

## 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 5 月 24 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790774

研究課題名（和文）難治性喘息におけるヘルパーメモリーT細胞の糖鎖性ホーミング分子異常発現機構

研究課題名（英文）Disordered expression of the homing receptor glycans on helper memory T cells in patients with severe bronchial asthma

研究代表者

佐久間 圭一郎（SAKUMA KEIICHIRO）

愛知県がんセンター（研究所）・分子病態学部・主任研究員

研究者番号：90402891

研究成果の概要（和文）：

1. 気管支喘息とアトピー性皮膚炎患者のヘルパーT細胞には「硫酸化糖鎖性ホーミング分子」が健常者より有意に高く発現した。同分子の発現量はアトピー性皮膚炎の症状再燃性と相関する一方、「硫酸化されていない糖鎖性ホーミング分子」は採血時の病勢と相関した。統計学的検証により、硫酸化糖鎖性ホーミング分子の測定は高再燃患者群の検出に有用である可能性が示唆された。

2. 硫酸化糖鎖の合成に関与する酵素のひとつである HEC-GlcNAc6ST の転写調節機構を報告した。HEC-GlcNAc6ST がヘルパーT細胞において硫酸化糖鎖性接着分子の合成に関与することを遺伝学的手法を用いて証明した。

研究成果の概要（英文）：

1. The expression levels of the sulfated homing-receptor glycan on helper T (Th) cells were higher in patients with bronchial asthma or atopic dermatitis than those in normal controls. These levels were significantly correlated with frequency of exacerbation of atopic dermatitis, while the expression levels of non-sulfated Th-trafficking glycan were correlated with the disease severity at the time when the blood sample was collected. Statistic analysis suggested potential utility of the sulfated homing-receptor glycan for discriminating patients with highly recurrent atopic dermatitis.

2. We have reported the mechanism of the transcriptional regulation of a sulfotransferase gene *HEC-GlcNAc6ST*. We have also revealed the involvement of HEC-GlcNAc6ST in the synthesis of a sulfated cell-adhesion glycan in helper T cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：閉塞性肺疾患、喘息、ホーミング、メモリーT細胞、糖鎖

### 1. 研究開始当初の背景

●申請者の研究室は、硫酸化糖鎖性接着分子を認識するオリジナルの抗体を用いて、同分子がCCR4/CCR7/CD45RO陽性のヘルパーT(Th)細胞に特異的に発現することを見出した。また、同分子のセレクトイン結合能は独自の機構によって不活性化されることから、Th細胞のホーミングレセプターとして機能することが示唆された。

●気管支喘息やアトピー性皮膚炎ではCCR4/CCR7/CD45RO陽性Th細胞が病態に関与することが知られている。我々は、これらの疾患では硫酸化糖鎖性ホーミング分子の発現異常が見られるという仮説を立て、研究を開始した。

●申請者自身は、平成20・21年度の科学研究費補助金若手研究(B)において、喘息患者のヘルパーメモリーT細胞には前述の硫酸化糖鎖性ホーミング分子が健常者よりも高発現していることを見出した。また、同分子の合成に関与する硫酸基転移酵素ファミリーのひとつであるGlcNAc6ST-1の転写調節機構を解明した。

### 2. 研究の目的

課題1) 硫酸化糖鎖性ホーミング分子が喘息やアトピー性皮膚炎の病態とどのように関与するのかを明らかにする。

課題2) 硫酸化糖鎖性ホーミング分子の合成に関与する硫酸基転移酵素ファミリーのひとつであるHEC-GlcNAc6STの転写調節機構を明らかにする。

課題3) 硫酸化糖鎖性ホーミング分子の機能阻害によってヘルパーT細胞の肺・皮膚ホーミングを抑制できるか検証する。

### 3. 研究の方法

課題1) 喘息およびアトピー性皮膚炎患者の末梢血を同意を得た上で採取した。フローサイトメーターを用いてヘルパーメモリーT細胞の硫酸化糖鎖性ホーミング分子陽性率を定量し、再燃性ならびに病勢の臨床データとの相関を統計学的に解析した。フローサイトメーターに使用した抗糖鎖モノクローナル抗体は以下の通りである。

●セレクトイン結合能を持つ硫酸化糖鎖性ホーミング分子に対する抗体：clone G152(マウスIgM)

●セレクトイン結合能が不活性化された硫酸化糖鎖性ホーミング分子に対する抗体：clone G159(マウスIgG1)

●硫酸化されていない糖鎖性ホーミング分子に対する抗体：clone CSLEX-1(マウスIgM)

課題2) HEC-GlcNAc6STの転写調節機構を、レポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降法などを用いて解明した。また、HEC-GlcNAc6ST

がTh細胞の硫酸化糖鎖合成に実際に関与しているか検証するために、Th細胞株を用いて同遺伝子のノックダウンおよび強制発現を行い、硫酸化糖鎖の発現量変化をフローサイトメーターで調べた。

課題3) 以下の手順で行った。

(I)マウスの準備

①GFPマウス

②GlcNAc6ST-1, 2 DKO/GFPマウス

(II)マウスの並体結合

A)①とC57BL/6マウス

B)②とC57BL/6マウス

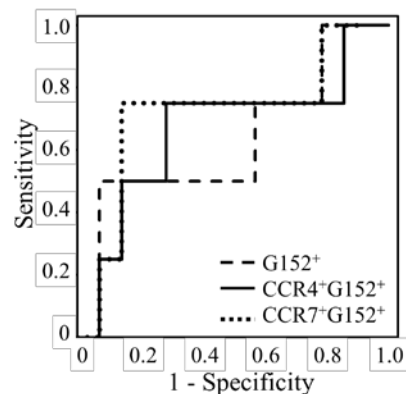
(III)解析

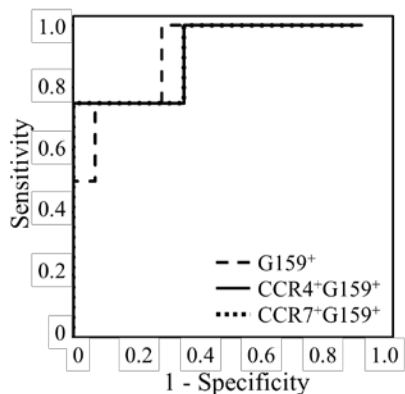
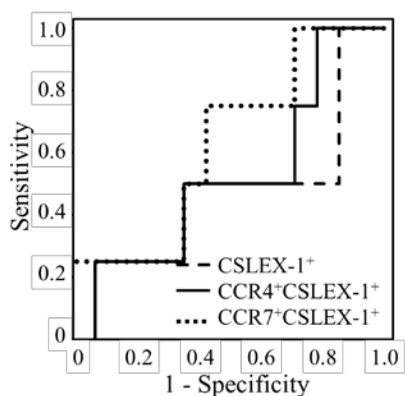
AとBそれぞれについて、C57BL/6マウスの肺および皮膚にホーミングしたGFP陽性ヘルパーT細胞数をフローサイトメーターで比較する。

### 4. 研究成果

課題1) 気管支喘息検体の収集効率が著しく悪いため、アトピー性皮膚炎に集中して研究を行った。ヘルパーメモリーT細胞の硫酸化糖鎖性ホーミング分子陽性率は、症状再燃スコア(月々のステロイド塗布薬の使用量から独自に算出)と有意に相関した。一方で、硫酸化されていない糖鎖性ホーミング分子の陽性率は、血清CCL17(TARC)値およびSCORAD(Scoring Atopic Dermatitis)値によって示される採血時の病勢と有意に相関した。さらに、G152、G159、CSLEX-1の各抗体による糖鎖性ホーミング分子の測定がアトピー性皮膚炎の高再燃患者群(症状再燃スコア4以上)の検出に有効か、ROC曲線(Receiver Operating Characteristic curve)を用いて検証した。G159抗体はAUC(Area Under the Curve)が0.9以上の高値を示し、臨床的有用性が示唆された。

【参考図表：ROC曲線とAUC値】





	AUC values
G152 <sup>+</sup> percentage	0.63
CCR4 <sup>+</sup> G152 <sup>+</sup> percentage	0.66
CCR7 <sup>+</sup> G152 <sup>+</sup> percentage	0.71
G159 <sup>+</sup> percentage	0.91
CCR4 <sup>+</sup> G159 <sup>+</sup> percentage	0.91
CCR7 <sup>+</sup> G159 <sup>+</sup> percentage	0.91
CSLEX-1 <sup>+</sup> percentage	0.54
CCR4 <sup>+</sup> CSLEX-1 <sup>+</sup> percentage	0.52
CCR7 <sup>+</sup> CSLEX-1 <sup>+</sup> percentage	0.63
G152 <sup>+</sup> /G159 <sup>+</sup> percentages	0.93
CCR4 <sup>+</sup> G152 <sup>+</sup> /CCR4 <sup>+</sup> G159 <sup>+</sup> percentages	0.96
CCR7 <sup>+</sup> G152 <sup>+</sup> /CCR7 <sup>+</sup> G159 <sup>+</sup> percentages	0.89

課題 2) HEC-GlcNAc6ST 遺伝子が、T-bet、GATA-3、Sp1 によって転写調節され、PKA による GATA-3 のリン酸化が必要であることを論文報告した。Th 細胞株である Jurkat 細胞の HEC-GlcNAc6ST をノックダウンあるいは強制発現したところ、注目している硫酸化糖鎖性ホーミング分子の発現量は変化しなかったが、他の硫酸化糖鎖構造の発現が減少あるいは増加した。興味深いことにこの硫酸化糖鎖構造は、B 細胞特異的に発現する CD22 分子

に対するリガンドであることが知られている。以上の結果から、HEC-GlcNAc6ST は Th 細胞において、少なくともひとつの硫酸化糖鎖性接着分子の合成に関与することが示された。

3) 我々が所有する GlcNAc6ST-1KO マウス、GlcNAc6ST-1, 2 DKO マウスを順に GFP マウスと交配し、GlcNAc6ST-1, 2 DKO/GFP マウスを得た。12 組の並体結合を作成して予備実験を行い、基本的な実験系は構築できた。しかし、採取した皮膚や肺からフローサイトメトリ用の検体を調整する方法などについて、本研究課題の期間後に検討の余地を残した。

#### 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 4 件)

(1) Miyazaki K, Sakuma K, Kawamura Y, Izawa M, Ohmori K, Mitsuki M, Yamaji T, Hashimoto Y, Suzuki A, Saito Y, Dohi T, Kannagi R. Colonic epithelial cells express specific ligands for mucosal macrophage immunosuppressive receptors siglec-7 and -9. *J Immunol*. May 1;188(9):4690-700, 2012. 査読あり

DOI: 10.4049/jimmunol.1100605

(2) Sakuma K, Chen GY, Aoki M, Kannagi R. Induction of 6-sulfated glycans with cell adhesion activity via T-bet and GATA-3 in human helper T cells. *Biochim Biophys Acta*. 1820: 841-848, 2012. 査読あり

DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.03.005

(3) Sakuma K, Aoki M, Kannagi R.: Transcription factors c-MYC and CDX2 mediate E-selectin ligand expression in colon cancer cells undergoing EGF/bFGF-induced epithelial-mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(20): 7776-7781, 2012. 査読あり

DOI: 10.1073/pnas.1111135109

(4) Kannagi R, Ohmori K, Chen GY, Miyazaki K, Izawa M, Sakuma K. Sialylated and sulfated carbohydrate ligands for selectins and siglecs: involvement in traffic and homing of human memory T and B lymphocytes. *Adv Exp Med Biol*. 705: 549-569, 2011. 査読あり

DOI: 10.1007/978-1-4419-7877-6\_29

[学会発表] (計 2 件)

1) 佐久間圭一朗、青木正博、神奈木玲児: EGF and bFGF induce EMT and E-selectin ligand

glycan expression on colorectal cancer cells. 第70回日本癌学会総会, 名古屋, 10月3日-5日, 2011. [口演].

2) 佐久間圭一朗、古橋卓也、近藤幸子、矢部宇一郎、大森勝之、森田明理、神奈木玲児: Th2-specific homing ligands involved in recurrent atopic dermatitis exacerbations. 第40回日本免疫学会学術集会, 千葉, 11月27日-29日, 2011. [口演].

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi\\_byotai/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/07bunshi_byotai/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐久間 圭一朗 (SAKUMA KEIICHIRO)

愛知県がんセンター(研究所)・分子病態学部・主任研究員

研究者番号: 90402891