

東海大学大学院平成26年度博士論文

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

STUDIES ON CARBOHYDRATE PREFERENCES AND FUNCTIONS OF A C-TYPE  
LECTIN, SIGNR1 USING NEOGLYCOLIPIDS

指導 小島直也 教授

東海大学大学院 総合理工学研究科  
総合理工学専攻

川内 暢子

## 目次

略語一覧	4
第 1 章 研究の背景	7
1-1 細胞免疫応答を誘導できる新規抗原送達システムの必要性とリポソーム 媒体の送達システムとしての有用性	7
1-2 抗原提示細胞上の標的分子としての C-型レクチン受容体	9
1-3 マウス CLR, SIGNR1	11
1-4 新規抗原送達媒体としてのオリゴマンノース被覆リポソーム	12
1-5 従来の CLR の糖鎖結合機能の評価方法と人工糖脂質を用いた新規評価方法	13
1-6 本研究の目的	16
1-7 参考文献	17
第 2 章 貪食受容体としての C-型レクチン受容体の糖鎖選択性の比較	
2-1 序論	28
2-2 実験材料および方法	
2-2-1 試薬および細胞	29
2-2-2 人工糖脂質の合成	30
2-2-3 人工糖脂質被覆リポソームの作製	30
2-2-4 リポソームの取り込み評価	31
2-3 結果	
2-3-1 CLR 発現細胞による Man3-DPPE 被覆リポソームの取り込み	32
2-3-2 SIGNR1 発現細胞によるマンノース含有人工糖脂質被覆リポソームの 取り込み	33

2-3-3	SIGNR1 発現細胞による LNFP3-DPPE と BNCP-DPPE 被覆 リポソームの取り込み	34
2-3-4	SIGNR3 および Langerin の糖鎖選択性の解析	35
2-3-5	人工糖脂質被覆リポソームの取り込みにおける糖鎖密度要求性	36
2-3-6	CLR 発現細胞による高密度人工糖脂質被覆リポソームの取り込み	36
2-3-7	SIGNR1 および SIGNR3 のネック領域の糖鎖選択性および糖鎖密度 要求性の違いに及ぼす影響	37
2-4	考察	38
2-5	参考文献	42
第3章 貪食受容体および接着分子としての SIGNR1 の糖鎖選択性の評価		
3-1	序論	55
3-2	実験材料および方法	
3-2-1	細胞および材料	58
3-2-2	人工糖脂質を固定化した固相に対する細胞接着評価法	58
3-2-3	RAW-SIGNR1 細胞によるリポソーム取り込みの評価法	59
3-3	結果	
3-3-1	固相化人工糖脂質に対する RAW-SIGNR1 細胞の接着評価	60
3-3-2	SIGNR1 を介した各種固相化糖脂質に対する細胞接着比較	60
3-3-3	RAW-SIGNR1 細胞によるリポソーム取り込み評価	61
3-3-4	SIGNR1 を介した各種糖脂質被覆リポソームの取込みの比較	62
3-3-5	SIGNR1 を介した糖脂質低被覆率リポソームの取り込み	63
3-4	考察	64

3-5 参考文献	67
第4章 免疫応答に及ぼす貪食受容体としての SIGNR1 の機能評価	
4-1 序論	80
4-2 実験材料および方法	
4-2-1 試薬、細胞および方法	81
4-2-2 サイトカインの測定方法	82
4-3 結果	
4-3-1 SIGNR1 を介した OML の貪食による IL-6 の分泌抑制	82
4-3-2 粒径が異なる OML による IL-6 の分泌抑制	83
4-3-3 SIGNR1 を介したエンドサイトーシスによる IL-6 の分泌抑制	84
4-3-4 SIGNR1 を介した細胞接着による IL-6 の分泌抑制	84
4-4 考察	85
4-5 参考文献	86
第5章 全体の総括と今後の展望	
5-1 総括と展望	94
5-2 参考文献	100
謝辞	103

## 略語一覧

APC	抗原提示細胞 (antigen-presenting cell)
BNCP	biantennary N-linked core pentasaccharide
BSA	ウシ血清アルブミン (bovine serum albmin)
CHO	チャイニーズハムスター卵巣細胞 (chinese hamster ovary cell)
CLR	C-型レクチン受容体 (C-type lectin receptor)
CRD	糖鎖認識ドメイン (carbohydrate recognition domain)
CTL	細胞障害性 T リンパ球 (cytotoxic T-lymphocyte)
DC	樹状細胞 (dendritic cell)
DC-SIGN	樹状細胞特異的 ICAM-3 結合ノンインテグリン (dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing nonintegrin)
DPPC	ジパルミトイルホスファチジルコリン (Dipalmitoylphosphatidylcholine)
DPPE	ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (Dipalmitoylphosphatidylethanolamine)
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
EPN	Glu-Pro-Asn
FACS	Fluorescence-activated cell sorter
FITC	fluorescein isothiocyanate
FL	fucosyllactose
GlcNAc	N-アセチルグルコサミン

HBSS	Hank's balanced salt solution
HIV	ヒト免疫不全ウイルス
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
IL	インターロイキン
Le	ルイス (lewis)
LNDFH	lacto-N-difucohexaose
LNFP	lacto-N-fucopentaose
LNT	lacto-N-tetraose
LPS	Lipopolysaccharide
Man2	マンノビオース (mannobiose)
Man3	マンノトリオース (mannotriose)
Man5	マンノペンタオース (mannopentaose)
MHC	主要組織適合性抗原 (major histocompatibility complex class)
MMR	マクロファージマンノース受容体
NGL	Neo-glyco lipid
ODN	オリゴデオキシヌクレオチド (oligodeoxynucleotide)
OML	オリゴマンノース被覆リポソーム (oligomannose-coated liposome)
OVA	卵白アルブミン
PAA	ポリアクリルアミド
PAMPs	病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular pattern)

PBS	リン酸緩衝食塩水
PE	phycoerythrin
PRRs	パターン認識受容体 (pattern recognition receptor)
SIGNR	DC-SIGN 関連分子 (DC-SIGN related molecule)
TCR	T 細胞受容体 (T-cell receptor)
Th	ヘルパーT 細胞 (helper T cell)
TLC	薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography)
TLR	Toll 様受容体 (Toll-like receptor)

## 第1章 研究の背景

### 1-1 細胞免疫応答を誘導できる新規抗原送達システムの必要性和リポソーム媒体の送達システムとしての有用性

様々なウイルス感染症やマラリアをはじめとする多くの原虫感染症は全世界的に未だ主要な死因となっており、これら疾患の予防ないし治療に用いるためのワクチン開発は緊急の課題となっている。一方で、がんにおいても免疫療法に死するワクチンの開発が望まれている。ウイルス感染症、原虫感染症およびがんの制御には、共通して抗原特異的な CD8<sup>+</sup> 細胞障害性 T リンパ球 (CTL) が重要な役割を担っている。加えて、様々な疾患に応じて CD4<sup>+</sup> T リンパ球からヘルパー T (Th) 細胞への分化も必要である。Th 細胞の中でも Th1 細胞と Th2 細胞は互いに拮抗作用をもつ事が知られており、Th1 細胞は CTL の誘導に不可欠であるが、Th2 細胞の誘導はがんやアレルギーのワクチンや細胞内寄生病原体に対するワクチンにとって好ましくない影響を与える。従って感染症やがんに対するワクチンは CD8<sup>+</sup> 及び CD4<sup>+</sup> T リンパ球をともに活性化し、抗原特異的な CTL および Th1 細胞、そのなかでも細胞性免疫応答を誘導できるものでなければならない。しかし、現在使用されているワクチンは基本的に抗原特異的な液性免疫を誘導するものが主流となっており、抗原特異的な細胞性免疫を誘導できるワクチンはほとんど存在しない。

外部から侵入した病原体に対する免疫応答は、次のようなメカニズムで誘導される事が知られている。まず、末梢領域において抗原提示細胞 (APC) の一つである未熟な樹状細胞 (DC) が病原体を捕捉した後、活性化・成熟して所属リンパ節の T 細胞領域に遊走する。一方で DC 内部では病原体が分解され、その一部が抗原ペプチドとして自身の主要組織適合性抗原 (MHC) クラス I または II 分子上に提示される。さらに DC が移動した所属リンパ節において、ナイーブ CD8<sup>+</sup> 及び CD4<sup>+</sup> T リンパ球が MHC 分子上に提示された抗原ペプチドを認



識・活性化し、それぞれ機能を持つリンパ球へと分化する事で獲得免疫応答が誘導される。

すなわち、APCの一つであるDCは、自然免疫応答とその後に引き続く獲得免疫応答の誘導において、非常に重要な役割を担っている細胞であるといえる<sup>1)3)</sup>。従って新しいワクチンに用いる抗原送達システムを設計する場合には、DCへの選択的な標的化とその機能調節を可能とするシステムが求められる<sup>4)6)</sup>。

ワクチンに適した抗原送達システムは、次に述べるような幾つかの基準を満たしている必要がある<sup>6)</sup>。第一に、APC特にDCに対する特異的な標的化が可能であることが必要である。第二に、MHCクラスIに抗原ペプチドを提示させる経路に抗原を送達できる必要がある。通常、DCに取り込まれた外来性抗原はMHCクラスIIに優先的に提示される。一方、MHCクラスIに提示されるペプチド抗原は、内在性タンパク質由来のペプチドである。しかし、外来性抗原であってもMHCクラスIに提示される場合がある。これをクロスプレゼンテーションと呼んでいる。クラスIへの抗原提示は抗原特異的なCTLを誘導するためには必須であるので、細胞性免疫誘導能を持つワクチンに用いる抗原送達システムにはクロスプレゼンテーション能力が必須となる。第三として、APCに対して刺激シグナルを伝達できる必要がある。この刺激シグナルが伝達されないと免疫寛容が誘導されてしまう。例えば、抗原を結合させた抗DEC205抗体は効果的にAPCに対して抗原を送達し、その後その抗原をMHCクラスIへ提示する経路にのせることができる。しかし、T細胞に対してAPCから補助刺激シグナルが同時に伝達されない場合、この抗原を結合させた抗DEC205抗体は、抗原特異的なCD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>調節性T細胞を誘導してしまい、結果として抗原に対する免疫寛容を引き起こす。第四に、幅広いMHCに適合するようになるべく大きく多様な抗原配列を抗原送達媒体に挿入できることも求められる。例えば、脂質二重層からなる小胞であるリポソームは、水溶性の抗原タンパク質のような高分子を内部に、また脂質のような非極性抗原を脂質二重

層の中に取り込むことができるため、抗原送達媒体として優れている。現在までに様々なリポソームを含む多数の粒子キャリアが DC への抗原送達および T 細胞応答誘導を達成すべく試されている<sup>7),8)</sup>。一つの事例をあげると、抗原と CpG-ODN を被覆した中性もしくは酸性のリン脂質で構成されたリポソームは生体内で DC に抗原を送達し、抗原特異的な CTL の誘導に成功している。DC に特異的な受容体とそのリガンドとの間の相互作用を利用することは DC と送達したい抗原との間の相互作用を増強できるので、特異的な抗原送達のためには好ましい方法だと考えられる。例えば DC に特異的な Fc 受容体やインテグリンに対する抗体と抗原との免疫複合体によって抗原を DC へ送達することも試みられており、抗原の効率的な DC への取り込み、抗原ペプチドのクロスプレゼンテーション、さらに T 細胞の活性化などがこれらの複合体によって誘導されることが示されている<sup>9),10)</sup>。

## 1-2 抗原提示細胞上の標的分子としての C-型レクチン受容体

APC 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る。多くの病原体は病原体関連分子パターン (PAMPs) と呼ばれる類似の構造を有しており、APC はこの PAMPs を認識する様々なパターン認識受容体 (PRR) をその細胞膜上に発現している。最もよく研究されている PRR として、2011 年度のノーベル医学生理学賞の受賞対象になった Toll 様受容体 (TLR) ファミリーがある<sup>11)</sup>。グラム陰性菌の細胞表面に存在するリポ多糖のような PAMPs は APC 上の TLR を介してシグナルを伝達し、炎症性のサイトカインを産生させる。更に APC の成熟も引き起こし、自然免疫応答と獲得免疫応答を誘発する。このような報告からも、TLR が自然免疫応答や獲得免疫応答の基軸受容体の一つになっている事は間違いないが、TLR そのものには病原体の貪食を媒介する能力はない。そのため、抗原送達のための標的として TLR を選択することは適切ではない。

一方で、Table 1-1 に示したように、免疫に関与する細胞は貪食受容体として機能する事が出来る C-型レクチン受容体 (CLR) を数多く発現しており、その機能が近年注目されている<sup>12),13)</sup>。CLR は 1 回膜貫通型の 2 型膜タンパク質で、いくつかの CLR はその分子内領域に、抗原の取り込みや細胞内での後期エンドソームへの移送に関与するようなモチーフを有している。CLR が持っているこのような機能から、APC に発現している CLR を APC への選択的な抗原送達のための標的として利用できると考えられている。さらに最近の研究より、CLR はその分子内領域に免疫受容体活性型チロシンモチーフや免疫受容体抑制型チロシンモチーフを有しており、T 細胞の分化を決定づけるサイトカインの産生誘導に関わるシグナル伝達系を調節できる事が明らかとなってきた<sup>13)</sup>。従って、抗原送達とその後の機能調節といった両面から、APC 上の CLR をターゲットとする事は、APC への新規抗原送達システムを構築するうえで大変理にかなった方法だといえる。実際、APC 上に発現が限られているマクロファージマンノース受容体 (MMR; CD206) や樹状細胞特異的 ICAM-3 結合ノンインテグリン (DC-SIGN)、dectin-1 のような CLR に対して特異的な抗体を用いて標識化する事で抗原を細胞の後期エンドソーム、リソソームに移送し、MHC 上で抗原提示をさせ T 細胞を活性化できることが示されている<sup>14),15)</sup>。

また、C-型レクチンファミリーは一つ以上の糖鎖認識ドメイン (CRD) を有しており、Ca<sup>2+</sup> 依存的に糖鎖を認識する分子の一群である。この CRD を通して、CLR は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。糖鎖は抗体に比べ分子として小さく、安定であり、化学的に合成できることから、抗体に比べて優れた利点をもっている。特に DC には、MMR や DC-SIGN、DC-SIGN 関連分子 (SIGNRs) や Langerin (CD207) のように、分子内に Glu-Pro-Asn (EPN) モチーフを持ちマンノース、N-アセチ

ルグルコサミン (GlcNAc) およびフコースを認識する CLR が数多く発現している<sup>13)</sup>。また、マンノースを末端にもつ糖鎖は、生きているほ乳動物細胞ではまれにしか細胞表層に発現していないのに対し、多くの病原体表層で共通にみられる糖鎖構造の一つである。従って、末端にマンノースを有する糖鎖は、これらの CLR を介して抗原や薬剤を送達するためのターゲティングシグナルとして大変有用であると考えられる。

### 1-3 マウス CLR, SIGNR1

DC-SIGN はヒトの単球由来 DC に強く発現している CLR として知られており、また皮膚や粘膜あるいはリンパ節の DC のサブセットにも発現しているため、DC への選択的な抗原送達においてよい標的分子になると考えられている<sup>20)</sup>。DC-SIGN は高マンノース型の糖鎖やフコースを含むルイス血液型糖鎖に高い親和性を示し、HIV や *Mycobacterium tuberculosis*, *Helicobacter pylori* 等の病原体を認識することが知られている。ヒト DC-SIGN のホモログとしてマウス DC-SIGN とそれに関連したいくつかの分子 (SIGNR1~SIGNR8) がマウスのゲノムにはエンコードされている<sup>24)</sup>。ヒト DC-SIGN と同様にマウス DC-SIGN も DC に発現していることが知られているが、構造的にはヒト DC-SIGN と異なっており、また糖鎖への結合性についても見いだされていない。一方マウスが有する多くの SIGN 関連分子 (SIGNRs) の中で、SIGNR1 は構造的にヒト DC-SIGN と類似しており、ヒト DC-SIGN とおなじ糖鎖構造や病原体を認識できることから、ヒト DC-SIGN の構造的・機能的な相同体と考えられている (Fig. 1-1)<sup>28)</sup>。しかしながら、SIGNR1 の発現パターンはヒト DC-SIGN とは全く異なっており、脾臓のマージナルゾーンマクロファージや腹腔内常在性マクロファージに強い発現が見られるが、骨髄由来の DC での発現は見られないと報告されている<sup>23)</sup>。しかし、腹腔内のマクロファージの一部は DC 様の抗原提示細胞に分化できることが知られ

ていることから、DC での **SIGNR1** 発現については未だに不明な点がある。筆者は腹腔内の常在性マクロファージの中で DC 様の抗原提示細胞に成熟できる細胞に **SIGNR1** が一定量発現していることを見いだしている<sup>29)</sup>。

#### 1-4 新規抗原送達媒体としてのオリゴマンノース被覆リポソーム

このような考えに基づいて当研究室では、オリゴマンノース被覆リポソーム (OML) をプラットフォームとして用いて、抗原送達システムの構築を試みている。OML はジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) とコレステロール、およびマンノトリオース (Man3; Man $\alpha$ 1-6(Man $\alpha$ 1-3)Man) を有する人工糖脂質 (モル比 10:10:1) から構成された、粒径およそ 1  $\mu$  m のリポソームである (Fig. 1-2)<sup>16)</sup>。リポソームの表面はマンノースで覆われているため、他の糖鎖修飾粒子と同様に貪食細胞に容易に貪食される。これまでの研究により、OML をマウス腹腔内に投与すると 1 時間以内に腹腔の常在性腹腔内マクロファージ (rpM $\Phi$ ) および DC 様細胞に貪食されることがわかっている<sup>18)</sup>。また、OVA の抗原ペプチドに対する T 細胞受容体 (TCR) のトランスジェニックマウスである OT-1 および OT-2 由来の T 細胞を用いた検討によると、OVA を含む OML で感作した抗原提示細胞は、OVA を含む糖鎖を被覆していないリポソームや OVA そのものに比べ、それぞれ 1/100 および 1/1000 の抗原量で抗原特異的な CD8<sup>+</sup>あるいは CD4<sup>+</sup>T 細胞応答を誘導する事ができた<sup>18)</sup>。この結果から、OML に封入された抗原は、効率的に抗原提示細胞の MHC class I および class II 分子上に提示され、それぞれ CD8<sup>+</sup>および CD4<sup>+</sup>T 細胞を活性化することが出来る事が判明した。また、OML は Th1 分化誘導に必須である IL-12 の選択的な産生を促すとともに、CD40 や CD80、CD86 といった T 細胞を活性化する共刺激分子の発現上昇を誘導するアジュバント活性も有している<sup>19)</sup>。これらのことから、OML は細胞性免疫を誘導出来る抗原送達媒体として大変

優れた特性をもつといえる。実際 OML を基盤としたワクチンによって様々な原虫感染症、がん、あるいはアレルギーの発症予防や発症後の病態コントロールに成功している<sup>16)</sup>。これまでの研究から、Fig. 1-3 に示す様な機構が想定されているが、OML のような糖鎖被覆リポソームにより誘導される細胞性免疫の詳細なメカニズムや、OML 受容体分子とその受容体の糖鎖選択性に関しては未だ不明な点が多い。特に、DC への選択的な送達と免疫応答誘導のために OML を用いることの妥当性については明らかではなかった。

これまで小島らは、マウス腹腔マクロファージが OML を取り込む際の機能的な受容体が SIGNR1 であることを明らかにした<sup>20)</sup>。また最近では、微生物上への C3 の沈着が微生物上の多糖と補体 C1q の SIGNR1 への結合によって引き起こされ、それに引き続き補体系の古典的経路が活性化されることが示されている。また著者らは、SIGNR1 が抗原提示細胞の成熟を調節していると考えられている Lyn のような Src ファミリーキナーゼとともにマイクロドメインに局在していることも見いだしている<sup>21)</sup>。このようにマウスにおいて SIGNR1 が糖鎖被覆リポソームを基盤としたワクチンの最も有力な受容体と考えられる。そのため糖鎖被覆リポソームをプラットフォームとして用いた新規ワクチンの効果をマウスモデルで検証し最適化してゆく上で、SIGNR1 の糖鎖被覆リポソームの貪食選択性や糖鎖被覆リポソームによる SIGNR1 を介したシグナル伝達系の解析が必須となる。

#### 1-5 従来の CLR の糖鎖結合機能の評価方法と人工糖脂質を用いた新規評価方法

これまで述べたように、CLR は病原体の取り込みと細胞の機能調節の両方において重要な機能を有しているため、新規ワクチン構築のための優れた標的分子になりうる。従って、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は、糖鎖をリガンドとした新規ワクチン構築のためには必要不可欠である。また、CLR は生体内において貪

食受容体として機能しているだけでなく、自己の糖タンパク質などのエンドサイトーシス受容体、あるいは細胞認識・接着分子としても機能しており、これらの機能を通してホメオスタシスにも重要な役割を担っていると考えられている<sup>22)</sup>。これらのことから、CLRには食食受容体としての機能や細胞接着としての機能、また自己や非自己の認識というような多様な機能をもっている (Fig. 1-4)。しかし、CLR自身が病原体の糖鎖と自己の糖鎖を区別する事ではなく、また食食と細胞接着という機能の違いによっても糖鎖をそれぞれ区別することはないと一般的には考えられている。

既に多くの研究者によって、CLRの糖鎖認識特異性については検討されている<sup>23)-26)</sup>。これらの報告では、可溶化組換えCLRによる固相化された糖鎖プローブへの結合を指標として評価される方法を用いられている。一般的にはCLRの機能の違いによってCLRの糖鎖選択性が異なることはない信じられているので、可溶性組換えCLRでの糖鎖結合特異性が細胞表面に存在しているCLRの糖鎖認識特異性として受け入れられている。しかしこれまでの報告を比較してみると、それぞれの研究で用いる可溶型CLRや糖鎖プローブの違いによってCLRの糖鎖認識特異性が異なっている場合がある。本論文の主題となるSIGNR1の糖鎖認識特異性を例としてあげれば、人工糖脂質固定化固相と可溶化組換えSIGNR1を用いて研究したGalustianらのチームは、Le<sup>a</sup>やLe<sup>x</sup>のようなルイス式血液型抗原糖鎖のほうがマンノースを含む糖鎖よりもより選択的に認識されると報告している<sup>23)</sup>。しかし、Takaharaらの研究チームでは、糖鎖マイクロアレイと evanescent-field fluorescence-assisted system を用いて可溶化組換えSIGNR1の糖鎖認識結合特異性を検討し、SIGNR1はマンノースを含む糖鎖には強く結合するが、Le<sup>a</sup>やLe<sup>x</sup>のようなフコースを含む糖鎖は認識しないと結論づけている<sup>26)</sup>。また、Powleslandらの報告では、可溶型組換えSIGNR1の糖鎖マイクロアレイに対する結合性そのものを見いだしていない<sup>24)</sup>。生理的な条件下において、CLRは細胞膜に存在し、場

合によっては細胞膜上でオリゴマー構造を形成することで、貪食受容体や細胞接着分子としての機能を果たしている。従って、生体内原位置での CLR の糖鎖認識特異性あるいは選択性を評価するためには、可溶型 CLR ではなく、生理的な条件、すなわち細胞膜上に埋まった状態の CLR を用いて、機能に基づいた糖鎖認識特異性・選択性を系統的に評価する必要がある。

CLR は貪食・エンドサイトーシス受容体と細胞接着分子といった、あるいは非自己認識と自己認識というような機能の二面性を持っている。そのため、糖鎖を CLR の標的シグナルとして用いて新規ワクチン、抗原送達システムを構築する場合には、CLR の貪食機能に着目して評価することが望ましい。これまで貪食機能を評価する場合には、一般的な手法として、微生物あるいは微生物由来の高分子多糖体がプローブとして用いられている<sup>30)</sup>。しかし、微生物表面には多様な糖鎖はもちろん他の様々な分子が存在しており、またその糖鎖構造も不均一であるため、貪食能の糖鎖選択性を解析する上で適切なプローブとはいえない。従って、これまで貪食機能に着目して CLR の糖鎖選択性を構造既知の糖鎖プローブを用いて系統的評価した研究は非常に少なく、CLR を介した貪食過程での詳細な糖鎖選択性については不明な点が多い。実際、可溶化ヒト DC-SIGN のホモログである SIGNR1 と SIGNR3 はどちらも末端マンノースを有する糖鎖やルイス血液型糖鎖に強い親和性を示すが、これら CLR を介した細胞への細菌の取り込みでは顕著な違いがみられている<sup>27)</sup>。

当研究室では、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (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。ここで用いられる人工糖脂質は両親媒性物質であり、その疎水部分は DPPC、コレステロール、人工糖脂質からなるリポソームの脂質 2 重層に容易に取り込まれ、またオリゴ糖部分はその親水性のために水層に向かって露出する。そのため、構造既知のオリゴ糖から多様な人工糖脂質のライブラ



リーを作製しておけば、構造既知の様々な糖鎖が表面に露出したリポソームのライブラリーを構築することが可能となる。また、リポソーム上の糖鎖の密度も容易にコントロールすることができる。また、人工糖脂質は容易にプラスチックの固相上に固定化することができることから、固定化人工糖脂質のアレイを用いて CLR を介した細胞接着も簡便に評価することが可能である。すなわち、構造既知の多様な人工糖脂質は細胞表面に発現した CLR の貪食受容体あるいは細胞接着分子としての糖鎖結合選択性を解析する上で理想的なツールとなるはずである。

#### 1-6 本研究の目的

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。そのために 14 種類の構造既知のオリゴ糖より Table 1-2 に示す 14 種類の人工糖脂質を合成した。本論文においては次章以降、Table 1-2 に示した人工糖脂質を必要に応じて用いることで、人工糖脂質被覆リポソームあるいは人工糖脂質固定化固相を調製し、CLR の機能と関連付けて CLR の糖鎖結合特異性を評価することを試みた。まず第 2 章では、糖鎖認識特異性が類似している三つのマウス CLR、SIGNR1、SIGNR3 および Langerin の貪食受容体としての糖鎖選択性について糖鎖構造が明確な人工糖脂質を様々な比率で含むリポソームを用いて比較検討した。第 3 章においては、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に SIGNR1 を安定的に発現させた細胞を用いて、貪食細胞上に発現している SIGNR1 の貪食受容体としての糖鎖選択性と糖鎖認識分子としての糖鎖結合特異性について人工糖脂質被覆リポソームおよび人工糖脂質固定化プレートを用いて系統的に評価した。このような機能性の違い、つまり CLR が貪食受容体として機能した場合と細胞接着分子として機能した場合では糖鎖選択性が異なることから、

細胞内での免疫応答も機能によって異なる事が考えられた。そのため第4章では、SIGNR1の様々な機能、すなわち貪食受容体、エンドサイトーシス受容体および接着分子としての機能がTLR4を介した炎症性サイトカインの産生にどのような影響を与えるかを人工糖脂質被覆リポソームと、SIGNR1分子を恒常的に発現しているRAW細胞（RAW-SIGNR1細胞）を用いて検討した。さらに、以上のような検証を通して、人工糖脂質の有用性とOMLを抗原送達の媒体として用いる妥当性について考察した。

#### 1-7 参考文献

1. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol*, 19, 12-25, 1999
2. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1036-1041, 1999
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252, 1998
4. O'Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat Rev Drug Discov*, 2, 727-735, 2003
5. Tacke PJ, Torensma R, Figdor CG. Targeting antigens to dendritic cells in vivo. *Immunobiology*, 211, 599-608, 2006
6. Moron G, Dadaglio G, Leclerc C. New tools for antigen delivery to the MHC class I pathway. *Trends Immunol*, 25, 92-97, 2004
7. Tacke PJ, de Vries IJ, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from

- ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol*, 7, 790-802, 2007
8. Joshi MD, Unger WJ, Storm G, van Kooyk Y, Mastrobattista E. Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *J Control Release*, 161, 25-37, 2013
  9. Heijnen IA, van Vugt MJ, Fanger NA, Graziano RF, de Wit TP, Hofhuis FM et al. Antigen targeting to myeloid-specific human Fc gamma RI/CD64 triggers enhanced antibody responses in transgenic mice. *J Clin Invest*, 97, 331-338, 1996
  10. Liu Y, Gao X, Masuda E, Redecha PB, Blank MC, Pricop L. Regulated expression of Fc gamma R in human dendritic cells controls cross-presentation of antigen-antibody complexes. *J Immunol*, 177, 8440-8447, 2006
  11. Kawai T, Akira S. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*, 17, 338-344, 2005
  12. McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol*, 41, 1109-1121, 2004
  13. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Reis e Sousa C. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*, 7, 1258-1265, 2006
  14. Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, Nussenzweig M, Steinman RM. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol*, 151, 673-684, 2000
  15. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, 168, 2118-2126, 2002

16. Kojima N, Ishii M, Kawauchi Y, Takagi H. Oligomannose-coated liposome as a novel adjuvant for the induction of cellular immune responses to control disease status. *BioMed Research International*, 2013, Article ID 562924, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/562924>, 2013
17. Ikehara Y, Niwa T, Biao L, Kabata-Ikehara S, Ohashi N, Kobayashi T et al. A Carbohydrate Recognition-Based Drug Delivery and Controlled Release System using Intraperitoneal Macrophages as a Cellular Vehicle, *Cancer Res*, 66, 8740-8748, 2006
18. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi, H et al. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett*, 260, 137-145, 2008
19. Takagi H, Furuya N, Kojima N. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250, 2007
20. Takagi H, Numazaki M, Kajiwara T, Abe Y, Ishii M, Kato C et al. Cooperation of specific ICAM-3 grabbing nonintegrin related 1 (SIGNR1) and complement receptor type 3 (CR3) in uptake of oligomannose-coated liposomes by macrophages. *Glycobiology*, 19, 258-66, 2009
21. Numazaki M, Kato C, Kawauchi Y, Kajiwara T, Ishii M, Kojima N. Cross-linking of SIGNR1 activates JNK and induces TNF- $\alpha$  production in RAW264.7 cells that express SIGNR1. *Biochem Biophys Res Commun*, 386, 202-206, 2009
22. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. Mycobacteria target

- DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, 197, 7-17, 2003
23. Galustian C, Park CG, Chai W, Kiso M, Brueninf SA, Kang YS et al. High and low affinity carbohydrate ligands revealed for murine SIGN-R1 by carbohydrate array and cell binding approaches, and differing specificities for SIGN-R3 and langerin. *Int Immunol*, 16, 853-866, 2004
24. Powlesland, AS, Ward EM, Sadhu SK, Guo Y, Taylor, ME, Drickamer K. Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins. *J Biol Chem*, 281, 20440-20449, 2006
25. Tateno H, Ohnishi K, Yabe R, Hayatsu N, Sato T, Takeya M et al. Dual specificity of Langerin to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem*, 285, 6390-6400, 2010
26. Takahara K, Arita T, Tokieda S, Shibata N, Okawa Y, Tateno H et al. Difference in fine specificity to polysaccharides of *Candida albicans* mannoprotein between mouse SIGNR1 and human DC-SIGN. *Infect Immun*, 80, 1699-1706, 2012
27. Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, Yoshida H, Kimura Y, Kang YS et al. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol*, 16, 819-829, 2004
28. Stephen A. Parent, Theresa Zhang, Gary Chrebet, Joseph A. Clemas, David J. Figueroa, Betty Ky, Richard A. Blevins, Christopher P. Austin, Hugh Rosen. Molecular characterization of the murine SIGNR1 gene encoding a C-type lectin homologous to human DC-SIGN and DC-SIGNR. *Gene*, 293, 33-46, 2002
29. Kawauchi Y, Igarashi M, Kojima N. C-type lectin receptor SIGNR1 expressed on

peritoneal phagocytic cells with an immature dendritic cell-like phenotype is involved in uptake of oligomannose-coated liposomes and subsequent cell maturation. *Cell Immunol*, 287,121-128, 2014

Table 1-1. Myeloid cells express variety of CLRs

CLR	Cell types	Carbohydrate specificity
MR (CD206)	DC, Mo, Mφ,	Man, Fuc, GlcNAc
Dec205 (CD205)	DC, LC, Mφ, B	Man, Fuc, GlcNAc
Endo180	MØ	Man, Fuc, GlcNAc
DC-SIGN (CD209)	DC, Mφ	Mannan, high mannose Fuc, Lewis antigens, Man
SIGNR1 (CD209b)	Marginal zone Mφ, Peritoneal Mφ	Mannan, high mannose Fuc, Lewis antigens, Man
SIGNR3	DC?, Mφ?	Mannan, high mannose Fuc, Lewis antigens, Man
Dectin-2	DC, Mφ	High mannose
BCDA-2	DC	Unknown
DCIR	DC, Mo, Mφ, B	Lewis b, mannotriose
Langerin (CD207)	LC, DC	Man, Fuc, GlcNAc
MGL	DC, Mφ	GalNAc, Gal, Le <sup>x</sup>
Dectin-1	DC, LC, Mφ	beta-glucan
CLEC-1	DC, EC	Unknown
DCAL	DC	Unknown

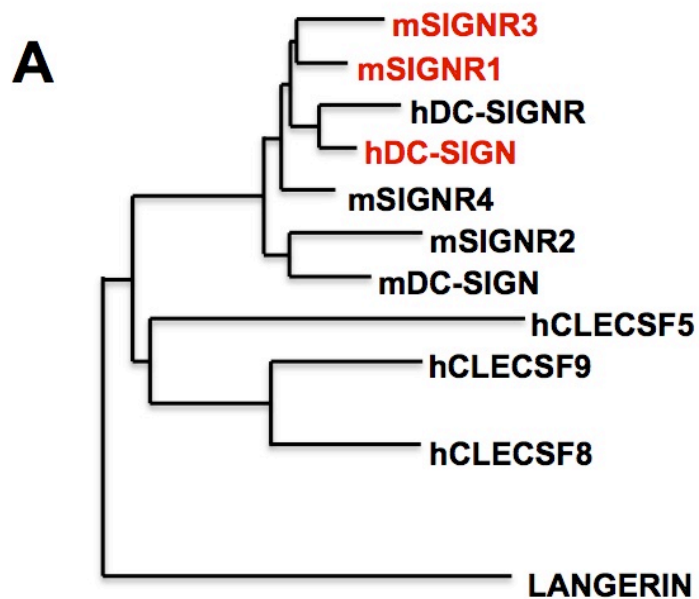
DC; Dendritic cell, Mo; Monocyte, Mφ; Macrophage, LC; Langerhans cell,

B: B cell, EC: Endothelial cell

Table 1-2. Schematic diagram of structures of the oligosaccharides in neoglycolipids used in this thesis.

Oligosaccharide-DPPE	Structure
$\alpha$ 1-2Man <sub>2</sub>	$\begin{array}{c} \text{Man} \\ \nearrow \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 2 \end{array}$
$\alpha$ 1-3Man <sub>2</sub>	$\begin{array}{c} \text{Man} \\ \nearrow \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$
$\alpha$ 1-4Man <sub>2</sub>	$\text{Man}\alpha 1 \rightarrow 4 \text{Man}$
$\alpha$ 1-6Man <sub>2</sub>	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \\ \searrow \\ \text{Man} \end{array}$
Man <sub>3</sub>	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man} \\ \nearrow \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$
Man <sub>5</sub>	$\begin{array}{c} \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man} \\ \nearrow \quad \nearrow \\ \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \quad \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$
BNCP	$\begin{array}{c} \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 6 \text{Man} \\ \nearrow \\ \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 2 \text{Man}\alpha 1 \rightarrow 3 \end{array}$
2-FL	$\text{Fuca}\alpha 1 \rightarrow 2 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}$
3-FL	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} \\ \uparrow \\ \text{Fuca}\alpha 1 \end{array}$
LNFP1 (H)	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} \\ \uparrow \\ \text{Fuca}\alpha 1 \end{array}$
LNFP2 (Le <sup>a</sup> )	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} \\ \uparrow \\ \text{Fuca}\alpha 1 \end{array}$
LNFP3 (Le <sup>x</sup> )	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} \\ \uparrow \\ \text{Fuca}\alpha 1 \end{array}$
LNDFH (Le <sup>b</sup> )	$\begin{array}{c} \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc} \\ \uparrow \quad \uparrow \\ \text{Fuca}\alpha 1 \quad \text{Fuca}\alpha 1 \end{array}$
LNT	$\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNAc}\beta 1 \rightarrow 3 \text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4 \text{Glc}$





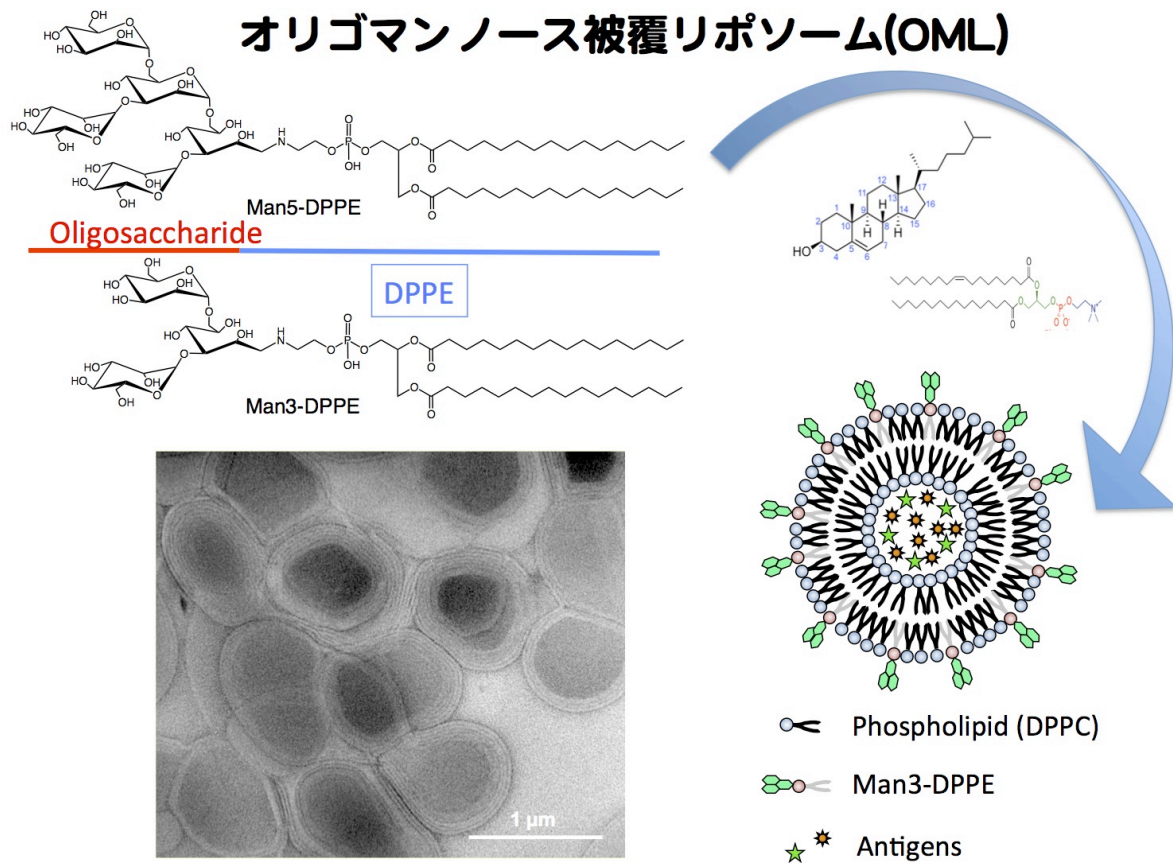
**B**

CLR	carbohydrate	pathogen	Cell
hDC-SIGN	Man,Fuc ,GlcNAc, highmannose,Lewis	HIV,M. tuberculosis, C. albicans, Zymosan	DC
SIGNR1	Man,Fuc,GlcNAc, highmannose,Lewis	HIV,M. tuberculosis, C. abicans, Zymosan	Macrophage
SIGNR3	Man,Fuc,GlcNAc, highmannose,Lewis	Zymosan	?
mDC-SIGN	ND	ND	DC

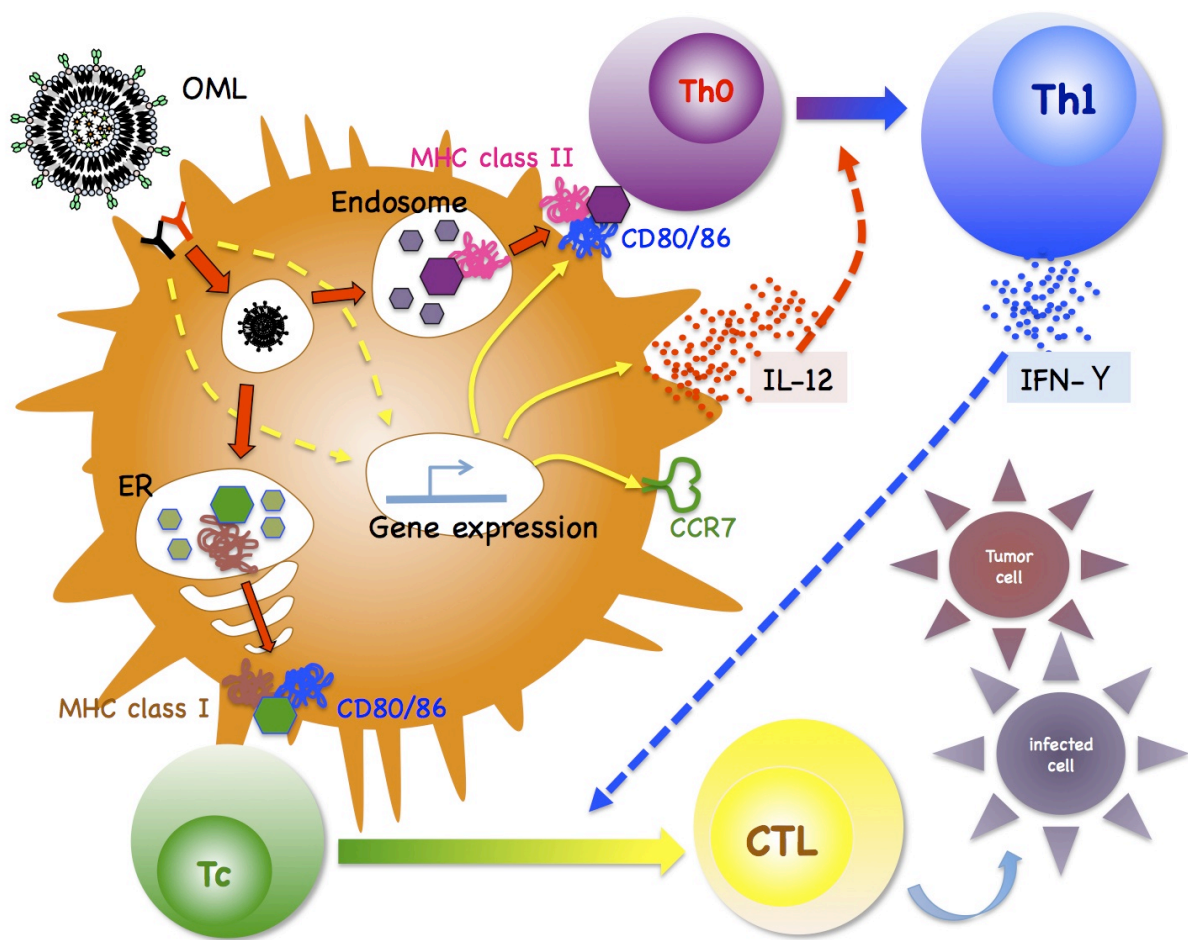
**Fig. 1-1. Relationship among hDC-SIGN, mSIGNR1 and mSIGNR3.**

(A)Phylogenetic tree of C-type lectin receptors. (B)The table is

compared among each CLR. ND: not determined, Man: mannose, Fuc: Fucose, GlcNAc: N-acetyl Glucosamine, HIV: human immunodeficiency virus, M tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*, C albicans: *Candida albicans*, DC: Dendritic Cell. Scores based on results from Ref.28.



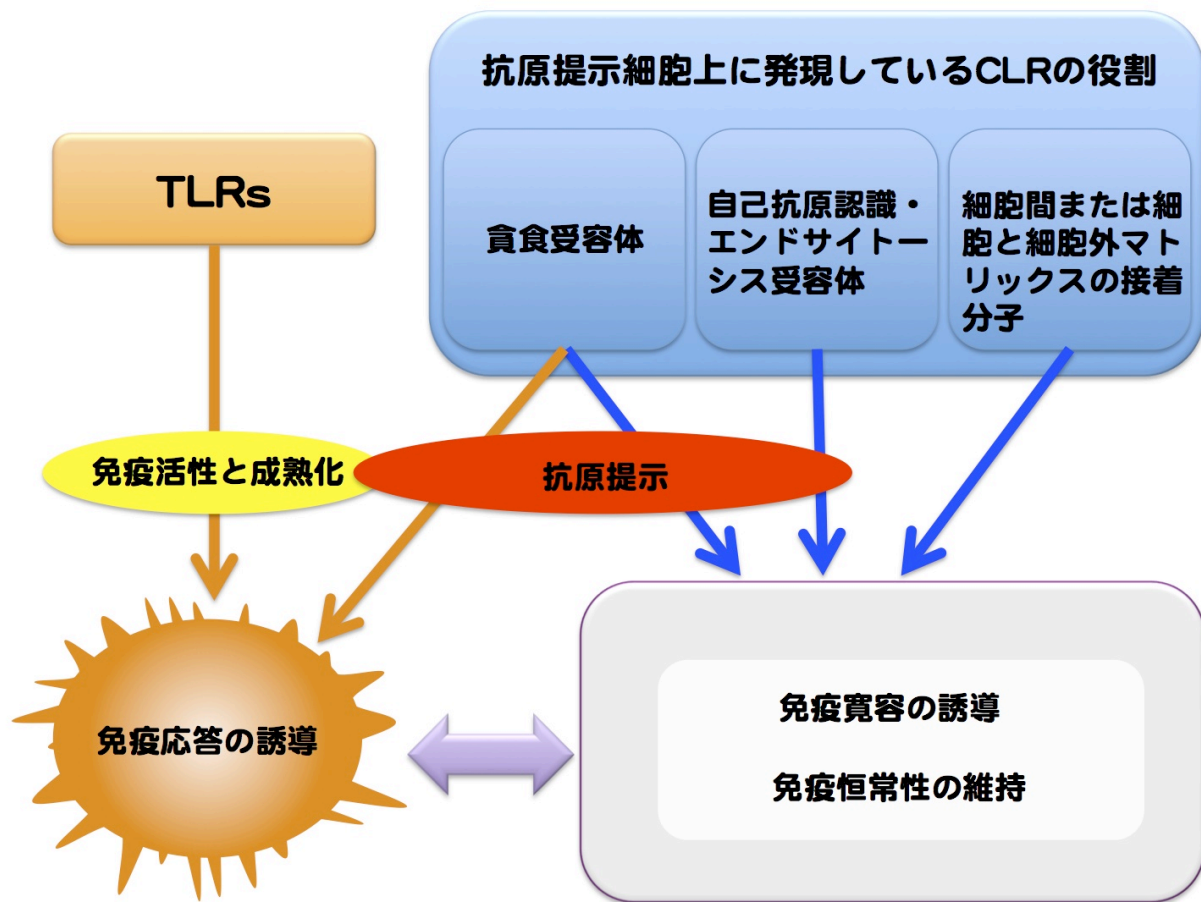
**Fig. 1-2. Representation of an oligomannose-coated liposome (OML).** Neoglycolipids containing oligomannose were prepared by reductive amination of an aldehyde group at the end of the mannotriose (Man3) or mannopentaose (Man5) with an amino group of DPPE. OMLs are prepared from DPPC, cholesterol, and Man3-DPPE at a molar ratio of 10:10:1 by intense vortex dispersion with antigen-containing PBS and extruded through a 1μm pore membrane. The electron microscopic picture of OMLs was taken by BioMed Core Inc. under the collaboration with our laboratory, and used in this thesis with the permission from BioMedCore Inc.



**Fig. 1-3. Presumed mechanism of induction of anti-tumor and anti-infectious immunity**

**by OMLs.** OMLs are ingested into APCs via CLR. The encapsulated antigens are degraded in intracellular compartments and the antigenic peptides are presented efficiently on both MHC class II and class I molecules. OML uptake also triggers activation of un-identified signaling pathway, which leads enhanced expression of co-stimulatory molecules (e.g. CD80 and CD86) and chemokine receptors such as CCR7 on APCs, and preferential production of IL-12 from the APCs. Naive CD4+ T cells (Th0) are activated by antigen-presented MHC class II on APCs that take up OMLs, and the activated Th0 cells predominantly differentiate into Th1 phenotype in the presence of IL-12 produced by OML-ingested APCs. Naive CD8+ T cells (Tc) are activated by antigen-presented MHC class

I on APCs. The Th1 cells produce IFN- $\gamma$ , which can help differentiation of naive CD8+ T cells to CTLs.



**Fig. 1-4. Multiple function of CLR on APCs.** CLR is particularly important for recognition and uptake of pathogens into intracellular compartments of DCs, leading to processing and presentation of antigens on MHC class I and II molecules, and therefore, CLR on phagocytic cells often called *phagocytic receptors*. CLR may also function as the *recognition receptors for glycosylated self-antigens* and as *the adhesion molecules*. The continuous interactions of carbohydrate on self-glycoproteins with CLR on resident APCs may be important for homeostatic control.

## 第2章 貪食受容体としての C-型レクチン受容体の糖鎖選択性の比較

### 2-1 序論

抗原提示細胞による病原体の認識と捕捉およびその後の MHC への病原体抗原の提示は、獲得免疫の誘導に必須である。DC は全身に存在し、侵入してくる病原体を捕捉し貪食し、抗原を T 細胞に提示する役割を担っている。抗原提示細胞は病原体を識別するために病原体関連分子パターン (PAMPs) を認識する一群のパターン認識分子 (PRR) を有している<sup>1)</sup>。PAMPs には核酸、脂質、タンパク質、糖鎖などの物質が含まれるが、この中で糖鎖は様々な病原体を含む全ての生きた細胞の表面に露出している物質であり、病原体の表面に露出した糖鎖はおそらく免疫担当細胞が最初に感知する病原体の分子パターンとなる。従って、糖鎖を認識して病原体を取り込むことのできる C-型レクチン受容体 (CLR) は PRR の中でも特に重要な分子である<sup>2)</sup>。第1章で述べたように、CLR は単に病原体の貪食受容体として機能するだけでなく、シグナル伝達分子として免疫応答の活性化や調節に関連する遺伝子の発現の誘導にも関与している<sup>3)</sup>。

糖鎖認識ドメインに EPN モチーフ(Glu-Pro-Asn)をもつ一群の CLR は末端マンノース、GlcNAc、フコースを有するリガンドに結合し、それらの細胞への取り込みを促進することから、病原体の取り込みに関与していると考えられている。このような活性を引き起こす受容体として、はじめにマクロファージマンノース受容体 (MMR) が特定された。しかし、DC-SIGN とその関連分子 (SIGNR) および Langerin が DC のような抗原提示細胞に局限して発現していることから、現在ではこれらの分子がマンノースを認識する受容体として興味の対象となっている<sup>4)</sup>。マウスの抗原提示細胞には構造的に良く似た2種のマンノースを認識する受容体、SIGNR1 および SIGNR3 が発現している。また、真皮や粘膜上皮に存在する抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞には Langerin がマンノース受容体として発現し

ている。これらマンノース受容体の糖鎖認識特異性は可溶性組換え CLR と糖鎖アレイを用いてスクリーニングされており、SIGNR1、 SIGNR3 および Langerin はいずれも高マンノース型糖鎖やルイス血液型糖鎖に高い親和性を持つことが示されている<sup>5)-8)</sup>。しかし、実際の病原体を用いた細胞への貪食では、SIGNR1 を発現している細胞が *Salmonella typhimurium* や *Escherichia coli* を捕捉・貪食することができるのに対して、SIGNR3 および Langerin を発現した細胞ではこれら細菌の貪食が認められていない<sup>9),10)</sup>。一方で、これら3種の CLR を発現している細胞はいずれも、酵母の細胞壁の粒子で主に  $\beta$ -glucan と mannan から構成される Zymosan を取り込むことができる。このような事実は、たとえ糖鎖認識分子としての CLR としてその糖鎖認識特性が類似していても、それぞれの CLR は微生物の取り込みに関与する時には固有の糖鎖認識パターンを持っていることを示唆している。しかしながら、微生物そのものを用いているため、これら CLR の糖鎖で覆われた粒子の取り込みに関連した糖鎖の詳細な選択性については不明であった。そこで本章において著者は、CLR による糖鎖修飾粒子の細胞への取り込みを、構造が明確な人工糖脂質で被覆したリポソームと SIGNR1、 SIGNR3 および Langerin を一過性に発現させた CHO 細胞を用いて評価した。

## 2-2 実験材料および方法

### 2-2-1 試薬および細胞

CHO-K1 細胞は、2 mM グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシンおよび 10 %ウシ胎児血清を含有した RPMI1640 培地で培養した。ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE) とジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、FITC-BSA はそれぞれ Sigma-Aldrich より購入した。。また、biotin-conjugated monoclonal

anti-FLAG 抗体と phycoerythrin (PE)-conjugated streptavidin は、Rockland (Gilbertsville, PA) と BD PahrMingen (San Diego, CA) より入手した。

### 2-2-2 人工糖脂質の合成

第1章 Table 1-2 に示した人工糖脂質のうち本研究では Man2-DPPE, Man3-DPPE, Man5-DPPE, LNFP1-DPPE, LNFP3-DPPE, BNCP-DPPE および LNT-DPPE を用いた。これらの人工糖脂質は以下の方法で合成した<sup>11)</sup>。まず、20  $\mu\text{mol}$  の構造既知のオリゴ糖と 70  $\mu\text{mol}$  の DPPE を 5 ml の chloroform/methanol/water (10:10:1, v/v/v) に反応バイアル中で超音波処理により完全に溶解させた。次いで溶液中に 1 ml のメタノールに溶かした 300  $\mu\text{mol}$  のシアノホウ素化ナトリウムを加え、反応混液を 80°C で 5 時間反応させた。反応終了後溶媒を除去し、残さを 10 ml の chloroform/methanol/water (4:50:50, v/v/v) に懸濁し、同じ溶媒で平衡化した C18 カラム (Bond Elute, MEGA BE-C18, Varian, Harbor City, CA) に供した。カラムを 50 ml の chloroform/methanol/water (4:50:50, v/v/v) で洗浄・脱塩した後、30 ml の chloroform/methanol/water (10:10:3, v/v/v) で全脂質を溶出した。ついで人工糖脂質を全脂質から silica column (Wakosil 5SIL-120, 0.75 $\times$ 30 cm, Wako Pure Chemical, Tokyo, Japan) を用いた HPLC により精製した。人工糖脂質の溶出には chloroform/methanol/water from 65:30:5 から 50:55:18 にいたる直線濃度勾配によった。人工糖脂質の構造と純度は MALDI-TOF 質量分析計とシリカゲルを用いた HPTLC によって確認した。純度は少なくとも 95% 以上であった。全ての人工糖脂質の物質量は人工糖脂質中の全リン酸量およびヘキソース量を測定することで定量した。その結果、それぞれ少なくとも 95% の純度が確認できた。

### 2-2-3 人工糖脂質被覆リポソームの作製

人工糖脂質被覆リポソームはこれまでの方法<sup>11)</sup>に従って、DPPE:コレステロール:人工糖脂質の構成モル比率が 10:10:1 で作製したものをを用いた。chloroform/ methanol (1:1, v/v) の溶媒で溶解した DPPC とコレステロールをそれぞれ 1.5  $\mu\text{mol}$ 、人工糖脂質 0.15  $\mu\text{mol}$  をフラスコ内で混合し、エバポレータを用いて脂質フィルムを作製した。乾燥した脂質フィルムに 5mg/ml の FITC-BSA の PBS 溶液 (180  $\mu\text{l}$ ) を加え、ボルテックスで分散させ多重層の小泡を調製した。その後形成した小泡を孔径 1  $\mu\text{m}$  のポリカーボネート膜 (Nucleopore, Pleasanton, CA) をセットしたエクストルーダに 10 回以上通し、直径 1  $\mu\text{m}$  に粒径を調整した。PBS を用いてリポソームを 3 回洗浄し (20,000 $\times$ g、30min、4 $^{\circ}$  C)、封入されなかった FITC-BSA を除去した。また、DPPC:コレステロール:人工糖脂質の構成モル比率が 10:7:4 で作製したリポソームは DPPE を 1.05  $\mu\text{mol}$ 、コレステロールを 1.5  $\mu\text{mol}$ 、また人工糖脂質 0.6  $\mu\text{mol}$  で脂質フィルムを作製した。リポソーム中のコレステロール と DPPC は HPLC を用いて以前報告した方法で定量し、人工糖脂質はフェノール/硫酸法によって定量した。また、リポソームに封入された FITC-BSA のタンパク質量と蛍光強度は FITC-BSA を標準物質として用いて 0.3% SDS 存在下で蛍光スペクトロメーター (RF-5300PC, Shimadzu, Kyoto, Japan) により定量した。得られたリポソームの粒子径は動的光散乱式粒径分布測定装置 (LB-550, Horiba, Kyoto, Japan) により測定した。

### 2-2-4 リポソームの取り込み評価

CHO-K1 細胞( $1 \times 10^6$ )に 1.0  $\mu\text{g}$  の C-末端に FLAG タグを有する SIGNR1, SIGNR3, Langerin, または dectin-1 の全長がコードされた cDNA を含む pCMV expression vector を Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクトした。24 時間後、FITC-BSA を封入した人



工糖脂質被覆リポソーム（コレステロール量で  $10\ \mu\text{g}$ ）を添加し、 $37^\circ\text{C}$ で 16 時間穏やかに攪拌しながら培養した。ポジティブコントロールとして、FITC-標識した Zymosan を用いた。細胞表面に結合したリポソームを取り除く為に  $1\text{mM}$  EDTA を含む PBS で細胞を 2 回洗浄した後、細胞表面に発現した CLR 分子の検出をする為に、biotin- conjugated anti-FLAG 抗体と PE-conjugated streptavidin で染色を行った。洗浄後 2%パラホルムアルデヒドで固定化し、FLAG タグが陽性となる CHO 細胞（CLR が発現している CHO 細胞）中のリポソーム中に封入された FITC-BSA に由来する蛍光強度をフローサイトメトリーで解析した。

## 2-3 結果

### 2-3-1 CLR 発現細胞による Man3-DPPE 被覆リポソームの取り込み

はじめに、人工糖脂質被覆リポソームの取り込みに関与しているかどうか定性的に検討した。C 末端に FLAG エピトープタグを持つ SIGNR1、SIGNR3、Langerin を CHO 細胞に一過性に発現させて、FITC-labeled Zymosan 粒子 あるいは FITC-BSA を封入した Man3-DPPE 被覆リポソームを加え 16 時間培養後、細胞内に取り込まれた蛍光シグナルを蛍光顕微鏡で観察した。SIGNR1、SIGNR3、Langerin を遺伝子導入した細胞いずれにおいても Zymosan 粒子の取込みが観察できたことから、それぞれ CLR が機能をもつ形で細胞表面に存在している事が確認できた (Fig. 2-1A, upper panel)。そこで次に、FITC-BSA を封入した Man3-DPPE 被覆リポソームで調べたところ、FITC 由来の蛍光シグナルは SIGNR1 を遺伝子導入した CHO 細胞にだけ認められ、SIGNR3 や Langerin を遺伝子導入した細胞では認められなかった (Fig. 2-1A, lower panel)。FLAG エピトープは細胞表面にて観察でき、FITC に由来する蛍光シグナルは細胞質側に認められることから、リポソームは細胞内に取り込まれていると判断した (Fig. 2-1B)。

次に CLR を発現している CHO 細胞へのリポソームの取り込みをフローサイトメトリーで定量的に評価した。3 種の異なる CLR を介したリポソームの細胞への取り込みを定量的に比較評価するためには、まず CLR の発現レベルが同程度でなければならない。そこで、FLAG タグを C-末端に持つ SIGNR1, SIGNR3 あるいは Langerin を CHO 細胞に一過性に発現させて、細胞表面に発現した FLAG エピトープを特異抗体で検出した。いずれの CLR を導入した場合でも 15-20% の CHO 細胞 FLAG エピトープ陽性となって (R1 in Fig. 2-2)、トランスフェクション効率には CLR 間で差がないことが確認できた。また、その平均蛍光強度も CLR 間で差がなかった (Fig. 2-2 upper panel)。また、SIGNR1, SIGNR3 あるいは Langerin を一過性に発現している CHO 細胞への zymosan 粒子の取り込みはそれぞれ  $89.1 \pm 10.1$ ,  $85.7 \pm 7.3$ , および  $87.5 \pm 8.9\%$ であった。以上の結果から、CLR を発現している CHO 細胞上には機能のある CLR がほぼ同じレベルで発現していると結論した。

そこでこの条件を用いて Man3-DPPE 被覆リポソームの CLR 発現細胞への取り込みを検証した。80%以上の SIGNR1 を発現した細胞 (R1 in Fig. 2-2A upper panel) は Man3-DPPE 被覆リポソームに封入されている FITC の蛍光シグナルを持っていた (Fig. 2-2A, lower panel)。それに対し人工糖脂質を被覆していないリポソームを取り込ませた細胞や CLR を導入していない CHO 細胞ではいずれのリポソーム由来の蛍光シグナルを認めなかった。従って、Man3-DPPE 被覆リポソームは細胞に発現した SIGNR1 を介して取り込まれたと結論できる。また、約 30%の SIGNR3 発現細胞および 15%の Langerin 発現細胞に Man3-DPPE 被覆リポソームが取り込まれることが確かめられた。そこで、以降の実験においては、CLR 陽性細胞中の FITC 陽性細胞の割合を求めて、CLR を介した人工糖脂質被覆リポソームの貪食特異性を定量的に評価することとした。

### 2-3-2 SIGNR1 発現細胞によるマンノース含有人工糖脂質被覆リポソームの取り込み

次に、様々な人工糖脂質被覆リポソームを作製し (DPPC:cholesterol:Man3-DPPE, 10:10:1)、SIGNR1 を一過性発現させた CHO 細胞による各リポソームの取り込み特異性を比較検討した。リポソームに被覆する人工糖脂質はそれぞれ、 $\alpha$ 1-6Man2-DPPE-, Man3-DPPE-, Man5-DPPE-, LNFP-I-DPPE-, LNFP-III-DPPE-, BNCP-DPPE-, そして LNT-DPPE を選択した。細胞内の蛍光強度を基に評価するため、使用する人工糖脂質被覆リポソーム内に封入された FITC-BSA の量および人工糖脂質の物質量が同程度でなければならない。そのため、各種リポソーム内に封入された FITC-BSA 量を測定した。その結果、コレステロール量 1 mg あたりの FITC-BSA 量はそれぞれ 209  $\mu$ g/mg、210  $\mu$ g/mg、225  $\mu$ g/mg、189  $\mu$ g/mg、197  $\mu$ g/mg、201  $\mu$ g/mg、207  $\mu$ g/mg、254  $\mu$ g/mg であった。またこれらリポソーム組成はモル比で DPPC:cholesterol:人工糖脂質で 1.00:1.09  $\pm$  0.21:0.11  $\pm$  0.03 であり、リポソーム間で人工糖脂質の物質量に大きな違いはなかった。さらにそれぞれのリポソームの平均粒子径は 1065 から 1442 nm の間にあり、大きな違いはなかった。これらのリポソームの分析結果は、実験で使用する数種の人工糖脂質被覆リポソームが、リポソーム間で定量的に比較できる程度に同じ量の FITC-BSA をもち (すなわち同定度の蛍光強度を有し)、同じ量のオリゴ糖を提示し、ほぼ同じ粒子径を持っていることを示している。

これら比較可能な人工糖脂質を用いて、マンノースを持つ人工糖脂質で被覆したリポソームの取り込みの選択性について SIGNR1 発現 CHO 細胞で検討した。SIGNR1 発現 CHO 細胞は Man2-, Man3- および Man5-DPPE をいずれも取り込んだが、これらのうち Man3-DPPE 被覆リポソームを最も効率的に取り込んだ (Fig. 2-3A)。

### 2-3-3 SIGNR1 発現細胞による LNFP-III-DPPE と BNCP-DPPE 被覆リポソームの取り込み

SIGNR1 を発現している CHO 細胞はそれぞれ末端フコースまたは GlcNAc をもつ LNFPIII-DPPE あるいは BNCP-DPPE を被覆したりポソームを取り込んだ (Fig. 2-3A)。しかし、その効率性は Man3-DPPE を被覆したそれよりは明らかに低く、Man5-DPPE を被覆したりポソームとほぼ同程度であった。また末端ガラクトースをもつ LNT-DPPE を被覆したりポソームの SIGNR1 発現細胞への取り込みは観察されなかった。さらに、末端フコースをもつ LNFPI(blood group H type pentasaccharide)-DPPE を被覆したりポソームは SIGNR1 発現 CHO 細胞にほとんど取り込まれなかった。

#### 2-3-4 SIGNR3 および Langerin の糖鎖選択性の解析

SIGNR3 を発現している CHO 細胞は、Man2-, Man3- および Man5-DPPE をいずれも取り込んだが、その効率性は SIGNR1 発現細胞と比較すると、全体的に著しく低いものであった (Fig. 2-3B)。また、SIGNR3 発現細胞の取り込みにおいて、人工糖脂質のマンノース残基の数は関連していた。すなわち、Man5-DPPE で被覆したりポソームがこの中で最も効率的にとりこまれた。SIGNR1 発現細胞とは対照的に、SIGNR3 発現細胞への LNFP-III-DPPE および BNCP-DPPE で被覆したりポソームの明瞭な取り込みは観察されなかった。可溶性 SIGNR3 を用いた糖鎖結合特異性の解析から、SIGNR1 も SIGNR3 もほぼ同じ糖鎖に対して同程度の結合特性を示すことが知られているが<sup>10,11)</sup>、この結果からは食食受容体としての SIGNR3 の糖鎖選択性は SIGNR1 のそれとは取り込み効率も含め異なっていると考えられた。また、Dectin-1 は  $\beta$ -グルカンを認識する CLR であり、マンノースやフコースをもつ糖鎖との親和性はないとされている<sup>25)</sup>。そのため、本研究では Dectin-1 を発現させた CHO 細胞をネガティブコントロールとしていた。この Dectin-1 発現細胞への 7 種の人工糖脂質被覆りポソームの取り込みと比較して、Langerin を発現している細胞はこれら 7 種の人工糖脂質を取

り込んでいないと判断した (Fig. 2-3C, D)。

### 2-3-5 人工糖脂質被覆リポソームの取り込みにおける糖鎖密度要求性

一般的に、レクチンの糖鎖認識において、糖鎖の多価性が重要となる事が知られている<sup>26)</sup>。そのため、SIGNR3 および Langerin 発現細胞が SIGNR1 に比べて、人工糖脂質、コレステロール、および DPPC を 1:10:10 で含むリポソームを低い効率でしか取り込まない一つの理由として、リポソーム表面の糖鎖密度が低いためであると考えられた。そこで DPPC、コレステロール、および Man3-DPPE を 5:10:6 で含む糖鎖密度の高い Man3-DPPE 被覆リポソームを調製し、その取り込みを検討した (Fig. 2-4A)。その結果、SIGNR3 発現細胞においても Man3-DPPE の表面密度が高いリポソームの取り込みが観察された (Fig. 2-4B)。これらの結果より、SIGNR3 は貪食受容体として機能する際に、SIGNR1 よりも高い糖鎖密度を必要とする事が示唆された。

### 2-3-6 CLR 発現細胞による高密度人工糖脂質被覆リポソームの取り込み

そこで cholesterol, DPPC と人工糖脂質がモル比 10:7:4 で構成されている糖鎖密度の高いリポソームを用い、その取り込みを検討した。これらリポソームの平均組成は DPPC, cholesterol, と人工糖脂質がモル比で  $1.00: 0.66 \pm 0.12: 0.31 \pm 0.06$  となり、リポソーム間で人工糖脂質の物質に大きな違いはなかった。SIGNR1 発現細胞においてはリポソーム上の糖鎖密度を上昇させることで、Man2-, Man3-, Man5-, LNFPIII-, BNCP-DPPE 被覆リポソームともほぼ同程度に取り込まれるようになった (Fig. 2-5A)。一方、LNFPI-DPPE 被覆リポソームは糖鎖密度が上昇しても全く取り込まれなかった。SIGNR1 発現細胞による取り込みにおいて、リポソーム上の糖鎖密度を上昇させると糖鎖選択の特異性に差がみられなくな

ってしまったが、その中でも Man3-DPPE を被覆したリポソームが最も効率よく取り込まれた。

SIGNR3 および Langerin 発現細胞においても、糖鎖密度をが低いリポソームの取込み (Fig. 2-3) と比較すると、糖鎖密度の上昇にともない、取込みの選択性がみられるようになった (Fig. 2-5B, C)。なかでも、Man2-、Man3-、 および Man5-DPPE 被覆リポソームを明瞭に取り込みが確認できたが、その取り込み効率は SIGNR1 とは異なり Man5-DPPE > Man3-DPPE > Man2-DPPE の順であった。また両 CLR 発現細胞とも、糖鎖密度が上昇することで BNCP-DPPE 被覆リポソームを取り込んだが、SIGNR1 発現細胞で明瞭な取り込みがみられた LNFPIII-DPPE 被覆リポソームの取込みはほとんど観察されなかった。一方で SIGNR1 発現細胞では全くその取り込みが観察されない LNFPI-DPPE 被覆リポソームは弱いながらも SIGNR3 および Langerin 発現細胞において観察された。

### 2-3-7 SIGNR1 および SIGNR3 のネック領域の糖鎖選択性および糖鎖密度要求性の違いに及ぼす影響

上記のように、人工糖脂質を被覆したリポソームの CLR 発現細胞への取り込みにおいて、SIGNR3 および Langerin は SIGNR1 に比べて糖鎖の高い表面密度を要求した。SIGNR1 はヒト DC-SIGN と同様、CRD に続く比較的長いネックドメインをもっており、このドメインを介して細胞表面でオリゴマーを形成していると考えられている<sup>12),13)</sup>。これに対して SIGNR3 および Langerin は短いネックドメインをもっており、オリゴマー構造をとれないため単量体で存在していると考えられている。このような細胞表面での CLR のオリゴマー形成が糖鎖密度要求性に影響をあたえていることが予想された。このことを検証するため、SIGNR1 と SIGNR3 の糖鎖認識ドメインを組み換えたキメラ体を構築し、これまで同様細胞

に発現させて、これらリポソームの取り込みを検討した。SIGNR3 の CRD を有する SIGNR1/R3CRD キメラはコレステロール、DPPC、および人工糖脂質を 10:10:1 で含むリポソームを取り込むようになった (Fig. 2-6)。一方で、SIGNR1 の CRD を有する SIGNR3/R1CRD キメラを発現させた細胞へのリポソームの取り込みはほとんどみられなくなった (Fig.2-6)。興味深いことに、SIGNR3 の CRD をもつ SIGNR1/R3CRD キメラを発現している細胞の取り込み効率がマンノースの数に比例しており、Man5-DPPE > Man3-DPPE > Man2-DPPE の順であり、SIGNR3 を発現している細胞と同じであった。

## 2-4 考察

CLR の糖鎖結合特異性の結果は、可溶性 CLR を用いて検討されてきているが、CLR は膜タンパク質であり、細胞膜脂質 2 重層に埋まった状態 (すなわちある程度自由度を制限された状態) で機能していることから、このような状態の CLR の糖鎖結合特異性や選択性が非生理的な状態で自由度の高い可溶性 CLR と同じであるかどうかについての知見は少なかった。そこで、著者は本研究において細胞表面に発現している 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、ともに EPN モチーフを持ちマンノース結合レクチン受容体である 3 つの CLR の間で貪食受容体としての糖鎖選択性や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。特に細胞表面に発現している CLR (Membrane-associated form) の糖鎖の選択性に関しては、詳細な部分でこれまで報告されている可溶性組換え CLR (Soluble form) の糖鎖結合特異性とは異なっていた。その違いを Table 2-1 に表示した。

可溶性組換え CLR の固相化した糖鎖プローブへの結合を指標として評価する方法で検証

された **SIGNR1** の糖鎖結合特異性によると、**SIGNR1** はマンノースを含むオリゴ糖に結合するが、その結合の特異性はオリゴ糖中のマンノースの残基数と比例するという報告がなされている。また **Le<sup>a</sup>** や **Le<sup>x</sup>** 構造のようなフコース含有オリゴ糖により強く結合することも示されている<sup>7)</sup>。しかし一方では、**SIGNR1** のフコース含有オリゴ糖への結合はほとんど観察されないという報告もある<sup>14)</sup>。これに対して貪食機能を指標とした本研究の評価法では、**SIGNR1** はマンノース、フコース、および **GlcNAc** を末端にもつオリゴ糖を認識しそれらに被覆されたリポソームを取り込むことができたが、その中でも **Man3-DPPE** で被覆されたリポソームを最も効率良く取り込んだ。特にオリゴマンノースを被覆したリポソームの **SIGNR1** 発現細胞への取り込みは、**Man3-DPPE** > **Man2-DPPE** > **Man5-DPPE** の順であり、必ずしもマンノースの残基数とは比例しなかった。また、可溶型 **SIGNR1** は **Le<sup>x</sup>** 構造を持つ糖鎖に対して最も高い親和性を示すが、**LNFP<sup>III</sup>(Le<sup>x</sup>)-DPPE** で被覆したリポソームの取り込み効率は **Man3-DPPE** よりも低かった。**GlcNAc** に $\alpha$ 1-3 結合したフコースをもつ **LNFP<sup>III</sup>(Le<sup>x</sup>)-DPPE** で被覆されたリポソームは **SIGNR1** によってよく取り込まれたが、ガラクトースに $\alpha$ 1-2 結合したフコースをもつ **LNFP<sup>I</sup>-DPPE** で被覆されたものは全く取り込まれなかった。従って、**SIGNR1** が貪食受容体として機能する時にはマンノースの数やフコースの結合様式を認識し区別しているように思われた。またその選択性はこれまで報告のある可溶型 **CLR** とは異なっていた。このような可溶型 **CLR** で示された糖鎖認識特異性と貪食受容体としての **CLR** の糖鎖選択性のわずかな違いは **SIGNR3** および **Langerin** でも観察されている。

本章における検討で特に興味深い点は、貪食受容体としての **CLR** によって、要求する粒子上の糖鎖密度が異なるということである。特に **SIGNR3** と **SIGNR1** はほとんど同じ糖鎖に対して特異性を示すことが知られているが、コレステロール、**DPPC** と人工糖脂質がモル比 10:10:1 で構成された **Man3-DPPE** 被覆リポソームは **SIGNR1** を発現している **CHO** 細胞に



は効率よく取り込まれるのに対して、SIGNR3 を発現している CHO 細胞にはほとんど取り込まれない。しかしリポソームを構成している人工糖脂質の比率を増加させると、SIGNR3 発現細胞でも SIGNR1 発現細胞と遜色なく取り込むようになる。このように、貪食受容体としての CLR には貪食する粒子上にある一定以上の糖鎖密度を要求しており、その密度はおそらく CLR によってそれぞれ異なっているのであろう。SIGNR1 を発現している細胞のみが *Salmonella typhimurium* や *Escherichia coli* を捕捉・貪食することができ、SIGNR3 および Langerin を発現した細胞ではこれら細菌の貪食が認められていないという報告があるが<sup>9), 10)</sup>、これはそれぞれの細菌の表層に提示されている糖鎖の密度あるいは量が少ないためにみられたのかもしれない。このような糖鎖の密度要求性が異なる理由として、CLR の細胞膜上での存在様式の違いが影響していることも本研究では明らかにした。SIGNR1 はヒト DC-SIGN と同様に CRD に続く比較的長いネックドメインをもっており、このドメインを介して細胞表面でオリゴマーを形成していると考えられている<sup>12), 13)</sup>。これに対して SIGNR3 および Langerin は短いネックドメインをもっており、そのためオリゴマー構造をとれないため単量体で存在していると考えられている。実際にキメラ分子を構築してリポソームの貪食を比較すると、SIGNR3 の CRD を有する SIGNR1/R3CRD キメラを発現している細胞は低い糖鎖密度を有する人工糖脂質被覆リポソームを取り込むようになり、また SIGNR1 の CRD と SIGNR3 のネック部分を有する SIGNR3/R1CRD キメラを発現している細胞は低い糖鎖密度を有する人工糖脂質被覆リポソームを取り込めなくなった。この結果は、オリゴマー構造をとっている CLR のほうが単量体の CLR より低密度の糖鎖を効率よく認識できることを示している。

以上本章での結果を総括すると、それぞれの CLR において貪食受容体としての糖鎖選択性と糖鎖認識分子としての糖鎖結合特異性の間には違いがあることを著者は明らかにした。

このような違いは、Soluble form の CLR と Membrane-associated form の CLR の間で機能的に違いよると考えられる。実際にデキストランなどは細胞表面に発現している CLR を介して細胞内に取り込まれるが、可溶性の組み替え CLR を用いてもデキストランへの結合はほとんど観察されない。しかし、このような違いはそれぞれの CRD が本質的に持っているものかもしれない。なぜなら、SIGNR3 発現細胞はオリゴマンノース被覆リポソームを Man5-DPPE > Man3-DPPE > Man2-DPPE の順に取り込むが、SIGNR3 の CRD を有する SIGNR1/R3CRD キメラ分子を発現している細胞も、おそらく細胞膜上で SIGNR1 と同様にオリゴマー形成しているにも関わらず、オリゴマンノース被覆リポソームの取り込み効率は Man5-DPPE > Man3-DPPE > Man2-DPPE の順であった。すなわち、このオリゴマンノースに対する糖鎖選択性は貪食受容体として機能する場合の SIGNR3 の CRD が持っている本質的な機能であると考えられる。本研究においては一過性の発現系を用いているため、細胞接着を指標として膜結合型 CLR の糖鎖結合性を評価できていない。従って、本研究で示された貪食受容体としての糖鎖選択性が細胞膜上の糖鎖認識分子としての糖鎖認識特異性と異なっているかについては結論が出た訳ではない。これを解決するためには、定常的にこれらの CLR を発現させた細胞を用いて固定化糖鎖への細胞結合とリポソームの貪食能を系統的に比較検討することが必要であろう。筆者は次章において、この問題を解決するための研究を展開している。

また本章では、貪食受容体としての CLR がそれぞれ固有の糖鎖密度要求性を示すことを明らかにした。このような貪食受容体としての CLR の糖鎖の選択性および糖鎖密度の要求性の違いを利用すれば、たとえ SIGNR1、SIGNR3 および Langerin のように CLR の糖鎖認識特異性が重複していても、リポソームなどの粒子の上に提示させる糖鎖の種類や糖鎖密度を適切に選択することで、特定の CLR に適したリポソーム粒子をデザインできる可能性がある。

人工糖脂質被覆リポソームはその上に提示させる糖鎖の種類や密度を比較的厳密にコントロールできることからこの目的に適しているといえる。

## 2-5 参考文献

1. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54, 1–13, 1989
2. Cambi A, Figdor, GC. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 539-546, 2003
3. Robison, MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Sausa CR, Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*, 12, 1258-1265, 2006
4. Turne MW. Mannose binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*, 17, 532-540, 1996
5. Stamach NS, Taylor ME. Characterization of carbohydrate recognition by langerin, a C-type lectin of Langerhans cells. *Glycobiology*, 13, 401–410, 2003
6. Tateno H, Ohnishi K, Yabe R, Hayatsu N. Sato T, Takeya M, et al. Dual specificity of langerin to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem*, 285, 6390-6400, 2010
7. Galustian C, Park CG, Chai W, Kiso M, Brueninf SA, Kang YS et al. High and low affinity carbohydrate ligands revealed for murine SIGN-R1 by carbohydrate array and cell binding approaches, and differing specificities for SIGN-R3 and langerin. *Int Immunol*, 16, 853-866, 2004
8. Powlesland AS, Ward EM, Sadhu SK., Guo, Y., Taylor ME, Drickamer K. Widel.

- divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins. *J Biol Chem*, 281, 20440-20449, 2006
9. Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, Yoshida H, Kimura Y, Kang YS et al. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int. Immunol*, 16, 819-829, 2004
  10. Taylor PR, Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Gordon S. The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol*, 172, 1157-1162, 2004
  11. Kojima N, Biao L, Nakayama T, Ishii M, Ikehara Y, Tsujimura K. Oligomannose-coated liposomes as a therapeutic antigen-delivery and an adjuvant vehicle for induction of in vivo tumor immunity. *J Control Release*, 129, 26-32, 2008
  12. Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *J Biol Chem*, 276, 28939–28945, 2001
  13. Feinberg H, Guo Y, Mitchell DA, Drickamer K, Weis W. Extended neck regions stabilize tetramers of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Biol Chem*, 280, 1327-1335, 2005
  14. Takahara K, Arita T, Tokieda S, Shibata N, Okawa Y, Tateno H et al. Difference in fine specificity to polysaccharides of *Candida albicans* mannoprotein between mouse SIGNR1 and human DC-SIGN. *Infect Immun*, 80, 1699-1706, 2012

**Table 2-1. Evaluation of carbohydrate specificities of membrane-associated and soluble CLRs**

Carbohydrates	Membrane-associated form <sup>1)</sup>			Soluble form <sup>2)</sup>		
	SIGNR1	SIGNR3	Langerin	SIGNR1	SIGNR3	Langerin
Man2	++++	+++	+++	ND <sup>4)</sup>	ND	ND
Man3	+++++	++++	+++	+	-	-
Man5	+++	+++++	++++	++	+	-
Lex (LNFP-III)	+++	+/-	+/-	++	+	+/-
H (LNFP-I)	+/-	+	+	-	-	+/-
Terminal GlcNAc <sup>3)</sup>	+++	++++	++++	+	-	+/-
LNT	-	-	-	-	-	-

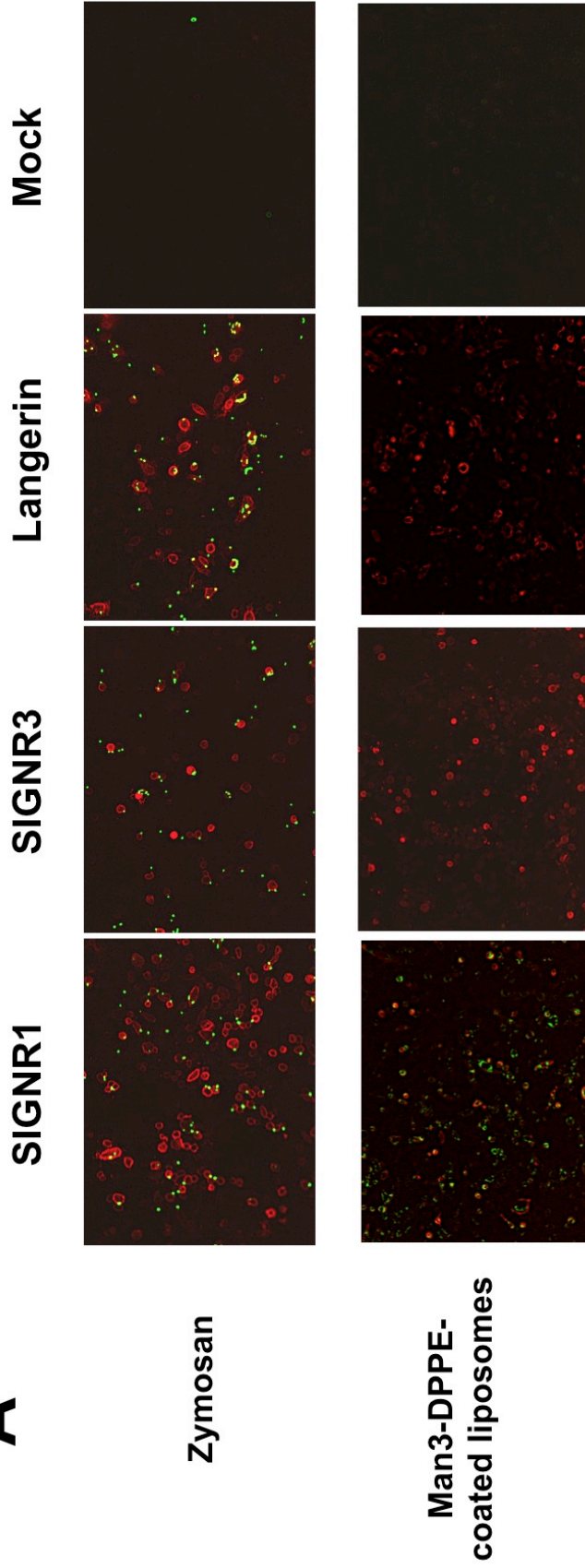
<sup>1)</sup> Scores based on results shown in Fig. 2-3.

<sup>2)</sup> Scores based on results from Ref. 7.

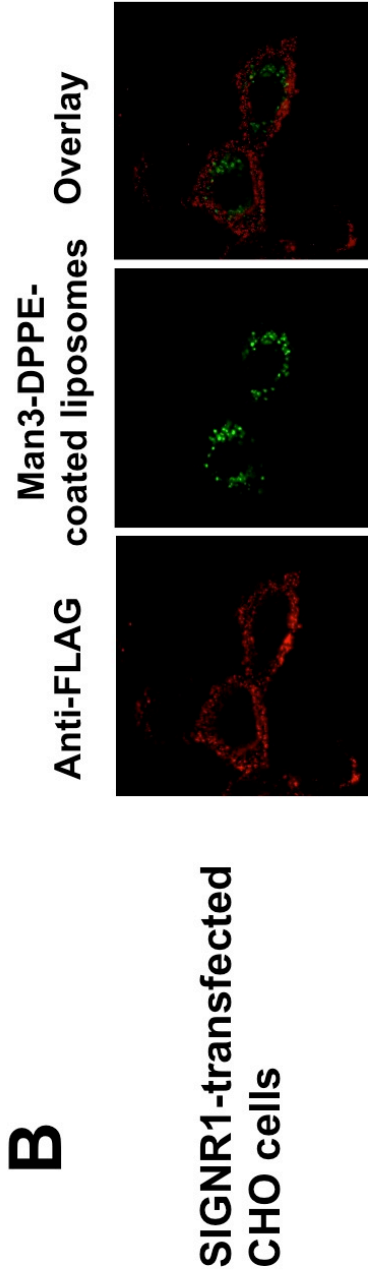
<sup>3)</sup> BNCP and chitotriose were used as oligosaccharides with a terminal GlcNAc as membrane-associated and soluble CLRs, respectively.

<sup>4)</sup> ND indicates not determined.

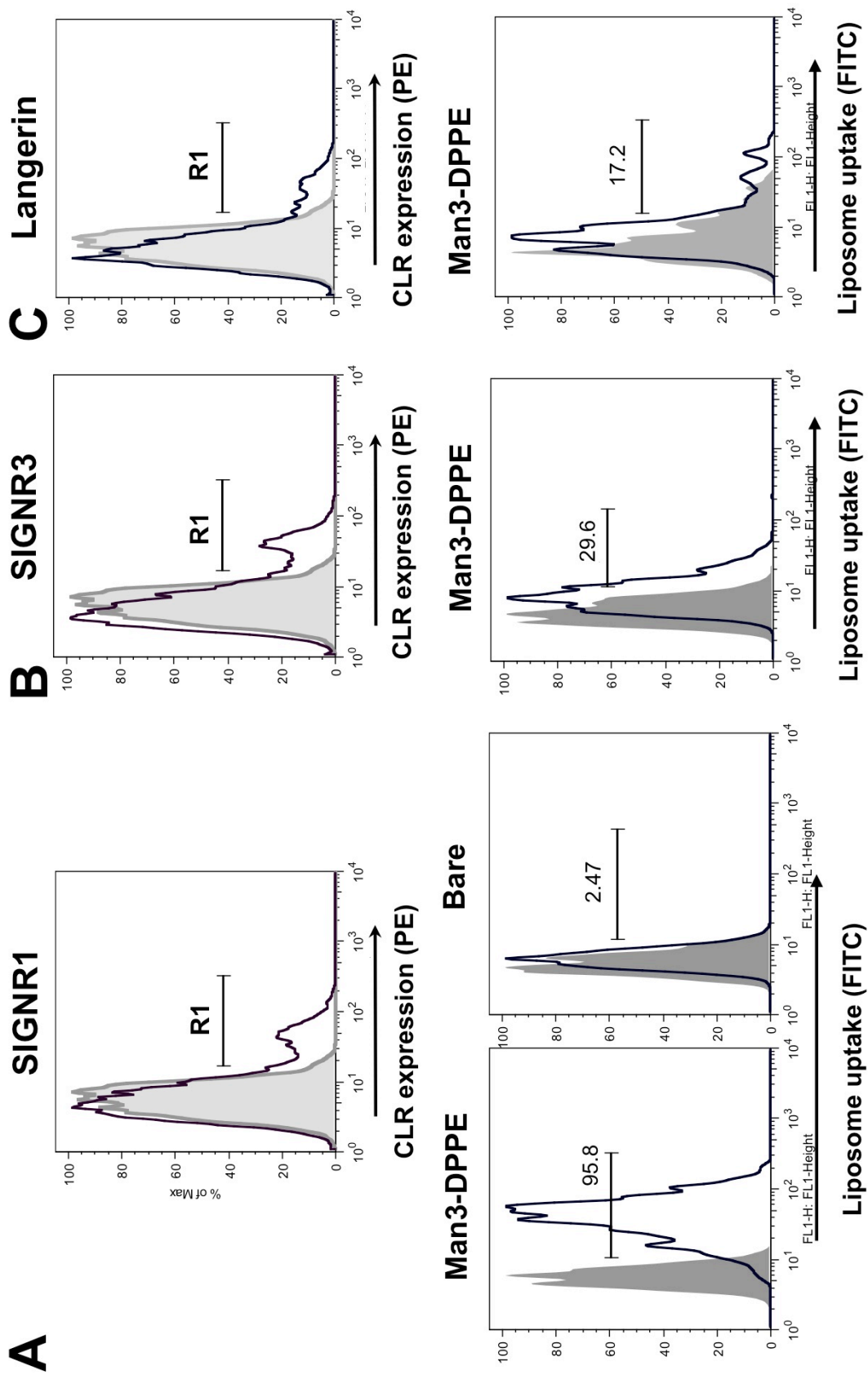
**A**



**B**

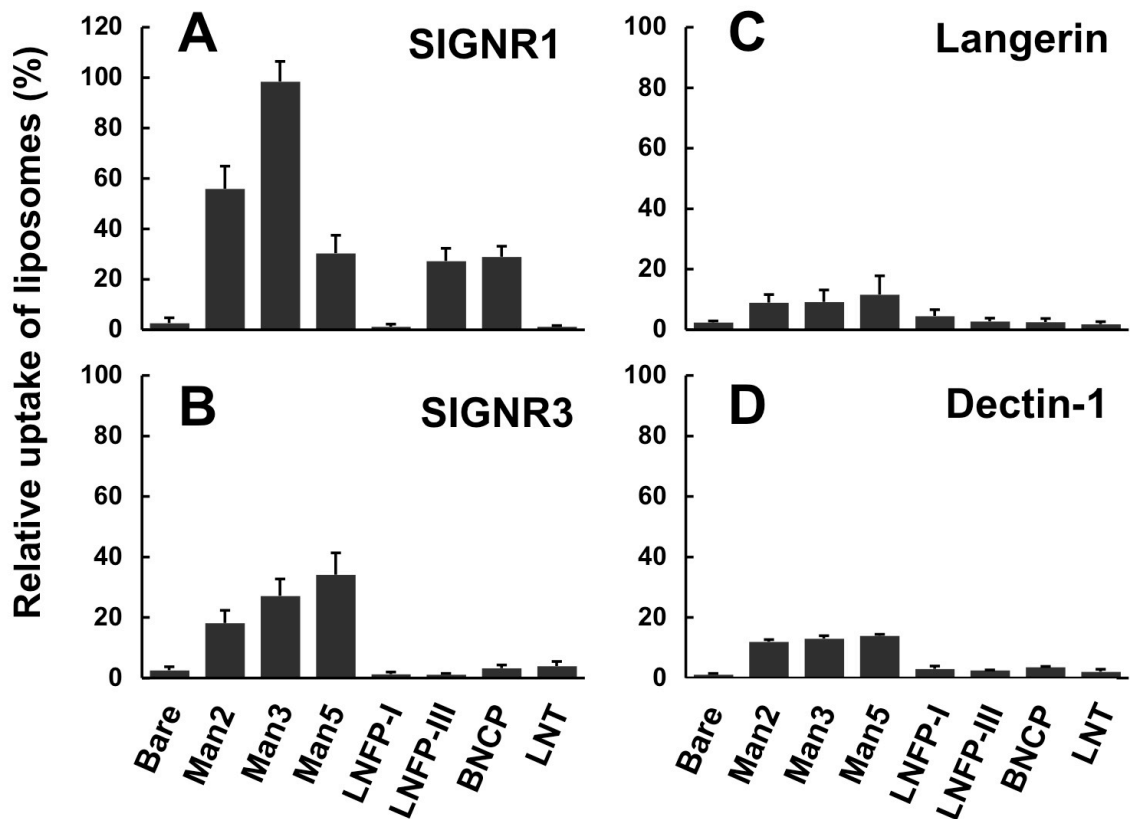


**Fig. 2-1. Uptake of Man3-DPPE-coated liposomes into CLR-transfected CHO cells.** A. CHO cells were transfected with cDNAs encoding SIGNR1, SIGNR3, or Langerin tagged with C-terminal FLAG. FITC-labeled zymosan particles (upper panel) or Man3-DPPE-coated liposomes with encased FITC-BSA (lower panel) were added to cell cultures at 24 h after transfection. CLR expression determined by an anti-FLAG antibody (red) and particle uptake (green) were detected by fluorescent microscopy. B. Distribution of Man3-DPPE-coated liposomes at the cells. Note that FITC signals were found in the cells, indicating that Man3-DPPE-coated liposomes were ingested in the cells.





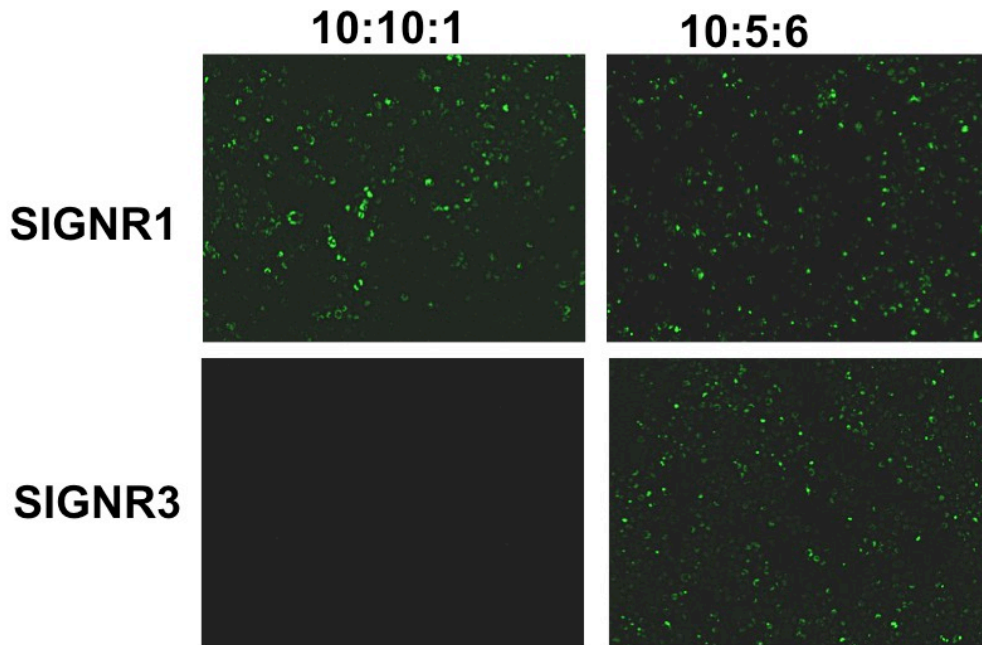
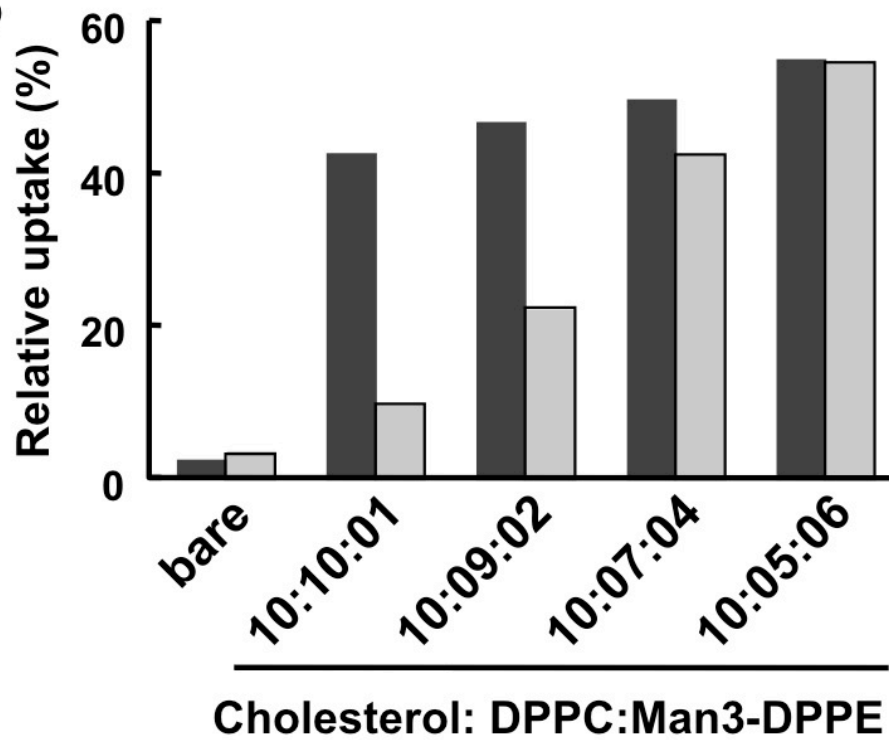
**Fig. 2-2. Uptake of Man3-DPPE-coated liposomes by CHO cells expressing SIGNR1, SIGNR3 or Langerin.** CHO cells were transfected with FLAG-tagged SIGNR1 (A), SIGNR3 (B) or Langerin (C) and incubated with FITC-labeled liposomes coated with Man3-DPPE (Man3-DPPE) or uncoated liposomes (Bare) for 18 h. The cells were then stained with a biotin-conjugated anti-FLAG antibody followed by PE-conjugated streptavidin, and expression levels of CLRs were evaluated by FACS (upper panels). White and gray peaks indicate SIGNR1-transfected and mock-transfected CHO cells, respectively. Each R1 region of the CLR-transfected cells was gated and the fluorescent signals from FITC-BSA encased in the liposomes in the gated cells were analyzed (lower panels). The mean fluorescent intensity (MFI) of cells in each R1 region is indicated in each upper panel. White and gray peaks indicate cells incubated with and without liposomes, respectively. The percentage of FITC-positive cells is shown in each panel.



**Fig. 2-3. Efficiency of uptake of liposomes by CLR-expressing CHO cells.** FLAG-tagged SIGNR1 (A), SIGNR3 (B), Langerin (C), or dectin-1(D) transfected cells were incubated with FITC-BSA-containing liposomes consisting of DPPC, cholesterol, and various neoglycolipids (indicated on abscissa) at a molar ratio of 10:10:1 for 24 h. The cells were then stained with a biotin-conjugated anti-FLAG antibody followed by PE (Phycoerythrin)-conjugated streptavidin, and analyzed by FACS. The percentage of FITC-positive cells in PE-positive CLR-expressing cells is shown on the vertical axis. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 5 independent experiments.

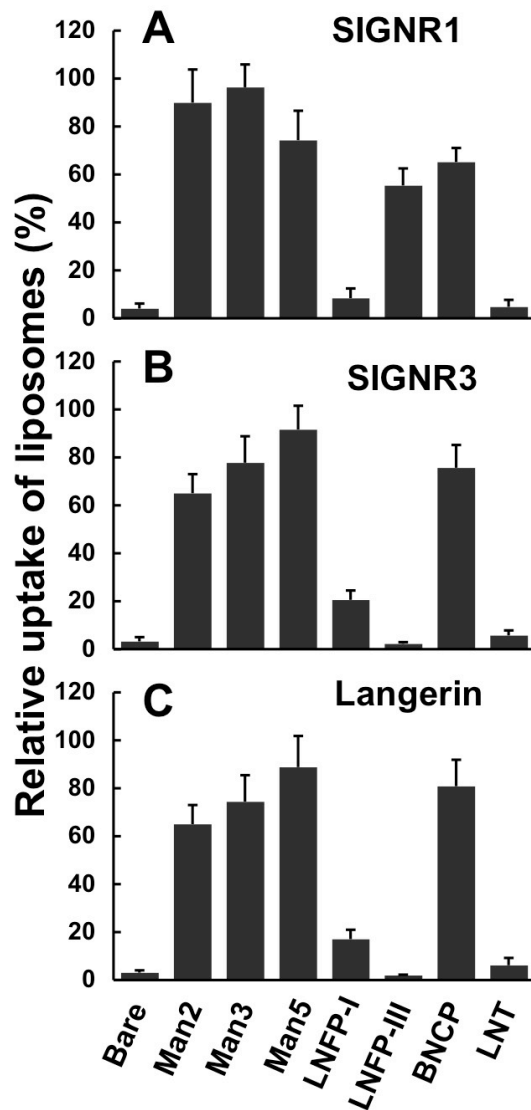
**A**

Cholesterol: DPPC:Man3-DPPE

**B**

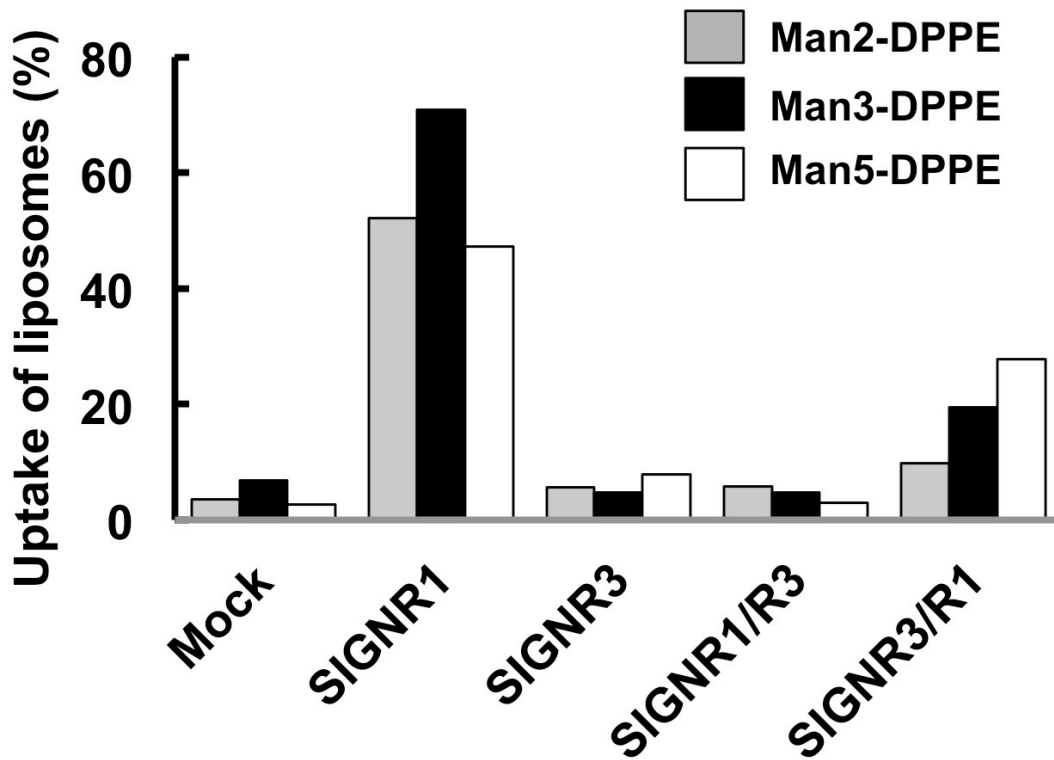
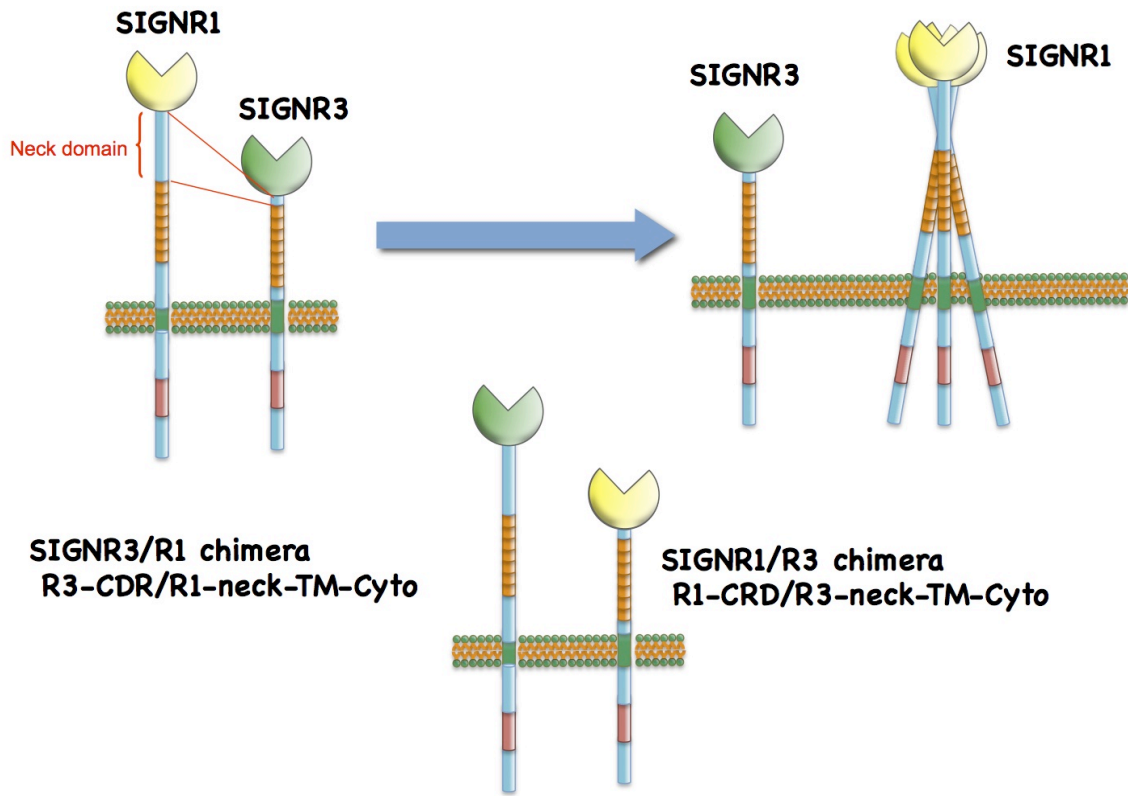
**Fig. 2-4. Effect of neoglycolipid content on liposome uptake by CLR-expressing cells.**

A. CHO cells transfected with FLAG-tagged SIGNR1 or SIGNR3 were incubated with liposomes consisting of cholesterol, DPPC, and Man3-DPPE at molar ratios of 10:10:1 and 10:5:6, respectively. Liposome uptake was detected by fluorescent microscopy. B. Cells transfected with SIGNR1 (black bars) or SIGNR3 (gray bars) were incubated with liposomes containing different ratios of Man3-DPPE, as indicated in the figure, and the uptake of each liposome was analyzed as described in Fig. 2-2. Data are expressed as the mean percentage of 2 independent experiments.



**Fig. 2-5. CLR-mediated uptake of liposomes with a higher density of neoglycolipids.**

CHO cells transfected with FLAG-tagged SIGNR1 (A), SIGNR3 (B), and Langerin (C) were incubated with neoglycolipid-coated liposomes containing cholesterol, DPPC, and various neoglycolipids at a molar ratio of 10:7:4. Liposome uptake was analyzed as described in Fig. 2-2. Each bar shows the mean  $\pm$  SD of 3 independent experiments.



**Fig. 2-6. Effect of oligomerization of CLRs on uptake of liposomes coated with neoglycolipids.**

A. SIGNR1 contains a juxta-membrane extended neck region and a carbohydrate recognition domain in the extracellular domain, and SIGNR1 forms oligomers on the cell surface through the extended neck region. In contrast, SIGNR3 are present in a monomeric state on the cell surface because of their short neck regions. To examine the effect of oligomer formation of CLRs on the liposomal uptake, uptake of liposomes by the cells that express chimera molecules. SIGNR1/R3 is the chimera with carbohydrate recognition domain (CRD) of SIGNR1 and neck, transmembrane, and cytosolic domains of SIGNR3. SIGNR3/R1 is the chimera with CRD of SIGNR3 and neck, transmembrane, and cytosolic domains of SIGNR1.

B. Uptake of liposomes by the cells that express SIGNR1, SIGNR3, SIGNR3/R1, or SIGNR1/R3.

### 第3章 貪食受容体および接着分子としての SIGNR1 の糖鎖選択性の評価

#### 3-1 序論

体内に侵入してきた病原体は、DCのようなプロフェッショナルな貪食細胞によって認識および貪食・分解され抗原として提示される。これは免疫応答の関わるエフェクターT細胞の分化の決定に関わってくる非常に重要な一連の流れである<sup>1)·3)</sup>。TLRやCLRなどのPRRはAPC上に発現しており、免疫応答誘導のための病原体認識に関与している<sup>4)·6)</sup>。CLRは、病原体の認識および細胞内への取り込みに関与する重要なPRRである事が近年明らかとなってきた。特に、DC-SIGNやDC-SIGN関連分子のようなEPNモチーフを有するCLRは、末端にマンノースやフコース、GlcNAcを有するリガンドへ結合および取り込む事が出来るため、病原体の認識に関与していると考えられている<sup>7)·8)</sup>。小島らは、オリゴマンノースで被覆したリポソーム (OML) が生体内において糖鎖依存的にCLRを介して貪食細胞に選択的に取り込まれること、また、この生体内でのOMLの取り込みに応答して貪食細胞が活性化・成熟し、OMLに封入された抗原がMHC分子上に提示され、CD4<sup>+</sup>と CD8<sup>+</sup> T 細胞を活性化することで、感染症やがんの病態制御が可能になることをマウスモデルで見いだしてきている<sup>9)·14)</sup>。これらのことは、EPNモチーフを有するCLRの貪食能を利用する事で、特異的な免疫応答を誘導する事ができることを暗示している。

ところが、CLRは生体内において常に病原体の貪食受容体としてだけ機能しているのではなく、免疫細胞の細胞接着分子としての機能や、糖鎖をもつ自己抗原の認識に関しても重要な役割を担っていることが示されている。例えば、未熟なDC上に発現しているDC-SIGNは、未感作のT細胞の一部に発現しているICAM-3の高マンノース型糖鎖を認識することや<sup>15)</sup>、血管内皮細胞上に発現したLe<sup>x</sup>提示ICAM-2との相互作用を介して、DC前駆細胞の血管内皮細胞上へのローリングや接着を引き起こすことも知られている<sup>16)</sup>。さらに、DCと好



中球にとの細胞間相互作用が、DC 上に発現している DC-SIGN と好中球上の Le<sup>x</sup>を提示した Mac-1 や CEACAM1 との結合を介して行われていることも知られている<sup>17),18)</sup>。また、未熟な DC は DC-SIGN を介して自己の糖タンパク質を捕捉して、自己抗原に対する免疫寛容を引き起こすことも知られている<sup>19)-21)</sup>。そのため、CLR と自己抗原上の糖鎖との継続的な相互作用は免疫の恒常性の維持に必要であると考えられる。従って、病原体を認識・貪食する貪食受容体あるいは自己抗原を認識し細胞間認識を司る細胞接着分子という CLR の機能に応じて、CLR を介した糖鎖認識は免疫応答誘導と免疫寛容というような、相反する細胞応答を導くことができるといえる。

前述したように、効率的に APC に抗原を輸送するために、APC 上に発現している CLR とこれらのリガンド間の相互作用を利用する事は、細胞と抗原間の特異的相互作用を惹起する為の非常に良いアプローチとなると考えられる<sup>22)</sup>。これまで既に、モノクローナル抗体を用いた樹上細胞上の CLR の同定およびターゲティングは、初期段階で検討されてきた<sup>19),23)</sup>。CLR は病原体上に発現している特定の糖鎖を認識するため、CLR によって特異的に認識される糖鎖はモノクローナル抗体の代わりにターゲティングシグナルに利用できる。さらに、糖は抗体よりも小さく安定な分子であり化学的手法より合成可能なため、糖鎖を利用した手法はモノクローナル抗体より利点がある。それゆえ、特定の CLR が最も選択的に認識する糖鎖の特定は、糖鎖をターゲットとした抗原送達システムにおいて非常に重要である。

一般的に CLR は病原体上の糖と自己抗原の糖をそれぞれ区別しないと考えられている<sup>24)</sup>。SIGNR1 の糖鎖認識特異性は可溶性組換えタンパク質と糖鎖アレイを用いて調べられており、その結果、マンノースを含むオリゴ糖よりもルイス血液型糖鎖をより選択的に認識することが示された<sup>25)</sup>。しかし第 2 章でも示したとおり、SIGNR1 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の SIGNR1 を一過性に発現させた CHO 細胞への取り込みを指

標として評価した結果、その糖選択特異性は、Le<sup>x</sup>や GlcNAc を末端にもつ糖を被覆したり  
ポソームよりもオリゴマンノース残基をもつ糖脂質を被覆したりポソームの方が効率的かつ  
選択的に取り込まれる事を見いだした<sup>26)</sup>。このような SIGNR1 の糖選択特異性における矛盾  
は、単純に、可溶型組換え SIGNR1 と細胞膜上に発現した SIGNR1 の構造的あるいは存在  
様式の違いに起因すると説明することは可能である。実際、可溶型ヒト DC-SIGN は Man3  
より Le<sup>x</sup> に対して高い親和性を示すが、DC-SIGN を発現した細胞は Man3 あるいは Le<sup>x</sup> を  
結合させたマイクロビーズをほとんど同程度に取り込む<sup>27)</sup>。しかしながら、この違いが貪食  
受容体としての SIGNR1 の糖鎖選択性と細胞接着分子としての糖鎖認識特異性の違い、すな  
わち機能の違いに起因する糖鎖選択性の違いのためであると考えられることもできる。このよう  
な問題を克服するには、CLR のそれぞれの機能に対応した糖鎖選択性を細胞表面に提示され  
た CLR を用いて比較する必要がある。

前述したように、CLR は免疫応答の活性化と寛容といった相反する細胞応答を誘導するこ  
とができる。CLR の機能の違いに応じて CLR の糖鎖選択性やその後のシグナル伝達が変化  
するということは、なぜ CLR が機能に対応して相反するような細胞応答を誘導するかという  
ことを説明するのに大変魅力的な仮説となる。また、もし貪食受容体としての CLR の糖鎖選  
択性が細胞接着分子としてのそれと異なるのであれば、特定の CLR を標的として効率のよい  
抗原送達を達成するためにはその CLR が貪食受容体として最も選択性の高い糖鎖を決定す  
る必要がある。そこで著者は本章において、SIGNR1 を安定的に発現しているマウスマクロ  
ファージ様 RAW264.7 細胞 (RAW-SIGNR1) と人工糖脂質を用いて、SIGNR1 の貪食受容  
体としての糖鎖選択性を細胞接着分子としてのそれとを比較した。

### 3-2 実験材料および方法

### 3-2-1 細胞および材料

マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に SIGNR1 分子を恒常的に発現させた細胞 (RAW-SIGNR1 細胞) は当研究室で樹立した。この細胞は 10%ウシ胎児血清、2 mM グルタミンおよび 0.5 mg/ml G418 を含む DMEM 培地で培養維持した。また Table1-2 に示した人工糖脂質のなかで、 $\alpha$ 1-2Man2-DPPE,  $\alpha$ 1-3Man2-DPPE,  $\alpha$ 1-4Man2-DPPE,  $\alpha$ 1-6Man2-DPPE, Man3-DPPE, Man5-DPPE, 2-FL-DPPE, 3-FL-DPPE, LNFP2-DPPE, LNFP3-DPPE, LNDFH-DPPE, BNCP-DPPE, and LNT-DPPE の 13 種類を本研究では用いた。合成および精製方法は第 2 章で述べた方法に準じた。これら 13 種の人工糖脂質を被覆したリポソームもまた第 2 章で述べて方法に従った。なお、人工糖脂質被覆リポソームの構成比率は DPPC, cholesterol, NGL が 1.00: 0.94  $\pm$  0.15: 0.11  $\pm$  0.01 であり、FITC-BSA をコレステロール 1 mg あたり 190 から 230  $\mu$ g の範囲で含み、その平均値は 209  $\pm$  10.5  $\mu$ g であった。またリポソームの粒子径は 985 から 1200 nm の範囲にあり、その平均値は 1080  $\pm$  80 nm であった。

### 3-2-2 人工糖脂質を固定化した固相に対する細胞接着評価法

人工糖脂質を固定化した固相 (NGL-coated solid phase) は以下の方法で調製した。2-プロパノールで溶解し様々な濃度 (10-200  $\mu$ M) に調製した人工糖脂質を 100  $\mu$ l ずつ 96well プレーットのそれぞれのウェルに加え、37°C で一晩放置し溶媒を完全に除去した。その後各ウェルを PBS で洗浄し、1%BSA を含む PBS を 100 $\mu$ l 加えて 30 分間 37°C で放置し、ブロッキングを行った。これを再び PBS でウェルを洗浄し NGL-coated solid phase とした。なお、固相上に固定化プレート上にコートされた人工糖脂質の定量性を調べるため、100 pmol の  $\alpha$ 1-2Man2-, Man3-, Man5-, LNFP2-, LNDFH-, 3-FL-, BNCP-DPPE を上記の方法で

固層化した 96well プレートからそれぞれ回収し、人工糖脂質のリン酸量を測定した。その結果、 $\alpha$ 1-2Man2-DPPE では  $85.5 \pm 4.9$  pmol、Man3-DPPE では  $83.3 \pm 5.2$  pmol、Man5-DPPE では  $81.2 \pm 3.1$  pmol、LNFP2-DPPE では  $83.8 \pm 3.9$  pmol、LNDFH-DPPE では  $80.2 \pm 4.1$  pmol、3-FL-DPPE では  $86.8 \pm 3.7$  pmol、BNCP-DPPE では  $84.5 \pm 4.5$  pmol と、人工糖脂質の種類による糖量のばらつきは無いことが確認できた。

CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub> あるいは 5 mM EDTA を含む Hank's balanced salt solution (HBSS) に懸濁した RAW-SIGNR1 または親株である RAW264.7 細胞 (each  $1 \times 10^6$ /well) を人工糖脂質が固定化されたウェルに加え、 $180 \times g$  (1000rpm) で 1 分間遠心した。25°C で 30 分間恒温放置した後、各ウェルを温めておいた HBSS で満たし、プレートシールで密封した。プレートを反転させ  $180 \times g$  で 1 分間遠心することで、固相に接着していない細胞を除去した。固相に接着した細胞の数は cell counting kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて 450nm 波長で吸光度測定することで評価した。

### 3-2-3 RAW-SIGNR1 細胞によるリポソーム取り込みの評価法

RAW 細胞、もしくは RAW-SIGNR1 細胞によるリポソームの取り込みは、第 2 章に述べた方法に準拠して行った。すなわち、CaCl<sub>2</sub> および MgCl<sub>2</sub> を含む Hank's balanced salt solution (HBSS) に懸濁した細胞 ( $5 \times 10^5$ /500  $\mu$ l) を 1.5-ml のシリコナイズチューブ中にとり、FITC-BSA を封入した人工糖脂質被覆リポソーム (人工糖脂質で 2.5 nmol、コレステロールとして 10  $\mu$ g 相当) を加えて 37°C で 1 時間緩やかに攪拌した。その後、EDTA を含む HBSS で細胞を洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで細胞を固定化した。細胞へのリポソームの取り込みは第 2 章で述べたように FACS を用いて細胞中の FITC に由来する蛍光強度を測定することで評価した。リポソームの細胞表面への結合と取り込みの比較は細胞とリポソーム

ムを 4°C または 37°C でそれぞれ反応させて、その後の洗浄および固定化の操作を行わず、反応終了直後に FACS を用いて細胞中の蛍光強度を測定することで評価した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 固相化人工糖脂質に対する濃度依存的な RAW-SIGNR1 細胞の接着評価

細胞膜上に発現している SIGNR1 の細胞接着分子としての糖鎖結合特異性を明らかにする為に、マクロファージ様細胞である RAW に SIGNR1 を恒常的に発現させた RAW-SIGNR1 細胞を樹立し、固相化した糖脂質に対する細胞の接着を検討した。Man3-DPPE の固相化量を変えると、Man3-DPPE 固相化量依存的に RAW-SIGNR1 の結合量が増加し、約 50 pmol/well 以上の量になると、結合量は一定となった (Fig. 3-1A)。固相化した Man3-DPPE に対する細胞接着は EDTA 存在下で接着がみられなくなり、SIGNR1 抗体で前処理をすることも接着がみられなくなった (Fig.3-1A)。また、親細胞で SIGNR1 が発現していない RAW 細胞では Man3-DPPE に対する接着はみられなかったことから、RAW-SIGNR1 細胞の接着は SIGNR1 を介していると結論された。またその他の糖脂質との結合を調べた結果、末端に  $\alpha$ 1-2 結合のフコースをもつ 2-FL-DPPE や  $\alpha$ 1-4 結合のフコースを側鎖にもつ LNFP2-DPPE、末端に GlcNAc をもつ BNCP-DPPE を固定化した固相に対しても、最大結合量はそれぞれの糖脂質で異なっていたが、Man3-DPPE 固定化固相への接着と同様の濃度依存性で RAW-SIGNR1 細胞は結合した (Fig. 3-1B)。

#### 3-3-2 SIGNR1 を介した各種固相化糖脂質に対する細胞接着比較

次に上記の結果を基として、RAW-SIGNR1 細胞と親株である RAW 細胞を用いて、50pmol/well の各種糖脂質を固定化した固相上への細胞接着を比較検討した (Fig3-2)。その

結果、SIGNR1 分子を発現していない親株である RAW 細胞は、全ての人工糖脂質固定化固相に対して接着性を示さなかった。マンノースを含む各固相化糖脂質に対する RAW-SIGNR1 細胞の接着を検討した結果、 $\alpha 1-2$ Man2-DPPE と  $\alpha 1-3$  Man2-DPPE、Man3-DPPE に対して同程度の細胞接着を示した。また、Man5-DPPE に対しては、Man3-DPPE よりも効率よく細胞接着がみられたが、 $\alpha 1-4$  Man2-DPPE と  $\alpha 1-6$  Man2-DPPE に対しては  $\alpha 1-3$  Man2-DPPE と Man3-DPPE に対するよりも接着性が顕著に低いレベルであった。マンノースを含有する各固相化糖脂質に対する細胞接着性の効率はそれぞれ、 $\text{Man5} > \text{Man3} \geq \alpha 1-3\text{Man2} \approx \alpha 1-2\text{Man2} > \alpha 1-6\text{Man2} > \alpha 1-4\text{Man2-DPPE}$  であり、概ねマンノースの残基数に比例していた。この結果は、可溶化組み換え SIGNR1 を用いたこれまでの報告の結果と矛盾しなかった<sup>25)</sup>。

次に、フコースもしくは GlcNAc を含む人工糖脂質を固定化した固相への接着性について検討した。フコースを含む固相化糖脂質への細胞接着は、いずれも Man3-DPPE よりも効率的な結合がみられた (Fig. 3-2)。更にこれら糖脂質間での顕著な差異はみられなかった。対照的に、BNCP-DPPE への細胞接着程度は、Man3-DPPE よりも低かった。

### 3-3-3 RAW-SIGNR1 細胞によるリポソーム取り込み評価

細胞膜上に発現している SIGNR1 の貪食受容体としての糖鎖選択性を明らかにするために、第 2 章同様、FITC-BSA を封入した人工糖脂質被覆リポソームとともに細胞を培養して、その貪食効率を比較した。その結果、RAW-SIGNR1 細胞の約 60%以上の細胞が、コレステロール : DPPC : 人工糖脂質のモル比が 10:10:1 の比率で作製されたりポソームを取り込んでいた事が確認できた (Fig.3-3A)。対照的に、RAW 細胞による Man3-DPPE 被覆リポソームの取り込みは 10%以下であった。加えて、RAW-SIGNR1 細胞を予め SIGNR1 抗体で処理するこ

とで、Man3-DPPE 被覆リポソームの取込みは阻害された (Fig.3-3A)。また、LNT-DPPE 被覆リポソームや糖脂質を被覆していないリポソームの取り込みは 10%以下であった。従って、Man3-DPPE 被覆リポソームは細胞表面に発現した SIGNR1 を介して細胞内に取り込まれている。

様々な系で細胞表面上に発現している CLR とリガンドとの結合は 4°Cで測定することで、またリガンドの CLR を介した取り込みは 37°Cで測定することで評価されている。そこで、RAW-SIGNR1 細胞と Man3-DPPE 被覆リポソームを 1 時間 4°C で反応させ、リポソームの取り込みを解析した結果、細胞に取り込まれたリポソーム内の蛍光タンパクは検出されなかったが、反応温度が 37°C の場合では明らかな取り込みがみられた (Fig. 3-3B)。このことから、人工糖脂質被覆リポソームと細胞表面に発現している SIGNR1 の結合の評価はできないと判断した。

#### 3-3-4 SIGNR1 を介した各種糖脂質被覆リポソームの取込みの比較

貪食受容体としての SIGNR1 分子の糖鎖選択特異性を調べるため、第 2 章で述べた方法を用いて、RAW-SIGNR1 細胞による様々な糖脂質被覆リポソームの取り込みを比較検討した。リポソームは全てコレステロール : DPPC : 人工糖脂質の構成比率が 10:10:1 で調製されたものを用いた。これらの糖脂質の取り込みは FACS で解析し、その代表的な糖脂質の取り込み結果を Fig.3-4 に示した。結果、 $\alpha$ 1-3Man2-DPPE を被覆したリポソームは RAW-SIGNR1 細胞の約半数に取り込まれた。それとは対照的に、 $\alpha$ 1-2Man2-DPPE を被覆したリポソームは $\alpha$ 1-3Man2-DPPE を被覆したリポソームと比較すると、明らかに取り込み効率は低下している (Fig. 3-4 upper pane)。また、LNFP2 (Le<sup>a</sup>)-DPPE を被覆したリポソームにおいては、RAW-SIGNR1 細胞の約 80%程度の取り込みがみとめられたが、LNDFH (Le<sup>b</sup>)-DPPE や

LNFP1(L<sup>x</sup>)-DPPE を被覆したリポソームは Le<sup>a</sup>-DPPE を被覆したリポソームと比較すると顕著な取り込み率の低下がみとめられた (Fig. 3-4 middle panel)。加えて、2-FL-DPPE 被覆リポソームは RAW-SIGNR1 細胞に取り込まれたのに対して、3-FL-DPPE 被覆リポソームでは取り込みがみとめられなかった。(Fig. 3-4 lower panel)

以上のような結果を基に、RAW-SIGNR1 細胞への各種人工糖脂質被覆リポソームの取り込みを Fig. 3-5 にまとめた。マンノースを含む人工糖脂質で被覆したリポソームの中では Man3-DPPE 被覆リポソームが最も効率よく細胞に取り込まれるという結果が得られた。貪食効率の順序は Man3- > Man5- ≈ α1-3Man2- > α1-2Man2- ≈ α1-6Man2- > α1-4Man2-DPPE であった (Fig. 3-5 upper panel)。一方、フコースを含む人工糖脂質被覆リポソームの貪食を比較した場合、Le<sup>a</sup>-DPPE で被覆したリポソームが Le<sup>x</sup>-DPPE または Le<sup>b</sup>-DPPE で被覆したリポソームよりも効率よく取り込まれていた。フコースおよび GlcNAc を含む人工糖脂質被覆リポソームの取り込み効率は、Le<sup>a</sup>- ≈ Man3- ≥ BNCP- ≈ 2-FL- > Le<sup>x</sup>- > Le<sup>b</sup>- > 3-FL-DPPE の順であった。また全 13 種類の人工糖脂質被覆リポソームの中では Man3-DPPE および Le<sup>a</sup>-DPPE で被覆したリポソームが最も効率よく RAW-SIGNR1 細胞に貪食された (Fig. 3-5 lower panel)。

### 3-3-5 SIGNR1 を介した糖脂質低被覆率リポソームの取り込み

一般的に、レクチンによる糖鎖認識には糖鎖が多価の状態が存在することが必要である<sup>30)</sup>。著者は既に第2章において、人工糖脂質被覆リポソーム上の糖鎖密度が CLR を介したリポソームの貪食効率に影響を与えることを示している。コレステロール, DPPC, および人工糖脂質が 10:10:1 で構成されたリポソームを用いた場合 Man3-DPPE および Le<sup>a</sup>-DPPE で被覆したリポソームが最も効率よく貪食されたことから、この2種の人工糖脂質を従来のリポソーム



ムよりも低い割合で被覆したリポソームの取り込みについて検討した (Fig. 3-6)。

その結果、コレステロール : DPPC : 人工糖脂質の構成比率を 10:10:1 で作製したリポソームの取り込みと同様に、10:10:0.5 で構成されているリポソームでは Man3-DPPE および Le<sup>a</sup>-DPPE のどちらも、RAW-SIGNR1 細胞によって効率的に取り込まれたが、コレステロール, DPPC, および Man3-DPPE が 10:10:0.2 で構成されたリポソームの細胞への取り込みは著しく低下した。一方で、RAW-SIGNR1 細胞による、コレステロール : DPPC : Le<sup>a</sup>-DPPE の比率が 10:10:0.2 のモル比率で構成されているリポソームの取り込みにおいては、細胞内への取り込みが確認できた。従って、相対的に糖脂質の密度が低い状態では Man3-DPPE 被覆リポソームよりも Le<sup>a</sup>-DPPE 被覆リポソームの方が、細胞表面上に発現している SIGNR1 分子を介して効率的に貪食されることが明らかとなった。

### 3-4 考察

CLR の機能についての知見が増すにつれて、CLR が免疫応答の誘導と調節といった場面に重要な役割を果たしていることが明らかになってきている。CLR の機能における糖鎖選択性や特異性を理解することによって、ホメオスタシスの維持における抗原提示細胞の細胞間相互作用や、免疫誘導における病原体の取り込みを理解することも可能となる。既に述べたように、CLR の糖鎖結合特異性は基本的に組換え可溶型の CLR と糖鎖アレイなど固相化された糖鎖との結合や相互作用を指標として調べられているが、実験系の違いによって細かな結合特異性が異なっている場合がある。例えば、Galustian らは人工糖脂質の糖鎖アレイを用いて検討を行い、可溶型 SIGNR1 がルイス血液型糖鎖をオリゴマンノースに対して含む糖鎖よりも選択的に結合することを報告している<sup>26)</sup>。対照的に、Takahara らは糖鎖マイクロアレイと evanescent-field fluorescence-assisted detection system を用いて可溶化組換え

SIGNR1 の糖鎖認識結合特異性を検討し、SIGNR1 は $\alpha$ -マンノースと菌体のマンナンには強く結合するが、Le<sup>a</sup>や Le<sup>x</sup>のようなフコースを含む糖鎖は認識しないと結論づけている<sup>28)</sup>。前者はレクチンの糖鎖認識ドメインを IgG の Fc 部位に融合させた組換え CLR を抗 Fc 抗体でポリメライズしたものを可溶型 CLR として用いているが、後者では、2 量体の可溶型 SIGNR1 を可溶型 CLR として用いている。これらの結果から、CLR のオリゴマー形成の違いが CLR の糖鎖選択特異性に影響をあたえる可能性が示唆された。第 2 章でも述べたように、SIGNR1 は膜近傍に長いネック領域をもち<sup>31)</sup>、ヒト DC-SIGN のように細胞表面上でネック領域を介して SIGNR1 の多量体を形成していると考えられている<sup>29),30)</sup>。つまり生理的な条件では SIGNR1 は細胞表面でオリゴマーを形成した状態で貪食受容体もしくは細胞接着分子として機能している。従って、CLR をワクチンでの抗原送達のターゲットとして利用しようとした場合には細胞表面での CLR の糖鎖選択性を評価する必要がある。

そこで本章では、生理的条件下での SIGNR1、すなわち膜上に発現した SIGNR1 の貪食受容体あるいは細胞接着分子としての糖鎖選択性を評価することを目的とした。そのため、マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に SIGNR1 を恒常的に発現させた RAW-SIGNR1 細胞を樹立し、様々な人工糖脂質を固相化したプレートに対する細胞接着と、人工糖脂質を被覆したリポソームの細胞への取り込み選択性を系統的に比較した。結論として、貪食受容体としての SIGNR1 の糖鎖選択性は細胞接着分子のそれとは細かい点で異なっていた。その詳細な比較結果は Table 3-1 に総括した。ここで人工糖脂質を固定化した固相への RAW-SIGNR1 細胞への接着効率と人工糖脂質被覆リポソームの RAW-SIGNR1 細胞への貪食効率を比較してみると、Man3-DPPE は Man5-DPPE あるいはフコースを含む多くの人工糖脂質に比べ、接着分子としての SIGNR1 のリガンドとしては効率が低い。この結果は Galustian らが可溶型 SIGNR1 多量体を用いて得た結果と概ね一致している。一方で、

Man3-DPPEはMan5-DPPEあるいはフコースを含む多くの人工糖脂質に比べ貪食受容体としてのSIGNR1のリガンドとしては適しているといえる。逆にDC-SIGNにおいてよいリガンドとされているLe<sup>x</sup>-DPPE または Le<sup>b</sup>-DPPEは確かに接着分子としてのSIGNR1のリガンドとしても優れていたが、貪食受容体としてのSIGNR1のリガンドとしてはMan3-DPPEやLe<sup>a</sup>-DPPEに比べて優れたリガンドとはならないと考えられた。このような違いがなぜ生じるのかについての明確な答えはない。しかしひとつの理由として、糖鎖の提示のされ方による違いが原因となっている可能性がある。なぜなら、プラスチックの固相上で人工糖脂質糖鎖が提示される状態とリポソームの脂質二重層上で人工糖脂質糖鎖が提示される状態では、大きく異なるからである。そこで著者も人工糖脂質被覆リポソームの細胞への結合を、人工糖脂質被覆リポソームと細胞を4℃で反応させることで評価しようと試みた。しかし、Fig. 3-5に示したように、リポソームの細胞への結合を検出することができなかった。また機能によって選択性に違いが生じる原因として、細胞表面上の他の分子が影響を与えている可能性も考えられる。例えば、貪食というプロセスは非常に複雑であり、貪食受容体以外の多数の分子が関与していることが知られている<sup>31),32)</sup>。これら貪食に関与する受容体以外の分子が糖鎖を提示している粒子のソーティングに影響を及ぼしているのかもしれない。しかし、このことを示すためにはさらなる研究が必要である。

本章を総括すると、人工糖脂質がCLRの機能を考慮した糖鎖選択性の解明に非常に有用であることを示し、またLe<sup>a</sup>とMan3を含む糖鎖(人工糖脂質)が貪食受容体としてのSIGNR1をターゲットとするうえで非常に魅力的なリガンドになる事を示した。DCにCLRを介して抗原を送達する上で、それぞれのCLRの糖鎖選択特異性を明らかにする事は重要である<sup>22)</sup>。これまで、CLRを介してDCに抗原を送達する場合、その糖鎖は可溶性組換えCLRで示された糖鎖結合特異性を基に選択をされている。しかしながら今回の結果より、糖鎖を用いた

ターゲティングには、機能に応じた糖鎖選択性を基として選択する必要性が浮き彫りになった。また、著者らのグループでは Man3-DPPE で被覆したリポソームを用いてマウスの抗原提示細胞への抗原送達を達成してきたが、本研究の結果は Man3-DPPE を選択した妥当性を与えるものであった。一方でヒト DC-SIGN では異なる糖鎖によって異なるシグナルが伝達され、その結果として異なる免疫応答が誘導されることが示されていることから<sup>33)-35)</sup>、CLR の機能に応じた糖鎖認識の選択性の違いが異なるシグナルを惹起している可能性も考えられる。今後、人工糖脂質固定化固相への CLR を介した細胞接着から惹起されるシグナルや細胞応答を人工糖脂質被覆リポソームの CLR を介した取り込みから惹起されるそれらと比較することで、免疫系における CLR の機能を理解できるようになることが期待される。

### 3-5 参考文献

1. Palucka K, Banchereau J. Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin Immunol*, 19, 12-25, 1999
2. Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, et al. Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1036-1041, 1999
3. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-252, 1998
4. Janeway Jr CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54, 1-13, 1989
5. Cambi A, Figdor GC. Dual function of C-type lectin-like receptors in the immune system. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 539-546, 2003

6. Robinson MJ, Sancho D, Slack EC, LeibundGut-Landmann S, Sausa CR. Myeloid C-type lectins in innate immunity. *Nat Immunol*, 12, 1258-1265, 2006
7. Avraméas A, McIlroy D, Hosmalin A, Aufran B, Debré P, Monsigny M, et al. Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells. *Eur J Immunol*, 26, 394-400, 1996
8. Turner MW. Mannose binding lectin: the pluripotent molecule of the innate immune system. *Immunol Today*, 17, 532-540, 1996
9. Ikehara Y, Niwa T, Biao L, Kabata-Ikehara S, Ohashi N, Kobayashi T, et al. A carbohydrate recognition-based drug delivery and controlled release system using intraperitoneal macrophages as a cellular vehicle. *Cancer Res*, 66, 8740-8748, 2006
10. Takagi H, Furuya N, Kojima N. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250 2007
11. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, et al. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett*, 260, 137-145, 2008
12. Ishii M, Kato C, Hakamata A, Kojima N. Targeting with oligomannose-coated liposomes promotes maturation and splenic trafficking of dendritic cells in the peritoneal cavity. *Int Immunopharmacol*, 11, 164-171, 2011
13. Shimizu Y, Takagi H, Nakayama T, Yamakami K, Tadakuma T, Yokoyama N, et al. Intraperitoneal immunization with oligomannose-coated liposome-entrapped soluble leishmanial antigen induces antigen-specific T-helper type 1 immune response in

- BALB/c mice through uptake by peritoneal macrophages. *Parasite Immunol*, 29, 229-239, 2007
14. Nishikawa Y, Zhang H, Ikehara Y, Kojima N, Xuan X, Yokoyama N. Immunization of oligomannose-coated liposome-entrapped NcGRA7 protects dams and offspring from *Neospora caninum* infection in mice. *Clin Vaccine Immunol*, 16, 792-797, 2009
  15. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, et al. Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell*, 100, 575-585, 2000
  16. Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, et al. DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol*, 1, 353-357, 2000
  17. van Gisbergen KP, Ludwig IS, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett*, 579, 6159-6168, 2005
  18. Bogoevska V, Horst A, Klampe B, Lucka L, Wagener C, Nollau P. CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiology*, 16, 197-209, 2006
  19. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*, 196, 1627-1638, 2002

20. Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, et al. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J Exp Med*, 197, 7-17, 2003
21. Nonaka M, Ma BY, Murai R, Nakamura N, Baba M, Kawasaki N, et al. Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 180, 3347-3356, 2008
22. van Kooyk Y, Unger WW, Fehres CM, Kalay H, García-Vallejo JJ. Glycan-based DC-SIGN targeting vaccines to enhance antigen cross-presentation. *Mol Immunol*, 55, 143-145, 2010
23. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*, 168, 2118-2126 2002
24. Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y. Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 22, 33-54 2004
25. Galustian C, Park CG, Chai W, Kiso M, Brueninf SA, Kang YS, et al. High and low affinity carbohydrate ligands revealed for murine SIGN-R1 by carbohydrate array and cell binding approaches, and differing specificities for SIGN-R3 and langerin. *Int Immunol*, 16, 853-866, 2004
26. Kawauchi Y, Kuroda Y, Kojima N. Preferences for uptake of carbohydrate-coated liposomes by C-type lectin receptors as antigen-uptake receptors. *Glycoconj J*, 29, 481-490, 2012

27. Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells. *J Immunol*, 170, 1635–1639, 2003
28. Tateno H, Ohnishi K, Yabe R, Hayatsu N, Sato T, Takeya M, et al. Dual specificity of Langerin to sulfated and mannosylated glycans via a single C-type carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem*, 285, 6390–400, 2010
29. van Kooyk Y. C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses. *Biochem Soc Trans*, 36, 1478-1481, 2008
30. Park CG, Takahara K, Umemoto E, Yashima Y, Matsubara K, Matsuda Y, et al. Five mouse homologues of the human dendritic cell C-type lectin, DC-SIGN. *Int Immunol*, 13, 1283-1290, 2001
31. Kerrigan AM, Brown GD. C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology*, 214, 562-575, 2009
32. Chen WC, Completo GC, Sigal DS, Crocjer PR, Saven A, Paulson JC. In vivo targeting of B-cell lymphoma with glycan ligand of CD22. *Blood*, 115, 4778-4786, 2010
33. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Geijtenbeek TB. Carbohydrate- specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nat Immunol*, 10, 1081-1088, 2009

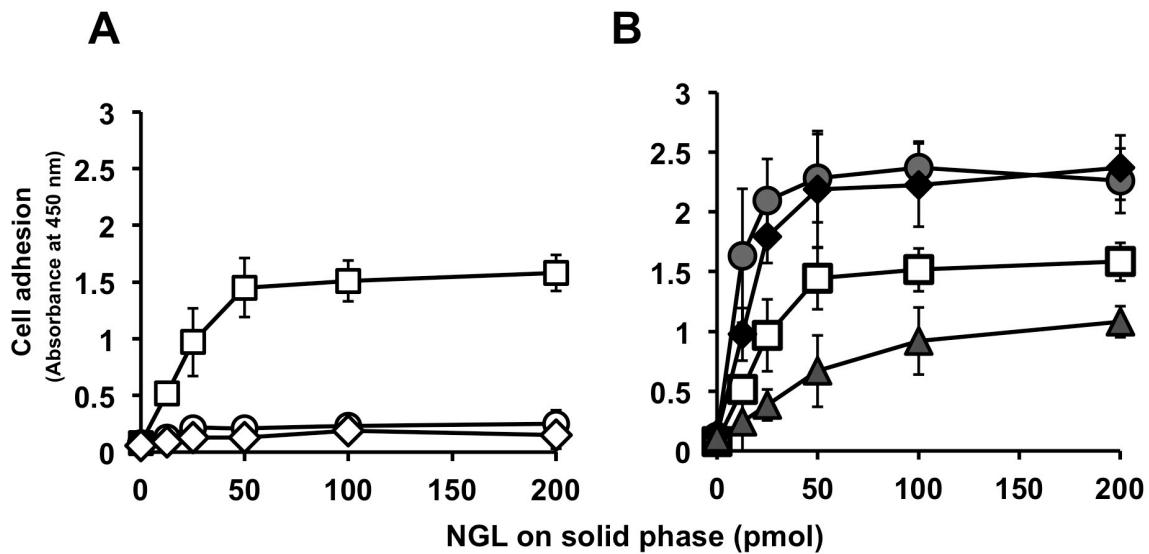


34. den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother*, 8, 1149-1157, 2009
35. Steeghs L, van Vliet SJ, Uronen-Hansson H, van Mourik A, Engering A, Sanchez-Hernandez M, et al. *Neisseria meningitidis* expressing lgtB lipopolysaccharide targets DC-SIGN and modulates dendritic cell function. *Cell Microbiol*, 8, 316-325, 2006

**Table 3-1. Evaluation of carbohydrate preference of SIGNR1**

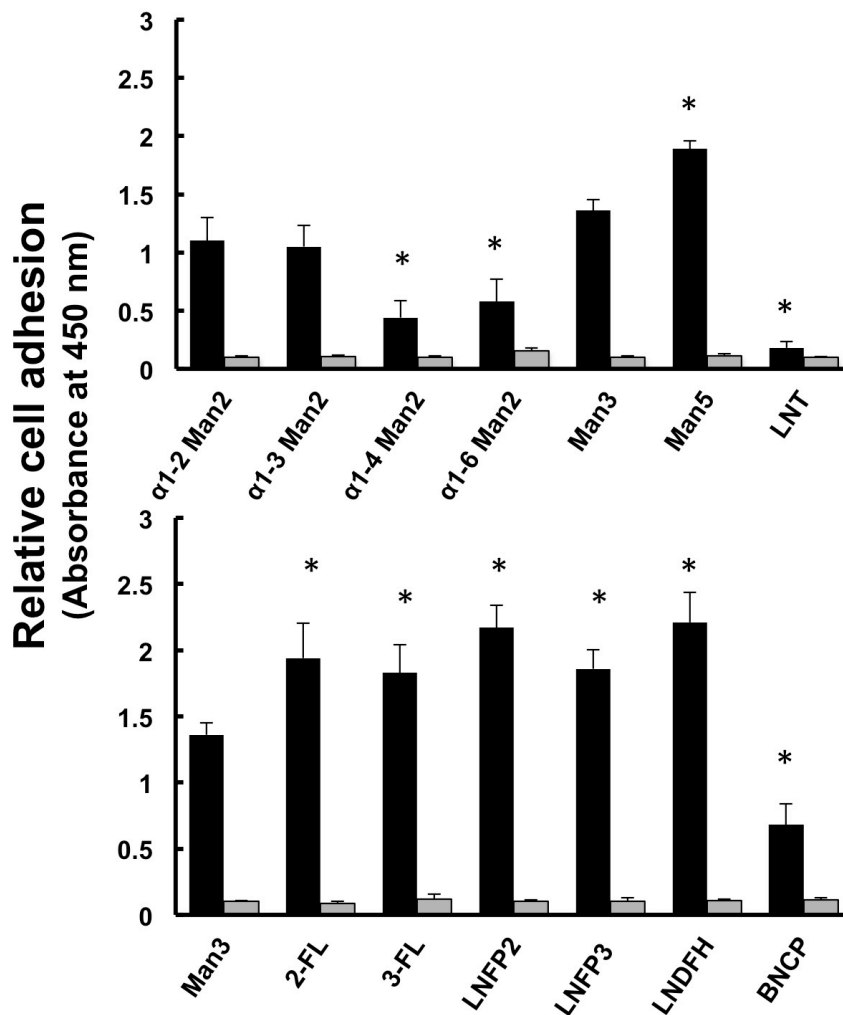
Neoglycolipid	Assessed as a cell adhesion molecule	<u>Assessed as a phagocytic receptor</u>	
		DPPC:Chol:NGL (10:10:1)	DPPC:Chol:NGL (10:10:0.2)
a1-2Man2	++	+	ND
a1-3Man2	++	+++	+/-
a1-4Man2	+	+/-	ND
a1-6Man2	+	+	ND
Man3	++	++++	+
Man5	+++	+++	+/-
LNFP2 (Le <sup>a</sup> )	++++	++++	+++
LNFP3 (Le <sup>x</sup> )	++++	+++	+/-
LNDFH (Le <sup>b</sup> )	++++	++	+/-
2-FL (Blood group H)	++++	+++	ND
3-FL	++++	+/-	ND
BNCP	++	+++	+
LNT	-	-	ND

ND; not determined



**Fig. 3-1. Assessment of SIGNR1-mediated cell adhesion to NGL-coated solid phases.**

To prepare NGL-coated solid phases, different quantities of NGLs were added in the wells of a 96-well plate (indicated on abscissa), and the wells were dried, washed with PBS, and blocked with 1% BSA in PBS for 1h at room temperature. A. Cell adhesion of RAW-SIGNR1 cells to Man3-DPPE coated solid phases was determined in the presence of CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> (open squares), EDTA (open diamonds) or an anti-SIGNR1 antibody (open circles). Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 3 independent experiments. B. Cell adhesion of RAW-SIGNR1 cells to the solid phases coated with Man3- (open squares), 2-FL- (closed diamonds), LNFP2- (closed circles), or BNCP-DPPE (closed triangles) was determined in the presence of CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub>. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 5 independent experiments.

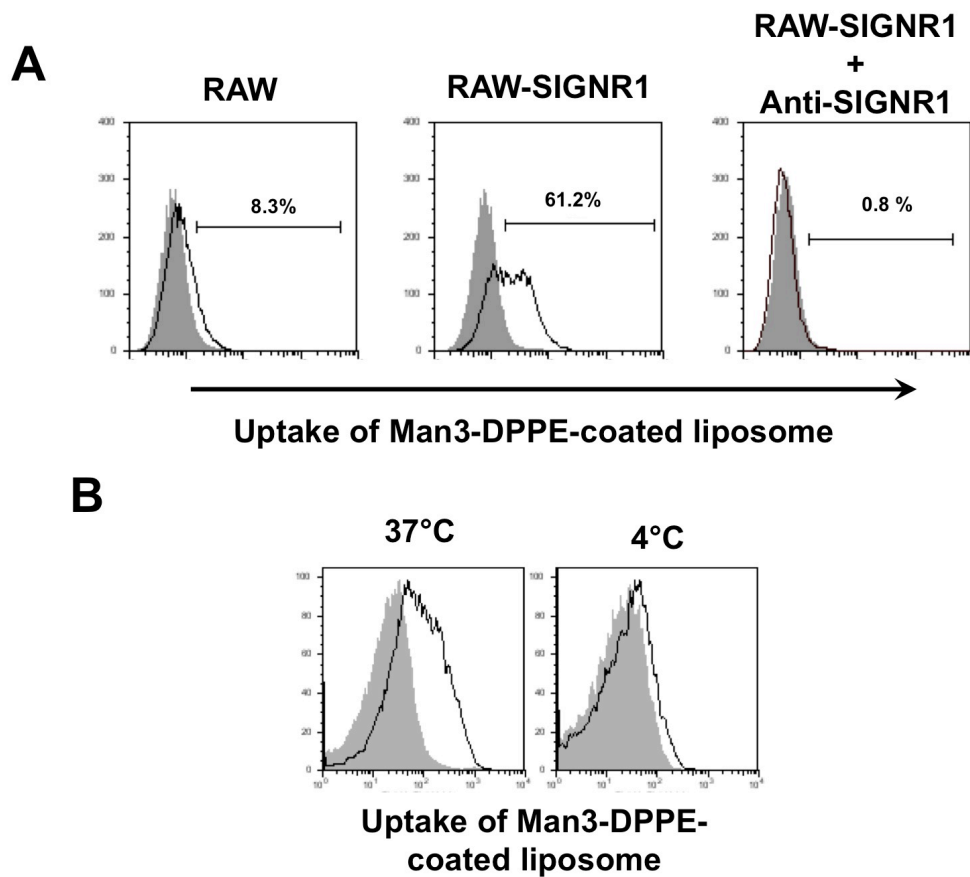


**Fig. 3-2.**

**Efficiency of cell adhesion to NGL-coated solid phases.**

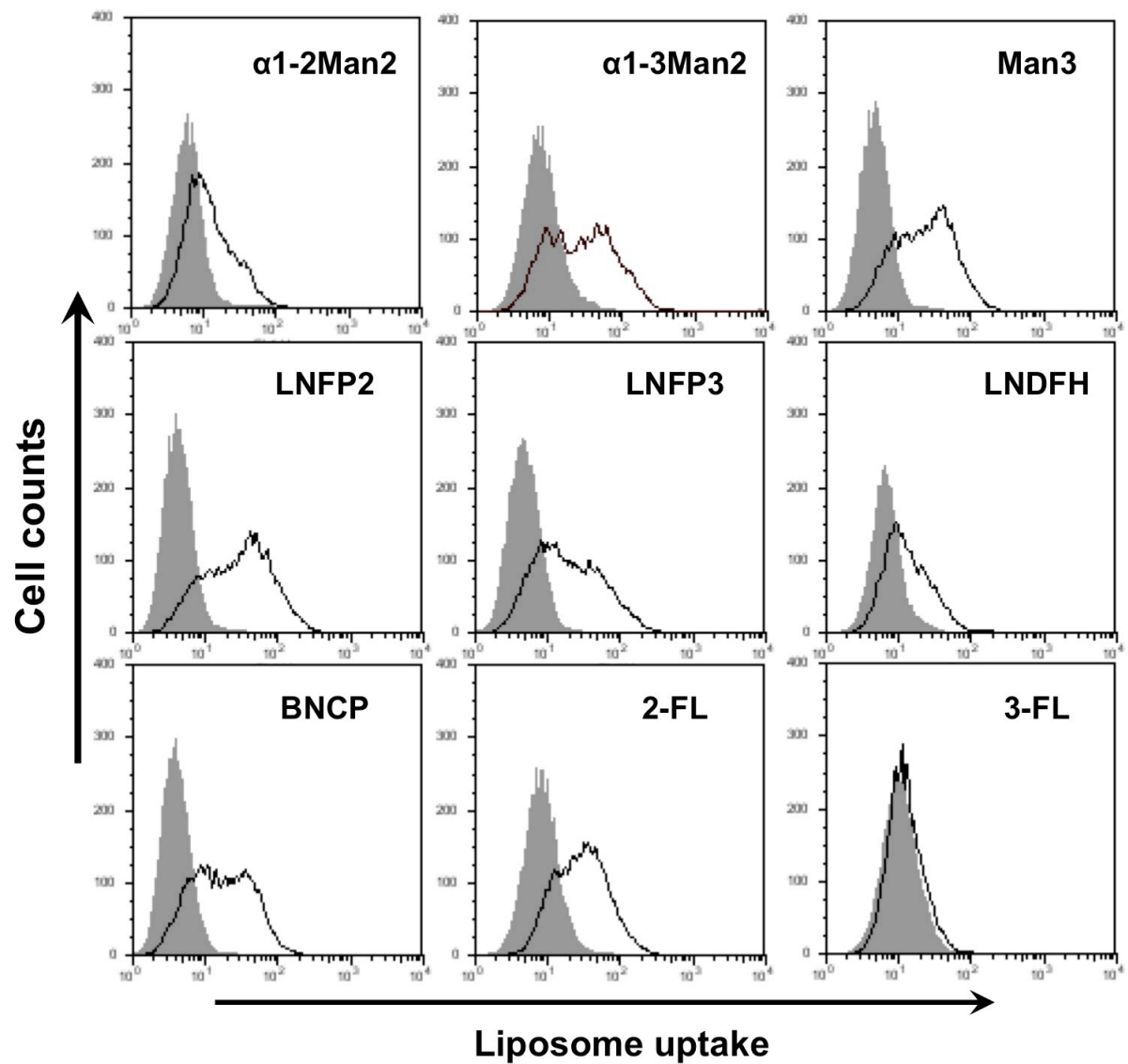
The cells were plated on wells of 96-well plates coated with 50 pmol of various NGLs (indicated on abscissa), and incubated for 1h at 37°C. Unbound cells were removed by centrifugation and the bound cells on each well were measured. Black and gray bars

indicate the cell adhesion of RAW-SIGNR1 and RAW264.7 cells, respectively. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 5 independent experiments. \*  $P < 0.05$  vs. adhesion of cells to Man3-DPPE-coated solid-phase.



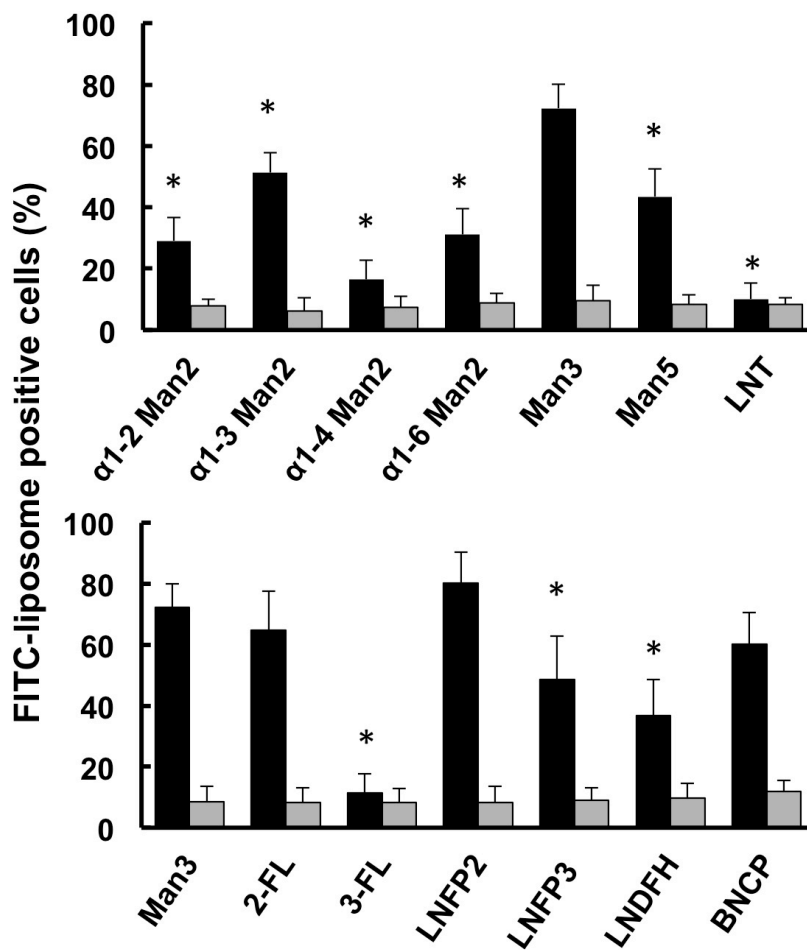
**Fig. 3-3. Assessment of SIGNR1-mediated phagocytosis of NGL-coated liposomes**

A. RAW264.7 or RAW-SIGNR1 cells were incubated with FITC-labeled liposomes coated with Man3-DPPE (open peaks) or uncoated liposomes (shaded peaks) at 37°C for 1 h, and the fluorescence in the cells were analyzed. Prior to addition of liposomes, cells were treated with or without an anti-SIGNR1 antibody for 30 min at 4°C. B. The cells were incubated with the liposomes in HBSS containing CaCl<sub>2</sub> and MgCl<sub>2</sub> at 4°C or 37°C for 1 h, and the fluorescence from FITC in the cells were analyzed by flow cytometry. Open and shaded peak indicates the fluorescent intensities of RAW-SIGNR1 and RAW264.7 cells, respectively.



**Fig. 3-4. Representative histograms of uptake of liposomes coated with various NGLs by RAW-SIGNR1 cells**

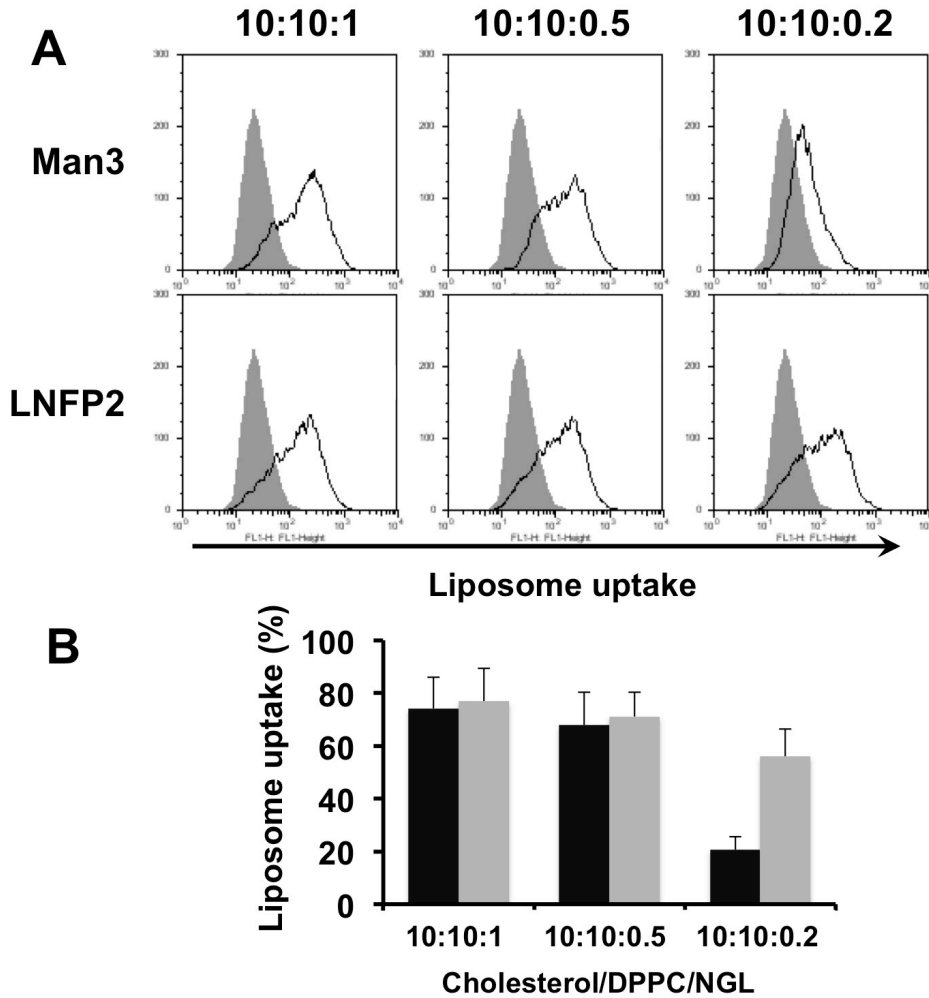
FITC-labeled NGL-coated liposomes comprising of cholesterol, DPPC, and various NGLs (indicated in the panels) at a molar ratio of 10:10:1 (open peaks) or uncoated liposomes (shaded peaks) were incubated with RAW-SIGNR1 for 1 h, and the fluorescent signals in the cells were analyzed.



**Fig. 3-5.**  
**Efficiency of uptake of NGL-coated liposomes by RAW-SIGNR1 cells.**

The cells were

incubated with FITC-BSA-containing liposomes comprised of DPPC, cholesterol, and various NGLs (indicated on abscissa) at a molar ratio of 10:10:1 for 3 h. and liposome uptake was analyzed by FACS. The percentage of FITC-positive cells in the cells is shown on the vertical axis. Black and gray bars indicate the liposome uptake by RAW-SIGNR1 and RAW264.7 cells, respectively. Each bar shows the mean percentage  $\pm$  SD of 5 independent experiments. \*  $P < 0.05$  vs. uptake of Man3-DPPE-coated liposomes.



**Fig. 3-6. Uptake of liposomes with lower NGL quantities**

Uptake of FITC-BSA containing liposomes comprised of cholesterol, DPPC, and various NGLs at molar ratios of 10:10:1, 10:10:0.5, and 10:10:0.2 were analyzed. A. Representative histograms of the uptake of liposomes coated with Man3-DPPE and those coated with LNFP2-DPPE. B. Quantitative comparison of the uptake of liposomes containing different quantities of NGLs. Black and gray bars indicate the percentage of FITC-positive cells that incubated with liposomes coated with Man3-DPPE and those coated with LNFP2-DPPE, respectively. Data are expressed as the mean percentage  $\pm$  SD of 5 independent experiments.



## 第4章 免疫応答に及ぼす貪食受容体としての SIGNR1 の機能評価

### 4-1 序論

SIGNR1 は糖鎖を被覆したリポソームのような大きな粒子を貪食する貪食（ファゴサイトーシス）受容体として機能するとともに、糖タンパク質やデキストランのような糖鎖をもつ可溶性高分子を細胞内に取り込むエンドサイトーシス受容体としても機能する<sup>1)3)</sup>。さらに、第3章で示したように SIGNR1 は糖鎖で被覆された固相上への細胞接着も媒介する接着分子としての機能も持っている。すなわち、SIGNR1 などの CLR は多機能分子であるといえる。

前章までに述べてきたように、Man3-DPPE で被覆したリポソーム (OML) が SIGNR1 を発現している細胞に SIGNR1 を介して Man5-DPPE を含む他の人工糖脂質被覆リポソームより効率よく取り込まれることを著者は明らかにした。一方で、SIGNR1 を発現している細胞は Man5-DPPE を固定化した固相上に Man3-DPPE を固定化したそれよりも効率よく接着した<sup>3)</sup>。このことは貪食受容体としての SIGNR1 と細胞接着分子としての SIGNR1 では、細かな糖鎖選択性が異なっていることを示している。

ところで、SIGNR1 のヒトの相同体である DC-SIGN は数多くの病原体に対する免疫応答誘導において鍵分子として機能していることが明らかにされている<sup>4)</sup>。例えば、DC-SIGN と病原体のマンノースやフコースを含む糖鎖との相互作用は DC の成熟化を障害することで、TLR4 を基点とした免疫応答に影響を与えている。また DC-SIGN がリガンド糖鎖と結合することで serine/threonine kinase である Raf-1 が活性化し、そのために NF- $\kappa$ B subunit, p65 のリン酸化が亢進しさらに、IL-10 遺伝子の転写が増加し、IL-10 の産生量が増える<sup>5)</sup>。さらには、ダニの唾液腺で作られる免疫抑制タンパク質 Salp15 は DC-SIGN と結合することで細胞内にシグナルを伝達し、TLR2 あるいは TLR4 を介した IL-6 や TNF- $\alpha$  といった炎症性サ

イトカインの産生を阻害することも示されている<sup>6)</sup>。このように、様々なサイトカインの産生が CLR と糖鎖との相互作用を介したシグナル伝達によって調節されていることが示されているが、CLR の多彩な機能の違いがサイトカインの産生にどのような影響を与えているかについて述べた報告は見当たらない。

小島らは、腹腔内に OML を投与すると貪食細胞が SIGNR1 を介して OML を貪食し、その結果として細胞が活性化され Th1 免疫応答誘導に必須である IL-12 が選択的に産生されることを示した<sup>2)</sup>。この能力は OML の持っている優れた特徴の一つである。しかし同時に、貪食細胞が産生する IL-6 が OML の取り込みに応答して著しく抑制されることも見いだしている。このことは SIGNR1 による OML の認識によって DC-SIGN の場合と同じように炎症性サイトカインの産生が抑制されることを示している。前章において述べたように、SIGNR1 の糖鎖認識選択性はそれぞれの機能に応じて異なっていると考えられることから、SIGNR1 による免疫応答調節においても糖鎖認識の場合と同じように SIGNR1 の機能に応じて異なっている可能性が考えられた。そこで本章においては、SIGNR1 の様々な機能、すなわち貪食受容体、エンドサイトーシス受容体および接着分子としての機能が炎症性サイトカインの産生にどのような影響を与えるか、RAW-SIGNR1 細胞を用いて、グラム陰性菌の細胞壁の成分である LPS で刺激することで TLR4 を介した炎症性サイトカインの産生量の変化を検討した。

## 4-2 実験材料および方法

### 4-2-1 試薬、細胞および方法

マウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞に SIGNR1 分子を恒常的に発現させた細胞(RAW-SIGNR1 細胞)は、第 3 章同様、著者の研究室で樹立した細胞株を用いた。

Hamster 由来の SIGNR1 モノクローナル抗体 (22D1) は eBoscience (Boston, MA, USA) から購入した。また特に断らない限り、使用した試薬類および方法は基本的には第 1 章から 3 章までに述べたものと同じである。

#### 4-2-2 サイトカインの測定方法

2%の牛胎児血清を含む培地に懸濁した RAW-SIGNR1 細胞 ( $5 \times 10^5/500 \mu\text{l}$ ) を 1.5 ml のシリコナイズドチューブに入れ、そこに 100 ng/ml になるように *Escherichia. coli* 0111:B4 株の LPS (Sigma-Aldrich)を加えた。LPS を加えた直後に、人工糖脂質被覆リポソーム、あるいは可溶性の糖鎖プローブ (Man3-BSA または Man3-PAA) を加え、1 時間 37°C で穏やかに攪拌した。その後、細胞を 24-well プレートに移し、37°C 18 時間培養した。また別途、細胞を Man3-DPPE または Man3-BSA を固定化したプラスチックプレートに加え、 $180 \times g$  で 1 分間遠心し、すぐに LPS を加え 37°C 18 時間培養した。培養後培地を回収し培地中に分泌されたサイトカインをそれぞれの ELISA キット (BD bioscience) を用いて定量した。

#### 4-3 結果

##### 4-3-1 SIGNR1 を介した OML の貪食による IL-6 の分泌抑制

これまで、OML が SIGNR1 を介してマクロファージに取り込まれる事で、LPS 刺激より惹起される IL-6 のサイトカイン分泌が抑えられるという結果が得られている。そこで RAW264.7 細胞からのサイトカイン産生において、SIGNR1 を介した OML の取込みが与える影響を検討する為に、OML 存在もしくは非存在下での LPS 刺激による RAW-SIGNR1 細胞からの IL-6 産生量の変化を調べた。第 3 章で示したように、RAW-SIGNR1 細胞は SIGNR1 依存的に OML を速やかに取り込むが、親株 RAW264.7 細胞では OML の取り込みはほとん

ど観察されない。SIGNR1 を発現していない RAW264.7 細胞では、OML も糖鎖を被覆していないリポソーム(BL)も、LPS によって誘導される IL-6 の産生に影響を与えなかった(Fig. 4-1A)。対照的に、RAW-SIGNR1 細胞による OML 存在下での IL-6 の産生は、顕著に抑制された。別のクローンでも同様に OML による IL-6 の産生抑制はみられた。しかし BL 存在下では、いずれのクローン株においても IL-6 の産生抑制は認められなかった。さらに、OML 濃度依存的に IL-6 の産生が抑制される事も、明らかとなった(Fig. 4-1B)。

SIGNR1 分子と相同性の高い DC-SIGN は、TLR を介したシグナル伝達で惹起される IL-6、IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-12 といった幅広い炎症性のサイトカインの産生を抑える報告がある。そこで、SIGNR1 分子による炎症性のサイトカイン産生への影響を検討した。その結果、SIGNR1 を介した OML の貪食は IL-6 だけではなく IL- $\beta$ の産生も抑制するが、TNF- $\alpha$  の産生には全く影響を与えない事が明らかとなった(Fig. 4-1C)。

#### 4-3-2 粒径が異なる OML による IL-6 の分泌抑制

上記の実験では粒子径が約 1  $\mu\text{m}$  の OML を用いている。そこで、粒子径が与える影響を検討するため、粒子径が 1.0  $\mu\text{m}$ 、0.4  $\mu\text{m}$ 、0.2  $\mu\text{m}$  および 0.1  $\mu\text{m}$  になるように調整した OML を用いて LPS 刺激によって誘導される IL-6 産生の抑制について検討した。RAW-SIGNR1 細胞は直径 0.1  $\mu\text{m}$  の OML であっても、細胞内に取り込んだ (Fig.4-2A)。しかしながら、直径が 0.2  $\mu\text{m}$  以下の OML では IL-6 の産生は抑制されなかった。一方、直径 0.4  $\mu\text{m}$  のリポソームは 1.0  $\mu\text{m}$  のリポソーム同様に IL-6 の抑制が認められた (Fig.4-2B)。ファゴサイトーシスとは貪食細胞が 500 nm 以上の大きな粒子をアクチンに依存した形で細胞内に取り込む過程を指している。0.4  $\mu\text{m}$  以上の OML では抑制効果がみられ、それ以下では見られないということは、SIGNR1 を介したファゴサイトーシスが LPS 刺激で誘導される IL-6 や IL-1 $\beta$ の産

生を抑制していることを示している。

#### 4-3-3 SIGNR1 を介したエンドサイトーシスによる IL-6 の分泌抑制

次に SIGNR1 を介したエンドサイトーシスがどのようにサイトカイン産生に影響を及ぼすかを調べるために、可溶性の SIGNR1 リガンドを用いて TLR4 を介した IL-6 産生への影響を検討した。RAW-SIGNR1 細胞に可溶性の糖鎖ポリマーである Man3-PAA を加えて培養した結果、Man3-PAA の顕著な取込みが認められた (Fig. 4-3A)。しかしながら、20 µg/ml の Man3-PAA 存在下における RAW-SIGNR1 細胞からの LPS 刺激による IL-6 の産生は抑制されなかった (Fig. 4-3B)。また高濃度の Man3-PAA でも IL-6 産生への影響は認められなかった。さらに人工糖タンパク質である Man3-BSA も RAW-SIGNR1 からの IL-6 の産生に影響を与えなかった (Fig. 4-3B)。このことは、SIGNR1 を介した可溶性のリガンドの認識と取り込みは OML のような粒子の取り込みの場合とは異なり TLR4 を介した IL-6 の産生に影響を与えないことを示している。そこで、SIGNR1 のエンドサイトーシスの IL-6 産生への影響を検討することにした。すなわち、RAW-SIGNR1 細胞をハムスター抗 SIGNR1 抗体で処理した後に抗ハムスター IgG 抗体を用いて SIGNR1 分子をクロスリンクすることで、SIGNR1 の受容体依存型エンドサイトーシスを惹起した。その結果、抗体によるクロスリンクによって SIGNR1 は明瞭にエンドサイトーシスされた (Fig. 4-3C)。しかしながら、これらの処理によっても LPS 刺激によって誘導される IL-6 の産生は全く抑制を受けなかった (Fig. 4-3D)。以上のことから、SIGNR1 を介したエンドサイトーシスは IL-6 の産生には影響を与えないことが明らかになった。

#### 4-3-4 SIGNR1 を介した細胞接着による IL-6 の分泌抑制

SIGNR1 のような C 型レクチン受容体は抗原取り込み受容体としてだけでなく、細胞接着分子としても機能している。そのため、固相化した SIGNR1 リガンドへの接着による LPS 刺激誘導の IL-6 の産生への影響を検討した。その結果、RAW-SIGNR1 細胞と常在性腹腔内マクロファージによる Man3-DPPE と Man3-BSA を固相化プレートへの明らかな結合が認められた (Fig. 4-4A, C)。しかし、細胞の SIGNR1 を介した固相化プレートへの結合は LPS 刺激で誘導される IL-6 産生に全く影響を与えなかった (Fig. 4-4B, D)。

#### 4-4 考察

本章ではマンノトリオース (Man3) で被覆された 0.4  $\mu\text{m}$  以上の粒径をもつリポソームが SIGNR1 経由で取り込まれたときに、LPS の刺激によって惹起されるマウスマクロファージ RAW 細胞からの IL-6 の産生が顕著に抑制されることを示した。一方で 0.4  $\mu\text{m}$  未満の粒径をもつリポソームや Man3 を有する可溶性高分子は SIGNR1 を介して細胞内に取り込まれるが、これらの取り込みは IL-6 の産生には影響を与えなかった。同様に Man3 を固定化した固相への SIGNR1 を介した細胞接着も IL-6 の産生に影響を与えなかった。貪食 (ファゴサイトーシス) とは、貪食細胞が 500 nm 以上の粒径を持つ大きな粒子をアクチンに依存した機構で取り込むことであり<sup>7)</sup>、体内に侵入した細菌などの病原微生物を排除するための生体防御機構として重要な働きである。多くの CLR は病原体を捕食するファゴサイトーシス受容体、糖鎖を持つ自己抗原などの認識と取り込みに関与するエンドサイトーシス受容体および細胞間認識で機能するような細胞接着分子としての機能を持っている。しかし、これまで CLR のこれら機能と CLR が関与するような免疫応答誘導の関連性は明らかではなかった。本章で RAW-SIGNR1 細胞を用いて示した結果は、SIGNR1 のもつ機能、すなわちファゴサイトーシス受容体、エンドサイトーシス受容体あるいは接着分子としての機能の中で、ファゴサイ

トーチス受容体としての **SIGNR1** だけが、**TLR4** を介した炎症性サイトカインの産生を抑制することを明確に示している。

**DC-SIGN** と **SIGNR1** はそれぞれヒトとマウスの相同的な分子であることや、ダニや鞭虫の可溶性糖鎖あるいはマンソン住血吸虫の卵の抗原のような特定のリガンドの **DC-SIGN** による認識が **TLR** によって媒介される幅広い炎症性サイトカイン、すなわち **IL-6**, **IL-12** および **TNF- $\alpha$**  などの産生を抑制することが既に明らかになっていることから<sup>6), 8), 9)</sup>、**SIGNR1** を介した貪食が **TLR4** を介した炎症性サイトカインの産生を抑制すること自体は、驚くにあたらない。しかし **DC-SIGN** による前述のリガンドの認識は **IL-6** および **TNF- $\alpha$**  の両者の産生を抑制するのに対して、**SIGNR1** を介した **OML** の貪食は **IL-6** の産生のみを抑制し **TNF- $\alpha$**  の産生には全く影響を与えないことが本研究より明らかとなった。また、**DC-SIGN** の場合可溶性のリガンドであってもサイトカインの産生抑制が見られるが、**SIGNR1** の場合は **Man3-BSA** や **Man3-PAA** といった可溶性リガンドのエンドサイトーシスでは全く **IL-6** の産生抑制が認められない。従って、その抑制のメカニズムはおそらく大きく違っていると考えられる。すなわち **SIGNR1** を介した貪食は **DC-SIGN** によるリガンド認識とは異なるシグナル伝達系で特定の炎症性サイトカインの産生だけを抑制していると考えられた。筆者が本章で示した結果は、多彩な機能をもつ **CLR** がその機能に応じて特異的な免疫応答を形成できることを強く示唆しており、**CLR** が多様な病原体に対して免疫応答を誘導する上で重要な分子であることを改めて示したものである。今後は **SIGNR1** の機能に応じたシグナル伝達系について詳細に検討するとともに、**DC-SIGN** でも同様なことが起きるか否かを本章で用いた構造既知の様々な糖鎖プローブを用いてさらに検討する必要がある。

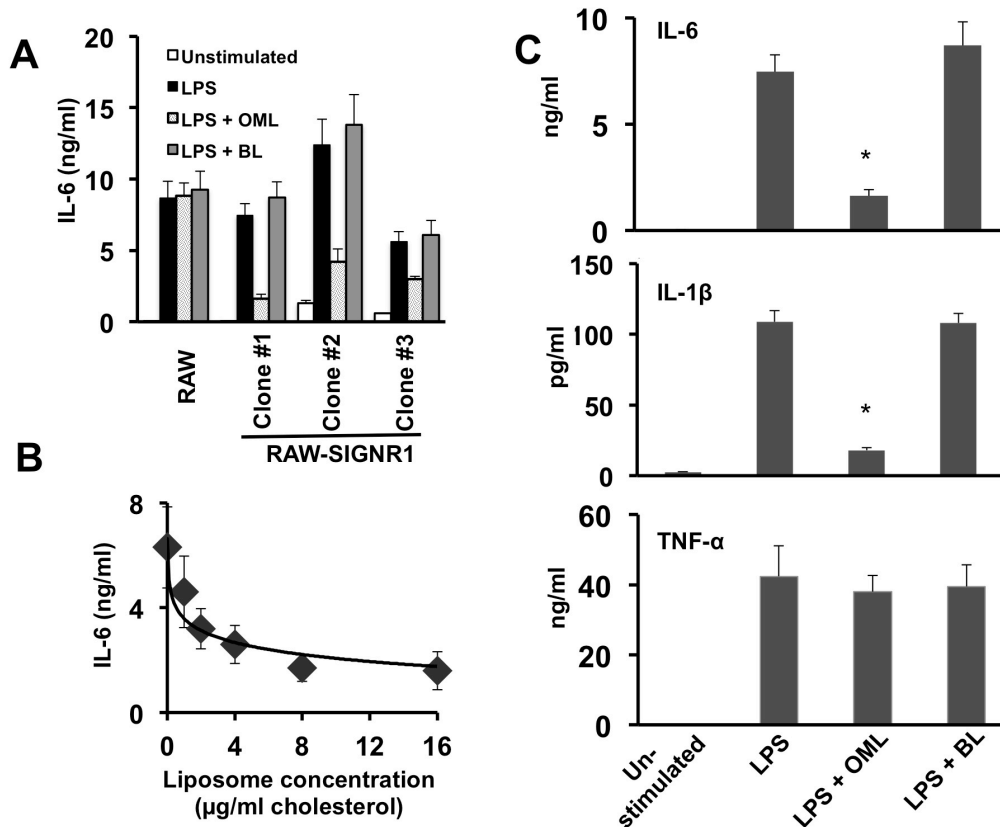
#### 4-5 参考文献

1. Takagi H, Furuya N, Kojima N. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250, 2007
2. Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, Yoshida H, Kimura Y, Kang YS et al. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol*, 16, 819-829, 2004
3. Kawauchi Y, Kuroda Y, Kojima N. Comparison of the carbohydrate preference of SIGNR1 as a phagocytic receptor with the preference as an adhesion molecule. *Int Immunopharmacol*, 19, 27-36, 2014
4. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Immunity* 26, 605–616, 2007
5. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9, 465-479, 2009
6. Hovius JW, de Jong MA, den Dunnen J, Litjens M, Fikrig E, van der Poll T et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog*, 4, e31, 2008
7. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol*, 17, 593–623, 1999
8. Klaver EJ, Kuijk LM, Laan LC, Kringel H, van Vliet SJ, Bouma G et al. *Trichuris suis*-induced modulation of human dendritic cell function is glycan-mediated. *Int J*



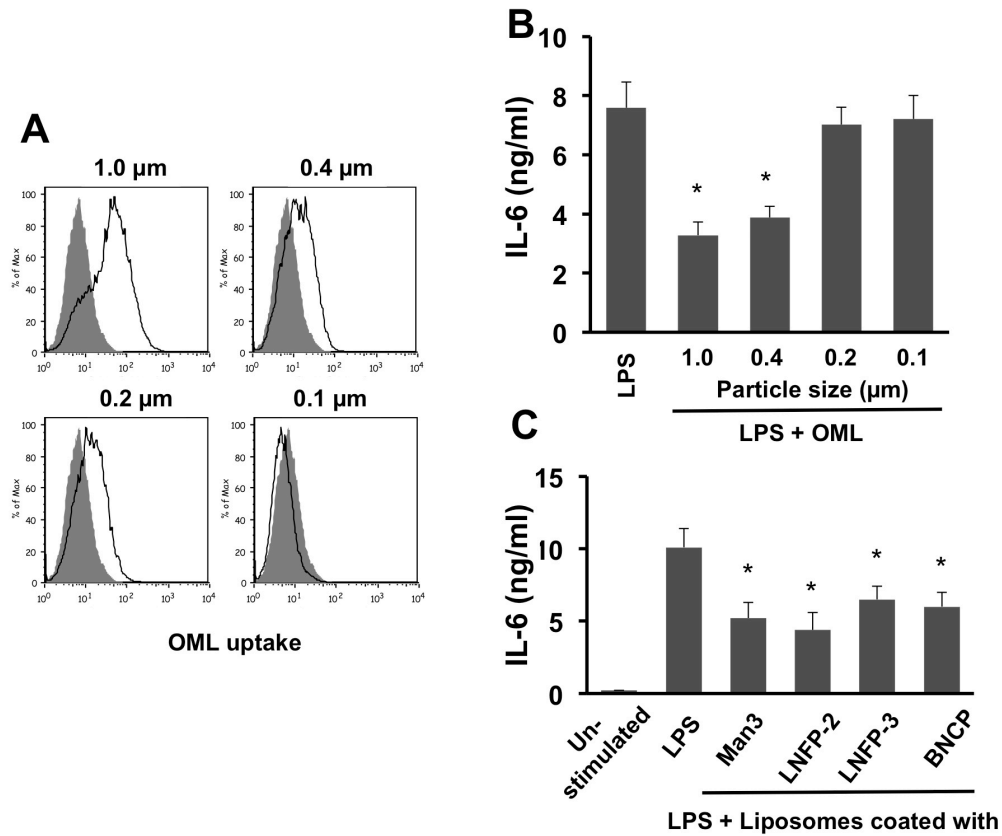
Parasitol, 43, 91-200, 2013

9. van Liempt E, van Vliet SJ, Engering A, García Vallejo JJ, Bank CM, Sanchez-Hernandez M et al. Schistosoma mansoni soluble egg antigens are internalized by human dendritic cells through multiple C-type lectins and suppress TLR-induced dendritic cell activation. Mol Immunol, 44, 2605-2615, 2007
10. Caparrós E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL et al. DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production. Blood, 107, 3950-3958, 2006
11. Nakahara T, Uchi H, Urabe K, Chen Q, Furue M, Moroi Y. Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. Int Immunol, 16, 1701-1709, 2004
12. Chu CL, Lowell CA. The Lyn tyrosine kinase differentially regulates dendritic cell generation and maturation. J Immunol, 175, 2880-2889, 2005

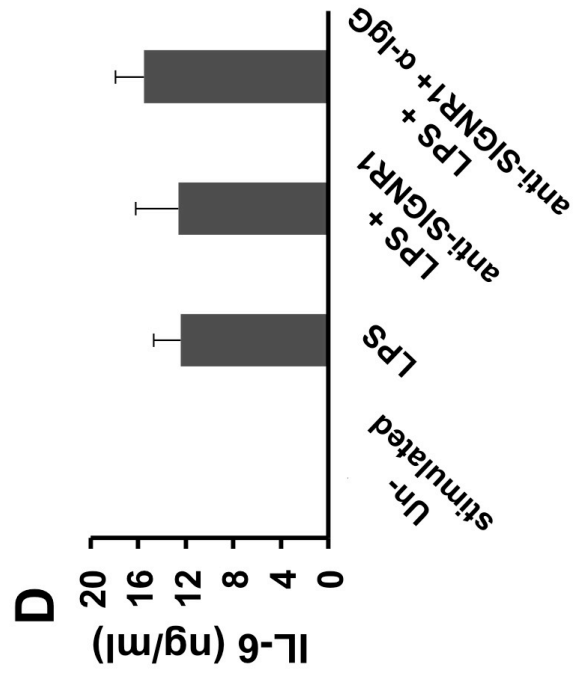
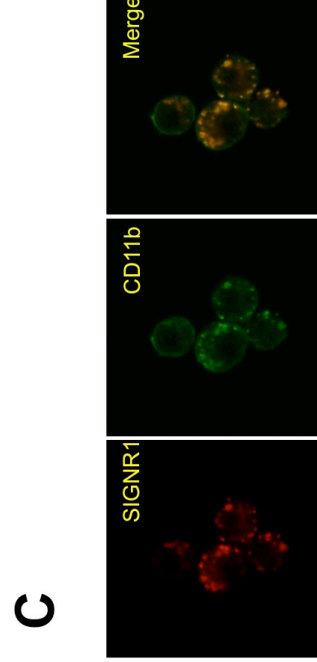
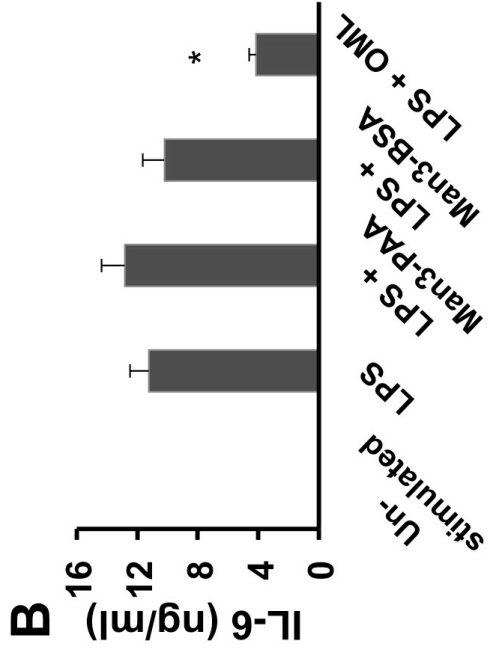
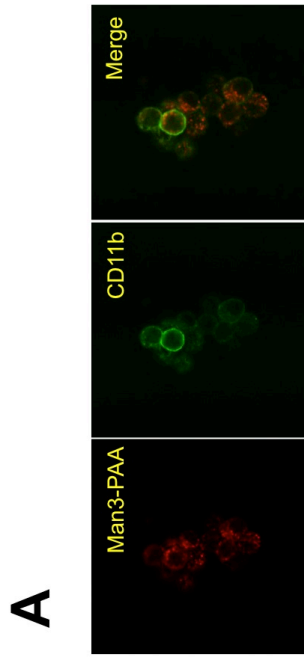


**Fig. 4-1. Suppression of LPS-induced cytokine production by OMLs**

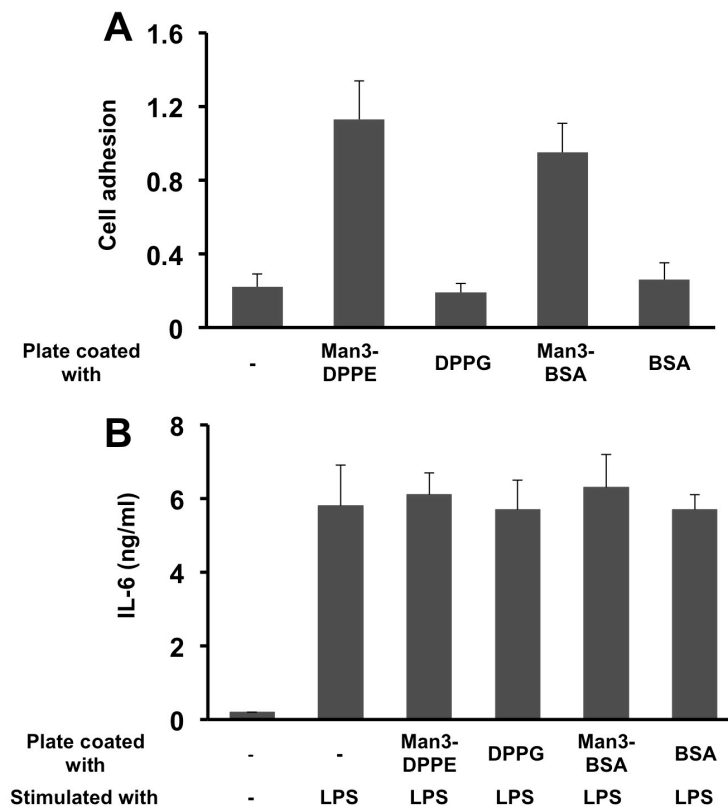
A. Three clones of RAW-SIGNR1 cells or parental RAW cells ( $1 \times 10^6$ /ml) were stimulated with LPS alone (100 ng/ml), LPS plus OMLs (20  $\mu$ g/ml of cholesterol), or LPS plus uncoated liposomes (BLs; 20  $\mu$ g/ml of cholesterol), cultured for 18 h, and secretion of IL-6 into the medium was determined. B. RAW-SIGNR1 cells (clone #1) were stimulated with LPS and different concentration of OMLs, as indicated. C. RAW-SIGNR1 cells (clone #1) were stimulated with LPS plus OMLs (20  $\mu$ g/ml of cholesterol), and then secretion of IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$  into the medium was determined. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 5 independent experiments. \*  $P < 0.05$  vs. LPS alone.



**Fig. 4-2. Effect of particle sizes and carbohydrates of the liposomes on LPS-induced IL-6 production.** A. RAW-SIGNR1 cells were incubated with FITC-BSA-containing OMLs with different particle sizes for 30 min, and uptake of OMLs into the cells was determined based on the fluorescent intensity of FITC-BSA by FACS. B. The cells were incubated with LPS and OMLs of different particle sizes, and then secretion of IL-6 into the medium was determined. C. The cells were incubated with LPS plus liposomes coated with either Man3-DPPE, LNFP-2-DPPE, LNFP-3-DPPE, or BNCP-DPPE. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 3 independent experiments.



**Fig. 4-3. Effect of SIGNR1-mediated endocytosis of soluble ligands on LPS-induced IL-6 production.** A. Endocytosis of Man3-PAA. Biotin-conjugated Man3-PAA were incubated with PE-conjugated streptavidin for 30 min, and RAW-SIGNR1 cells were cultured with the Man3-PAA-streptavidin complex for 60 min. After washing with PBS containing 1 mM EDTA, the cells were stained with FITC-conjugated CD11b on ice for 30 min to label the cell surfaces. The cells were then washed with PBS and fixed with 1% paraformaldehyde. B. RAW-SIGNR1 ( $1 \times 10^6$ /ml) cells were incubated with LPS alone, LPS plus Man3-PAA (20  $\mu$ g/ml), LPS plus Man3-BSA (50  $\mu$ g/ml), or LPS plus OMLs (20  $\mu$ g/ml of cholesterol) for 18 h, and secretion of IL-6 into the medium was determined. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 3 independent experiments. \*  $P < 0.02$  vs. LPS alone. C. Endocytosis of SIGNR1. The cells were treated with an anti-SIGNR1 antibody, 22D1, and PE-conjugated anti-hamster IgG antibody for 30 min on ice. After washing with PBS, the cells were incubated for 30 min at 37°C. Then cells were stained with FITC-conjugated CD11b on ice for 30 min, washed and fixed. D. The cells were treated with LPS, LPS plus anti-SIGNR1 antibody (10  $\mu$ g/ml), or LPS plus anti-SIGNR1 antibody and anti-hamster IgG antibody to crosslink SIGNR1 on the cell surface. Secretion of IL-6 from the cells was determined after 18 h. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 3 independent experiments. \*  $P < 0.02$  vs. LPS alone



**Fig. 4-4. Effect of SIGNR1-mediated cell adhesion to ligand-coated solid phases on LPS-induced IL-6 production.** A. The cells ( $1 \times 10^5$ /well) were plated on wells of 96-well plates coated with ligands (indicated on abscissa). The plates were centrifuged to allow the cells to adhere to the coated ligands and the cells were incubated for 1h at 37°C. Unbound cells were removed by centrifugation and the bound cells in each well were measured. B. The cells ( $1 \times 10^5$ /well) were plated on 96-well plates coated with ligands (indicated on the abscissa), and then the plates were centrifuged for 1 min to allow the cells to adhere to the coated ligands. LPS were added to each well and then cells were incubated for 18 h at 37°C. Secretion of IL-6 from the cells was determined after 18 h. Each bar shows the mean  $\pm$  SD for 4 independent experiments.

## 第5章 全体の総括と今後の展望

### 5-1 総括と展望

DC は最も強力な抗原提示細胞であり、免疫応答を誘導するための中心的な役割を担っている。そこで、次世代のワクチンは抗原を MHC クラス I および II に送達し CD4 と CD8 陽性 T 細胞を同時に活性化するために DC をターゲットとするものでなければならない。DC に特異的な受容体とそのリガンドとの間の相互作用を利用することは DC と送達したい抗原との間の相互作用を増強できるので、特異的な抗原送達のためには好ましい。DC 上に発現している CLR は病原体を認識し細胞内に取り込み、MHC 分子上に病原体由来の抗原を提示させるために重要な受容体であり、またいくつかの CLR はそのシグナル伝達系を介して免疫応答をコントロールする能力を有しているので CLR がワクチンのためのターゲット分子として有用である。Steinmann らは CLR のひとつである Dec205 に対する抗体を結合させた抗原を用いて DC への特異的な抗原送達を達成し、抗原特異的な細胞性免疫応答を誘導することに成功した。CLR は糖鎖を認識する分子であり、糖鎖が抗体に比べ小さく、安定で、化学的に合成することができる。従って、ターゲティングシグナルとして CLR に対する特異抗体の代わりに CLR が選択的に認識する糖鎖を用いることができれば、薬学的には抗体を用いることに比べてはるかに有利となる。この問題を解決するためには、標的となる CLR の糖鎖認識特性を理解する必要がある。CLR の糖鎖認識特異性は一般的に組み替え可溶性タンパク質を用いて評価されているが、評価系や評価方法の違いによって特異性が一致しない場合がみられる。CLR は膜タンパク質であり、細胞膜上で貪食受容体あるいは細胞接着分子として機能している。また DC-SIGN などの CLR は細胞膜上でオリゴマーを形成していることも知られている。従って、CLR の糖鎖認識選択性・特異性は細胞膜上に存在する様式で機能に基づいた糖鎖認識特異性・選択性を系統的に評価する必要がある。

当研究室では、オリゴ糖とリン脂質から合成される人工糖脂質の応用、特に細胞への薬剤や抗原の特異的な送達方法への応用について研究を続けてきた。ところで、人工糖脂質は次のような特性を有している。

- ① 構造が明確な多様なオリゴ糖から多様な人工糖脂質のライブラリーが比較的簡便に構築できる。
- ② リポソームの脂質 2 重層に容易に封埋され、また疎水的な固相上にも容易に固定化でき、糖鎖の密度を自由に調節できる。このことから、糖鎖の種類や密度が異なる多様な糖鎖被覆リポソームや糖鎖固定化固相を容易に構築できる。
- ③ 人工糖脂質で被覆されたリポソームの粒径を自由に調節できることから、多様な粒子径のリポソームを容易に調製できる
- ④ 人工糖脂質被覆リポソームの脂質 2 重層や内部に蛍光色素や抗原などを導入することで簡単に標識ができる。

このような人工糖脂質の特性から考えて、著者は、糖鎖構造が明らかな人工糖脂質で被覆された一群のリポソームおよびそれらを固定化した固相は、細胞表面に発現している CLR の代表的な機能、すなわち貪食機能と細胞接着機能に基づいた糖鎖選択性を解析する上で有用なツールとなると予想した。そこで著者は、人工糖脂質の CLR 機能解析への有用性を確かめるため、様々な構造既知のオリゴ糖から 14 種類の異なる糖鎖構造をもつ人工糖脂質を合成・精製し、この人工糖脂質ライブラリーを用いて、CLR 特に SIGNR1 の機能に基づいた糖鎖選択性の解析を試みた。

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。一般に、CLR は病原体の糖鎖と自己の糖鎖を区別することはなく、貪食と細胞接着という機能の違いによっても糖鎖を区別することはないと信じられていたが、筆者の研究結果は、CLR が機能によってその糖鎖選択性を変化させている可能性を初めて示したもののといえる。

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。例えば、Galustian らが可溶性組換え SIGNR1 を用いて示した糖鎖選択性があるいは本研究において著者が明らかにした細胞接着分子としての糖鎖選択性を基盤とすれば、マンノースを含む糖鎖よりルイス血液型である Le<sup>x</sup> 糖鎖のようにフコースを含む糖鎖を選択すべきであるし、マンノースを含む糖鎖の中ではなるべくマンノースを多く含む Man5-DPPE を選択する必要がある。著者らのグループでは Man3-DPPE を被覆した OML を用いて、抗原を抗原提示細胞へ選択的に送達することで、様々な疾患に対して効果的な免疫応答を誘導することができることをマウスモデルで示しており、またマウス DC における OML の受容体として SIGNR1 を同定した。外部から遺伝子を導入して強制的に SIGNR1 を発現させた細胞を用いているが、本章で示したように、様々な人工糖脂質で被覆したリポソームの中で、DPPC, cholesterol, Man3-DPPE がモル比 10:10:1 で構成された OML が Man5-DPPE や Le<sup>x</sup>- (LNFP3-)DPPE で被覆されたリポソームよりも効率的に SIGNR1 を介して貪食されたことから、当研究室が新規ワクチンの抗原送達媒体として OML を用いてきた妥当性が示されたといえる。

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。CLR の機能が免疫応答にどのように影響を及ぼすかについてはほとんど知見がなかったことから、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。

以上に述べたような一連の研究を通して、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。SIGNR1 は腹腔マクロファージが OML を選択的に取り込む際の主要な受容体として機能していることが示されており<sup>1)</sup>、また、OML の選択的な取り込みによって OML に封入された抗原特異的な細胞性免疫が誘導されることも示されている<sup>2)</sup>。従って筆者は本論文において、マウスモデルで OML を抗原送達に用いてきた一連の研究の妥当性を示すことができたと考える。冒頭に述べた通り、SIGNR1 のマウス DC での発現については未だ明確ではない。本論文では示さなかったが、筆者は DC における SIGNR1 の発現についても検討を試みている。すなわちマウス腹腔内貪食細胞の中の亜集団 (CD11b<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> 貪食細胞) が未熟な DC の表現系をもっていることを細胞表面の分子マーカーの発現を基に見だし、マウスの系統に関わらず、その亜集団に含まれる細胞には SIGNR1 が発現していることを明らかにした<sup>3)</sup>。また著者は、この腹腔内未熟 DC 様細胞が試験管内で SIGNR1 を介して OML を取り込むことを示し、その SIGNR1 を介した OML

の取り込みに応答して貪食細胞での CD11c, CD86, および MHC class II の発現が増加することも示している<sup>3)</sup>。このことは、SIGNR1 を介した人工糖脂質被覆リポソームのような糖鎖修飾粒子の貪食が、これらの細胞の成熟シグナルを惹起することを示している。最近、腸管の DC やリンパ節髄質 DC で SIGNR1 が発現していることが示されている<sup>4,5)</sup>。また SIGNR1 はマウスでのヒトホモログと考えられているヒト DC-SIGN は、生体内の広い範囲で DC に発現しており、免疫誘導において重要な役割を担っていることが知られている。従って、ヒト DC-SIGN と同様に SIGNR1 もまた生体内の幅広い DC の亜集団に発現しており、様々な免疫応答誘導に関与している可能性が考えられる。

OML はマウスだけでなくヒトにおいても非常に強く細胞性免疫を誘導できることが最近の研究で判明している<sup>6,7)</sup>。このヒトにおける細胞性免疫誘導には SIGNR1 の機能的なホモログであるヒト DC-SIGN が関与している可能性が考えられる。従って Man3-DPPE で被覆した OML の作用機序を理解する上では、ヒト DC-SIGN についても本研究で示されたような方法論でその貪食機能に関する糖鎖選択性を明らかにする必要がある。特に DC-SIGN に関しては可溶性タンパク質による糖鎖選択性から Le<sup>x</sup> や Le<sup>y</sup> が選択されているが<sup>8)</sup>、SIGNR1 で示されたように、Le<sup>x</sup> や Le<sup>y</sup> よりも Man3 あるいは Le<sup>a</sup> が適している可能性は否定できない。

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<sup>9-11)</sup>。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、OML 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<sup>12,13)</sup>。このことは、SIGNR1 を

含めて CLR のリポソームの認識・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。実際に細胞表面の SIGNR1 を抗体でクロスリンクすることで、TNF- $\alpha$  の産生を促進するようなシグナルが惹起されることを、著者らは明らかにしている<sup>14)</sup>。しかし未だに、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、著者が本論文で示した 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。今後人工糖脂質を用いて、サイトカインの産生などを指標として、CLR の機能に応じた糖鎖認識に対して細胞がどのように応答するか、また、その応答が惹起されるときにどのようなシグナル分子が関与するかなどの解析を進めてゆく必要がある。

## 5-2 参考文献

1. Takagi H, Numazaki M, Kajiwara T, Abe Y, Ishii M, Kato C, Kojima N. Cooperation of specific ICAM-3 grabbing nonintegrin related 1 (SIGNR1) and complement receptor type 3 (CR3) in uptake of oligomannose-coated liposomes by macrophages. *Glycobiology*, 19, 258-266, 2009
2. Kojima N, Ishii M, Kawauchi Y, Takagi H. Oligomannose-coated liposome as a novel adjuvant for the induction of cellular immune responses to control disease status. *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 562924, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/562924>, 2013
3. Kawauchi Y, Igarashi M, Kojima N. C-type lectin receptor SIGNR1 expressed on

- peritoneal phagocytic cells with an immature dendritic cell-like phenotype is involved in uptake of oligomannose-coated liposomes and subsequent cell maturation. *Cell Immunol*, 287,121-128, 2014
4. Zhou Y, Kawasaki H, Hsu SC, Lee RT, Yao X, Plunkett B, Fu J, Yang K, Lee YC, Huang SK, Oral tolerance to food-induced systemic anaphylaxis mediated by the C-type lectin SIGNR1. *Nat Med*, 16, 1128-1133, 2010
  5. Gonzalez SF, Lukacs-Kornek V, Kuligowski MP, Pitcher LA, Degen SE, Kim YA, Cloninger MJ, Martinez-Pomares L, Gordon S, Turley SJ, Carroll MC. Capture of influenza by medullary dendritic cells via SIGN-R1 is essential for humoral immunity in draining lymph nodes. *Nat Immunol*, 11, 427-434, 2010
  6. Kozako T, Hirata S, Shimizu Y, Satoh Y, Yoshimitsu M, White Y, Lemonnier F, Shimeno H, Soeda S, Arima N. Oligomannose-coated liposomes efficiently induce human T-cell leukemia virus-1-specific cytotoxic T lymphocytes without adjuvant. *FEBS J*, 278, 1358-1366, 2011
  7. Mizuuchi M, Hirohashi Y, Torigoe T, Kuroda T, Yasuda K, Shimizu Y, Saito T, Sato N. Novel oligomannose liposome-DNA complex DNA vaccination efficiently evokes anti-HPV E6 and E7 CTL responses. *Exp Mol Pathol*, 92, 185-19, 2012
  8. Unger WW, van Beelen AJ, Bruijns SC, Joshi M, Fehres CM, van Bloois L, Verstege MI, Ambrosini M, Kalay H, Nazmi K, Bolscher JG, Hooijberg E, de Gruijl TD, Storm G, van Kooyk Y. Glycan-modified liposomes boost CD4+ and CD8+ T-cell responses by targeting DC-SIGN on dendritic cells. *J Control Release*, 160, 88-95, 2012
  9. White KL, Rades T, Furneaux RH, Tyler PC, Hook S. Mannosylated liposomes as

- antigen delivery vehicles for targeting to dendritic cells. *J Pharm Pharmacol*, 58, 729-737, 2006
10. Carrillo-Conde B, Song EH, Chavez-Santoscoy A, Phanse Y, Ramer-Tait AE, Pohl NL, Wannemuehler MJ, Bellaire BH, Narasimhan B. Mannose-functionalized "pathogen-like" polyanhydride nanoparticles target C-type lectin receptors on dendritic cells. *Mol Pharm*, 8, 1877-1886, 2011
  11. Espuelas S, Thumann C, Heurtault B, Schuber F, Frisch B. Influence of ligand valency on the targeting of immature human dendritic cells by mannosylated liposomes. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 2385-2393, 2008
  12. Takagi H, Furuya N, Kojima N. Preferential production of IL-12 by peritoneal macrophages activated by liposomes prepared from neoglycolipids containing oligomannose residues. *Cytokine*, 40, 241-250, 2007
  13. Ikehara Y, Shiuchi N, Kabata-Ikehara S, Nakanishi H, Yokoyama N, Takagi H, Nagata T, Koide Y, Kuzushima K, Takahashi T, Tsujimura K, Kojima N. Effective induction of anti-tumor immune responses with oligomannose-coated liposome targeting to intraperitoneal macrophage. *Cancer Lett*, 260, 137-145, 2008
  14. Numazaki M, Kato C, Kawauchi Y, Kajiwara T, Ishii M, Kojima N. Cross-linking of SIGNR1 activates JNK and induces TNF- $\alpha$  production in RAW264.7 cells that express SIGNR1. *Biochem Biophys Res Commun*, 386, 202-206, 2009

## 謝辞

本研究の機会を与えて頂き、終始心温まるご指導、ご鞭撻をいただきました東海大学大学院総合理工学研究科総合理工学専攻 小島直也教授に厚く御礼申し上げます。

本論文執筆にあたり数々のご助言、ご鞭撻頂きました東海大学大学院工学研究科工業化学専攻 稲津敏行教授、東海大学工学部生命化学科 松下操教授、水谷隆太教授、笹川昇准教授、糖鎖科学研究所 蟹江治教授に深く感謝申し上げます。

また、研究遂行および論文作成と多岐にわたり、多大なご指導、ご鞭撻をいただきました東海大学工学部生命化学科 黒田泰弘講師に深く御礼申し上げます。

本研究を行うに当たり、多大なご支援、ご協力を賜りました梶原敏充博士、高木秀明博士、石井麻莉子さん、沼崎麻希さん、加藤千晶さんに深く感謝いたします。

最後に、本研究を遂行するに当たり、多大なご支援、ご協力を賜りました東海大学工学部生命化学科 小島研究室所属の大学院生ならびに卒業研究生の皆様、糖鎖科学研究所の皆様に心から深く感謝いたします。