

Glycotext講義

リンパ球ホーミングと糖鎖

千葉大学大学院薬学研究院

免疫微生物学研究室

川島 博人



CHIBA
UNIVERSITY

「二度なし」現象

- 免疫現象と同義
- 免疫系がひとたび「異物」を認識するとそれは記憶される。生体が再び同一の「異物」に出会うと、初回の時よりも迅速・強力に反応
- カルタゴ軍のシチリア攻撃
- ジェンナーによる牛痘種痘の実験

カルタゴ軍のシチリア攻撃

- シラクサ: イタリア半島突端の島シチリア最大のギリシアの植民都市。紀元前5世紀にカルタゴ軍により攻撃を受ける。
 - ペストが発生し、両軍ともダメージ。カルタゴ軍撤退。
- 数年後、カルタゴ軍はシラクサを再攻撃。再度ペストが流行。
 - 一度ペストを経験し生き残ったシラクサ軍には被害なし。新しく部隊を編成したカルタゴ群は大被害を被り敗退。

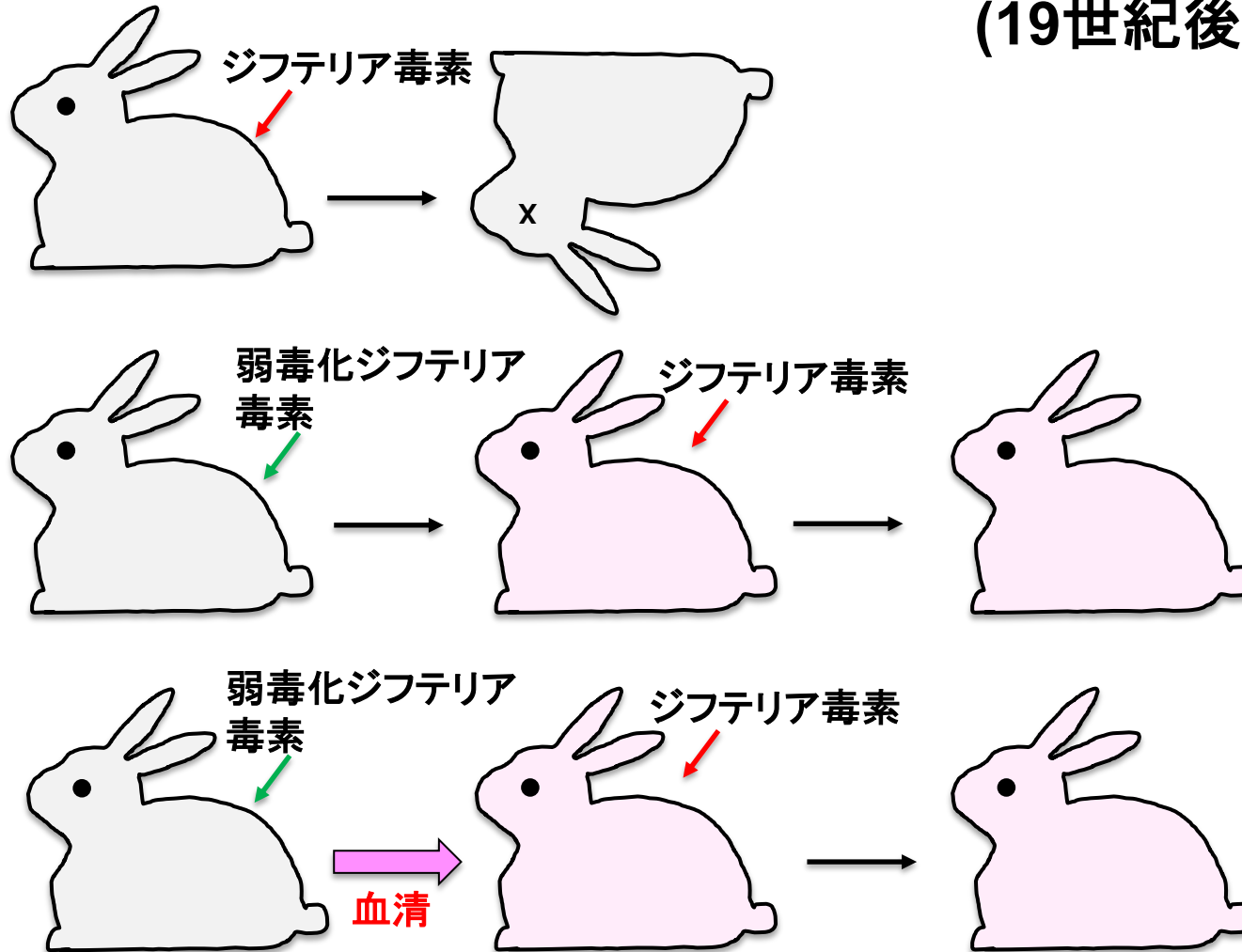
ジェンナーによる牛痘種痘の実験

(18世紀後半)

- 天然痘に乳搾りの娘は罹らない。顔には牛痘ウイルスによってできたアバタ。
→ 牛痘ウイルス感染すると、天然痘にならない。
- 少年を実験台に天然痘の予防実験 (1796)
少年に牛痘を接種(種痘)したのち、天然痘ウイルスを感染させた。
→ 天然痘発症せず。免疫現象(二度なし)証明。

北里柴三郎とベーリングの実験

(19世紀後半)



抗体の特異性と多様性

- ジフテリア毒素で免疫したウサギの血清
→ジフテリア毒素と沈殿物を作るが破傷風毒素と反応せず。
- 破傷風毒素で免疫したウサギの血清
→破傷風毒素と沈殿物を作るがジフテリア毒素と反応せず。

→ 抗体には特異性と多様性が存在。

ワクチン療法と抗血清療法

- ワクチン療法

疾病の**予防法**の一種。

パスツールにより、牛痘(*variola vaccinia*)の学名から vaccination と命名。ワクチン接種による免疫力の獲得。

- 抗血清療法

疾病の**治療法**の一種。

抗体を含む血清を注射して免疫を賦与。

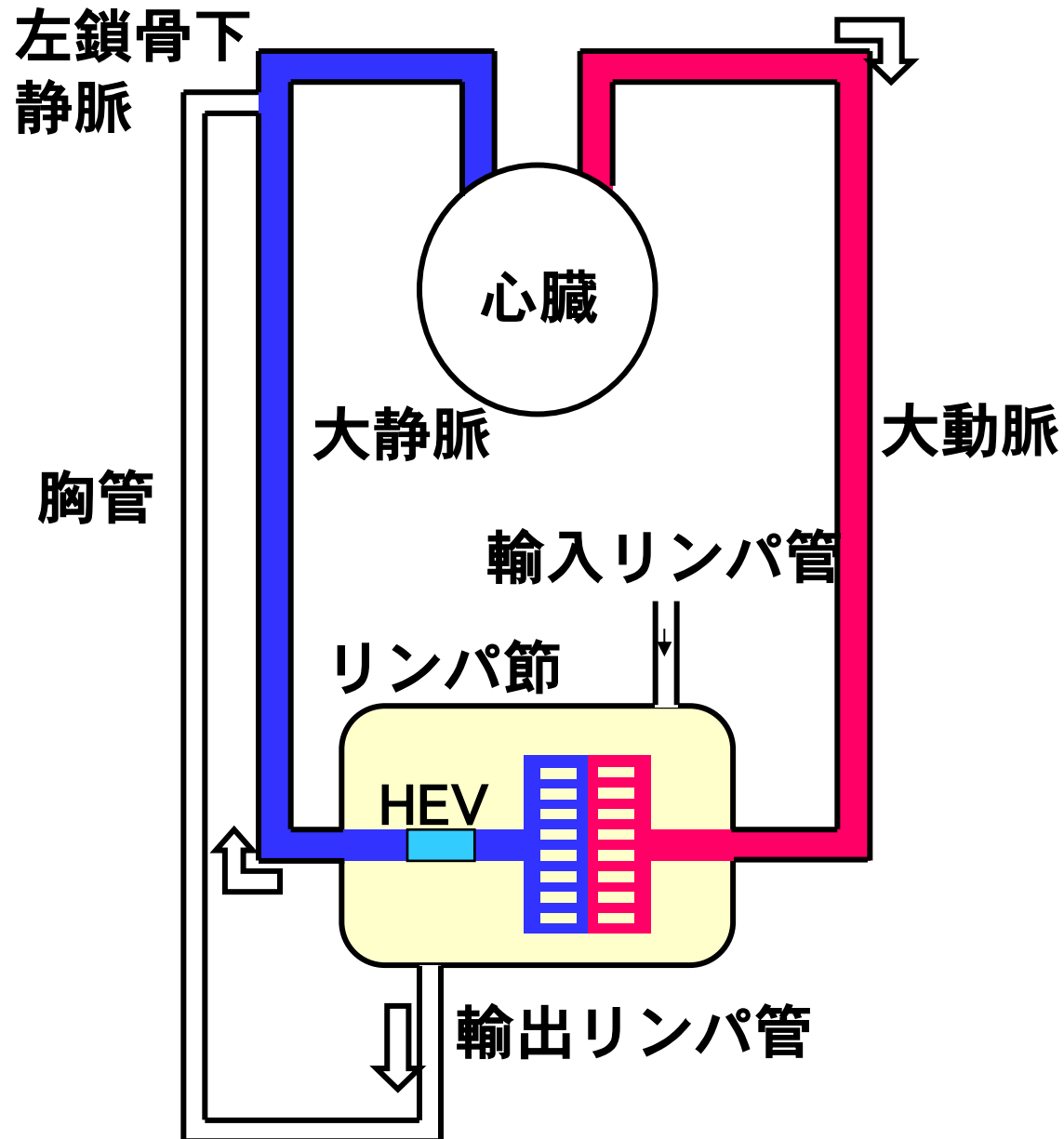
抗血清療法からわかったこと

- 抗血清療法において、異種動物由来の抗体を複数回投与された患者→異種動物の抗体蛋白に対する抗体ができ、重篤な炎症が起こった。
 - 免疫系は必ずしも自己防衛システムとして機能するのではない。
 - 免疫系は自己と非自己を識別するシステムである。

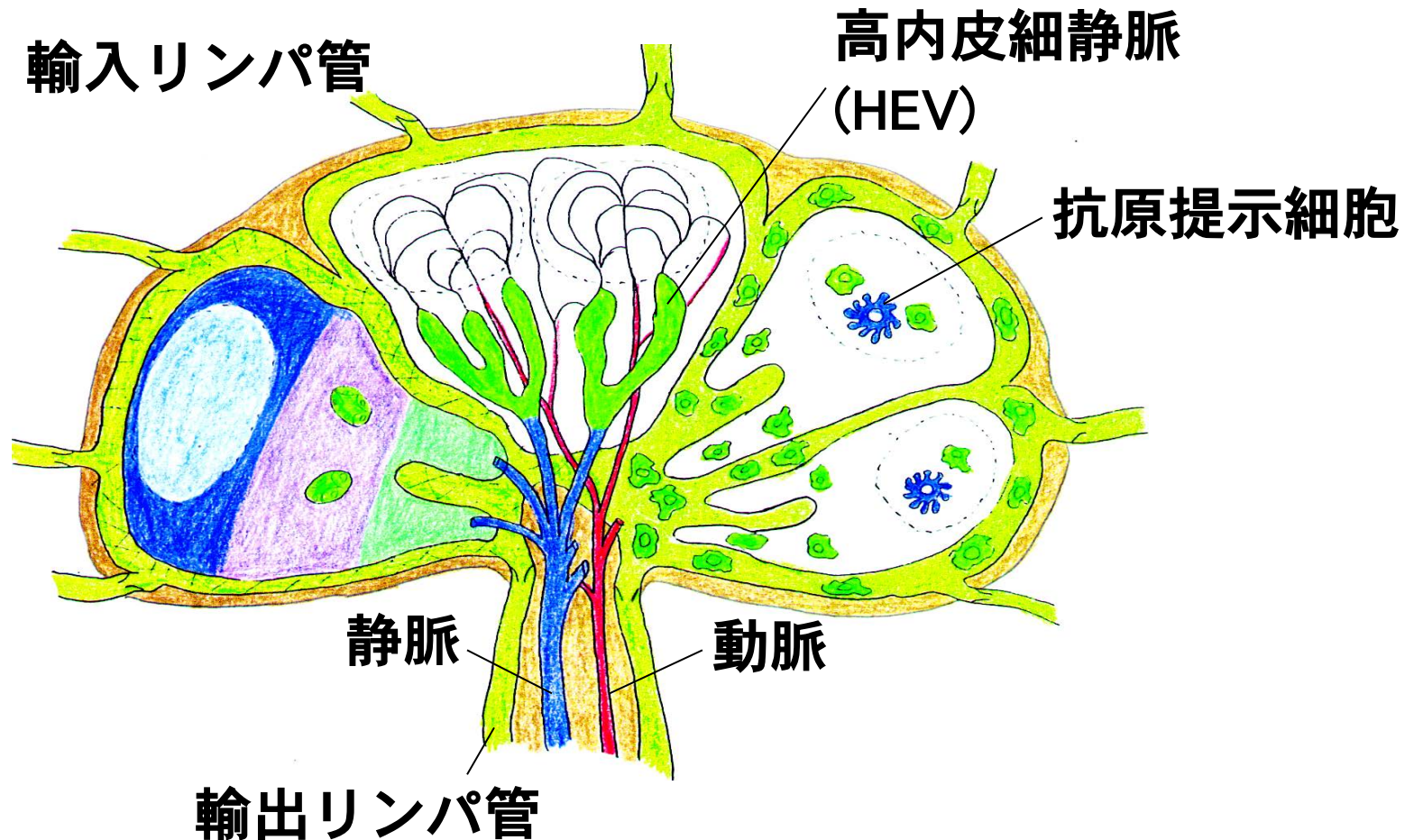
リンパ組織

- 一次リンパ組織（リンパ球が分化する場）
 - 胸腺：Tリンパ球が分化
 - 骨髄：Bリンパ球が分化
- 二次リンパ組織（免疫応答が起こる場）
 - リンパ節
 - アデノイド、扁桃
 - パイエル板、虫垂
 - 脾臓

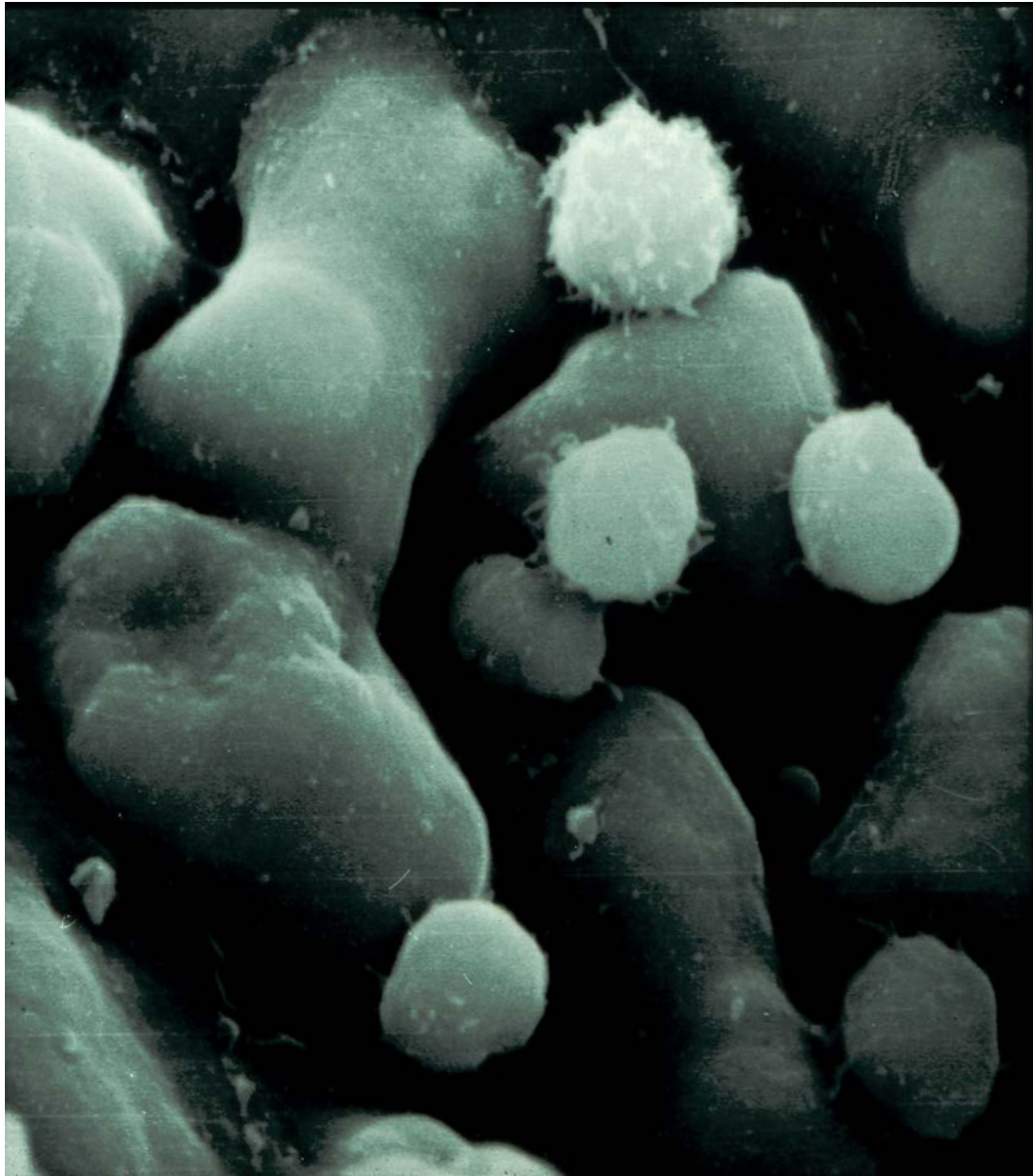
リンパ球ホーミング



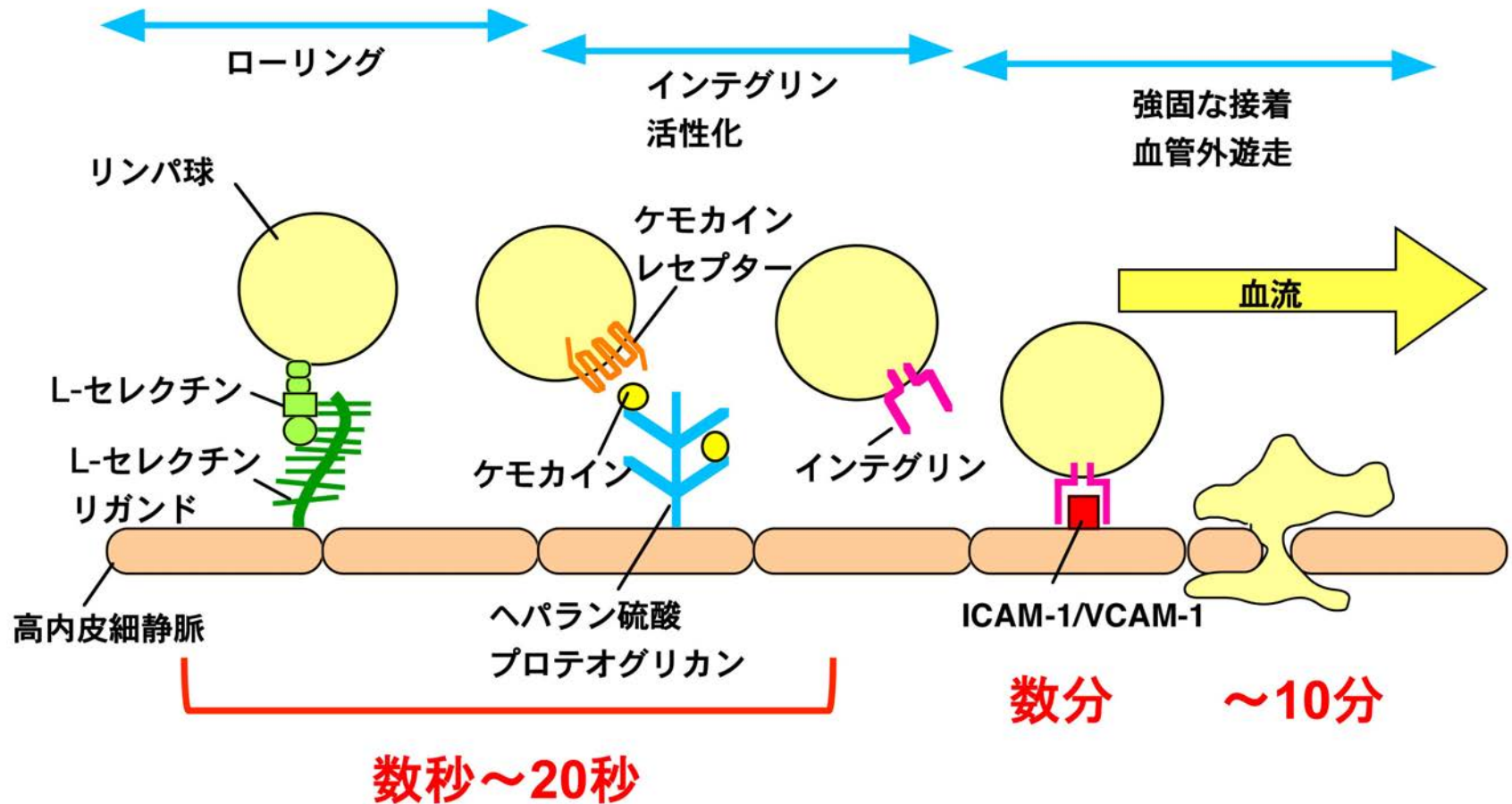
リンパ節： 免疫細胞のコミュニケーションの場



高内皮細静脈(HEV)-リンパ球相互作用



高内皮細静脈(HEV)-リンパ球相互作用



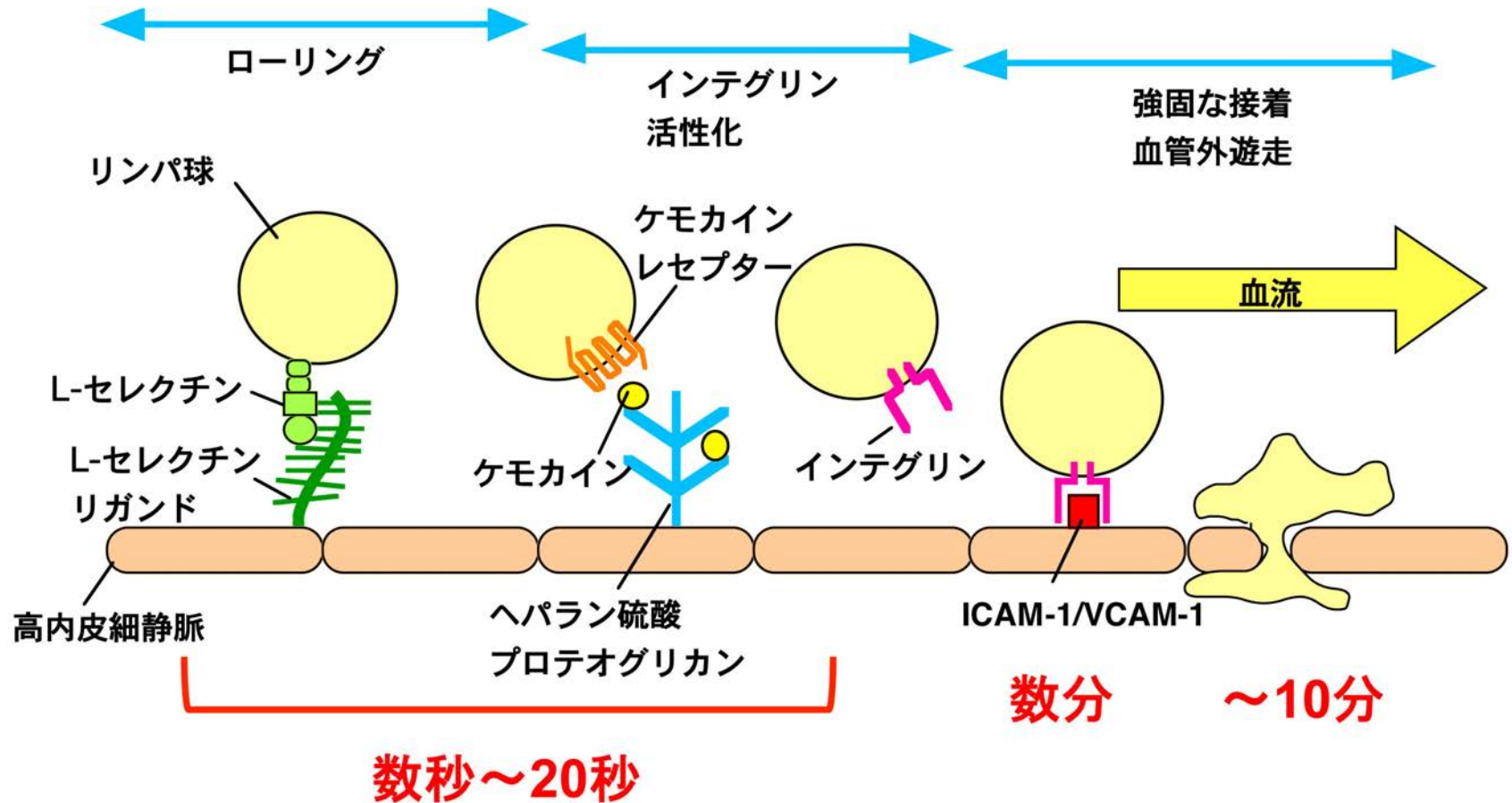
研究紹介

- 末梢リンパ節(PLN)へのリンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解析
 - 1.糖鎖合成酵素欠損マウスを用いた解析
 - 2.新規抗糖鎖抗体を用いた解析
- 鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)へのリンパ球ホーミングおよびアレルギー性鼻炎における硫酸化糖鎖の機能解析

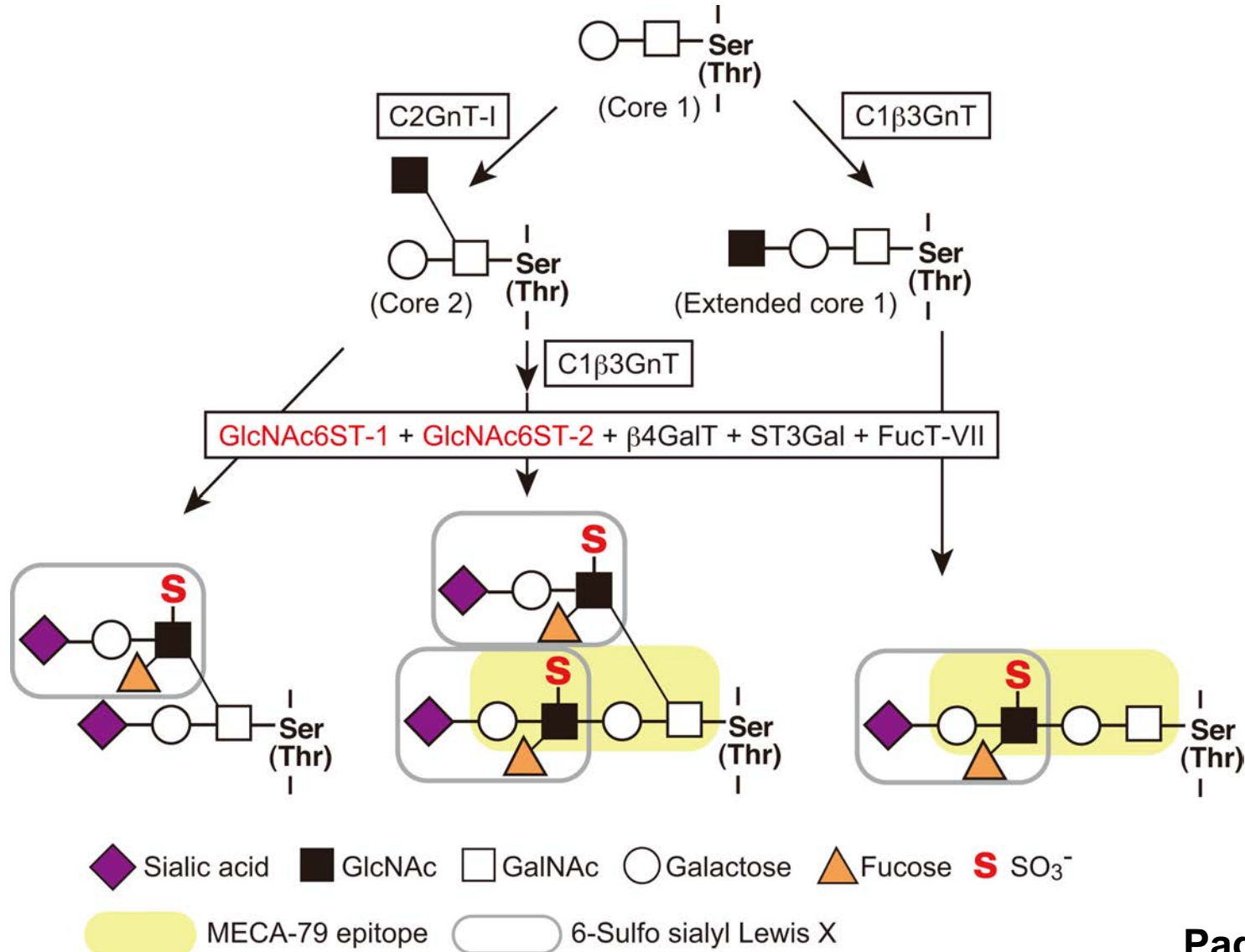
研究紹介

- 末梢リンパ節(PLN)へのリンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解析
 - 1.糖鎖合成酵素欠損マウスを用いた解析
 - 2.新規抗糖鎖抗体を用いた解析
- 鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)へのリンパ球ホーミングおよびアレルギー性鼻炎における硫酸化糖鎖の機能解析

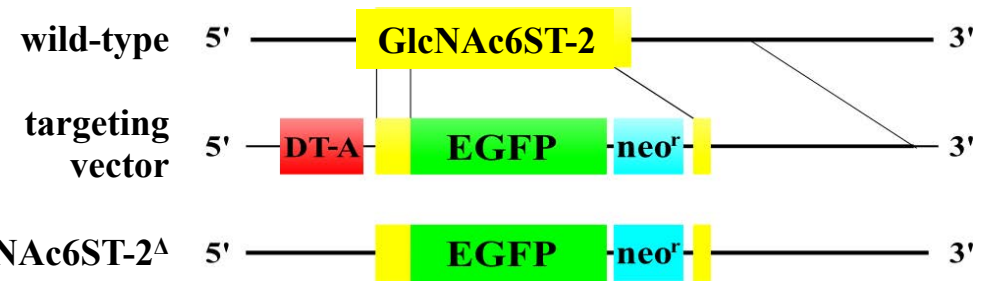
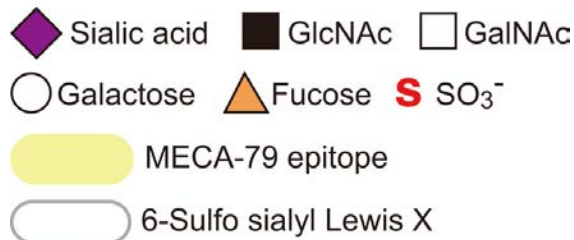
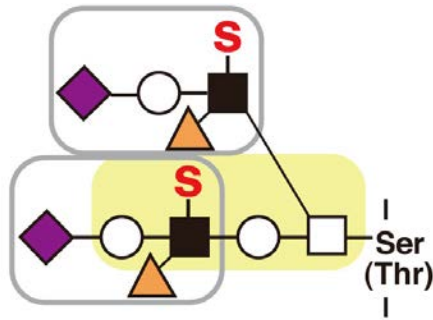
高内皮細静脈(HEV)-リンパ球相互作用



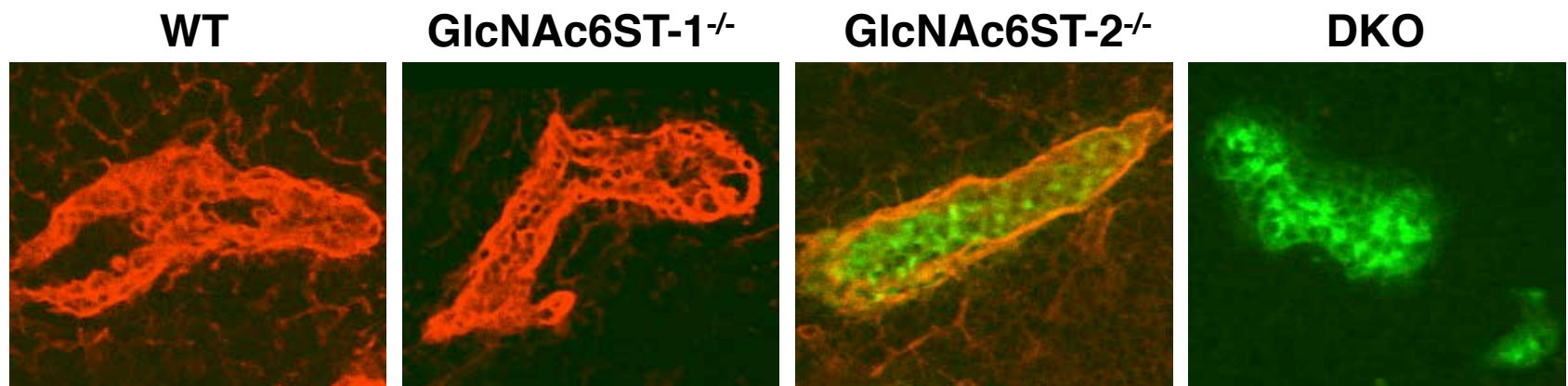
L-セレクチンリガンドとして働くO-型糖鎖の生合成



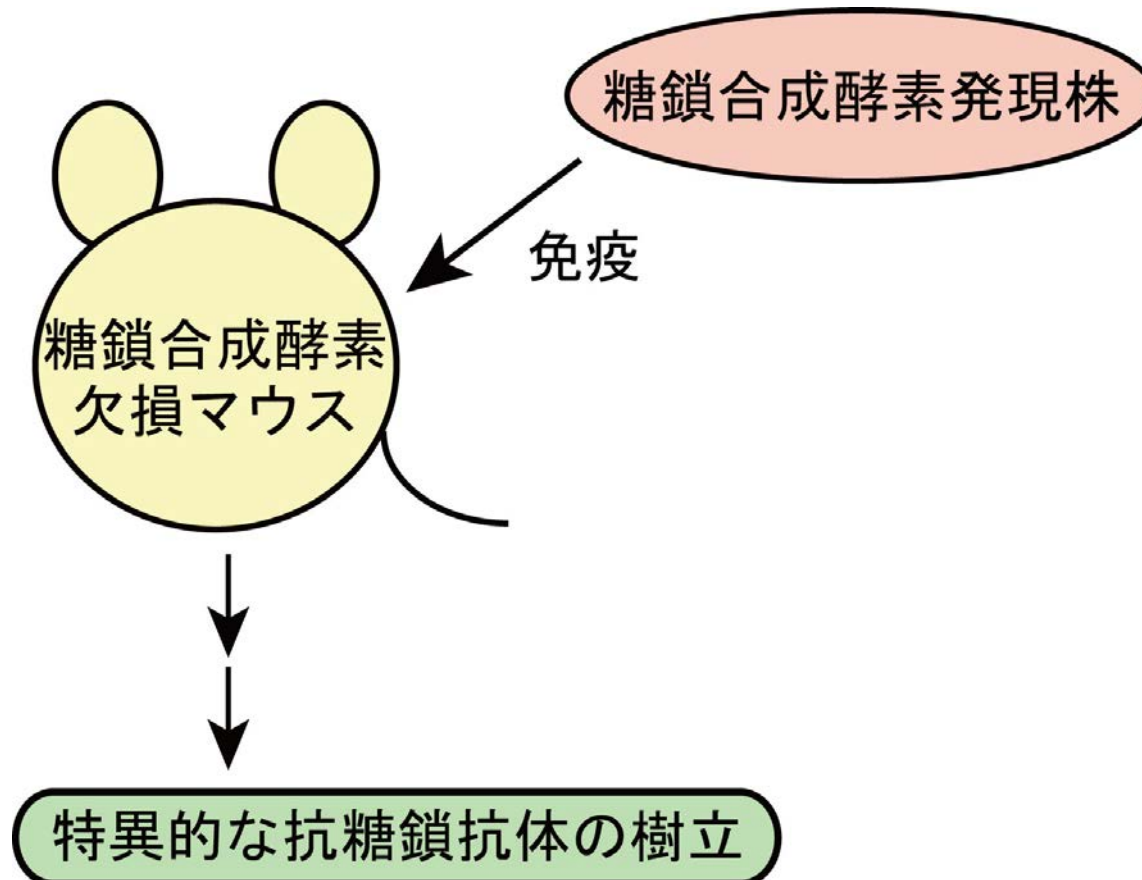
硫酸基転移酵素GlcNAc6ST-2欠損マウスの作製



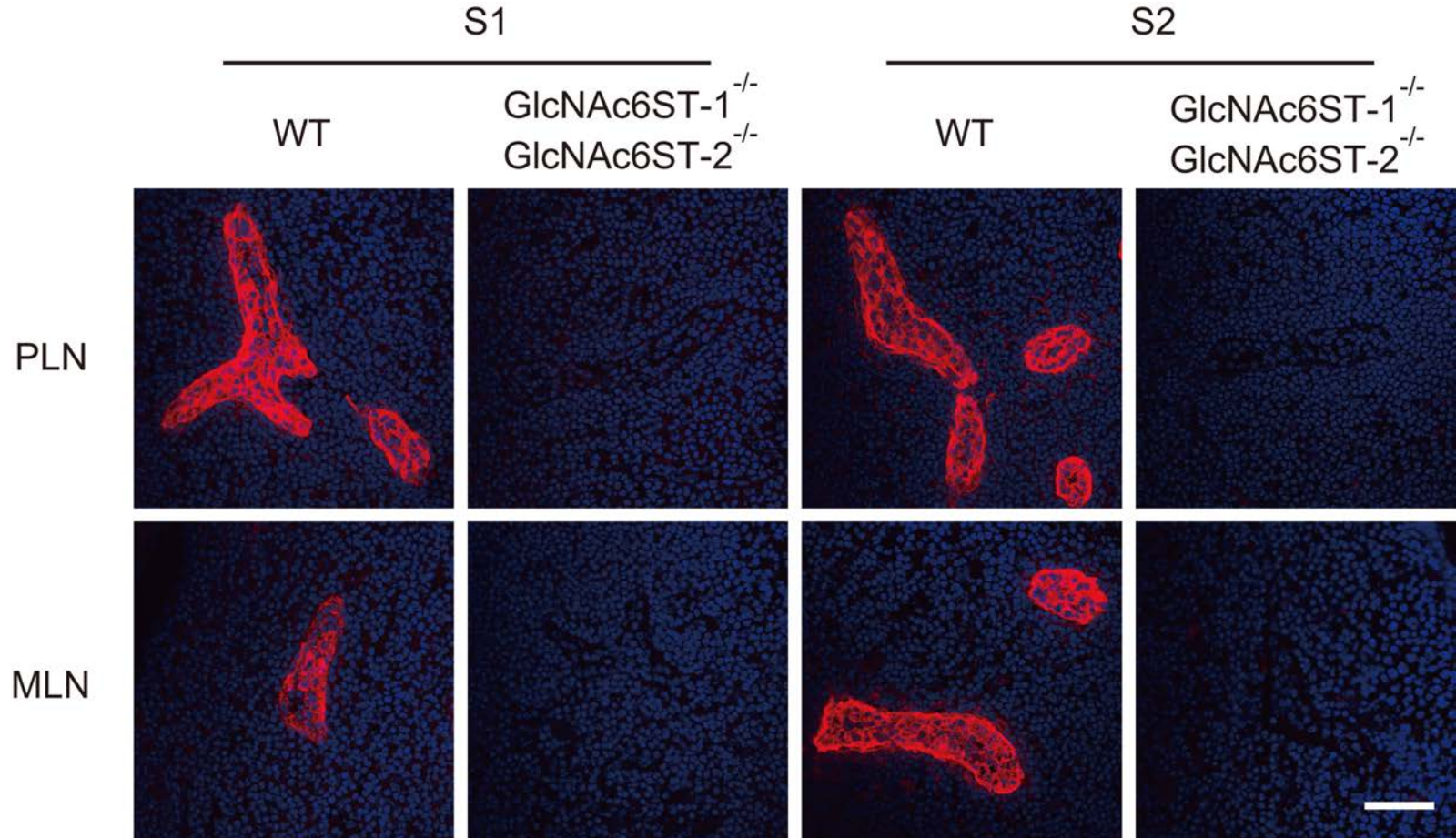
MECA-79 / EGFP



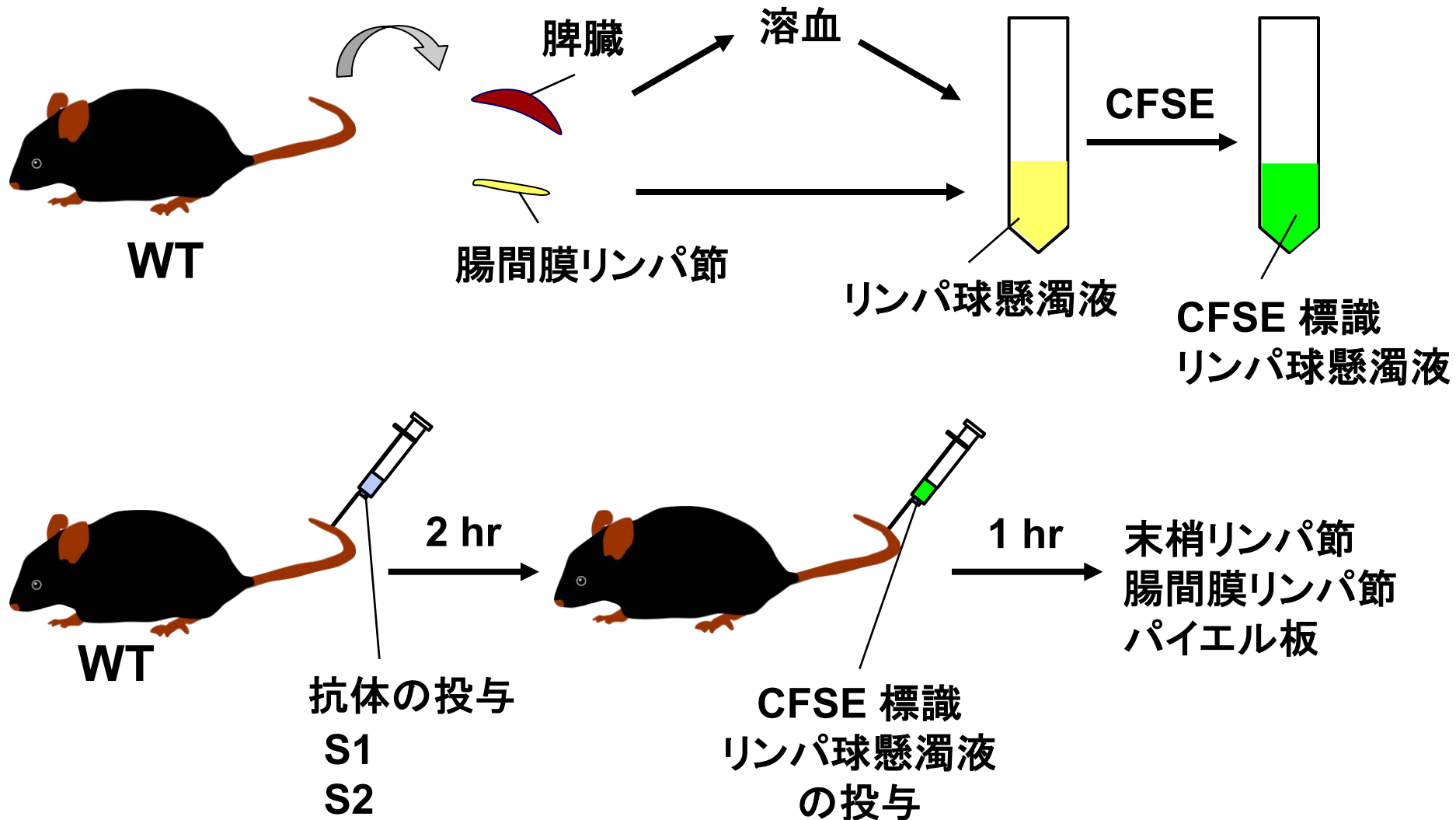
新しい抗糖鎖抗体作製法の樹立



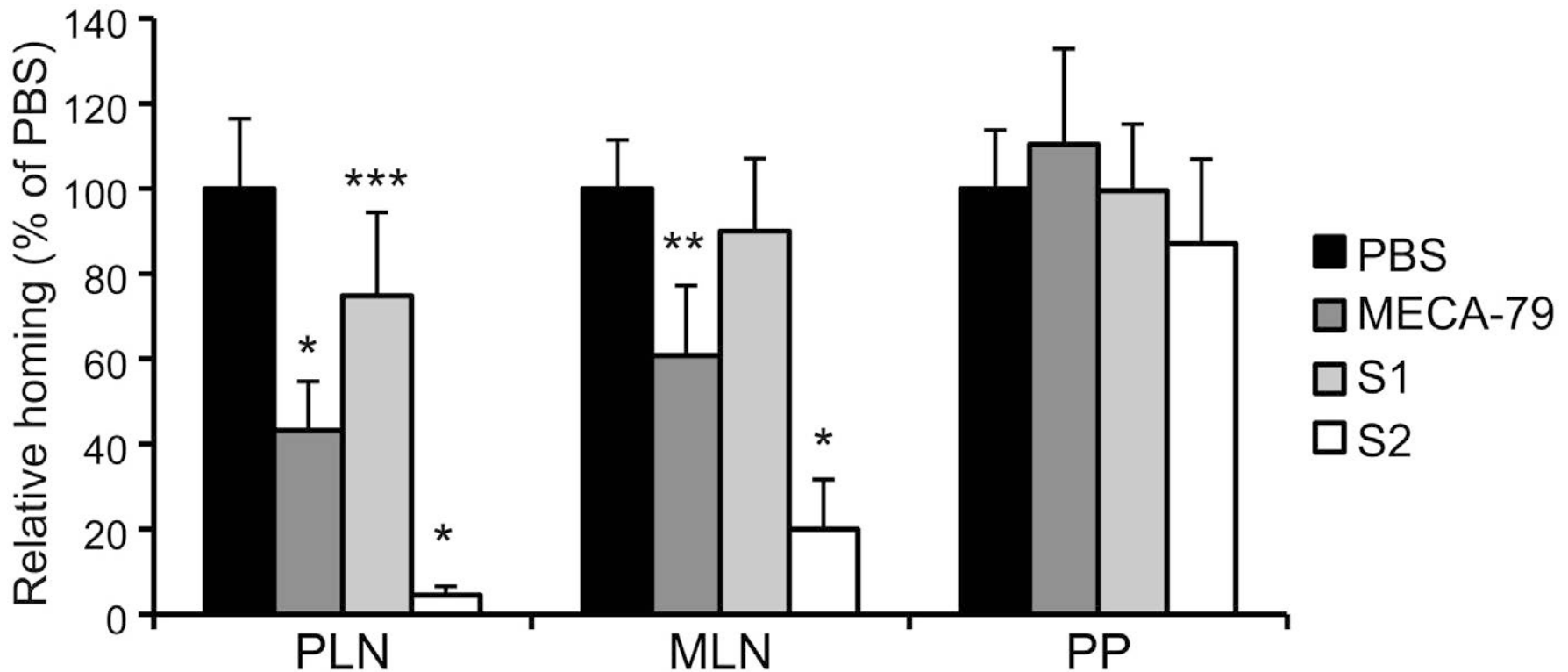
マウスリンパ節の免疫染色

Bar, 50 μ m

リンパ球ホーミングアッセイ

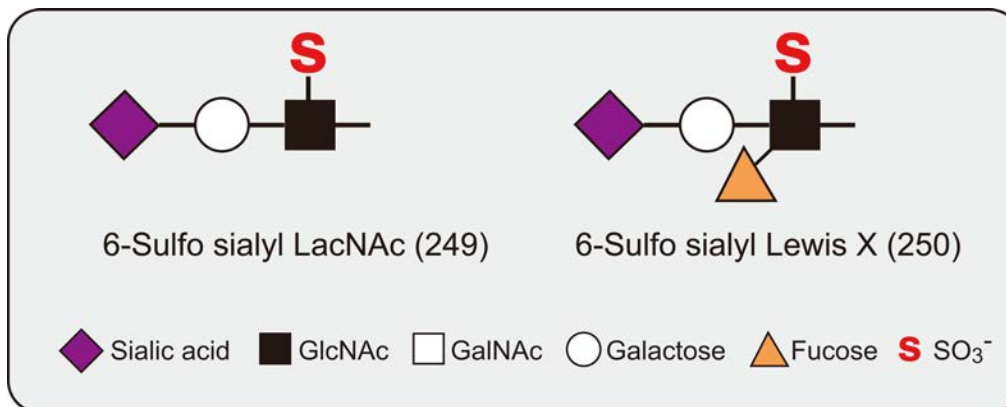
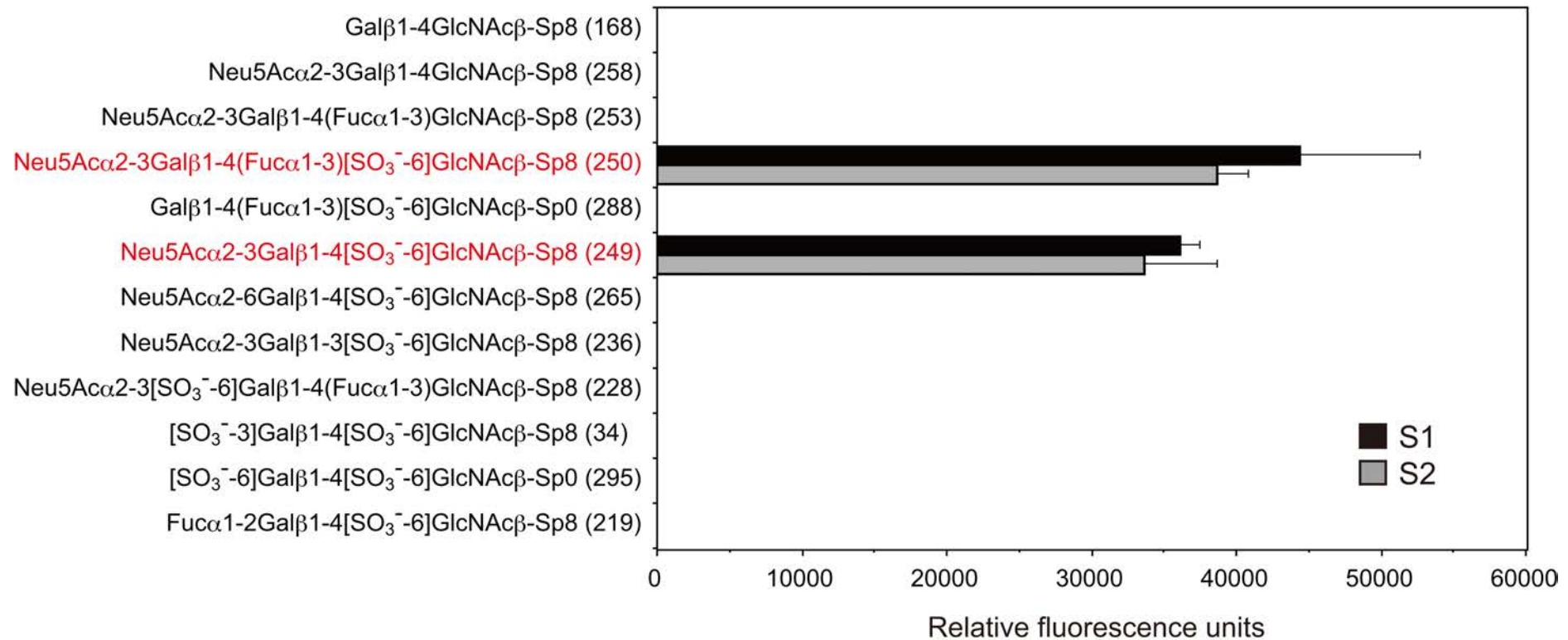


S1, S2抗体による リンパ球ホーミング阻害効果の検討

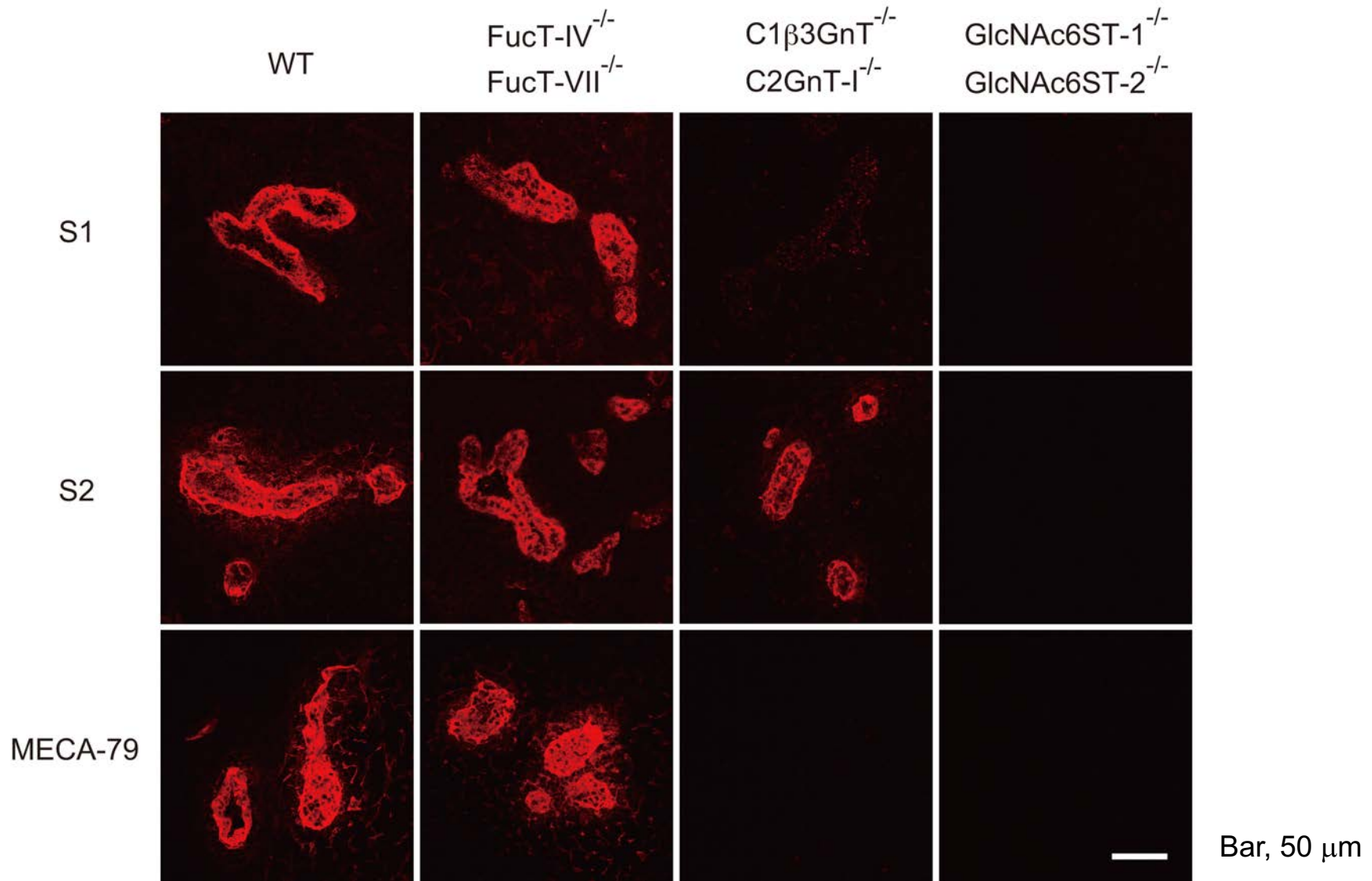


*P<0.0001, **P<0.001, ***P<0.02

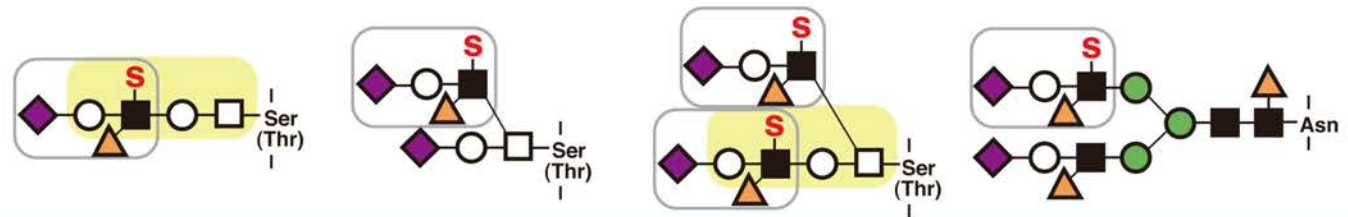
糖鎖Arrayを用いたエピトープ解析



マウスリンパ節の免疫染色



各種遺伝子欠損マウスにおける糖鎖発現の違い



WT

+

+

+

+

GlcNAc6ST-1/GlcNAc6ST-2 DKO

-

-

-

-

C1 β 3GnT/C2GnT-I DKO

-

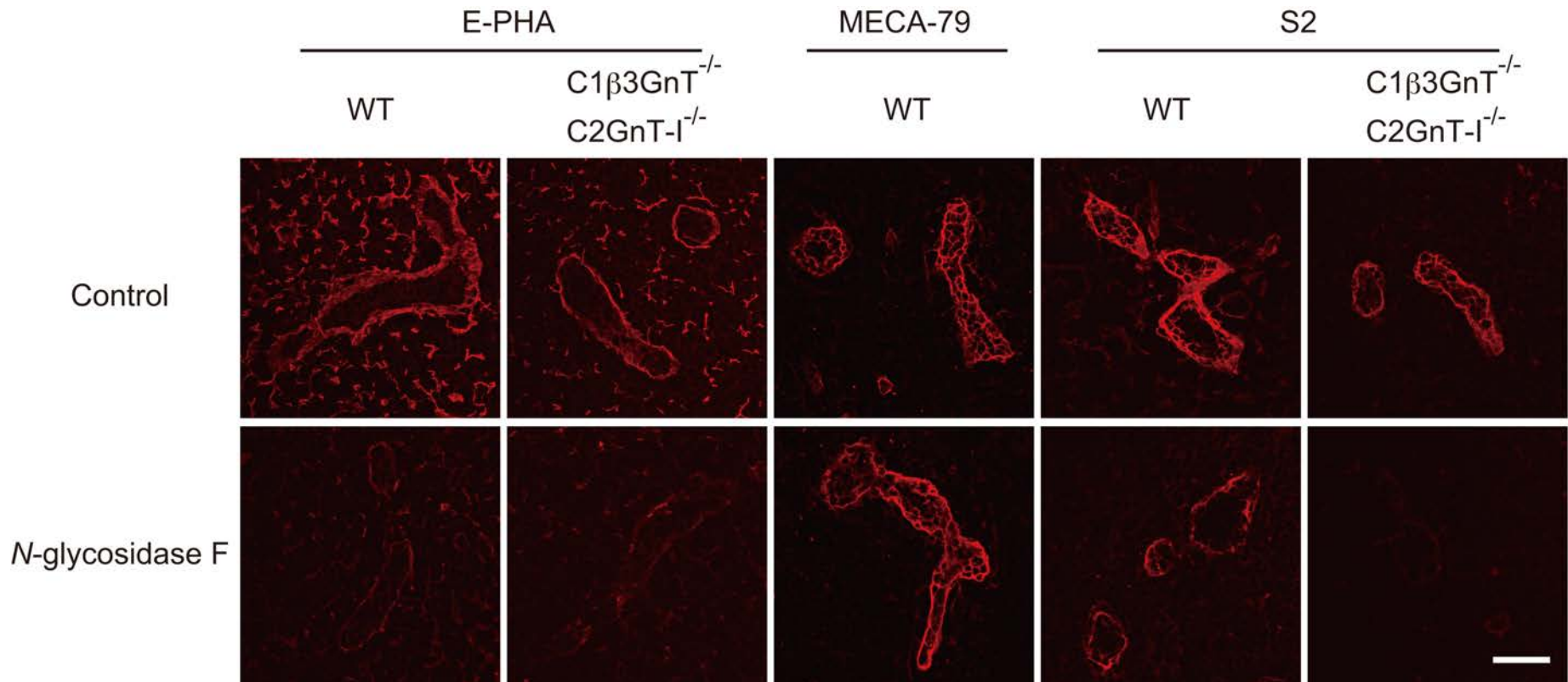
-

-

+

Sialic acid
 GlcNAc
 GalNAc
 Galactose
 Fucose
 Mannose
 SO₃⁻
 MECA-79 epitope
 6-Sulfo sialyl Lewis X

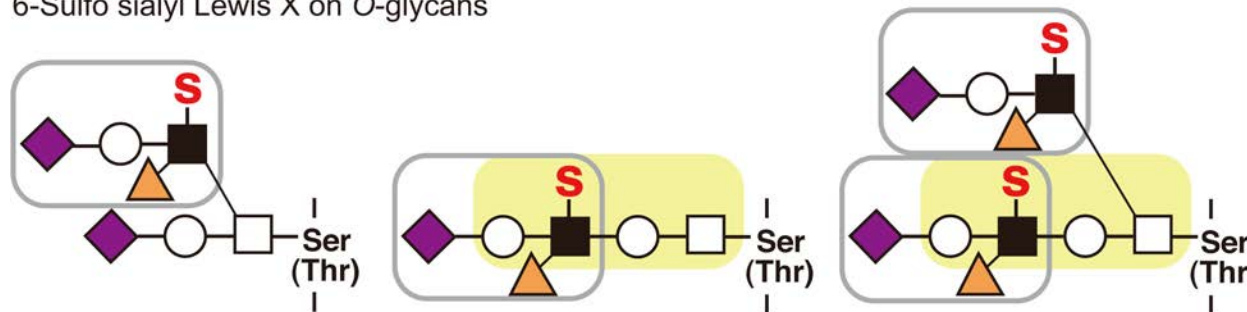
S2の反応性に及ぼすN-型糖鎖除去の影響

Bar, 50 μ m

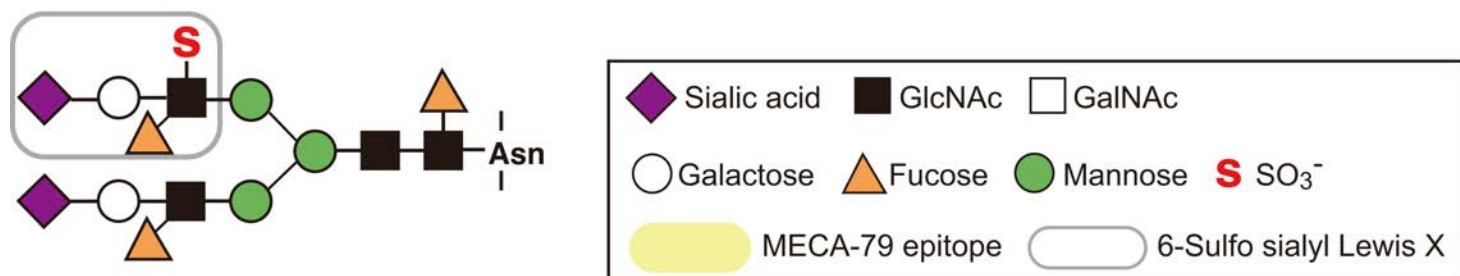
まとめ (1)

1. 硫酸基転移酵素二重欠損マウスを硫酸化糖鎖強制発現株で免疫することにより、6-スルホシアリルLacNAc特異的S1, S2抗体を樹立した。
2. S1とS2の結合特異性の違いを利用して、硫酸化されたO-型およびN-型糖鎖の双方がL-セレクチンリガンドとして機能することを明らかにした。

6-Sulfo sialyl Lewis X on O-glycans



6-Sulfo sialyl Lewis X on an N-glycan

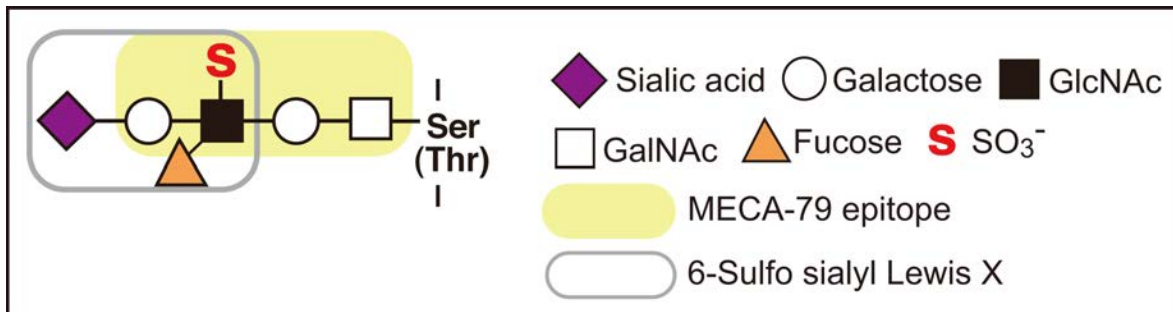
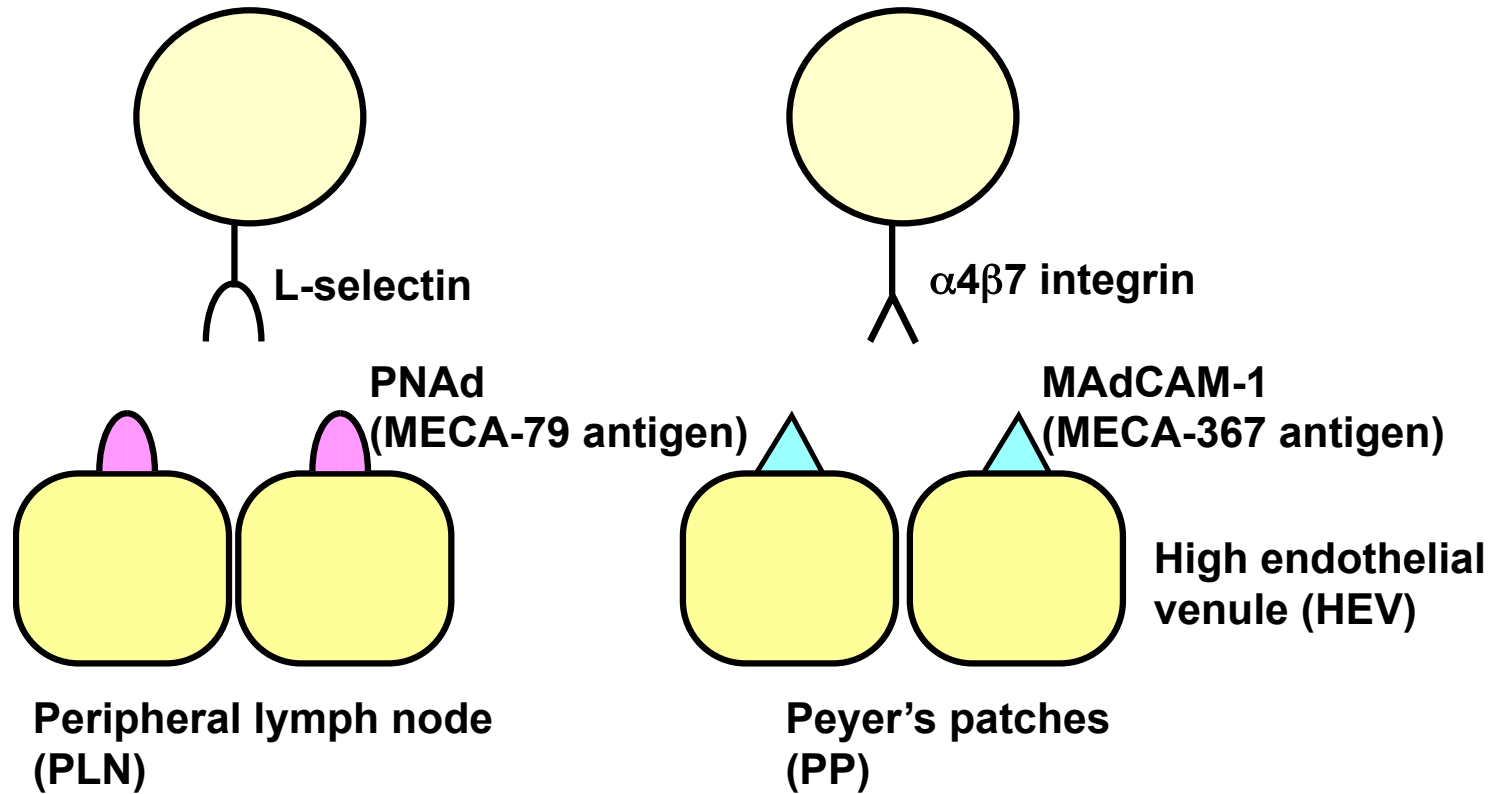


→ 様々な抗糖鎖抗体の作製に有用な汎用性の高い方法論が確立した。

研究紹介

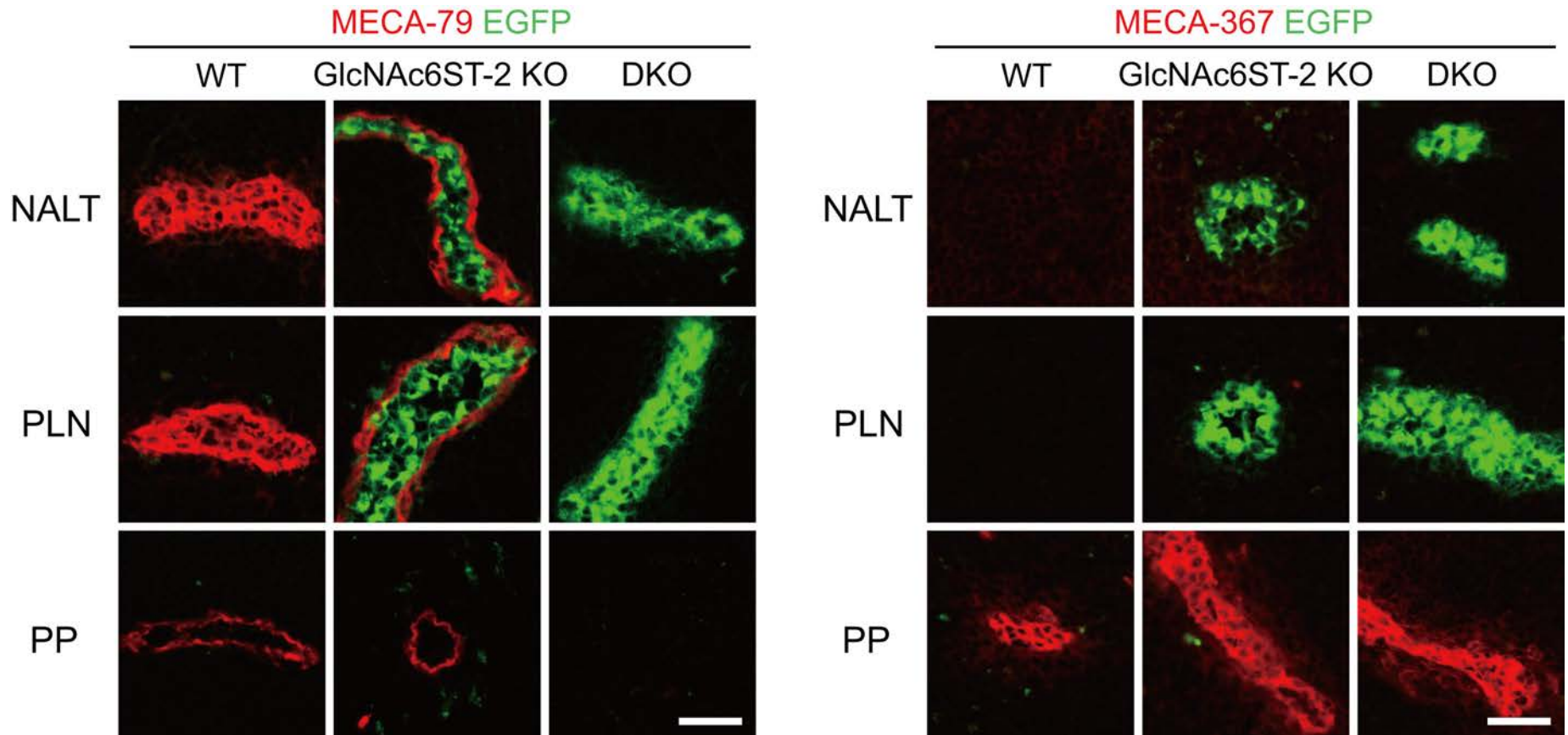
- 末梢リンパ節(PLN)へのリンパ球ホーミングにおける硫酸化糖鎖の機能解析
 - 1.糖鎖合成酵素欠損マウスを用いた解析
 - 2.新規抗糖鎖抗体を用いた解析
- 鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)へのリンパ球ホーミングおよびアレルギー性鼻炎における硫酸化糖鎖の機能解析

ホーミングレセプターとアドレシン



鼻咽頭関連リンパ組織
Nasal-associated lymphoid tissue (NALT) ?

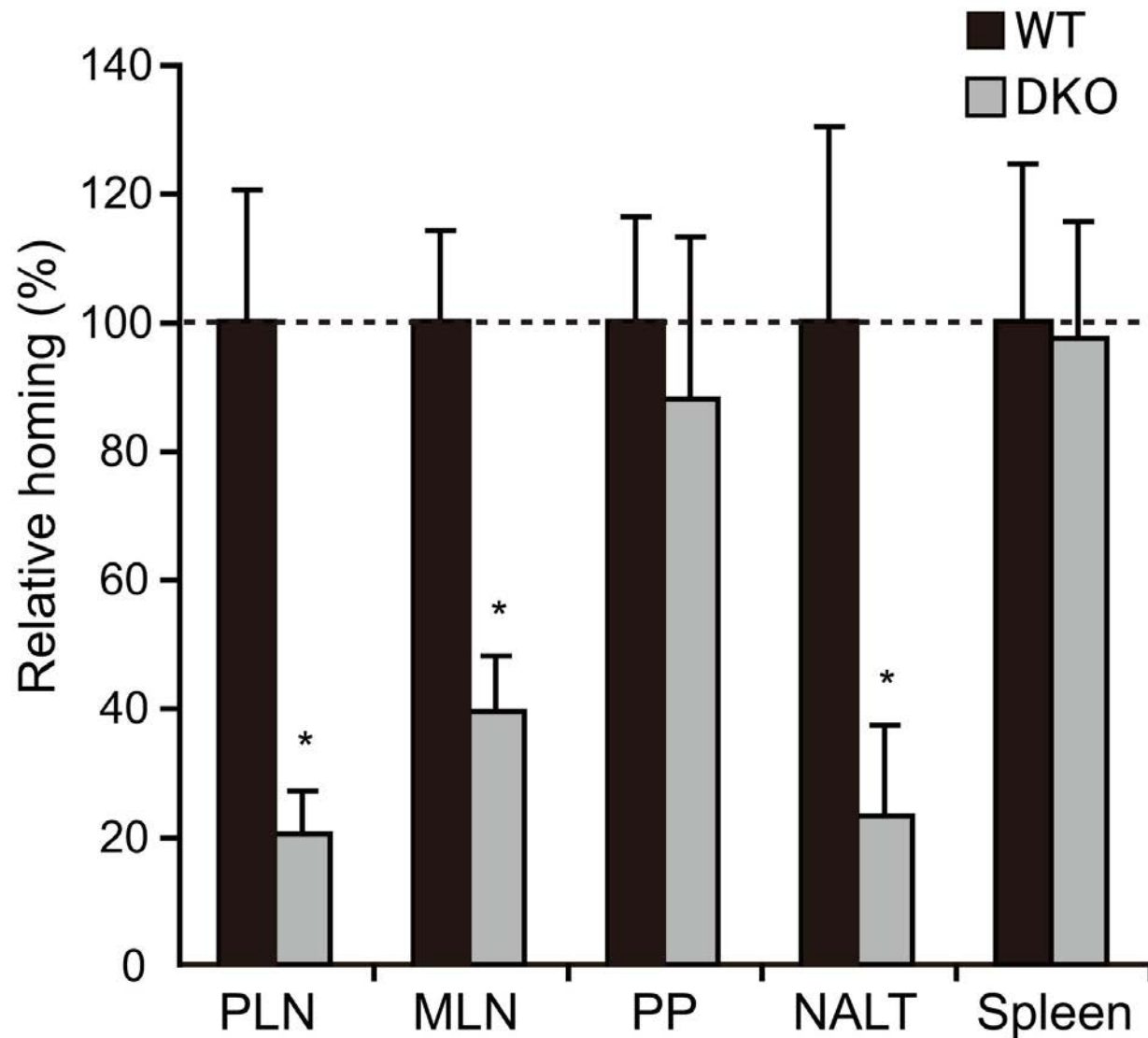
NALT HEVにおけるPNAdの発現



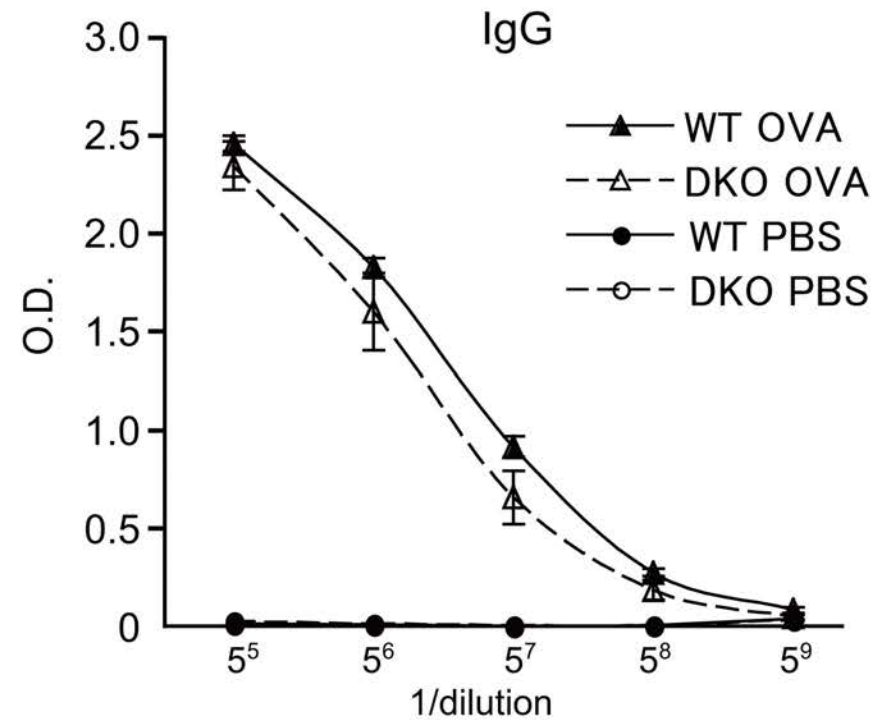
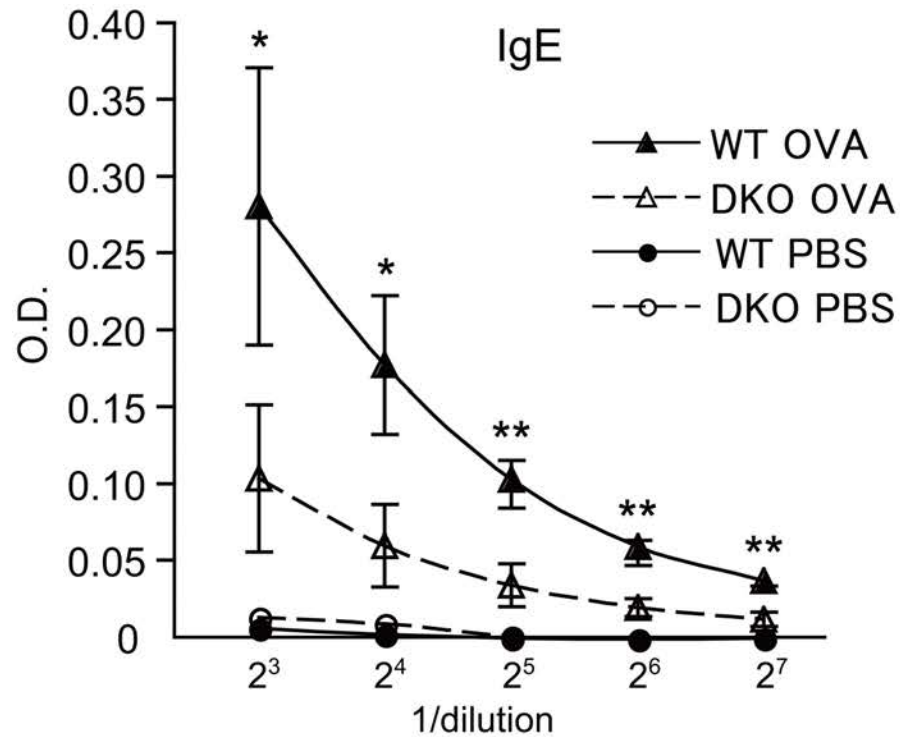
DKO: GlcNAc6ST-1^{-/-}/GlcNAc6ST-2^{-/-}

Bar, 30 μm

リンパ球ホーミングアッセイ

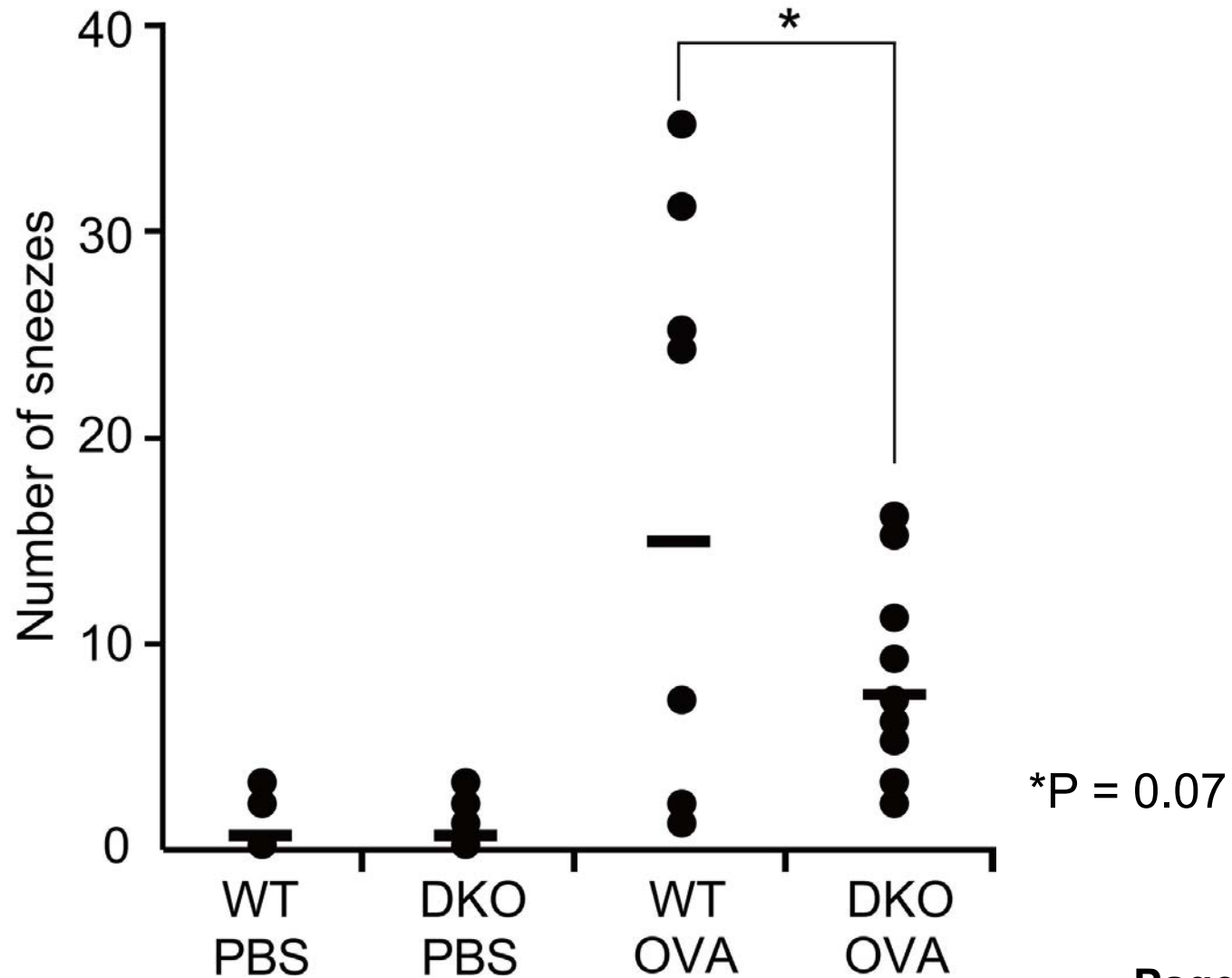


血清中のOVA特異的IgEおよびIgG

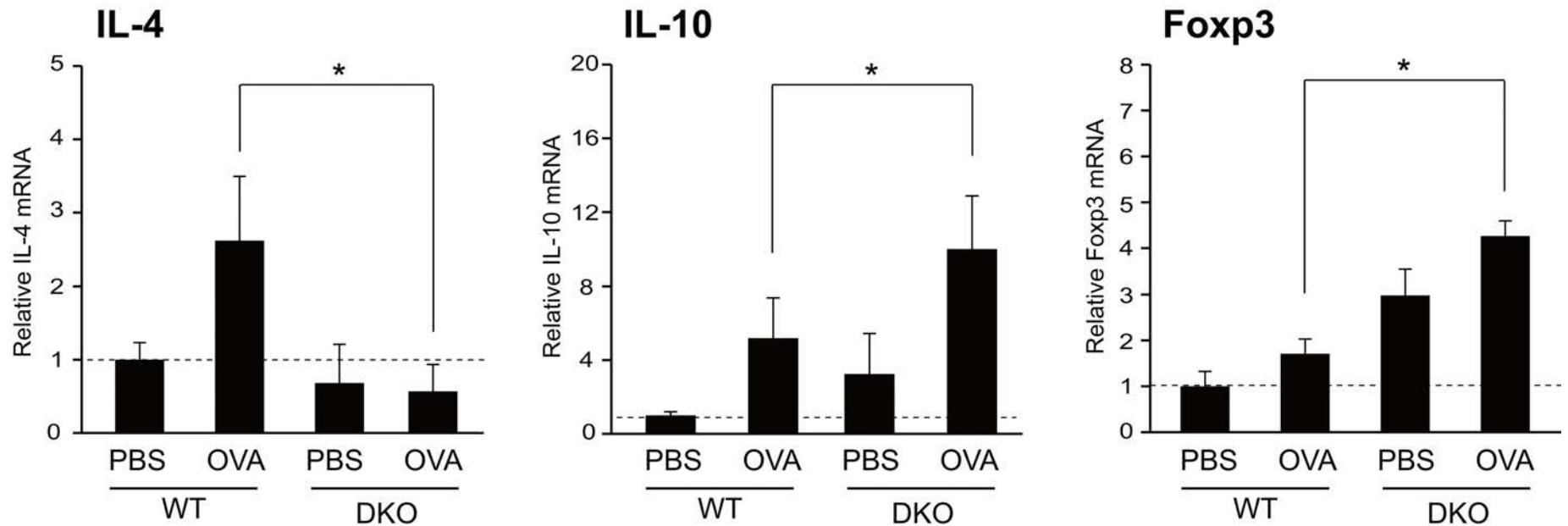


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

感作マウスへのOVA投与によるくしゃみの回数

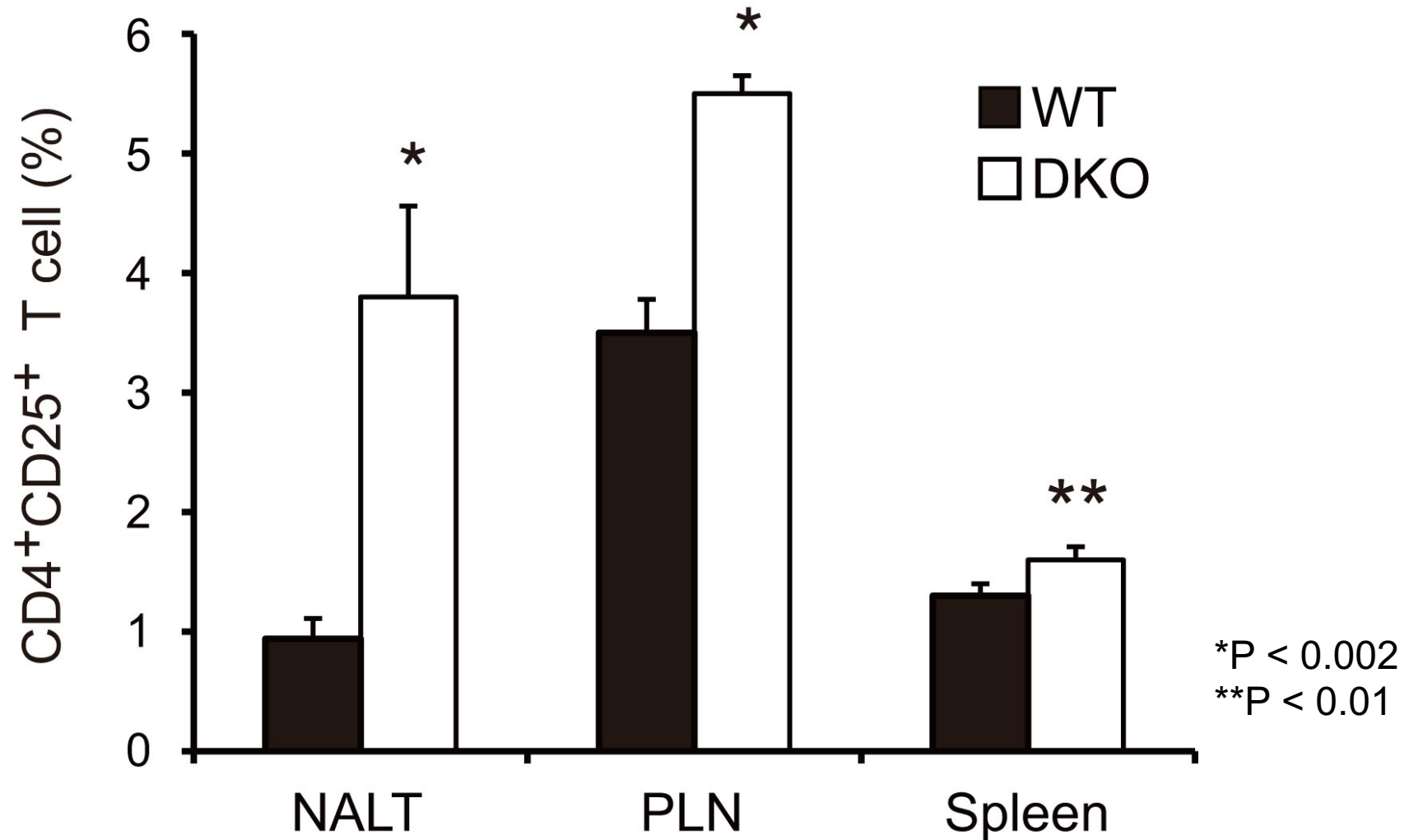


サイトカイン(IL-4, IL-10)と制御性T細胞特異的転写因子Foxp3の定量的PCR解析

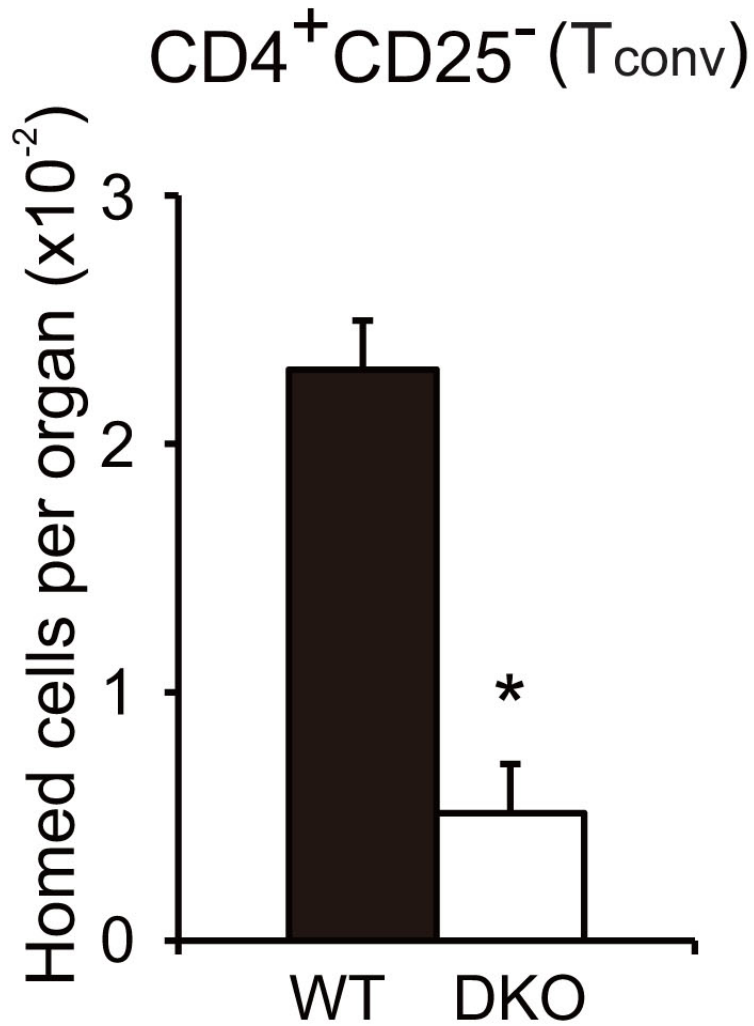


*P < 0.02

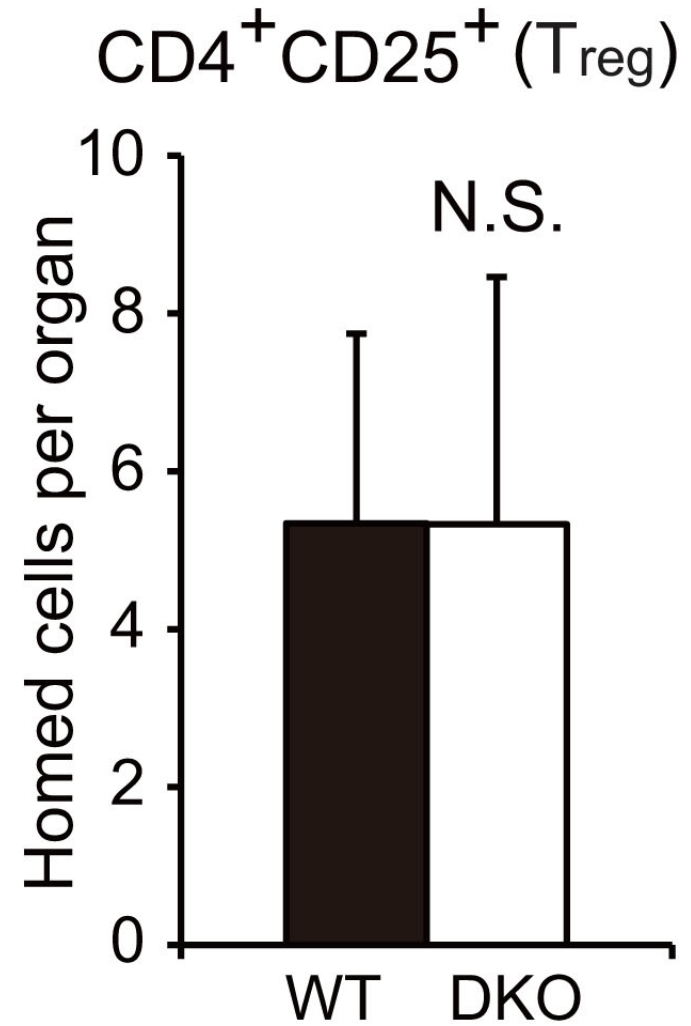
各リンパ組織における制御性T細胞の割合



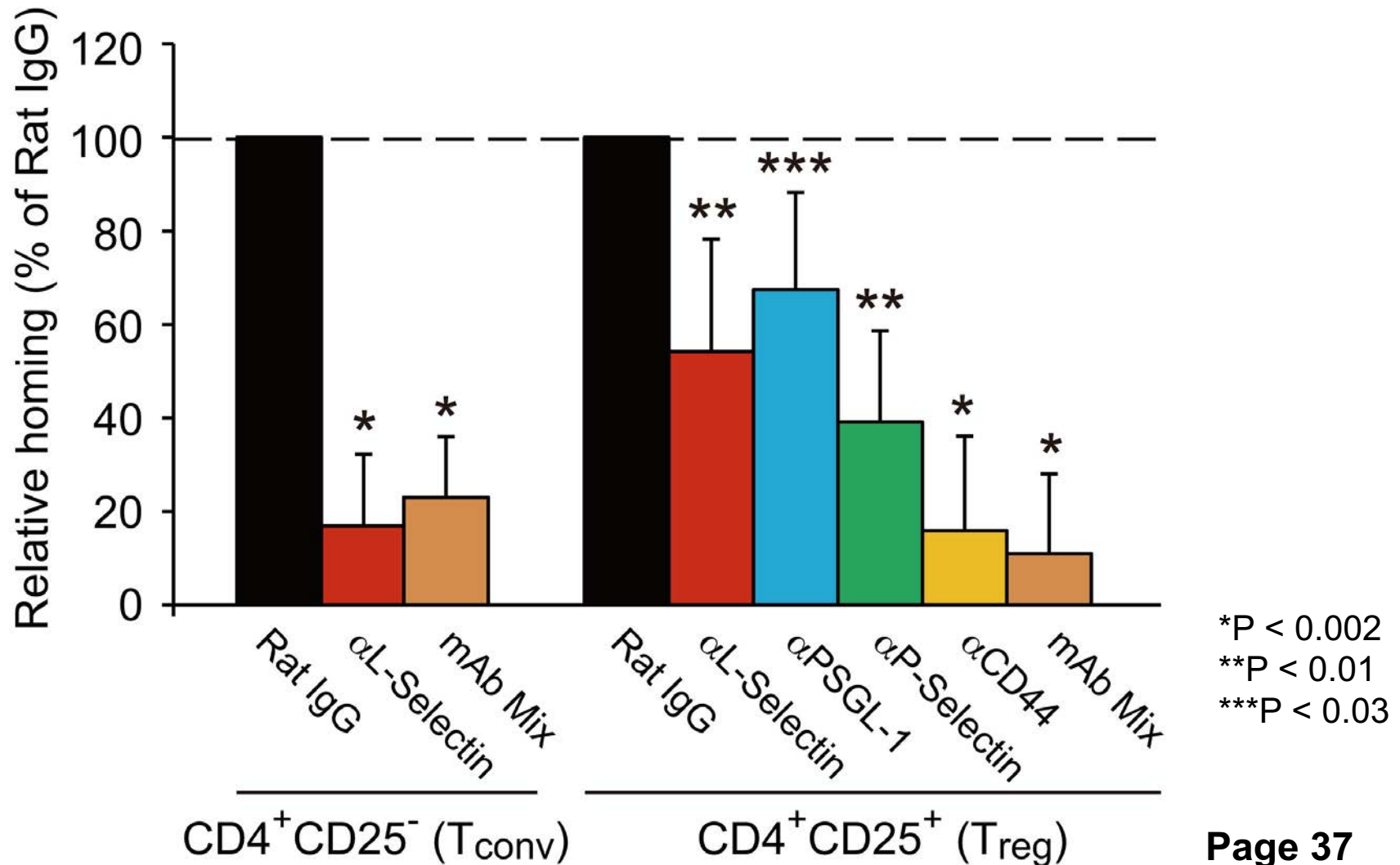
NALTへのリンパ球ホーミングアッセイ



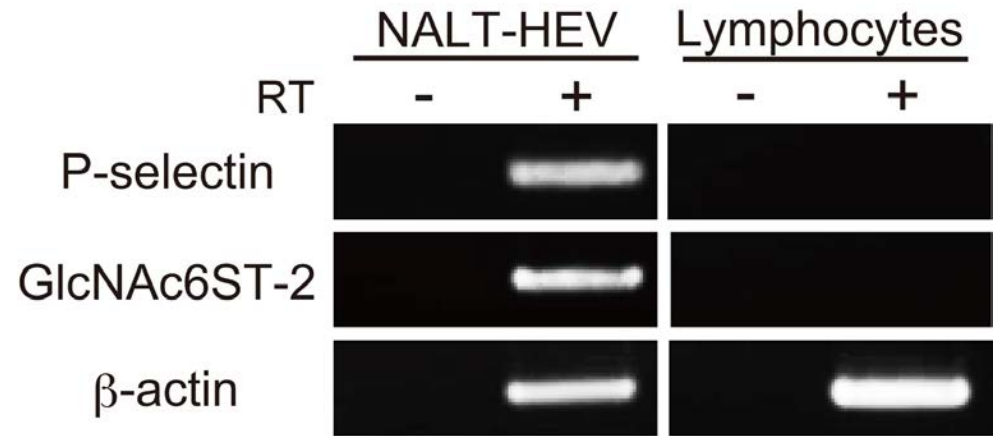
*P < 0.01



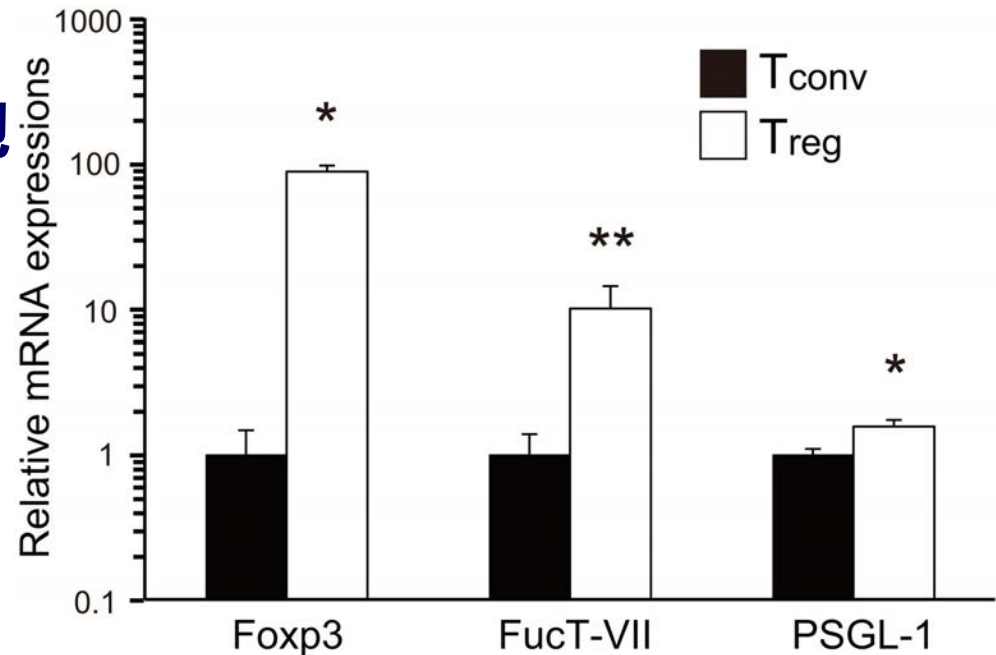
Tconv および Treg 細胞のNALTへの ホーミングの各種モノクローナルによる阻害



NALT HEVにおける P-セレクチンの発現



FucT-VII および PSGL-1 の Tconv 細胞、Treg 細胞 における発現



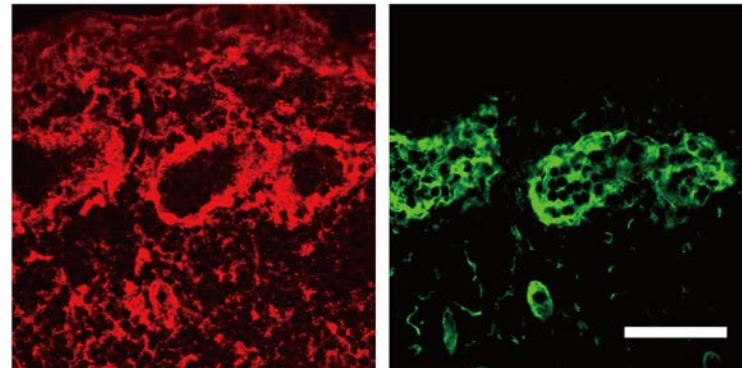
*P < 0.005

**P < 0.02

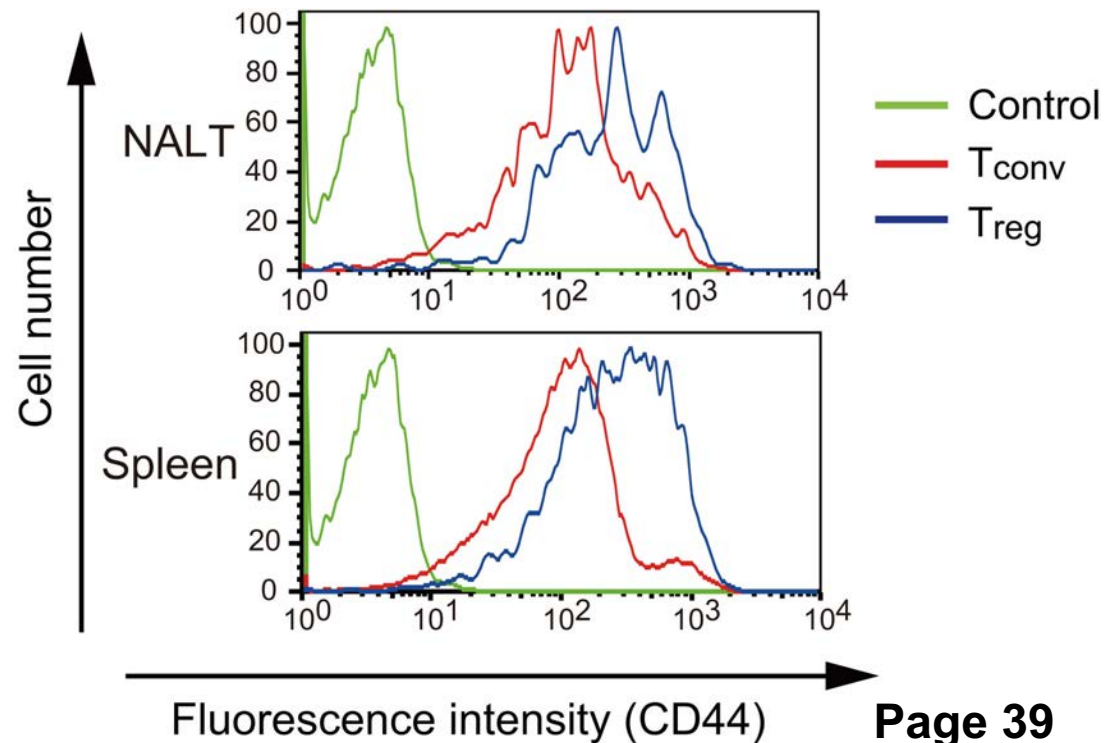
NALT HEVにおける ヒアルロン酸(HA)の発現

HA binding protein

MECA-79

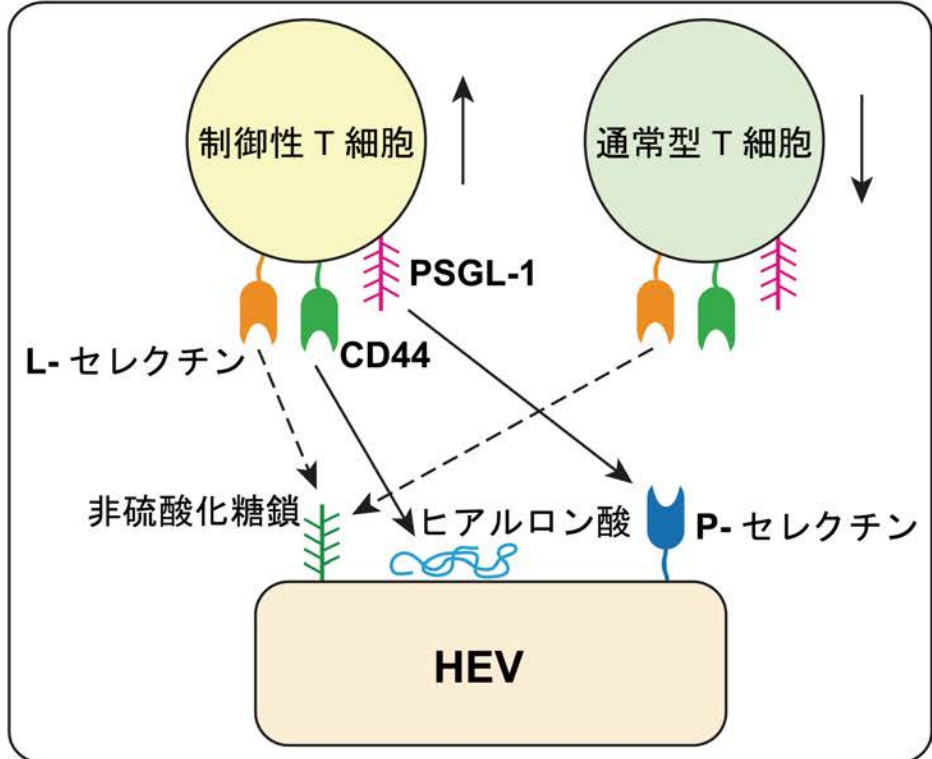
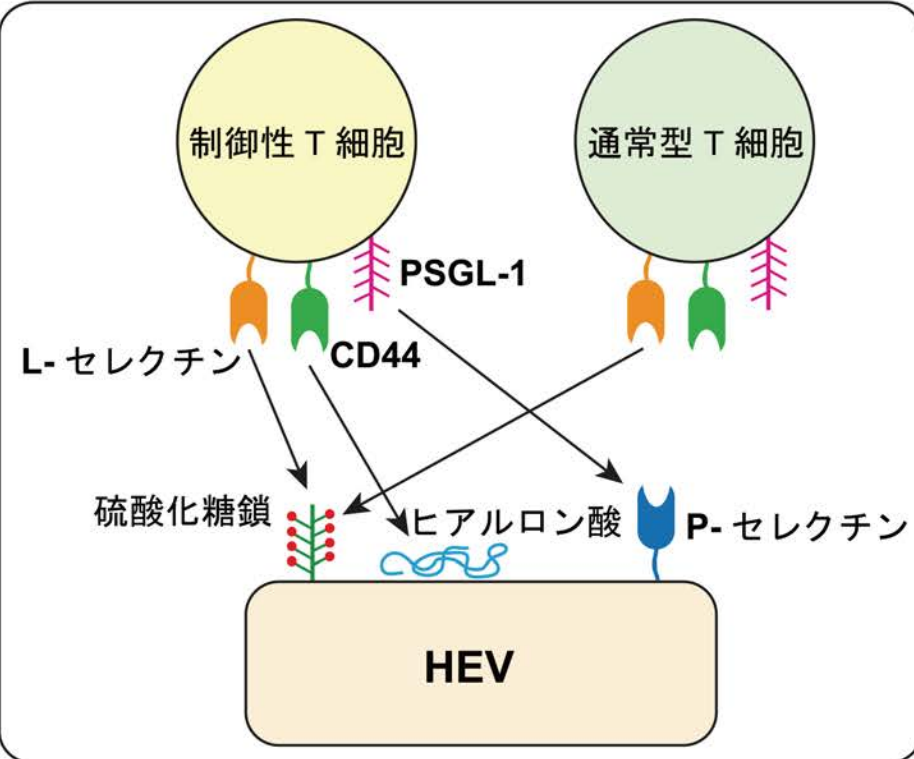
Bar, 50 μ m

Tconv およびTreg 細胞 におけるCD44の発現



野生型マウス

硫酸基転移酵素欠損マウス



アレルゲン
経鼻投与 ↓

アレルゲン
経鼻投与 ↓

アレルギー性鼻炎
IL-4
IgE
くしゃみ

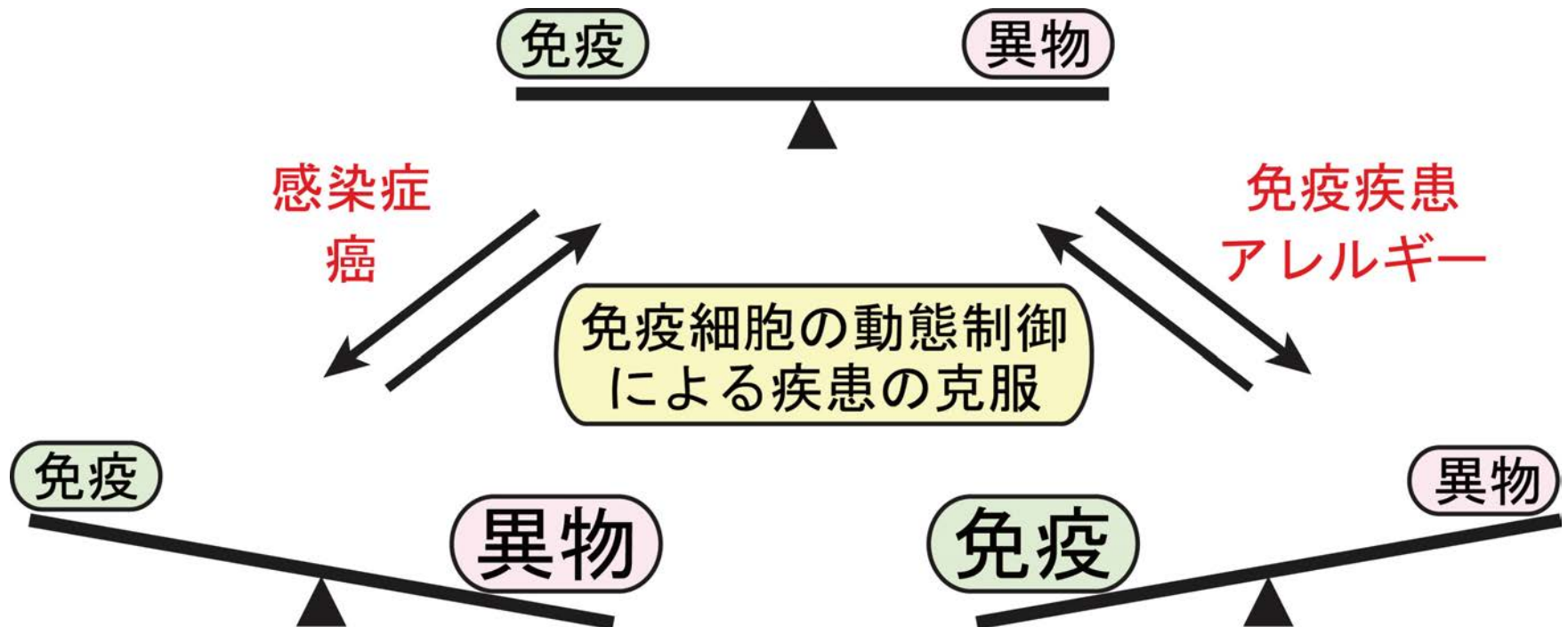
免疫抑制
IL-10
IgE ↓
くしゃみ ↓

まとめ (2)

1. 粘膜系リンパ組織NALTのHEVは、MECA-79抗体反応性の硫酸化糖鎖抗原を発現する。
2. 通常型リンパ球と制御性T細胞では、異なるリガンド-レセプターペアを利用してNALTへのホーミングする。
3. 通常型リンパ球のホーミングに主要な働きをする硫酸化糖鎖の欠損により、NALTに制御性T細胞が蓄積し、花粉症様症状が軽減する。

→ 硫酸化糖鎖が、アレルギー疾患の治療標的となることが明らかとなった。

免疫細胞の動態制御による疾患の克服



免疫細胞の動態制御による疾患の克服

- 新規抗糖鎖抗体を用いた制御性T細胞(T_{reg})特異的動態制御法の確立
 - 動物モデルにおける疾患治療効果の検証
 - (i) 免疫疾患・アレルギー
 - … T_{reg} の動員を誘導
 - (ii) 癌… T_{reg} の動員を阻害
- 免疫細胞サブセット特異的な動態制御による疾患治療法の確立へ

