

CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の活性化におけるラフトガングリオシドの相違

永福 正和, 奥山 香織, 鈴木 明身,^a 高柳 元明, 大野 勲, 井ノ口仁一

^a 東海大学糖鎖科学研究所

Distinct ganglioside-species expression dependencies between CD4⁺ and CD8⁺ T cells in T cell activation

Masakazu NAGAFUKU, Kaori OKUYAMA, Akemi SUZUKI,^a Motoaki TAKAYANAGI,
Isao OHNO, and Jin-ichi INOKUCHI

(Received November 20, 2012)

はじめに

スフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipids: GSL) はセラミドに糖鎖が付加された脂質群であり, なかでもシアル酸 (SA) を有する GSL はガングリオシドと呼ばれラフトを形成する重要なコンポーネントである. primary の T 細胞においてどのようなガングリオシドが発現し, それらが T 細胞の成熟や機能にどのような役割を持っているかについて十分な解明はされていない. 本稿では, 胸腺細胞および末梢の CD4⁺T, CD8⁺T 細胞はそれぞれどのようなガングリオシドを発現している, その発現が各 T 細胞サブセットの活性化にどのような意義を持つのかについて最近の筆者らの知見を中心に論じてみたい.

T 細胞膜ラフトとガングリオシド発現

T 細胞はリンパ球の一種であり, 獲得免疫系の中樞を担う細胞である. 末梢の成熟 T 細胞は細胞表面に CD4 あるいは CD8 分子を発現しており, それぞれ CD4⁺ヘルパー T 細胞および CD8⁺キラー T 細胞サブセットとして区別され, 機能的に異なる T 細胞サブセットを形成する. CD4⁺T 細胞は液性免疫系の活性化, アレルギー反応, 免疫系の制

御など広範な免疫反応に関与する. 一方, CD8⁺T 細胞はウイルス感染細胞やがん細胞などを破壊する機能を有する. T 細胞の活性化は, その細胞膜上に発現する T 細胞抗原受容体 (TCR) が抗原提示細胞 (APC) 上の主要組織適合性遺伝子複合体 (MHC) と抗原を認識することにより惹起される. 近年, 顕微鏡による生細胞の可視化技術の向上によって T 細胞と APC がその接触部分に形成する“免疫シナプス”が T 細胞の活性化に重要であることがわかってきた. 細胞膜の流動性は脂質二重層を構成するガングリオシドなどの脂質分子種に依存した物理化学的性状によって決定されるが, 免疫シナプス部分における膜脂質分子の構成や挙動に関してよくわかっていない. “ラフト”と呼ばれる細胞膜脂質マイクロドメインの概念が提唱されて久しいが, T 細胞においてもラフト構造は TCR シグナル伝達に必須の場として機能していることはよく知られており, ラフト構成脂質分子と TCR シグナル伝達分子との相互作用は T 細胞活性化にとって重要な初期イベントであると考えられる.¹⁾

ラフトを構成する重要な脂質分子として GSL, スフィンゴミエリンおよびコレステロールがある.

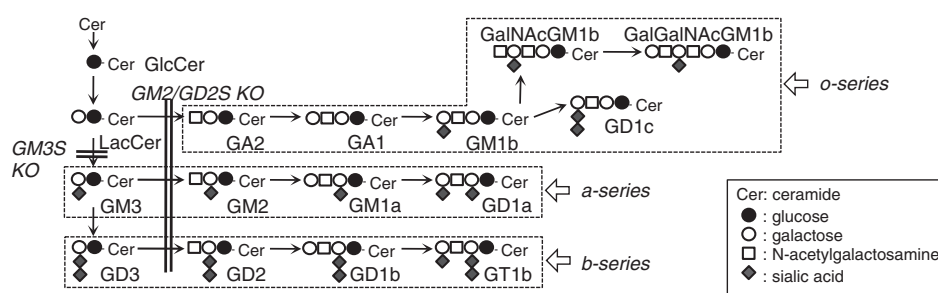


Fig. 1. Ganglio-series glycosphingolipids are synthesized from ceramide and are divided into o-, a-, and b-series species

GSL は、長鎖のアミノアルコール（スフィンゴシンと呼ばれる）に脂肪酸がアミド結合したセラミド骨格に対して糖鎖が付加された脂質分子の総称である。すべての内在性の GSL はセラミドを起点とした一連の酵素反応によって生合成され、なかでも SA を有する酸性 GSL をガングリオシドと呼ぶ (Fig. 1)。GSL の多様性はラクトシルセラミド (LacCer) にどの糖鎖が付加されるかで決定される。LacCer に GM3 合成酵素 (GM3S) によって SA が付加されると α -シ리즈ガングリオシドの出発分子である GM3 が合成される。GM3 にさらに GD3 合成酵素 (GD3S) によって SA が付加されると β -シ리즈の出発分子である GD3 が合成される。一方、LacCer に GM2/GD2 合成酵素 (GM2/GD2S) によって N アセチルガラクトサミン (GalNAc) が付加すると GA2 となり、以下複雑な α -シ리즈が合成されていく。GM2/GD2S は LacCer に加えて GM3 と GD3 も基質にすることができ、それぞれ GM2 と GD2 が合成される。このように多種多様な GSL 分子群が存在し、組織や細胞ごとに特徴的な発現プロファイルを示すことが知られている。

ガングリオシドはラフトの外層に存在して、糖鎖部分を外界にさらして伸ばしており様々な蛋白分子と相互作用することによって、細胞の分化、増殖、接着などに重要な役割を持っている。²⁾ T 細胞において、抗 CD3 抗体 + 抗 CD28 抗体の刺激により TCR のクラスターリングは起こるが、このとき CD4⁺T 細胞では GM1 ラフトの極性化が起こっているのに対して CD8⁺T 細胞ではそれが起こらないことが示されている。³⁾ さらに、ヒト T 細胞を用いた実験において、遊走する T 細胞の先端部分 (leading-edge) とその対極側 (uropod) とではそれ

ぞれ GM3 と GM1 に富んだラフトが形成される。⁴⁾ 一方、注意すべきは、多くの研究においてラフトの可視化あるいは機能解析のためにコレラ毒素 (CTxB) が繁用されているが、CTxB は GM1 以外のいくつかのガングリオシドに対しても等しい親和性で結合できる。⁵⁾ さらに、細胞に発現するガングリオシド分子種として GM1 はマイナーであるケースも多いことから、CTxB にて検出したラフトはラフトのある一種を見ているに過ぎず、この GM1 ラフトのみで多様なラフトの機能評価を行うことは難しい。従って、T 細胞の抗原認識におけるラフトの機能を評価するためには T 細胞サブセットにおいてどのようなガングリオシドが発現しているかをまず理解する必要がある。しかしながら、胸腺細胞、T 細胞株および ConA レクチン刺激によって芽球化した T 細胞におけるガングリオシドの発現はよく検討されてきたが、T 細胞は活性化によりガングリオシド発現パターンを変化させるため、⁶⁾ 生体内の休止期状態の成熟 T 細胞サブセット (CD4⁺T および CD8⁺T 細胞) においてどのようなガングリオシド分子種が発現しているかについてよくわかっていなかった。著者らは、マウスの胸腺細胞と末梢 CD4⁺T 細胞、CD8⁺T 細胞の間で GSL 発現を薄層クロマトグラフィー (TLC) 解析にて比較した。野生型マウスより胸腺細胞および末梢リンパ組織から CD4⁺T/CD8⁺T 細胞を分離して TLC 解析を行った。⁷⁾ 中性糖脂質の発現は 3 者ともにグルコシルセラミド (GlcCer) と GA1 (アジアロ GM1 と呼ばれる) の発現が認められ、このうち GA1 の発現は胸腺細胞に比して CD8⁺T 細胞で高かった (Fig. 2A)。一方、Fig. 2B に示すように、胸腺細胞、CD4⁺T、CD8⁺T 細胞ともに複数

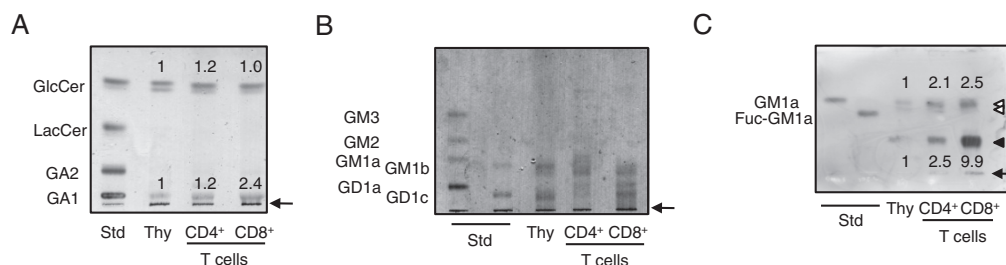


Fig. 2. Glycosphingolipid expression patterns in thymocytes and peripheral primary CD4⁺T and CD8⁺T cells in wild-type mice.

Neutral and acidic lipids were obtained from thymocytes, CD4⁺T cells, and CD8⁺T cells of WT mice. (A, B) The neutral (B) and acidic (C) lipids were separated on HPTLC plates and visualized with orcinol-sulfuric acid. (C) The acidic lipids were separated on HPTLC plates and were stained with HRP-conjugated cholera toxin B subunit (CTxB). An arrow indicates the origin for TLC. White and black arrowheads indicate GM1a and extended-GM1b bands, respectively. The relative expression levels determined by densitometric analysis were indicated in A and C. Thy: thymocytes, Std: standard lipids, Fuc-GM1a: fucosylated GM1a.

の複雑なガングリオシド分子種を発現しているが、それぞれで独特の特徴的なパターンを示した。

ただ、マウス T 細胞は非常に複雑なガングリオシドを発現しており TLC 解析では十分な分離解析ができなかったため、CTxB による免疫染色および質量分析を利用して分子種の同定を行った。CTxB はグルコース-ガラクトース-GalNAc-SA の四糖構造を持つガングリオシド (GM1a, フコシル GM1, GalGalNAcGM1b) を同等のアフィニティーで非常に強く認識することが知られており、マウスの胸腺細胞や脾臓細胞では GM1a と GalGalNAcGM1b が CTxB による免疫染色で発現が認められる。^{5,6)} 我々は胸腺細胞, CD4⁺T, CD8⁺T 細胞由来に分離して CTxB 免疫染色を行ったところ, 3 者ともに GM1a と GalGalNAcGM1b の発現を確認できた (Fig. 2C). 注目すべきは, 胸腺細胞と CD4⁺T 細胞では GM1a の方が高発現であるのに対して, CD8⁺T 細胞では GalGalNAcGM1b の方が高く, 胸腺細胞に比して 9.9 倍と著明に高いことが判明した。以上の結果より, T 細胞分化の過程において, 発現する GSL 分子種が非常に激しく変化することがわかった。すなわち, CD8⁺T 細胞においては α -シリーズの GSL が大きく発現上昇するのに対して, CD4⁺T 細胞では α -シリーズガングリオシドの発現比率が比較的優位であることが判明した。さらに, LC-MS 解析によって胸腺細胞および成熟 T 細胞に発現するガングリオシド分子種を検討した (Table 1).^{7,8)} なお, この MS 解析では同一サンプル間での発現比率を比較したが, これは MS 解析の性質上異なるサンプル間での横断的な発現量の比較が難しいためである。胸腺細胞, CD4⁺T および CD8⁺T 細胞はどれも 6 種類のガングリオシド (GM1a, GM1b, GD1b, GD1c, GalNAcGM1b, extended-GM1b) を発現していた

が, 興味深いことに, それぞれの細胞種においてこの 6 種のガングリオシドの発現比率には大いに違いがあった。胸腺細胞は成熟 T 細胞と比較して GD1b および GM1a を強く発現しており, α -シリーズ分子種の合計比率は 61.7% にすぎなかった。一方, CD4⁺T および CD8⁺T 細胞は α -シリーズの合計比率が 90% を超え, 特に CD8⁺T 細胞では 98.4% に達し, 発現するガングリオシド分子種は極度に α -シリーズに偏っていることが判明した。また, CD4⁺T 細胞は GM1a や GD1c といった α -シリーズ以外の比率が CD8⁺T 細胞よりも高いのが特徴であった。 α -シリーズと他のシリーズ (α -シリーズや β -シリーズ) は LacCer 分岐により枝分かれし, それは GM3S と GM2/GD2S の活性の違いに依存している。そこで, T 細胞分化におけるこの 2 つの酵素の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果, GM3S の発現は胸腺細胞に比して CD4⁺T 細胞は 1.8 倍と上昇する一方で, CD8⁺T 細胞では 0.3 倍に低下していた。GM2/GD2S は胸腺細胞に比して末梢 T 細胞ではともに著しい発現上昇がみられた (CD4⁺T 細胞で 200 倍, CD8⁺T 細胞で 300 倍)。この遺伝子発現プロファイルより, CD8⁺T 細胞は GM3S の発現を抑制して GM2/GD2S の発現を上昇させることによって α -シリーズリッチな GSL 発現になり, CD4⁺T 細胞は CD8⁺T 細胞と比べてより高い GM3S の発現を示すため α -シリーズおよびその先の β -シリーズへと合成を進める傾向にあることが示唆される。これまでに Müthing らは各種抗 GSL 抗体を用いた FACS 解析によってマウス末梢 CD4⁺T と CD8⁺T 細胞の GSL 発現を報告している。⁹⁾ 著者らの結果と一致して, 抗 GalNAcGM1b 抗体を用いた彼らの結果では CD4⁺T 細胞より CD8⁺T 細胞の方がこのガングリオシドを発現している細胞の比率が高かった。

Table 1. Structures of ganglioside species found in mouse primary T cells

Structure	Biosynthetic pathway*	Trivial name	Relative expression level(%)		
			Thy	CD4T	CD8T
Gal β 1-3GalNAc β 1-4(SAa2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	α -series	GM1a	8.4	4.1	0.8
SAa2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	α -series	GM1b	18.9	14.4	8.6
Gal β 1-3GalNAc β 1-4(SAa2-8SAa2-3)Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	β -series	GD1b	29.9	5.7	0.8
SAa2-8SAa2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	α -series	GD1c	13.3	20.3	3.7
GalNAc β 1-4(SAa2-3)Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	α -series	GalNAcGM1b	23.0	36.6	49.0
Gal β 1-4GalNAc β 1-4(SAa2-3)Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-1'Cer	α -series	extended-GM1b	6.5	18.9	37.1

*Biosynthetic pathway of each series gangliosides is illustrated in Fig. 1. Thy: thymocytes.

また、他のグループによる抗 GD1c 抗体を用いた解析では、胸腺細胞や末梢 CD8⁺T 細胞では発現細胞が少なく、末梢の CD4⁺T 細胞では非常に多いことが示されている。^{10,11)}

GM1 発現あるいはラフト発現のマーカーとして CTxB が繁用されており、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞とを比較すると、GM1 発現は後者の方が高いと考えられてきたが、¹²⁾ 我々は実際には CD8⁺T 細胞では CTxB と反応する extended-GM1b が著明に高発現であるということを明らかにした。ガングリオシド分子種の違いによって多様なラフトが存在するため、^{3,4)} マウス T 細胞において CTxB で検出しているものは GM1 ラフトではなく、特に CD8⁺T 細胞では extended-GM1b ラフトがリッチである可能性もあるということに注意が払われるべきであろう。

T 細胞活性化におけるガングリオシド発現の意義

従来、T 細胞活性化におけるガングリオシドの役割を検討する方法として、GlcCer 合成酵素 (GlcCerS) の阻害剤を細胞培養系に添加して GSL 全般を枯渇させるという方法や、あるいは細胞培養系に外来性に GSL を添加するという方法が試されてきた。これまでに我々は、GlcCerS 阻害剤 D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (D-PDMP) を用いてヒトおよびマウスの T 細胞株の TCR 媒介性活性化における GSL の役割を検討してきた。¹³⁾ D-PDMP 処理により培養 T 細胞株に発現する GSL を約 10% にまで減少させたとき、TCR 刺激による T 細胞活性化は未処理細胞と比べて変化はなかったが、ラフト局在蛋白である GPI アンカー型蛋白を介した T 細胞活性化は増強するという結果を見いだした。一方、ヒト末梢血リンパ球を D-PDMP にて処理するとスーパー抗原に反応した増殖応答や IFN γ 産生が低下するという報告もある。¹⁴⁾ また、primary T 細胞に対してガングリオシドを添加するという方法により、T 細胞活性化におけるガングリオシドの機能は検討されてきた。しかし、primary CD4⁺T あるいは CD8⁺T 細胞の機能において内在性に発現するガングリオシドがどのような役割を担っているかについてまだ詳細な検討は試されていない。

上述のように T 細胞分化・成熟において GSL 発現パターンが劇的に変化することは、GSL が T 細胞機能に重要である可能性がある。そこで、2 種類

のガングリオシド合成系酵素のノックアウト (KO) マウスを用意して T 細胞の分化・成熟や TCR 依存性の活性化を検討した。⁷⁾ GM3S KO マウスは、 α -シリーズおよび β -シリーズに属するガングリオシドがすべて欠損し、その結果、LacCer の貯留あるいは α -シリーズの増加が予想される。もう一種の GM2/GD2S KO は、 α -シリーズのすべておよび GM3 と GD3 以外のすべての α 、 β -シリーズのガングリオシドが欠如し、LacCer の貯留ないし GM3 や GD3 の代償的増加を起こすことが予想される。野生型 (WT) マウスの胸腺細胞、CD4⁺T、CD8⁺T 細胞はいずれも複雑なガングリオシドを主に発現しているため、GM3S が欠損すると LacCer の蓄積はほとんど認められず、下流の α -シリーズガングリオシドが広く検出された。一方、GM2/GD2S KO では WT に認められるような複雑なガングリオシドは消失した。具体的に、胸腺細胞では GD3 が、CD4⁺T では GM3 と GD3 が検出されたのに対して、CD8⁺T では GM3 も GD3 も検出されなかった。一方で、この KO マウスの中性糖脂質をみると、CD8⁺T では、胸腺細胞、CD4⁺T と比して WT で発現している GA1 が KO では消失するとともに、LacCer の蓄積が非常に顕著であった。以上まとめると、GM3S KO マウスでは GSL の分布は各細胞ともに α -シリーズのガングリオシドにシフトし、GM2/GD2S KO では、胸腺細胞から CD4⁺T にかけては GM3 や GD3 が代償的に発現するのに対して CD8⁺T では LacCer の激しい貯留が認められた。これらの結果は、上記の遺伝子発現のデータと一致する。コレラ染色により、予想通り GM3 KO では α -シリーズの GM1a バンドが消失して α -シリーズの GalGalNAcGM1b のみが発現していた。一方、GM2/GD2S KO では、予想通りどちらのバンドも消失した。

次に、KO マウスにおける T 細胞の分化や機能にどのような影響を及ぼすかを解析した。最初に、胸腺、脾臓およびリンパ節の細胞数を調べたところ、両 KO ともに WT と比べて有意な差はなかった。T 細胞および B 細胞の分化および末梢での分布についても大きな変化はなかった。以上より、ガングリオシドの発現変化は T 細胞の分化および末梢での分布に影響を及ぼさないことが判明した。GSL 発現パターンの変化が TCR 依存性の活性化に影響があるか否かを解析した。WT および両 KO マウスのリンパ組織を採取して、そこから CD4⁺T 細

胞と CD8⁺T 細胞に精製してそれぞれ抗体による TCR 架橋刺激を行った。その結果、驚くべきことに、CD4⁺T 細胞の増殖反応は GM3SKO マウスでは抑制されていたが、GM2/GD2S KO マウスでは正常であった。対照的に CD8⁺T 細胞の増殖反応は GM2/GD2S KO マウスでは抑制されていたが、GM3SKO マウスでは正常であった。また、TCR 刺激に伴うサイトカイン (IL-2 と IFN γ) の産生も増殖反応と同様の結果を示した。より生理的な T 細胞活性化を検討するために、混合リンパ球試験、スーパー抗原あるいは卵白アルブミン抗原に対する活性化も検討したが、すべて同様の結果を示した。以上より、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の TCR 依存性活性化はそれぞれ特徴的なガングリオシド分子種の発現を必要とすることが示唆された。CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞の TCR 依存性活性化においてそれぞれどの GSL 分子種が重要であるか検討した。T 細胞の培養系において、特定の GSL 分子種を添加して前処理した後に TCR 刺激を行うという GSL の add-back の実験を行った。なお、注意として、本実験において用いた GSL 添加条件で

は、どの GSL 分子種を添加しても TCR 非依存的な活性化は認められなかった (Fig. 3)。GM3S KO の CD4⁺T 細胞に対して α -シリーズを添加したところ、どの分子種の添加においても TCR 依存性活性化は正常レベルにまで回復した (Fig. 3A)。しかし、 β -シリーズあるいは α -シリーズの添加ではどの分子種を添加してもほとんど回復しなかった。すなわち、GM3S KO で欠損しているガングリオシドの中で α -シリーズを補充したときのみ CD4⁺T 細胞の TCR 依存性活性化の回復に有効であったことから、この KO における CD4⁺T 細胞の TCR 依存性活性化の抑制は α -シリーズの欠如が原因であった。加えて、WT において CD4⁺T 細胞への α -シリーズや LacCer の添加は細胞の活性化を抑制することにはなかったことから、GM3S KO での現象は代償的に増加した α -シリーズや LacCer の影響ではないことがいえる。一方、GM2/GD2S KO の CD8⁺T 細胞に対しては、 α -シリーズを添加したところ、どの分子種の添加においても TCR 依存性活性化は正常に回復した (Fig. 3B)。しかし、 α -シリーズあるいは β -シリーズの添加ではどの分子種を添加してもほと

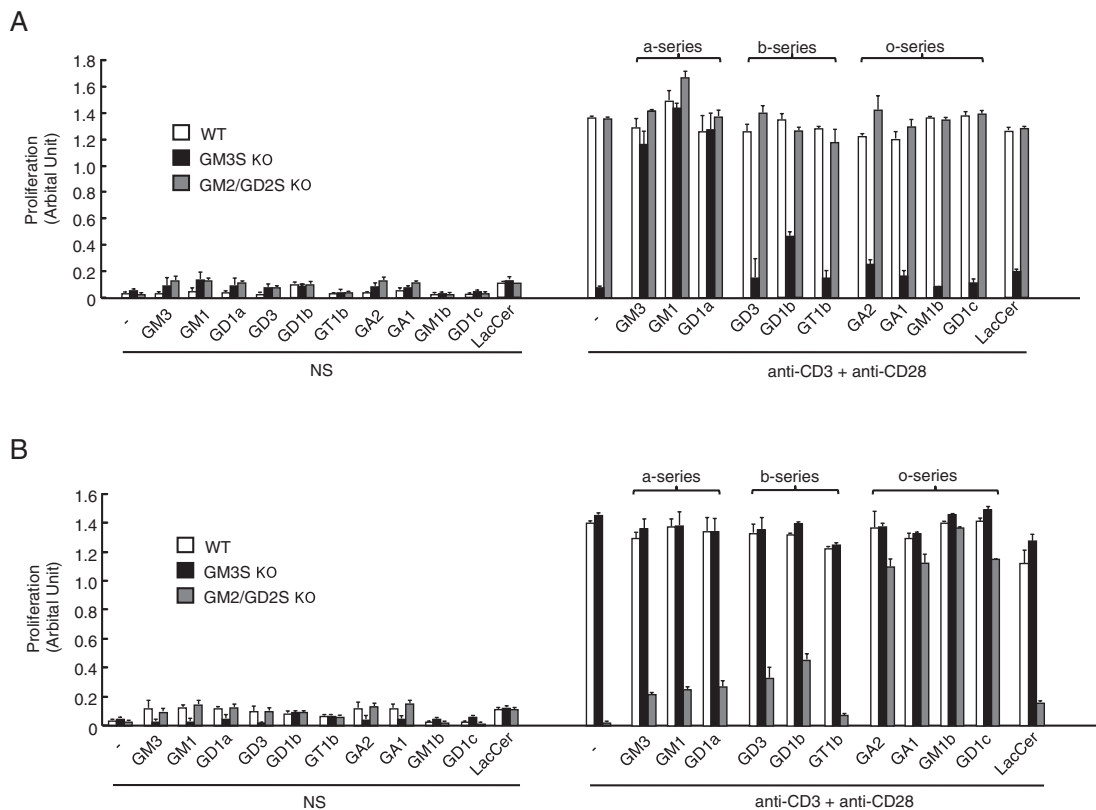


Fig. 3. Activation of CD4⁺T and CD8⁺T cells upon TCR-mediated stimulation.

Purified peripheral CD4⁺T and CD8⁺T cells from WT, GM3S null (A), and GM2/GD2S (B) null mice were left unstimulated (NS) or were stimulated with anti-CD3 antibody plus anti-CD28 antibody in the presence or absence of the indicated ganglioside.

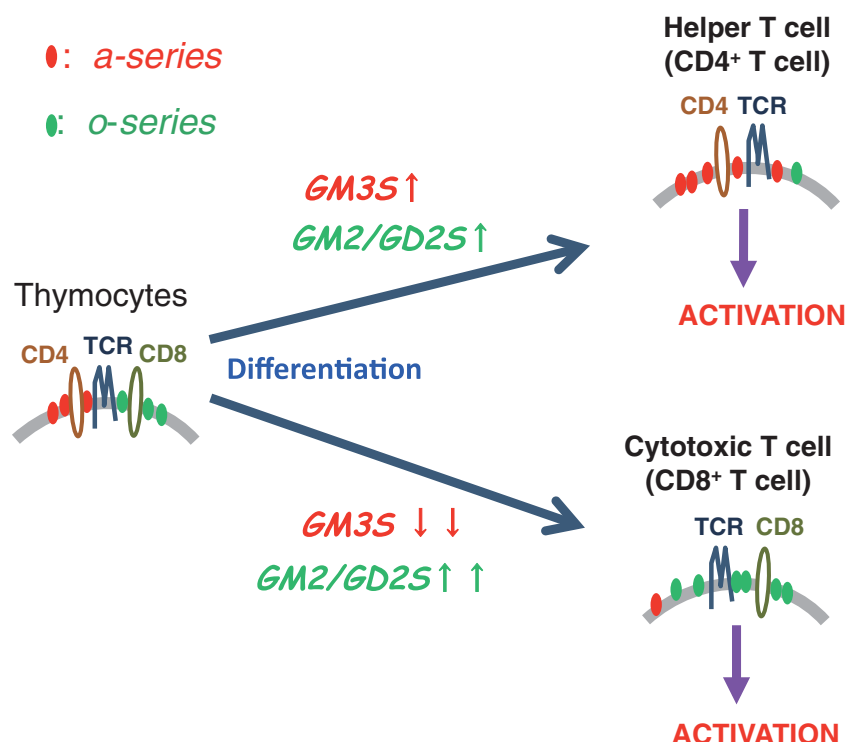


Fig. 4. Distinct difference of lipid rafts in individual T cell subsets.

The repertoire selection from immature thymocytes (CD4⁺ and CD8⁺ double positive) to mature single positive T cell subpopulations is accompanied by selective ganglioside expression. The gene expression patterns together with ganglioside analysis confirm that CD8⁺ T cells exclusively express o-series gangliosides due to downregulation of GM3S and upregulation of GM2/GD2S expression. On the other hand, CD4⁺ T cells maintain the expression of GM1a due to upregulation of GM3S. This suggests that each T cell subset has unique rafts composed of different ganglioside species and that these rafts provide distinct functions in different intracellular events following receptor-mediated stimulation. This ganglioside selection process may be indispensable in the formation of distinct and functional lipid rafts in mature T cells.

んど回復しなかった。すなわち、GM2/GD2S KOで欠損しているGSLの中でa-やb-シリーズではなくo-シリーズを補充したときのみCD8⁺T細胞のTCR依存性活性化の回復に有効であったことから、このKOにおけるCD8⁺T細胞のTCR依存性活性化の抑制はo-シリーズの欠如が原因であった。加えて、WTにおいてCD8⁺T細胞へのLacCer, GM3やGD3の添加が細胞の活性化を抑制することはなかったことから、GM2/GD2S KOでの現象は代償的に増加したLacCerの影響ではないことがいえる。また、別のグループの報告では、マウスCD8⁺T細胞をGA1(o-シリーズ)発現が陽性と陰性とに分離して解析したところ、GA1陽性細胞の方がTCR刺激に伴うIFN γ 産生能ははるかに高いことや、抗GA1抗体投与によりin vivoにおけるCD8⁺T細胞の増殖反応および同T細胞依存性の同種移植片拒絶反応が非常に低下することが知られている。¹⁵⁾ 以上のように、T細胞はその分化過程において特異的なガングリオシド分子種の発現を

示し、その分子種の仕分けこそがTCR依存性活性化に重要であることが明らかとなった(Fig. 4)。すなわち、胸腺細胞からCD4⁺T細胞に分化するときにはa-シリーズを優位に発現させ、CD8⁺T細胞に分化するときにはa-シリーズの発現を減少させてo-シリーズを特異的に強く発現させるようになり、このようなガングリオシド選別こそが成熟T細胞の免疫機能発現に重要なイベントである。

なぜCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞とではTCR依存性の活性化に必要なGSL分子種の依存性が違うのであろうか？CD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞とではTCRに構造的な違いがある。Comelliらは両primary T細胞サブセットのN-結合型糖鎖のパターンが異なることを詳細に示している。¹⁶⁾ また、TCRのN-結合型糖鎖のパターンは両T細胞サブセット間でそれぞれ異なり、そのパターンはTCRのアビディティに影響する。¹⁷⁾ MHCとの相互作用において、T細胞サブセットはCD4/CD8分子の補助を必要としており、CD4/CD8もまた糖鎖修飾

を受ける。GSL は N 結合型糖鎖を持つ糖蛋白と相互作用するので、¹⁸⁾ CD4⁺T 細胞と CD8⁺それぞれにおいて特有に発現する GSL が TCR や CD4/CD8 と相互作用を示して TCR シグナル伝達を効率的に行っている可能性もある。CD4 分子と CD8 分子はすべて細胞膜直下に飽和脂肪酸修飾を受けることによってラフトに局在できるが、その修飾だけでラフト局在が決まるものではない。^{19,20)} 細胞内輸送や細胞膜上での発現様式を保証するうえで、CD4/CD8 分子がどの種類のガングリオシドにより構成されるラフトを必要とするかが重要なかもしれない。また、両サブセット間の機能的な違い（サイトカイン産生、増殖、生存）は CD28 など B7 ファミリーの共刺激シグナルによってもたらされる。ヒトおよびマウスの CD4⁺T 細胞では、CD28 はその下流のシグナル伝達分子 PKC θ を介して免疫シナプスにおけるラフト（CTxB 結合性ラフト）の集積に機能的な役割を担う。²¹⁾ 一方、CD8⁺T 細胞ではその活性化のために免疫シナプスの形成や APC との接触面への CTxB 結合性ラフトの再配向を必要としない。以上の知見より、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞とでは TCR あるいは共刺激分子のシグナル伝達に必要なラフトガングリオシドの分子種が異なることが推論される。CTxB あるいはその類縁蛋白である大腸菌の熱不安定性エンテロトキシンの B サブユニットは GM1 四糖構造を認識するが、これらの架橋刺激によって CD8⁺T 細胞ではアポトーシスが誘導されるが、CD4⁺T 細胞では誘導されないことが知られている。²²⁾ このメカニズムとして、これらの毒素による CD8⁺T 細胞では架橋によって NF- κ B や c-Myc の活性化によるカスパーゼ依存性アポトーシスが誘導される（CD4⁺T 細胞では誘導されない）。この現象は FAS および TNF 受容体非依存性であることはわかっているが、細胞膜上でどのようなイベントが起こっているかについて詳細にはわかっていない。CD4⁺T と CD8⁺T 細胞における CTxB 結合ガングリオシドの発現の違いを考慮すると、一つの可能性として、CTxB によるアポトーシス誘導は GM1 ではなく GalGalNAcGM1b が形成するラフトが関与している可能性もある。以上のように、CD4⁺T 細胞と CD8⁺T 細胞とでは、活性化時の細胞膜上でのイベントは非常に異なっており、それはユニークなガングリオシドラフトの存在が重要な役割を担っていることを示唆している。

加えて、FACS 解析により、CD4⁺T、CD8⁺T 細胞の中で特定の GSL を発現する細胞としない細胞が混在し、実際、アシアロ GM1 陽性 CD8⁺T 細胞は陰性細胞に比べて活性化を強く起こす。また、マウス Th クローン細胞を用いた検討では、 α -シリーズの GD1a や GD1c は Th1 細胞に優位に発現し、 α -シリーズの GD1a の発現は Th2 細胞に特異的であることが見いだされている。以上の知見より、CD4⁺T あるいは CD8⁺T 細胞およびそれらの細かい機能的サブセットの細胞膜上にはそれぞれ特定の GSL ラフトが発現しており、それらが特異的な T 細胞免疫機能を担っているのかもしれない。従って、今後の課題は、GSL 発現の違いに応じて T 細胞をもっと細かいサブセットに分けて免疫学的機能解析を行う必要がある。

ガングリオシドと免疫疾患および今後の展望

最近、マウスに GM3S のアンチセンスオリゴを経鼻投与したところ、メタコリン誘導性の気道炎症反応が抑制されるという報告がされた。²³⁾ その機序として、GM3S KO マウスでは活性化肥満細胞の脱顆粒が抑制されていることが示されたが、T 細胞の関与については触れられていなかった。気道炎症反応は CD4⁺T 細胞が主体的に働く免疫反応である。我々は、卵白アルブミン抗原を用いた気道炎症反応の検討により、GM3S KO では炎症反応がほとんど認められず（Fig. 5A）、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球および好酸球の浸潤が非常に低下していることを見いだした。⁷⁾ また、血清の卵白アルブミン特異的 IgE 価や Th2 サイトカインもほとんど誘導されていなかった。KO マウスの CD4⁺T 細胞の移入実験により、これらの現象は CD4⁺T 細胞の機能異常が原因であり、*in vivo* においても α -シリーズガングリオシドが CD4⁺T 細胞の機能発現に不可欠であることが示された（Fig. 5B）。T 細胞は活性化すると GM1 発現を遺伝子レベルから増加させる。自己免疫疾患患者の末梢血 T 細胞では GM1 やコレステロールすなわち GM1 ラフトが高発現している。²⁴⁾ さらに最近、SLE 患者では CD4⁺T 細胞特異的に GM1 の発現が増強していることが示された。²⁵⁾ すなわち、自己反応性の CD4⁺T 細胞では GM1 ラフトの発現が亢進した状態に陥っており、このことが異常な活性化を持続させる原因であると考えられている。GM3S KO マウスにおける気道炎症反応の改善という結果も含

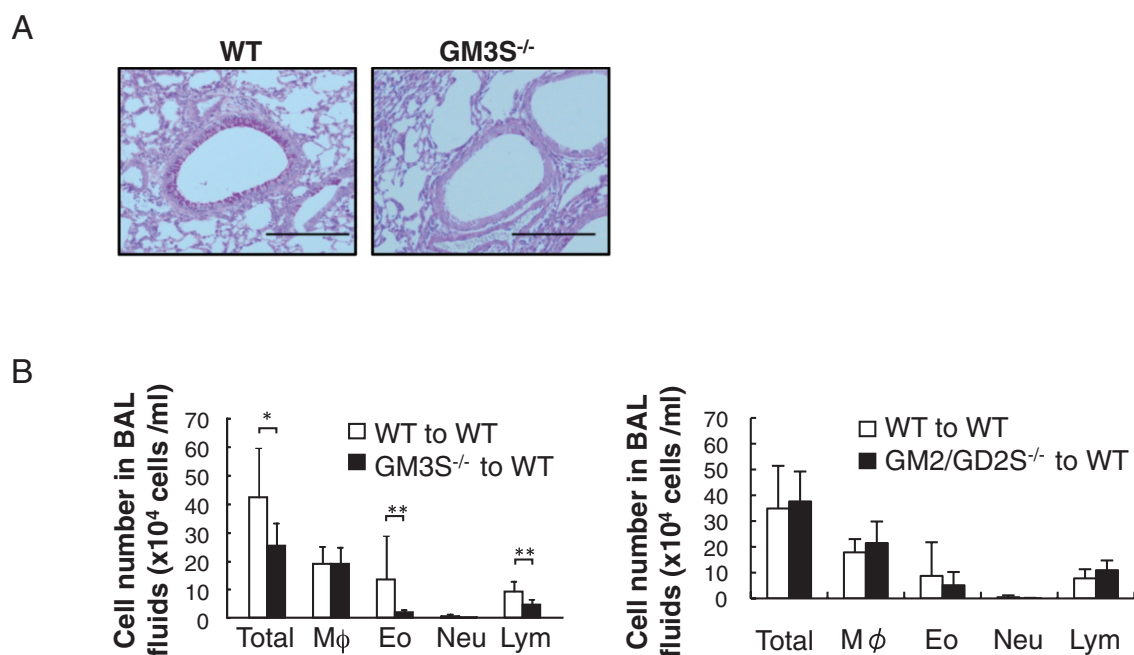


Fig. 5. Amelioration of allergic airway responses in GM3S null mice.

- (a) Sensitized wild-type (WT) and GM3S null mice were challenged with OVA. Airway mucus hypersecretion characteristic of asthma was observed in WT but not in GM3S null mice. (PAS staining, bar: 200 μ m)
- (b) Transfer of CD4 T cells from sensitized GM3S null mice, but not those from GM2/GD2S null mice, failed to develop allergic airway inflammation in recipient WT mice.

めて、GM3Sの阻害はアレルギー性喘息の改善における可能性を示すものであり、T細胞機能の異常による免疫関連疾患の新しい標的として注目される。

REFERENCES

- 1) Dykstra M., Cherukuri A., Sohn H. W., Tzeng S. J., Pierce S. K., *Annu. Rev. Immunol.*, **21**, 457–481 (2003).
- 2) Hakomori Si S. I., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 225–232 (2002).
- 3) Kovacs B., Maus M. V., Riley J. L., Derimanov G. S., Koretzky G. A., June C. H., Finkel T. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 15006–15011 (2002).
- 4) Gomez-Mouton C., Abad J. L., Mira E., Lacalle R. A., Gallardo E., Jimenez-Baranda S., Illa I., Bernad A., Manes S., Martinez-A. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **98**, 9642–9647 (2001).
- 5) Nakamura K., Suzuki M., Inagaki F., Yamakawa T., Suzuki A., *J. Biochem.*, **101**, 825–835 (1987).
- 6) Noguchi M., Iwamori M., Hirano T., Hashimoto H., Hirose S., Hirose S., Shirai T., Nagai Y., *Cell. Immunol.*, **135**, 184–194 (1991).
- 7) Nagafuku M., Okuyama K., Onimaru Y., Suzuki A., Odagiri Y., Yamashita T., Iwasaki K., Fujiwara M., Takayanagi M., Ohno I., Inokuchi J., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, E336–E342 (2012).
- 8) Muthing J., *Glycoconj. J.*, **14**, 241–248 (1997).
- 9) Marusic A., Markotic A., Kovacic N., Muthing J., *Carbohydr. Res.*, **339**, 77–86 (2004).
- 10) Hayakawa K., Hardy R. R., *J. Exp. Med.*, **168**, 1825–1838 (1988).
- 11) Nakamura K., Suzuki H., Hirabayashi Y., Suzuki A., *J. Biol. Chem.*, **270**, 3876–3881 (1995).
- 12) de Mello Coelho V., Nguyen D., Giri B., Bunbury A., Schaffer E., Taub D. D., *BMC. Immunol.*, **5**, 2 (2004).
- 13) Nagafuku M., Kabayama K., Oka D., Kato A., Tani-ichi S., Shimada Y., Ohno-Iwashita Y., Yamasaki S., Saito T., Iwabuchi K., Hamaoka T., Inokuchi J., Kosugi A., *J. Biol. Chem.*, **278**, 51920–51927 (2003).
- 14) Blank N., Schiller M., Gabler C., Kalden J. R., Lorenz H. M., *Biochem. Pharmacol.*, **71**, 126–135 (2005).
- 15) Kosaka A., Wakita D., Matsubara N., Togashi Y., Nishimura S., Kitamura H., Nishimura T., *Int. Immunol.*, **19**, 249–256 (2007).
- 16) Comelli E. M., Sutton-Smith M., Yan Q., Amado M., Panico M., Gilmartin T., Whisenant T., Lanigan C. M.,

- Head S. R., Goldberg D., Morris H. R., Dell A., Paulson J. C., *J. Immunol.*, **177**, 2431–2440 (2006).
- 17) Zapata D. A., Schamel W. W., Torres P. S., Alarcon B., Rossi N. E., Navarro M. N., Toribio M. L., Regueiro J. R., *J. Biol. Chem.*, **279**, 24485–24492 (2004).
- 18) Hakomori S. I., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1780**, 325–346 (2008).
- 19) Popik W., Alce T. M., *J. Biol. Chem.*, **279**, 704–712 (2004).
- 20) Pang D. J., Hayday A. C., Bijlmakers M. J., *J. Biol. Chem.*, **282**, 13884–13894 (2007).
- 21) Bi K., Tanaka Y., Coudronniere N., Sugie K., Hong S., van Stipdonk M. J., Altman A., *Nat. Immunol.*, **2**, 556–563 (2001).
- 22) Yankelevich B., Soldatenkov V. A., Hodgson J., Polotsky A. J., Creswell K., Mazumder A., *Cell. Immunol.*, **168**, 229–234 (1996).
- 23) Karman J., Tedstone J. L., Gumlaw N. K., Zhu Y., Yew N., Siegel C., Guo S., Siwkowski A., Ruzek M., Jiang C., Cheng S. H., *Int. Immunol.*, **22**, 593–603 (2010).
- 24) Jury E. C., Kabouridis P. S., Flores-Borja F., Mageed R. A., Isenberg D. A., *J. Clin. Invest.*, **113**, 1176–1187 (2004).
- 25) Dong L., Hu S., Chen F., Lei X., Tu W., Yu Y., Yang L., Sun W., Yamaguchi T., Masaki Y., Umehara H., *J. Biomed. Biotechnol.*, **2010**, 569053 (2010).