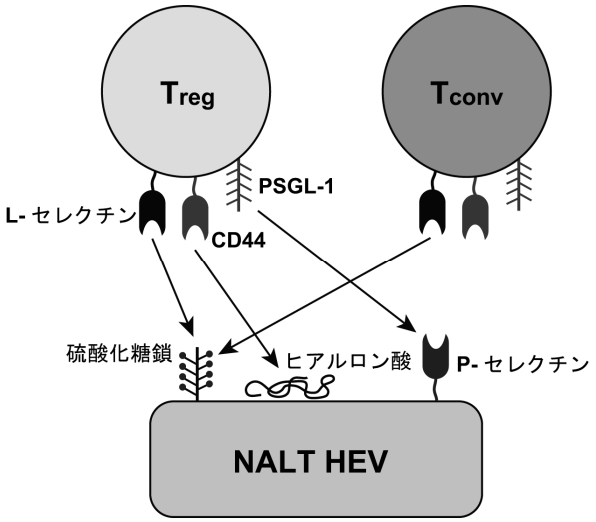
31　糖鎖を標的とした制御性T細胞動態の制御	川島　博人

【目的】本研究では、独自開発した新規抗糖鎖抗体を用いて、制御性 T 細胞の糖鎖発現および体内動態機構を解明するとともに、その体内動態の人為的制御に基づくアレルギー性疾患の治療効果を検証することを目的とする。

【方法】各種の抗糖鎖抗体（*J. Biol. Chem.,* 2010, 2015）を用いて、制御性 T 細胞における糖鎖発現をフローサイトメトリーで解析するとともに、経鼻的に侵入する抗原の蓄積するマウス鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）の高内皮細静脈（HEV）における糖鎖発現を免疫蛍光染色により解析した。さらに、HEV に反応性の見られた抗糖鎖抗体の制御性 T 細胞の NALT へのホーミングに及ぼす影響を解析するとともに、同抗体を前投与し、卵白アルブミン（OVA）の経鼻投与により誘導するアレルギー性免疫応答の抑制効果を検討した。

【結果】制御性T細胞にシアリルルイスX糖鎖抗原が発現し、マウスNALTのHEVにおいては、抗硫酸化糖鎖抗体S2により認識される硫酸化糖鎖抗原が発現することが分かった。興味深いことに、S2抗体は鼻咽頭関連リンパ組織への通常型リンパ球のホーミングを有意に抑制したが、制御性T細胞のホーミングには影響せず、制御性T細胞のNALTへの蓄積を誘導した。さらに様々な阻害抗体を用いた検討の結果、制御性T細胞（T_{reg}）および通常型T細胞（T_{conv}）とNALTのHEVとの相互作用には各々異なる糖鎖と糖鎖結合分子の相互作用が関与することが分かった（下図）。そこでS2抗体の投与により通常型T細胞のホーミングに主要な役割を果たすL-セレクチンと硫酸化糖鎖の相互作用を選択的にブロックしたところ、OVA特異的IgE抗体産生およびアレルギー症状が有意に軽減することが分かった。以上の結果から、抗硫酸化糖鎖抗体S2は、制御性T細胞のNALTへの蓄積を誘導し、アレルギー症状を軽減することが示された。

制御性 T 細胞（T_{reg}）と通常型 T 細胞（T_{conv}）と NALT HEV との相互作用



31. 糖鎖を標的とした制御性 T 細胞動態の制御

川島　博人

*千葉大学 大学院薬学研究院 微生物薬品化学研究室

Key words：制御性 T 細胞，リンパ球ホーミング，糖鎖，シアリルルイス X，アレルギー性疾患

緒　言

アレルギー性の免疫応答は、二次リンパ組織における抗原感作過程と抗原の再侵入による惹起過程に分けられる。抗原感作過程においては、血流中を循環するリンパ球が、高内皮細静脈（high endothelial venule ; HEV）とよばれる丈の高い特殊な血管と特異的に接着し、リンパ節実質に浸潤する。このリンパ球と HEV との特異的な接着を抑制することができれば、生体のアレルギー応答を制御できると考えられる。リンパ球が HEV を介してリンパ節実質へと浸潤する際には、多段階の分子間相互作用が関与する。その最も初期の段階は、血流による強いずり応力のもとで作用することのできる糖鎖と糖鎖結合分子の相互作用により媒介される。実際にこれまでに我々は、糖鎖に硫酸基を転移する硫酸基転移酵素の遺伝子欠損マウスを作製し、HEV に特異的に発現する 6-スルホシアリルルイス X（図 1）と呼ばれる特殊な硫酸化糖鎖がリンパ球の二次リンパ組織へのホーミングおよび接触性皮膚炎の発症に必須の役割を果たすことを証明してきた［1］。

制御性 T 細胞は免疫制御の鍵となる細胞であり、その体内動態を人為的に制御することができれば、アレルギー疾患の有効な治療法の確立につながることが期待される。しかし、これまでに制御性 T 細胞の体内動態を規定する分子機構に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、独自に開発した各種の抗糖鎖モノクローナル抗体［2, 3］を用いて、制御性 T 細胞の糖鎖および糖鎖結合分子の発現と体内動態制御機構を解明するとともに、それらの抗体を用いてマウスアレルギー疾患の治療効果の検証を行った。その結果、6-スルホシアリルルイス X の部分構造をエピトープとする抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2（図 1）が、制御性 T 細胞の鼻咽頭関連リンパ組織への選択的な蓄積を誘導し、アレルギー症状を軽減することを見出した。



図 1. 6-スルホシアリルルイス X の構造

6-スルホシアリルルイス X の糖鎖構造を示す。R は *N*-型糖鎖および *O*-型糖鎖のコア構造を示し、破線で囲んだ部分は S2 抗体が認識する糖鎖構造を示す。

方　法

1. マウス制御性 T 細胞および二次リンパ組織 HEV における糖鎖発現の解析

マウス二次リンパ組織よりリンパ球を調製し、T 細胞マーカーCD3、ヘルパーT 細胞マーカーCD4、制御性 T 細胞に高発現する IL-2 レセプターα鎖 CD25、および制御性 T 細胞特異的転写因子 FoxP3 に対する抗体と各種の抗糖鎖モノクローナル抗体［2, 3］に対する反応性をフローサイトメトリーにより解析した。また、マウス末梢リンパ節（PLN）および経鼻的に侵入する抗原の蓄積するマウス鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）の HEV における糖鎖発現を免疫蛍光染色により解析した。

*現在の所属：千葉大学 大学院薬学研究院 免疫微生物学研究室

2. 制御性 T 細胞および通常型 T 細胞の NALT へのホーミングに関与する糖鎖および糖鎖結合分子の解析

抗糖鎖モノクローナル抗体を尾静注したのちに蛍光標識リンパ球を尾静注し、一定時間後に NALT にホーミングした蛍光標識リンパ球をフローサイトメトリーで検出することにより、NALT へのリンパ球ホーミングにおける糖鎖の機能を解析した。また、抗糖鎖モノクローナル抗体を尾静注し、2 日後の通常型 T 細胞と制御性 T 細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。さらに、各種の糖鎖結合分子に対する阻害抗体を用いた検討により、通常型 T 細胞および制御性 T 細胞の NALT へのホーミングに関与する糖鎖結合分子の解析を行った。

3. 制御性 T 細胞の体内動態の人為的制御に基づくマウスアレルギー疾患の発症抑制

抗糖鎖モノクローナル抗体を前投与したマウスおよび無処理マウスを、卵白アルブミン（OVA）の経鼻投与により感作した。再度 OVA を経鼻投与した後に、静粛な実験室内で一定時間内におけるくしゃみおよび鼻かき行動の回数を計測するとともに、血清中の OVA 特異的 IgE 量を ELISA により測定した。

結　果

1. マウス制御性 T 細胞および二次リンパ組織 HEV における糖鎖発現の解析

独自開発した抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた解析により、制御性 T 細胞にシアリルルイス X 糖鎖抗原が発現することが分かった。一方、マウス PLN および NALT の HEV においては、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 による強い染色が認められた（図 2）。これらの染色は硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1/-2 ダブルノックアウトマウス［1］で完全に消失したことから、糖鎖の硫酸化に特異的な染色であることが確認された。

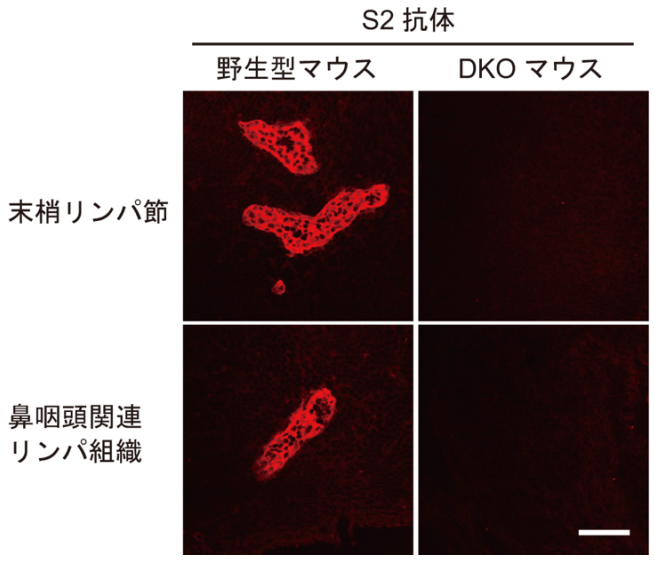


図 2. S2 抗体によるマウスリンパ組織の蛍光免疫染色

マウス末梢リンパ節（PLN）および鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）の凍結切片を用いて、ビオチン標識 S2 抗体および Alexa Fluor 594 標識ストレプトアビジンによる蛍光免疫染色を行った。DKO マウス：硫酸基転移酵素 GlcNAc6ST-1/-2 ダブルノックアウトマウス。スケールバー：50 μm。

2. 制御性 T 細胞および通常型 T 細胞の NALT へのホーミングに関与する糖鎖および糖鎖結合分子の解析

S2 抗体は NALT への通常型リンパ球のホーミングを有意に抑制したが、制御性 T 細胞のホーミングには影響せず、制御性 T 細胞の NALT への蓄積を誘導した。さらに様々な糖鎖結合分子に対する阻害抗体を用いた検討の結果、制御性 T 細胞（T_{reg}）および通常型 T 細胞（T_{conv}）と NALT の HEV との相互作用には各々異なる糖鎖と糖鎖結合分子の相互作用が関与することが分かった（図 3）。

3. 制御性 T 細胞の体内動態の人為的制御に基づくマウスアレルギー疾患の発症抑制

次に OVA を経鼻投与し、マウス花粉症モデルを用いた検討を行ったところ、S2 抗体の投与により、OVA 特異的 IgE 抗体産生が有意に抑制されるとともに、くしゃみおよび鼻かき行動の回数が有意に低下し、花粉症様症状が軽減することが分かった。この時、S2 抗体の投与により、通常型 T 細胞に対する制御性 T 細胞の割合が有意に上昇した。以上の結果から、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、通常型 T 細胞のホーミングを選択的に抑制するとともに制御性 T 細胞の NALT への蓄積を誘導し、マウスの花粉症様症状を軽減することが示された。

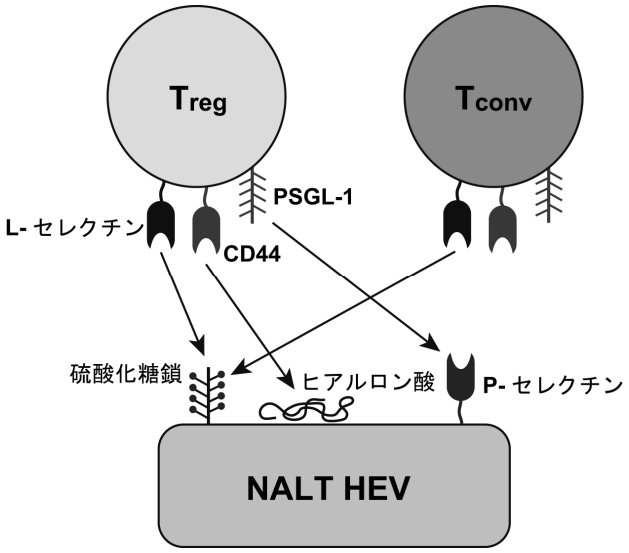


図 3. 制御性 T 細胞（T_{reg}）と通常型 T 細胞（T_{conv}）と NALT HEV との相互作用
制御性 T 細胞（T_{reg}）と通常型 T 細胞（T_{conv}）は、異なる糖鎖-糖鎖認識分子の相互作用を介して NALT の HEV と相互作用する。

考　察

独自に樹立した抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、通常型 T 細胞の NALT へのホーミングを選択的に抑制するとともに制御性 T 細胞の蓄積を誘導し、マウスアレルギー疾患を有意に抑制した。S2 抗体投与後に認められた制御性 T 細胞のホーミングの少なくとも一部は、制御性 T 細胞に発現の認められたシアリルルイス X 糖鎖抗原によるものである可能性が考えられる。実際我々は、PSGL-1 と呼ばれる特定のコアタンパク質に付加したシアリルルイス X 糖鎖抗原と結合して細胞接着を媒介する P-セレクチンが、鼻咽頭関連リンパ組織の高内皮細静脈に発現することを確認している[4]。以上の結果より、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、制御性 T 細胞の体内動態の人為的制御とアレルギー性疾患治療に有用である可能性が示唆された。

本研究により、制御性 T 細胞の体内動態を制御することにより、アレルギー疾患の発症を効果的に抑制できる可能性が示された。本研究で用いた抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、臨床応用への可能性を持つ有用な抗体であると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute の福田穣博士、静岡県立大学大学院薬学研究院の今井康之博士、千葉大学大学院薬学研究院の平川城太朗博士に感謝する。

文 献

1) Kawashima H, Petryniak B, Hiraoka N, Mitoma J, Huckaby V, Nakayama J, Uchimura K, Kadomatsu K, Muramatsu T, Lowe JB, Fukuda M. *N*-Acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. Nat Immunol. 2005 Nov;6(11):1096-104. Epub 2005 Oct 9. PMID:16227985 DOI:10.1038/ni1259

2) Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, Kawashima H. Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated *N*- and *O*-glycans in lymphocyte homing. J Biol Chem. 2010 Dec 24;285(52):40864-78. Epub 2010 Oct 7. PMID:20929857 DOI: 10.1074/jbc.M110.167296.

3) Matsumura R, Hirakawa J, Sato K, Ikeda T, Nagai M, Fukuda M, Imai Y, Kawashima H. Novel antibodies reactive with sialyl Lewis X in both humans and mice define its critical role in leukocyte trafficking and contact hypersensitivity responses. J Biol Chem. 2015 Jun 12;290(24):15313-26. Epub 2015 May 5. DOI: 10.1074/jbc.M115.650051.PMID:25944902

4) Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. J Exp Med. 2011 May 9;208(5):1015-25. Epub 2011 Apr 25. PMID:21518796 DOI: 10.1084/jem.20101786.