

氏名	野中元裕
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第642号
学位授与の日付	平成20年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	生体防御レクチンによる糖鎖シグナルの制御に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 竹島 浩 教授 伊藤 信行 教授 中山 和久

論文内容の要旨

糖鎖は、翻訳タンパク質の大半を修飾しており、様々な生命現象、疾病等に関与していることが次々と明らかにされつつある。動物体内には特定の糖鎖に結合するレクチンと呼ばれる一群のタンパク質が存在する。マンナン結合タンパク質(MBP)やDC-SIGNは、自然免疫において第一線として働くカルシウム依存性C型レクチンである。本研究は、これらの生体防御レクチンが糖鎖シグナルをどのように解釈、制御し、多彩な生命現象へと導くかについて明らかにすることを目的として行った。第一章では細胞内MBPの局在と機能解明に関して、第二章ではDC-SIGNによる結腸がん細胞表面糖鎖の認識と腫瘍免疫の制御に関して、第三章ではMBP、DC-SIGNによるDNAの認識とクリアランスに関しての研究成果について記す。

第一章 細胞内MBPによる糖タンパク質の翻訳後修飾、輸送

ヒトMBPは一種類の遺伝子によりコードされ主に肝臓で合成されるが、翻訳後修飾の違いから、細胞外に分泌される血清型MBP(S-MBP)と肝臓細胞内に存在する細胞内MBP(I-MBP)に分かれる。これまで、I-MBPに関する知見はほとんど得られていないため、I-MBPの細胞内局在とその機能の解明を目的とした研究を行った。申請者は、I-MBPが細胞内において特徴的な顆粒状分布を示し、主に小胞体、なかでもexit site付近に集中し、一部がGolgiやCOP-II輸送小胞に局在していることを蛍光顕微鏡および電子顕微鏡観察により初めて明らかにした。次に、I-MBPは、リソソームの主要膜タンパク質であるLAMP-1の生合成中間体と糖鎖を介して相互作用することを示した。また、ツニカマイシン処理した細胞および糖結合能を持たない変異体MBP(C236S/C244S)を発現した細胞では特徴的な顆粒状分布が消失したことから、レクチンとリガンドの相互作用がI-MBPの特徴的な局在に必要であることが示された。

以上の結果は、MBPが、糖タンパク質の細胞内輸送に関与していることを強く示唆するものである。

第二章 樹状細胞に発現するDC-SIGNによる結腸がん細胞表面糖鎖の認識と腫瘍免疫の制御

がん細胞は増殖と共に形質転換を繰り返すことで細胞表面の糖鎖構造を多様に変化させる。その結果、正常細胞に無い、がん細胞に特徴的ながん関連糖鎖抗原を発現し、組織への浸潤や他の臓器への転移を促進している。そこで申請者は、樹上細胞に特異的に発現するDC-SIGNによるがん関連糖鎖抗原の認識および腫瘍免疫との関連に着目し、以下の研究を行った。まずヒト組換え型DC-SIGN-Fcが結腸がん細胞株SW1116、COLO205に糖鎖依存的、カルシウム依存的に結合することを明らかにした。またDC-SIGN-Fcが結合するSW1116細胞上のCEAやCEACAM1分子上にはがん関連血液型糖鎖抗原(Le^a/Le^b)が発現していた。さらに、ヒト血液由来の末梢血単核細胞から分化誘導した未成熟樹状細胞は、結腸がん細胞株SW1116と接着したが、その接着面にはDC-SIGNが強く発現していた。また、LPSによって樹状細胞に誘導され放出されるサイトカイン(IL-6, IL-10)の量は未成熟樹状細胞とSW1116細胞の結合によって促進されることが示された。さらに、抗原提示関連分子(CD83, CD86)の発現の程度を指標として調べたところ、LPSによって引き起こされる樹状細胞の成熟は、SW1116細胞との共培養上清を加えることにより抑制されることが明らかとなった。

以上の結果は、DC-SIGNを介した樹状細胞による結腸がん細胞の認識が、樹状細胞の機能や成熟に抑制的に働くことを示したものであり、がん細胞が免疫監視機構から逃避するメカニズムとしてDC-SIGNが機能することを示唆するものである。

第三章 MBP, DC-SIGNによるDNAの認識とクリアランス

自己免疫疾患には血液中に自己のDNAに対する抗体が認められることを特徴としているものが多い。それは遊離された血中DNAの除去がうまくいかないことによると考えられている。これまで自己免疫疾患の患者では血清MBP濃度が低いという報告が複数あることから、申請者はレクチンと血中DNAのクリアランスの関連に着目し、MBP, DC-SIGNのDNAに対する結合性およびその生理的意義に関する検討を行った。その結果、まず、ヒトMBPとヒト組換え型DC-SIGN-Fcが濃度依存的にプラスミドDNAに結合することを明らかにした。さらに、DNAとの結合は糖認識ドメインを介することが示されたが、この結合はdNTPにより阻害された。次に、単球系細胞U937のDC-SIGN安定発現株による、プラスミドDNAの細胞内への取り込みを調べたところ、コントロールのU937に比べて有意に高い値を示した。また、この取り込みはヒトMBPを加えると顕著に増加した。以上の結果は、MBP, DC-SIGNがDNAを認識し、そのクリアランスに関与することを示唆するものである。

以上本研究は、生体防御に関わるレクチンが、糖鎖との結合を介して、生命現象を巧妙に制御することを示したものであり、糖鎖機能の重要性に新しい知見を与えるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文は、生体防御レクチンによる糖鎖シグナルの制御に関する研究成果をまとめたものである。

第一章は、細胞内MBPによる糖タンパク質の翻訳後修飾、輸送に関する研究である。ヒトMBPは、一種類の遺伝子によりコードされ、主に肝臓において合成されているが、翻訳後修飾の違いから、細胞外に分泌される血清型MBP (S-MBP)は先天性免疫において重要であることが知られていたが、I-MBPの局在や機能についてはまったく不明であった。そこで、肝臓がん細胞株HLF細胞にヒトMBPを強制発現させた系を用いて、I-MBPの局在を詳細に明らかにした。さらに、I-MBPが合成中間体糖鎖をもつ内在性および外来の糖タンパク質をERからGolgiへと輸送する機能を持つ可能性を初めて示した。このI-MBPに関する発見は、内在性の糖タンパク質の品質管理機構に新たな知見を加えるのみならず、生体防御の観点からも、ウイルスの宿主細胞への感染や再構築の詳細な機構解明に繋がるものと考えられる。

第二章は、樹状細胞に発現するDC-SIGNによる結腸がん細胞表面糖鎖の認識と腫瘍免疫の制御に関する研究についてである。DC-SIGNは細菌やウイルスなど外来異物表面の糖鎖を認識し、樹状細胞による抗原の取り込み、抗原の提示に関与する。しかし、これまでDC-SIGNと腫瘍免疫の関連性は明らかにされていなかった。第二章では、ヒト抹消血単核細胞より分化誘導した樹状細胞およびヒト結腸がん組織を用いた実験を行い、樹状細胞上に発現するDC-SIGNが結腸がん関連血液型糖鎖抗原との結合を介して、がん細胞と正常細胞を識別することを明らかにした。さらに、DC-SIGNが樹状細胞の機能やT細胞の活性化を調節することで、腫瘍免疫の制御に関わることを初めて示した。このDC-SIGNに関する発見は、腫瘍免疫のメカニズムを理解する上で重要であり、将来的にはDC-SIGNを標的とした、がん免疫療への貢献も十分に期待される。

第三章は、MBP, DC-SIGNによるDNAの認識とクリアランスに関する研究についてである。DNAの血液中での蓄積は抗DNA抗体の産生を引き起こし、自己免疫疾患の原因の一つとなる。これまで、アポトーシス細胞などの死細胞から放出されたDNAの除去メカニズムについてはほとんど明らかになっていなかった。第三章では、*in vitro*の系でS-MBPおよびDC-SIGNがDNAに結合することを確認し、さらにそれらの分子を介して免疫細胞へのDNAの取り込みを促進することを初めて示した。このMBPとDC-SIGNに関する発見は、血液中の遊離DNAのクリアランス機構を理解する上で重要であり、自己免疫疾患の発症メカニズムの解明に近づくものと考えられる。

以上、本論文は、生体防御レクチンであるMBPとDC-SIGNが、主に糖鎖との結合を介して様々な生命現象を巧みに制御することを示したものであり、糖鎖機能の重要性に新たな知見を加えるものである。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。