

## ムチンをリガンドとする免疫抑制情報のシグナル伝達機構

戸 田 宗 豊  
中 田 博

### 要 旨

ヒトバーキットリンパ腫由来細胞株Daudi細胞を用いて、上皮性癌細胞の産生するムチンがB細胞表面に特異的に発現するレクチンCD22と結合し、その結果としてB細胞に抑制性のシグナルが伝達される可能性を示してきた。本年度は、実際に担癌患者の生体内においてこれらの現象が起こりうることを確かめるために、癌細胞の転移したのリンパ節の凍結切片におけるB細胞とムチンとの分布について調べた。その結果、CD22を発現している細胞の近傍にムチンが分布するケースもあり、分子レベルでの相互作用が可能であることがわかった。

また、上皮性癌細胞の産生するムチン存在下でDaudi細胞を抗IgM F(ab')<sub>2</sub>で刺激すると、非存在下に比べ濃度依存的にMAPKのリン酸化が阻害されることがわかった。このことは、ムチン存在下では抗原刺激によるB細胞の増殖、分化が抑制されることを示唆している。

### 1. はじめに

腫瘍形成の初期段階において、がん遺伝子、がん抑制遺伝子、あるいはアポトーシスなどの関連経路の変化が起こることが広く知られている。また、グリコシル化の変化もよく知られた現象であり、臨床において特定のグリカン構造が腫瘍の進行度を表すマーカーとして用いられている。腫瘍細胞に起こるグリコシル化の変化は様々で、例としてN-グリカン分枝構造の変化、シアル酸の結合様式、量およびアセチル化修飾の変化、グリコサミノグリカンの発現変化などが挙げられる<sup>1,2,3)</sup>。

ムチンは多様な糖鎖構造を持つ高分子の糖タンパク質で、細胞膜糖タンパク質や分泌糖タンパク質として存在する。正常な上皮細胞ではムチンはアピカル側からのみ分泌されているが、悪性化に伴い極性が失われた上皮細胞では細胞表面全てから分泌されるようになり、その結果として器官の内腔以外の空間や体液中にも見いだされるようになる。癌化した上皮由来の細胞が産生するムチンは、グリコシル化の変化により、胎児組織を除く正常細胞ではほとんど発現されない癌関連糖鎖抗原を含む多様なO-グリカン側鎖を持つようになる。また、その発現量も増加することが知られている<sup>4,5)</sup>。一般に、癌患者におけるムチンの血中濃度と生存率は逆相関することが知られている<sup>6,7)</sup>。マウスを用いたモデル実験では、マウス乳がん細胞が産生する

ムチン様分子エビグリカニンを経注することにより、免疫能力の低下および生存率の低下が認められている<sup>8)</sup>。これらの報告から、血中のムチンが血中成分と相互作用しうる血球系細胞や血管内皮細胞に何らかの影響を与え、免疫能力を低下させていると考えられるが、その分子機構についてはほとんど解明されていない。

血球細胞の細胞表面には様々なレクチンが存在する。このうち、シグレックファミリーに属するレクチンは、シアル酸を含む糖鎖を認識する性質を持つ<sup>9)</sup>。

CD22 (Siglec-2)はシグレックファミリーに属し、N-グリカン上の $\alpha$ 2-6 sialyl lactosamineやO-グリカン上のシアリルTn抗原に結合することが報告されている<sup>10)</sup>。また、CD22はB細胞に特異的に発現し、BCR (B cell receptor)の共受容体として知られている。ヒトではプロB細胞、プレB細胞の細胞質内にまず発現し、IgM陽性B細胞ではIgDとほぼ同時期に細胞表面に発現され、形質細胞に分化すると消失する。図1に示すように、CD22は細胞質外に7個のIgドメイン(1個のVドメインと6個のC2ドメイン)をもつ型膜タンパク質で、分子量は130～140 kDaである。細胞内ドメインは約140アミノ酸からなり、6個のチロシン残基を持つ。このうち4つはITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) に位置する<sup>11)</sup>。ITIM相同性領域のチロシン残基がリン酸化されると、SHP-1 (Src homology-2 containing tyrosine phosphatase-1)がSH2ドメインを介して結合する。結合したSHP-1は、BCRシグナルの抑制に働く(図1)。

CD22の生理的リガンドとしてはCD45やsIgなどが報告されているが<sup>12,13)</sup>、明確ではない。

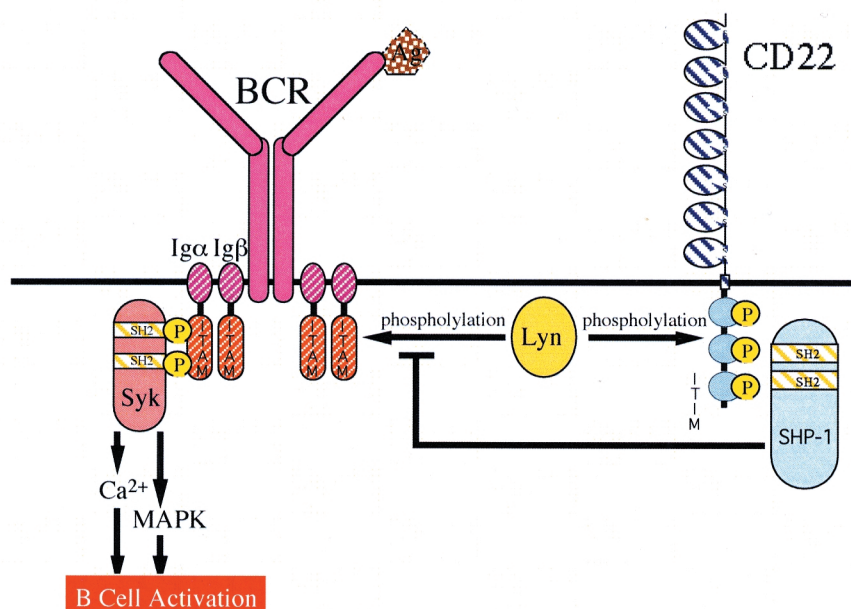


図1 BCRおよびCD22を介した情報伝達

BCRに抗原が結合するとチロシンキナーゼが活性化され、リン酸化が亢進する。B細胞が活性化される一方、CD22のリン酸化はSHP-1をリクルートし、活性化の情報伝達を抑制する。

CD22をはじめシグレックファミリーに属するレクチンは、リガンドとなる糖鎖としてシアル酸を末端に持つことが必須であるが、結合様式や修飾の違いにより結合力に差があることが報告されている<sup>9)</sup>。シグレックファミリーに属する他の分子と同じくCD22も癌関連糖鎖抗原の一つであるシアリルTn抗原を認識することから<sup>10)</sup>、我々は上皮性癌の担癌状態にある患者において、生理的なりガンドとしてムチン上のシアリルTn抗原が結合する可能性があると考えた。また、ムチン上にはシアリルTn抗原以外にもシアル酸を含有する様々な糖鎖構造が存在し、これらも結合する可能性がある。このことから、シアル酸を多く含有するムチンは、シグレックを介して免疫抑制に働く可能性が高いと考えられる。

昨年度までに、ヒト腸癌細胞株LS180の産生するムチンを精製し、遺伝子改変CD22を用い

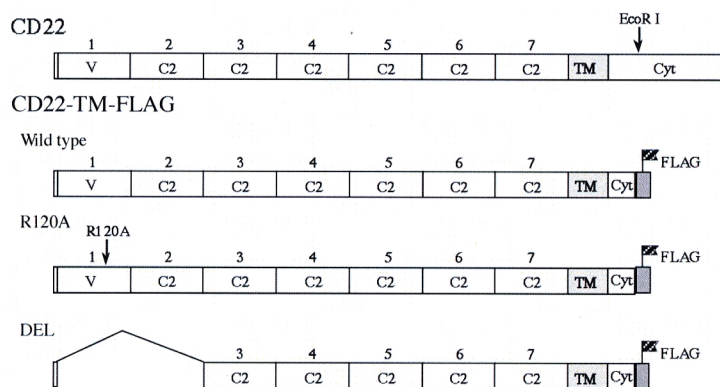


図2 遺伝子改変human CD22の作製

上図に示すようなCD22にFLAG Tagをもつ遺伝子改変CD22を作製した。

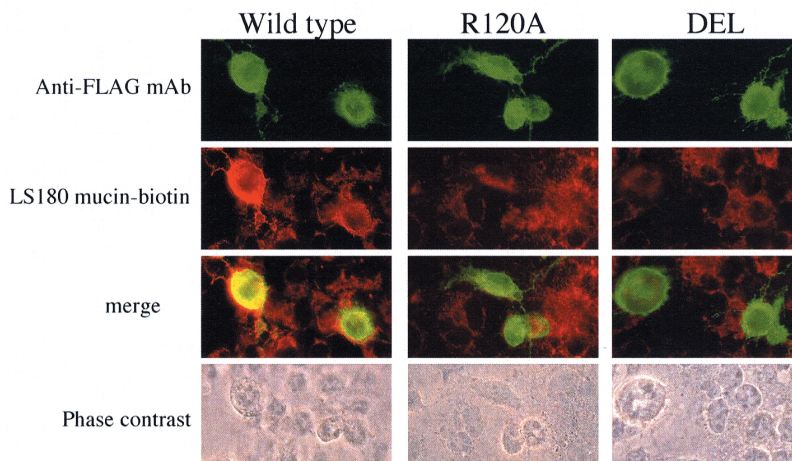


図3 遺伝子改変CD22発現細胞へのムチンの結合

図2に示した遺伝子改変CD22を一過性に発現させたCos 7細胞に、ビオチン化したムチンを加えて1時間インキュベート後、蛍光標識したアビジンを用いて細胞表面に結合したムチンを検出した。

て腫瘍ムチンとCD22が結合することを示した(図2, 3). また, 腫瘍ムチンがヒトバーキットリンパ腫由来細胞株Daudi細胞に与える影響を調べたところ, Daudi細胞に腫瘍ムチンを添加することによりDaudi細胞表面上に発現しているCD22のチロシンリン酸化およびSHP-1のリクルートが亢進することがわかった(図4). 本年度は, ムチンとCD22の結合がB細胞に与える生物学的効果について検討するために, ムチンのBCRを介する情報伝達へ与える影響について調べた. また, 実際の担癌患者におけるムチンとB細胞表面上のCD22との結合について組織化学的手法を用いて検討した.

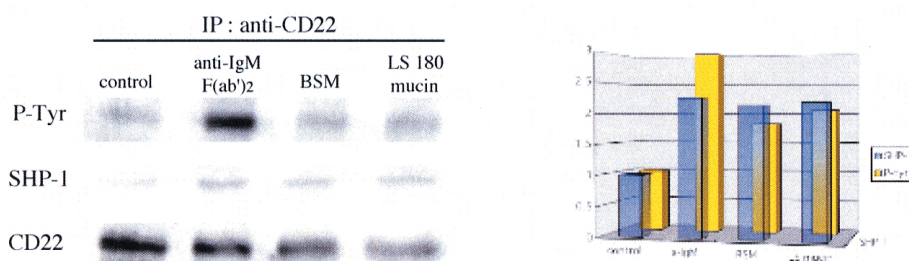


図4 ムチンによるCD22のリン酸化, SHP-1のリクルート

Daudi細胞 ( $5 \times 10^6$  cells) 培養液に抗IgM F(ab')<sub>2</sub>, BSMあるいはLS180細胞より精製したムチンを加え, 1分後に細胞を回収した. 細胞の可溶化物に抗CD22抗体を加え, 免疫沈降した.

CD22の免疫沈降物を回収し, 三分して抗CD22抗体, 抗リン酸化チロシン抗体, 抗SHP-1抗体を用いて検出した.

## 2. BCRを介する情報伝達へのムチンの影響

BCRに抗原が結合するとBCRを構成するCD79a (Ig $\alpha$ ), CD79b (Ig $\beta$ )のITAMモチーフのチロシン残基がリン酸化される<sup>(4)</sup>. リン酸化されたITAMモチーフにSykが結合し, リン酸化のカスケードを介してB細胞の活性化が起こる. CD22はBCRの共受容体であり, この活性化シグナルを負に調節している(図1). 昨年度までに, 腫瘍ムチンがCD22に結合することによりCD22の細胞質内領域に存在するITIMモチーフのチロシン残基のリン酸化およびSHP-1のリクルートが亢進することを明らかにした. このことは, 腫瘍ムチンがCD22に結合することによりB細胞活性化のシグナルを抑制していると考えられる. そこで, B細胞活性化の情報伝達カスケードの下流に位置するMAPKのリン酸化に与えるムチンの影響について調べた. Daudi細胞 ( $5 \times 10^6$  細胞) に腫瘍ムチン, アシアロ腫瘍ムチンを加えて37℃, 5分間インキュベートした後, 抗ヒトIgM F(ab')<sub>2</sub> (5 $\mu$ g/ml)を加えた. さらに, 37℃, 3分間インキュベートした後, 遠心分離により細胞を回収した. 回収した細胞をSDS-PAGE試料用緩衝液により可溶化した. このようにして得られた細胞抽出液を10%ポリアクリルアミドゲル電気泳動し, ウェスタンブロッティングによりPVDF膜に転写した. 膜を抗リン酸化MAPK抗体または抗MAPK抗体と反応



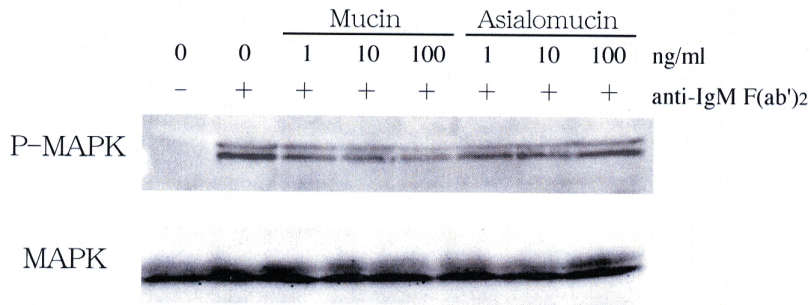


図5 ムチンによるMAPKのリン酸化の阻害

Daudi細胞 ( $2 \times 10^6$  cells) 培養液に, LS180細胞より精製したムチンあるいはアシアロムチンを0 ~ 100 ng 加えて37℃, 5分間インキュベートした。さらに, 抗IgM F(ab')<sub>2</sub>を加え, 3分間インキュベート後に細胞を回収した。細胞の可溶化物を二分してSDS-PAGE, ウエスタンブロッティング後, 抗MAPK抗体, 抗リン酸化MAPK抗体を用いて検出した。

させた後, ペルオキシダーゼ標識した抗マウスIgG抗体または抗ウサギIgG抗体を用いて検出した。図5に示すように, 腫瘍ムチン存在下では, 濃度依存的にMAPKのリン酸化が抑制された。これに対し, アシアロ腫瘍ムチンでは抑制が見られなかった。このことから, 腫瘍ムチン存在下では抗原刺激によるB細胞の活性化が抑制され, また, この抑制効果にはシアル酸が関与していることが示された。Daudi細胞に腫瘍ムチンを添加することによりDaudi細胞表面上に発現しているCD22のチロシンリン酸化およびSHP-1のリクルートが亢進すること(図4)とあわせると, この抑制効果はムチン上のシアル酸残基とCD22の相互作用による結果であると考えられる。

### 3. 癌細胞の転移したリンパ節におけるムチンとB細胞の分布

上記したように *in vitro* において, 腫瘍ムチンがB細胞の活性化シグナルを抑制することが示唆された。次に, 実際の生体内においてこのような現象が起こりうるかどうかについて検討した。胃癌患者のリンパ節の凍結切片を作成し, CD22とムチンの分布をCD22に対する抗体およびシアリルTn抗原に対する抗体 (MLS132) を用いて染色した。図6に示すように, CD22は以前の報告と一致して<sup>15)</sup> マントルゾーン (暗殻層) に強い発現がみられた。転移がみられるリンパ節 (図6: a ~ i) においては, その近傍にムチンを高発現する腫瘍細胞が観察された (図6: d ~ f, 矢印)。比較的転移の少ないリンパ節 (図6: j ~ r) においても, 暗殻層の周辺にムチン産生腫瘍細胞がみられた (図6: m ~ o, 矢印)。このことから, 実際の癌患者の生体内においてムチンがB細胞の活性化シグナルを抑制している可能性が示唆された。また腫瘍細胞に比べてはるかに低いレベルではあるが, 以前に報告されているように<sup>16)</sup>, 胚中心においてもムチンの発現がみられた。これは, 濾胞樹状細胞 (Follicular dendritic cell) が発現している

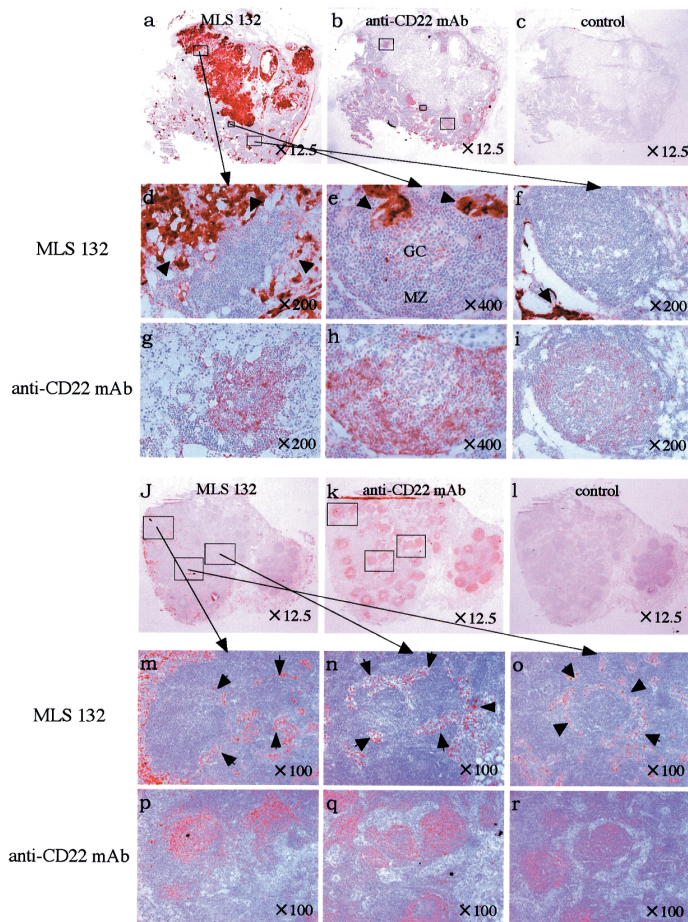


図6 担癌患者リンパ節におけるB細胞とムチン産生腫瘍細胞の分布

担癌患者リンパ節の凍結切片をモノクローナル抗体 MLS132 (抗シアリルTn抗体) または抗CD22抗体をもちいて免疫染色した。CD22発現B細胞は、主に暗殻層 (Mantle zone: MZ) に分布していた (g, h, i, p, q, r)。転移が認められるリンパ節 (a ~ h) において、ムチンはその近傍に分布していた (d ~ f)。比較的転移の少ない担癌患者リンパ節 (j ~ r) においても、暗殻層を囲むようにムチンが分布していた (m ~ o: 矢印)。GC: 胚中心 (germinal center)。

MUC1であることが知られている。その機能については明らかにされていないが、腫瘍ムチンのB細胞活性化シグナル抑制と同様の機構で、B細胞の分化、増殖を調節している可能性もある。

#### 4. 癌患者リンパ節におけるB細胞のアポトーシス

癌細胞の転移したリンパ節において、がん細胞の産生するムチンとB細胞表面上のCD22が相互作用することが示唆されたが、次に、この相互作用が生物学的にどのような結果をもたらすかが問題となる。リンパ節の胚中心において、低い抗原親和性しか有さないクローンや自己

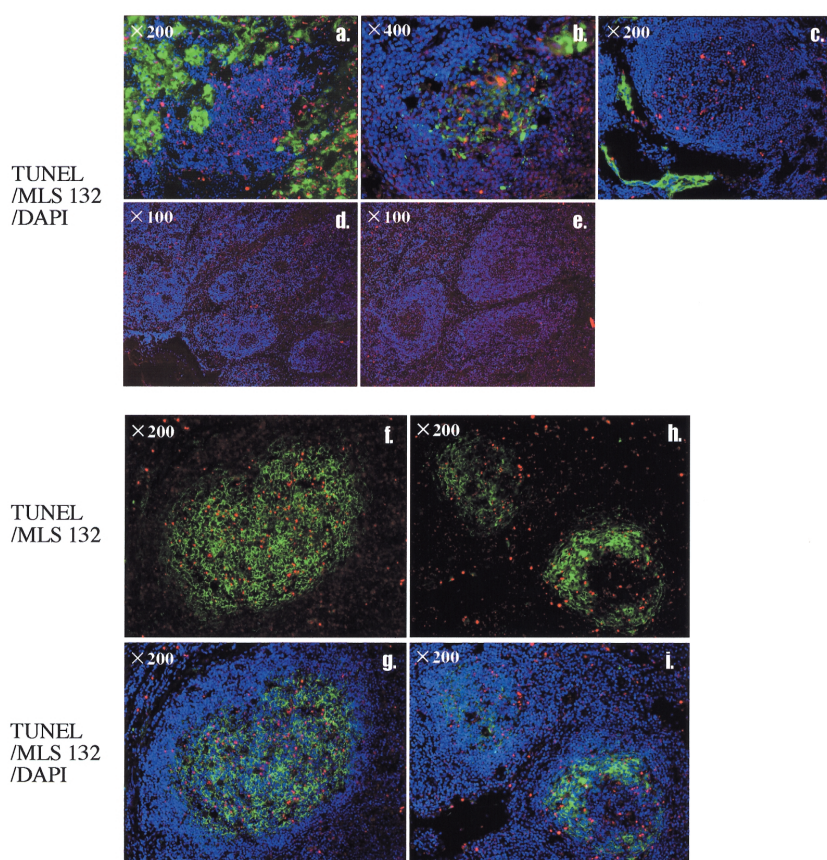


図7 担癌患者リンパ節におけるアポトーシス

担癌患者リンパ節においてアポトーシスを起こしている細胞をTUNEL法により検出した（赤色）。同時に、モノクローナル抗体 MLS132をもちいてムチンを（緑色）、DAPIにより核をそれぞれ染色した（青色）。a～c；ムチン産生腫瘍細胞近傍のリンパ濾胞，d，e；転移の認められないリンパ節のリンパ濾胞，f～i；転移は認められないが胚中心がMLS132で強く染色されている（濾胞樹状細胞がMUC 1を高発現している）リンパ節のリンパ濾胞。

反応性クローンはアポトーシスにより除去されると考えられている<sup>17)</sup>。このことから、腫瘍ムチンによるB細胞の活性化シグナルに対する抑制効果は、抗原に対するB細胞の反応性を低下させ、その結果としてアポトーシスを引き起こすという可能性が考えられる。この可能性について、TUNEL法を用いて検討した。図7 a～cに示すように、ムチンを高発現する腫瘍細胞付近の胚中心において高頻度のアポトーシスがみられた。前述のように、胚中心はB細胞選択の場であり、アポトーシスがよく観察される組織構造として知られている。しかしながら、腫瘍細胞近傍の胚中心では、転移の認められないリンパ節の胚中心（図7：d，e）に比べ、有意にB細胞のアポトーシスが増加していた。この現象がムチンによる影響であるという直接の証拠はないが、これまでの実験結果からその可能性は十分考えられる。また、転移はみとめられな

いが、胚中心部分がシアリルTn抗原に対する抗体で強い染色像がみられる担癌患者のリンパ節（図7：f～i）において、リンパ濾胞におけるアポトーシスが多く認められることも、この可能性を示唆している。前述のように、正常組織においては濾胞樹状細胞（Follicular dendritic cell）が発現しているMUC1が、腫瘍ムチンのB細胞活性化シグナル抑制と同様の機構で、B細胞の分化、増殖を調節しているのかもしれない。

## 5. ま と め

- (1) 腫瘍ムチン存在下では、濃度依存的にMAPKのリン酸化が抑制された。これに対し、アシアロ腫瘍ムチンでは抑制が見られなかった。このことから、腫瘍ムチン存在下では抗原刺激によるB細胞の活性化が抑制され、また、この抑制効果にはシアル酸が関与していることが示された。
- (2) 担癌患者のリンパ節において、マントルゾーン（暗殻層）にCD22発現B細胞がみられた。転移がみられるリンパ節において、その近傍に腫瘍細胞の産生したムチンが観察された。このことは、実際の担癌患者の生体内においてムチンがB細胞の活性化シグナルを抑制している可能性を示唆している。
- (3) 腫瘍細胞近傍に位置するリンパ濾胞の胚中心では、有意にB細胞のアポトーシスが増加していた。この現象がムチンによる影響であるという直接の証拠はないが、これまでの実験結果からその可能性は十分考えられる。

## 6. 展 望

担癌患者のリンパ節において、腫瘍細胞の産生するムチンとCD22を高発現するB細胞が近傍に位置することが明らかとなり、実際の担癌患者の生体内においてムチンがB細胞の活性化シグナルを抑制している可能性が示唆された。また、ムチンがB細胞活性化のシグナルを抑制していることも確かめられた。しかしながら、その機構の詳細についてはまだ不明の点が多く、さらなる研究が必要である。現在、培養細胞を用いてムチンのB細胞活性化のシグナル抑制効果の機構を解析中である。

## 参 考 文 献

- 1) Kim, Y.J. and Varki, A. (1997). Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glycoconj J.*, **14**: 569-76.
- 2) Bhaumik, M., Harris, T., Sundaram, S., Johnson, L., Guttenplan, J., Rogler, C., Stanley, P. (1998)



- Progression of hepatic neoplasms is severely retarded in mice lacking the bisecting N-acetylglucosamine on N-glycans: evidence for a glycoprotein factor that facilitates hepatic tumor progression. *Cancer Res.* **58**: 2881-7.
- 3) Dennis, J.W. (1992). Changes in glycosylation associated with malignant transformation and tumor progression. In *Cell surface carbohydrates and cell development* (ed. Fukuda, M.), pp.161-194.
  - 4) Kim, Y.S., Gum, J. and Brockhausen, I. (1996). Mucin glycoproteins in neoplasia. *Glycoconj J.*, **13**: 693-707.
  - 5) Taylor-Papadimitriou, J. and Finn, O.J. (1997). Biology, biochemistry and immunology of carcinoma-associated mucins. *Immunol. Today* **18**: 105-107.
  - 6) Kobayashi, H., Terao, T. and Kawashima, Y. (1992). Serum sialyl Tn as an independent predictor of poor prognosis in patients with epithelial ovarian cancer. *J Clin. Oncol.*, **10**: 95-101.
  - 7) Nakamori, S., Kameyama, M., Inaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Kabuto, T., Iwanaga, T., Matsushita, Y. and Irimura, T. (1993). Increased expression of sialyl Lewis X antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma : clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res.*, **52**: 3632-3637.
  - 8) Fung, P.Y.S. and Longenecker, B.M. (1991). Specific immunosuppressive activity of epiglycanin, a mucin-like glycoprotein secreted by a murine mammary adenocarcinoma (TA3-HA). *Cancer Res.*, **51**: 1170-1176.
  - 9) Crocker, P.R. and Varki, A. (2001). Siglecs, sialic acids and innate immunity. *TRENDS in Immunology*, **28**: 337-342.
  - 10) Brinkman, E.C.M. and Varki, A. (2000). New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. *J. Biol. Chem.*, **275**: 8625-8632.
  - 11) Tedder, T. F., Tuscano, J., Sato, S. and Kehrl, J.H. (1997). CD22 a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 481-504.
  - 12) Stamenkovic, I., Sgroi, D., Aruffo, A., Sy, M.S. and Anderson, T. (1991). The B lymphocyte adhesion molecule CD22 interacts with leukocyte common antigen CD45RO on T cells and alpha 2-6 sialyltransferase, CD75, on B cells. *Cell*, **66**: 1133-44.
  - 13) Hanasaki, K., Powell, L.D. and Varki, A. (1995). Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. *J. Biol. Chem.*, **270**: 7543-50.
  - 14) Cambier, J.C., Pleiman, C.M., Clark, M.R. (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol.* **12**: 457-86.
  - 15) Dorken, B., Moldenhauer, G., Pezzutto, A., Schwartz, R., Feller, A., Kiesel, S., Nadler, L.M. (1986). HD39 (B3), a B lineage-restricted antigen whose cell surface expression is limited to resting and activated human B lymphocytes. *J Immunol.* **136**: 4470-9.
  - 16) Kamoshida, S. and Tsutsumi, Y. (1998). Expression of MUC-1 glycoprotein in plasma cells, follicular dendritic cells, myofibroblasts and perineurial cells: Immunohistochemical analysis using three monoclonal antibodies. *Pathol. Int.* **48**: 776-785.
  - 17) MacLennan, I.C.M. (1994). Germinal centers. *Annu Rev Immunol.* **12**: 117-39.