

担癌マウスにおける免疫機能の低下の分子的背景について

中 田 博

京都産業大学工学部生物工学科

久 野 理 沙

京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻

圓 山 浩 二

京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻

万 木 肇

京都産業大学大学院工学研究科生物工学専攻

井 上 瑞 江

京都産業大学工学部生物工学科 (客員研究員)

戸 田 宗 豊

京都産業大学工学部生物工学科 (客員研究員)

要 旨

シグレック 2 は、B 細胞情報伝達を抑制する分子で $\alpha 2,6$ 結合のシアル酸をもつ糖鎖に結合する。その中にはムチン上に発現している代表的な癌関連糖鎖抗原の一つであるシアリル Tn 抗原も含まれる。多くの上皮性癌細胞はムチンを癌組織や血流中に分泌することから、B 細胞上のシグレック 2 と相互作用することが予想された。ムチンのモデルとして牛顎下腺ムチンを用い、標識して正常マウスに静注すると、一部の BSM は脾臓マージナルゾーン (MZ) に取り込まれ、B 細胞と共局在した。従って、ムチン産生腫瘍をもつ担癌マウスにおいても、血流中のムチンが MZ の B 細胞 (MZB 細胞) に結合し、何らかの影響を与える可能性が考えられた。マウス乳癌細胞株 TA3-Ha は、ムチン (エビグリカニン) 産生細胞で、その亜株である TA3-St 細胞は非産生細胞であることから、ムチンとの関連性を比較する上で好適な研究対象である。腹腔内担癌マウスより脾臓細胞を調製し、T、B 細胞数を測定したところ、コントロール、TA3-St 担癌マウスに比して、TA3-Ha 担癌マウスにおいて B 細胞が減少していた。これは、B 細胞の中で、CD21、CD1d 陽性 B 細胞、すなわち MZB 細胞の減少によるものであることがわかった。TUNEL 法により脾臓組織を染色したところ、MZ 中の B 細胞がアポトーシスにより消失したことが明らかとなった。また、MZB 細胞は、T 細胞非依存性抗原に対して応答する細胞集団であるが、同抗原である TNP-Ficoll を投与したところ、TA3-Ha 担癌マウスにおいて IgM、IgG ともに産生量が減少したことから、MZB 細胞の減少を裏付ける結果となった。さらに、TA3-Ha 担癌マウスに抗ムチン抗体を投与した場合、MZB 細胞の減少が抑制された。あるいは正常マウスに BSM を投与しても MZB 細胞が減少することがわかった。これらの結果は、担癌状態において、血流中のムチンが MZB 細胞上のシグレック 2 と相互作用し、MZ の形成不全または維持不全をもたらす、あるいは双方に影響することを示している。

緒言

シグレック 2 は、B 細胞上に特異的な膜タンパク質で pre-B 細胞で細胞表面に発現され、形質細胞では消失している¹⁾。シグレックファミリーはシアル酸を含む糖鎖を認識するレクチンであるが、その中でシグレック 2 は、SA α 2,6-Gal/GalNAc を認識することが知られている²⁻⁷⁾。SA α 2,6-GalNAc は癌関連糖鎖抗原の一つであるシアリル Tn 抗原であり、多くのムチンが同抗原を発現していることから、シグレック 2 は上皮性癌細胞の産生するムチンに結合することが予想された。また、シグレックファミリーの多くは、細胞質側に ITIM (Immuno tyrosine inhibitory motif) をもち、SH2 ドメインをもつホスファターゼをリクルートし、B 細胞受容体を介した活性化シグナルを抑制することが知られている⁸⁻¹²⁾。従って、担癌状態で血流中に存在するムチンが、B 細胞上のシグレック 2 を介して相互作用することにより、B 細胞の活性化シグナルを抑制することが予想された。このことは、担癌患者における免疫機能の低下について、その分子的背景の一つになりうる可能性がある。一般的にシグレック 2 は内在性のシスリガンドによってマスクされていると考えられてきた。しかし、近年、ある休止 B 細胞あるいは一部の活性化 B 細胞では内在性リガンドが結合していないことが報告されている^{13, 14)}。また、Collins らは¹⁵⁾、シスリガンドがマスクされた状態でも接着した細胞上のトランスリガンドと相互作用しうることを示した。従って、シグレック 2 は構造的かつ立体的に適合する糖タンパク質であればシスリガンド以外にも結合すると考えられる。一般的に、ムチンは α 2,6 シアル酸をもつ O-グリカンを多く発現し、タンデムリピートをもつことから、多価であるなどの構造的特徴によりシグレック 2 に対し高親和性のリガンドとなる可能性が高い。

ムチンを産生する細胞株の中で、マウス乳癌細胞株 TA3-Ha 細胞を選択した。TA3-Ha 細胞はエピグリカニンと呼ばれるムチンを産生し、その亜株である TA3-St はムチン非産生株でコントロールとして有用である。エピグリカニンは、糖含量が 85~85% を占める高分子の糖タンパク質であり¹⁶⁾、細胞表面よりシェディングされ、同細胞を腹腔中にもつ担癌マウスでは血流中にも検出される¹⁷⁾。本論文では、シグレック 2 とエピグリカニンの結合に伴う、*in vitro* 及び *in vivo* での生物学的作用について明らかにし、担癌状態におけるムチンの影響について検討した。

結果

— 静注したムチンの脾臓への取り込み —

担癌状態におけるムチンの影響を調べる目的で、まず血流中のムチンがどのような組織と相互作用あるいはどのような組織に取り込まれるかを調べた。蛍光標識した牛頸下腺ムチン (BSM) を正常マウスに静注し、20 分後に組織を検索した。従来から指摘されているとおり¹⁸⁾、

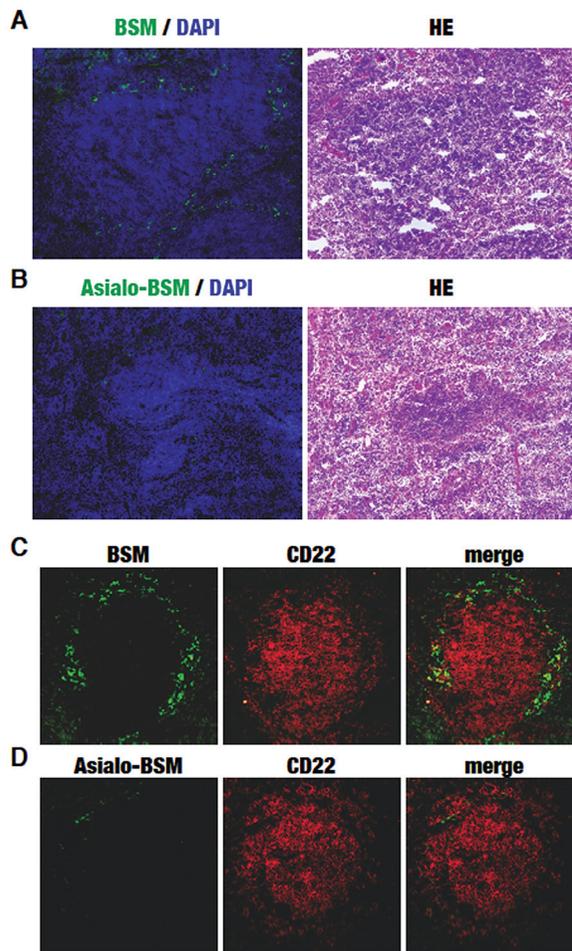


図1. マウスに静注したムチンの脾臓への取り込み

Alexa Fluor 488で標識したBSM (A, C) 又はアシアロBSM (B, D) を静注し、20分後に4%パラホルムアルデヒドで還流固定したマウスより脾臓を取り出した。核はDAPIにより染色した。シグレック2を発現しているB細胞は、ビオチン化抗シグレック2抗体とAlexa Fluor 594標識ストレプトアビジンにより染色した (C, D)。

大半のBSMは肝臓に取り込まれたが、一部は脾臓に検出された。アシアロBSMの場合は検出されなかったことから、シアル酸に依存した現象であることがわかった (図1A, B)。次に、同様の処理をしたマウス脾臓の切片を抗シグレック2抗体で染色したところ、脾臓マージナルゾーン (MZ) において、蛍光標識したBSMとシグレック2は共局在することがわかった (図1C)。これらの結果により、血流中のムチンは脾臓マージナルゾーンB細胞 (MZB細胞) とシグレック2を介して相互作用することが示唆された。

—シグレック 2 へのムチンの結合—

マウス乳癌細胞株TA3-Haの産生するムチンであるエピグリカニンについて、同細胞担癌マウスの腹水を用いて検討した。細胞成分を除いた腹水を直接電気泳動し、ナイロン膜にウエスタンブロットした。癌関連糖鎖抗原の一つであるTn抗原に対する抗体 (MLS128) 及び α 2,6シアル酸を認識するレクチン (SSA) により検出した。エピグリカニンに相当する同一で唯一のバンドが検出された。従って、TA3-Ha細胞はムチンとしてはエピグリカニンのみを産生し、 α 2,6シアル酸をもつO-グリカンを発現していることがわかった (図2A)。また、組織化学的にも抗Tn抗原抗体を用いて、TA3-Ha細胞表面に発現し、TA3-St細胞には発現していないことを確認した (図2B)。さらに、シグレック 2 への結合を確認するために、同細胞の担癌マウス腹水よりエピグリカニンを精製した。すなわち、腹水よりゲルろ過 (セファロース 6B)、過塩素

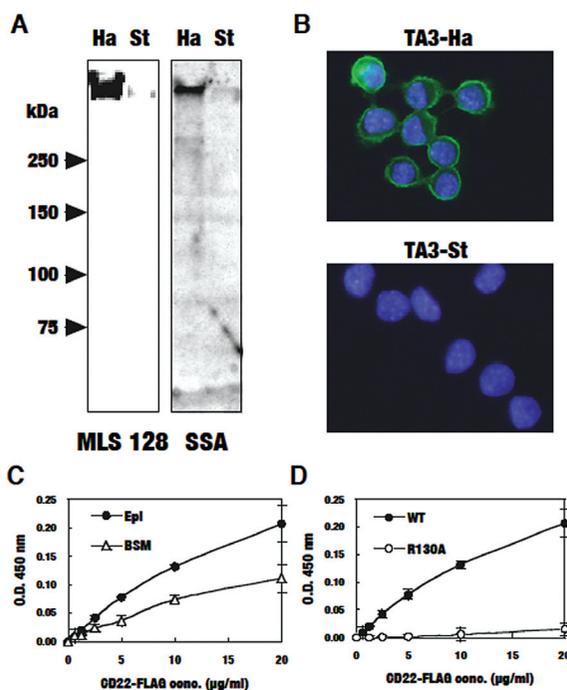


図 2. シグレック 2 へのエピグリカニンの結合

マウス乳癌細胞株TA3-Ha及びTA3-Stをマウス腹腔内に播種し、8日後に腹水を採取した。細胞成分を除いた後、直接電気泳動し、ナイロン膜にウエスタンブロットした。

単クローン抗体MLS128 (Tn抗原を認識) 及び α 2,6シアル酸を認識するレクチン (SSA) で検出した (A)。また、2つの細胞をMLS128 (緑) 及びDAPI (青) を用いて染色した (B)。BSM (\triangle) 及びエピグリカニン (\bullet) を固相化したプレートにFLAG付きリコンビナントシグレック 2 を加え結合活性を測定した (C)。エピグリカニンを固相化したプレートにFLAG付きリコンビナントシグレック 2 (\bullet) 及びN末より30番目のArgをAlaに変換したFLAG付きリコンビナントシグレック 2 (\circ) を加え結合活性を測定した (D)。

酸沈殿及びセシウムクロライド密度勾配遠心を用いて精製した。シグレック 2 に関しては、同分子のエクトドメインからなる可溶性シグレック 2 及びシアル酸との結合に必須なアミノ酸である Arg30 (N 末端より 30 番目のアミノ酸) を Ala に変換した可溶性シグレック 2 を作成した。エピグリカニン及び BSM を固相化したプレートに、可溶性シグレック 2 は濃度依存的に結合した (図 2C)。Arg30 を Ala に変換したシグレック 2 は、エピグリカニンに結合せず、シアル酸に特異的な結合であることが確認された (図 2D)。

—TA3-Ha 腫瘍担癌マウスにおける脾臓マージナルゾーン B 細胞の消失—

TA3-Ha あるいは TA3-St 細胞を腹腔内に注射し、8 日後に脾臓細胞を調製し、B220 あるいは CD3 陽性細胞を解析した。図 3A に示すように、TA3-St 担癌マウスとコントロールマウスでは、B220 陽性細胞 / CD3 陽性細胞の比はほぼ同等であったが、TA3-Ha 担癌マウスのそれは著しく低い値を示し、B 細胞の減少が示唆された。さらに、B 細胞の中で CD23 及び CD21 陽性細胞の分布を検討した (図 3B, C)。新しく形成された B 細胞 (NFB) はコントロールに比して、TA3-Ha、-St のいずれの担癌マウスにおいても増加したが、免疫反応の亢進に伴うものと考えられる。ろ胞 B 細胞 (FOB) に大きな変化はなかったが、TA3-Ha 担癌マウスの MZB 細胞の著しい減少が見られた。MZB 細胞は CD1d、CD21 陽性細胞であることを特徴とすることから、2 つ

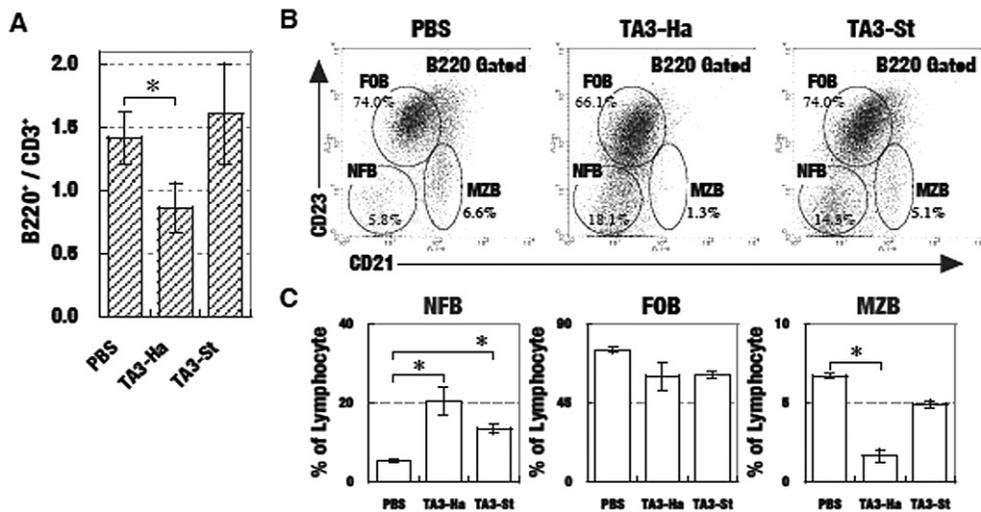


図 3. TA3-Ha 又は TA3-St 担癌マウスの脾臓 B 細胞の分布

癌細胞を播種して 8 日後に脾細胞を調製し、FITC 結合抗 B220 抗体と RPE 結合抗 CD3 抗体で染色し、フローサイトメトリーで解析した。数値は B220 陽性細胞 / CD3 陽性細胞の比の平均値 ± SD で示す (n ≥ 6, *P < 0.01) (A)。同様に脾細胞を調製し、PE-Cy5.5 結合抗 B220 抗体、FITC 結合抗 CD21 抗体及び PE 結合抗 CD23 抗体で染色し解析した。数字は、B220 陽性細胞中のそれぞれの割合を示す (B)。B の値を棒グラフで示した。データは平均値 ± SD で示す (n = 6, *P < 0.01) (C)。

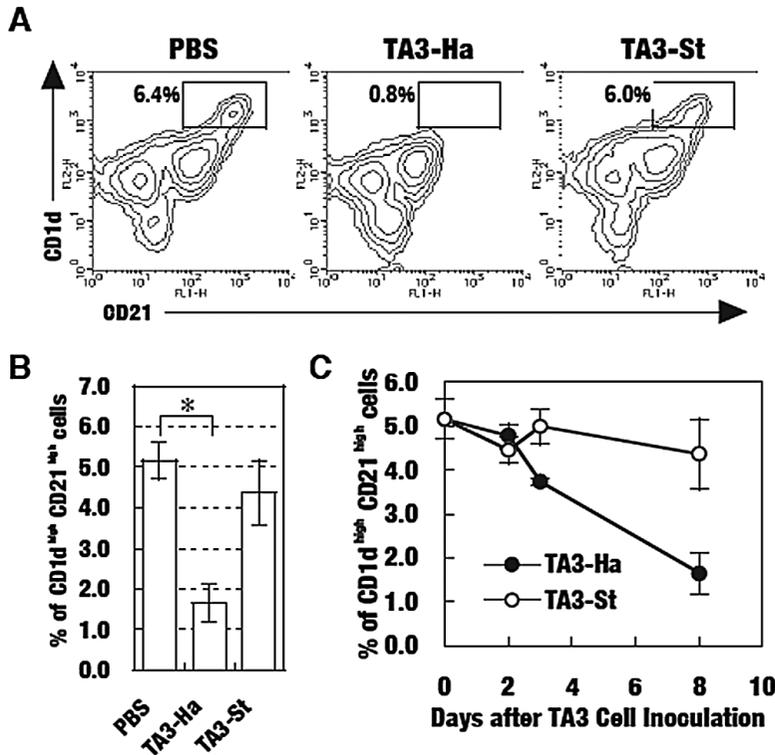


図4. TA3-Ha担癌マウスにおける脾臓マージナルゾーンB細胞の減少

図3と同様に脾細胞を調製し、FITC結合抗CD21抗体及びRPE結合CD1d抗体で染色した。代表的なフローサイトメトリーの結果を示す ($n \geq 6$)。数値は図中のゲートで囲まれたCD21、CD1dダブル高発現細胞の割合を示す (A)。(A)の値を棒グラフで示した。値はCD21、CD1dダブル高発現細胞の割合を示す (平均値 \pm SD, $n \geq 6$, * $P < 0.01$) (B)。細胞を播種し、2, 3, 8日後に脾細胞を調製した。(B)と同様に、CD21、CD1dダブル高発現細胞の割合を調べた (平均値 \pm SD, $n \geq 6$) (C)。

の抗原についての発現を調べた。図4A, Bに示すように、CD1d、CD21ダブルポジティブ細胞、すなわちMZB細胞は、コントロール及びTA3-St担癌マウスではほぼ同等であったが、TA3-Ha担癌マウスでは著しく減少した。同細胞の減少は、TA3-HA細胞の播種後の経過に伴って亢進した (図4C)。さらに、担癌マウスの脾臓組織のシグレック2及びMZのマクロファージを組織化学的に染色した。図5に示すように、TA3-Ha担癌マウスの脾臓ではMZがほぼ消失していた。コントロール及びTA3-St担癌マウスの脾臓では変化は認められなかった。

—TA3-Ha担癌マウスにおけるT細胞非依存性抗原に対する免疫応答—

MZB細胞は、T細胞非依存性抗原に対する抗体を産生することが知られている¹⁹⁻²³。従って、担癌マウスを用いてT細胞非依存性抗原 (TNP-フィコール) に対する抗体産生を調べた。すな

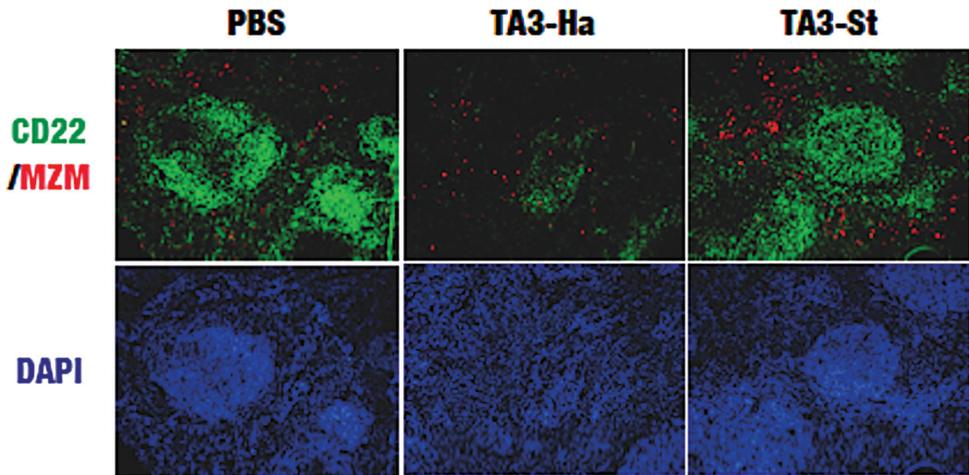


図5. TA3-Ha担癌マウスにおける脾臓マージナルゾーンB細胞の消失

癌細胞を播種し、8日後に脾臓組織切片を調製した。ビオチン化抗CD22抗体とAlexa Fluor 488結合ストレプトアビジン（緑）あるいはER-TR9とAlexa Fluor 594結合抗ラットIgM抗体（赤）で染色した。CD22/MEMは両者をマージした染色図を示す。核はDAPIで染色した（青）。

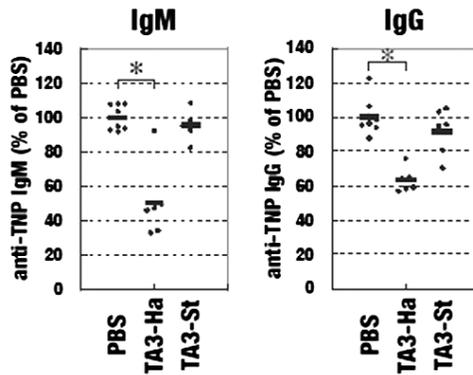


図6. 担癌マウスにおけるTI-2応答

TA3-Ha (n=6)、TA3-St (n=8) 担癌マウスあるいは正常マウス (n=8) に播種後5、7日目に10 μ gのTNF-Ficollを静注した。8日目に採血し、抗TNP IgM及びIgG抗体をELISAで測定した。ドット及びバーは、それぞれ各サンプルの測定値と平均値を示す (*P<0.01)。

わち、担癌マウスに癌細胞播種後5日と7日目にTNP-フィコールを静注し、8日目に採血した試料の抗体価をELISAで測定した。図6に示すように、TA3-Ha担癌マウスでのTNP-フィコールに対する抗体は、IgMとIgGでそれぞれコントロールに比して約50%と60%に減少した。TA3-St担癌マウスでの抗体価はコントロールのそれとほぼ同じであった。これらの結果は、TA3-HA担癌マウスにおけるMZB細胞の減少とよく一致した。

—TA3-Ha 担癌マウスの脾臓 MZB 細胞におけるアポトーシス—

TA3-Ha 担癌マウスの脾臓 MZB 細胞の消失の機構を調べる目的で、TUNEL 法によりアポトーシス細胞を検出した。図 7 に示すように、TA3-Ha 担癌マウスの脾臓 MZ において、アポトーシス細胞が増加していることがわかった。また、MZ マクロファージでも TA3-Ha 担癌マウスにおいて減少していたが、これは MZB 細胞は MZ の維持に必須であるという報告²⁴⁾ と一致する。

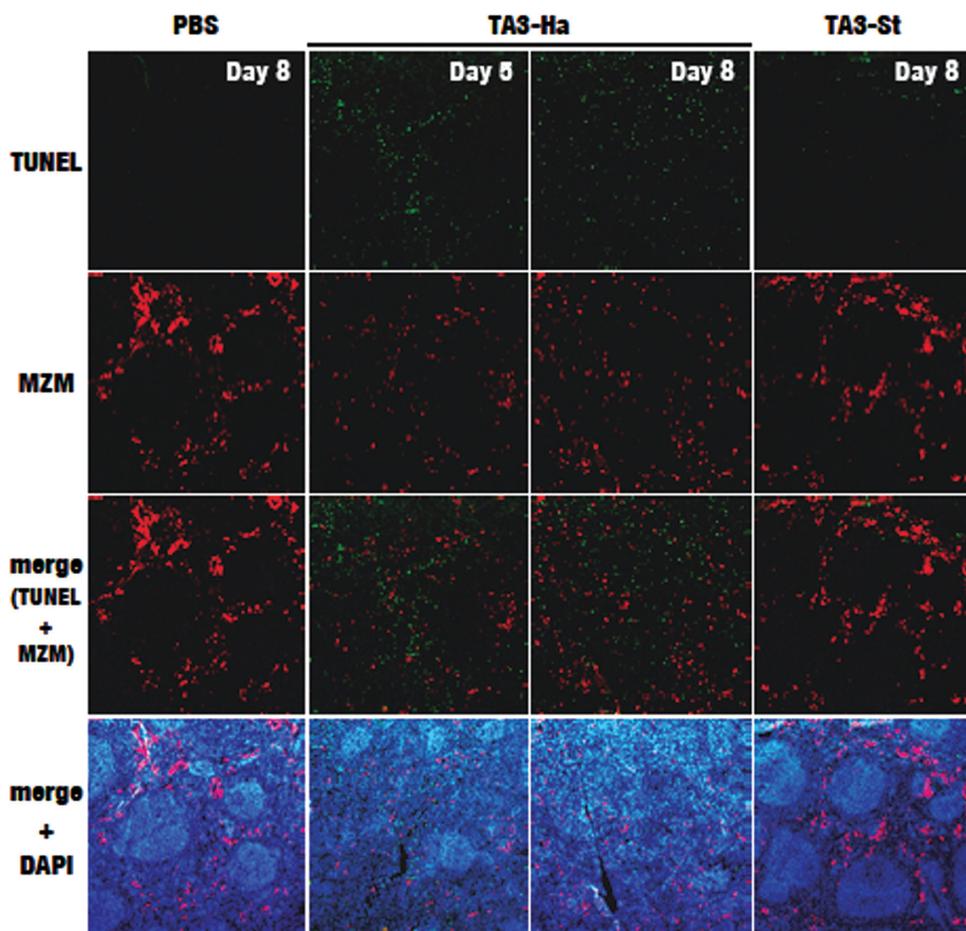


図 7. 担癌マウスの脾臓におけるアポトーシス細胞

癌細胞を播種後、5、8 日目に脾臓組織切片を調製した。TUNEL (緑) 法によりアポトーシス細胞を検出した。マージナルゾーンを示すために、ER-TR9 と Alexa Fluor 549 結合抗ラット IgM 抗体 (赤) を用いた。また、核は DAPI (青) で染色した。

—シグレック 2 へのムチンの結合に伴う B 細胞受容体を介した情報伝達の抑制—

B 細胞受容体を介した情報伝達に対するエピグリカニンの影響を検討した。ハプテンのニトロフェニル基 (NP) を認識する受容体 (BCR) とシグレック 2 を発現する安定株 (K46 μ m λ -シグレック 2 細胞) (東京医科歯科大学; 鏗田博士より供与) を用いて、エピグリカニン存在下で抗原 (NP-BSA) により、同細胞を刺激した。細胞のライセートより、シグレック 2、SHP-1 をそれぞれ免疫沈降及び共沈させた。沈殿物を電気泳動し、ウエスタンブロッティング後にシグレック 2 のリン酸化チロシン及び SHP-1 を検出したところ、いずれもエピグリカニン存在下では減少した (図 8A)。さらに、細胞のライセートを直接電気泳動し、ウエスタンブロッティング後リン酸化 ERK1/2 を検出すると、リン酸化の減少が認められた (図 8B)。マウス脾臓 B 細胞についても同様の実験を行ったところ、同様の結果を得た (図 8C, D)。

—TA3-Ha 担癌マウスへの抗 Tn 抗体の投与及び正常マウスへの BSM の投与—

血流中のムチンと MZB 細胞の減少の因果関係をさらに明確にするために、先ず TA3-Ha 担癌

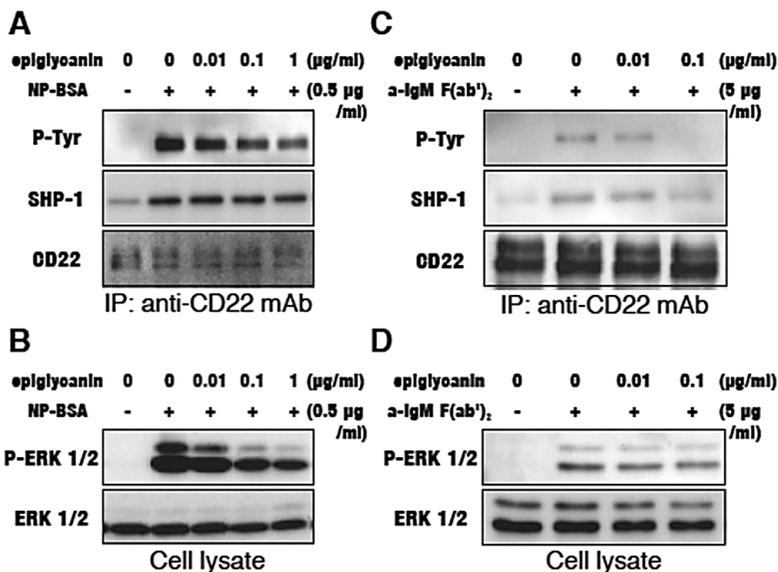


図 8. エピグリカニン存在下における B 細胞受容体を介した情報伝達の抑制

K46 μ m λ -CD22 強制発現株における情報伝達 (A, B) ; エピグリカニン存在下、非存在下において、K46 μ m λ -シグレック 2 細胞を NP-BSA で刺激後、リン酸化シグレック 2、SHP-1 のリクルート及びリン酸化 ERK1/2 を検出した。正常マウスより調製した脾臓 B 細胞における情報伝達 (C, D) ; エピグリカニン存在下、非存在下で脾臓 B 細胞をヤギ抗 IgM F (ab')₂ 抗体で刺激後、リン酸化シグレック 2、SHP-1 のリクルート及びリン酸化 ERK1/2 を検出した。

マウスに抗Tn抗体 (MLS128) を投与したときの効果について検討した。図9Aに示すように、コントロールの抗体処理に比して明らかにMZB細胞の減少が抑制された。さらに、正常マウスにBSMを投与した場合も、MZB細胞が減少することがわかった (図9B)。

考察

血流中に存在する糖タンパク質の代謝については、ガラクトースを認識する肝レクチンによりアジア糖タンパク質が取り込まれ、代謝されることがよく知られている。ムチン上のO-グリカンについては、末端にガラクトースをもつ糖鎖も存在することから、多くのムチンが肝臓に取り込まれるものと予想された。BSMの場合も予想通り多くは肝臓に取り込まれたが、一部脾臓への取り込みが確認された。しかも、アジアロBSMでは認められないことから、シアロ酸を認識するレクチンの関与が予想された。また、MZB細胞と共局在することからB細胞上

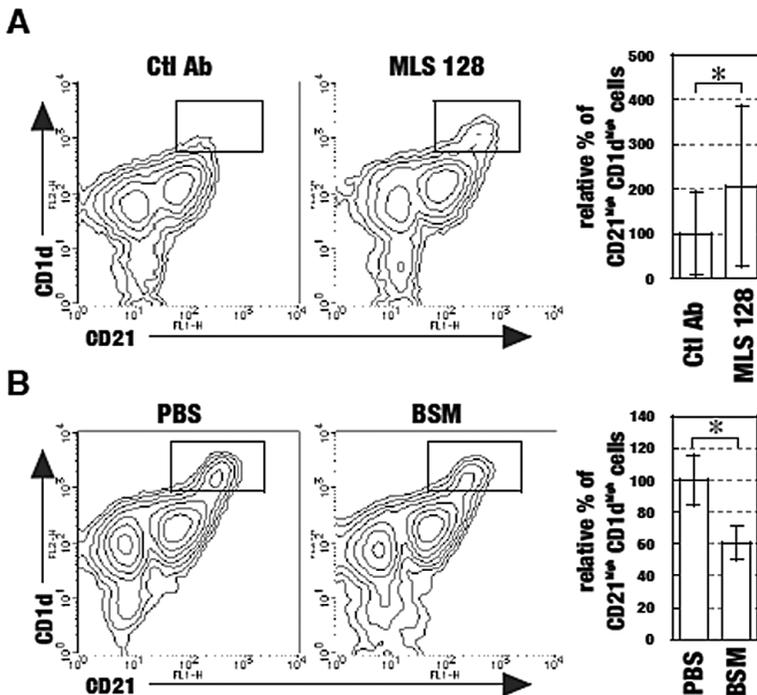


図9. 脾臓マージナルゾーンB細胞に対する血中ムチンの影響

TA3-Ha細胞を播種し、2、3、7日後にMLS128 5 μ gを静注した。8日後に調製した脾細胞をフローサイトメトリーで解析し、CD21、CD1d高発現細胞を比較した (A)。棒グラフはコントロールを100とした相対値を示す (n \geq 15, *P<0.05)。正常マウスに一日おきに100 μ gのBSMを静注した。開始後8日目に脾細胞を調製し、同様に解析した (*P<0.05) (B)。

のレクチン、すなわちシグレック 2 もしくは CD72 の関与が考えられたが、マウス CD72 強制発現株にはムチンが結合しなかったことから、シグレック 2 を対象に検討した。また、癌細胞としては、マウス乳癌由来細胞株 TA3 を選択した。TA3-Ha はムチン産生株で、その亜株である TA3-St はムチン非産生株であることから、ムチンの有無に伴う担癌マウスの免疫学的差異にアプローチする好適な細胞株と考えられた。TA3-Ha の腹腔内担癌マウスより回収した腹水を直接電気泳動し、ウエスタンブロッティング後に抗 Tn 抗体あるいは SSA で検出したところ、エビグリカニンが唯一のムチンであることがわかった。また、SSA との反応性から、シグレック 2 の結合部位である α 2,6 シアル酸を含むことが示された。TA3-Ha 担癌マウス腹水よりエビグリカニンを精製し、シグレック 2 に結合することを確認するとともに、同担癌マウスの脾臓 B 細胞の内 MZB 細胞が著しく減少するという注目すべき結果を得た。シグレック 2 ノックアウトマウスでも MZB 細胞の減少が報告されており²⁵⁾、シグレック 2 とそのリガンドとの相互作用が MZB 細胞の維持に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、Poe らは²⁶⁾、リガンドとの結合部位を欠損したシグレック 2 を発現するトランスジェニックマウスについても同様の現象を確認し、MZB 細胞の維持にシグレック 2 と内在性リガンドの相互作用が必須であることを証明した。従って、担癌マウスの場合、血流中のムチンが結合することにより内在性リガンドとの相互作用が阻害されたことに起因する現象と考えられる。シグレック 2 は α 2,6 シアル酸を含む糖鎖を認識するが、この中にはシアル Tn 抗原も含まれる²⁷⁾。シアル Tn 抗原は多くのカルシノーマで発現していることが知られており、普遍性のある現象と考えられる。これらの結果は、子宮癌においてシアル Tn 抗原を高発現している患者の生存率が低いという最近の我々の結果と一致している²⁸⁾。また、MZB 細胞は T 細胞非依存性抗原に应答する B 細胞であり、TA3-Ha 担癌マウスにおいて同抗原に対する免疫応答が著しく弱くなっている事実は、これまでの生化学的・組織化学的結果と一致する。

従来、B 細胞上のシグレック 2 はシスリガンドにマスクされているとされてきたが¹³⁾、一部の B 細胞ではトランスリガンドとも結合しうることが報告されている¹⁵⁾。また、MZB 細胞ではシスリガンドの発現が少ないことから、よりトランスリガンドと結合しやすいものと考えられる。TUNEL 法で MZB 組織を染色すると、TA3-HA 担癌マウスでアポトーシス細胞が増加していることが観察された。B 細胞受容体へのリガンドの結合に加えて、シグレック 2 などのアクセサリー分子の架橋によってアポトーシスが誘導されるという報告²⁹⁾ もあり、一致する現象と考えられる。なお、ムチンは一定のアミノ酸配列からなるユニットの繰り返し構造（タンデムリピート）をもち、1 ユニットに結合部位が 1 個以上あるとすると、多くの分子を架橋することになる。

ムチン存在下における B 細胞の情報伝達については、シグレック 2 のリン酸化、SHP-1 のリクルート及び MAP キナーゼのリン酸化のいずれも抑制的に作用することがわかった。シグレック 2 に抗体を結合した場合、MAP キナーゼのリン酸化が亢進するという報告^{8, 30, 31)} と相違す

る結果を得た。この相違を説明する実証は得られていないが、エビグリカニンは約500nmの巨大分子であり、多くのシグレック2分子を架橋すると予想され、B細胞受容体も含めてラフトへの移行が阻害されることによると考えている。

抗Tn抗原抗体 (MLS128) をTA3-Ha担癌マウスに静注したところ、MZB細胞の減少が抑制されたこと、あるいはBSMを正常マウスに静注した場合もMZB細胞の減少が見られるという結果は、血中ムチンが作用していることを証明するものである。

REFERENCES

1. Tedder, T. F., J. Tuscano, S. Sato, and J. H. Kehrl. 1997. CD22, a B lymphocyte-specific adhesion molecule that regulates antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:481-504.
2. Sgroi, D., A. Varki, S. Braesch-Andersen, and I. Stamenkovic. 1993. CD22, a B cell-specific immunoglobulin superfamily member, is a sialic acid-binding lectin. *J Biol Chem* 268:7011-7018.
3. Powell, L. D., D. Sgroi, E. R. Sjoberg, I. Stamenkovic, and A. Varki. 1993. Natural ligands of the B cell adhesion molecule CD22 beta carry N-linked oligosaccharides with alpha-2,6-linked sialic acids that are required for recognition. *J Biol Chem* 268:7019-7027.
4. Powell, L. D., and A. Varki. 1994. The oligosaccharide binding specificities of CD22 beta, a sialic acid-specific lectin of B cells. *J Biol Chem* 269:10628-10636.
5. Kelm, S., A. Pelz, R. Schauer, M. T. Filbin, S. Tang, M. E. de Bellard, R. L. Schnaar, J. A. Mahoney, A. Hartnell, P. Bradfield, and P. R. Crocker. 1994. Sialoadhesin, myelin-associated glycoprotein and CD22 define a new family of sialic acid-dependent adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Curr Biol* 4:965-972.
6. Nath, D., P. A. van der Merwe, S. Kelm, P. Bradfield, and P. R. Crocker. 1995. The amino-terminal immunoglobulin-like domain of sialoadhesin contains the sialic acid binding site. Comparison with CD22. *J Biol Chem* 270:26184-26191.
7. Blasioli, J., S. Paust, and M. L. Thomas. 1999. Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22. *J Biol Chem* 274:2303-2307.
8. Engel, P., N. Wagner, A. S. Miller, and T. F. Tedder. 1995. Identification of the ligand-binding domains of CD22, a member of the immunoglobulin superfamily that uniquely binds a sialic acid-dependent ligand. *J Exp Med* 181:1581-1586.
9. Doody, G. M., L. B. Justement, C. C. Delibrias, R. J. Matthews, J. Lin, M. L. Thomas, and D. T. Fearon. 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 269:242-244.
10. Lankester, A. C., G. M. van Schijndel, and R. A. van Lier. 1995. Hematopoietic cell phosphatase is recruited to CD22 following B cell antigen receptor ligation. *J Biol Chem* 270:20305-20308.
11. Campbell, M. A., and N. R. Klinman. 1995. Phosphotyrosine-dependent association between CD22 and protein tyrosine phosphatase 1C. *Eur J Immunol* 25:1573-1579.
12. Law, C. L., S. P. Sidorenko, K. A. Chandran, Z. Zhao, S. H. Shen, E. H. Fischer, and E. A. Clark. 1996. CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C-gamma (1) upon B cell activation. *J Exp Med* 183:547-560.
13. Blasioli, J., S. Paust, and M. L. Thomas. 1999. Definition of the sites of interaction between the protein tyro-

- sine phosphatase SHP-1 and CD22. *J Biol Chem* 274:2303-2307.
13. Razi, N., and A. Varki. 1998. Masking and unmasking of the sialic acid-binding lectin activity of CD22 (Siglec-2) on B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7469-7474.
 14. Danzer, C. P., B. E. Collins, O. Blixt, J. C. Paulson, and L. Nitschke. 2003. Transitional and marginal zone B cells have a high proportion of unmasked CD22: implications for BCR signaling. *Int Immunol* 15:1137-1147.
 15. Collins, B. E., O. Blixt, A. R. DeSieno, N. Bovin, J. D. Marth, and J. C. Paulson. 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.
 16. Codrington, J. F., A. G. Cooper, D. K. Miller, H. S. Slayter, M. C. Brown, C. Silber, and R. W. Jeanloz. 1979. Isolation and partial characterization of an epiglycanin-like glycoprotein from a new non-strain-specific subline of TA3 murine mammary adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 63:153-161.
 17. Cooper, A. G., J. F. Codrington, and M. C. Brown. 1974. In vivo release of glycoprotein I from the Ha subline of TA3 murine tumor into ascites fluid and serum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:1224-1228.
 18. Wahrenbrock, M. G., and A. Varki. 2006. Multiple hepatic receptors cooperate to eliminate secretory mucins aberrantly entering the bloodstream: are circulating cancer mucins the "tip of the iceberg"? *Cancer Res* 66:2433-2441.
 19. Lane, P. J., D. Gray, S. Oldfield, and I. C. MacLennan. 1986. Differences in the recruitment of virgin B cells into antibody responses to thymus-dependent and thymus-independent type-2 antigens. *Eur J Immunol* 16:1569-1575.
 20. Martin, F., and J. F. Kearney. 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 B cells as part of a "natural immune memory". *Immunol Rev* 175:70-79.
 21. Martin, F., and J. F. Kearney. 2002. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2:323-335.
 22. Martin, F., A. M. Oliver, and J. F. Kearney. 2001. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 14:617-629.
 23. Pillai, S., A. Cariappa, and S.T. Moran. 2005. Marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 23:161-196.
 24. Nolte, M. A., R. Arens, M. Kraus, M. H. van Oers, G. Kraal, R. A. van Lier, and R. E. Mebius. 2004. B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol* 172:3620-3627.
 25. Samardzic, T., D. Marinkovic, C. P. Danzer, J. Gerlach, L. Nitschke, and T. Wirth. 2002. Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. *Eur J Immunol* 32:561-567.
 26. Poe, J. C., Y. Fujimoto, M. Hasegawa, K. M. Haas, A. S. Miller, I. G. Sanford, C. B. Bock, M. Fujimoto, and T. F. Tedder. 2004. CD22 regulates B lymphocyte function in vivo through both ligand-dependent and ligand-independent mechanisms. *Nat Immunol* 5:1078-1087.
 27. Brinkman-Van der Linden, E. C., and A. Varki. 2000. New aspects of siglec binding specificities, including the significance of fucosylation and of the sialyl-Tn epitope. Sialic acid-binding immunoglobulin superfamily lectins. *J Biol Chem* 275:8625-8632.
 28. Ohno, S., Y. Ohno, H. Nakada, N. Suzuki, G. Soma, and M. Inoue. 2006. Expression of Tn and sialyl-Tn antigens in endometrial cancer: its relationship with tumor-produced cyclooxygenase-2, tumor-infiltrated lymphocytes and patient prognosis. *Anticancer Res* 26:4047-4053.
 29. Chaouchi, N., A. Vazquez, P. Galanaud, and C. Leprince. 1995. B cell antigen receptor-mediated apoptosis. Importance of accessory molecules CD19 and CD22, and of surface IgM cross-linking. *J Immunol*

154:3096-3104.

30. Pezzutto, A., B. Dorken, G. Moldenhauer, and E. A. Clark. 1987. Amplification of human B cell activation by a monoclonal antibody to the B cell-specific antigen CD22, Bp 130/140. *J Immunol* 138:98-103.
31. Pezzutto, A., P. S. Rabinovitch, B. Dorken, G. Moldenhauer, and E. A. Clark. 1988. Role of the CD22 human B cell antigen in B cell triggering by anti-immunoglobulin. *J Immunol* 140:1791-1795.