

論文内容の要旨

論文題目 植物レクチンを利用したヒト末梢血単球のプロファイリングと細胞の分画法
氏名 小松 邦光

【序論】

細胞表面の糖鎖は増殖因子やホルモンの受容体、細菌やウイルスの受容体、そして細胞間相互作用や細胞移動において重要な役割を演じている。糖鎖の多様な構造は、一般に細胞の系譜で変化することが知られており、細胞の分化段階および成熟段階を反映すると考えられている。このことから、細胞表面の糖鎖によって生体内のあらゆる細胞系譜が記述されると考えられているが、200種類以上の糖鎖合成関連遺伝子の組合せで合成される糖鎖構造を、遺伝子発現から推測することはできない。加えて、未だに明らかになっていない細胞集団も多く、まずは糖鎖を直接検出し、その発現が異なる細胞集団を個々に同定する必要があると考えた。糖鎖を直接検出する方法としては、レクチンを利用する方法がある。特に植物レクチンは特異的な糖鎖の検出プローブとして、生物学や医学の分野で広く利用されている。近年、植物レクチンのアレイや遺伝子工学技術による改変レクチンライブラリーの作製によって、多数のレクチンと種々の糖タンパク質もしくは細胞との結合パターンを測定し、これによって表面糖鎖に基づくプロファイリングを行うことが可能になった。このことから、私は細胞表面糖鎖を多数の植物レクチンで検出することで、種々の細胞集団を同定することができると考えた。本研究の長期的な目標はそれぞれ特異的な機能を持つ細胞集団を細胞表面糖鎖に基づいて記述すること、および生体内のあらゆる細胞の系譜と成熟段階を細胞表面糖鎖に基づいて記述するこ

Lectin	Conc. (μg/ml)
ABA*	5
ACA*	1
BPL*	5
DBA	10
GSL-I	10
HPA*	10
Jacalin*	5
PHA-E4	0.5
PHA-L4	1
PNA*	10
RCA120	1
SBA*	10
SJA	10
VVA-B4*	10
MAM	5
MAL II*	10
SNA	1
SSA	1
WGA	0.5
ConA	1
DSA	0.5
LAA	10
LCA	1
LEL	0.5
PSA	1
PWM	10
Succinyl	2
WGA	10
AAL	0.25
LTA	10
UEA-I	10

表 1、使用したレクチン。植物レクチンは単糖特異性ごとにまとめて表記した。* は比較的長さの短い結合型糖鎖に結合することが知られているもの。

とである。今回はヒト単球とその類縁細胞である樹状細胞 (DC) を対象として研究を行った。

単球および DC はそれぞれ多様な亜集団から成る。DC は重要な抗原提示細胞であり、免疫の応答にも寛容にも重要な役割を果たしている。単球は骨髄において骨髄系前駆細胞より生じ、末梢血中へ放出される。単球は DC の前駆細胞であるが、それ以外にも培養条件の違いによってマクロファージや破骨細胞などにも分化することがわかっている。しかし、単球およびその分化経路に存在する亜集団の全容、そして各亜集団に対応する細胞分化のコミットメントについては完全には明らかにされていない。本研究では、細胞表面糖鎖の多様性に基づいて単球から特異的な機能を持つ細胞亜集団を同定し、分画することを試みた。

1. 植物レクチン単球亜集団の同定: Jacalin 低結合および高結合単球亜集団

【方法と結果】

(1) ヒト単球の採取と DC の誘導

ヒト末梢血からパーコールを用いた密度勾配遠心によって末梢血単核球を調製し、さらに抗 CD14 抗体ビーズを用いた磁気細胞分離法によって CD14⁺ 単球を単離した。単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 7 日間培養して未成熟 DC を誘導した。さらに LPS を添加して 2 日間培養することで成熟 DC を誘導した。調製された細胞は表面マーカーに対する抗体を用いたフローサイトメトリー法により確認した。

(2) 単球及びそれに由来する細胞へのレクチンの結合

糖鎖構造特異的に結合するタンパク質であるレクチンを 30 種類用い、ヒト単球もしくは未成熟・成熟 DC への結合をフローサイトメトリー法で解析した。使用したレクチンの濃度は、10 $\mu\text{g/ml}$ を最大として、単球を凝集させないがシグナルを最大に得られるように最適化した (表 1)。レクチンの細胞に対する結合は分化・成熟過程で変化した。例えば MAH は 3 種類のどの細胞にも結合したが、DBA はいずれの細胞にも結合せず、SBA や PNA、および VVA-B4 は単球の分化、成熟過程で結合が減少した。また特に興味深いことに、Jacalin は未成熟および成熟 DC に対しては高いレベルで結合するのに対し、単球の中には結合レベルの高い細胞と低い細胞が見られた (図 1)。

(3) Jacalin と細胞表面マーカーの二重染色

Jacalin への結合性と相関する細胞表面マーカーがあるかどうかを調べるため、Jacalin と 19 種類の白血球細胞表面マーカーを用いて

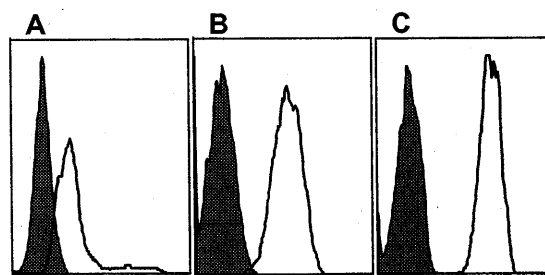


図 1. Jacalin の結合。単球 (A)、未成熟 DC (B)、および成熟 DC (C) に対する ビオチン化 Jacalin の結合をフローサイトメトリー法によって測定した。横軸は蛍光強度、縦軸は相対的細胞数を表す。黒いヒストグラムはレクチンなしのコントロール、白いヒストグラムは Jacalin の結合量を表す。

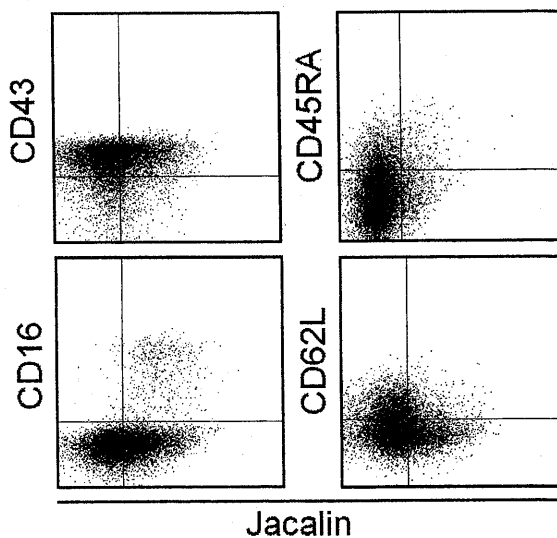


図 2. Jacalin (横軸) と各種表面マーカー (縦軸) による単球の二重染色。Jacalin の結合とマーカーに対する抗体の結合はフローサイトメトリー法によって解析した。

単球の蛍光二重染色を行った (図 2)。Jacalin はムチン様糖タンパク質に結合するが、ムチンドメインを持つ CD43 や CD45RA を発現している単球には Jacalin 高結合と低結合の両方の細胞が含まれており、Jacalin の結合とこれらの糖タンパク質の発現には相関関係は見られなかった。一方、CD16 を発現する単球は Jacalin 結合性は高かったが、CD16 を発現しない単球は Jacalin 高結合と低結合の両方の細胞集団を含んでいた。また、糖鎖を認識して細胞移動に関わる L-セレクトリン (CD62L) は Jacalin 低結合の単球に発現されていたが、Jacalin 高結合の単球には発現されていなかった。

【考察】

単球の分化に伴い SBA、PNA、VVA-B4 の結合レベルが低下すること、また Jacalin が未知の亜集団の同定に用いられうることを示された。これらのレクチンはすべて O 結合型で比較的短い長さの糖鎖を認識するものであり、単球の分化・成熟段階を見分けるのに O 結合型糖鎖が有用であることが示された。Jacalin を用いると、CD16⁻単球の中に結合レベルの高い細胞集団と低い細胞集団が発見された。これまでは、CD16⁻単球は CD62L を発現すると言われていたが、この中には CD62L⁺Jacalin^{low} および CD62L⁻Jacalin^{high} の細胞が含まれていることが明らかになった。従って、Jacalin で見分けられる亜集団は、既存のマーカーでは記述することのできない亜集団であると結論された。

単球上で Jacalin の結合性を規定する要因としては、糖転移酵素の発現や糖鎖を持つ分子の細胞表面での発現量が挙げられるが、Jacalin は比較的広い糖鎖認識特異性を有することから、前者よりも後者の可能性があると考えられる。Jacalin リガンドについては O 結合型糖鎖を持つ糖タンパク質であると推測され、レクチンカラムによるアフィニティークロマトグラフィーを利用して同定を試みている。

2. 植物レクチンを利用した単球の分画法:新規単球亜集団に特異的な機能の探索

【方法と結果】

(1) 単球亜集団の分画

Jacalin と CD16 で分けられた単球亜集団をセルソーターで単離することを試みた。CD16 を発現している細胞を CD16⁺Jacalin^{high} 亜集団とし、これと同程度に Jacalin の染色が見られるが CD16 の発現がない細胞を CD16⁻Jacalin^{high}、これより Jacalin による染色性が低い集団を CD16⁻Jacalin^{low} 亜集団と定義した。典型的なデータとしては、各亜集団の比率は CD16⁺Jacalin^{high} が $6.05 \pm 2.34\%$ 、CD16⁻Jacalin^{high} が $65.95 \pm 4.11\%$ 、および CD16⁻Jacalin^{low} が $27.44 \pm 5.58\%$ だった。純度を高めるためにそれぞれをやや狭くゲーティングして分画したときには、400 mL のヒト末梢血から採取された約 1.5×10^7 個の単

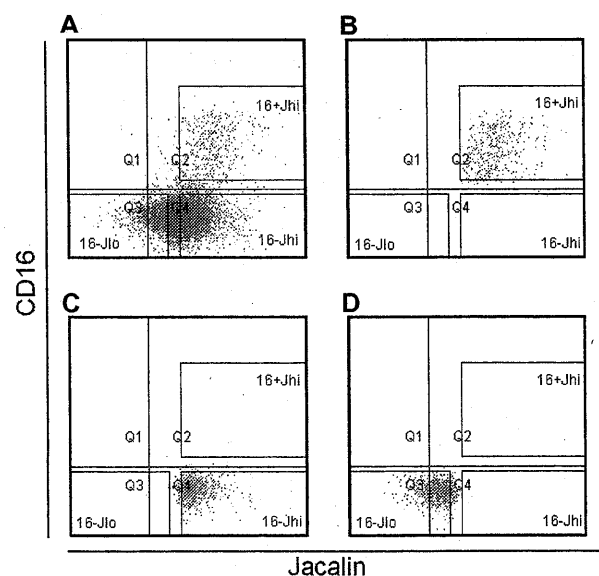


図 3. 単球亜集団の分画。単球を抗 CD16 抗体と Jacalin で染色し (A)、CD16⁺Jacalin^{high} (B)、CD16⁻Jacalin^{high} (C)、および CD16⁻Jacalin^{low} (D) を単離した。

球から、CD16⁺Jacalin^{high} が約 2×10^5 個、CD16⁻Jacalin^{high} が約 2×10^6 個、および CD16⁻Jacalin^{low} が約 1×10^6 個得られた (図 3)。分画後の各亜集団の純度は、それぞれ 90% 以上だった。

(2) 単球亜集団の形態

単離した細胞を染色後観察したところ (図 4)、どの亜集団においてもほぼ円形の細胞が見られ、細胞質に対して大きな核を持つ単球の特徴を備えていた。細胞の表面積を楕円に近似して計算すると、CD16⁺Jacalin^{high} は $226.2 \pm 66.6 \mu\text{m}^2$ 、CD16⁻Jacalin^{high} は $311.0 \pm 62.8 \mu\text{m}^2$ 、そして CD16⁻Jacalin^{low} は $251.3 \pm 68.7 \mu\text{m}^2$ だった (平均 \pm 標準偏差、 $n = 50$)。CD16⁺Jacalin^{high} は小さく、CD16⁻Jacalin^{high} は大きい傾向があったが、 t 検定で有意な差は見られなかった。

(3) ケモカインレセプターの mRNA の発現

単離した細胞から mRNA を回収し、19 種類のケモカインレセプター遺伝子の発現を PCR 法で調べた。この中で特に亜集団間で発現に違いがあると思われた CX3CR1、CCR2、および CCR5 については、そのアガロースゲル上でのバンド強度を β アクチンのバンド強度で規格化し、mRNA の発現量を半定量した。CD16⁺Jacalin^{high} は CX₃CR1 を強く発現していたが、CD16⁻Jacalin^{high} 及び CD16⁻Jacalin^{low} はこれを発現せず、代わりに CCR2 と CCR5 を発現していた。Jacalin の結合性と発現するケモカインレセプターの間に関連関係は見られなかった。

【考察】

Jacalin と CD16 を組み合わせることで、3 つの単球亜集団を単離した。レクチンを利用した表面糖鎖に基づく細胞の分画法を確立したことで、各亜集団特異的に発現する Jacalin リガンドの探索、発現する遺伝子の比較、*in vitro* 培養による細胞分化におけるコミットメントの検討、分化誘導された細胞の種類と機能の比較など、それぞれの単球亜集団に特異的な機能を調べることが可能になった。

【結語】

本研究において、私は O 結合型糖鎖に特異的なレクチンである Jacalin の結合性の違いによって新規の単球亜集団を発見した。さらに Jacalin の結合性と CD16 の発現を組み合わせることで 3 つの単球亜集団を単離することに成功した。現在のところは、Jacalin の結合性によって区別される単球亜集団に関して、機能の違いはまだ見つかっていない。単球亜集団の推測される機能としては次の二点が考えられる。まず、単球そのものが、細胞表面に発現する Jacalin

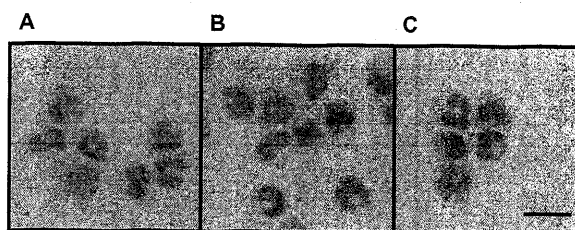


図 4. 単離された単球亜集団の形態。CD16⁺Jacalin^{high} (A)、CD16⁻Jacalin^{high} (B)、および CD16⁻Jacalin^{low} (C) 単球亜集団はサイトスピンによってスライドグラス上にはり付け、ヘマトキシリンおよびエオジンによって染色した。スケールバーは 10 μm を示す。

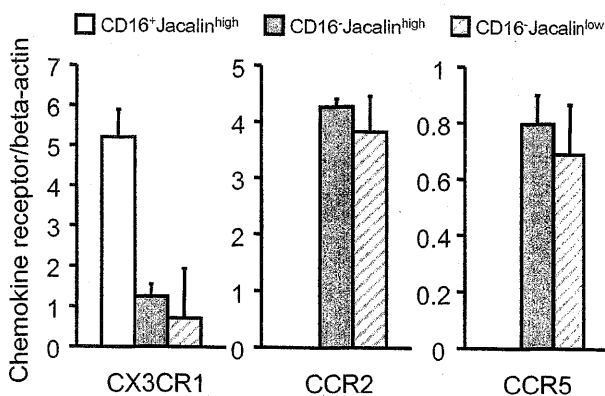


図 5. ケモカインレセプターの RT-PCR 解析。単離した単球亜集団から回収した mRNA から、CX3CR1、CCR2、および CCR5 に特異的なプライマーで増幅した PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で解析し、そのバンド強度を β -actin のバンド強度で規格化して、発現量を半定量した。

のリガンド糖鎖と、生体内の Jacalin 様レクチンとの相互作用によって、亜集団に特異的な細胞間相互作用や細胞移動をするという点。そして、亜集団に特異的な分化のコミットメントが存在し、特定のサイトカイン条件下では特定の亜集団だけが目的の細胞に分化する、もしくは、例えば DC の中でもその一部の亜集団のみに分化するという点である (図

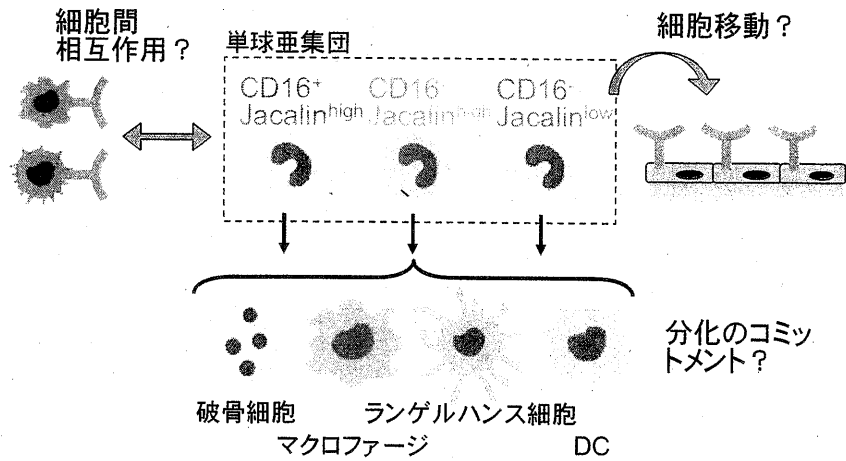


図 6、単球亜集団の推測される機能。単球そのものが、細胞表面に発現する Jacalin のリガンド糖鎖と、生体内の Jacalin 様レクチンとの相互作用によって、亜集団に特異的な細胞間相互作用や細胞移動をする。あるいは、亜集団に特異的な分化のコミットメントが存在し、特定のサイトカイン条件下では特定の亜集団だけが目的の細胞に分化する、もしくは、例えば DC の中でもその一部の亜集団のみに分化するという二点の可能性が考えられる。

6)。これら亜集団に特異的な機能を明らかにすることによって、樹状細胞ワクチンなど免疫療法で効果の高い細胞の調製や、病態に関わる細胞のみにターゲットを絞った治療のデザインなどへの応用が可能である。