

論文の内容の要旨

論文題目 糖鎖修飾抗原に対する免疫応答におけるマクロファージガラクトース型 C 型
レクチン 2 (MGL2) の役割

氏 名 傳田 香里

第一章 序論

真核生物の作るタンパク質の半分以上が糖鎖修飾を受けていると予測されており、抗原に修飾された糖鎖によって免疫応答が影響を受けることが予想される。しかし、抗原に存在する糖鎖が実際に免疫応答、特に獲得免疫応答に影響を与えるかが明らかになった例は少ない。高等動物の細胞表面に存在するタンパク質上の糖鎖の末端の多くはシアル酸が付加されているのに対して、酵母等の下等な真核生物ではマンノースが露出した糖鎖構造を持つ。我々の免疫系が、主に下等生物に存在するマンノース型の糖鎖を認識して活性化することは、外来抗原に対する防御応答として理解しやすい。一方、マンノース残基とシアル酸残基の間に挟まれて存在するガラクトース(Gal)や、O-結合型糖鎖の根元の *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)などについては、免疫系が活性化するのか、抑制的に働くのか不明である。Gal や GalNAc が免疫応答に影響を与えることが示唆される例として、ムチン上の Tn 抗原 (GalNAc α -Ser/Thr) および T 抗原 (Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr) があげられる。腫瘍抗原として知られる MUC1 ムチンに対しては、癌患者において MUC1 特異的な T 細胞応答や抗体応答が検出される例が知られている。こうした免疫応答は、MUC1 上の糖鎖が正常細胞に比べ Tn 抗原や T 抗原を含む短い糖鎖に変化したために、免疫系によって認識されるようになったためであると考えられている。

マクロファージガラクトース型 C 型レクチン(MGL/CD301)は、免疫系に発現する C 型レクチンの中で唯一 Gal/GalNAc に特異性を有するレクチンである。ヒトでは単一の遺伝子によってコードされるが、マウスでは非常に相同性の高い MGL1/CD301a および MGL2/CD301b をコードする 2 つの遺伝子が存在する。細胞内にチロシンエンドサイトー

シスモチーフを持ち、抗原の取り込みに関与することが予想される。研究開始当初、MGLは結合組織内マクロファージ (MΦ) に発現すると考えられていたが、MGL2に特異的な抗体が存在しなかったため、MGL1とMGL2を区別した発現細胞の詳細は不明であった。

以上の背景より、私は、Gal/GalNAcの修飾が、抗原に対する免疫応答にMGLを介して影響を及ぼすかを明らかにすることを本研究の目的とした。

第二章 抗MGL2モノクローナル抗体の作製

既に作製されていたモノクローナル抗体(mAb)は、MGL1に特異的な抗体(mAb LOM-8.7)あるいはMGL1およびMGL2に交差反応する抗体(mAb LOM-14)であり、MGL2に特異的な抗体は存在しなかった。そこで、MGL2の細胞外ドメインに特異的なmAb URA-1を作製した。mAb URA-1は、MGL2と糖鎖の結合に重要なアミノ酸を含む立体的な構造を認識すること、CHO細胞に強制発現させたMGL2に結合することなどを明らかにした。

第三章 MGL1またはMGL2を発現する細胞の同定

新規MGL2特異的mAb URA-1およびMGL1特異的mAb LOM-8.7を用いて、骨髄、脾臓、末梢リンパ節、肺から細胞を単離し、MGL1またはMGL2を発現する細胞を同定した。MGL1またはMGL2を発現する細胞は、樹状細胞(DC)の一部で、MGL1を単独で発現する細胞は観察されたが、MGL2はMGL1を発現する細胞の一部に限られて発現しており、MGL2を単独で発現する細胞は認められなかった。MGL1とMGL2をともに発現する細胞は比較的均一な集団(CD11c⁺CD4⁺CD8⁻CD11b⁺MHCII⁺F4/80^{low})であり、CD8⁻コンベンショナルDC(cDC)と考えられたのに対して、MGL1を単独で発現する細胞にはCD8⁻cDCの他にCD11c^{low}CD11b⁻B220⁺MHCII^{low}である形質細胞様DCが含まれていた。GM-CSFを用いて骨髄細胞から誘導したDC(BM-DC)では、CD11c⁺MHC II^{int}の未成熟BM-DCにMGL1、MGL2がともに発現するが、CD11c⁺MHC II^{hi}CD40⁺CD86⁺の成熟BM-DCにはどちらもほとんど発現していなかった。一方、骨髄細胞からM-CSFを含む培養液によって誘導したMΦでは、MGL1が高レベルで発現するのに対して、MGL2の発現はほとんど認められなかった。腹腔内にチオグリコレート培地を投与することで得られる炎症性MΦでは、MGL1、MGL2ともに発現が認められたが、MGL2の発現レベルは低かった。以上より、MGL1またはMGL2が、MΦだけでなく、免疫応答の制御に特に重要な抗原提示細胞であるDCに発現することを初めて明らかにし、MGL2の発現は、MGL1に比べ比較的DCに限られていることが明らかとなった。

第四章 樹状細胞による糖鎖修飾抗原の取り込みと提示におけるMGLの役割

ムチンに付加したO-結合型糖鎖のモデルとして、 α -GalNAcの結合したポリアクリルアミドポリマー(GalNAc-PAA)を用いてBM-DCによる結合と取り込みを検討した。ビオチン化GalNAc-PAAは、未成熟BM-DCにカルシウム依存的に結合し、この結合はGalNAcにより阻害された。さらに、FITC標識GalNAc-PAA(FITC-GalNAc-PAA)は、BM-DCと37°Cでインキュベートすることで細胞内に取り込まれた。コンフォーカル顕微鏡によりFITC-GalNAc-PAAが細胞内でMGL1/2、LAMP-1、MHC class IIと共局在していたことから、GalNAc修飾された抗原はMGL1またはMGL2を介してエンドサイトーシスにより取り込

まれ、細胞内の MHC class II コンパートメントに運ばれることが示唆された。そこで、GalNAc を付加した抗原が MHC 分子に提示されるかを明らかにするため、ビオチン—ストレプトアビジン (SAv) 複合体を利用した抗原提示アッセイ法を確立した (図 1)。ビオチン化 GalNAc-PAA と結合させた SAv (GalNAc-SAv) を取り込んだ BM-DC は、コントロールの GlcNAc-SAv や SAv のみに比べ、効率的に SAv 感作 T 細胞の増殖応答を誘導した (図 2)。次に SAv 感作 T 細胞を CD4⁺T 細胞または CD8⁺T 細胞に分離して実験を行ったところ、GalNAc-SAv を取り込んだ BM-DC は、CD4⁺T 細胞のみに効率的な増殖応答を誘導した。以上より、GalNAc 修飾された抗原を取り込んだ BM-DC は、抗原を MHC class II に提示し、抗原特異的 CD4⁺T 細胞を活性化することが示された。

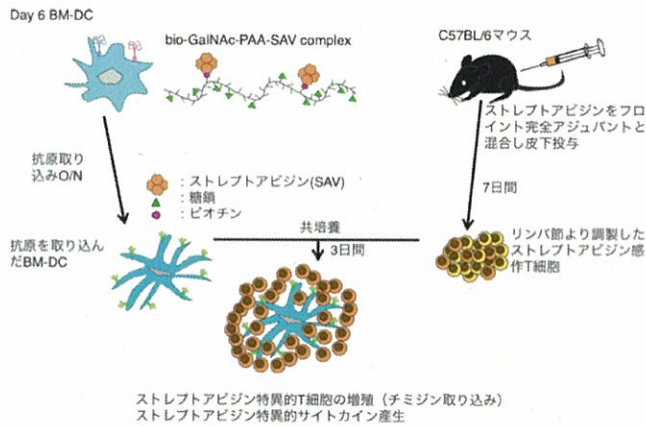


図1: ビオチン—ストレプトアビジン複合体を利用した抗原提示アッセイ法の概略

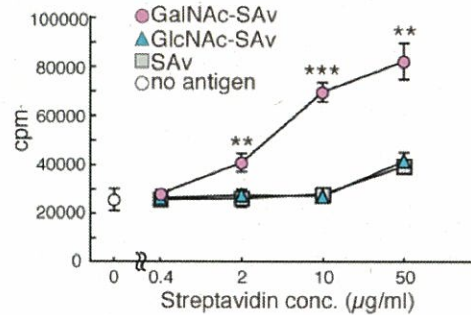


図2: GalNAc-SAvによる効率的なT細胞増殖応答の誘導
p < 0.01, *p < 0.001

続いて、*Mgl1* ノックアウトマウス (*Mgl1*^{-/-}) または *Mgl2* ノックアウトマウス (*Mgl2*^{-/-}) と各々の野生型マウスから BM-DC を誘導し、FITC-GalNAc-PAA の結合と取り込みを解析した。*Mgl1*^{-/-} の BM-DC では、野生型に比較して結合および取り込みが約 50% に減少したのに対して、*Mgl2*^{-/-} の BM-DC では、FITC-GalNAc-PAA の結合および取り込みが FITC-GlcNAc-PAA レベルまで減少していた。この際、*Mgl1*^{-/-} の BM-DC における MGL2 の発現レベルは野生型の約 50% に低下し、*Mgl2*^{-/-} の BM-DC における MGL1 の発現レベルは野生型に比べ著しく低下していた。以上より、FITC-GalNAc-PAA の結合および取り込みには MGL2 が必須であることが示された。

さらに、GalNAc-SAv を取り込ませた *Mgl1*^{-/-} の BM-DC を用いた場合には効率的な T 細胞応答が認められたのに対して、*Mgl2*^{-/-} の BM-DC ではこの効果が認められなかった (図 3)。以上から、BM-DC による GalNAc 付加された抗原の取り込みと効率的な CD4⁺T 細胞応答には、MGL2 を介した抗原の結合と取り込みが必要であることが示された。

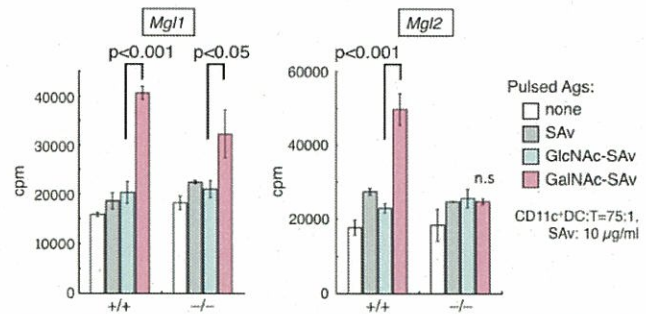


図3: GalNAc-SAvによる効率的なT細胞増殖応答は、*Mgl1*^{+/+}マウスでも野生型と同様に認められるのに対して、*Mgl2*^{-/-}マウスでは認められなかった。

最後に、mAb URA-1 を LPS とともにマウス皮下に投与し、1 週間後の血清中の抗ラット IgG2a 抗体応答を調べた。BALB/c マウスでは mAb URA-1 投与群はコントロール抗体投与群に比べ効率的な抗ラット IgG2a 抗体応答を生じたが、*Mgl2*^{-/-} マウスでは mAb URA-1 投

与群とコントロール抗体投与群で有意な差が認められなかった。BALB/c 個体で認められた抗ラット IgG2a 抗体には IgG クラスの抗体が検出されたことから、生体内においても MGL2 を介して取り込まれた抗原は CD4⁺T 細胞応答を介して液性免疫応答に寄与することが示唆された。

第五章 結論

本研究により、新たに MGL2 特異的モノクローナル抗体を作製し、初めて MGL1 と MGL2 を区別してマウス生体内で発現する細胞を同定することが可能となった。MGL2 の発現は、MGL1 に比べ、DC に比較的限られた発現パターンを示し、DC に密接な機能への関与が示唆された。さらに、GalNAc を付加した抗原は DC に発現する MGL2 を介して効率的に取り込まれ、MHC class II に提示され、CD4⁺T 細胞を活性化すると考えられた。これは、GalNAc の付加が DC に発現するレクチンを介して効率的な抗原提示を誘導することを示した初めての報告である。さらに、MGL2 は、マウス生体内においても CD4⁺T 細胞応答を介して液性免疫応答に寄与する可能性が示された。MGL2 は、糖鎖認識特異性および発現細胞の種類から、ヒト MGL のマウスにおける機能的カウンターパートである可能性が高いことから、MGL への抗原ターゲティングは、新たなワクチン開発に貢献できる可能性が高い。