

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790531

研究課題名（和文） B細胞膜型分子CD72を介した自己免疫制御機構の解明

研究課題名（英文） Suppression of autoimmunity by B lymphocyte membrane protein CD72

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

研究成果の概要（和文）：

B細胞膜型タンパク CD72 は自己免疫発症との相関が示されているが CD72 の細胞外領域の C タイプレクチン様領域(CTLD)のレクチン活性の有無とその糖鎖リガンドについては明らかになっていない。本研究では、CD72 の精製組換えタンパクを用いて CD72 糖鎖リガンドの網羅的な探索を糖鎖アレイにより行い、ある種の硫酸化糖鎖と CD72 が相互作用することを明らかにした。いくつかの CD72 リガンドは自己免疫疾患関連抗原であった。またほとんど全ての B 細胞がニトロフェニル基 (NP) に反応性の QM (quasi-monoclonal)マウスと QM/CD72 欠失マウス由来のプライマリーB細胞とを用いて、NP 架橋した CD72 リガンドと NP 架橋した非 CD72 リガンドで B 細胞抗原受容体刺激を加えた場合の細胞内カルシウム濃度を解析し、CD72 リガンドによって CD72 を介した BCR シグナルの抑制が起きる事を示した。さらに CD72 の欠損によって CD72 リガンドに対する抗体産生が増加するかを CD72 欠失マウスと野生型マウスで解析を行い、CD72 リガンドに対する IgM クラスの血清中の抗体量が CD72 欠失マウスで増加していることを明らかにした。これらの結果は B 細胞表面上の CD72 が、そのリガンドに対する B 細胞の活性化を抑制することでそのリガンドに対する抗体産生、免疫応答を抑制していることを示唆するものであり、まだ明らかになっていない B 細胞による自己と非自己の新たな識別機構を示すものである。このような自己と非自己の識別機構の解明は、自己免疫疾患の発症機構の新たな理解につながるものである。

研究成果の概要（英文）：

C-type lectin-like domain (CTLD) of B cell membrane protein CD72 is suggested to associated with development of autoimmune diseases. However, the glycan ligand and function of its CTLD is not clear. In this study, some kinds of sulfated glycans were identified as CD72 ligands by glycan array screening using CD72 recombinant protein. Interestingly, some of the identified CD72 ligands are autoimmune disease-associated antigens. In addition, the effect of CD72 ligand on B cell antigen receptor (BCR) signaling in primary B cells from QM mice and QM CD72 deficient mice by analyzing calcium influx using NP-conjugated CD72 ligand and NP-conjugated BSA, showed CD72-dependent reduction of BCR signaling following ligation of CD72 ligand-containing antigen. Moreover, the amount of serum anti-CD72 ligand IgM class antibody was increased in C57BL/6 CD72 deficient mice compared with that in C57BL/6 mice. These results suggest novel self and non-self recognition mechanism of B cells by CD72-CD72 ligand interaction-mediated suppression of BCR signaling and antibody production against CD72 ligand-containing antigens.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学、免疫学
科研費の分科・細目：基礎医学・免疫学
キーワード：Bリンパ球、レクチン、糖鎖

1. 研究開始当初の背景

CD72は細胞外領域に CTLD、細胞内領域に ITIM を有しており、ITIM を介して 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なっている。自己免疫疾患は多因子疾患であるが、全身性エリテマトーデス (SLE) のモデルマウスである MRL/lpr マウスの解析から、CD72 遺伝子を含むゲノム領域が血管炎と糸球体腎炎の原因領域であることが明らかにされている。実際、CD72 欠失マウスでは自己抗体の産生や自己免疫病が観察されることが示され、ヒトにおいても CD72 の多型は SLE の発症と相関関係があることが明らかにされている。また MRL/lpr マウスでは CD72 ハプロタイプが通常の a、b タイプ (CD72a,b) と異なる c タイプ (CD72c) であり、CD72c では CD72a,b に比べその CTLD に 7 アミノ酸の欠失が認められることから CD72 の CTLD 機能の違いが自己免疫発症の重要な要因となっている可能性も考えられる。

2. 研究の目的

CD72 リガンドによる CD72 を介した B 細胞免疫応答制御機構と自己免疫制御機構の解明を目的とする。CD72 の CTLD と相互作用する糖鎖リガンドを同定し、CD72 リガンドによって CD72 を介した B 細胞抗原受容体シグナルの制御が行われるか、CD72 リガンドに対する抗体産生の制御が CD72 によって行われるのかを明らかにする。

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う。また同定した糖鎖リガンドと CD72 の C 型レクチン様領域が結合するかどうか ELISA で解析を行う。

(2) ほとんど全ての B 細胞がニトロフェニル基 (NP) に反応性の QM (quasi-monoclonal) マウスと QM/CD72 欠失マウス由来のプライマリー B 細胞とを用いて、NP 架橋した CD72 リガンドと NP 架橋した非 CD72 リガンドで B 細胞

抗原受容体刺激を加えた場合の細胞内カルシウム濃度をフローサイトメーターにより解析し、CD72 リガンドによって CD72 を介した BCR シグナルの抑制が起きるかどうかを明らかにする。

(3) C57BL/6 マウスと C57BL/6 CD72 ノックアウトマウスを用いて、CD72 リガンドに対する抗体の血清中の量に変化がないか解析する。

4. 研究成果

糖鎖アレイにより CD72 がある種類の硫酸化糖鎖と結合すると結果が示唆された (図未表示)。CD72 の C 型レクチン様領域は C 型レクチン領域に典型的な Ca^{2+} 結合サイトを有していないが、バクテリアで発現・精製した CD72 の C 型レクチン様領域のタンパクを用いて ELISA により CD72 がある種の硫酸化糖鎖と CD72 の C 型レクチン様領域を介して Ca^{2+} 非依存的に結合することを明らかにした (図 1)。いくつかの CD72 リガンドは自己免疫疾患関連抗原であった。

また、CD72 を欠失した QM マウス由来のプライマリー B 細胞では QM マウス由来 B 細胞に比べて、NP 架橋 CD72 リガンドで抗原刺激をした際の細胞内 Ca^{2+} 濃度がより増加し、より強い B 細胞抗原受容体シグナルが誘導されている事を示した (図未表示)

さらに C57BL/6 CD72^{-/-} マウスでは C57BL/6 マウスに比べて CD72 リガンドに対する IgM クラスの血清中の抗体量が増加していることから、CD72 の欠失は CD72 リガンドに対する抗体産生の増加につながることを示した (図 2)。

これらの結果は B 細胞表面上の CD72 が、そのリガンドに対する B 細胞の活性化を抑制することでそのリガンドに対する抗体産生、免疫応答を抑制していることを示唆するものであり、まだ明らかになっていない B 細胞による自己と非自己の新たな識別機構を示すものである。このような自己と非自己の識別機構の解明は、自己免疫疾患の発症機構の新たな理解につながるものである。また B 細胞表面上のタンパクが直接そのリガンドに対する抗体産生を抑制することで自己免疫応答への障壁として機能しているという概念を提唱するものである。

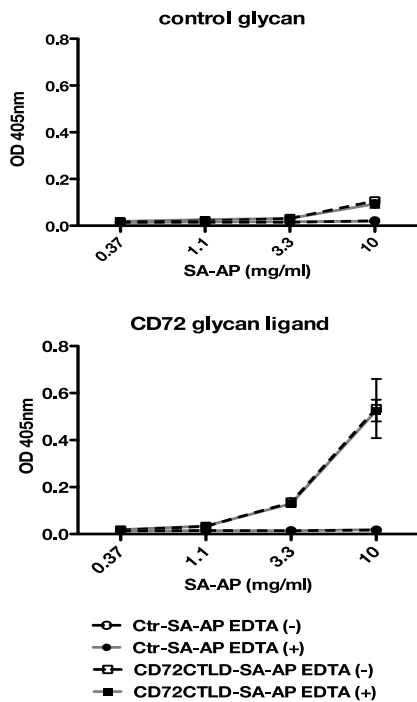


図1 CD72 リガンドを含む糖鎖と含まない糖鎖をコーティングしたプレートへの CD72 タンパク質/アルカリフォスファターゼ架橋ストレプトアビジン (SA-AP) 複合体とコントロール/SA-AP 複合体 (SA-AP 濃度 0.37mg/ml から 10mg/ml) の結合を EDTA 存在下 (+) 非存在下 (-) でアルカリフォスファターゼを用いて OD405nm を測定する ELISA で解析した。

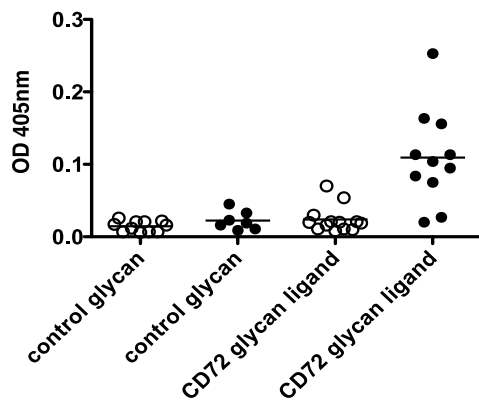


図2 C57BL/6 マウス (白丸) と C57BL/6 CD72 欠損マウス (黒丸) の血清の IgM クラスの抗体の CD72 糖鎖リガンドに対する反応性を ELISA で解析した。

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 3 件)

(1) Watanabe, K., Tsuchiya, Y., Kawaguchi, Y., Sawada, S., Ayame, H., Akiyoshi, K. and *Tsubata, T. The use of cationic nanogels to deliver proteins to myeloma cells and primary T lymphocytes that poorly express heparan sulfate.

Biomaterials. 32: 5900-5905. (2011) 査読あり

(2) Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Completo, G. C., Sadagopan, M., Hayashizaki, K., Takaku, C., Tamanaka, T., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Paulson, J.C., Tsubata, T., Ando, H., Ishida, H. and *Kiso, M. 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: 1966-1971 (2011) 査読あり

(3) Abdu-Allah, H. H. M., Watanabe, K., Kanie, O., Tsubata, T. Ishida, H. and *Kiso, M. Design and synthesis of multivalent heterobifunctional CD22-ligand as a potential immunomodulator.

Synthesis. 18: 2968-2974 (2011) 査読あり

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

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

