福井大学リポジトリ
UNIVERSITY OF FUKUI
REPOSITORY

Preferential expression of sialyl 6′-sulfo N-acetyllactosamine-capped O-glycans on high endothelial venules in human peripheral lymph nodes

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2020-09-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 堤内, 真実 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10098/00028495

別紙様式第４号（第３条，第５条関係）

学 位 論 文 の 要 旨

※ 整理番号		ふりがな 氏　　名	つつみうち　まなみ 堤内　真実
学位論文題目	Preferential expression of sialyl 6′-sulfo N-acetyllactosamine-capped O-glycans on high endothelial venules in human peripheral lymph nodes （ヒト末梢リンパ節の高内皮細静脈におけるシアリル６’硫酸化 N アセチルラクトサミンで覆われた O 結合型糖鎖の選択的発現）		

【研究の目的】

リンパ球をはじめとする免疫細胞は，血管とリンパ管の 2 つの脈管系を交通路として生体内を活発に移動しており，機能的に統合された免疫系を構築している。リンパ球はリンパ節やパイエル板などの二次リンパ組織に血行性に移住し（ホーミング）、輸出リンパ管を経て再び血液系に戻るという循環を繰り返している。ホーミングの際にリンパ球は高内皮細静脈（HEV）と呼ばれる特殊な静脈に特異的に接着し、段階を経て血管壁を通過するが、その第一段階であるローリングは、リンパ球上に発現した糖鎖結合タンパク質である L セレクチンと、HEV 上に発現した硫酸化糖鎖との反応によってはじまる。L セレクチンのリガンドは硫酸化・フコシル化・シアリル化された *O* 結合型糖鎖であり，シアリルルイス X を構成する *N*アセチルグルコサミンの 6 位の炭素が硫酸化された 6 硫酸化シアリルルイス X がその主体をなす。一方で、シアリルルイス X を構成するガラクトースの 6 位の炭素が硫酸化された 6’硫酸化シアリルルイス X の存在と機能については解明されていないため、我々はその機能解析を行うこととした。

【方法】

ガラクトースの 6 位の炭素を硫酸化する酵素であるケラタン硫酸ガラクトース 6 硫酸転移酵素（KSGal6ST）のノックアウトマウスを、同酵素の遺伝子を導入した HEK293T 細胞で免疫した後，リンパ節を採取し，型通りハイブリドーマを作製した。複数の陽性クローンの中から，グリカンアレイを用いて，*N* アセチルグルコサミンと 6 硫酸化ガラクトースが結合した 6’硫酸化 *N* アセチルラクトサミンを最小認識単位とする 297-11A 単クローン抗体を選択した。

福井大学医学部附属病院の手術検体から，腋窩リンパ節 74 個、腸間膜リンパ節 142 個を用いて，CD34、MECA-79、297-11A、HECA-452、MAdCAM-1 抗体を用いた免疫染色を行い、各抗体の陽性血管数をカウントして CD34 陽性血管に対する比率を求めた。また、6 硫酸化シアリルルイス X を安定発現している CHO 細胞に KSGal6ST と、CD34 または MAdCAM-1 の DNA を導入し、297-11A 抗体を用いて Western blot 解析を行った。

次に、膀胱癌、結腸癌、胃癌、慢性膀胱炎の手術検体についても同様に免疫染色を行った。

【結果】

全血管に対して、HEV を特異的に染色する MECA-79 抗体陽性血管の比率は、腋窩リンパ節で 56.9%、腸間膜リンパ節では 36.8%と有意差を認め（$p<0.001$）、297-11A 抗体陽性血管の陽性率も、それぞれ 6.9%と 0.9%と、腋窩リンパ節で有意に高くなっていた（$p<0.001$）。

また、腸間膜リンパ節を用いて 297-11A および CD34 または MAdCAM-1 抗体の二重染色を行ったところ、HEV 上の 297-11A のシグナルは MAdCAM-1 よりも CD34 と共局在していた。さらに、上記の Western blot 解析では、CD34 の方が MAdCAM-1 よりも 297-11A に反応する糖鎖で修飾されていた。

膀胱癌、結腸癌、胃癌の腫瘍部位と慢性膀胱炎の間質における HEV 様血管は、297-11A 抗体陽性糖鎖を発現していた。

【考察】

今回我々が開発したモノクローナル抗体 297-11A により、6'硫酸化 *N* アセチルラクトサミンを発現した HEV は、腸間膜リンパ節よりも末梢リンパ節に多く存在し、パイエル板には存在しないことがわかった。これまでに、MAdCAM-1 が腸間膜リンパ節、パイエル板の HEV に多く発現し、末梢リンパ節の HEV には発現しないことがわかっているが、今回の研究で、MAdCAM-1 は CD34 よりも 297-11A 陽性硫酸化糖鎖の修飾を受けにくいことが明らかとなり、297-11A 抗体の足場タンパク質の分布の違いが、各リンパ節における 6'硫酸化 *N* アセチルラクトサミンの発現の差の一因となっていると考えられた。

慢性炎症条件下では HEV 様血管が血中のリンパ球を炎症部位に動員する働きに関与しているが、リンパ球上の L セレクチンによる HEV の認識に重要な *N* アセチルグルコサミンのフコース化は、KSGal6ST を介したガラクトースの 6 硫酸化によって阻害されるため、KSGal6ST がリンパ球動員の制御に関与している可能性が考えられた。さらに、癌間質に誘導される HEV 様血管においても 297-11A 陽性硫酸化糖鎖が発現していることから、これらの HEV 様血管は、腫瘍浸潤リンパ球の動員を制御している可能性が考えられた。

【結論】

本研究は、新たに開発したモノクローナル抗体によって、6'硫酸化 *N* アセチルラクトサミンがヒト末梢リンパ節の HEV に選択的に発現していることを示した初めての報告である。またこの硫酸化糖鎖が種々の癌における腫瘍免疫にも関与している可能性が示唆された。

備考　1　※印の欄は、記入しないこと。

2　学位論文の要旨は、和文により研究の目的、方法、結果、考察、結論等の順に記載し、2,000 字程度にまとめタイプ等で印字すること。

3　図表は、挿入しないこと。