

博士學位論文

内容の要旨及び審査の結果の要旨

第 31 号

2011 年 3 月

京 都 産 業 大 学

— は し が き —

本号は、学位規則（昭和 28 年 4 月 1 日 文部省令第 9 号）第 8 条の規定による公表を目的とし、平成 23 年 3 月 20 日に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を収録したものである。

学位番号に付した甲は学位規則第 4 条第 1 項によるもの（いわゆる課程博士）であり、乙は同条第 2 項によるもの（いわゆる論文博士）である。

目 次

課程博士

1. 石 田 有 希 子〔博士（生物工学）〕…………… 1

氏名（本籍）	石田 有希子（京都府）
学位の種類	博士（生物工学）
学位記番号	甲工第14号
学位授与年月日	平成23年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
論文題目	シスまたはトランスリガンドの結合に伴う CD33-related Siglecs の生物学的機能の解析
論文審査委員	主査 中田 博 教授 副査 福井 成行 教授 " 瀬尾 美鈴 教授 " 板野 直樹 教授

論文内容の要旨

免疫細胞の多くは様々な抑制性受容体を発現し、免疫機能を調節している。免疫細胞に発現する抑制性受容体ファミリーの一つに Siglec ファミリーが挙げられる。その多くはシアル酸含有糖鎖を認識し、細胞質内領域に抑制性モチーフをもつことから発現細胞の機能を負に制御していると考えられている。しかし、そのリガンドや抑制作用の対象となる活性化受容体についてはほとんど明らかになっていない。

本研究では Siglec-3 および-9 のトランスおよびシスリガンドの結合に伴う生物学的機能を検討した。上皮性癌細胞が産生するムチンは、Siglec ファミリーが認識するとされているシアリル Tn 抗原をはじめとするシアログリカンを多く発現していることから、トランスリガンドとして Siglec-3 および-9 に作用し、これらを発現する樹状細胞の機能を負に制御する可能性がある。

まず、組換え可溶性ヒト Siglec-3 および-9 が大腸癌由来細胞株 LS180 細胞から精製した MUC2 ムチン (LSM)、ウシ顎下腺ムチン (BSM) およびシアル酸が $\alpha 2,3$ または $\alpha 2,6$ 結合した単一の糖鎖をもつ合成グリコポリマーに結合することをプレートアッセイにより確認した。ヒト末梢血単球から成熟樹状細胞への各分化過程を通じて Siglec-3 は高いレベルで一定量発現し、Siglec-9 の発

現は、単球から未熟樹状細胞に分化すると増加し、成熟する過程で減少した。単球より LSM 存在下で分化誘導したとき、CD83 を発現する成熟樹状細胞数が減少し、アポトーシス細胞が増加した。また、アポトーシスは抗 Siglec-3 抗体および可溶性 Siglec-3 によって部分的に阻害された。これらの結果により、LSM による樹状細胞のアポトーシスは、LSM の Siglec-3 への結合が一部関与していることが分かった。

Siglec-9 はその発現の推移より未熟樹状細胞の段階で機能的に重要であると予想され、未熟樹状細胞の段階で Siglec-9 を介したムチンの影響を検討した。標識した BSM および LSM を用いて、これらのムチンが未熟樹状細胞に結合することをフローサイトメトリーで確認した。ムチン、抗 Siglec-9 抗体あるいは抗 Siglec-3 抗体存在下で未熟樹状細胞を LPS 刺激すると、IL-12 の産生が減少した。胃癌患者の血清から調製したムチンも Siglec-9 に結合活性をもつことから、未熟樹状細胞に発現する Siglec-9 は上皮性癌患者の生体内でムチンと結合し、IL-12 の産性能を抑制するものと考えられる。これらの結果は、ムチンが抗腫瘍免疫の抑制に関与していることを示唆している。

続いて、上述した LPS 刺激に伴う IL-12 の産生の減少の背景にあると予想される TLR4 のシグナル伝達に対する抑制機構を検討した。未熟樹状細胞を抗 Siglec-3 抗体存在下で LPS 刺激すると、NF- κ B のリン酸化が減少することから、Siglec-3 は TLR4 を介したシグナル伝達の抑制に関与することが分かった。Siglec-3 の内在性リガンドを検索する目的で、樹状細胞の細胞表面分子を架橋試薬で架橋し、Siglec-3 について免疫沈降を行った。沈降物を SDS-PAGE し、ウェスタンブロッティング後に CD14 および TLR4 を検出したところ、架橋された分子として CD14 が認められた。また、細胞を免疫染色すると、細胞表面の一部の Siglec-3 が CD14 と共局在していることが分かった。組換え可溶性 Siglec-3 と CD14 の結合をプレートアッセイにより確認するとともに、CD14 をノイラミニダーゼ処理することにより、Siglec-3 と CD14 の結合が消失したことから、Siglec-3 は CD14 のシアル酸含有糖鎖を介して CD14 と結合していることが分かった。TLR4 のシグナル伝達に対する Siglec-3 の影響を詳しく調べるため、LPS レセプター複合体分子 (TLR4、CD14、MD2) を強制発現した HEK293 T 細胞に更に野生型またはレクチン活性を欠損した Siglec-3 を強制発現した細胞株を作製した。LPS 刺激による TLR4 のシグナル伝達を介した NF- κ B のリン酸化について比較した結果、野生型 Siglec-3 の発現により NF- κ B のリン酸化は著しく減少したが、レクチン活性を欠損した Siglec-3 では抑制効果は認められなかった。これらの結果は、CD14 は Siglec-3 のシスリガンドであり、両分子の結合による TLR4 のシグナル伝達の抑制が示唆された。

論文調査結果の要旨

ほとんどのシグレックファミリー分子は免疫系細胞に発現されており、レクチンであること及び多くのシグレック分子が細胞質内に ITIM と呼ばれる免疫抑制性のモチーフをもつことを特徴としている。しかしながら、生体内におけるリガンド及び免疫細胞においてどのような活性化シグナルを調節しているかについては、シグレック 2 による B 細胞シグナル伝達の抑制などを除いてほとんど解明されていない。一方、多くの悪性腫瘍が上皮細胞由来でムチンとよばれる多様なシアロ O-グリカンをもつ糖タンパク質を産生し、腫瘍組織や血液中に分泌する。一般的にシグレックはシアル酸を含む糖鎖を認識することから、ムチンはシグレックファミリーの内在性リガンドの候補と考えられた。従って、担癌状態における免疫抑制機構の一端を担っている可能性があり、興味深い研究対象と言える。このような発想は、癌患者血中のムチンが単なる腫瘍マーカーとして研究対象となってきた状況から一步踏み出したものであり、糖鎖生物学と腫瘍免疫学の学際領域をうめる極めて独創性に富んだ研究といえる。また、腫瘍免疫学の立場からも、従来のサイトカインやキラー T 細胞などを対象としてきた視点とは全く異なる領域を開拓するユニークな研究と言える。

本研究は、主にマクロファージや樹状細胞に発現している CD33-related Siglecs であるシグレック-3 及び-9 を対象として、内在性トランスおよびシスリガンドとの相互作用とその生物学的意義について検討したものである。対象としたいずれのシグレックもヒト腸がん由来細胞株である LS180 細胞の産生するムチンと結合することが確認された。単球から樹状細胞への分化段階において、シグレック-3 は一定量の発現を示したが、シグレック-9 については、未熟樹状細胞において最も高く発現していた。従って、シグレック-3 は分化段階初期より機能する可能性が予想された。上記ムチン存在下での単球からの分化はアネキシン V 陽性細胞の増加をもたらした。すなわち、ムチンによるアポトーシスの誘導を示しており、癌患者に一般的に見られる樹状細胞の減少を裏付ける背景の一つと考えられ、詳細な誘導機構の解明が待たれる。

シグレック-9 を介したムチンの影響は、未熟樹状細胞において見られた。すなわち、LS180 細胞由来のムチン、合成グリコポリマー、あるいは抗シグレック-9 抗体の存在下で未熟樹状細胞を LPS で刺激し、IL-12 の産生に対する影響を見るといずれも同サイトカインの産生を抑制した。未熟樹状細胞上には他のシグレックも含めて多くのレクチンが発現しており、それらのレクチンを介した反応も関与することが予想されたが、過ヨウ素酸処理をしたムチンでは上記効果が消失したことから、シグレック-9 を含むシグレックファミリーによる作用と考えられる。また、抗シグレック-3 抗体によっても同様の効果が見られ、かつ抗シグレック-9 および-3 抗体を同時に用いてもその効果は単独の場合と同レベルであったことから、抑制効果はシグナル伝達の下流で制御されている可能性が考えられた。これらの結果の内、シグナル伝達については、多くの課題を残しているが、ムチンによる IL-12 の産生抑制は Th2 免疫環境をもたら

すことから、担癌状態における免疫抑制の一端を担う現象と考えられ、極めて興味深い結果と言える。

TLR-4 は LPS を認識する受容体として、自然免疫において重要な機能をはたしているが、その抑制性受容体についてはほとんど解明されていない。LPS 受容体複合体 (TLR-4、CD14、MD-2) の強制発現株において、LPS 刺激に伴う NF- κ B のリン酸化を指標にさらなるシグレック-3 の導入による効果をみたところ、シグレック-3 により NF- κ B のリン酸化の著しい抑制が見られた。レクチン活性を無くしたシグレック-3 の導入では、その効果が消失したことからシグレック-3 のリガンド結合活性が必要であることがわかった。従って、内在性リガンドが関与すると予想され、内在性シスリガンドの検索が重要となった。一般的にレクチンと糖鎖の結合の親和性は低いことから、シグレック-3 と共局在する分子を架橋剤を用いて検索した。すなわち、樹状細胞あるいはシグレック-3 および LPS 受容体複合体の強制発現株において、架橋後のシグレック-3 とともに CD14 が回収されることがわかった。その抑制機構については、CD14 との結合に伴うシグレック-3 への SHP-1 のリクルートを検討したが、有意の結果は得られなかった。LPS の CD14 から TLR-4 への受け渡しの過程でシグレック-3 が関与する全く新規な機構が考えられる。本研究の成果は、糖鎖生物学領域のみならず自然免疫学領域においても極めて重要な発見であり、今後の研究の進展が期待される。

以上の研究成果は、癌微小環境因子としてのムチンがその認識分子としてのシグレック-3 や-9 への結合を介して、癌細胞の腫瘍免疫からの回避に機能するという新たな知見であり、学術的にも意義深いものであると評価できる。また、TLR-4 を介した LPS による活性化シグナルがシグレック-3 により制御されるという知見も、糖鎖生物学のみならず自然免疫学において特筆される成果と言える。さらに、本研究は多方面からの解析が加えられ、得られた結果に説得力があり、かつ目的、方法、および結果も明瞭で当該分野において今後の研究上大いに意義のある論文であると評価できる。

以上により本学位論文は本調査に合格とする。