

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09909

研究課題名(和文) O-GlcNAc糖鎖修飾による正常造血と異常造血の分子制御メカニズム

研究課題名(英文) Regulation of normal and malignant hematopoiesis by protein glycosylation with O-GlcNAc

研究代表者

中島 秀明 (NAKAJIMA, HIDEAKI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：30217723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：O結合型 -N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)転位酵素(OGT)は、タンパク質のセリン・スレオニン残基にO-GlcNAc基を付加する酵素であり、蛋白の機能調節やエピゲノム修飾に重要である。本研究ではOGTの造血幹細胞(HSC)における機能解析を施行し、OGTはHSC維持に必須であること、それがミトファジーを介したミトコンドリアの品質管理によって行われていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでO-GlcNAc化は細胞機能・成体恒常性維持の様々な局面で極めて重要な役割を果たしており、その異常は糖尿病などの代謝性疾患、アルツハイマー病などの変性疾患、さらには発癌や老化と密接に関係していることが知られていたが、HSCにおける役割は未解明であった。本研究はOGTがHSC維持において必須の役割を果たしていることを明らかにした世界初の報告であり、学術的意義は極めて高い。本研究はOGTやO-GlcNAc化の制御によりHSC機能を制御できる可能性を示しており、さらには白血病などの造血器腫瘍の発症機構解明にもつながるものとして期待される。

研究成果の概要(英文)：O-GlcNAc transferase (OGT) confers O-GlcNAc moiety to the serine/ threonine residue of the target proteins. O-GlcNAcylation plays a critical role for regulating protein function and epigenetic modification. We have performed in-depth functional analysis of OGT in hematopoietic stem cells (HSCs) using Ogt-conditional knockout mice and found that OGT is crucial for HSC maintenance. OGT disruption in vivo led to decreased HSCs and impaired HSC function. Further analysis revealed that OGT is critical for quality control of mitochondria in HSCs through mitophagy regulation.

研究分野：血液学

キーワード：造血幹細胞 OGT O-GlcNAc ミトコンドリア ミトファジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

タンパク質の翻訳後修飾は、転写調節とならびタンパク質の活性制御に極めて重要である。O 結合型  $\beta$ -N-アセチルグルコサミン(O-GlcNAc)修飾は、リン酸化と並ぶ重要なタンパク質翻訳後修飾であり、転写因子・シグナル分子・細胞周期制御因子など 1000 種類以上の蛋白が O-GlcNAc 修飾を介して活性や分解の調節を受けることが知られている。

O-GlcNAc 付加反応は O-GlcNAc 転移酵素 (OGT) により行われる。OGT はグルコースからヘキソサミン生合成経路を経て生成された UDP-GlcNAc をドナーとし、標的タンパク質のセリン・スレオニン残基に O-GlcNAc 基を付加する酵素である (図 1)。O-GlcNAc 化はタンパク質のセリン・スレオニン残基におこり、同部位のリン酸化反応としばしば拮抗する。このことから O-GlcNAc 修飾はリン酸化によるシグナル伝達と密接に関連し、さまざまな細胞外刺激に対する応答反応の重要な制御因子となっている。一方 O-GlcNAc 化反応は細胞内 UDP-GlcNAc 濃度と細胞外グルコース濃度に依存しており、また様々な細胞外ストレスに影響を受けるため、O-GlcNAc 修飾は細胞のストレス・栄養センサーとして機能している。

このように O-GlcNAc 化は細胞機能・成体恒常性維持の様々な局面で極めて重要な役割を果たしており、その異常は糖尿病などの代謝性疾患、アルツハイマー病などの変性疾患、さらには発癌や老化と密接に関係している。

造血系では、造血幹細胞 (HSC) 機能に重要なエピゲノム因子 (TET2, EZH2, ASXL1 など) 転写因子 (RUNX1, HCF-1 など) がん遺伝子 (c-Myc など) 癌抑制遺伝子 (p53, PTEN など) の多くが O-GlcNAc 修飾で制御されており、これらの機能異常が造血器腫瘍発生につながることはよく知られている。また静止状態の造血幹細胞では、低酸素やニッチ因子で活性化された HIF-1 $\alpha$  が造血幹細胞老化をひきおこす活性酸素 (ROS) 生成を抑制しているが、HIF-1 $\alpha$  蛋白も O-GlcNAc 修飾の制御下にあることが知られている。以上のことは、O-GlcNAc 化制御が HSC 機能・老化やそれに基づく腫瘍発生と密接な関係にあることを示している。しかしながら、これまで正常 HSC や造血器腫瘍における O-GlcNAc 化の役割については全く解明されていない。

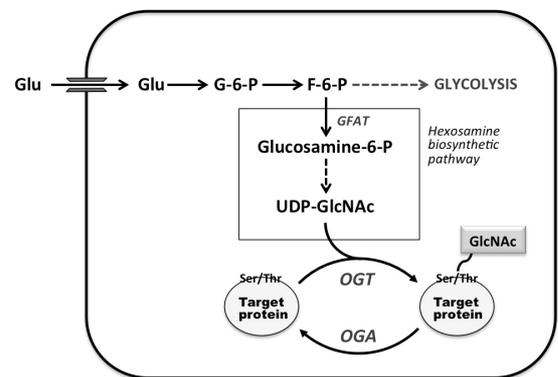


図1 ヘキソサミン生合成経路と O-GlcNAc 化反応

### 2. 研究の目的

本研究では O-GlcNAc 修飾による HSC 機能制御の詳細を統合的に明らかにすることを目標とする。具体的には、HSC の幹細胞機能 (自己複製能、長期骨髄再建能、多分化能) に O-GlcNAc 化がどのように関わっているのか、OGT 欠損マウスを用いて解析する。さらにその分子メカニズムについて、代謝・エピジェネティクス・遺伝子発現制御の観点から詳細に明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

OGT-flox マウスと Mx-Cre トランスジェニックマウス (Tg) を交配し、HSC を含む造血細胞分画で OGT を条件特異的に欠失させ、得られたマウスの末梢血・骨髄について FACS による

詳細な細胞分画解析を行った。さらにこれらマウスの骨髄から HSC を純化し、致死量放射線照射したレシピエントマウスに骨髄移植、長期骨髄再建能と自己複製能を解析した。

続いて OGT 欠失 HSC・造血前駆細胞 (HPC) の機能異常のメカニズムを解明するため、細胞周期・アポトーシス解析、トランスクリプトーム解析、メタボローム解析、ミトコンドリア機能解析などを施行した。

#### 4. 研究成果

polyIC 投与により OGT を欠失させると、HSC/HPC を含む造血幹前駆細胞・骨髄系前駆細胞分画が広範に減少し、末梢血でも汎血球減少をきたした。OGT を欠失させた HSC をレシピエントマウスに移植すると全く生着がみられず、OGT は HSC の長期骨髄再建能に必須であることが明らかとなった。

続いて OGT 欠失が HSC の幹細胞機能障害を引き起こす分子メカニズムを、細胞内代謝の観点から解析した。その結果、OGT 欠失に伴って HSC の活性酸素 (ROS) が上昇し、細胞のアポトーシスが亢進、静止状態が失われることを見いだした。さらに OGT を欠失した HSC では膜電位の低下した異常ミトコンドリアが蓄積していることが、ミトコンドリア量、ミトコンドリア膜電位、細胞外フラックスアナライザーの解析から明らかになった。また電子顕微鏡による解析では、OGT 欠失 HSC のミトコンドリアは膨大しており、内部のクリステも異常になっていることが判明した。

以上のような異常ミトコンドリアが蓄積する分子メカニズムを明らかにするため、ミトコンドリア品質管理に重要なマイトファジーについて解析したところ、OGT 欠失 HSC ではマイトファジーが有意に低下していることが判明した。さらに OGT 欠失 HSC の RNA sequence によるトランスクリプトーム解析を施行したところ、マイトファジーの主要な制御分子である PINK1 の発現が数分の一に低下していることが判明した。これらのことから、OGT による O-GlcNAc 化は、HSC のマイトファジー制御に必須であることが明らかとなった。

以上のことから、OGT は PINK1 の発現制御を介して HSC のマイトファジー制御、ホメオスタシス維持、幹細胞機能維持に必須の役割を果たしていることが明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tachibana Takayoshi, Koyama Satoshi, Andou Taiki, Ishiyama Yasufumi, Tanaka Masatsugu, Nakajima Hideaki, Kanamori Heiwa	4. 巻 109
2. 論文標題 Salvage and bridging to allogeneic hematopoietic cell transplantation with ponatinib in patients with relapsed or refractory Philadelphia chromosome-positive leukemia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 162 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-018-02571-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii Yoshimi, Fujisawa Shin, Ando Taiki, Suzuki Taisei, Ishiyama Yasufumi, Kishimoto Kumiko, Hattori Yukako, Nakajima Yuki, Miyazaki Takuya, Takasaki Hirotaka, Matsumoto Kenji, Koharazawa Hideyuki, Taguchi Jun, Fujimaki Katsumichi, Sakai Rika, Nakajima Hideaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Primary uterine lymphoma: The Yokohama Cooperative Study Group for Hematology (YACHT) study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 e455 ~ e459
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajco.13049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tachibana Takayoshi, Andou Taiki, Tanaka Masatsugu, et al.	4. 巻 18
2. 論文標題 Clinical Significance of Serum Ferritin at Diagnosis in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A YACHT Multicenter Retrospective Study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia	6. 最初と最後の頁 415 ~ 421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.clml.2018.03.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishii Yoshimi, Fujisawa Shin, Nigauri Chika, Ando Taiki, Suzuki Taisei, Ogusa Eriko, Miyashita Kazuho, Motohashi Kenji, Nakajima Hideaki	4. 巻 34
2. 論文標題 Peripheral Blood Monocyte Count is a Predictor of Successful Peripheral Blood Stem Cell Harvest After Chemo-Mobilization in Patients with Malignant Lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion	6. 最初と最後の頁 347 ~ 349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12288-017-0848-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Kenji, Fujisawa Shin, Ando Taiki, Koyama Megumi, Koyama Satoshi, Ishii Yoshimi, Numata Ayumi, Yamamoto Wataru, Motohashi Kenji, Hagihara Maki, Nakajima Hideaki	4. 巻 35
2. 論文標題 Anemia associated with worse outcome in diffuse large B-cell lymphoma patients: a single-center retrospective study	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Turkish Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 181-184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4274/tjh.2017.0437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koyama Satoshi, On behalf of the Yokohama Cooperative Study Group for Hematology (YACHT), Fujita Hiroyuki, Shimosato Takeshi, Kamijo Aki, Ishiyama Yasufumi, Yamamoto Eri, Ishii Yoshimi, Hattori Yukako, Hagihara Maki, Yamazaki Etsuko, Tomita Naoto, Nakajima Hideaki	4. 巻 Feb 17
2. 論文標題 Septicemia from Lactobacillus rhamnosus GG, from a Probiotic Enriched Yogurt, in a Patient with Autologous Stem Cell Transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Probiotics and Antimicrobial Proteins	6. 最初と最後の頁 na
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12602-018-9399-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujimaki Katsumichi, Hattori Yukako, Nakajima Hideaki	4. 巻 107
2. 論文標題 10-year complete remission in a Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia patient using imatinib without high-intensity chemotherapy or allogeneic stem cell transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 709 ~ 711
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2382-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Satoshi Koyama, Shin Fujisawa, Reina Watanabe, Megumi Itabashi, Daisuke Ishibashi, Yoshimi Ishii, Yukako Hattori, Yuki Nakajima, Kenji Motohashi, Hiroataka Takasaki, Rika Kawasaki, Chizuko Hashimoto, Etsuko Yamazaki, Hideyuki Koharazawa, Sachiya Takemura, Naoto Tomita, Rika Sakai, Shigeki Motomura, Hideaki Nakajima	4. 巻 39
2. 論文標題 Serum ferritin level is a prognostic marker in patients with peripheral T-cell lymphoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Laboratory Hematology	6. 最初と最後の頁 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ijlh.12592	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsushita M, Ozawa K, Suzuki T, Nakamura M, Nakano N, Kanchi S, Ichikawa D, Matsuki E, Sakurai M, Karigane D, Kasahara H, Tsukamoto N, Shimizu T, Mori T, Nakajima H, Okamoto S, Kawakami Y, Hattori Y	4. 巻 7
2. 論文標題 CXorf48 is a potential therapeutic target for achieving treatment-free remission in CML patients	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Blood Cancer J.	6. 最初と最後の頁 601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/bcj.2017.84	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naoto Tomita, Masahiro Yokoyama, Wataru Yamamoto, Reina Watanabe, Yutaka Shimazu, Yasufumi Masaki, Saburo Tsunoda, Chizuko Hashimoto, et al.	4. 巻 59
2. 論文標題 The standard international prognostic index for predicting the risk of CNS involvement in DLBCL without specific prophylaxis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Leukemia and Lymphoma.	6. 最初と最後の頁 97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2017.1330541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kunimoto H, Nakajima H.	4. 巻 106
2. 論文標題 Epigenetic dysregulation of hematopoietic stem cells and preleukemic state.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 34-44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2257-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakajima H	4. 巻 106
2. 論文標題 Guest editorial: Hematopoietic stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 16-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-017-2267-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上 紘一、黒滝 大翼、川瀬 航、相馬 俊介、福地 由美、國本 博義、吉見 竜介、小出 周平、大島 基彦、小田 真由美、洪 実、菱木 貴子、早川 典代、松浦 友美、柳澤 輝一、小林 央、原口 美帆、岩間 厚志、岡本 真一郎、田久保 圭誉、田村 智彦、中島 秀明
2. 発表標題 Metabolic regulation of hematopoietic stem cells by O-linked N-acetylglucosamine transferase
3. 学会等名 幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Murakami, Daisuke Kurotaki, Wataru Kawase, et al.
2. 発表標題 Metabolic Regulation Of Hematopoietic Stem Cells By O-linked N-acetylglucosamine Transferase
3. 学会等名 JSH国際シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Murakami, Daisuke Kurotaki, Wataru Kawase, et al.
2. 発表標題 Metabolic regulation of hematopoietic stem cells by O-linked N-acetylglucosamine transferase
3. 学会等名 47th International Society for Experimental Hematology Annual Meeting
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Murakami, Daisuke Kurotaki, Wataru Kawase, et al.
2. 発表標題 O-GlcNAcylation is critical for mitochondrial dynamics in hematopoietic stem cells
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Murakami, Daisuke Kurotaki, Wataru Kawase, et al.
2. 発表標題 Regulation of mitophagy by O-linked N-acetylglucosamine transferase is essential for hematopoietic stem cell maintenance
3. 学会等名 60th American Society of Hematology Annual Meeting
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	田村 智彦 (TAMURA TOMOHIKO)  (50285144)	横浜市立大学・医学研究科・教授   (22701)	