

論文の内容の要旨

論文題目「人工糖脂質を用いた C-型レクチン受容体 **SIGNR1** の糖鎖結合選択性の解析に関する研究」

学位申請者 川内 暢子

キーワード: C-型レクチン受容体、人工糖脂質、ターゲティング、貪食細胞、**SIGNR1**

感染症やがんは全世界的には未だ主要な死因となっており、これら疾患の予防や治療に用いるためのワクチン開発は大きな課題となっている。これを達成するためには、樹状細胞 (Dendritic Cell, DC) への抗原の選択的送達とその機能調節を可能とするシステムが求められている。DCによる病原体の貪食とその分解は、生体防御上で非常に重要なプロセスであり、その表面に数多く発現して、貪食受容体として機能し得るC-型レクチン受容体 (C-type Lectin Receptor, CLR) が抗原の選択的送達を達成するための標的分子として注目を集めている。CLRはCa²⁺依存的に糖鎖を認識する分子の一群であり、病原体表面の糖鎖構造に結合し病原体を認識し貪食する。従ってCLRへのターゲティングシグナルとしてそれぞれのCLRに対して選択的に結合する糖鎖を利用する事が可能である。新規ワクチン構築のための優れた標的分子としてCLRを利用するためには、CLRの病原体取り込み受容体としての機能評価、なかでも糖鎖結合特異性の評価が必要不可欠である。申請者らは、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (Dipalmitoylphosphatidyl ethanolamine, DPPE) のアミノ基とオリゴ糖の還元端のアルデヒド基との間を還元アミノ化法で縮合させた人工糖脂質で被覆したリポソームを用いて、新規抗原送達システムの構築を行ってきた。そこで本研究では、CLRの機能解析における人工糖脂質の有用性を明らかにし、CLRの機能に関連づけてCLRの糖鎖選択性を評価することを目的とした。

第1章では、新たなワクチン開発のための抗原送達法としての糖鎖被覆リポソームの有用性を述べるとともに、このターゲット分子となる CLR の糖鎖結合特異性に関するこれまでの研究の経過をのべ、その現状と問題点について議論した。

第2章では、ともに EPN モチーフを持ち類似した糖鎖認識特異性を持っているマンノース結合 CLR である **SIGNR1**, **SIGNR3** および **Langerin** を介した糖鎖修飾粒子の細胞内への貪食を、糖鎖構造がはっきりしている人工糖脂質被覆リポソームをプローブとして用いることで比較し

た。その結果、3つの CLR の間で貪食受容体としての糖鎖選択性やリポソーム上の糖鎖密度の要求性が異なっていることが明らかになった。特に **SIGNR3** および **Langerin** は貪食受容体として **SIGNR1** に比べ明らかにリポソーム上での高い糖鎖密度を必要とした。このことは、たとえ **SIGNR1**, **SIGNR3**, **Langerin** のように CLR の糖鎖認識特異性が重複類似していても、適切な糖鎖を選択した上で人工糖脂質被覆リポソームの糖鎖密度を適切に調節することで、特定の CLR を標的とした分子指向性の高い粒子でデバイスをデザインし構築できることを強く示唆している。本章での重要な点のひとつとして、これまで可溶型の組換え CLR を用いて報告されていた CLR の糖鎖認識特異性と貪食受容体としての CLR の糖鎖選択性に違いがあることを明らかにしたことがあげられる。特に **SIGNR1** においてはその違いが顕著であった。**SIGNR1** は細胞膜上でオリゴマーを形成していると知られていることから、糖鎖選択性の違いは細胞表面に発現している **SIGNR1** の Membrane-associated form と Soluble form という存在様式の違いが影響している可能性と糖鎖を提示している粒子の貪食と糖鎖認識という機能的な違いが影響している可能性が考えられた。

第3章では、上記の点を明らかにするために、同じ人工糖脂質をプローブとして用いることで、貪食と細胞接着という機能に基づいて、細胞表面に発現している **SIGNR1** の糖鎖の選択性について検討した。**SIGNR1** を安定的に発現しているマウスマクロファージ様細胞への人工糖脂質被覆リポソームと貪食と人工糖脂質を固定化した固相への同細胞の接着を比較したところ、それぞれの機能での糖鎖の選択性にはわずかではあるが明確に差があることが判明した。ここで重要な点は、細胞接着分子としての **SIGNR1** の糖鎖選択性は、可溶性 **SIGNR1** を用いて調べられた糖鎖認識特異性と基本的に同じであり、貪食受容体としての糖鎖選択性に変化が生じているところにある。すなわち、第2章で課題とされた糖鎖選択性の違いは、**SIGNR1** の存在様式や構造的な違いではなく、機能的な違いに起因して生じていることが明らかになった。また本研究のもう一つの成果は、糖鎖をターゲティングシグナルとして用いて CLR を標的としたデリバリーシステムを構築する際には、可溶性 CLR で示された糖鎖認識特異性を基盤としてではなく、CLR を介した貪食機能に基づいた糖鎖選択性で示された最適な糖鎖を用いなければならないこと示した点である。

第4章では、CLR とリガンドとの結合が CLR の機能に応じて免疫応答に異なる影響を及ぼしていることを示した。**SIGNR1** のような貪食細胞上の CLR は病原体といった大きな粒子を取り込んで排除する貪食受容体としての役割と、自己抗原を認識し免疫のホメオスタシスを維持するためのエンドサイトーシス受容体あるいは細胞間接着分子としての機能を持っている。貪食細胞である RAW-SIGNR1 細胞が同じ糖鎖を持つリガンドを認識した場合、**SIGNR1** を介した大きな粒子のファゴサイトーシスが LPS 刺激で誘導される IL-6 および IL-1 の産生を抑制したのに対し、**SIGNR1** を介した可溶性高分子のエンドサイトーシスや細胞接着は全く影響を与えなかった。本章で得られた知見は CLR が機能に応じて免疫応答の形を規定していることを初めて示したものであるといえる。

第5章では全体を総括し今後の展望について述べた。人工糖脂質が CLR の機能に基づいた

糖鎖の選択性や機能を解析する上できわめて優れたツールになることを示した。また、人工糖脂質被覆リポソームを用いることで、特定の **CLR** に強い選択性を持つ抗原・薬剤の送達媒体を構築できることも示した。糖鎖を提示している粒子状の抗原送達キャリアについては多くの報告があり、いずれも効率的に抗原を **DC** に送達することができる。しかし、これらのキャリアのほとんどは **DC** を活性化・成熟させることはできないため、活性化シグナルを伝えるためのアジュバントを別に必要とする。それに対して、人工糖脂質被覆リポソームは抗原提示細胞に抗原を送達し **MHC** 分子上に抗原をクロスプレゼンテーションできるだけでなく、抗原提示細胞を活性化し成熟化させるアジュバント活性があり、追加のアジュバントを必要としない。このことは、**SIGNR1** を含めて **CLR** による人工糖脂質被覆リポソームの認識・貪食によって **DC** に活性化・成熟シグナルが伝達されることを意味している。しかしながら、**CLR** を介したシグナル伝達の詳細ははっきりと理解されていない。これまでの **CLR** を介したシグナル伝達系の解析では、多くの場合病原体そのものあるいは病原体の構成成分が用いられてきたが、本論文で示した **CLR** の糖鎖選択性の解析における人工糖脂質の有用性と同様に、**CLR** を介したシグナル伝達の解析においても人工糖脂質およびそれらを被覆したリポソームは有用なツールとなると考えられる。