糖鎖の機能阻害に基づく制御性 T 細胞の体内動態制御とアレルギー性疾患治療への応用

川島博人

千葉大学大学院薬学研究院

【研究の背景】

これまでに我々は、リンパ組織内へのリンパ球浸潤を司る血管である高内皮細静脈に発現する特殊な硫酸化糖鎖が、リンパ球ホーミングに必須の役割を果たすことを証明した（*Nat. Immunol.*, 2005）。また我々は、糖転移酵素欠損マウスを同酵素の過剰発現株で免疫することにより、効率良く抗糖鎖モノクローナル抗体を取得する新しい方法論を樹立し、新規抗糖鎖モノクローナル抗体の作製に成功している（*J. Biol. Chem.*, 2010, 2015）。

【目　　的】

本研究では、独自開発した新規抗糖鎖モノクローナル抗体（*J. Biol. Chem.*, 2010, 2015）を用いて、制御性 T 細胞の糖鎖発現および体内動態機構を解明するとともに、その体内動態の人為的制御に基づくアレルギー性疾患の治療効果を検証することを目的とする。

【方　　法】

マウス制御性T細胞における糖鎖発現の解析

マウス二次リンパ組織よりリンパ球を調製し、T細胞マーカーCD3、ヘルパーT細胞マーカーCD4、制御性T細胞に高発現するIL-2レセプター・鎖CD25、および制御性T細胞特異的転写因子FoxP3に対する抗体と各種の新規抗糖鎖モノクローナル抗体（*J. Biol. Chem.*, 2010, 2015）に対する反応性をフローサイトメトリーにより解析した。

マウス二次リンパ組織高内皮細静脈における糖鎖発現の解析

マウス末梢リンパ節および鼻咽頭関連リンパ組織等の二次リンパ組織を採取し、高内皮細静脈における糖鎖発現の詳細を、各種抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた免疫蛍光染色により解析した。

マウス二次リンパ組織への制御性T細胞のホーミングにおける糖鎖の機能解析

蛍光標識リンパ球のマウス二次リンパ組織へのホーミングに対する抗糖鎖モノクローナル抗体の阻害効果を調べることにより、リンパ球ホーミングにおける糖鎖の機能を解析した。また、抗糖鎖モノクローナル抗体投与後の通常型T細胞と制御性T細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。

制御性 T 細胞の体内動態の人為的制御に基づくマウス花粉症の発症抑制

抗糖鎖モノクローナル抗体を前投与したマウスおよび無処理マウスを、卵白アルブミン（OVA）の経鼻投与により感作した。再度 OVA 経鼻投与した後に、静粛な実験室内で一定時間内におけるくしゃみおよび鼻かき行動の回数を計測するとともに、血清中の OVA 特異的 IgE 量を ELISA により測定した。

【結　　果】

独自開発した抗糖鎖モノクローナル抗体を用いた解析により、制御性T細胞にシアリルルイスX糖鎖抗原が発現することが分かった。一方、マウス末梢リンパ節および鼻咽頭関連リンパ組織の高内皮細静脈においては、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体S2による強い染色が認められた。リンパ球ホーミングアッセイにおいて、S2抗体は末梢リンパ節および鼻咽頭関連リンパ組織へのリンパ球ホーミングを有意に抑制した。次にOVAを経鼻投与し、マウス花粉症モデルを用いた検討を行ったとこ

ろ、S2抗体の投与により、OVA特異的IgE抗体産生が有意に抑制されるとともに、くしゃみおよび鼻かき行動の回数が有意に低下し、花粉症様症状が軽減することが分かった。興味深いことに、S2抗体の投与により、通常型T細胞に対する制御性T細胞の割合が有意に上昇することが分かった。以上の結果から、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体S2は、通常型T細胞のホーミングを選択的に抑制するとともに制御性T細胞の二次リンパ組織への蓄積を誘導し、マウスの花粉症様症状を軽減することが示された。

【考　　察】

独自に樹立した抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体S2は、通常型T細胞の鼻咽頭関連リンパ組織へのホーミングを選択的に抑制するとともに制御性 T 細胞の蓄積を誘導し、マウス花粉症様症状を有意に抑制した。S2 抗体投与後に認められた制御性 T 細胞のホーミングの少なくとも一部は、制御性 T 細胞に発現の認められたシアリルルイス X 糖鎖抗原によるものである可能性が考えられる。実際我々は、PSGL-1 と呼ばれる特定のコアタンパク質に付加したシアリルルイス X 糖鎖抗原と結合して細胞接着を媒介する P-セレクチンが、鼻咽頭関連リンパ組織の高内皮細静脈に発現することを確認している（*J. Exp. Med.,* 2011）。以上の結果より、抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、制御性 T 細胞の体内動態の人為的制御とアレルギー性疾患治療に有用である可能性が示唆された。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究により、制御性 T 細胞の体内動態を制御することにより、免疫アレルギー疾患の発症を効果的に抑制できる可能性が示された。本研究で用いた抗硫酸化糖鎖モノクローナル抗体 S2 は、臨床応用への可能性を持つ有用な抗体であると考えられる。

【参考・引用文献】

Kawashima H, Petryniak B, Hiraoka N, Mitoma J, Huckaby V, Nakayama J, Uchimura K, Kadomatsu K, Muramatsu T, Lowe JB and Fukuda M. *N*-Acetylglucosamine-6-*O*-sulfotransferases 1 and 2 cooperatively control lymphocyte homing through L-selectin ligand biosynthesis in high endothelial venules. ***Nat. Immunol.*** 6:1096-1104, 2005.

Hirakawa J, Tsuboi K, Sato K, Kobayashi M, Watanabe S, Takakura A, Imai Y, Ito Y, Fukuda M, and Kawashima H. Novel anti-carbohydrate antibodies reveal the cooperative function of sulfated *N*- and *O*-glycans in lymphocyte homing. ***J. Biol. Chem.***, 285:40864-40878, 2010.

Ohmichi Y, Hirakawa J, Imai Y, Fukuda M, and Kawashima H. Essential role of peripheral node addressin in lymphocyte homing to nasal-associated lymphoid tissues and allergic immune responses. ***J. Exp. Med.***, 208:1015-1025, 2011.

Matsumura R, Hirakawa J, Sato K, Ikeda T, Nagai M, Fukuda M, Imai Y and Kawashima H. Novel antibodies reactive with sialyl Lewis X in both humans and mice define its critical role in leukocyte trafficking and contact hypersensitivity responses. ***J. Biol. Chem.***, 290:15313-15326, 2015.