

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390063

研究課題名(和文) Bリンパ球レクチンの糖鎖認識と機能

研究課題名(英文) Carbohydrate recognition of B lymphocyte lectins and their function

研究代表者

鏑田 武志 (TSUBATA, Takeshi)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：80197756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：CD72は、もっぱらBリンパ球に発現する抑制性の膜型レクチンであり、自己免疫疾患発症を制御する。我々は、CD72が種々の硫酸化糖鎖に結合するとともに、硫酸化糖鎖への免疫応答を抑制することを明らかにした。ヒトを含め脊椎動物は種々の硫酸化糖鎖を多量に産生するが、微生物での産生は通常は見られない。したがって、CD72は硫酸化糖鎖を自己パターン分子として認識し、自己と微生物の識別に関わる受容体であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：CD72 is an inhibitory receptor expressed mostly in B lymphocytes, and contains a C-type lectin-like domain. We demonstrated that CD72 binds to various sulfated glycans and inhibits immune responses to sulfated glycans. Sulfated glycans are abundantly produced in vertebrates including human, but are not normally produced by microbes. These findings suggest that CD72 recognizes sulfated glycans as a self-associated molecular pattern, and is involved in distinction between self and microbes.

研究分野：免疫学

キーワード：Bリンパ球、レクチン 糖鎖 抑制性受容体

## 1、研究当初の背景

(1) 糖鎖に対する抗体産生は感染免疫や移植免疫、自己免疫など種々の免疫応答で重要な役割を果たす。糖鎖は多くの場合 T 細胞によって認識されないために、糖鎖に対する獲得免疫応答はもっぱら B リンパ球 (B 細胞) による抗体産生によって行われ、また、これまでによく知られているタンパク質抗原への応答とは異なったメカニズムによって制御されている。しかしながら、糖鎖への免疫応答制御の仕組みは、自己と微生物の識別などの根本的な仕組みを含めそのメカニズムは、ほとんど解明されていない。

(2) CD72 はもっぱら B 細胞に発現する C 型レクチン様受容体であり、CD72 欠損マウスでは全身性エリテマトーデス (SLE) 様の自己免疫疾患を自然発症する。しかし、CD72 の糖鎖認識については知られていない。また、SLE 発症に関わる自己抗体産生のメカニズムについても不明な点が多い。

## 2、研究目的

(1) CD72 がどのような糖鎖を認識するのかを明らかにし、その糖鎖認識が糖鎖への免疫応答の制御に関わるのかを明らかにする。

(2) SLE では種々の核成分に対する抗体産生がおこるが、その中でも RNA とタンパク質の複合体である Sm 抗原への自己抗体産生が発症に重要であることが示されているので、抗 Sm 抗体産生 B 細胞を解析できるマウスのシステムを構築する。

## 3、研究方法

(1) Imperial College London の Feizi 教授との共同研究で CD72 が硫酸化糖鎖に反応する

ことが示唆されたので、より優れた組み換え CD72 タンパク質を開発し、この組み換え CD72 タンパク質を用いて種々の硫酸化糖鎖への反応性を ELISA や表面プラズモン共鳴 (SPR) により解析した。

(2) CD72 が硫酸化糖鎖による B 細胞活性化抑制に関わるかを明らかにするため、CD72 欠損マウス由来の B 細胞を硫酸化糖鎖とともに培養し、B 細胞の増殖等を測定した。また、CD72 欠損マウスおよび CD72 欠損 Fas<sup>lpr</sup> マウスの血清中の抗硫酸化糖鎖抗体を測定した

(3) シカゴ大学の Weigert 博士から供与を受けた抗 DNA 抗体 H 鎖トランスジェニックマウス 56R を用いて、抗 Sm 抗体産生 B 細胞を同定する。

## 4、研究成果

(1) His タグとビオチン化酵素 BirA の標的となる Avi タグを付加した CD72 の C 型レクチン様ドメイン (C-type lectin-like domain, CTLD) をコードする発現プラスミドを作成し、BirA を発現するバクテリアに導入することで、組み換え CD72CTL D タンパク質を産生させた。この組み換えタンパク質は inclusion body に蓄積していたが、還元条件下で精製することで、効率良く可溶性のビオチン化 CD72CTL D タンパク質を得ることができた。

(2) ELISA により、この組み換え CD72CTL D タンパク質がスルファチド、ヘパリン、コンドロイチン硫酸などの種々の硫酸化糖鎖に結合することが明らかとなった。さらに、CD72CTL D と硫酸化糖鎖との反応は表面プラズモン共鳴によっても確認された。なお、古典的な C 型レクチンが糖鎖に結合する際には  $Ca^{2+}$  が必要であるが、CD72CTL D は EDTA の存在下でも硫酸化糖鎖に結合したた

め、Ca<sup>2+</sup>を必要としないことが明らかとなった。

(3) 野生型マウス脾臓 B 細胞をスルファチド存在下で抗 IgM 抗体で刺激すると B 細胞の活性化は抑制されたが、CD72 欠損マウス由来の B 細胞ではスルファチドによる活性化抑制は見られなかった。この結果から、CD72 が硫酸化糖脂質スルファチドによる B 細胞活性化抑制に関わることが示された。

(4) CD72 欠損マウスおよび CD72 欠損 Fas<sup>lpr</sup> マウスの血清中では、それぞれ野生型および Fas<sup>lpr</sup> マウスに比べて、スルファチド、ヘパリンなどの硫酸化糖鎖への高い IgM 抗体価を検出した。この結果から、CD72 が硫酸化糖鎖への抗体産生を抑制することが明らかとなった。

(5) 抗 DNA 抗体 H 鎖トランスジェニックマウス 56R では 56RH 鎖と V<sub>κ</sub>38C との組み合わせにより抗 Sm/RNP 抗体が形成されることが明らかとなり、さらに、56RH 鎖と V<sub>κ</sub>38C の組み合わせを特異的に認識するモノクローナル抗体を作成することができた。この抗体を用いることで、抗 Sm/RNP 抗体産生 B 細胞をマウス個体レベルで解析することが可能となった。

(6) 抗 DNA 抗体 H 鎖トランスジェニックマウス 56R と 56H 鎖 / V<sub>κ</sub>38C を認識するモノクローナル抗体を用いた解析により、抗 DNA 抗体産生 B 細胞など既知の自己反応性 B 細胞とは異なり、抗 Sm/RNP 抗体産生 B 細胞は末梢リンパ組織に移行したから自己トレランスの制御を受けて死滅することが明らかとなった。

## 5、主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

すべて査読あり

1. Aslam, M., Kishi, Y. and Tsubata, T. (2014): Excess CD40L does not rescue anti-DNA B cells from clonal anergy. *PLoS ONE* 9:218. doi:10.1371/journal.pone.002218.
2. Xu, M., Hou, R., Sato-Hayashizaki, A., Man, R., Zhu, C., Wakabayashi, C., Hirose, S., Adachi, T. and Tsubata, T. (2013): *CD72<sup>c</sup>* is a modifier gene that regulates *Fas<sup>lpr</sup>*-induced autoimmune disease. *J. Immunol.* 190: 5436-5445. doi:10.4049/jimmunol.1203576.
3. Hitomi, Y., Adachi, T., Tsuchiya, N., Honda, Z.-I., Tokunaga, K. and Tsubata, T. (2012): Human CD72 splicing isoform responsible for resistance to systemic lupus erythematosus regulates serum immunoglobulin level and is localized in endoplasmic reticulum. *BMC Immunol.* 13: 72. doi: 10.1186/1471-2172-13-72.
4. Kishi, Y., Higuchi, T., Phoon, S., Kamiya, K., Riemekasten, G., Akiyoshi, K., Weigert, M. and Tsubata, T. (2012): Apoptotic marginal zone deletion of anti-Sm/ribonucleoprotein B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 7811-7816. doi: 10.1073/pnas.1204509109.
5. Poe, J. C., Smith, S. H., Haas, K. M., Yanabe, K., Tsubata, T., Matsushita, T. and Tedder, T. F. (2011): Amplified B lymphocyte CD40 signaling drives regulatory B10 cell expansion in mice. *PLoS ONE* 6: 22464. doi: 10.1371/journal.pone.0022464.
6. Watanabe, K., Tsuchiya, Y., Kawaguchi, Y., Sawada, S.-i., Ayame, H., Akiyoshi, K. and Tsubata, T. (2011): The use of cationic nanogels to deliver proteins to myeloma cells and primary T lymphocytes that poorly express heparan sulfate. *Biomaterials* 32: 5900-5905. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.058.

7. Tsubata, T. (2011): Role of inhibitory BCR co-receptors in immunity. *Infectious Disorders - Drug Targets* 12: 181-190.

〔学会発表〕（計20件）

国際招待（小計7件）

1. Tsubata, T.: Synthetic sialosides that regulate CD22/Siglec-2, a B lymphocyte membrane molecule activating SH2-containing phosphatases. 11th International Conference on Protein Phosphatase, November 12-14, 2014. Sendai (Miyagi, Japan).
2. Tsubata, T.: Role of CD22/Siglec2 and its ligand in B lymphocyte activation. Joint annual meeting of SFG & JSCR, Integrating Glycoscience from Biology and Chemistry to Medicine. November 16-19, 2014. Honolulu, Hawaii (USA)
3. Tsubata, T.: CD22-binding synthetic sialosides as a tool to elucidate the role of CD22 cis-ligand and as a novel immunostimulan. Medical Research Institute 40th Anniversary, 13th Surugadai International Symposium & Joint Usage/Research Program of Medical Research Institute International Symposium. November 28, 2014. Tokyo (Japan).
4. Tsubata, T.: CD72<sup>C</sup>, a haplotype encoding the SHP-1-binding B lymphocyte molecule, is a modifier gene for murine lupus, the 10<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, Feb 7-9. 2013, Tokyo (Japan).
5. Tsubata, T.: CD72<sup>c</sup> a haplotype encoding the SHP-1-binding B lymphocyte molecule is a modifier gene for murine lupus, the 10<sup>th</sup> International Conference on Protein Phosphatase, Feb 7-9. 2013, Tokyo (Japan).
6. Tsubata, T.: Sialic acids and immune responses. Molecular Frontier Science Conference for Humboltians and DAAD Alumni, September 20-22, 2013. Shanghai (China).
7. Tsubata, T.: SHP-1-activating Receptors

in B lymphocytes. The 2nd Taiwan-Japan Bilateral Conference on Protein Phosphatase, November 27-29, 2013. Hsinchu (Taiwan).

国内招待（小計13件）

1. 鐷田武志「Bリンパ球に発現するCD22/Siglec-2を標的とした免疫増強化合物の開発」第8回次世代アジュバント研究会、2015年1月20日、大阪府大阪市
2. 鐷田武志「自己反応性Bリンパ球の制御と細胞死」第23回日本Cell Death学会学術集会、2014年7月18日-19日、東京都
3. 鐷田武志「Bリンパ球の活性化制御と自己免疫」第23回日本シェーグレン症候群学会学術集会、2014年9月12日-13日、長崎県長崎市
4. 鐷田武志「免疫グロブリンの機能多様性と疾患」第三回高齢者ネフローゼ症候群治療研究会・講演会、2014年10月18日、東京都
5. 鐷田武志「糖鎖抗原への免疫応答・不応答のメカニズム」共同研究拠点研究集会 Glyco Immunology 2014. 2014年2月17-18日、東京都
6. 鐷田武志「シアル酸誘導体による炎症を伴わない免疫応答の増強とそのメカニズム」第12回糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム2014年12月4日-5日、東京都
7. 鐷田武志「自己抗体産生とアイソタイプ」第20回自己抗体と自己免疫シンポジウム、2013年2月2日、東京都
8. 鐷田武志「CD72<sup>c</sup>はFas欠損マウスでの自己免疫疾患発症を制御する修飾遺伝子である」第22回日本cell death学会学術集会、2013年7月19日、京都府京都市

9. 鏝田武志「チロシンフォスファターゼ SHP - 1 を活性化する B リンパ球膜分子 CD72 の多型と自己免疫」、第 5 回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会、2012 年 1 月 19 日-20 日、大阪府大阪市
10. 鏝田武志「シグレックと感染免疫」第 5 回感染病態研究フロンティア、2012 年 8 月 4 日、東京都
11. 鏝田武志「全身性自己免疫疾患と自己トランス」第四回全国共同利用・共同研究「酵素学研究拠点」シンポジウム、2012 年 10 月 2 日、東京都
12. 鏝田武志「C 型レクチン様分子 CD72 による硫酸糖鎖への免疫応答の制御」第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 14 日—16 日、福岡県福岡市
13. 鏝田武志「辺縁帯 B リンパ球のアポトーシスと自己免疫」第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会、2011 年 7 月 29 日 30 日、東京都

〔図書〕（計 1 件）

1. Tsubata, T. (2014): Siglecs and B cell regulation. In: Taniguchi N., Endo T., Hart G., Seeberger P., Wong C. (Ed.) Glycoscience: Biology and Medicine: SpringerReference (www.springerreference.com). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2014-04-01 06:48:34 UTC

〔産業財産権〕

特許取得 （計 0 件）

6、研究組織

(1) 研究代表者

鏝田 武志 (TSUBATA, Takeshi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所  
免疫疾患分野・教授

研究者番号：8019775

(2) 連携研究者

伊藤 暢聡 (ITO, Nobutoshi)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所  
分子構造情報学分野・教授  
研究者番号：8019775

渡辺 幸造 (WATANABE, Kozo)  
東京医科歯科大学・難治疾患研究所  
免疫疾患分野・助教  
研究者番号：20376718