

191. シアル酸の修飾による好酸球性炎症制御機構の解明

鈴川 真穂

Key words：シアル酸，好酸球，アレルギー，Siglec

帝京大学 医学部 内科学講座
呼吸器・アレルギー学

緒 言

シアル酸は、細胞表面糖鎖の非還元末端に存在し、炭素9個からなるマイナス電荷の酸性糖である。シアル酸は、細胞の最も外側に位置しているため、細胞による認識や細胞の結合を含む細胞間相互作用に様々な形で関与することが知られている。また、シアル酸は非常に多彩な修飾を受け、それ故に細胞間、分子間の多様な相互作用が精密に制御されていると考えられている。

シアル酸結合タンパクの一種である Siglec は、主に免疫担当細胞に発現しているため、免疫機能の調節に関与する糖鎖認識タンパク（レクチン）として脚光を浴びつつある¹⁾。Siglec の中でも、ヒト Siglec-8 とマウス Siglec-F はホモログであり、共に好酸球特異的に発現し、主に好酸球のアポトーシスを誘導することで好酸球性炎症の収束に関与することが示唆されている。そのため好酸球性アレルギー疾患の次なる治療法として、Siglec-8 および Siglec-F を標的とした好酸球の機能制御が期待されている²⁾。

これまで Siglec-F のリガンドシアル酸の発現と分布、生合成に関する報告は極めて限られていた。しかしながら、Siglec のリガンドシアル酸の多様性により、Siglec のリガンド認識において高い特異性が保たれる性質を考えると、リガンドシアル酸の特性を明らかにすることは有意義なことであると考えられた。そこで、本研究では、Siglec-F のリガンドシアル酸分布を解析し、その合成酵素欠損マウスを用いて、マウスの気道炎症に及ぼす影響を解析した。さらに、リガンドシアル酸の修飾酵素を SiRNA によりノックダウンすることによる、Siglec-F 結合能の変化を解析した。

方法および結果

1. Siglec-F リガンドの分布³⁾

まず、細胞上に発現している Siglec-F リガンドを Siglec-F-human Fc fusion protein で標識し、引き続き2次抗体の phycoerythrin (PE) conjugated 抗ヒト IgG 抗体を用いて染色し、フローサイトメーターを用いて Siglec-F リガンドの発現レベルを解析する手法を確立した。

はじめに、Wild-type マウス由来の細胞における、Siglec-F リガンドの分布を解析した。マウス肺からコラーゲナーゼを用いて単離した細胞と、血液細胞の解析を行ったところ、肺、末梢血の好酸球において、最も高い Siglec-F リガンド発現を認めた（図1）。肺マクロファージにも同様に高レベルの Siglec-F リガンド発現を認め、肺マスト細胞にも発現を認めた（図1）。

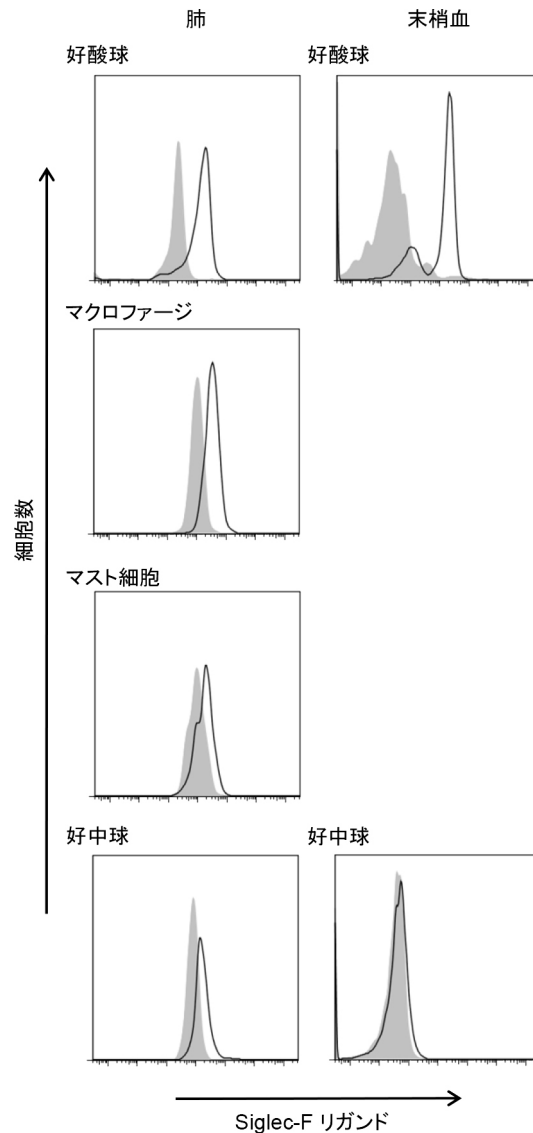


図 1. Siglec-F リガンド発現.

Wild-type マウスの肺（左）および末梢血（右）由来の細胞による Siglec-F リガンド発現を，フローサイトメーターで解析した．コントロール抗体で標識した細胞を灰色のヒストグラムで示す．

2. Siglec-F リガンドの発現に影響する因子の解析³⁾

既に免疫染色を用いた手法により，気道上皮細胞に Siglec-F リガンドの発現が報告されている⁴⁾．そこで，Siglec-F リガンドを恒常的に高発現しているマウス気道上皮細胞株，MLE-12 を用いた解析を行った．シアリダーゼを添加すると，MLE-12 に発現している Siglec-F リガンドは完全に消失するが，その後経時的に発現が自然回復し，約 24 時間経過すると元通りの発現レベルに戻ることを確認した（図 2 A）．そこで，シアリダーゼを添加して Siglec-F リガンドの発現をなくし，その後様々な刺激を加えて，Siglec-F リガンド発現の回復に対する影響を，フローサイトメーターを用いて解析した．結果，IL-4，IL-13，GM-CSF は Siglec-F リガンドの発現回復を促進したが，IL-17，IL-10 は影響しなかった（図 2 B）．

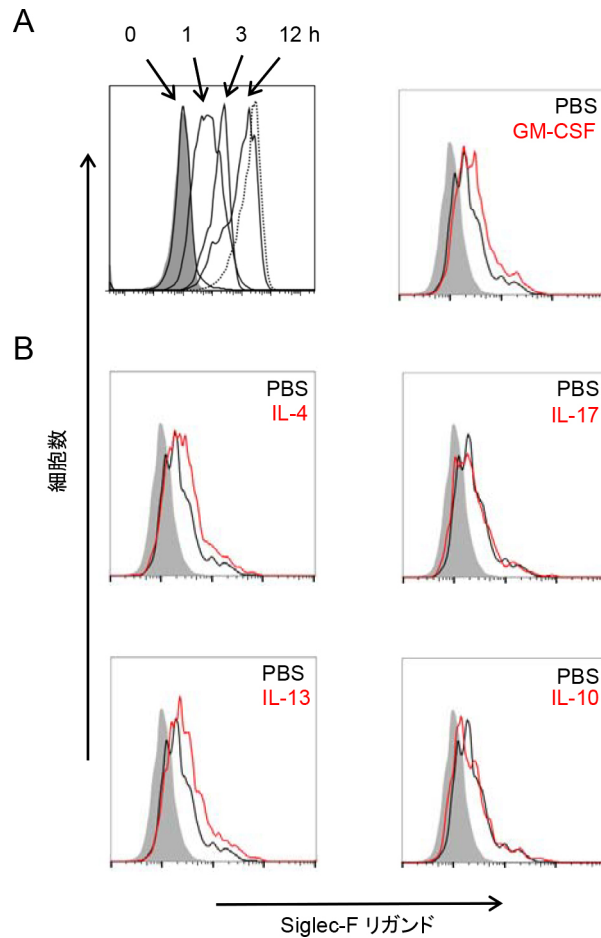


図2. Siglec-F リガンド発現を増強するサイトカイン.

A) MLE-12 をシアリダーゼで処理し、処理前、0、1、3、12 時間後の Siglec-F リガンド発現をフローサイトメーターで解析した。コントロール抗体で標識した細胞を灰色の、シアリダーゼ処理前の細胞を破線のヒストグラムで示す。B) MLE-12 をシアリダーゼ処理し、各サイトカイン (10 ng/ml) を含むメディウムに交換し 6 時間培養した後の Siglec-F リガンド発現をフローサイトメーターで解析した。コントロール抗体で標識した細胞を灰色の、サイトカイン刺激をした細胞を赤色のヒストグラムで示す。

3. Siglec-F リガンド合成酵素の同定³⁾

Siglec-8 リガンドとして報告されている 6'-sulfo-SLex の合成に関わる酵素を候補とし⁵⁾、Siglec-F リガンドの合成酵素を同定するための解析を行った。シアリルトランスフェラーゼ ST3gal III、およびフコシルトランスフェラーゼ Fuc-TIV、Fuc-TVII の欠損マウスを入手し、それぞれの遺伝子改変マウスにおける気道上皮細胞の Siglec-F リガンド発現を解析した。Fuc-TIV/VII 欠損マウスにおいて Siglec-F リガンドの発現は低下しており、ST3gal III^{+/-}マウスにおいては、ほとんど Siglec-F リガンドの発現が認められなかった (図3)。

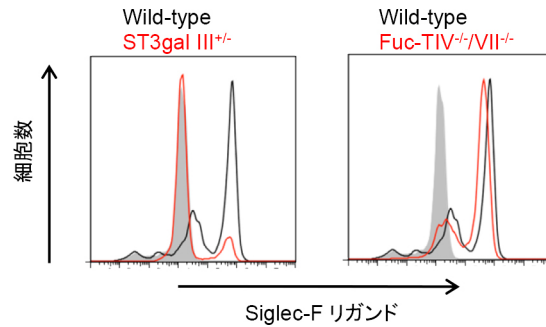


図3. 気道上皮細胞による Siglec-F リガンド発現.

マウス気管支から分離培養した気道上皮細胞による Siglec-F リガンドの発現を，フローサイトメーターで解析した．コントロール抗体で標識した細胞を灰色のヒストグラムで示す．黒線は Wild-type マウス，赤線は ST3gal III^{+/-}マウス（左），Fuc-TIV^{-/-}/VII^{-/-}マウス（右）の気道上皮細胞の Siglec-F リガンド発現を示す．

4. ST3gal III^{+/-}マウスによる好酸球性気道炎症モデルマウスの作製³⁾

前述の結果より，Siglec-F リガンドの合成には，ST3gal III が主に関与することが示唆されたため，ST3gal III^{+/-}マウスを用いて好酸球性気道炎症モデルマウスを作製し，肺の H&E 染色で気道炎症を観察し，気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の細胞数を計測し，ギムザ染色で細胞分画を計測した．結果 ST3gal III^{+/-}マウスにおいて，気道炎症が増悪し，気道周囲の好酸球浸潤，気管支肺胞洗浄液中の総細胞数，好酸球数，マクロファージ数が増加した（図4 A, B）．

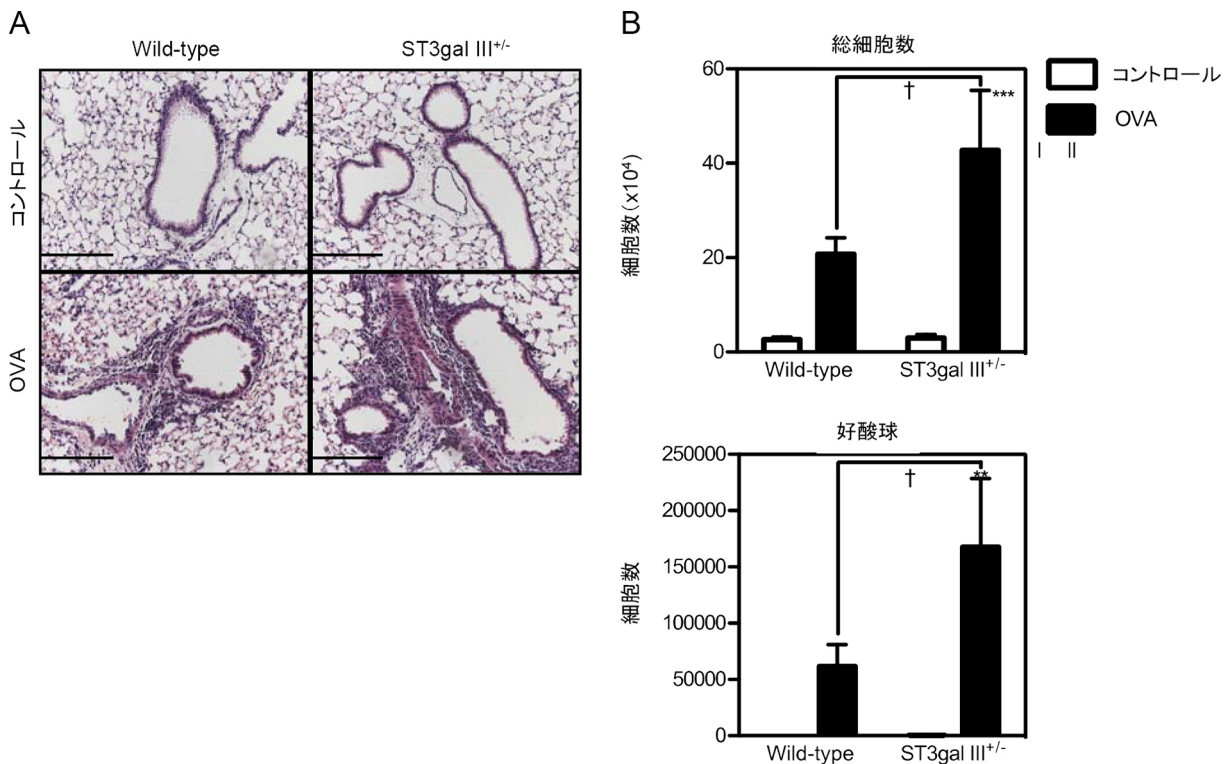


図4. ST3gal III^{+/-}マウスによる好酸球性気道炎症.

A) Wild-type マウス（左），ST3gal III^{+/-}マウス（右）に OVA 感作・チャレンジを行った肺切片の H&E 染色を示す．上段はコントロールマウス．スケール線は 100 μ m を示す．B) OVA 感作・チャレンジを行った Wild-type マウスおよび ST3gal III^{+/-}マウスの BAL 中の総細胞数，好酸球数を示す．N = 4~8．† p < 0.05，** p < 0.01，*** p < 0.001 対コントロールマウス（ANOVA および unpaired student's test）．

5. Siglec-F リガンドの修飾による Siglec-F との結合能の変化

Siglec-8 リガンドとして報告されている 6'-sulfo-SLex と類似した構造を持つ 6-sulfo-SLex の合成に関わる酵素として、スルフォトランスフェラーゼ (CHST) (硫酸塩をガラクトースに付加する) が重要な働きを示すことが報告されている⁹⁾。そこで、マウス気道上皮細胞株, MLE-12 に CHST1 および CHST3 の SiRNA をトランスフェクトして、Siglec-F リガンドの発現をフローサイトメトリーで解析した (図 5)。結果, CHST1, 3 共に、Siglec-F による Siglec-F リガンド認識が抑制され、これらスルフォトランスフェラーゼの修飾によって、リガンドの結合能が保持されることが示唆された。

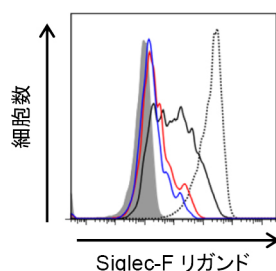


図 5. Sulfotransferase を標的とした SiRNA 導入による MLE-12 の Siglec-F リガンド発現。

MLE-12 にコントロール RNA (黒線), CHST1 SiRNA (赤線), CHST3 SiRNA (青線) を導入後, シアリダーゼで処理し, 6 時間後の Siglec-F リガンド発現をフローサイトメーターで解析した。コントロール抗体で標識した細胞を灰色の, シアリダーゼ処理前の細胞を破線のヒストグラムで示す。

考 察

本研究から得られたデータにより, Siglec-F リガンドの発現は, Siglec-F を発現するマウス好酸球, マクロファージ, そして呼吸器構成細胞である気道上皮細胞に高レベルで発現していることが明らかになった。そして, そのリガンド合成には, シアリルトランスフェラーゼの中でも ST3gal III が必要であると同時にスルフォトランスフェラーゼによる修飾が重要な役割を演じ, 気道上皮細胞上の Siglec-F リガンドを, 好酸球上の Siglec-F が認識することにより, 好酸球のアポトーシスが誘導され, 好酸球数が減少することが示唆された。Siglec-8, Siglec-F を介した好酸球生存の制御により, 生体内において好酸球性炎症の消退または遷延化が調節されている可能性が考えられ, 気管支喘息を始め, 好酸球が関与する疾患において, Siglec-8, Siglec-F が治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は, 国立病院機構東京病院の大田 健院長, University of California, San Diego の David Broide 教授, 帝京大学医学部内科学講座の山口正雄教授である。最後に, 本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Schnaar, R. L. : Glycans and glycan-binding proteins in immune regulation: A concise introduction to glycobiology for the allergist. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **135** : 609-615, 2015.
- 2) Kiwamoto, T., Kawasaki, N., Paulson, J. C, & Bochner, B. S. : Siglec-8 as a drugable target to treat eosinophil and mast cell-associated conditions. *Pharmacol Ther.*, **135** : 327-336, 2012.
- 3) Suzukawa, M., Miller, M., Rosenthal, P., Cho, J. Y., Doherty, T. A., Varki, A. & Broide, D. : Sialyltransferase ST3Gal-III regulates Siglec-F ligand formation and eosinophilic lung inflammation in mice. *J. Immunol.*, **190** : 5939-5948, 2013.
- 4) Cho, J. Y., Song, D. J., Pham, A., Rosenthal, P., Miller, M., Dayan, S., Doherty, T. A., Varki, A. & Broide, D. H. : Chronic OVA allergen challenged Siglec-F deficient mice have increased mucus, remodeling, and epithelial Siglec-F ligands which are up-regulated by IL-4 and IL-13. *Respir. Res.*, **11** : 154, 2010.
- 5) Bochner, B. S., Alvarez, R. A., Mehta, P., Bovin, N. V., Blixt, O., White, J. R. & Schnaar, R. L. : Glycan array screening reveals a candidate ligand for Siglec-8. *J. Biol. Chem.*, **280** : 4307-4312, 2005.

- 6) Hemmerich, S. & Rosen, S. D. : Carbohydrate sulfotransferases in lymphocyte homing. *Glycobiol.*, **10** : 849-856, 2000.