により抗体を大量精製した。

(2) 抗硫酸化糖鎖抗体の糖結合特異性の解析

次に、抗硫酸化糖鎖抗体と様々な糖鎖合成酵素遺伝子導入株との結合をフローサイトメトリーを用いて解析した。また、米国 Consortium for Functional Glycomics の糖鎖アレイを用いて、抗硫酸化糖鎖抗体と 485 種類の糖鎖との結合を詳細に調べた。さらに、抗硫酸化糖鎖抗体と O-型糖鎖の伸長を欠損する Core1 β 3GlcNAcT/Core2GlcNAcT ダブルノックアウトマウスのリンパ節 HEV との結合を免疫組織染色により解析した。

(3) 抗硫酸化糖鎖抗体のリンパ球ホーミング阻害活性の検討

抗硫酸化糖鎖抗体を野生型マウスに静脈内注射し、その 30 分後に蛍光物質 CMFDA で標識したリンパ球を静脈内注射した。1 時間後に PLN を採取し、蛍光標識リンパ球のホーミングをフローサイトメトリーにより解析した。

(4) 抗硫酸化糖鎖抗体のリンパ球ローリング阻害活性の検討

PLN の HEV において L-セレクトイン結合性糖鎖の付加を受けるコアタンパク質 CD34 とその糖鎖修飾に関与する種々の糖鎖合成酵素の遺伝子を安定発現する CHO 細胞をフローチャンバーにセットし、定速ポンプを用いて生理的な流速でリンパ球浮遊液を流し、その挙動を顕微鏡観察しビデオ撮影することにより、リンパ球のローリングを解析した。

(5) 抗硫酸化糖鎖抗体のマウス接触性皮膚炎阻害活性の検討

0 日目にアセトン/オリーブオイル(4:1)に溶解させた 0.2%オキサゾロンを剃毛したマウスの前肢に塗布して感作を行った後、0 日目と 3 日目に抗硫酸化糖鎖抗体または PBS を静脈内注射した。5 日目に右耳には 0.5%オキサゾロンを、左耳には溶媒のみを塗布して惹起を行い、炎症の指標である耳介腫脹を 24 時間後に測定するとともに、耳介切片をヘマトキシリン-エオジン染色することにより白血球

浸潤を観察した。

4. 研究成果

(1) 抗硫酸化糖鎖抗体産生ハイブリドーマの樹立

上記の方法により、二つの陽性クローンを得た。これらのクローンの産生するモノクローナル抗体を S1 および S2 と命名した。これらの抗体はともに野生型マウスの HEV と特異的に結合したが、硫酸基転移酵素欠損マウスの HEV とは結合しなかったことから、硫酸化糖鎖を特異的に認識すると考えられた。

(2) 抗硫酸化糖鎖抗体の結合特異性の解析

各種の糖鎖合成酵素の遺伝子安定発現株を用いたフローサイトメトリーの結果、S1 および S2 抗体は硫酸化糖鎖を特異的に認識することが確認された。次に糖鎖アレイを用いて 485 種類の糖鎖に対する結合性を調べたところ、これら二種類の抗体はともに、リンパ球ホーミングレセプター・L-セレクチンが認識する糖鎖構造として知られている 6-スルホシアリルルイス X およびその構造からフォースを除去した 6-スルホシアリル LacNAc の二種類の糖鎖とのみ特異的に結合した。さらに、O-型糖鎖の伸長を欠損する Core1 β 3GlcNAcT/Core2GlcNAcT ダブルノックアウトマウスのリンパ節凍結切片を用いた免疫組織染色の結果、S1 は HEV 上に発現する硫酸化 O-型糖鎖と選択的に結合するのに対し、S2 は HEV 上に発現する硫酸化 O-型糖鎖と硫酸化 N-型糖鎖の双方に結合することが明らかとなった。

(3) 抗硫酸化糖鎖抗体によるリンパ球ホーミングの阻害

興味深いことに、S2 は既知の抗硫酸化糖鎖抗体である MECA-79 に比べはるかに強力に PLN へのリンパ球ホーミングを阻害したが、S1 はわずかにしか阻害作用を示さなかった(図 1 参照)。

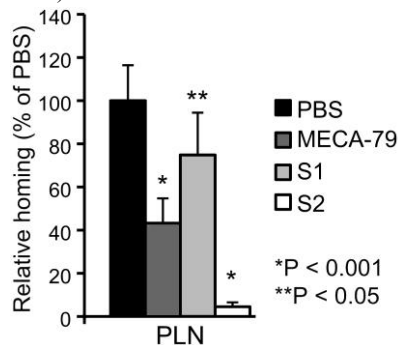


図 1 リンパ球ホーミングアッセイ

(4) 抗硫酸化糖鎖抗体によるリンパ球ローリングの阻害

S1 および S2 抗体のリンパ球ホーミング阻害活性の違いが、リンパ球のローリングに及ぼす阻害活性の違いによることを確認するために、遺伝子導入により L-セレクチン・リガンドを再構成させた培養細胞を用いてローリングアッセイを行ったところ、S2 抗体は L-セレクチン依存性リンパ球ローリングを強く抑制することが確認された(図 2 参照)。S1 抗体もローリングの抑制作用を示したが、S2 抗体に比べその作用は有意に弱かった。なお、本アッセイにおいてリンパ球が L-セレクチン依存性にローリングすることは抗 L-セレクチン抗体 MEL-14 によりローリングが完全に阻害されることにより確認された。

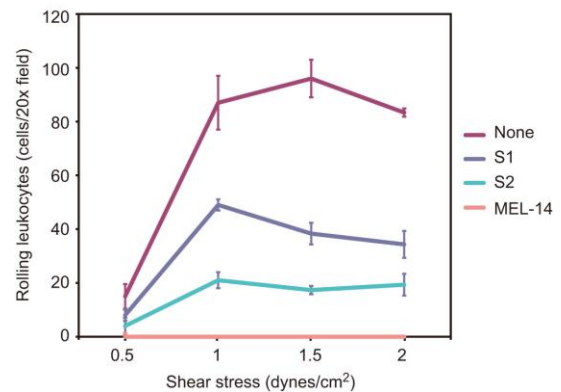


図 2 リンパ球ローリングアッセイ

(5) 抗硫酸化糖鎖抗体によるマウス接触性皮膚炎の阻害

S2 抗体は惹起後 24 時間における耳介腫脹および耳介への白血球浸潤を有意に阻害したが、S1 抗体は阻害作用を示さなかった。

本研究課題では硫酸基転移酵素欠損マウスを硫酸基転移酵素強制発現株で免疫し、二種類の抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S1 および S2 を樹立した。興味深いことに S2 は末梢リンパ節へのリンパ球ホーミングを強く抑制したが S1 は僅かにしか抑制しなかった。また、接触性皮膚炎モデルにおいても S2 のみが有意な阻害作用を示した。S1 は HEV 上に発現する硫酸化 O-型糖鎖と選択的に結合するのに対し、S2 は HEV 上に発現する硫酸化 O-型糖鎖と硫酸化 N-型糖鎖の双方に結合したことから、以上の結果は硫酸化 O-型糖鎖と硫酸化 N-型糖鎖の双方がリンパ球ホーミ

ングおよび接触性皮膚炎に関与することを示している。本研究で樹立した新しい方法論は、様々な糖鎖に対する抗体の作製に広く応用しうる汎用性の高いものであり、糖鎖生命科学の発展に広く貢献することが期待される。

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. Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *J. Exp. Med.*, 208:1015-1025, 2011. 査読有

[DOI:10.1084/jem.20101786](https://doi.org/10.1084/jem.20101786)

2. Hirose M, Matsumura R, Sato K, Murai T, and Kawashima H. Binding of L-selectin to its vascular and extravascular ligands is differentially regulated by pH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 414:437-442, 2011. 査読有

[DOI:10.1016/j.bbrc.2011.09.123](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.09.123)

3. Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, and Kawashima H. Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated N- and O-glycans in lymphocyte homing. *J. Biol. Chem.*, 285:40864-40878, 2010. 査読有

[DOI: 10.1074/jbc.M110.167296](https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167296)

4. Bao X, Moseman EA, Saito H, Petryanik B, Thiriot A, Hatakeyama S, Ito Y, Kawashima H, Yamaguchi Y, Lowe JB, von Andrian UH and Fukuda M. Endothelial Heparan Sulfate Controls Chemokine Presentation in Recruitment of Lymphocytes and Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Immunity*, 33:817-829, 2010. 査読有

[DOI:10.1016/j.immuni.2010.10.018](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.018)

5. Tobisawa Y, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Sulfation of colonic mucins by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase-2 and its protective function in experimental colitis in

mice. *J. Biol. Chem.*, 285:6750-6760, 2010. 査読有

[DOI: 10.1074/jbc.M109.067082](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.067082)

6. Kawashima H. Two roles of mucin sulfation. *Trends Glycosci. Glycotechnol.*, 22:211-225, 2010. 査読無

<http://www.jstage.jst.go.jp/article/tigg/22/127/22>

[_211/_article](#)

[学会発表] (計 14 件)

1. 坪井康一郎、平川城太郎、關愛実子、今井康之、山口祐、福田穰、川島博人 リンパ球ホーミングにおける高内皮細静脈へパラン硫酸の機能解析 日本薬学会第132年会(札幌)、2012年3月29日

2. Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *Keystone Symposia-Chemokines and Leukocyte Trafficking in Homeostasis and Inflammation*, 2012.1.10, Breckenridge, Colorado, USA

3. Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Imai Y, and Kawashima H. Novel Anti-carbohydrate Antibodies Reveal the Cooperative Function of Sulfated N- and O-Glycans in Lymphocyte Homing. 第40回日本免疫学会(千葉)、2011年11月29日

4. 坪井康一郎、高倉惇、今井康之、小松雅明、川島博人 大腸特異的 *Atg7* 欠損マウスにおけるデキストラン硫酸誘発性大腸炎の解析 第84回日本生化学会年会(京都)、2011年9月24日

5. 坪井康一郎、高倉惇、今井康之、小松雅明、川島博人 大腸特異的 *Atg7* 欠損マウスにおけるデキストラン硫酸誘発性大腸炎の増悪化 第75回日本生化学会中部支部例会(静岡)、2011年5月28日

6. 廣瀬まゆみ、川島博人、村井稔幸、川上和之、源利成、岡田雅人、末次志郎、竹縄忠臣、中川敦史 各種 SH3 ドメインと N-WASP プ

ロリンリッチ部位の相互作用の相違により N-WASP のアクチンフィラメント形成と細胞運動の相違が生じる 第 63 回日本細胞生物学会大会 (北海道)、2011 年 6 月 27-29 日

7. Hirose M, Kawashima H, Murai T, Kawakami K, Minamoto. Elevation of rat plasma P-selectin in acute lung injury. 日本分子生物学会・第 11 回春季シンポジウム、金沢国際がん生物学シンポジウム (金沢)、2011 年 5 月 25-26 日

8. Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, and Kawashima H. Novel Anti-Carbohydrate Antibodies Reveal the Cooperative Function of Sulfated N- and O-Glycans in Lymphocyte Homing. *Keystone Symposia-New Frontiers at the Interface of Immunity and Glycobiology*, 2011.3.8, Lake Louise, Alberta, Canada

9. Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. *Keystone Symposia-New Frontiers at the Interface of Immunity and Glycobiology*, 2011.3.8, Lake Louise, Alberta, Canada

10. 加賀正基, 渡部草太, 平川城太朗, 今井康之, 川島博人 B16 メラノーマの肺転移に及ぼすケモカイン強制発現の影響 平成 22 年度日本薬学会東海支部例会 (静岡)、2010 年 11 月 28 日

11. Bao X, Nakayama J, Miller M, Pham A, Kobayashi M, Kawashima H, Broide D, Fukuda M. Deficiency of L-selectin ligand biosynthesis by knocking out of GlcNAc6ST-1 and -2 suppresses asthmatic response in murine model of asthma. *Glycobiology2010*, 2010.11.7-10, St. Pete Beach, FL, USA.

12. 川島博人 新しい抗糖鎖抗体作製法の樹立に基づく硫酸化糖鎖のリンパ球ホーミングにおける機能の解明 CREST「代謝調節機構解析に基づく細胞機能制御基盤技術」平成 22 年度第 3 回公開シンポジウム (東京)、2010 年 10 月 21 日

13. 廣瀬まゆみ、川島博人、村井稔幸、竹縄忠臣、末次志郎、中川敦史 CRIB ドメインと WH ドメインを介した特定の N-WASP 多量体がアクチン骨格形成におよび細胞運動に寄与している 第 33 回日本分子生物学会年会 (神戸)、2010 年 12 月 7-10 日

14. 加賀正基、渡部草太、平川城太朗、今井康之、川島博人 ケモカイン CXCL10 の強制発現による B16 メラノーマの肺転移抑制 第 83 回日本生化学会年会 (神戸)、2010 年 12 月 7-10 日

〔図書〕 (計 1 件)

1. Kawashima H. Roles of GlcNAc-6-O-sulfotransferases in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Methods in Enzymology* 479:243-256, 2010.

〔その他〕

ホームページ

<http://sys.u-shizuoka-ken.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川島 博人 (KAWASHIMA HIROTO)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号 : 50260336