

「T 細胞の活性化に伴うプロヒビチンの細胞表面への誘導と、
Siglec-9 との相互作用による T 細胞受容体を介したシグナル伝達の抑制」

2013

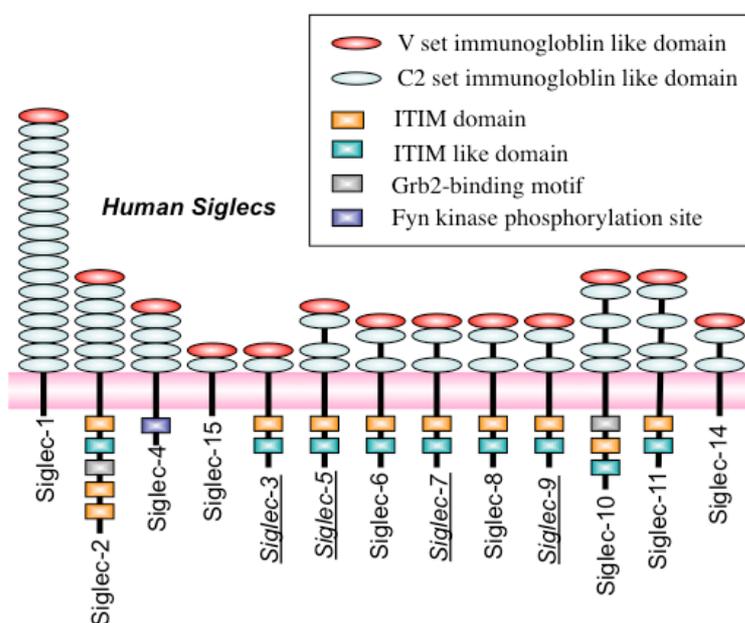
万木 肇

目次

1 : 序論	1
2 : 材料と方法	4
2-1 : 動物及び細胞	
2-2 : T 細胞の活性化	
2-3 : 可溶性組換え Siglec-9 の調製	
2-4 : FACS による解析	
2-5 : Siglec-9 結合タンパク質の同定	
2-6 : 免疫化学的手法による Siglec 結合タンパク質の同定	
2-7 : 活性化 T 細胞における PHBs の分布の検討	
2-8 : PHB1 及び PHB2 のゲル濾過	
2-9 : Jurkat 細胞表面における PHB1、PHB2、及び CD3 の検出	
2-10 : Molt-3 細胞表面タンパク質の過ヨウ素酸処理	
2-11 : Siglec-9 の PHBs への結合	
2-12 : 抗原提示ビーズの調製	
2-13 : 抗原提示ビーズによる Jurkat 細胞及び活性化 T 細胞の処理	
2-14 : Jurkat 細胞への siRNA の導入	
2-15 : サイトカインの測定	
2-16 : 有意差検定	
3 : 結果	10
3-1 : T 細胞表面における Siglec-9 結合タンパク質の検索	
3-2 : T 細胞の活性化に伴う PHBs の発現誘導	
3-3 : Jurkat 細胞表面における PHB1 及び PHB2 の発現と分布	
3-4 : 抗 PHB1 及び PHB2 抗体による TCR シグナル伝達の抑制	
3-5 : Siglec-9 と PHBs の相互作用による TCR シグナル伝達の抑制	
3-6 : Siglec-9 による TCR シグナル伝達の抑制に対する PHB1 ノックダウンの影響	
3-7 : ヒト末梢血 T 細胞における TCR シグナル伝達への Siglec-9 の影響	
4 : 考察	28
5 : 謝辞	32
6 : 引用文献	33

1 : 序論

T 細胞と抗原提示細胞との相互作用は免疫応答において最も重要なステップの 1 つであり、様々なアクセサリー分子の相互作用により免疫応答のレベルが制御されている。T 細胞への糖鎖認識分子であるレクチンの結合は細胞増殖、サイトカイン産生、細胞死の調節といった T 細胞の機能の調節に関与している [1-3]。しかしながら、抗原提示時に抗原提示細胞上のレクチンが T 細胞上の糖鎖と結合する可能性は十分に予想されるが、明らかにされた例はない。シグレックファミリー (Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins; Siglecs) はシアル酸認識レクチンであり、造血細胞や様々な免疫細胞上に発現しており、リガンドと結合することにより細胞内情報伝達を制御している [4-6]。



Siglecs の模式図

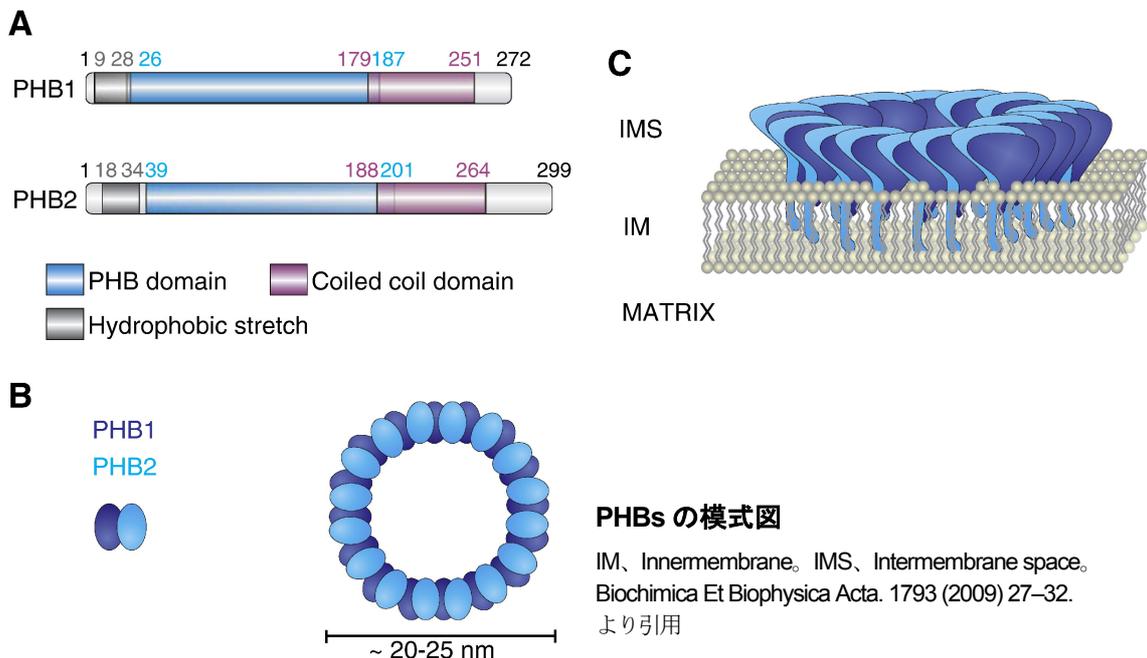
Nature Reviews. Immunology. 7 (2007) 255-66. より引用

ヒト Siglecs は、上図に示したように複数の遺伝子が同定されており、内在性のシス及びトランスリガンド、あるいは病原体上のシアル酸修飾されたタンパク質を認識する [7-9]。Siglec-3 (CD33)、-5、-7、-9 は抗原提示細胞の 1 つである樹状細胞に発現するレクチンであり [10]、それぞれ特徴的な糖鎖認識特異性を持つ。例えば、Siglec-3 は $\alpha 2,3$ 、 $\alpha 2,6$ 、及び $\alpha 2,8$ 結合型のシアル酸残基を認識し、Siglec-5 は $\alpha 2,3$ 結合型のシアル酸残基を、Siglec-7 は $\alpha 2,6$ 及び $\alpha 2,8$ 結合型のシアル酸残基を認識する。Siglec-9 は $\alpha 2,3$ 及び $\alpha 2,6$ 結合型のシアル酸残基を認識するが、特に $\alpha 2,3$ 結合型のシアル酸残基に強く結合する [11]。T 細胞上には Siglecs はほとんど発現していないことから、T 細胞上のシアル酸修飾されたタンパク質は異なる細胞上に発現した Siglecs に結合する可能性が高い。上図に示すように、Siglecs の多くは細胞内に抑制性のシグナルモチーフである Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) または ITIM 様モチーフを有し、Siglecs の生物学的な機能に関する研究は主にシスリガンドの結合に伴う抑制性の細胞内情報伝達について行われてきた [4-6, 10]。また、一部の研

究は Siglecs による細胞間相互作用について行われてきたが、カウンターレセプター等のトランスリガンドの研究は十分に行われているとは言えない [12-14]。Siglec-2 (CD22) はシスリガンドと結合し、B 細胞のシグナル伝達を抑制するのみならず、トランスリガンドに結合することで細胞間の相互作用を仲介する Siglec であることが知られている [15, 16]。例えば、Siglec-2 の T 細胞上のトランスリガンドとの結合は T 細胞の活性化に影響を与える [17, 18]。Lanoue らは、癌細胞表面の抗原により B 細胞受容体を介して B 細胞が刺激される際、その癌細胞上に Siglec-2 のリガンドが存在すると B 細胞の活性化が抑制されることを明らかにした [19]。また、Siglec-1 はマクロファージ上に発現しており、シアル酸修飾されたリガンドとの相互作用を介して制御性 T 細胞の増殖を抑制する [20]。これらの知見より、樹状細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞に発現している Siglecs は発現細胞の活性を抑制するだけでなく、抗原提示時において、T 細胞上のトランスリガンドと結合することにより T 細胞の活性を調節する可能性がある。

樹状細胞は骨髄前駆細胞から分化する白血球の 1 つで、免疫応答において重要な役割を担う。その主な機能として死細胞や外来性の抗原の取り込み、T 細胞への抗原提示、サイトカインの産生が挙げられる [21]。未熟樹状細胞は抗原の取り込みを主たる機能とし、CD40 や炎症性サイトカイン、バクテリア由来抗原等の刺激で成熟する。成熟した樹状細胞は抗原提示を主たる機能とし、サイトカイン、ケモカイン、T 細胞共刺激分子やプロテアーゼを発現することにより、免疫応答を開始する [22-24]。抗原提示細胞による未感作 T 細胞の活性化は、T 細胞を介した免疫応答の調節において特に重要である。活性化した未感作 T 細胞は null ヘルパー T 細胞 (Th0) へと分化し、Th1 細胞もしくは Th2 細胞へと分化する。Th1 細胞は IL-2、IFN- γ および IL-12 などのサイトカインを産生し、ウイルスや細胞内の病原菌、腫瘍細胞等に対して細胞性免疫を誘導する。Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-6 等のサイトカインを産生し、異物に対しての抗体産生を誘導する体液性免疫を誘導する。Th0 細胞からの Th1、Th2 細胞への分化にはマクロファージや樹状細胞から産生される IL-10 (Th2) や IL-12 (Th1) が関与している [25]。

本研究では可溶性 Siglec-9 が T 細胞悪性リンパ腫細胞表面に発現する PHBs に結合することを明らかにした。PHBs は種間で高度に保存された stomatin/prohibitin/flotillin/Hflk/c (SPFH or PHB) ドメインを有する分子で、主にミトコンドリア内膜に分布している [26]。ミトコンドリア内膜において、PHB1 と PHB2 は互いに会合しヘテロ二量体となることが報告されており、さらにその二量体が 16-20 個会合し、リング状の複合体を形成することが報告されている [27]。



また、PHBs はミトコンドリア以外の領域にも存在し、多様な機能を有している [28-30]。乳癌細胞株において、核に分布する PHB1 は転写因子である E2F1、pRb、及び p53 と共局在しており、E2F1 あるいは p53 に制御される転写活性を調節している [31, 32]。PHB2 はエストロゲン受容体と結合し、この受容体の核への移行を阻害することでエストロゲンの作用を調節している [33]。腸管上皮細胞や脂肪細胞の細胞表面には PHBs が発現していることが報告されており、*Salmonella typhi* 上の Vi polysaccharide は腸管上皮細胞上の PHBs と相互作用し、炎症反応を抑制する [34, 35]。また、マウスにおける PHBs のノックアウトは胎生致死を引き起こすことから、マウスの胚形成期においても重要な役割を担っていると考えられている [36, 37]。さらに、Rajalingam らにより上皮性癌細胞において PHB1 が Ras と c-Raf の相互作用に関与し、ERK のリン酸化を伴う下流のシグナル伝達に必須であることが報告されている [38]。

本研究において、以下の知見を得た。PHBs が活性化 T 細胞の細胞表面に誘導された。Jurkat 細胞表面において、PHBs が T 細胞受容体を構成する分子の 1 つである CD3 と共局在することを示した。Jurkat 細胞及びヒト末梢血 T 細胞において、抗 CD3 抗体によるシグナル伝達は抗 PHBs 抗体存在下で抑制され、さらに、抗体と同様の効果が PHBs に結合する Siglec-9 でも認められた。その結果、Jurkat 細胞、ヒト末梢血 T 細胞においてそれぞれ IL-2、IFN- γ の産生が著しく低下した。Siglec-9 と PHBs の相互作用は、免疫応答の新たな抑制機構の 1 つと考えられ、免疫疾患への応用も視野に入れ、詳細についてはさらに検討中である。

2 : 材料と方法

2-1 : 動物及び細胞

Balb/c マウス (5-7 週齢, ♀) は清水実験材料より購入し SPF 環境で飼育した。CHO-KI 細胞は ATCC より購入し、2% 血清、50 IU/ml penicillin、及び 50 µg/ml streptomycin を含む OPTI-MEM で培養した。T 細胞系悪性リンパ腫細胞株 Molt-3、Molt-4、CCRF-CEM、及び Jurkat 細胞は ATCC より購入した。マウス T 細胞はマウス脾臓細胞から Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を用いて分離した。マウス CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞はマウス T 細胞よりそれぞれ anti-CD4 antibody-及び CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて調製した。ヒト T 細胞はヒト末梢血単核球から CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec) あるいは Pan T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec) を用いて調製した。それぞれの T 細胞は 10% 非働化血清 (Cell Culture Bioscience)、2 mM L-glutamine、50 IU/ml penicillin、及び 50 µg/ml streptomycin を含む RPMI-1640 培地で培養した。なお、本研究の動物実験に関しては、京都産業大学動物実験規定に基づき動物実験委員会により承認されたものである。

2-2 : T 細胞の活性化

マウス及びヒト T 細胞 (1.5×10^6 個) は 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 及び 500 ng/ml イオノマイシンを用いて活性化した。また、マウス T 細胞は抗 CD3 抗体 (BioLegend, clone 145-2C11) を固相化した 6 well plate 上で、100 U/ml マウス IL-2 (CST) 及び 5 µg/ml 抗 CD28 抗体 (BioLegend, clone 37.51) 存在下で培養し活性化した。ヒト T 細胞の細胞表面に PHBs を誘導する目的で、抗 CD3/CD28 抗体固相化プレート (いずれも 10 µg/ml) 上で 40 時間培養した後、細胞を回収し、培地中でさらに 5 時間培養し、活性化 T 細胞とした。

2-3 : 可溶性組換え Siglec-9 の調製

全長の Siglec-9 遺伝子をコードする cDNA (GenBank Accession No. 14441) はヒト悪性リンパ腫細胞株である U937 細胞の mRNA より下記プライマーを用いた RT-PCR により調製した。

プライマー 1 ; 5'-CTGTGTGCTTTTCACTCT-3'

プライマー 2 ; 5'-GAGAAGAACCCTGAGGAA-3'

全長 Siglec-9 cDNA は pUC18 ベクターに導入した (pUC18-fSiglec-9)。

Siglec-9 の細胞外領域をコードする遺伝子は pUC18-fSiglec-9 を元にして下記プライマーを用いて調製した。

プライマー 3 ; 5'-AGGAGATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCCCTGCT-3'

プライマー 4 ; 5'-AGGGTACCCTGAGTCACTCCTGATGTGGCTTTGC-3'

Siglec-9 の細胞外領域をコードする cDNA は KpnI 及び BglIII により切断し、同じく KpnI 及び BglIII で切断した p3xFLAG CMV14 vector (SIGMA) に導入した (pFLAG-sSiglec-9)。得られたベクターを FuGENE 6 transfection reagent (Roche) を用いて CHO-KI 細胞に導入し安定発現株を調製した。FLAG タグ付可溶性 Siglec-9 (WT-hsSiglec-9-FLAG) は WT-hsSiglec-9-FLAG 安定発現株の培養上清より、抗 FLAG 抗体結合アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって調製した。Arg¹²⁰ を Ala に置換した変異型 Siglec-9 (RA-hsSiglec-9-FLAG) 及び V-set 領域を欠く欠損型 Siglec-9 (Δ V-hsSiglec-9-FLAG) の発現ベクターは pFLAG-sSiglec-9 を鋳型にし、下記プライマーを用いて PCR を行い、生成物を T4 DNA リガーゼにより繋ぎ合わせることで調製した。

(RA-hsSiglec-9-FLAG)

プライマー 5 ; 5'-GCT ATG GAG AAA GGA AGT ATA AAA TGG-3'

プライマー 6 ; 5'-AAA GAA GTA TCT CCC CGC ATC AC-3'

(Δ V-hsSiglec-9-FLAG)

プライマー 7 ; 5'-TTG ACC CAC AGG CCC AAC-3'

プライマー 8 ; 5'-TGT CTG TCC TTC CGC CCT C-3'

得られた発現ベクターを Fugene HD transfection reagents (Promega) を用いて CHO-KI に形質導入した。形質導入後の CHO-KI 細胞を 2 日間培養し、培養上清を回収した。得られた培養上清に抗 FLAG 抗体結合アガロースを加え、一晚攪拌した後、PBS で洗浄し、組換え Siglec-9 結合アガロース (WT-、RA-、及び Δ V-hsSiglec-9-agarose) を調製した。

2-4 : FACS による解析

T 細胞株の細胞表面への Siglec-9 の結合を WT-hsSiglec-9-FLAG 及び FITC 標識抗 FLAG 抗体を用いて、フローサイトメーターにより検出した。

2-5 : Siglec-9 結合タンパク質の同定

T 細胞系悪性リンパ腫細胞株の細胞表面タンパク質を EZ-Link sulfo-NHS biotin (Thermo Scientific) を用いて標識した。標識後の細胞から細胞溶解緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM

NaCl、1% Triton-X100、2 mM EDTA、及び 1% protease inhibitor cocktail (nacalai tesque) を用いて細胞抽出液を調製した。細胞抽出液に WT-hsSiglec-9-FLAG 結合アガロース (WT-hsSiglec-9-agarose) を加え一晩攪拌した。攪拌後の担体を細胞溶解緩衝液で洗浄し、結合したタンパク質を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行った。転写した PVDF 膜を 5% BSA 含有 PBS でブロッキングし、streptavidin-HRP (Invitrogen) を用いてビオチン化タンパク質を検出した。膜上のバンドは LAS4000 (GE Healthcare) を用いて可視化した。WT-hsSiglec-9-agarose を充填したアフィニティーカラムに Molt-3 細胞抽出液を通し、Siglec-9 結合タンパク質を溶出した。溶出画分を濃縮し、SDS-PAGE 後、銀染色を行った。Siglec-9 結合タンパク質を含んだバンドをゲルから切り出し、トリプシン消化後 AXIMA Performance (Simadzu Biotech) により質量分析を行った。

2-6 : 免疫化学的手法による Siglec 結合タンパク質の同定

Jurkat 細胞及び Molt-3 細胞から調製した細胞抽出液に WT-hsSiglec-9-agarose を加え、一晩攪拌した。担体を細胞溶解緩衝液で洗浄後、結合したタンパク質を溶出し、SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行った。ブロッキング後の PVDF 膜をマウス抗 PHB1 抗体 (Neo Markers、clone II-14-10) 及びウサギ抗 PHB2 抗体 (BETHYL) で処理し、それぞれのタンパク質を HRP 標識抗マウス抗体、HRP 標識抗ウサギ抗体を用いて検出した。バンドは前述の方法により可視化した。他の Siglec と PHBs との結合を検討する目的で、同様の実験を Fc タグ付 Siglec-3、-5、及び -7 結合 magnetic beads (Siglec-3、-5、-7-beads) を用いて行った。

2-7 : 活性化 T 細胞における PHBs の分布の検討

一部の活性化及び未刺激 T 細胞を、細胞溶解緩衝液を用いて溶解し、細胞抽出液を調製した。また、刺激後各時間に回収した細胞の抽出液を調製し、SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングを行った。一方の活性化及び未刺激 T 細胞の細胞表面タンパク質を EZ-Link sulfo-NHS biotin を用いて標識した。標識後の細胞の細胞抽出液に streptavidin-Sepharose (GE Healthcare) を加え一晩攪拌した。担体を細胞溶解緩衝液で洗浄し、結合したタンパク質について SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行った。ブロッキング後の PVDF 膜をマウス抗 PHB1 抗体 (Neo Markers、clone II-14-10) 及びウサギ抗 PHB2 抗体 (BETHYL) で処理し、それぞれのタンパク質を HRP 標識抗マウス抗体、HRP 標識抗ウサギ抗体を用いて検出した。バンドは前述の方法により可視化した。さらに、マウス抗 β -actin 抗体 (SIGMA)、ヤギ抗 Lamin B 抗体 (Santa cruz)、及びウサギ抗 Voltage-dependent anion channel (VDAC) 抗体 (CST) を用いて、PVDF 膜上のそれぞれのタンパク質を検出した。

2-8 : PHB1 及び PHB2 のゲル濾過

マウス脾臓より調製した T 細胞を PMA/イオノマイシンで活性化後、細胞表面分子をビオチンにより標識した。細胞の抽出液を Sephadex G-75 (1 x 42 cm、GE Healthcare) を用いたゲル濾過により分画した。試料は溶出緩衝液 (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1% TritonX-100、及び 2 mM EDTA) を用いて溶出し、1 フラクションあたり 0.65ml の容量で 80 フラクションを回収した。溶出液の一部を Zeta-probe 膜へ Dot blot し、ビオチン化タンパク質 (細胞表面タンパク質) を検出した。また、各フラクションに含まれるビオチン化タンパク質を streptavidin-Sepharose を用いて沈降し、SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングを行い、PHB1 及び PHB2 を前述の方法により検出した。

2-9 : Jurkat 細胞表面における PHB1、PHB2、及び CD3 の検出

Jurkat 細胞懸濁液 (5×10^5 個) に $5 \mu\text{g/ml}$ マウス抗ヒト CD3 抗体 (Millipore、clone UCHT1) 及び $2.5 \mu\text{g/ml}$ ウサギ抗 PHB1 抗体 (ABGEBT)、あるいは $5 \mu\text{g/ml}$ マウス抗ヒト CD3 抗体及び $2.5 \mu\text{g/ml}$ ウサギ抗 PHB2 抗体 (BETHYL) を加え、 4°C で 1 時間攪拌した。細胞を PBS で洗浄した後に Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) 及び Alexa Fluor 594 標識抗ウサギ IgG 抗体を加え二次抗体反応を行った。Jurkat 細胞懸濁液 (5×10^5 個) に $5 \mu\text{g/ml}$ マウス抗ヒト CD3 抗体 (Millipore、clone UCHT1) 及び $5 \mu\text{g/ml}$ PHB1 結合ビオチン化ペプチド (CKGGRAKDC) を加え、 4°C で 1 時間攪拌した。細胞を PBS で洗浄した後に Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) 及び Alexa Fluor 594 標識 streptavidin を加え、 4°C で 1 時間攪拌した。 4% paraformaldehyde により細胞を固定後、核を DAPI で染色し、Prolong Gold Antifade Reagent (Invitrogen) を用いてスライドガラス上に封入した。

2-10 : Molt-3 細胞表面タンパク質の過ヨウ素酸処理

Molt-3 細胞の細胞表面に存在するシアル酸残基を開裂する目的で、 2 mM NaIO_4 を含む PBS 中で 0°C 、30 分間細胞を処理した。

2-11 : Siglec-9 の PHBs への結合

Molt-3 細胞抽出液に WT-hsSiglec-9-agarose、RA-hsSiglec-9-agarose、あるいは ΔV -hsSiglec-9-agarose を加え、 4°C で一晩攪拌した。コントロール実験は抗 FLAG 抗体結合アガロースを用いて行った。PHBs は前述した方法で検出し、また、Siglec-9 は HRP 標識抗 FLAG 抗体を用いて検出した。

2-12 : 抗原提示ビーズの調製

抗 CD3 抗体結合ビーズはプロテイン A 結合 magnetic beads (Millipore) と抗 CD3 抗体を 4°C で 3 時間インキュベートすることにより調製した。Siglec-9 結合ビーズ、抗 PHBs 抗体結合ビーズはそれぞれプロテイン A 結合 magnetic beads と Fc タグ付 Siglec-9 (R&D)、抗 PHB1 抗体 (ABGENT)、あるいは抗 PHB2 抗体 (BETHYL) を 4°C で 3 時間インキュベートすることにより調製した。Siglec-9 と抗 CD3 抗体が共に結合したビーズ (Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ) はプロテイン A 結合 magnetic beads、Fc タグ付 Siglec-9、及び抗 CD3 抗体を共に 4°C で 3 時間インキュベートすることにより調製した。抗 PHBs 抗体と抗 CD3 抗体が共に結合したビーズ (抗 PHBs-CD3 抗体ビーズ) は抗 PHB1 抗体あるいは抗 PHB2 抗体と抗 CD3 抗体を共に 4°C で 3 時間インキュベートすることにより調製した。

2-13 : 抗原提示細胞ビーズによる Jurkat 細胞及び活性化 T 細胞の処理

Jurkat 細胞 (5×10^4 個) を抗 CD3 抗体結合ビーズで刺激し、TCR シグナル伝達を誘導した。以下の 3 通りの方法で、TCR シグナル伝達に対する抗 PHBs 抗体の影響を検討した。(1) 抗 PHB1-CD3 抗体結合ビーズあるいは抗 PHB2-CD3 抗体結合ビーズ、(2) 抗 PHB1 抗体結合ビーズあるいは抗 PHB2 抗体結合ビーズと抗 CD3 抗体結合ビーズ、(3) 抗 CD3 抗体結合ビーズと可溶性抗 PHB1 抗体あるいは抗 PHB2 抗体により Jurkat 細胞を処理した。10 分後、細胞を回収し、細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行った。PVDF 膜に転写されたリン酸化 ERK1/2 及び ERK1/2 はそれぞれマウス抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (CST) 及びウサギ抗 ERK1/2 抗体 (CST) を用いて検出した。マウス抗体、ウサギ抗体の二次抗体として、それぞれ、HRP 標識抗マウス IgG 抗体、HRP 標識抗ウサギ抗体 (共に Invitrogen) を用いた。バンドの濃さは Image J software により数値化した。TCR シグナル伝達に対する Siglec-9 の影響について、以下の 3 通りの方法で検討した。(1) Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ、(2) Siglec-9 結合ビーズ及び抗 CD3 抗体結合ビーズ、あるいは (3) 可溶性 Siglec-9 及び抗 CD3 抗体結合ビーズ存在下で細胞を処理した。3-60 分後、細胞を回収し、細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行った。前述の方法によりリン酸化 ERK1/2 及び ERK1/2 を検出した。同様に、リン酸化 c-Raf 及び c-Raf はそれぞれウサギ抗リン酸化 c-Raf 抗体 (CST) 及びマウス抗 c-Raf 抗体 (BD) を用いて検出した。

未刺激 T 細胞及び活性化 T 細胞 (各 1×10^5 個) を抗 CD3 抗体結合ビーズで刺激し、TCR シグナル伝達を誘導した。Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて、TCR シグナル伝達への Siglec-9 の影響について検討した。調製した 2 種の細胞をこれらのビーズで処理し、30 分後に細胞を回収し、細胞抽出液を SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行った。前述の方法によりリン酸化 ERK1/2 及び ERK1/2 を検出した。

2-14 : Jurkat 細胞への siRNA の導入

添付文書に従って、6 穴細胞培養プレートで培養した Jurkat 細胞 (2×10^5 個) に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて以下の siRNA を形質導入した。

(Luciferase、コントロール)

配列1 ; 5'-AACUUACGCUGAGUACUUCGA-3'

配列2 ; 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUU-3'

(PHB1)

配列3 ; 5'-CUUCAGAUCUCUAAUUAGU-3'

配列4 ; 5'-ACUAAUUAGAGAUCUGAAG-3'

配列5 ; 5'-GAGCACAGGUGUCUGCCUA-3'

配列6 ; 5'-UAGGCAGACACCUGUGCUC-3'

配列7 ; 5'-CAGGUGAGCGACGACCUUA-3'

配列8 ; 5'-UAAGGUCGUCGCUCACCUG-3'

2-15 : サイトカインの測定

Jurkat 細胞により産生された IL-2 を Human IL-2 ELISA Kit (eBioscience) を用いて添付文書に従い測定した。IFN- γ を産生する活性化 T 細胞数を Human IFN- γ ELISPOT Kit (eBioscience) を用いて以下の通り測定した。抗 IFN- γ 抗体を固相化した ELISPOT プレート (Millipore) 上で抗 CD3 抗体結合ビーズあるいは Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ存在下で活性化 T 細胞を培養した。48 時間後、細胞及びビーズを除いたプレートにビオチン化抗 IFN- γ 抗体、streptavidin-HRP を順次加え、3-amino-9-ethyl carbazole により発色した。検出したスポット数を解剖顕微鏡下で計測した。

2-16 : 有意差検定

Student's t test によりデータの有意性を検討し、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

3 : 結果

3-1 : T 細胞表面における Siglec-9 結合タンパク質の検索

T 細胞悪性リンパ腫細胞株を用いて、細胞表面における Siglecs 結合タンパク質を検索した。Siglec-9 は抗原提示細胞である樹状細胞やマクロファージに発現しており、抗原提示時に T 細胞上のトランスリガンドと Siglec-9 の相互作用を想定した [10]。Siglec-9 の細胞外領域のみを有する可溶型の FLAG タグ付 Siglec-9 を用いて、T 細胞株 (Molt-3、Molt-4、CCRF-CEM 及び Jurkat 細胞) の細胞表面への Siglec-9 の結合を FACS により検討した。その結果、今回用いた全ての T 細胞株において、Siglec-9 の結合が認められた (図 1A)。Siglec-9 結合タンパク質を同定する目的で、用いた細胞株の細胞表面タンパク質をビオチン化し、細胞抽出液を調製した。各細胞の抽出液に可溶型 Siglec-9 を加え、Siglec-9 結合タンパク質を沈降した。沈降物を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、膜上のビオチン化タンパク質を検出したところ、全ての細胞株において分子量約 28 kDa、31 kDa の 2 本のバンドが認められた (図 1B)。すなわち、細胞表面に存在するこの両タンパク質が Siglec-9 に結合することが分かった。これらのバンド以外には、細胞間で共通の Siglec-9 結合タンパク質は認められなかった。また、抗 FLAG 抗体結合アガロースを用いたコントロール実験では 2 本のバンドは認められなかった。

これらの Siglec-9 結合タンパク質を同定する目的で、Molt-3 細胞抽出液を WT-hsSiglec-9-agarose を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い、溶出されたタンパク質を SDS-PAGE 後、銀染色を行った (図 2A)。前述の 2 本のバンドを切り出し、トリプシン消化により得たペプチド断片を質量分析した結果、図 2B に示すように、解析されたアミノ酸配列 (赤字) はそれぞれ PHB1、PHB2 の部分配列と一致した。さらに、Molt-3 及び Jurkat 細胞抽出液より調製した Siglec-9 結合タンパク質を試料とし、SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行い、転写されたタンパク質を抗 PHB1、PHB2 抗体で確認したところ、図 2A で見られた分子量約 28 kDa と 31 kDa の位置にそれぞれのバンドが認められたことから、Siglec-9 と結合した 2 つのタンパク質は、PHB1、PHB2 であることが免疫化学的にも確認された (図 2C)。

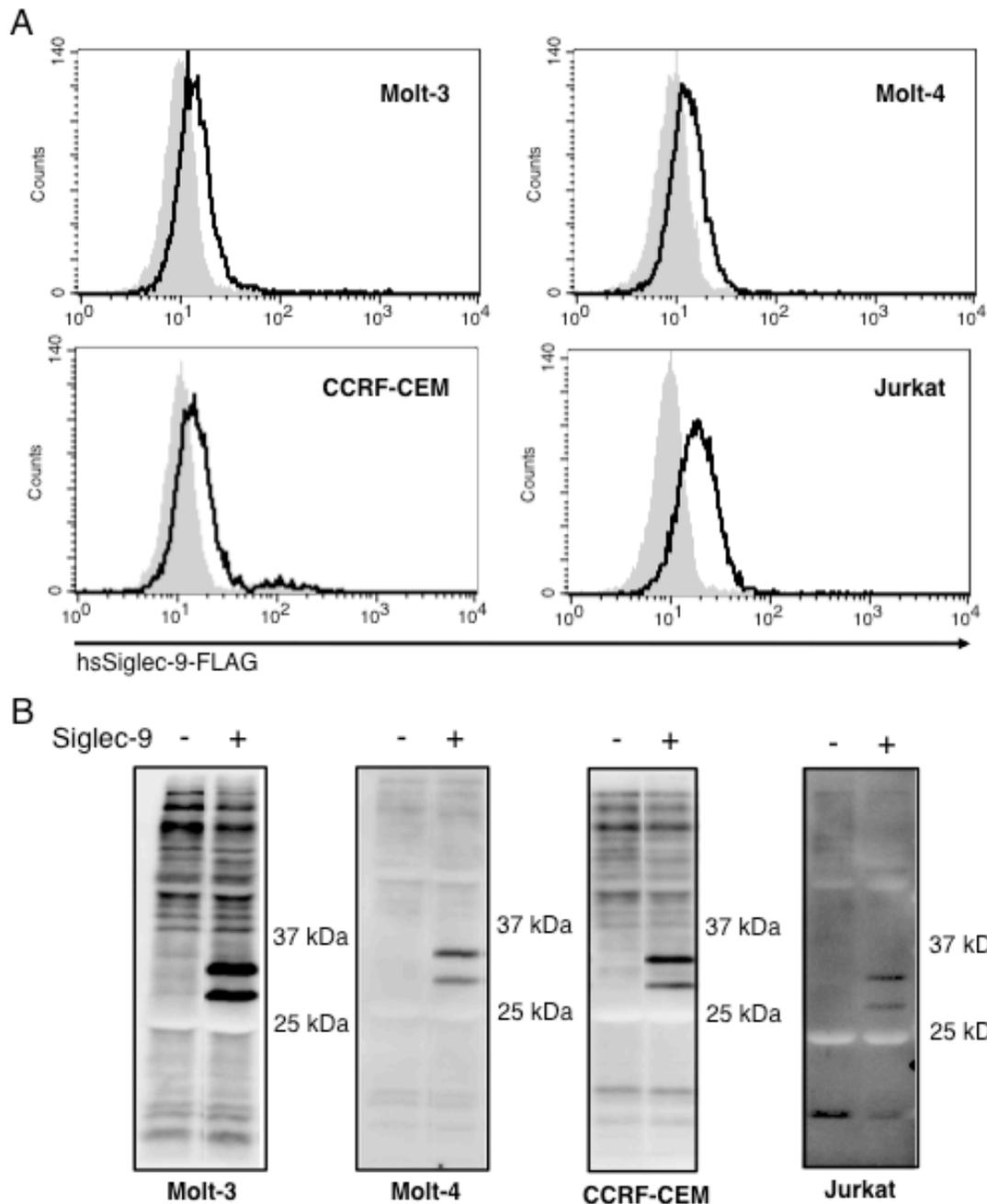


図 1： T 細胞株における Siglec-9 結合タンパク質の検索

(A) T 細胞株 (Molt-3、Molt-4、CCRF-CEM 及び Jurkat 細胞、各 5×10^5 個) の懸濁液に WT-hsSiglec-9-FLAG を加え、攪拌後、FITC 標識抗 FLAG 抗体を用いて検出した (実線)。コントロール実験として二次抗体のみを用いた (filled histograms)。(B) 細胞表面タンパク質をビオチン化した T 細胞株から調製した細胞抽出液に、WT-hsSiglec-9-agarose (Siglec-9: +) 及び anti-FLAG-agarose (Siglec-9: -) を加え、インキュベート後、結合タンパク質を SDS-PAGE し、ウェスタンブロッティング後、ビオチン化されたタンパク質を検出した。

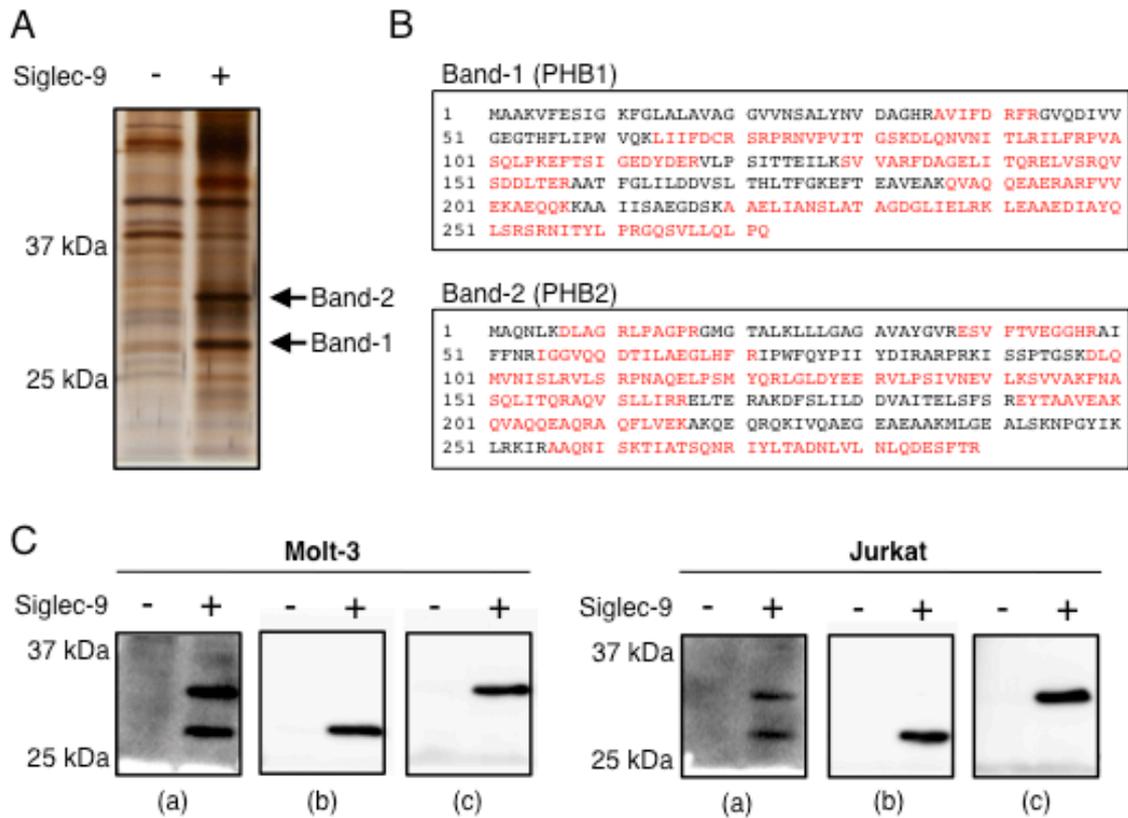


図 2: Siglec-9 結合タンパク質の同定

(A) Molt-3 細胞抽出液より、WT-Siglec-9-agarose に結合するタンパク質を電気泳動し、銀染色を行った。Band-1 及び Band-2 と示した部分を切り出し、トリプシン消化後、MALDI-TOF mass spectrometer により解析した。(B) 得られたペプチド断片の配列 (赤字) はそれぞれ PHB1、PHB2 中のペプチド配列と一致した。(C) 細胞表面タンパク質をビオチン標識した Molt-3、Jurkat 細胞より細胞抽出液を調製し、WT-hsSiglec-9-agarose を加え、結合したタンパク質を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行った。ビオチンの検出 (a)、抗 PHB1 抗体による検出 (b)、及び抗 PHB2 抗体を用いた検出 (c) を行った。

樹状細胞やマクロファージには Siglec-9 以外にもいくつかの Siglec が発現していることから、他の Siglec についても PHBs との結合を検討した。可溶性 Siglec-3、-5、-7 を Molt-3 細胞抽出液に加え、沈降物を同様に解析した。Siglec-3 による沈降物を解析した結果、Siglec-9 と同程度の PHBs が検出されたが、Siglec-5 及び Siglec-7 の沈降物においてはほとんど検出されなかった (図 3A)。本研究で検討した全ての Siglec は親和性の違いはあるものの、全て $\alpha 2,3$ あるいは $\alpha 2,6$ 結合型のシアル酸残基を認識する [39]。PHB1 は 2 つの N 型糖鎖結合部位であるトリプレット構造をもつことが報告されている [40]。PHBs と Siglec-9 の結合におけるシアル酸残基を含む糖鎖の関与を検討する目的で、過ヨウ素酸処理により Molt-3 細胞表面のシアル酸残基を開裂し、その細胞抽出液を用いて Siglec-9 結合タンパク質を検出した。図 3B に示すように、過ヨウ素酸処理後も PHBs は Siglec-9 への結合活性を保持していた。さらに、Molt-3 細胞抽出液を N-グリコナーゼ、O-グリコナーゼ で処理した後も PHBs

は Siglec-9 への結合活性を保持していた (データは示していない)。Siglec-9 のシアル酸への結合には、120 番目の Arg が必須であることから、Arg¹²⁰ を Ala に置換した変異型 Siglec-9 (RA)、Arg¹²⁰ を含む V-set 領域を欠いた欠損型 Siglec-9 (Δ V) を調製した (図 3C) [41]。WT-Siglec-9、RA-Siglec-9、 Δ V-Siglec-9 がそれぞれ結合した担体を Molt-3 細胞より調製した細胞抽出液に加えて、沈降物を同様に解析した。その結果、WT-Siglec-9 のみが PHBs に結合することが分かった (図 3D)。従来、Arg¹²⁰ の陽性荷電とシアル酸の陰性荷電の相互作用が両者の結合に必須とされることから、Arg 残基の陽性荷電と PHBs のペプチド鎖上の陰性荷電が両者の結合に関与していることが示唆された。

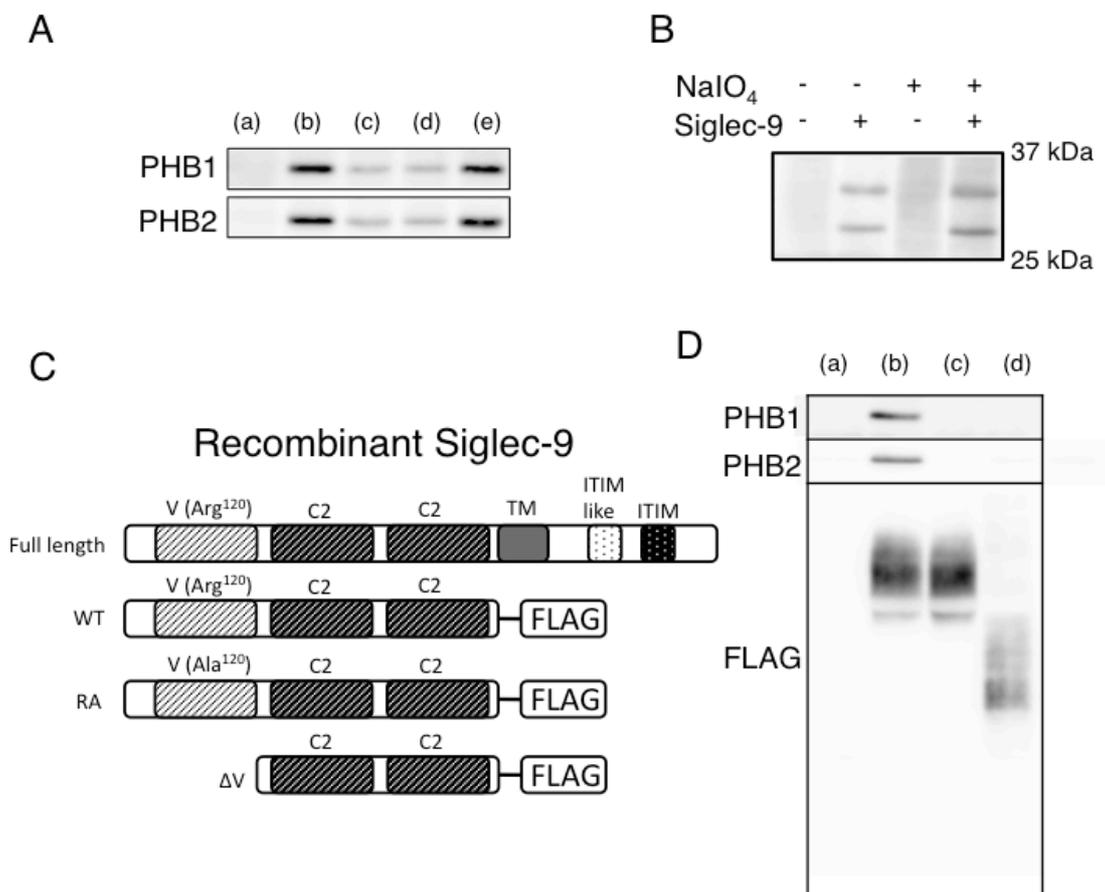


図 3: Siglec-9 と PHBs の相互作用の性質

(A) Molt-3 細胞抽出液に プロテイン A 結合 magnetic beads (a, コントロール)、Siglec-3-beads (b)、Siglec-5-beads (c)、Siglec-7-beads (d)、及び Siglec-9-beads (e) を加え、インキュベートした。結合したタンパク質を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、PHB1、PHB2 を検出した。(B) Molt-3 細胞を 0°C で 30 分間、過ヨウ素酸で処理後、細胞表面のタンパク質をビオチン化し、細胞抽出液を調製した。同様に Siglec-9 結合タンパク質を streptavidin-HRP を用いて検出した。(C) 調製した3種の組換え Siglec-9 の模式図を示した。(D) Molt-3 細胞抽出液中に anti-FLAG-agarose (a)、WT-hsSiglec-9-agarose (b)、RA-hsSiglec-9-agarose (c)、及び Δ V-hsSiglec-9-agarose (d)を加え、結合したタンパク質を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、PHB1、PHB2 及び各種 FLAG タグ付 Siglec-9 を検出した。

3-2 : T 細胞の活性化に伴う PHBs の発現誘導

上述したように、T 細胞株の細胞表面に PHBs が発現していることから、正常 T 細胞についても検討したが、細胞表面での PHBs の発現は認められなかった。次に、活性化 T 細胞の PHBs の発現について検討した。マウス脾臓より T 細胞を調製し、PMA 及びイオノマイシンにより活性化した。未刺激 (0 時間)、刺激後 24-72 時間の細胞を回収し、細胞抽出液を調製した。細胞抽出液を SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行い、PHB1 及び PHB2 を検出した。図 4A に示したように、マウス PHB1、PHB2 は刺激後 48 時間経過して、その発現量がそれぞれ 2、2.5 倍に増加した。同様に刺激した細胞について、細胞表面のタンパク質をビオチン標識した。前述した方法により細胞抽出液を調製し、streptavidin-Sepharose を用いて細胞表面タンパク質を分離し、SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行い、PHB1、PHB2 を検出した。細胞表面の PHB1、PHB2 の発現量は刺激後 48 時間で、それぞれ 66、28 倍に増加した (図 4A)。細胞表面における PHBs の発現の誘導が、T 細胞のサブクラスによって異なるかどうかを検討する目的で、マウス脾臓より CD4⁺、あるいは CD8⁺ T 細胞を調製し、前述の方法と同様にそれぞれの細胞全体及び細胞表面における PHBs の発現量の変化を検討した。その結果、いずれの T 細胞においても、細胞全体の PHBs の発現が亢進し、その中で細胞表面における PHBs の発現の亢進がより顕著に認められた (図 4B)。PMA 及びイオノマイシンを用いた T 細胞の活性化は生理的条件での活性化とは大きく異なるため、マウス脾臓より調製した T 細胞を抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、細胞全体及び細胞表面における PHBs の発現を検討した。その結果、より生理的条件に近い条件で活性化された T 細胞も PMA/イオノマイシンで刺激した T 細胞と同様に刺激後 48 時間で最も高い PHBs の発現が認められ、同様に細胞表面における発現の亢進が顕著であった (図 4C)。

次に、ビオチン化された PHBs がすべて細胞膜由来であることを確認する目的で以下の実験を行った。活性化 T 細胞表面をビオチンにより標識した後に、細胞の抽出液を調製し、streptavidin-Sepharose を用いてビオチン化されたタンパク質を沈降した。沈降したタンパク質を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、 β -actin、Lamin B、及び voltage-dependent anion channel (VDAC) を検出した。これらのタンパク質はそれぞれ、細胞骨格、核膜、ミトコンドリア外膜に存在するタンパク質であり、細胞表面には発現していない。図 4D に示すように、これらの細胞内のタンパク質は、ビオチンで標識されなかったことより、ビオチン化された PHBs はすべて細胞膜由来であることが確認された。すなわち、細胞膜のダメージ等により細胞内成分がビオチン標識されなかったことを意味する。

マウスの脾臓 T 細胞の活性化に伴い、細胞全体の PHB1、PHB2 のうちそれぞれ 20%、29% が細胞表面に誘導された。細胞表面における PHBs の発現の亢進は、新たに合成されるものに加えて、細胞内より移動したものも存在することが予想されるが、その機構は明確でない (図 4E)。ヒト末梢血より調製した T 細胞においても T 細胞の活性化に伴う PHBs の発現量の変化を検討した。PMA 及びイ

オノマイシンで刺激した結果、マウス T 細胞と同様に細胞全体での PHB1、PHB2 の発現がそれぞれ 5.4、2.3 倍に増加した。細胞表面における発現の変化はより顕著で、それぞれ 16、23 倍に増加した (図 5A、B)。従って、T 細胞の活性化に伴う PHBs の細胞表面への誘導はマウスとヒトに共通の現象であることが分かった。

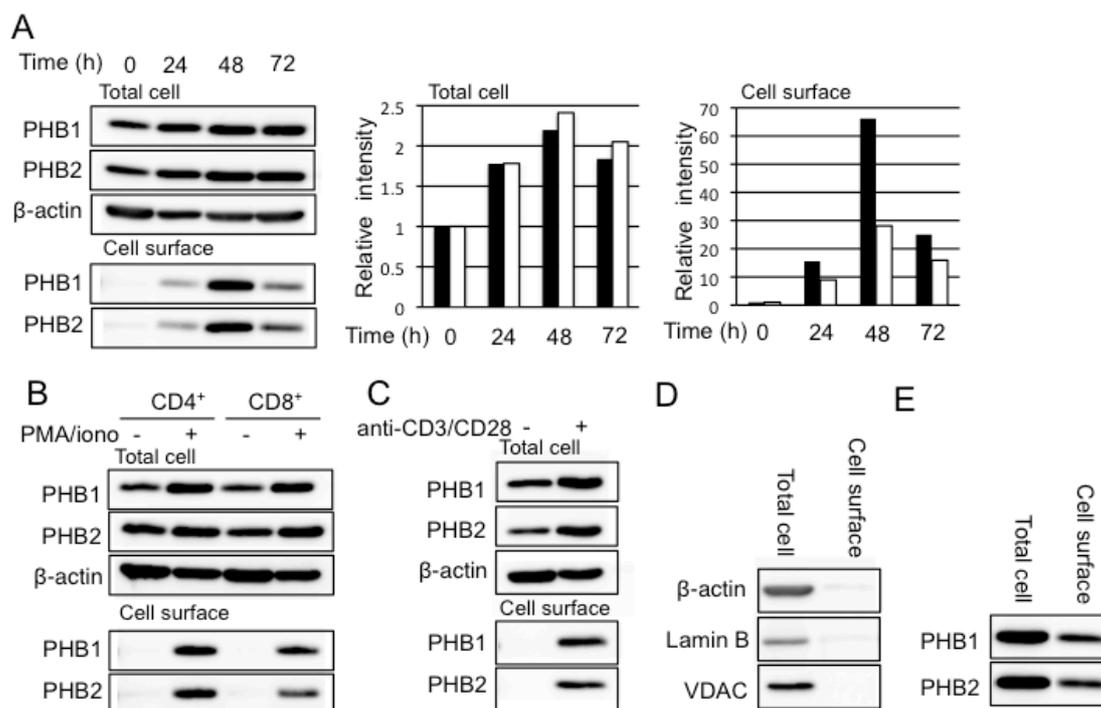


図4 マウス活性化 T 細胞における PHBs の分布

(A) マウス脾臓より調製した T 細胞を、PMA 及びイオノマイシンで刺激後 0-72 時間培養した。一定時間経過後、一部の細胞を細胞溶解緩衝液で溶解し、SDS-PAGE の試料とした。また、一部の細胞の細胞表面タンパク質をビオチン化し、streptavidin-Sepharose を用いて細胞表面のタンパク質を分離し、SDS-PAGE の試料とした。それぞれの試料を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、PHB1、PHB2 及び β -actin を検出した。棒グラフは未刺激細胞より調製した試料における PHB1 (■)、PHB2 (□) の発現を 1 とした時の、活性化 T 細胞より検出したこれらの分子の相対的発現量を示す。(B) マウス CD4⁺ 及び CD8⁺ T 細胞を調製し、PMA/イオノマイシンで刺激後 48 時間培養した。(A)と同様に刺激後の細胞における、細胞表面 (Cell surface)、細胞全体 (Total cell) での PHB1、及び PHB2 の発現を示した。(C) マウス脾臓より調製した T 細胞を IL-2 存在下で、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体を用いて刺激し 48 時間培養した。刺激後の細胞を (A)と同様に処理し、細胞表面 (Cell surface)、細胞全体 (Total cell) での PHB1、及び PHB2 の発現を示した。(D) (A)と同様に細胞表面タンパク質、全細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE 及びウェスタンブロッティングを行い、 β -actin、Lamin B、及び VDAC を検出した。(E) 活性化 T 細胞について細胞全体、細胞表面に分布している PHB1、PHB2 の発現を示した。

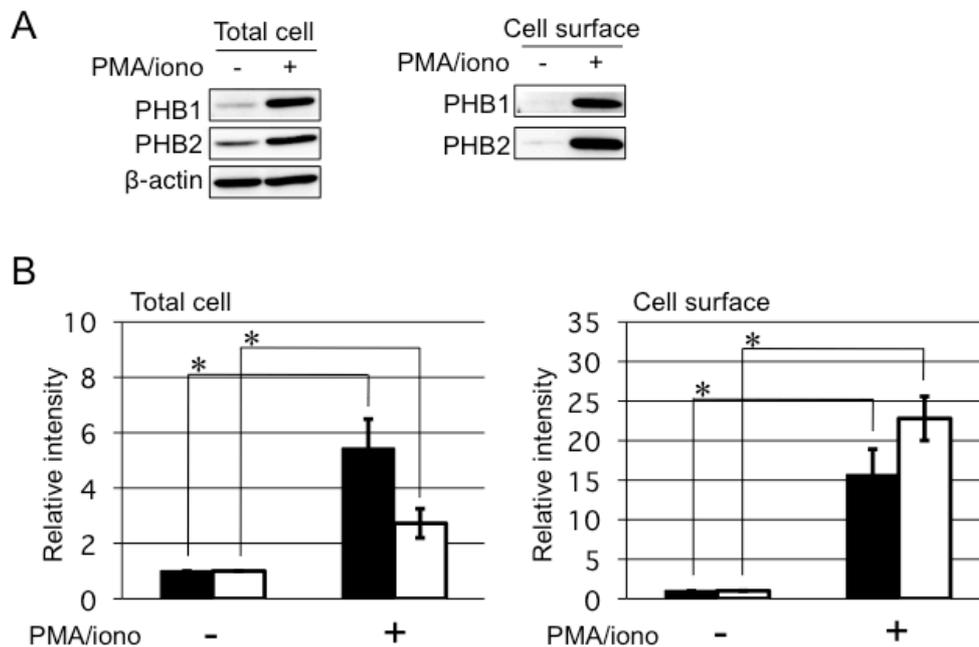


図5： ヒト活性化 T 細胞における PHBs の分布

(A) ヒト末梢血より T 細胞を調製し、PMA/イオノマイシンで刺激後 48 時間培養した。(図 4A)と同様に処理した細胞について、細胞表面 (Cell surface)、細胞全体 (Total cell) での PHB1、及び PHB2 の発現を示した。(B) 棒グラフは未刺激細胞より調製した試料における PHB1 (■)、PHB2 (□) の発現を 1 とした時の、活性化 T 細胞より検出したこれらのタンパク質の相対的発現量を示す。データは 4 回実験を行って得られた結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す (n=4, *p<0.05)。

PHB1 と PHB2 はミトコンドリア内膜において、ヘテロ二量体を形成し、さらに他分子と会合し巨大な複合体を作っていることが報告されている [27]。細胞膜表面においてこれらの分子がどのような複合体で存在しているかは未だ明らかになっていない。細胞表面タンパク質をビオチンで標識し、細胞表面及び細胞内の PHBs の分子サイズを、Sephadex-G75 を用いたゲル濾過により推定した。その結果、分子量 75 kDa 以上の分子が溶出される素通り画分にビオチン化された細胞表面の PHBs、及び細胞内の PHBs が検出された。細胞内に存在している PHBs は主にミトコンドリア由来と考えられる。細胞内及び細胞表面の PHBs は共に同様の溶出パターンを示すことから、細胞膜表面においても PHB1、PHB2 は巨大な分子複合体を形成していることが考えられる (図 6A、B)。

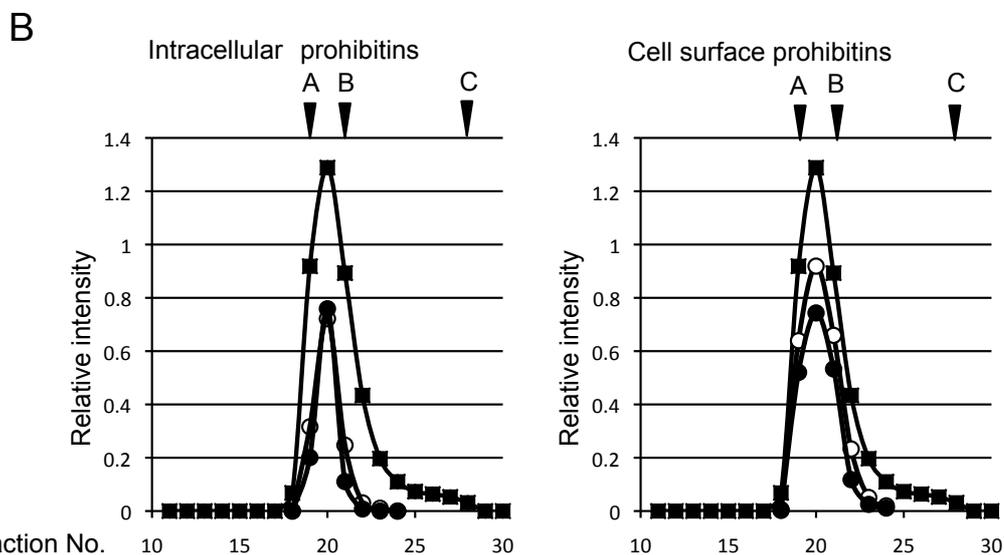
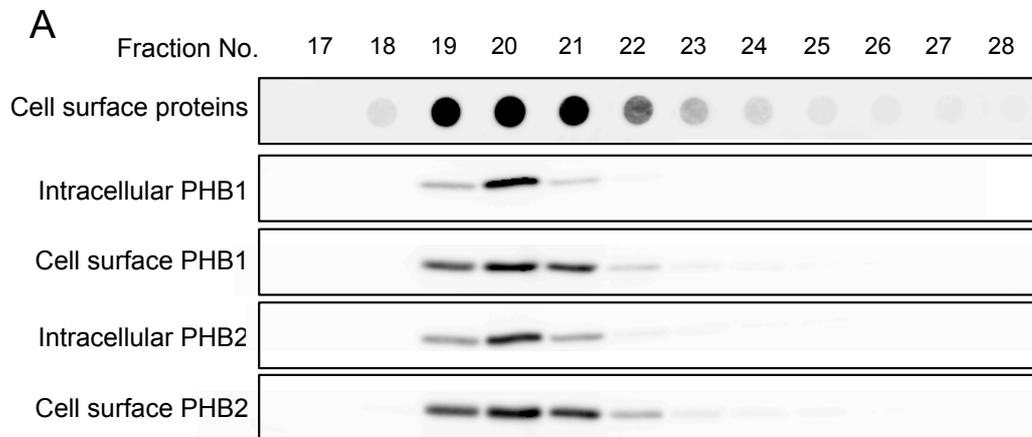


図 6 : 細胞表面及び細胞内 PHBs のゲル濾過クロマトグラフィー

細胞表面タンパク質をビオチン標識した活性化マウス T 細胞より調製した細胞抽出液を Sephadex G-75 を用いたゲル濾過により分画した。(A) 得られたフラクションの一部を Zeta-Probe Membrane 上にプロットし、ビオチン化されたタンパク質を検出した。Streptavidin-Sepharose をフラクションの一部に加え、ビオチン化されたタンパク質とされていないタンパク質とを分離した。それぞれの試料を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、PHB1 及び PHB2 を検出した。(B) (A) で得られた結果より、ビオチン化された全タンパク質 (■)、PHB1 (●)、及び PHB2 (○) のバンドあるいはドットの濃さを数値化し、グラフにプロットした。矢頭の A、B、及び C はそれぞれ標準物質である blue dextran 2000 (2000 kDa)、conalbumin (75 kDa)、及び carbonic anhydrase (29 kDa) を示す。

3-3 : Jurkat 細胞表面における PHB1 及び PHB2 の発現と分布

本研究に用いた細胞株の中で、Jurkat 細胞は T 細胞受容体を発現している唯一の細胞株である。T 細胞の機能に関して、最も重要な分子の 1 つは T 細胞受容体であり、T 細胞受容体複合体を構成するタンパク質である CD3 の分布と PHB1 及び PHB2 の分布を比較した (図 7A)。PHB1 及び PHB2 は共に Jurkat 細胞表面において、不均一に分布し、さらに両分子は CD3 と共局在していることが分かった。この不均一な分布は検出に用いた 2 価の抗体による可能性もあり、PHB1 の分布については、同タンパク質に特異的に結合するペプチド (CKGGRAKDC) を用いて、同様に検討した [35]。その結果、1 価のペプチドによっても同様の分布が観察された (図 7B)。また、PHBs は SPFH ドメインを有するタンパク質グループに属しており、このドメインを持つ分子は脂質ラフトに多く分布しているという報告とも矛盾しない [35, 42, 43]。また、これらの結果は細胞表面における PHBs が T 細胞受容体を介したシグナル伝達に何らかの関与をしていることを示唆している。

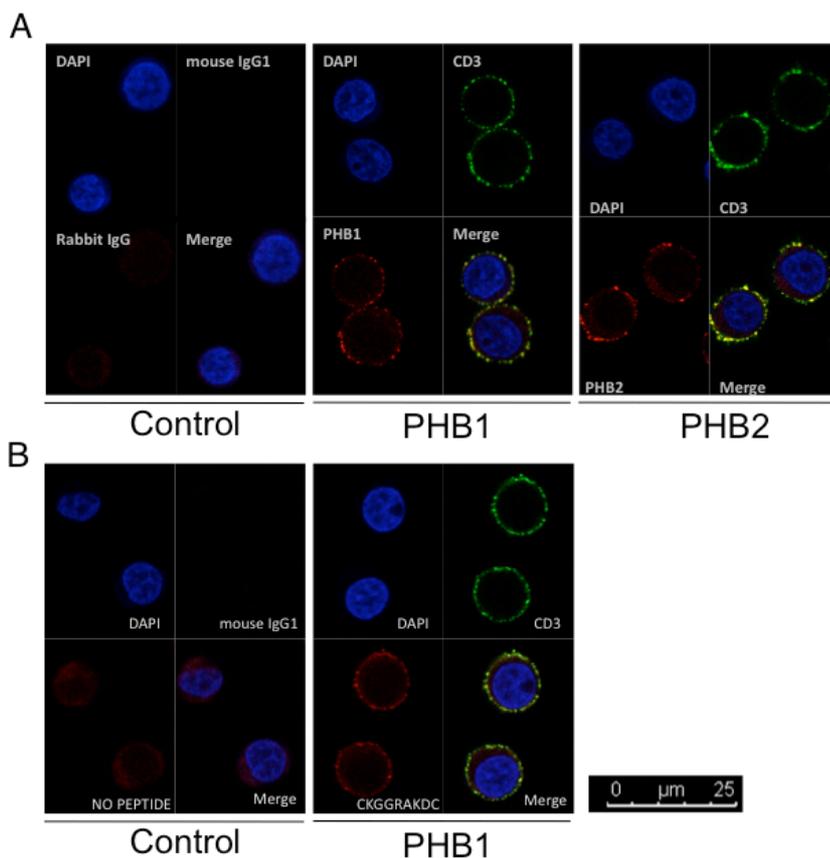


図 7 : Jurkat 細胞における PHB1 及び PHB2 の分布

(A) 抗 CD3 抗体、抗 PHB1、抗 PHB2 抗体及びそれらのコントロール抗体を用いて Jurkat 細胞の免疫染色を行った。細胞を固定後、DAPI を用いて核を染色した。(B) (A)と同様に PHB1 の分布を、PHB1 結合ビオチン化ペプチド (CKGGRAKDC) を用いて示した。

3-4 : 抗 PHB1 及び PHB2 抗体による TCR シグナル伝達の抑制

Jurkat 細胞を用いて TCR シグナル伝達における細胞表面の PHBs の関与を検討した。すなわち、抗 CD3 抗体結合ビーズ を用いて細胞を刺激した場合と抗 PHB1-CD3 抗体結合ビーズあるいは抗 PHB2-CD3 抗体結合ビーズを用いて Jurkat 細胞を処理した場合を比較し、抗 PHB1、PHB2 抗体の影響を検討した。コントロール実験にはアイソタイプコントロール抗体と抗 CD3 抗体を同一ビーズ上に結合したビーズを用いた。Jurkat 細胞をこれらのビーズで処理し、10 分後に回収した細胞の細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、膜上のリン酸化 ERK1/2、ERK1/2 を検出した。その結果、抗 PHB1 抗体存在下で刺激した細胞では、ERK1/2 のリン酸化が 40% 減少した。抗 PHB2 抗体存在下で刺激した細胞では、ERK1、ERK2 のリン酸化がそれぞれ 20%、30% 減少した (図 8A(a)、8B)。抗 CD3 結合ビーズと抗 PHBs 結合ビーズの混合物により Jurkat 細胞を処理した場合、あるいは可溶性抗 PHBs 抗体と抗 CD3-ビーズを用いて処理した場合ではいずれも ERK1/2 のリン酸化の低下は認められなかった (図 8A (b, c))。抗 PHBs 抗体と抗 CD3 抗体が適当な位置に配置されているビーズのみ効果的であることは、TCR と PHB は免疫シナプスに共局在し、空間的配置が重要であることを示唆している。Rajalingam らは、Ras と c-Raf の結合を仲介する分子が PHB1 であり、c-Raf の活性化を伴う MAP キナーゼ経路の活性化に必須であることを明らかにした [38]。これらの報告は、細胞表面に発現した PHB1 が細胞内情報伝達において重要な役割を担っていることを示しており、細胞表面の PHBs は T 細胞の機能を調節する標的分子になり得ると考えられる。Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) 及び programmed death-1 (PD-1) も PHBs と同様に活性化 T 細胞表面に誘導されることが報告されている [44-47]。CTLA-4 は T 細胞上の CD28 と結合し、抗原提示細胞における共刺激因子の 1 つである CD80/86 と CD28 の相互作用に拮抗することで T 細胞の活性を調節している [48, 49]。PD-1 は PD-L1、PD-L2 と結合することで T 細胞シグナル伝達を抑制する [49]。T 細胞受容体を介した細胞内シグナル伝達において、細胞表面の PHBs の役割は明らかになっていないが、T 細胞の活性化を伴う免疫疾患の制御を目的とした標的分子になり得ることが期待される。

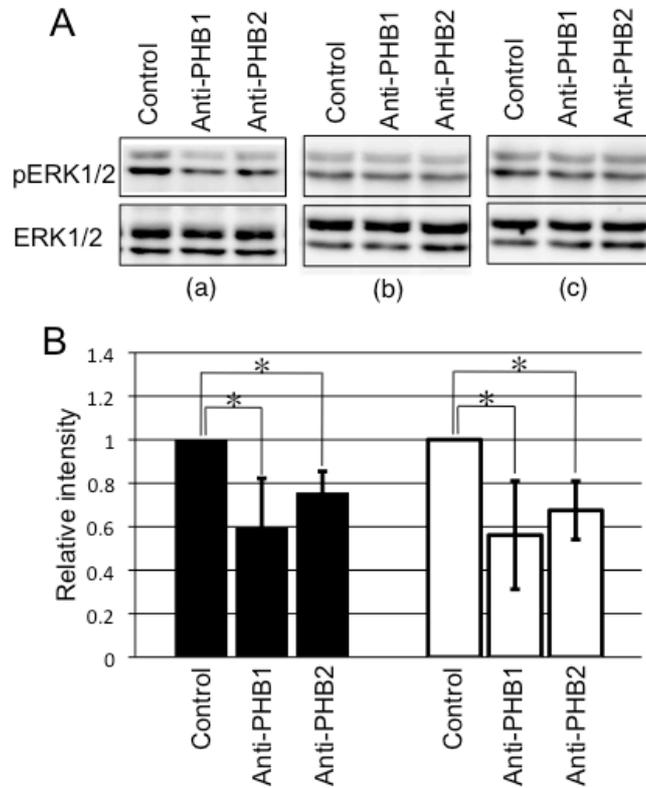


図8： TCR シグナル伝達における抗 PHB1 及び抗 PHB2 抗体の影響

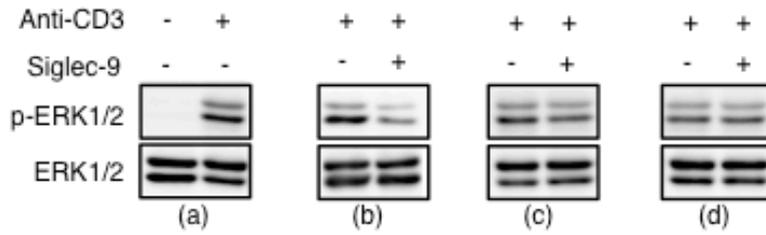
(A) 抗 PHBs-CD3 抗体結合ビーズ (a)、抗 CD3 抗体結合ビーズと抗 PHBs 抗体結合ビーズ (b)、あるいは可溶性の抗 PHBs 抗体と抗 CD3 抗体結合ビーズ (c)を用いて Jurkat 細胞 (5×10^4 個)を処理した。コントロール実験は、抗 PHBs 抗体のアイソタイプコントロール抗体を用いてそれぞれの条件で細胞を処理した。処理して 10 分後の細胞の細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 及び ERK1/2 を検出した。(B) (A) のバンドの濃さを数値化し、コントロール抗体を用いた時のリン酸化 ERK1/ERK1 及びリン酸化 ERK2/ERK2 の値を 1 とし、抗 PHB1 及び抗 PHB2 抗体の効果を相対値で示した。データは 4 回実験を行って得られた結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す ($n=4$, $*p<0.05$)。■、リン酸化 ERK1/ERK1。□、リン酸化 ERK2/ERK2。

3-5 : Siglec-9 と PHBs の相互作用による TCR シグナル伝達の抑制

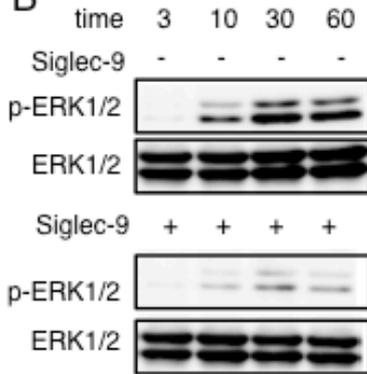
抗原提示時に PHB のカウンターレセプターになることが予想される Siglec-9 について、TCR シグナル伝達に対する影響を検討した。まず、Jurkat 細胞を抗 CD3 抗体結合ビーズで刺激し、30 分後に細胞を回収し、前項と同様に ERK1/2 のリン酸化を調べた (図 9A(a))。次に、前項の抗 PHB 抗体に代わって Siglec-9 を用いて ERK1/2 のリン酸化に対する影響を検討した。Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて Jurkat 細胞を処理した時に、抗 CD3 抗体結合ビーズで刺激した場合と比較して顕著に ERK1/2 のリン酸化が低下した (図 9A(b))。抗 CD3 抗体ビーズと Siglec-9 結合ビーズの混合物を用いた場合、あるいは可溶性の Siglec-9 の存在下で抗 CD3 抗体ビーズを用いた場合では ERK1/2 のリン酸化の低下はほとんど認められなかった (図 9A(c, d))。

次に、Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達における ERK1/2 のリン酸化を、時間経過を追って解析するとともに、Siglec-9 の影響を検討した。抗 CD3 抗体結合ビーズの刺激による ERK1/2 リン酸化の亢進は 30 分の時点で最大となった。また、この時点において、Siglec-9 により ERK1、ERK2 のリン酸化のレベルはそれぞれ 80%、70% 減少した (図 9B, C)。これらの結果より、Siglec-9 と T 細胞上の PHBs の相互作用により TCR シグナル伝達が強く抑制されたものと考えられる。PHBs は ERK1/2 の上流のシグナル伝達分子である Ras と c-Raf の相互作用を仲介する分子とされており、c-Raf の活性化に必須であることが報告されている [38]。従って、Jurkat 細胞の TCR シグナル伝達への Siglec-9 の影響を c-Raf についても検討した。その結果、ERK のリン酸化と同様に Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズで Jurkat 細胞を処理した場合、リン酸化のレベルは 60% まで低下した (図 9D, E)。Jurkat 細胞において T 細胞受容体を介した細胞内情報伝達は ERK のリン酸化を伴い、IL-2 の産生を誘導する [50, 51]。Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ存在下で 48 時間培養し、培養上清中の IL-2 を測定すると、ERK のリン酸化レベルに呼応して、IL-2 の産生量は顕著に低下した (図 9F)。Jurkat 細胞における IL-2 の産生には ERK のリン酸化が必須であり、IL-2 産生の低下は Siglec-9 と PHBs の結合による TCR シグナル伝達の抑制に起因することが考えられる。

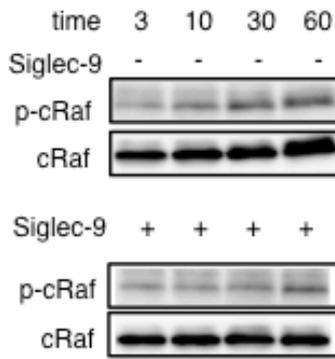
A



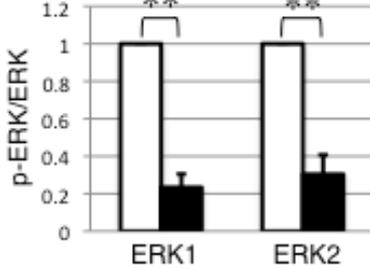
B



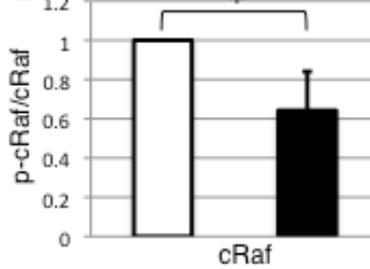
D



C



E



F

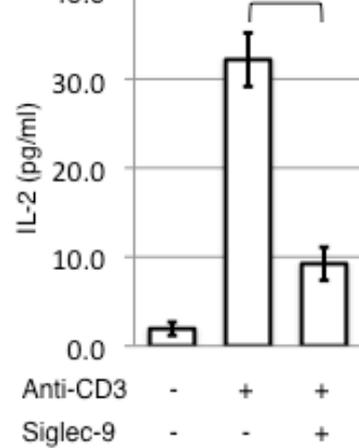


図9： TCR シグナル伝達及び IL-2 の産生に対する Siglec-9 の影響

(A) Jurkat 細胞 (5×10^4 個) を抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて刺激した (a)。TCR シグナル伝達に対する Siglec-9 の影響を検討する目的で、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ (b)、Siglec-9 結合ビーズ及び抗 CD3 抗体結合ビーズ (c)、あるいは可溶性 Siglec-9 と抗 CD3 抗体結合ビーズ (d) により Jurkat 細胞を処理し、30 分後の細胞の細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 及び ERK1/2 を検出した。(B) Jurkat 細胞を抗 CD3 抗体結合ビーズ (Siglec-9: -) あるいは Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ (Siglec-9: +) により処理し、時間経過を追って細胞を回収し、同様にリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 及び ERK1/2 を検出した。(C) (B) において、細胞を処理後 30 分間経過した時のバンドの濃さを数値化し、抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて処理した細胞 (□) についてリン酸化 ERK1/ERK1 及びリン酸化 ERK2/ERK2 の値を 1 とし、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズにより処理した細胞 (■) と比較した。データは 3 回実験を行って得られた結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$, $**p < 0.01$)。 (D) (B) と同様に Jurkat 細胞を処理し、c-Raf のリン酸化に対する Siglec-9 の影響を示した。(E) (C) と同様の手法により、リン酸化 c-Raf/c-Raf の値を比較することにより Siglec-9 の影響を示した。データは 3 回実験を行って得られた結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す ($n=3$, $*p < 0.05$)。 (F) Jurkat 細胞を抗 CD3 抗体結合ビーズあるいは Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ存在下で 48 時間培養し、培養上清の IL-2 量を棒グラフに示した。データは平均値、エラーバーは標準偏差を示す ($n=4$, $**p < 0.01$)。

3-6 : Siglec-9 による TCR シグナル伝達の抑制に対する PHB1 ノックダウンの影響

Jurkat 細胞に発現する PHB1 の発現を抑制した PHB1 低発現株において、Siglec-9 による TCR シグナル伝達の抑制効果と PHB1 の発現低下による TCR シグナル伝達への影響について検討した。コントロールとしては luciferase 特異的 siRNA 導入細胞を用いた。PHB1 特異的 siRNA 導入後の Jurkat 細胞において、PHB1 の発現は 40% 程度にまで減少した (図 10A)。コントロールの細胞においては、前項にも示したように Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズで処理した細胞における ERK1/2 のリン酸化は抗 CD3 抗体結合ビーズで処理した細胞における ERK1/2 のリン酸化と比較して有意に低下した (図 10B (lanes 1、2)、C)。一方で、PHB1 低発現細胞において、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ処理による有意な ERK1/2 のリン酸化の低下は認められなかった (図 10B (lanes 4、5)、C)。これらの結果は、PHB1 の発現抑制により、Siglec-9 の結合に伴う ERK1/2 のリン酸化の抑制効果が減少したことを示す。また、PHB1 は Ras と c-Raf の相互作用を仲介することから、PHB1 低発現 Jurkat 細胞において ERK1/2 のリン酸化レベルが低下することが予想されたが、抗 CD3 抗体により誘導される ERK1/2 のリン酸化レベル自体についてはコントロールの細胞と PHB1 低発現 Jurkat 細胞で差は認められなかった (図 10B (lanes 1、4))。Jurkat 細胞には c-Raf と併せて B-Raf も発現しており、B-Raf も ERK のリン酸化に関わること [52]、B-Raf は PHB1 とは相互作用しないとされていることから [38]、PHB1 低発現 Jurkat 細胞においては、B-Raf が ERK1/2 のリン酸化に関与していることが予想される。

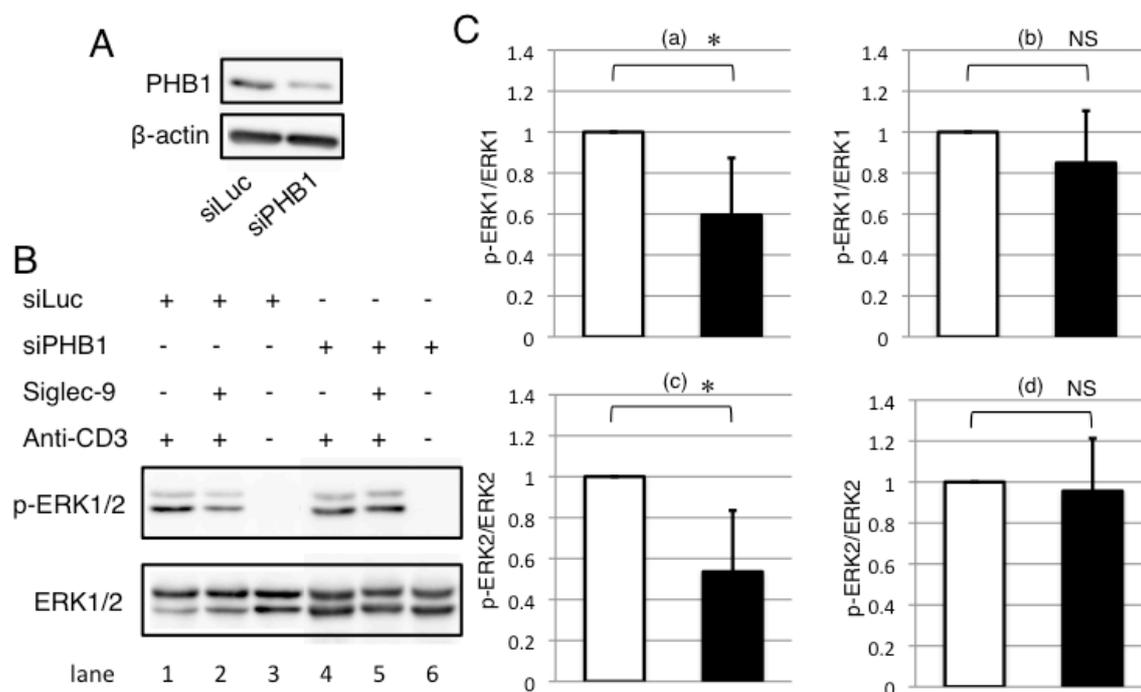


図 10 : Siglec-9 による TCR シグナル伝達の抑制に対する PHB1 ノックダウンの影響

(A) PHB1 特異的 siRNA (siPHB1) あるいはコントロール siRNA (siLuc) を導入した Jurkat 細胞の抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロットティングを行い、PHB1 及び β -actin を検出した。(B) PHB1 低発現 Jurkat 細胞を抗 CD3 抗体結合ビーズ あるいは Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ で処理した。30 分後に細胞を回収し、細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロットティングを行い、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 及び ERK1/2 を検出した。(C) コントロール (a, c) あるいは PHB1 低発現 Jurkat 細胞 (b, d) について、(B) で得られたバンドの濃さを数値化し、リン酸化 ERK1/ERK1 (a, b)、及びリン酸化 ERK2/ERK2 (c, d) の値を比較した。抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて処理した細胞 (□) についてリン酸化 ERK1/ERK1 及びリン酸化 ERK2/ERK2 の値を 1 として、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズにより処理した細胞 (■) と比較した。データは 4 回実験を行って得られた結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す (n=4, *p<0.05, NS=not significant)。

3-7 : ヒト末梢血 T 細胞における TCR シグナル伝達への Siglec-9 の影響

前述したように、ヒト末梢血より調製した T 細胞における PHBs の発現は PMA 及びイオノマイシンで刺激して 48 時間後に最大となった。しかしながらこれらの物質による T 細胞の活性化は、生体内で起こる活性化とは大きく異なることから、我々は末梢血より調製した T 細胞を、生理的状況下で起こる免疫応答に近い条件である抗 CD3/CD28 抗体を用いて刺激し、細胞表面に PHBs を誘導した (活性化 T 細胞)。また、コントロールとして、末梢血より調製した T 細胞を未刺激のまま用いた (未刺激 T 細胞)。なお、活性化 T 細胞については、抗 CD3/CD28 抗体で刺激し、40 時間後に細胞を回収し、さらに培地中で 5 時間培養した細胞を用いた。5 時間の休止時間は、抗 CD3 抗体による再刺激の効果を高めるために設定した。全 PHBs の発現量は未刺激の T 細胞と同等であったが、ビオチン標識によって得られた細胞表面の PHB1、2 は未刺激 T 細胞では検出されなかったが、活性化 T 細胞では発現が認められた (図 11A)。細胞のダメージ等によりビオチン化された細胞内成分の有無を β -actin を対象にして調べた。ビオチン標識された β -actin は検出されず、細胞のダメージは無いことが分かった。調製した 2 種の細胞について、抗 CD3 抗体結合ビーズで刺激し ERK1/2 のリン酸化を伴う TCR シグナル伝達を誘導した。また、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて処理し、Siglec-9 の影響を検討した。この系では、ERK1 のリン酸化のレベルが低かったため、ERK2 のリン酸化について検討した。細胞表面に PHBs の発現を誘導した 活性化 T 細胞 においては、抗 CD3 抗体刺激による ERK2 のリン酸化が Siglec-9 の共存により有意に低下した。未刺激 T 細胞においては、Siglec-9 存在下においても ERK2 のリン酸化に変化は認められなかった (図 11B、C)。Jurkat 細胞で認められた IL-2 の産生については、上述した活性化の条件では検出限界以下であったが、IFN- γ については、ELISPOT アッセイにより IFN- γ 産生細胞数を比較したところ、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズ で処理した細胞では、抗 CD3 抗体結合ビーズ で刺激した細胞と比較して有意にその産生細胞数が減少した (図 12)。

Jurkat 細胞あるいは、細胞表面に PHBs を誘導したヒト末梢血 T 細胞においても Siglec-9 と PHBs の相互作用が TCR シグナル伝達を抑制していることがわかった。これらの結果は、Siglec-9 と PHBs の相互作用は新たな免疫応答の調節機構であることを強く示唆している。

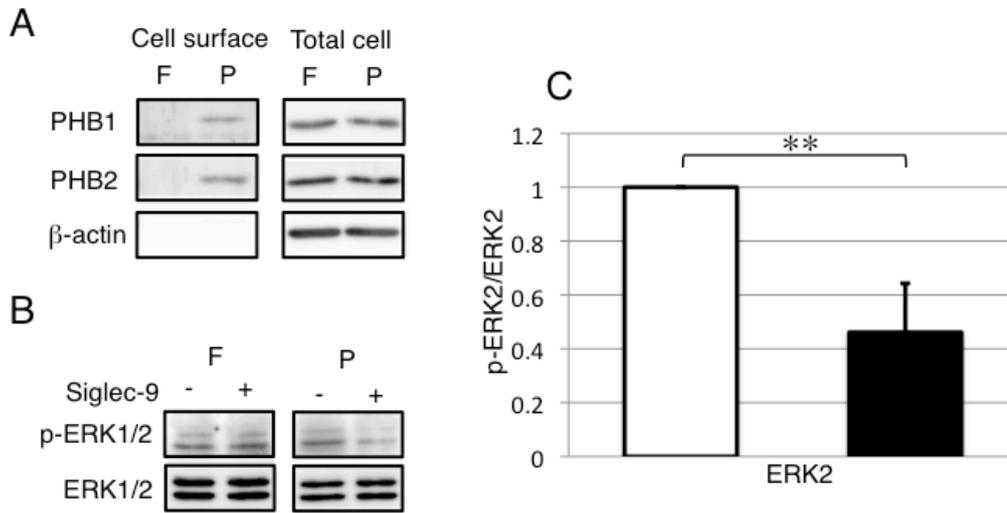


図 11 : ヒト末梢血 T 細胞における TCR シグナル伝達の Siglec-9 による抑制

(A)ヒト末梢血より調製した T 細胞の一部を、抗 CD3 抗体及び抗 CD28 抗体により活性化した。一部の未刺激 T 細胞、及び活性化 T 細胞の細胞抽出液を、SDS-PAGE の試料とした。また、別の一部の未刺激 T 細胞、及び活性化 T 細胞の細胞表面タンパク質をビオチン標識し、細胞抽出液より streptavidin-Sepharose を用いて細胞表面タンパク質を調製し、SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE 後、ウェスタンブロッティングを行い、PHB1、PHB2、及び β -actin を検出した。F、未刺激 T 細胞。P、活性化 T 細胞。(B) 未刺激 T 細胞、及び活性化 T 細胞を抗 CD3 抗体結合ビーズあるいは Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズで処理し、30 分後に細胞を回収した。それぞれの細胞抽出液を SDS-PAGE し、続いてウェスタンブロッティングを行い、リン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 及び ERK1/2 を検出した。(C)(B) の活性化 T 細胞において得られたバンドの濃さを数値化し、抗 CD3 抗体結合ビーズを用いて処理した細胞 (□) についてリン酸化 ERK2/ERK2 の値を 1 として、Siglec-9-抗 CD3 抗体結合ビーズにより処理した細胞 (■) と比較した。データは 4 回実験を行って得られた結果の平均値、エラーバーは標準偏差を示す (n=4、**p<0.01)。

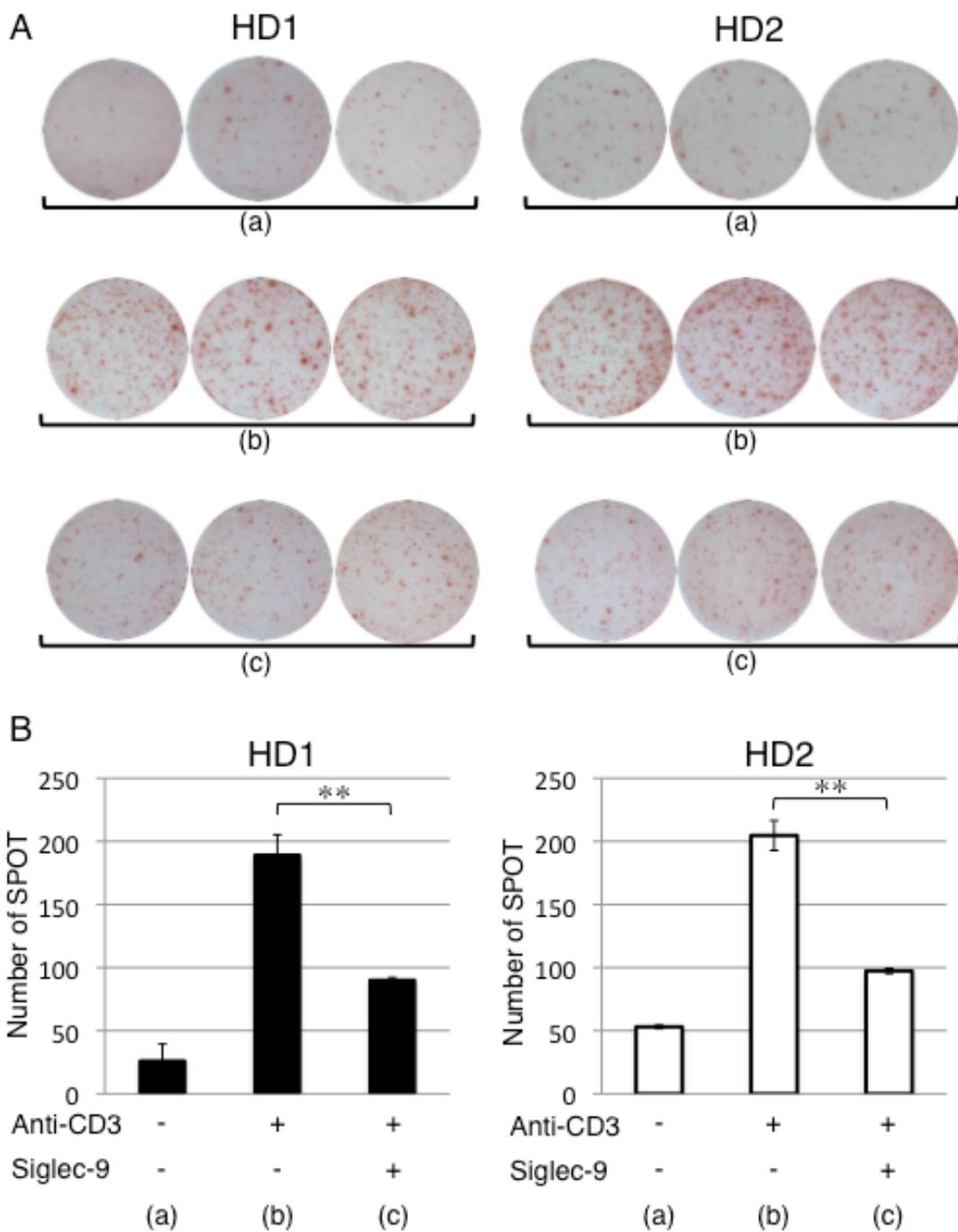


図 12： ヒト末梢血 T 細胞における IFN- γ の産生の Siglec-9 による抑制

(A) 未刺激 T 細胞及び活性化 T 細胞をコントロールビーズ (a)、抗 CD3 抗体結合ビーズ (b)、あるいは Siglec-9 抗 CD3 抗体結合ビーズ (c) 存在下で 48 時間培養し、IFN- γ 産生細胞を ELISPOT 法により検出した。(B) IFN- γ 産生細胞を示すスポットを計測し棒グラフに示した。データは平均値、エラーバーは標準偏差を示す (n = 3、**p < 0.01)。

4 : 考察

抗原提示細胞と T 細胞の相互作用は獲得免疫の重要な位置を占める。特異性は MHC と TCR によって担われているが、その活性化レベルは様々なアクセサリ分子によって調節されている。マクロファージや樹状細胞上などの抗原提示細胞には多くのレクチンが発現しており、抗原提示におけるアクセサリ分子としての機能を持つ可能性がある。多くの免疫細胞上に発現しているシグレックファミリーはシアログリカンを認識し、その結合特異性は比較的広いが、それらのシス及びトランスの内在性リガンドはほとんど解明されていない。我々は、Siglec-9 の T 細胞上のトランスリガンドを検索する過程で、複数の T 細胞株の細胞表面に共通して認められる 28kDa 及び 31kDa の Siglec-9 結合タンパク質を見出した。質量分析の結果、これらのタンパク質はそれぞれ PHB1、PHB2 であることが明確となったが、ヒト末梢血 T 細胞やマウス脾臓 T 細胞の細胞表面には検出されなかった。T 細胞上のアクセサリ分子である CTLA-4 や PD-1 のように、活性化に伴って細胞表面に発現が誘導される可能性を検討する目的で、PMA 及びイオノマイシン処理による活性化 T 細胞における PHBs の発現誘導を検討した。ヒト末梢血及びマウス脾臓由来 T 細胞のいずれにおいても 24 時間後に PHBs の発現が誘導され、48 時間後に最大となった。また、その多くは細胞表面にも誘導された (図 4、5)。その誘導の時間的経緯は CTLA-4 や PD-1 と近似しており、T 細胞の活性化レベルの調節に関与することが示唆された。

次に PHBs と Siglec-9 の相互作用について検討した。Siglec-9 はシアル酸を認識するレクチンとして知られていることから、シアル酸を介した結合の可能性について検討した。一般的に、ミトコンドリアを構成するタンパク質は糖鎖を持たない可能性が高いが、PHB1 は N 型糖鎖が付加される可能性のあるトリプレット構造を持つことから、糖鎖の有無は未検討であるが、過ヨウ素酸処理によりシアル酸残基の開裂を試みた。過ヨウ素酸処理後、さらに細胞表面タンパク質をビオチンにより標識した Molt-3 細胞の細胞抽出液より Siglec-9 結合タンパク質を検出した。その結果、過ヨウ素酸処理後も Siglec-9 は細胞表面に発現した PHBs と結合することが分かった (図 3B)。従って、Siglec-9 の PHBs への結合は、従来報告されている糖鎖への結合ではなく、ペプチド間の結合であることが示唆された。実際に、Siglec-5 及び Siglec-6 はシアル酸非依存的に、それぞれ cell wall-anchored β protein [9] 及び leptin [53] に結合することが報告されている。Siglec-9 の Arg¹²⁰ はシアル酸残基の認識に必須であることが報告されているが [41]、Arg¹²⁰ を Ala に置換した変異型 Siglec-9、及び Arg¹²⁰ を含む V-set 領域を欠く欠損型 Siglec-9 を調製し、PHBs との結合を検討した。前述したように、Siglec-9 と PHBs の結合にシアル酸は関与していないことが予想されるが、本研究で調製した変異型及び欠損型 Siglec-9 の PHBs への結合も認められなかった (図 3)。Siglec-9 によるシアル酸残基の認識は、Arg¹²⁰ の陽性荷電とシアル酸残基の持つ陰性荷電が関与していることから、PHBs のペプチド鎖上の陰性荷電が結合に関与していることが示唆される。事実、PHB1 の分子内に陰性荷電のクラスターが複数存在しているこ

とが報告されている [54]。酵母の PHBs はヘテロ二量体を形成しており、さらにその二量体が会合しリング状の構造をしていることが報告されている [27]。細胞表面における、プロヒビチンの存在様式は未解明であるが、Jurkat 細胞抽出液を Sephadex-G75に通すと、PHBs は素通り画分に溶出された。すなわち、PHBs はヘテロ二量体よりも大きい分子複合体を形成していることが示唆された (図 6)。このように、Siglec-9 は PHBs の分子複合体中の表面に存在する陰性荷電のクラスターに結合する可能性が高い。両者の結合に関する詳細な研究は現在進行中である。また、Siglec-9 の他のシス、あるいはトランスリガンドによる PHBs の結合に対する影響の有無についても今後の研究により明らかにする必要がある。T 細胞表面のシアル酸の発現は T 細胞の活性化や分化に伴いその発現が変化することが報告されている [55-58]。例えば、T 細胞へのマウス Siglec-E の結合は T 細胞を活性化して 24 時間後に劇的に増加することが報告されている [59]。樹状細胞やマクロファージの細胞表面に発現している Siglec-9 のシスリガンドはトランスリガンドとの結合を調節していると考えられている。しかしながら、Collins らは B 細胞表面の Siglec-2 が T 細胞と相互作用する際、その接触領域に Siglec-2 及びトランスリガンドが局在することにより親和性が増し、トランスリガンドとの結合が優位になることを報告している [60]。このように、Siglec-9 と PHBs の相互作用には他の様々な要素が関与する可能性がある。

細胞表面における PHBs の発現は腸管上皮細胞、脂肪細胞でも見い出されている [34, 61]。PHBs が細胞表面に誘導される機構については明らかになっていないが、PHBs はミトコンドリアと細胞膜の間を移動することが提唱されている [30, 35]。Stomatin-like protein-2 (SLP-2) は Stomatin グループに属するタンパク質で、PHBs と類似した特徴を持っている。SLP-2 はヒト T 細胞において、PHBs と同様にマイクロドメインに分布している [62, 63]。SLP-2 もミトコンドリアに存在することが報告されているタンパク質であるが、細胞膜においても SLP-2 が豊富に存在する領域がある [64]。さらに、SLP-2 は細胞膜において巨大なタンパク質複合体を形成し、T 細胞受容体を介したシグナル伝達を維持することで T 細胞の活性化に寄与している [63]。SLP-2 はミトコンドリアにおいても PHBs を含むタンパク質複合体を形成することが報告されているが、細胞表面において形成される複合体に PHBs が含まれているかどうかは明らかにはなっていない [64]。これらの報告と、細胞表面の PHBs が T 細胞受容体の構成分子である CD3 と共局在していることから、SLP-2 と PHBs は共通の機構で細胞膜に誘導され、共に TCR シグナル伝達に寄与していることが示唆される。

T 細胞において ERK シグナル伝達経路は、サイトカイン産生、細胞傷害活性、生存、細胞死、及び細胞増殖に関与している [65, 66]。TCR の刺激は Ras を GDP 結合型から活性型である GTP 結合型への変化を誘導する [67]。活性化した Ras は細胞膜に c-Raf を誘導し、c-Raf を活性化する。c-Raf は ERK1/2 の活性化を担う分子であり、ERK1/2 のリン酸化は IL-2 の産生に必須である [51]。ERK のリン酸化を伴うシグナル伝達経路への PHBs の関与についてはいくつかの報告がある。

Salmonella typhi 上の Vi polysaccharide は腸管上皮細胞上の PHBs と相互作用し、炎症反応を抑制する [34]。さらに、PHB1 は Ras と c-Raf の結合を仲介することで ERK1/2 細胞内情報伝達を制御している [38]。哺乳類細胞の Raf グループには c-Raf (Raf-1)、A-Raf、B-Raf が属している [68]。Siglec-9 は Jurkat 細胞において c-Raf のリン酸化を抑制した。これは、Siglec-9 と PHB1 の結合により、Ras と c-Raf の相互作用が阻害されたことに起因すると考えられる。PHB1 はまた c-Raf と直接結合することも報告されている [38]。PHBs による細胞内情報伝達調節機構をより詳細に検討する目的で、siRNA により、Jurkat 細胞における PHB1 の発現の抑制を試みた。PHB1 特異的な siRNA の導入により PHB1 の発現は 40% にまで低下した (図 10A)。Siglec-9 の結合に伴う ERK1/2 のリン酸化の抑制については、PHB1 の発現低下によりその抑制効果も低下した (図 10B、C)。また、Siglec-9 による抑制効果は PHB を細胞表面に発現している活性化ヒト末梢血 T 細胞では認められるが、PHB を発現していない未刺激ヒト末梢血 T 細胞では認められなかった (図 11B、C)。これらの結果は Siglec-9 と PHB の相互作用が TCR シグナル伝達を抑制することを明確に示している。

一方、PHB1 は Ras と c-Raf の相互作用を仲介することから、PHB1 のノックダウンにより ERK1/2 のリン酸化レベルが低下することが予想されたが、抗 CD3 抗体により誘導される ERK1/2 のリン酸化レベルに変化は無かった。B-Raf は PHB1 とは結合しないが、c-Raf 非存在下においてその機能を補完することが報告されている [52, 69]。PHB1 ノックダウン細胞において、抗 CD3 抗体刺激による ERK1/2 のリン酸化に変化が認められなかった要因は B-Raf の代償作用の可能性が高い。細胞表面における PHBs の有無に拘らず、未刺激及び活性化ヒト末梢血 T 細胞において抗 CD3 抗体により同レベルの ERK1/2 のリン酸化が認められたことも上記の報告に合致する。活性化した T 細胞や Jurkat 細胞では、細胞膜への PHBs の誘導に伴い T 細胞受容体を介したシグナル伝達に寄与するタンパク質複合体に PHBs が組み込まれることで Ras-(PHB)-c-Raf-MEK-ERK シグナル伝達経路が加わり、Ras-B-Raf-MEK-ERK シグナル伝達経路に置き換わると考えられる。そのため、抗体や Siglec-9 処理による PHBs あるいはこの複合体の構造変化が情報伝達に関わる分子の配置を乱した結果、T 細胞受容体を介したシグナル伝達が劇的に阻害されたと考えられる。時間の経過に伴い、再び B-Raf が c-Raf の機能を補完するということも考えられるが、ERK のリン酸化の減少と同様に Siglec-9 処理によりサイトカインの産生も抑制されていることから、活性化 T 細胞上の PHBs と抗原提示細胞上の Siglec-9 の相互作用は免疫応答の調節機能を有している。実際の免疫応答における両分子の相互作用によるシグナル伝達の詳細については検討中である。

PHBs の細胞表面における発現は、T 細胞の刺激後 48 時間から 72 時間にわたって認められた。この時間的経緯から、抗原提示機能が十分に発揮された後に T 細胞表面に PHBs が誘導され、Siglec-9 と相互作用することで T 細胞の機能を調節しているものと考えられる (図 13)。CTLA-4 及び PD-1 もまた、PHBs と同様に活性化 T 細胞表面に誘導される分子であり TCR シグナル伝達の調節に関与

している [45-47, 70]。IL-2 の産生は ERK1/2 依存性の T 細胞の活性化によって起こる最も重要な T 細胞の機能の 1 つである。Siglec-9 存在下では、ERK1/2 のリン酸化のみならず IL-2 の産生も抑制されていることが分かった。また、末梢血より調製した T 細胞においても同様に、Siglec-9 存在下において、ERK1/2 のリン酸化の低下に伴って IFN- γ の産生の低下が認められた。これらの結果より、PHBs と Siglec-9 の相互作用は T 細胞の活性化のレベルを決める上で CTLA-4 と CD28 及び PD-1 と PD-L1、PD-L2 の相互作用と同様に重要な調節機構であると考えられる。本研究では、人工の抗原提示細胞として、抗 CD3 抗体を結合したビーズを人工抗原提示細胞として用いた。実際の抗原提示細胞上に発現した Siglec-9 が PHBs と結合することで、その細胞内情報伝達を抑制するかどうかについては今後検討する必要がある。生理的条件下における Siglec-9 の機能の検証とは別に、Siglec-9 と同様に、抗 PHBs 抗体によっても TCR シグナルの抑制が認められ、細胞表面に発現している PHBs は種々の免疫疾患の治療におけるターゲット分子になることが期待される。活性化 T 細胞のみならず、T 細胞系悪性リンパ腫細胞株についても本研究で用いた全ての細胞株において細胞表面における PHBs の発現が認められた。さらに、B 細胞株である Ramos、Daudi 細胞においても同様に細胞表面に PHBs の発現が認められた (未発表データ) ことから、細胞表面に発現した PHBs は免疫応答の調節という機能を対象とした展開に加えて、悪性リンパ腫のマーカーや標的分子としても期待される。

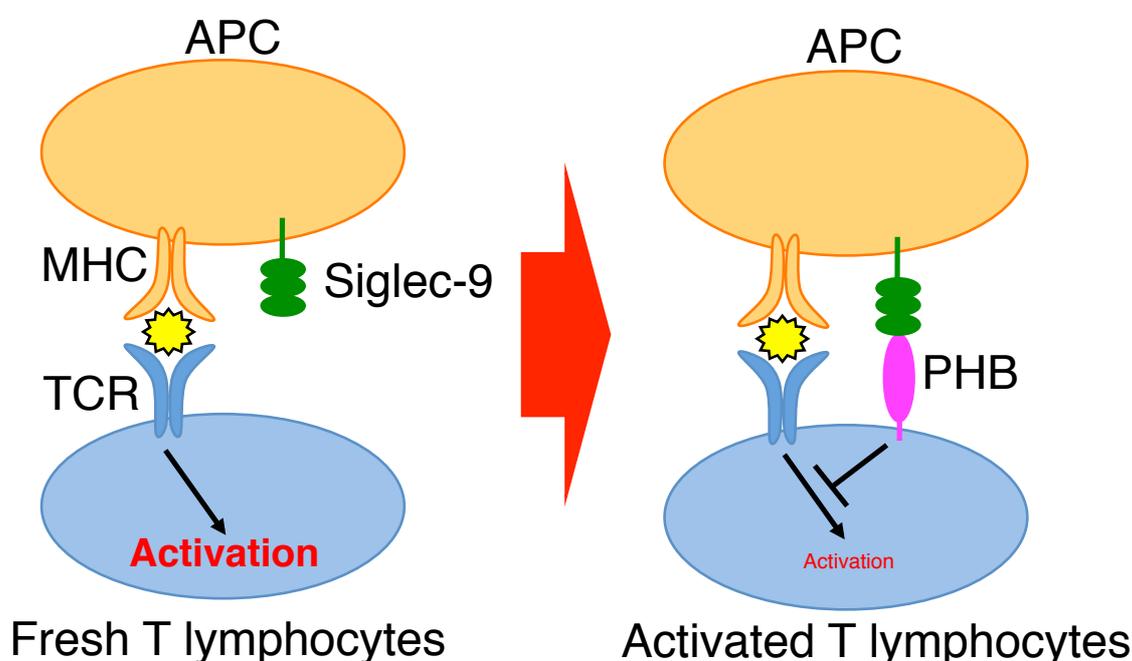


図 13 抗原提示における Siglec-9 を介する新たな活性化調節機構モデル

抗原提示細胞 (APC) に発現した Siglec-9 と活性化した T 細胞上に発現した PHB による新たな調節機構を示す。

5：謝辞

終わりに臨み、本研究に終始御懇意なる御指導と御鞭撻を承りました恩師京都産業大学工学部中田博教授に深甚の謝意を表します。本研究に種々の有益なる御助言を賜りました井上瑞江氏、戸田宗豊氏、秋田薫氏に深く感謝致します。また、本研究に対し種々のご協力を頂いた当研究室の諸氏に感謝致します。

さらに、本研究における種々の有益なる御助言を賜りました、愛知県がんセンター研究所葛島清隆教授、岡村文子博士に深く感謝致します。

6 : 引用文献

- 1 Daniels, M. A., Hogquist, K. A. and Jameson, S. C. (2002) Sweet 'n' sour: the impact of differential glycosylation on T cell responses. *Nat. Immunol.* **3**, 903-910
- 2 Sperandio, M., Gleissner, C. A. and Ley, K. (2009) Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* **230**, 97-113
- 3 Rabinovich, G. A. and Toscano, M. A. (2009) Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 338-352
- 4 Crocker, P. R., Paulson, J. C. and Varki, A. (2007) Siglecs and their roles in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 255-266
- 5 Varki, A. and Angata, T. (2006) Siglecs--the major subfamily of I-type lectins. *Glycobiology.* **16**, 1R-27R
- 6 Cao, H. and Crocker, P. R. (2011) Evolution of CD33-related siglecs: regulating host immune functions and escaping pathogen exploitation? *Immunology.* **132**, 18-26
- 7 Jones, C., Virji, M. and Crocker, P. R. (2003) Recognition of sialylated meningococcal lipopolysaccharide by siglecs expressed on myeloid cells leads to enhanced bacterial uptake. *Mol. Microbiol.* **49**, 1213-1225
- 8 Avril, T., Wagner, E. R., Willison, H. J. and Crocker, P. R. (2006) Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin 7 mediates selective recognition of sialylated glycans expressed on *Campylobacter jejuni* lipooligosaccharides. *Infect. Immun.* **74**, 4133-4141
- 9 Carlin, A. F., Chang, Y.-C., Areschoug, T., Lindahl, G., Hurtado-Ziola, N., King, C. C., Varki, A. and Nizet, V. (2009) Group B *Streptococcus* suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J. Exp. Med.* **206**, 1691-1699
- 10 Lock, K., Zhang, J., Lu, J., Lee, S. H. and Crocker, P. R. (2004) Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology.* **209**, 199-207
- 11 Crocker, P. R. (2004) CD33-related Siglecs in the immune system. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **16**, 357-370
- 12 Crocker, P. R., Mucklow, S., Bouckson, V., McWilliam, A., Willis, A. C., Gordon, S., Milon, G., Kelm, S. and Bradfield, P. (1994) Sialoadhesin, a macrophage sialic acid binding receptor for haemopoietic cells with 17 immunoglobulin-like domains. *EMBO J.* **13**, 4490-4503
- 13 Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovic, I. and Bevilacqua, M. P. (1994) Cytokine-induced beta-galactoside alpha-2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates alpha

- 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J. Biol. Chem.* **269**, 10637-10643
- 14 Powell, L. D., Jain, R. K., Matta, K. L., Sabesan, S. and Varki, A. (1995) Characterization of sialyloligosaccharide binding by recombinant soluble and native cell-associated CD22. Evidence for a minimal structural recognition motif and the potential importance of multisite binding. *J. Biol. Chem.* **270**, 7523-7532
- 15 Stamenkovic, I. and Seed, B. (1990) The B-cell antigen CD22 mediates monocyte and erythrocyte adhesion. *Nature*. **345**, 74-77
- 16 Engel, P., Nojima, Y., Rothstein, D., Zhou, L. J., Wilson, G. L., Kehrl, J. H. and Tedder, T. F. (1993) The same epitope on CD22 of B lymphocytes mediates the adhesion of erythrocytes, T and B lymphocytes, neutrophils, and monocytes. *J. Immunol.* **150**, 4719-4732
- 17 Sgroi, D., Koretzky, G. A. and Stamenkovic, I. (1995) Regulation of CD45 engagement by the B-cell receptor CD22. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 4026-4030
- 18 Tuscano, J., Engel, P., Tedder, T. F. and Kehrl, J. H. (1996) Engagement of the adhesion receptor CD22 triggers a potent stimulatory signal for B cells and blocking CD22/CD22L interactions impairs T-cell proliferation. *Blood*. **87**, 4723-4730
- 19 Lanoue, A., Batista, F. D., Stewart, M. and Neuberger, M. S. (2002) Interaction of CD22 with alpha2,6-linked sialoglycoconjugates: innate recognition of self to dampen B cell autoreactivity? *Eur. J. Immunol.* **32**, 348-355
- 20 Wu, C., Rauch, U., Korpos, E., Song, J., Loser, K., Crocker, P. R. and Sorokin, L. M. (2009) Sialoadhesin-positive macrophages bind regulatory T cells, negatively controlling their expansion and autoimmune disease progression. *J. Immunol.* **182**, 6508-6516
- 21 Rossi, M. and Young, J. W. (2005) Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* **175**, 1373-1381
- 22 Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. and Alber, G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* **184**, 747-752
- 23 Luft, T., Jefford, M., Luetjens, P., Hochrein, H., Masterman, K.-A., Maliszewski, C., Shortman, K., Cebon, J. and Maraskovsky, E. (2002) IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J. Immunol.* **168**, 713-722
- 24 Klinman, D. M., Yi, A. K., Beaucage, S. L., Conover, J. and Krieg, A. M. (1996) CpG motifs

- present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2879-2883
- 25 Kidd, P. (2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**, 223-246
- 26 Hinderhofer, M., Walker, C. A., Friemel, A., Stuermer, C. A. O., Möller, H. M. and Reuter, A. (2009) Evolution of prokaryotic SPFH proteins. *BMC Evol. Biol.* **9**, 10
- 27 Back, J., Sanz, M. and Jong, L. D. (2002) A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry. *Protein Sci.* **11**, 2471-2478
- 28 Mishra, S., Murphy, L. C. and Murphy, L. J. (2006) The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med.* **10**, 353-363
- 29 Mishra, S., Ande, S. R. and Nyomba, B. L. G. (2010) The role of prohibitin in cell signaling. *FEBS J.* **277**, 3937-3946
- 30 Mishra, S., Murphy, L. C., Nyomba, B. and Murphy, L. J. (2005) Prohibitin: a potential target for new therapeutics. *Trends Mol. Med.* **11**, 192-197
- 31 Fusaro, G., Dasgupta, P., Rastogi, S., Joshi, B. and Chellappan, S. (2003) Prohibitin induces the transcriptional activity of p53 and is exported from the nucleus upon apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.* **278**, 47853-47861
- 32 Wang, S., Nath, N., Fusaro, G. and Chellappan, S. (1999) Rb and prohibitin target distinct regions of E2F1 for repression and respond to different upstream signals. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7447-7460
- 33 Montano, M. M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P. and Katzenellenbogen, B. S. (1999) An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6947-6952
- 34 Sharma, A. and Qadri, A. (2004) Vi polysaccharide of *Salmonella typhi* targets the prohibitin family of molecules in intestinal epithelial cells and suppresses early inflammatory responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 17492-17497
- 35 Kolonin, M. G., Saha, P. K., Chan, L., Pasqualini, R. and Arap, W. (2004) Reversal of obesity by targeted ablation of adipose tissue. *Nat. Med.* **10**, 625-632
- 36 He, B., Feng, Q., Mukherjee, A., Lonard, D. M., DeMayo, F. J., Katzenellenbogen, B. S., Lydon, J. P. and O'Malley, B. W. (2008) A repressive role for prohibitin in estrogen signaling.

- Mol. Endocrinol.* **22**, 344-360
- 37 Park, S.-E., Xu, J., Frolova, A., Liao, L., O'Malley, B. W. and Katzenellenbogen, B. S. (2005) Genetic deletion of the repressor of estrogen receptor activity (REA) enhances the response to estrogen in target tissues in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1989-1999
- 38 Rajalingam, K., Wunder, C., Brinkmann, V., Churin, Y., Hekman, M., Sievers, C., Rapp, U. R. and Rudel, T. (2005) Prohibitin is required for Ras-induced Raf-MEK-ERK activation and epithelial cell migration. *Nat. Cell Biol.* **7**, 837-843
- 39 Blixt, O., Collins, B. E., van den Nieuwenhof, I. M., Crocker, P. R. and Paulson, J. C. (2003) Sialoside specificity of the siglec family assessed using novel multivalent probes: identification of potent inhibitors of myelin-associated glycoprotein. *J. Biol. Chem.* **278**, 31007-31019
- 40 Nuell, M. J., Stewart, D. A., Walker, L., Friedman, V., Wood, C. M., Owens, G. A., Smith, J. R., Schneider, E. L., Dell'Orco, R. and Lumpkin, C. K. (1991) Prohibitin, an evolutionarily conserved intracellular protein that blocks DNA synthesis in normal fibroblasts and HeLa cells. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 1372-1381
- 41 Angata, T. and Varki, A. (2000) Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways. *J. Biol. Chem.* **275**, 22127-22135
- 42 Rajendran, L., Masilamani, M., Solomon, S., Tikkanen, R., Stuermer, C. A. O., Plattner, H. and Illges, H. (2003) Asymmetric localization of flotillins/reggies in preassembled platforms confers inherent polarity to hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8241-8246
- 43 Liu, J., Deyoung, S. M., Zhang, M., Dold, L. H. and Saltiel, A. R. (2005) The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**, 16125-16134
- 44 Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A. J., Brown, J. A., Nunes, R. and others. (2001) PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat. Immunol.* **2**, 261-268
- 45 Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. and Mak, T. W. (1995) Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science.* **270**, 985-988

- 46 Nakaseko, C., Miyatake, S., Iida, T., Hara, S., Abe, R., Ohno, H., Saito, Y. and Saito, T. (1999) Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) engagement delivers an inhibitory signal through the membrane-proximal region in the absence of the tyrosine motif in the cytoplasmic tail. *J. Exp. Med.* **190**, 765-774
- 47 Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. and Honjo, T. (1996) Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* **8**, 765-772
- 48 Kremer, J., Westhovens, R. and Leon, M. (2003) Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4Ig. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1907-1915
- 49 Fife, B. T. and Bluestone, J. A. (2008) Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* **224**, 166-182
- 50 Whitehurst, C. E. and Geppert, T. D. (1996) MEK1 and the extracellular signal-regulated kinases are required for the stimulation of IL-2 gene transcription in T cells. *J. Immunol.* **156**, 1020-1029
- 51 Owaki, H., Varma, R., Gillis, B., Bruder, J. T., Rapp, U. R., Davis, L. S. and Geppert, T. D. (1993) Raf-1 is required for T cell IL2 production. *EMBO J.* **12**, 4367-4373
- 52 Tsukamoto, H., Irie, A. and Nishimura, Y. (2004) B-Raf contributes to sustained extracellular signal-regulated kinase activation associated with interleukin-2 production stimulated through the T cell receptor. *J. Biol. Chem.* **279**, 48457-48465
- 53 Patel, N., Brinkman-Van der Linden, E. C., Altmann, S. W., Gish, K., Balasubramanian, S., Timans, J. C., Peterson, D., Bell, M. P., Bazan, J. F., Varki, A. and Kastelein, R. A. (1999) OB-BP1/Siglec-6. a leptin- and sialic acid-binding protein of the immunoglobulin superfamily. *J. Biol. Chem.* **274**, 22729-22738
- 54 Winter, A., Kämäräinen, O. and Hofmann, A. (2007) Molecular modeling of prohibitin domains. *Proteins.* **68**, 353-362
- 55 Toscano, M. A., Bianco, G. A., Ilarregui, J. M., Croci, D. O., Correale, J., Hernandez, J. D., Zwirner, N. W., Poirier, F., Riley, E. M., Baum, L. G. and Rabinovich, G. A. (2007) Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat. Immunol.* **8**, 825-834
- 56 Comelli, E. M., Sutton-Smith, M., Yan, Q., Amado, M., Panico, M., Gilmartin, T., Whisenant, T., Lanigan, C. M., Head, S. R., Goldberg, D., Morris, H. R., Dell, A. and Paulson, J. C. (2006)

- Activation of murine CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes leads to dramatic remodeling of N-linked glycans. *J. Immunol.* **177**, 2431-2440
- 57 Van Dyken, S. J., Green, R. S. and Marth, J. D. (2007) Structural and mechanistic features of protein O glycosylation linked to CD8⁺ T-cell apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1096-1111
- 58 Priatel, J. J., Chui, D., Hiraoka, N., Simmons, C. J., Richardson, K. B., Page, D. M., Fukuda, M., Varki, N. M. and Marth, J. D. (2000) The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8⁺ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis. *Immunity.* **12**, 273-283
- 59 Redelinghuys, P., Antonopoulos, A., Liu, Y., Campanero-Rhodes, M. A., McKenzie, E., Haslam, S. M., Dell, A., Feizi, T. and Crocker, P. R. (2011) Early murine T-lymphocyte activation is accompanied by a switch from N-glycolyl- to N-acetyl-neuraminic acid and generation of ligands for siglec-E. *J. Biol. Chem.* **286**, 34522-34532
- 60 Collins, B. E., Blixt, O., DeSieno, A. R., Bovin, N., Marth, J. D. and Paulson, J. C. (2004) Masking of CD22 by cis ligands does not prevent redistribution of CD22 to sites of cell contact. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 6104-6109
- 61 Vessal, M., Mishra, S., Moulik, S. and Murphy, L. J. (2006) Prohibitin attenuates insulin-stimulated glucose and fatty acid oxidation in adipose tissue by inhibition of pyruvate carboxylase. *FEBS J.* **273**, 568-576
- 62 Wang, Y. and Morrow, J. S. (2000) Identification and characterization of human SLP-2, a novel homologue of stomatin (band 7.2b) present in erythrocytes and other tissues. *J. Biol. Chem.* **275**, 8062-8071
- 63 Kirchhof, M. G., Chau, L. a., Lemke, C. D., Vardhana, S., Darlington, P. J., Márquez, M. E., Taylor, R., Rizkalla, K., Blanca, I., Dustin, M. L. and Madrenas, J. (2008) Modulation of T cell activation by stomatin-like protein 2. *J. Immunol.* **181**, 1927-1936
- 64 Christie, D. A., Lemke, C. D., Elias, I. M., Chau, L. A., Kirchhof, M. G., Li, B., Ball, E. H., Dunn, S. D., Hatch, G. M. and Madrenas, J. (2011) Stomatin-like protein 2 binds cardiolipin and regulates mitochondrial biogenesis and function. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3845-3856
- 65 Kane, L. P., Lin, J. and Weiss, A. (2000) Signal transduction by the TCR for antigen. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 242-249
- 66 Marshall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* **80**, 179-185
- 67 Genot, E. and Cantrell, D. A. (2000) Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 289-294

- 68 Hagemann, C. and Rapp, U. R. (1999) Isotype-specific functions of Raf kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 34-46
- 69 Brummer, T. (2002) Inducible gene deletion reveals different roles for B-Raf and Raf-1 in B-cell antigen receptor signalling. *EMBO J.* **21**, 5611-5622
- 70 Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. and Honjo, T. (1992) Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* **11**, 3887-3895