

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590078

研究課題名(和文) ヒト胚中心B細胞を特徴づける糖鎖変化の機能解明

研究課題名(英文) Analyses of glycan function characteristic for human B cells

研究代表者

竹松 弘 (Takematsu, Hiromu)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80324680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：胚中心反応は体液性免疫において必須の反応である。胚中心ではB細胞受容体を介して活性化されたB細胞が抗体遺伝子の改変し、免疫応答を達成する。マウスは免疫系を明らかにするためのモデル動物として非常に重要な役割を果たすが、一方で、ヒトとマウスでは必ずしも同じではない。両者の主要な違いには細胞表面の糖鎖があげられる。胚中心B細胞は、活性化したB細胞であるが、その同定には糖鎖認識分子が使用される。糖鎖の機能的解析の結果シグナル伝達の質を変化させていることが明らかとなった。これらの結果は、胚中心B細胞は、糖鎖発現を変化させることで、細胞内シグナル伝達経路を経路特異的に制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Germinal center reaction is essential for acquired immunity. In germinal center, B cells undergo important immunoglobulin gene modification such as class switching and affinity maturation, which enable optimal immunity. Mouse has served as a nice model to study immunity. However, considerable difference was found between these two species. Cell surface glycans are one of those differences. Here we focused onto the glycans whose expression is regulated in germinal center B cells. We created model B cells with various change only on glycans. This set of cells are optimal for BCR signaling studied because germinal center B cells differ quite a lot from mature B cells, other than cell surface glycans. Thus comparison of normal mature B and germinal center B cells make it difficult to understand. We found that each marker glycans account for signaling events downstream BCR to achieve optimal B cell activation.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：糖鎖抗原 免疫応答 シグナル伝達経路 胚中心 抗体

1. 研究開始当初の背景

抗体は免疫系が産生する液性因子であり、この発現には抗原特異的に活性化された B 細胞が関わる。抗原特異的な B 細胞の活性化には B 細胞表面に存在する B 細胞抗原受容体 (BCR) が関わるため、BCR を介したシグナル伝達の制御は動物個体における免疫応答の成否決定するクリティカルな院試であると考えられる。申請者は、これまで、マウスの胚中心反応に特異的に誘導される単クローン抗体 GL7 に対するエピトープについての研究を行っており、GL7 エピトープは胚中心で活性化された B 細胞が発現誘導するシアル酸含有糖鎖である Neu5Ac α 2-6 Gal β 1-4 GlcNAc を末端に持つ糖鎖であることを明らかにしてきた。この GL7 エピトープは特異的に発現誘導が行われるため、マウス胚中心 B 細胞を組織切片やフローサイトメトリーで検出するために世界中で幅広く使われている。しかしながら、この糖鎖変化はマーカーとして細胞を検出するために有用であるだけでなく、免疫学的には、BCR 共受容体分子 CD22 の高親和性受容体が無くなる姿を検出していることも明らかにした。すなわち、活性化 B 細胞は胚中心における糖鎖変化を介してその活性化制御をも行っていることが明らかになってきた。

糖鎖は、細胞の顔とも比喩されるように、その発現の特徴として、動物種、細胞種、その活性化状態などに応じて、多様に制御される。しかしながら、その機能性について多くのことが分かっているわけではなかった。免疫系においては、マウスがモデル生物として、盛んに利用されており、マウスを使った研究で非常に多くのことが明らかにされてきたが、ヒトとマウスを比較すると、その糖鎖発現が大きく異なることが知られている。そこで、ヒト免疫系における胚中心反応での糖鎖変化については、その機能性をマウスモデルで明らかにすることが出来ない。一方で、ヒト胚中心 B 細胞においては、CD77、PNA 結合型糖鎖などの糖鎖変化が起こることが明らかにされてきており、その免疫応答を制御する因子としての機能性についても興味を持たれたが、これまで、糖鎖のみを変化させた B 細胞での比較の例はなく、不明な点が多かった。

2. 研究の目的

そこで、ヒト活性化 B 細胞特異的な糖鎖変化の機能性について検討することで、ヒトでの免疫応答についての知見が得られることが考えられた。糖鎖を改変することは特定のタンパク質の発現を変化させることに比べると非常に困難である。と言うのも、糖鎖はゴルジ体における糖転移酵素の逐次反応により生合成され、その生合成には数十に及ぶ酵素が関わる。そこで、本研究では、この胚中

心特異的な糖鎖の生合成に関わる制御因子の同定をまず試みた。また、同定できた制御酵素の発現をモデル B 細胞で変化させ、糖鎖のみを変化させた B 細胞を作成した。最後に、ここで得られたモデル細胞を用いて、BCR シグナル伝達における機能性を検討した。

3. 研究の方法

糖鎖生合成制御因子の同定には、申請者が開発したトランスクリプトーム解析を利用した定量的な遺伝型-表現型解析法である Correlation index based responsible enzyme gene screening (CIRES) 法をもちいた。また、ヒトモデル細胞としては、BCR シグナルを活性化した際に、BCR 下流の経路の活性化も含めて、チロシンリン酸化の誘導、カルシウムイオンの流入、Akt 経路の活性化、MAP kinase 経路の活性化など、これまで知られている BCR 下流でのイベントが成熟 B 細胞と同様におこるかどうかを指標として、リンフォーマ細胞から選び、糖鎖のみを変化させたモデル B 細胞の構築を試みた。

4. 研究成果

モデル細胞の選定

Namalwa 細胞は Burkitt lymphoma 細胞であり、成熟 B 細胞と同様に、細胞表面に IgM サブクラスの BCR を発現する。この BCR 量は、オートクライン経路で制御されており、この発現量を人為的に制御するために、細胞培養法の検討を行った。その結果、適度の培地交換により、シグナル伝達経路入り口となる BCR の量を制御できることが明らかとなった。

BCR が発現することは、BCR シグナル伝達を起こすことと直接には結びつかない。そこで、Namalwa 細胞を用いて、成熟 B 細胞でおこる下流のシグナル伝達に関わるイベントに関して検討を行った。その結果、BCR 直下でおこる様々なシグナル伝達因子のチロシンリン酸化、これとほぼ同時に誘導され、アダプター分子 BLNK を介し、PLC 2 を活性化するカルシウムイオンの流入、別の膜貫通型アダプター分子である CD19 を介し、PI3Kinase を活性化する経路およびその下流で Akt を活性化する経路など BCR 直下でおこるとされるシグナル伝達イベントは全て Namalwa 細胞でおこることが明らかとなった。

さらに、Namalwa 細胞では、BCR 刺激後、少し遅れて活性化される ERK, JNK などの MAP キナーゼ経路の活性化も成熟 B 細胞同様に起こし、がん細胞株でありながら Namalwa 細胞は BCR シグナル伝達を検討するのに適性が高い細胞であることを明らかにした。

糖鎖改変モデル細胞の樹立

ヒト胚中心 B 細胞ではピーナツレクチンにより検出される PNA エピトープやグロボ系列の糖脂質に属する CD77 抗原の発現が誘導され

る。PNA エピトープは centroblast, centrocyte と分類される両者の胚中心B細胞で発現が誘導されるが、CD77 はこれらのうち、centroblast でのみ発現誘導されることが知られており、両者は異なった経路で制御されていることが考えられた。CIRES 法により、それぞれの抗原を制御する遺伝子として、PNA エピトープを負に制御する ST3GAL1 遺伝子と CD77 を正に制御する A4GALT 遺伝子を同定した。これを Namalwa 細胞に発現させることにより、PNA エピトープを抑制した細胞と CD77 の発現を誘導した細胞の作成に成功した。また、A4GALT 遺伝子は、糖脂質生成分岐点で、基質であるラクトシルセラミドを生合成する B4GALT6 遺伝子との連携が見られ、A4GALT 酵素は B4GALT6 酵素とゴルジ体内複合体を形成しており、糖脂質生成分岐点で遺伝学的に優性に働いていた。このため、A4GALT の活性化部位に変異を導入した A4GALT-TxT 遺伝子を導入した、ドミナントネガティブ導入細胞も作成し、この細胞においては、ラクトシルセラミドやその下流での GM3、脂質ラフとのマーカーとして利用される GM1 の発現も抑制した細胞の作成にも成功した。

BCR シグナル伝達における糖鎖の機能

これらの Namalwa 細胞はコントロール細胞と比べると糖鎖のみが変化しており、糖鎖機能を検討するためには非常に有効な細胞であることが考えられた。というのも成熟 B 細胞は基本的に G1/0 期でアレストした非分裂細胞であり、胚中心 B 細胞は 6 時間に一度という哺乳動物細胞では稀なほどのスピードで細胞分裂を繰り返す細胞種である。そこで、成体から分離したこれらの細胞を比較して、その応答に変化があったとしても、それは、細胞表面での糖鎖の変化だけに起因するか同定することは困難だと考えられるからである。いっぽう、これら Namalwa 細胞では、遺伝学的には一つの糖転移酵素遺伝子を導入しただけの差しか無く、これらの遺伝子産物が作り出す糖鎖の変化の機能性を証明できることが期待された。

そこで、糖鎖改変モデル細胞を用いて、実際に BCR シグナル伝達を活性化させ、その下流で引き起こされる様々なシグナル伝達経路の活性化をモニターした。その結果、ST3GAL1 細胞では、カルシウムイオンの流入の速度に変化が見られた。さらに、この変化は下流では、シグナル伝達強度の変化となり伝わっており、今まであまり知られていないシグナル伝達の性質を変換する過程に関わっていることが考えられ、非常に興味深い結果であった。

BCR シグナル伝達は BCR と同じ膜に存在する共受容体分子により、制御される事が知られている。CD19 は BCR シグナル伝達を正に制御する共受容体分子である。CD77 の発現誘導は、CD19 を介した活性化を制御するが、異なるアダプター分子である BLNK を介した経路には影響を及ぼさなかった。すなわち、糖脂質の発現変化で、数ある経路の内の特定の経路のみが制御されていることが明らかになった。それとは対照的に、CD77 は生合成しないが、ガングリオ系列の糖脂質の発現を抑制する TxT 変異体細胞では、経路全体が制御されており、ラクトシルセラミドに付加される糖の種類の違いで異なる制御が可能になることが明らかになった。この結果は、糖脂質がただ、そこにあり、脂質ドメインを作り、シグナル伝達因子が入ってくるのを待っている、というこれまでの受け身的な見解を否定し、特定の細胞膜分子に対して積極的にその活性化を変化させることを示した結果であると考えられ、意義深いと思われた。

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)

Nakagawa N, Yagi H, Kato K, Takematsu H, Oka S. Ectopic clustering of Cajal-Retzius and subplate cells is an initial pathological feature in Pomgnt2-knockout mice, a model of dystroglycanopathy.

Sci Rep. 5:11163. (2015) doi: 10.1038/srep11163.

Itoh H, Matsuo H, Kitamura N, Yamamoto S, Higuchi T, Takematsu H, Kamikubo Y, Kondo T, Yamashita K, Sasada M, Takaori-Kondo A, Adachi S.

Enhancement of neutrophil autophagy by an IVIG preparation against multi-drug-resistant bacteria as well as drug sensitive strains

J Leukocyte Biol. In press (2015) pii: jlb.4A0813-422RRR[Epub ahead of print]

Yagi S, Many H, Nakagawa N, Takematsu H, Endo T, Kannagi R, Yoshihara T, Asano M, Oka S Major glycan structure underlying expression of the Lewis X epitope in the developing brain is O-mannose-linked glycans on phosphacan/RPTP

Glycobiology. 25(4):376-85 (2015) doi: 10.1093/glycob/cwu118

Yamane-Sando Y, Shimobayashi E, Shimobayashi M, Kozutsumi Y, Oka S, Takematsu H.

Fpk1/2 kinases regulate cellular sphingoid long-chain base (LCB) abundance and alter cellular resistance to LCB elevation or depletion

MicrobiologyOpen. 3(2):196-212. (2014) doi:

10.1002/mbo3.160

Morise J, Kizuka Y, Yabuno K, Tonoyama Y, Hashii N, Kawasaki N, Manya H, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Endo T, Maeda N, Takematsu H, Oka S. Structural and biochemical characterization of O-mannose-linked HNK-1 glycan expressed on phosphacan in developing mouse brains.

Glycobiology. 25(3): 314-24 (2014) doi: 10.1093/glycob/cwt116

Naito-Matsui Y, Takada S, Kano Y, Iyoda T, Sugai M, Shimizu A, Inaba K, Nitschke L, Tsubata T, Oka S, Kozutsumi Y, Takematsu H.

Functional Evaluation of Activation-dependent Alterations in the Sialoglycan Composition of T Cells.

J Biol Chem. 289(3):1564-79 (2014) doi: 10.1074/jbc.M113.523753

Nakagawa N, Takematsu H, Oka S.

HNK-1 sulfotransferase-dependent sulfation regulating laminin-binding glycans occurs in the post-phosphoryl moiety on -dystroglycan.

Glycobiology. 23(9):1066-74. (2013) doi: 10.1093/glycob/cwt043

Sun Y, Miao Y, Yamane Y, Zhang C, Shokat KM, Takematsu H, Kozutsumi Y, Drubin DG.

Orm protein phosphoregulation mediates transient sphingolipid biosynthesis response to heat stress via the Pkh-Ypk and Cdc55-PP2A pathway

Mol Biol Cell. 23 (12): 2388-98 (2012) doi: 10.1091/mbc.E12-03-0209

Adachi T, Harumiya S, Takematsu H, Kozutsumi Y, Wabl M, Fujimoto M, Tedder TF

CD22 serves as a receptor for soluble IgM
Eur J Immunol. 42 (1): 241-247 (2012) doi: 10.1002/eji.201141899

〔雑誌論文〕(計 10 件)

〔学会発表〕(計 12 (国際) 件)

〔図書〕(総説)(計 4 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.med.kyoto-u.ac.jp/organization-staff/research/human_health/mt0101/

6. 研究組織
(1) 研究代表者
竹松 弘 (TAKEMATSU, Hiromu)

京都市左京区聖護院川原町53

京都大学大学院医学研究科

人間健康科学専攻基礎検査展開学

研究者番号：80324680