

審査結果の要旨

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

本論文では、免疫反応において重要な C-型レクチン受容体 (CLR) について構造が明確な糖鎖修飾リポソームを用いることで糖鎖認識性の検討とともに貪食能との関係を明確にしている。抗原呈示をおこなう樹上細胞 (DC) は CLR を発現しており、病原体の貪食と分解は生体防御上で非常に重要である。この DC への選択的な抗原送達達成されれば有効なワクチン開発につながり、感染症やがんの診断や治療に役立つと期待されていることを根拠としている。実際、構造の明確な糖鎖を用いた研究により、培養細胞に発現した CLR のひとつである **SIGNR1** の結合特異性を明らかとするとともに、これが従来の可溶性の組み替えタンパク質を用いた結果と異なっていることが明確に示された。さらに、糖鎖構造の認識特異性による細胞接着とその後の貪食能の両側面の研究により効率良く糖鎖修飾リポソームを DC 様の細胞に取込ませることに成功し、また、**SIGNR1** を介した貪食が炎症性サイトカイン放出を抑制することを発見した。免疫に関与する糖鎖構造について系統的に評価した研究は非常にまれであり意義深い。

本学位論文の第 1 章では、新たなワクチンの必要性とその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、この標的分子となる 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することで、人工糖脂質被覆リポソームを用いた評価法を本論文で採用した経緯が述べられている。

第 2 章では 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** の貪食受容体としての糖鎖選択性を人工糖脂質被覆リポソームを用いて評価にした結果が報告されている。従来、これら 3 つの分子の糖鎖認識特異性は可溶性の組換え CLR を用いて検討されており、よく似た特異性・選択性を示すことが知られていたが、本研究における詳細な検討の結果、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 (量) の要求性が異なっていることが明らかにしている。また本章では、この糖鎖密度 (量) の要求性の違いの原因についてもキメラ分子を用いて検討しており、**SIGNR1** が **SIGNR3** や **Langerin** よりも低い糖鎖密度 (量) のリポソームでも貪食が可能であるのは、**SIGNR1** が細胞膜上でオリゴマー形成をしていることに起因することも明らかにしている。

第 3 章では、**SIGNR1** の糖鎖選択性が **SIGNR1** の機能に依存して異なっていることについて述べている。第 2 章では、以前に調べられた可溶性の組換え CLR を用いた結果とは貪食受容体としての **SIGNR1** の糖鎖選択性が異なっていることを示したが、この糖鎖選択性の違いは細胞膜上に発現した **SIGNR1** と可溶性組換え **SIGNR1** というタンパク質の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 **SIGNR1** の機能的な違いが影響している可能性が考えられた。そこで、この点を明らかにするために、**SIGNR1** の存在状態を同じとし、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 **SIGNR1** の糖鎖選択性について検討している。具体的には **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、貪食受容体として機能するのか接着分子として機能するのかによって **SIGNR1** の糖鎖選択性が変化することを明確に示している。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。

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す可能性について述べている。**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** 刺激で誘導される特定の炎症性サイトカイン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このサイトカインの産生に全く影響を与えないことを、粒子径の異なるリポソームや様々な糖鎖プローブを用いて明確に示している。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価値のあるものである。

最後に第5章において全ての章を総括して、本研究の新規性および成果を簡潔に述べている。本論文において著者は、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すとともに、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を明瞭に示したといえる。本論文の成果は、抗原の **DC** への効率的な送達システムを構築する上で重要な知見であり、今後のワクチン開発に大きく貢献するものと期待される。

平成27年1月10日に行われた公聴会では、貪食とエンドサイトーシスの違いなどについて質疑がなされ、いずれも的確な回答がなされたことが認められた。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 川内 暢子氏は東海大学博士（理学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	薬学博士	蟹江 治	糖鎖科学研究所教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	理学博士	稲津 敏行	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	薬学博士	松下 操	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	博士(薬学)	水谷 隆太	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	博士(農学)	笹川 昇	工学部准教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)
委員	理学博士	小島 直也	工学部教授	(総合理工学研究科総合理工学専攻)