

総説

糖鎖を見分ける自然免疫機構 ・マンナン結合タンパク質の多彩な役割・

上村 和秀

中部大学 生命健康科学部

要 旨

マンナン結合タンパク質(MBP)は主に血清および肝臓に存在する動物レクチンの1つでマンノース、フコース、N-アセチルグルコサミンを末端に有する糖鎖と特異的に結合する。MBPが結合する糖鎖はある種の真菌、細菌、ウイルスなど幅広く存在しており、MBPはこれらの表層糖鎖と特異的に結合し、補体依存的に殺菌することで、自然免疫における異物認識分子として機能する。MBPが腫瘍免疫に関与する可能性を調べるため、種々の細胞株の細胞表面におけるMBPの糖鎖リガンドの発現を検討した。その結果、ヒト結腸がん由来SW1116細胞はMBPに認識される糖鎖リガンドを有することが判明した。SW1116細胞を移植した担癌マウスに対してMBP遺伝子を組み込んだウイルスベクターで治療を施したところ、著しい腫瘍の退縮が認められ、MBPは抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった。その機序として補体に依存しない細胞性細胞障害機構の存在を新規に見出した。また、RT-PCRおよび免疫組織化学により小腸にMBPが強く発現することを新たに見出し、MBPが粘膜免疫にも関与することを示唆した。最後に、血管炎および糸球体腎炎の病態生理への関与を示唆する知見と今後の研究の方向について紹介する。

1. はじめに

私たちの身体は常に細菌、真菌、ウイルスなどの様々な異物の侵入の危険にさらされている。これらの異物は適当な温度と栄養があれば極めて少量からでも増殖し、それを放置すれば生命をも脅かすことになるが、私たちの身体はそのような異物から身を守る仕組みを備えている。このような生体防御の仕組みは、免疫系あるいは単に免疫と呼ばれている。免疫は大きく2つに分けることができる。一つは自然免疫(先天性免疫)、もう一つは獲得免疫(後天性免疫)である。そのうち、獲得免疫の方が私たちにはより馴染みのあるものかもしれない。例えば、一度はしかにかかると二度はかからないという現象がある。およそ200年前にジェンナーはこの知識を発展させて種痘という技術を開発し、その後の天然痘の撲滅につながったことはよく知られている。獲得免疫で重要な役割を果たすものとして抗体があるが、その抗体の設計図となる抗体遺伝子は、実際に侵入してきた病原体に合わせて最適なものに作り換えられる。両親から引き継いだ遺

伝子は基本的には一生変わることはないので、獲得免疫は生体防御のために特に高度に発展してきたシステムと言うことができる。一方で、自然免疫(先天性免疫)はまだあまり馴染みのない言葉かもしれない。こちらは、身体を構成する多くのタンパク質と同様に、両親から引き継いだ遺伝子そのまま設計図として使われ、「自然に」または「生まれながらにして」備わっている生体防御の仕組みである。獲得免疫が脊椎動物以後に備わった仕組みであるのに対し、自然免疫の方はより広く動物界に存在する、いわば原始的な仕組みと言える。ところが、「自然に」備わっているがゆえに、異物の侵入に際しては真っ先に対応し、生体防御の最前線を担うという意味ではとても重要な仕組みである。最近の研究では、獲得免疫が始動するにはまず自然免疫の働きが必要であることもわかってきている¹⁾。

2. 自然免疫の成り立ち

自然免疫を担う生体成分には細胞性成分と体液

性成分の二つがある。前者は、マクロファージ、好中球といった異物を飲み込んで破壊する食細胞をはじめとし、樹状細胞、好酸球、抗塩基球、NK 細胞などがある。最近、TLR (toll-like 受容体) とよばれる、マクロファージや樹状細胞などの細胞表面に存在する異物認識受容体が、獲得免疫の始動に重要であることが解明されてきている。また、マクロファージや樹状細胞、NK 細胞には特定の糖鎖と結合する受容体 (レクチン) があり、糖鎖を介した異物認識に関わっている。一方で、体液性成分として重要なものに、補体 (complement) がある。補体は血液中に含まれるタンパク質の一群で、異物と出会うと順々に反応を起こし、最終的には異物表面に穴をあける作用がある。表面に穴が空いた異物は、内容物が漏出して、もはや生存できなくなる。また、補体の一連のカスケード反応の途中でアナフィラトキシンという物質が生じ、この物質は食細胞を引き寄せるなど、強い生理活性もつことが知られている。補体系は最初の引き金となる反応の違いによって3種類に分けられるが、このうち、古典経路は、異物の抗原に結合した抗体に補体第1成分 C1q が結合することから始まる反応経路である。2番目の第2経路は、補体第3成分 C3 が異物の表面に直接に結合することから始まる。3番目のレクチン経路は、最後に発見された経路で、異物の細胞表面に特有の糖鎖構造にマンナン結合タンパク質 (Mannan-binding protein, MBP、mannan-binding lectin, MBL と呼ばれることもある) という補体成分が特異的に結合することから反応が始まる。なお、微生物を含むほとんど全ての生物の細胞表面は糖鎖という物質で覆われている。

3. 糖鎖とレクチン

糖鎖は、タンパク質、核酸について第3の生体高分子成分と言われ、最近の研究でその役割が次々に明らかにされてきているが、まだ不明な点も残されている²⁾。例えば、古くからよく知られている糖鎖として血液型糖鎖がある。血液型糖鎖は主

として赤血球の表面にあり、A 型は N-アセチルガラクトサミンという糖が、B 型はガラクトースという糖が末端にあり、AB 型糖鎖はその両方があり、O 型は両者とも存在しない、といった違いがあるが、その生理的意義はまだよくわかっていない。このように個体の間でも糖鎖構造が異なるが、それだけではなく、生物種によっても異なることや一つの個体 (一人の人間) のなかでも細胞によって表面の糖鎖が異なることが知られている²⁾。また、がん細胞のマーカーの一部は糖鎖そのものであることも知られている。つまり、糖鎖機能の全貌はまだ未解明な部分があるとしても、糖鎖構造には多様性があるということははっきりしている。レクチンは特定の糖鎖構造に対して、一種の鍵と鍵穴の関係で結合するタンパク質であるが、はじめは特定の血液型糖鎖と特異的に結合する植物性のタンパク質として発見された。レクチンという名はセレクト (選別) とタンパク質を意味する接尾語 (-in) に由来する。その後、植物だけではなく、微生物や動物体内からも次々にレクチンが発見された。

4. MBP と補体レクチン経路の発見

MBP すなわちマンナン結合タンパク質は京都大学の川寄敏祐博士によって発見された動物レクチンで、酵母から抽出した多糖類マンナンに特異的に結合するタンパク質として、最初は肝臓から、次いで血清から単離・精製された³⁾。単糖レベルではマンノース、N-アセチルグルコサミン、フコースを特異的に認識することが分かっており、これらの糖に共通する複数の水酸基の立体配置を厳密に認識していることが明らかにされている。タンパク質はアミノ酸から成る生体高分子 (ポリペプチド) であるが、単離精製された MBP も、その後アミノ酸配列が分析された。その結果、MBP を構成するポリペプチドは端から、糖鎖結合ドメイン (ドメインは機能単位の意味)、ネック領域、コラーゲン様ドメイン、高システイン領域の4つからなることがわかった。グルー過クロマ

トグラフィーや電気泳動といったタンパク質分析の結果から、MBP は分子量約 60 万であることがわかり、多くのポリペプチド鎖が束ねられて、全体として花束のような格好をしているものと推測された。コラーゲンに似た構造を一部に持ち、全体として花束様の構造をとるタンパク質としては、ほかにも補体古典経路第一成分の C1q が知られていた。構造と機能が密接に結びついていることは生物に限らずとも広く見られることである。MBP が補体のカスケード反応の引き金となる可能性が想定された。マンナンを結合させた羊赤血球を使って補体活性化作用があるかどうかを調べられ、糖鎖リガンド（リガンドは結合相手の意味）と結合した MBP は補体活性化作用があることが証明された。また、大腸菌を使った実験で実際に MBP が補体依存的に殺菌作用を示すということも明らかにされた。その後の研究で、MBP と結合するような糖鎖は種々の細菌、真菌、ウイルスなどに見いだされ、MBP が幅広い病原体に対応できることがわかってきている。一種類の分子で多数の異物をカバーすることは、自然免疫に共通してみられる特徴である。獲得免疫においては、一種類の抗体は一種類の抗原としか結合しない。

5. MBP 欠損とオプソニン不全症

小児科領域で知られていたオプソニン不全症という原因不明の感染症を繰り返す疾患が MBP の欠損によるものであることがわかり、1991 年にイギリスの研究グループから発表された。MBP は補体成分の一つであるとともに生体防御において重要な役割を果たすことが広く認められるようになった。さらに、MBP をコードする遺伝子の配列が明らかになると、オプソニン不全症患者における MBP 欠損の原因が、コラーゲン様領域の中のアミノ酸をコードする部分の変異に由来するものであることが報告された。また、血清から精製した MBP をオプソニン不全症の患者に投与し、治療に成功したという報告も出てきた。このような手法は補充療法とよばれ、よく知られて

いるものとしては、血液凝固因子を遺伝的に欠く血友病という疾患の治療が挙げられる。従来、血液から精製したものが用いられていたが、ウイルス混入による感染症のリスクがあり、最近ではより安全な遺伝子組み換え製剤が登場してきている。MBP もオプソニン不全症の治療に応用できる可能性が示されたが、当初から遺伝子組み換え型の必要性が考えられていた。

6. 遺伝子組み換え型 MBP の開発

機能解明と平行して、アミノ酸配列を元に MBP 遺伝子のクローニングが世界中で競うように行われ、次々に報告されたが、遺伝子がクローニングされたということはそのタンパク質の設計図が手に入ったということを意味する。川寄博士らのグループでも、クローニングされた MBP 遺伝子を発現ベクターの中に組み込んで培養肝臓細胞に導入し、生合成されて培地中に分泌された MBP を、再び酵母マンナンを使って精製するということが行われた。このような遺伝子組み換え型 MBP を使って、当初は構造活性相関研究が行われ、オプソニン不全症患者で見つかったコラーゲン領域の変異が、補体活性化能の低下と血中半減期の短縮につながることが明らかにされた。遺伝子組み換え型 MBP の研究は一方で高比活性、高収率を目指す方向にも発展していった。定石的な手法として試みられることとしては、より高い効率で発現するベクターの追究や、実際にタンパク質を合成する場となる細胞をいろいろ変えてみるということがある。MBP の場合はポリペプチド鎖が重合することも必要なため、さらに工夫が必要であった。そのような工夫のなかには、ビタミン C を培地に添加しておくことにより、ポリペプチド鎖が効率よく束ねられて、活性、収率がともに上昇したということもあった。遺伝子組み換えによって生産されたタンパク質は、化学合成とは違って、生きた細胞を必要とするため、その点では生物製剤の一種である。しかし、不特定多数の協力者から得た血液を使う方法と比べると格段

にきめ細かい品質管理が可能となる。遺伝子組み換え型 MBP の開発も世界中で試みられた⁴⁾が、その中でデンマークのオーフス大学のグループが大量合成に適した方法を確立してベンチャー企業を設立、製剤化を目指して開発が進められている。

7. MBP の抗腫瘍作用

MBP が認識するのはマンノース、フコース、*N*-アセチルグルコサミンといった単糖を末端にもつような糖鎖である。しかし、そのような単糖が一つあるだけでは結合は弱く、一定の距離を保って繰り返し存在して初めて強く結合する。例えば、細菌や真菌の表面にある多糖類やリポポリサッカライドに MBP がよく結合することがわかっている。私たち人間を含めた哺乳類の細胞では細胞表面の糖鎖は複合型糖鎖とよばれるもので末端にはシアル酸が存在する。シアル酸を欠く糖鎖もあるが、そのような糖鎖では多くの場合ガラクトースが末端に現れる。つまり、MBP が好んで結合するような糖鎖は私たちの身体をつくる細胞の表面には通常みられない。ただし、例外的に胸腺細胞という未分化 T リンパ球の表面には MBP がよく結合することがわかっている。川寄らの研究グループでは、がん化した細胞では、糖鎖に異変が生じ、MBP が異物として認識するのではないかという仮説を考えた。そこで、蛍光標識した MBP を使って、種々のがん細胞を調べたところ、一部のがん細胞の表面に MBP が結合することがわかった。特にヒト結腸がん由来の SW1116 という細胞で MBP の顕著な結合が見られた。この細胞の培養中に MBP 単独または MBP と補体を添加してみたが、がん細胞が障害されることはなかった。ところが、この細胞をマウスの皮下に移植して固形がんを作らせ、MBP 遺伝子を組み込んだ発現ベクターをがん病巣内に注入したところ、がんの退縮と胆がんマウスの余命延長が認められた⁵⁾。つまり MBP を遺伝子治療に応用することで、抗腫瘍効果が現れることがわかった。補体活性化能

を欠く変異型 MBP も同時に試されたが、予想に反してこちらにも正常型と同じ程度の抗腫瘍効果が認められた。これらの結果から、MBP の抗腫瘍効果には補体に依存しないメカニズムが働いているものと考えられた。獲得免疫においては、がん細胞に結合した抗体が免疫細胞上の受容体に結合して免疫細胞を活性化することにより抗腫瘍作用が発揮されるという現象が知られていて、ADCC（抗体依存性細胞性細胞障害作用）と呼ばれている。MBP の抗腫瘍作用についても同様の仕組みが存在することが想定された。実際に、合成糖鎖リガンドに MBP を結合させて、そこに好中球を加えると細胞が活性化されて活性酸素を放出することが示された。これに似た反応が MBP の抗腫瘍作用の仕組みとして働いているものと考えられる。

8. MBP の粘膜における発現

MBP は主として肝臓で合成され、肝臓と血液中に存在すると考えられてきたが、自然免疫に重要であるのならば、異物侵入の最前線においても発現しているのではないかと考えられた。マウスを用いて、mRNA の発現を全身の各部位について調べたところ、肝臓に次いで小腸で MBP の遺伝子の発現が多いことがわかり、さらに詳細に調べたところ、小腸の粘膜上皮細胞の一部に強く発現していることがわかった⁶⁾。普段から消化管には多くの微生物が存在する。腸管の免疫システムはそれらの体内への侵入を防ぐために高度に発達している必要があると考えられるが、MBP がその一助になっているのかもしれない。

9. おわりに

MBP は補体レクチン経路の第一成分として、一連の補体成分と、また時には、免疫細胞と協働して異物の排除を行い、自然免疫において重要な役割を果たす。補体活性化と免疫細胞活性化のいずれにおいても、標的異物を破壊するために強力なエフェクター機構が働く。これがもし、私たち

の身体を構成する細胞に対して振り向けられれば、そこでは細胞の障害や炎症の惹起といった有害事象が起こる可能性がある。実際に、心筋梗塞後の血液再還流時に起きる血管障害に MBP が深く関与することなどが報告されている。最近、糸球体腎炎および血管炎のモデル動物を使って、炎症の進展とともに血管周囲および血管壁に MBP が沈着することを見い出した。今後は、MBP の自己の細胞への結合とそれを引き金とする炎症の仕組み解明を進めていく予定である。このように MBP が「悪玉」として振る舞う場合には、MBP あるいは補体レクチン経路を抑える薬物が疾患治療につながることであるだろう。MBP が関与する炎症性疾患の病態生理の解明から、これまでにない新しいタイプの新薬開発につながるものと期待される。

引用文献

1. 免疫生物学—免疫系の正常と病理（第7版）
Charles A., Jr. Janeway 他、笹月健彦 監訳 南江堂 (2010)
2. コールドスプリングハーバー 糖鎖生物学（第2版）Ajit Varki 他 鈴木康夫 監訳 丸善 (2010)
3. 実験医学特集 vol.13 No.8 「細胞接着分子研究のトピックス」生体防御に関与するカルシウム依存性レクチンの構造と機能の相関 上村和秀、川寄伸子、川寄敏祐 (1998)
4. Vorup-Jensen T, Sorensen ES, Jensen UB, Schwaebler W, Kawasaki T, Ma Y, Uemura K, Wakamiya N, Suzuki Y, Jensen TG, Takahashi K, Ezekowitz RA, Thiel S, Jensenius JC. International Immunopharmacology 1, 677-687. (2001)
5. Ma Y, Uemura K, Oka S, Kozutsumi Y, Kawasaki N, Kawasaki T. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 371-375.
6. Uemura K, Saka M, Nakagawa T, Kawasaki N, Thiel S, Jensenius JC, Kawasaki T. The Journal of Immunology 169, 6945-6950.

Title: Roles of mannan-binding protein in innate immunity

Author: Kazuhide Uemura

Address:

Department of Biomedical Sciences, College of Life and Health Sciences
Chubu University
1200 Matsumoto-cho, Kasugai-shi, Aichi, 487-8501, Japan

Keywords: mannan-binding protein, lectin, innate immunity