

審査の結果の要旨

氏名 傳田 香里

「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」と題する本論文は、樹状細胞(DC)表面に存在する膜結合型レクチンである MGL2 が、糖を含む分子に対する免疫応答においてどのような役割を持つかを解明するに至った経緯が述べられている。このグループのレクチン(MGL)は脊椎動物の免疫細胞に発現するカルシウム依存型レクチンの中では唯一、単糖としてガラクトース及び N-アセチルガラクトサミンに結合性を有するものである。全体は五章から成り、第一章に序論、第五章に結論が述べられている。

序論では、タンパク質に付加した糖鎖の免疫応答への影響について、これまでに得られている知見とそれに基づく予想されるシナリオが詳細に述べられ、特に 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)に対する免疫応答について紹介されている。すなわち、腫瘍抗原として知られるムチン1 (MUC1)に対して、癌患者において T 細胞応答や抗体応答が検出される例が知られ、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と考えられていることなどが背景として述べられている。また、MGL については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 および MGL2 をコードする2つの遺伝子が存在すること、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などの、これまでに知られていたことが的確に述べられている。これらに基づき、今回行われた研究の独創性、重要性が明らかにされている。

「抗 MGL2 モノクローナル抗体の作製」と題する第二章では、マウス MGL2 の細胞外ドメインに特異的で、MGL1 には交叉しないモノクローナル抗体(mAb) URA-1 を作製した経緯が述べられている。mAb URA-1 は、MGL2 と糖鎖の結合に重要なアミノ酸を含むコンフォメショナルエピトープを認識すること、CHO 細胞に強制発現させた MGL2 に結合することなどが明らかにされ、有用なモノクローナル抗体が作製されたことを示している。

「MGL1 または MGL2 を発現する細胞の同定」と題する第三章では、新規 MGL2 特異的 mAb URA-1 及び MGL1 特異的 mAb LOM-8.7 を用いて、骨髄、脾臓、末梢リンパ節、肺から単離した細胞を対象に、MGL1 または MGL2 を発現する細胞をフローサイトメトリー解析にて同定した結果が述べられて

いる。MGL1 または MGL2 を発現する細胞は、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 ($CD11c^+CD4^{\pm}CD8^{\pm}CD11b^+MHCII^+F4/80^{low}$) であり、 $CD8^{\pm}$ 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 $CD8^{\pm}$ cDC の他に $CD11c^{low}CD11b^+B220^+MHCII^{low}$ である形質細胞様 DC が含まれることが初めて明らかになった。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いこと、骨髄細胞から誘導した 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いことも示された。このように、論文提出者は、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 の発現が DC に限られていることを証明し、抗原プロセッシング細胞の多様な亜集団の定義と分別法の確立に著しく貢献した。

「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」と題する第四章では、O-結合型糖鎖が多数付加したムチンのモデルとして、 α -GalNAc 残基の結合したポリアクリルアミドポリマー (GalNAc-PAA) を用いて MGL2 を介する BM-DC による結合、取り込み、及びこれに対する T 細胞応答の効率を測定するシステムを確立し、GalNAc-PAA が樹状細胞に結合した結果として起こる T 細胞応答について解析した結果が述べられている。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、 $37^{\circ}C$ で BM-DC とインキュベートすることで細胞内に取り込まれた。取り込まれた FITC-GalNAc-PAA が細胞内で MGL1/2、LAMP-1、MHC class II と共局在していることはコンフォーカル顕微鏡によって明確に示された。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-streptavidin (SAv) 複合体を利用した抗原提示アッセイ法を確立した。この方法を用いて、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することが明らかになった。 $CD4^+T$ 細胞に効率的な増殖応答を誘導するが、 $CD8^+T$ 細胞では見られなかったため、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。

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結果、*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コントロールである FITC-GlcNAc-PAA で観察されるレベルまで減少していた。これらの結果から、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。以上の

ように、論文提出者は 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 細胞応答は、MGL2 を介して行われていることを、実験的に明確にした。MGL2 に結合する mAb である URA-1 を (ラット IgG2a) をマウス皮下に投与し、血清中の抗体応答を調べた結果、BALB/c マウスではコントロール抗体投与群に比べ効率的な抗ラット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。これらの結果から、DC に発現するガラクトース型レクチンである MGL2 が免疫応答を制御することが確証された。

第五章で述べられている結論の中で、特に重要なのは、MGL2 が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である。論文提出者が主張するように、MGL に抗原ターゲティングをすることにより、新たなワクチン開発に貢献できる可能性が高い。

以上のように本論文は糖鎖認識分子である MGL2 が非常に限られた細胞、すなわち MGL1 を発現する細胞の中で cDC に限局して発現し、ムチン様分子の糖鎖を認識して取り込み、この細胞による抗原提示が効率的に行われる結果をもたらすことを明らかにした。その研究内容は、免疫学及び糖鎖生物学の発展に資するところが大きく、これを行った傳田香里は博士(薬学)の学位を得るにふさわしいと判断した。