

## 研究課題別事後評価結果

研究課題名：病態における膜マイクロドメイン糖鎖機能の解明

1. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点):

研究代表者

本家 孝一 (高知大学 副学長／同大学教育研究部医療学系 教授)

主たる共同研究者

宇高 恵子 (高知大学教育研究部医療学系 教授)

藤本 純一郎 (国立成育医療センター研究所 副所長)

今井 章介 (高知大学医学部微生物学講座 教授) (～平成19年 3 月)

2. 研究実施概要

糖脂質は、生体膜上でコレステロールや膜タンパク質と会合して、膜マイクロドメイン(脂質ラフト)とよばれる超分子アッセムブリーを形成し、膜輸送や細胞接着やシグナル伝達のためのプラットフォームを提供する。本研究課題は、脂質ラフトに対する抗体の作製や膜マイクロドメイン指向性プローブによる膜マイクロドメインの可視化を目指すとともに、癌やウイルス感染の免疫における膜マイクロドメインの機能に関わる糖鎖の役割を解明することを目的とした。研究実施体制は、糖鎖機能解析法グループ(リーダー:本家孝一、高知大学)、免疫制御グループ(リーダー:宇高恵子、高知大学)、抗体産生グループ(リーダー:藤本純一郎、国立成育医療センター研究所)の3グループで行ない、各研究グループが互いに連携しながら独自の研究を推進した。

**本家グループ**は、藤本グループが開発した脂質ラフト免疫法により、マウス精子形成細胞膜マイクロドメインに対する単クローン抗体を作製し、得られた抗体が認識するタンパク質抗原を5種類同定した。このうちの1種類は新規タンパク質であった。また、本家グループの久下は、脳の雄化に関与する分子としてマスキュリン遺伝子をクローニングしたが、このマスキュリン遺伝子をラット褐色細胞腫由来 PC12 細胞に強制発現させると神経様突起伸長を促進することを見出した。このように突起伸長した PC12 細胞から調製した膜マイクロドメインを免疫することにより、突起先端の膜マイクロドメインに局在する脂質を認識する単クローン抗体を得た。このように、ラフト免疫法では、精子形成細胞上で硫酸化糖脂質と相互作用する分子に対する抗体を作るという当初の思惑は外れたが、新規分子に対する興味深い抗体が得られた。一方、同グループで発見した膜マイクロドメイン指向性プローブによる Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS) 反応を用いて、生細胞の細胞膜上で会合する分子群を同定する方法を開発した。EMARS 法の応用例として、同一の抗原に対する2種類の単クローン抗体を作用させたときに集積してくる分子群が異なることを見出した。EMARS 法は、標識試薬としてアリアルアジドビオチンを用いた場合、外来性の HRP のみならず内在性酵素でも活性化されるという欠点があったが、この欠点の解消に成功した。

**宇高グループ**は、未熟胸腺細胞の CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CTL) あるいは CD4 陽性ヘルパー T 細胞 (Th) への分化決定の際、T 細胞レセプター (TCR) が胸腺上皮細胞上に発現する MHC 分子のクラスを見分ける方法として、MHC class II 分子が膜マイクロドメイン会合性に提示されることが Th 細胞への分化決定に必要であることを明らかにした。また、悪性腫瘍や難治性ウイルス感染症に対して特異的 CTL を誘導するための、HLA class I 分子結合性ペプチドを免疫源としたペプチド免疫療法に関して、膜マイクロドメインに局在する糖脂質 GD1a に結合する百日咳全菌体ワクチンを免疫賦活剤として添加することにより、Th1 優勢の免疫反応の場を作ることで、腫瘍制御活性を高めることができた。この改良法について、初期臨床第 I/II 相試験を行った。

**藤本グループ**は、独自に考案したラフト免疫法の特性を解析し、単一の糖脂質に対する抗体が出来やすいこと、自己抗原に対しても免疫応答が誘導されること、クラススイッチを伴う典型的な免疫反応であることを明らかにした。本方法により抗 G タンパク  $\beta 1$ 、2鎖単クローン抗体 Raft.1 及び抗 sialylGb5Cer 単クローン抗体

**Raft.2**を得た。**G** タンパク  $\beta$  1, 2鎖は一次構造が種を超えてよく保存されたタンパクなので、これまで、単クローン抗体の産生は困難とされていた。**Raft.2** は **Laminin Binding Protein** にも反応し、**SSEA-4** エピトープがタンパクにも担われていることを示唆するものである。さらに、アジュヴァントとの混合が不要で、同系抗原に対しても免疫応答が誘導可能というラフト免疫法の利点を生かして本方法の抗腫瘍免疫療法への応用をマウスで検討し、明らかな抗腫瘍効果を確認した。抗原非特異的抗腫瘍効果を有するヒト腎癌由来細胞株 **ACHN** のラフト免疫は、被免疫マウスの自然免疫を強化し、腹腔マクロファージを活性化し、腹腔細胞の腫瘍細胞に対する細胞傷害活性を惹起した。抗腫瘍免疫療法の免疫方法に応用可能と期待される。

### 3. 事後評価結果

#### 4-1. 研究の達成状況及び得られた研究成果(論文・口頭発表等の外部発表、特許の取得状況等を含む)

紫外線で活性化されるアリアルアジド基が西洋わさびペルオキシダーゼ (**HRP**) によっても活性化されナイトレンラジカルを生じることを発見し、この原理を利用して生細胞の細胞膜上の任意分子の近傍にある分子を同定する大変独創的な **EMARS** 法を開発した。標識試薬としてアリアルアジド-ビオチンを用いた場合、外来性の **HRP** のみならず、内在性酵素でも活性化されるという欠点があったが、新規合成したアリアルアジド-フロセインを使用すると内在性酵素による非特異的標識の問題が解消し、網羅的分析が可能となった。

ラフト免疫法では、精子形成細胞上で硫酸化糖脂質と相互作用する分子に対する抗体を作るという当初の思惑は外れたが、マスキュリンを強制発現させた細胞のマイクロドメインを抗原として、神経突起先端の膜マイクロドメインに局在する脂質を認識する興味ある単クローン抗体を得た。

未熟胸腺細胞は、胸腺上皮細胞が発現する **MHC** 分子に対する反応性に応じて、**TCR** がクラス **I** 分子に反応するものであれば **CD8** 陽性細胞傷害性 **T** 細胞に、クラス **II** 分子に反応するものであれば **CD4** 陽性ヘルパー **T** 細胞へ分化する。しかし、クラス **II** 分子を膜マイクロドメインに会合しない状態にすると、細胞傷害性 **T** 細胞に分化することを明らかにした。

腎癌由来細胞 **ACHN** のラフト免疫は、被免疫マウスの自然免疫を強化し、腹腔マクロファージを活性化し、腹腔細胞に対する細胞傷害活性を惹起することを見出した。

論文19報は、適切なレベルといえる。**EMARS** 法の特許は国内、海外に各 1 件出願しており、今後本方法の利用が進めば、特許の価値が高くなる。

#### 4-2. 研究成果の科学技術や社会へのインパクト、戦略目標への貢献

生体膜上での相互作用可能な位置に局在する分子の同定はライフサイエンス全般において重要な課題である。相互分子をラベルする方法はいくつかあるが、**EMARS** 法が今後使われるかどうかは、その簡便さと特異性にかかっている。**EMARS** 法により、細胞膜分子の相互作用が網羅的・ハイスループットに解析できるようになれば、システム的な創薬シーズへの展開となる可能性がある。

ラフトを免疫源とすることで、腫瘍免疫が誘導されることが示されている。どのような免疫反応を引き起こすか、不明な点が多いが、今後の臨床応用が可能な課題でありうる。

#### 4-3. 総合的評価

研究代表者はリーダーシップを発揮し、良くまとまった研究をしたと思われる。大変独創的な **EMARS** 法を開発しており、この成果は高く評価できる。

今後は **EMARS** 法がより優れた方法に発展することを期待する。

以上