

2019 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	ユニークな免疫応答調節に関わる糖鎖構造とアジュバントの探索
キーワード	①糖鎖、②免疫応答の調節、③樹状細胞

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	デンダ カオリ 伝田 香里	所属等	順天堂大学 医学部 特任助教
プロフィール	1995年東京大学薬学部薬学科卒業。同大学院薬学系研究科博士課程を中途退学し、同研究科・生体異物学教室 助手（現・助教）となる。博士（薬学）。2015年4月より順天堂大学医学部 基礎研究医養成プログラム チューターとして、医学部生の基礎研究を推進する傍ら、難病の診断と治療研究センター・糖鎖創薬研究室にて「がん・糖鎖・免疫」をキーワードに研究を行っている。小学2年女子の母として、家庭でも子どもの“教育と研究(?)”に奮闘中！		

1. 研究の概要

本研究では、「糖鎖に着目することで明らかになるユニークな免疫応答調節機構」を明らかにし、糖鎖を利用した創薬へと応用することを最終的な目標としている。本奨励金研究期間内においては、糖鎖付加のない抗原と糖鎖付加のある抗原と種々のアジュバントの組み合わせが、この新しい免疫応答調節機構にどのように関わるかを探索した。その結果、糖鎖付加に依存した免疫応答の調節が認められるアジュバントと認められないアジュバントが存在することを明らかにした。今後は、糖鎖付加に依存した免疫応答の調節機構の詳細を明らかにすることを通して、ワクチンの開発等において広く利用できるような研究を行っていきたい。

2. 研究の動機、目的

糖鎖が免疫系に及ぼす影響として、免疫細胞の活性化、細胞交通制御、自然免疫応答における抗原認識などはよく知られている。しかし、タンパク質に付加された糖鎖が、タンパク質に対する獲得免疫応答、特にT細胞依存的応答に、どのような影響を与えるのかは意外なほど明らかではない。通常T細胞が認識するエピトープとしては、ペプチドのみが考えられているが、実際には1~2個の糖鎖が付加したペプチドもMHC分子に抗原提示され、T細胞によって認識される。また、腫瘍抗原上の糖鎖構造の変化が免疫応答の活性化あるいは抑制につながることで、糖鎖を含む抗原の認識が自己免疫疾患の発症に関わることなど、免疫応答が関係する病態と糖鎖の関連も明らかにされつつある。ゆえに、糖鎖修飾が抗原タンパク質に対する獲得免疫応答に影響を与えることは間違いない。

獲得免疫応答において、タンパク質に付加された糖鎖が免疫応答に影響を与えるためには、抗原タンパク質が抗原提示細胞に取り込まれ、プロセッシングを受け、MHC分子に提示され、T細胞が活性化されるまでのいずれかの過程において糖鎖認識分子（レクチン）によって糖鎖構造が認識されることが必要と予想される。ナイーブT細胞の活性化に必須の樹状細胞には、種々のC型レクチンが発現しており、樹状細胞に発現するC型レクチンとタンパク質に付加された糖鎖の相互作用による抗原タンパク質の取り込みとその後の樹状細胞の応答は重要な役割を担うことが予想される。

申請者は、これまでに、皮膚に存在するCD11b陽性真皮樹状細胞亜集団に、MGL1及びMGL2という免疫系において唯一、単糖としてガラクトース(Gal)/N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を認識するC型レクチンが発現し、このMGL1/2へ抗原をターゲットすると、Th2型

免疫応答が誘導されることを発見した。さらに、*O*-結合型糖鎖修飾（GalNAc 付加）が MGL1/2 依存的に抗原タンパク質に対する抗体応答を増強することも明らかにした。しかし、単にタンパク質に付加された糖鎖をレクチンが認識して抗原の取り込みや提示が増強されるだけであれば、特に目新しくはない。ところが、免疫の際に使用するアジュバントを変更したところ、糖鎖なしの抗原タンパク質に対しては同レベルの抗体応答を誘導可能であるのに、GalNAc 付加抗原タンパク質により誘導される抗体応答が、糖鎖なしの抗原タンパク質により誘導される抗体応答よりも低下するという予想外の予備的知見を得た。つまり、**糖鎖構造が同じであるにも関わらず、抗原に対する免疫応答が「増強される場合」と「抑制される場合」という異なる免疫応答が誘導される可能性**が示された。これは、“**糖鎖に着目することで初めて明らかになるユニークな免疫応答調節**”の存在を示唆し、この機構を明らかにすることは、免疫応答調節に関わる新たな創薬につながり、広く疾患の治療や予防に貢献できると考え、この新しい免疫応答調節機構を解明したいという動機へとつながった。

3. 研究の結果

① 糖鎖なしおよび糖鎖付加抗原の調製

本研究では、免疫に使用する抗原としては、腫瘍抗原として知られるムチン分子細胞外ドメインとマウス IgG2a Fc 領域との融合タンパク質を用いた。*O*-結合型糖鎖修飾不全の CHO-1d1D 細胞に発現させ、無血清培地中に分泌された融合タンパク質を回収し、Protein G-セファロースを用いてアフィニティー精製し、純度および糖鎖修飾パターンを SDS-PAGE およびウェスタンブロットティングまたはレクチンブロットティングにより確認して、免疫実験に使用した。なお、CHO-1d1D 細胞を通常培地中で培養した場合には、*O*-結合型糖鎖修飾のないタンパク質を発現するが、培養液中に単糖として GalNAc を添加することで GalNAc 付加を受けたタンパク質を発現することができる。

① 糖鎖付加抗原とアジュバントの組み合わせによる免疫応答の評価

結果①により調製した糖鎖なし、または糖鎖付加抗原を、種々のアジュバントとともに C57BL/6マウスの皮下に投与した。投与前、投与後1週間毎に採血を行い、血清を採取し、抗原タンパク質に対するELISA法により、血清中の抗体応答を評価した（図1）。予備実験において糖鎖付加抗原に対する免疫応答を増強することが分かっていたアジュバントAでは、糖鎖付加抗原に対して、1回の免疫の1週間後という非常に早い段階から強い抗体応答を誘導するという結果が再現された。アジュバントBは、免疫の2週間後に糖鎖なしの抗原に対しては抗体応答を誘導できたのに対して、糖鎖付加抗原に対しては、糖鎖なし抗原に比べて有意に低い抗体応答しか誘導できないという糖鎖付加抗原に対する応答が抑制されるという結果が再現された。アジュバントBは、Th1応答を誘導するアジュバントCとTh2応答を誘導するアジュバントDの2種類のアジュバントの混合であったため、それぞれ単独で使用した場合の影響を検討した。その結果、アジュバントDは、抗体応答を誘導可能であることが広く知られているアジュバントであるが、本研究においては、1回の免疫では糖鎖付加の有無に関わらず有意な抗体応答を誘導できなかった。一方、アジュバントCでは、アジュバントBに似た傾向を示す結果が得られ、アジュバントDよりCの影響が強いことが示唆されたが、アジュバントBを使用したほうが安定した結果が得られることが判明した。アジュバントEでは、糖鎖付加の有無に関わらず抗体応答を誘導できると考えられた。アジュバントFは、抗体応答が誘導できることが既に

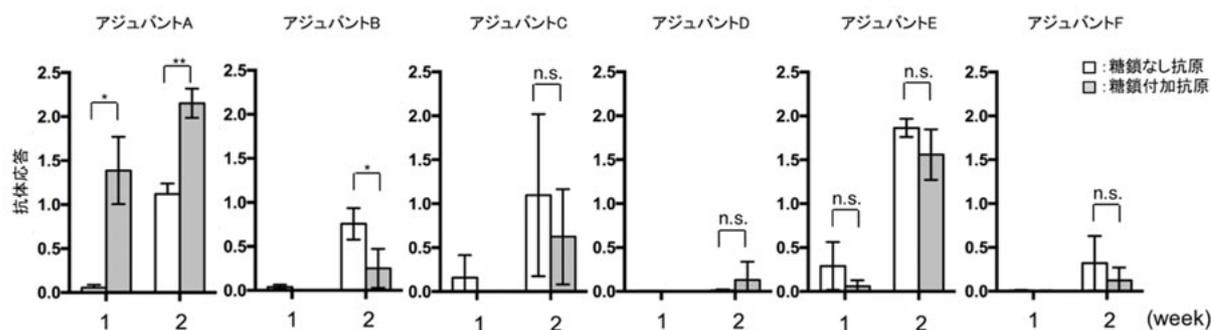


図1. 糖鎖なし抗原、糖鎖付加抗原免疫後の抗体応答に対するアジュバントの効果

知られているアジュバントであるが、本研究においては、1回の免疫では糖鎖付加の有無に関わらずほとんど抗体応答を誘導できなかった。以上より、糖鎖付加に依存した免疫応答の調節が認められるアジュバントと認められないアジュバントが存在することを明らかにした。つまり、糖鎖付加抗原とアジュバントの組み合わせを適切に用いれば、糖鎖付加抗原への免疫応答を、糖鎖なしと比較して強めることも、弱めることも、同等にすることも可能であることが示された。

4. 研究者としてのこれからの展望

今回の研究により、糖鎖に依存した免疫応答調節機構を明らかにするために用いるべきアジュバントを決定することができた。今後は、今回決定したアジュバントとの組み合わせに絞って、糖鎖に依存した免疫応答調節に関わる細胞や分子を解明していきたい。また、本研究ではまだモデルとして1つの抗原で結果を得ただけであるが、今後はこの現象が他の抗原についてもあてはまるのかどうかや、人工的に糖鎖付加することで特定の抗原への免疫応答を調節できるようにできるかなど、応用的な研究も進めていきたい。

以上のように、本研究を今後展開していくことで、研究者としては、糖鎖付加抗原に対する免疫応答がどのように調節されているのかというより普遍的な疑問に答えられるようになり、学問的に未開の領域を切り拓いていきたいと考えている。一方で、学問的な発展のみならず、実際に役立つ創薬開発への応用にも貢献していきたいと考えている。

5. 社会に対するメッセージ

このたびは、女性研究者奨励金のご支援を賜りましたこと、心より感謝申し上げます。本研究の芽がでてから、このテーマでの公的研究費へ応募を試みるものの獲得できないという状況が数年間に渡り続いていたため、ほとんど心が折れかかっていたところに、今回のご支援をいただき、研究を継続することができ、本当に嬉しく思っております。本奨励金のご支援を受けたことがはずみとなり、2020年度には新たな研究費を獲得することができましたので、本研究の成果をさらに発展させていきたいと考えております。

現在、世界中が新型コロナウイルス感染の蔓延により、今まで当たり前であったことができない毎日となってしまっております。科学者のはしくれとして、なにか少しでも社会のお役に立てることがあればと思います。本研究成果だけでは、まだまだ創薬までの道は遠いとは思いますが、少ない免疫回数で、素早い抗体応答を誘導できるような新しいワクチン開発に貢献できないだろうか、、、などと夢を膨らませております。

ぜひ一人でも多くの女性研究者が活躍できるよう、今後もご支援を継続していただければ幸いです。