

平成 22 年 4 月 6 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790278
 研究課題名（和文） 潰瘍性大腸炎におけるセレクトインリガンド糖鎖の硫酸化を制御する硫酸転移酵素の解析
 研究課題名（英文） Analysis of sulfotransferases involved in biosynthesis of selectin ligand carbohydrates in ulcerative colitis
 研究代表者
 小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)
 信州大学・医学系研究科・講師
 研究者番号：00362137

研究成果の概要（和文）：大腸粘膜固有層のびまん性リンパ球浸潤は潰瘍性大腸炎の特徴的像であり、高内皮細静脈様血管内腔面に発現するセレクトインリガンド糖鎖と MAdCAM-1 タンパクによって惹起される。本研究は MAdCAM-1 タンパクのセレクトインリガンド糖鎖による翻訳後修飾が、潰瘍性大腸炎の病態形成に寄与しているか否かを明らかにすることを目的に施行され、GlcNAc6ST-1 を介した MAdCAM-1 タンパクの翻訳後修飾が、潰瘍性大腸炎の臨床的活動度を規定する因子として重要である可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：A diffuse lymphocyte infiltrate characterizes ulcerative colitis, and requires at least one of the two molecular interactions: one via L-selectin and peripheral lymph node addressin (PNAd) and the other via $\alpha 4\beta 7$ integrin and mucosal addressin cell adhesion molecule 1 (MAdCAM-1). The present study was undertaken to elucidate the role of post-translational modification of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates in the pathogenesis of ulcerative colitis. In this study, ulcerative colitis disease activity is not regulated by expression of MAdCAM-1 protein itself, but rather by decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates mediated chiefly by sulfation by GlcNAc6ST-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医科学

キーワード：潰瘍性大腸炎，翻訳後修飾，高内皮細静脈様血管，MAdCAM-1，セレクトインリガンド糖鎖

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は大腸粘膜を侵す原因不明の慢性炎症性疾患である。病理組織学的には、本疾患は陰窩膿瘍に加えて、粘膜固有層のびまん性リンパ球・形質細胞浸潤で特徴付けられる。一般に、リンパ節、扁桃といった二次リンパ臓器におけるリンパ球ホーミングは、リンパ球表面に発現している L-セレクトインと、高内皮細静脈内腔面に発現している硫酸化シアリルルイス X 糖鎖との結合によって惹起される。これまでに、この硫酸化シアリルルイス X 糖鎖を発現した高内皮細静脈様血管が種々の慢性炎症性疾患で誘導されることが報告されており、申請者らも *Helicobacter pylori* 感染胃粘膜において、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖を発現した高内皮細静脈様血管が、胃粘膜固有層のリンパ球浸潤の程度に応じて誘導され、また *Helicobacter pylori* の除菌によって消失することを明らかにした (Kobayashi, *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 101: 17807-17812, 2004)。さらに、申請者らは最近、活動期潰瘍性大腸炎の粘膜固有層において、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖を発現した高内皮細静脈様血管が寛解期に比して有意に増加していることを明らかにした (Suzawa, Kobayashi, *et al. Am J Gastroenterol* 102: 1499-1509, 2007)。前までの研究では、申請者らは、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖が付加されるコアタンパクとして CD34 に着目してきたが、腸管粘膜固有層に特異的に発現している mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) は $\alpha 4\beta 7$ インテグリンのレセプターとして機能する他、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の付加を受けることにより、腸管粘膜固有層の L-セレクトイン依存性リンパ球ホーミングに関与していると考えられている (Berg, *et al. Nature* 366: 695-698, 1993)。MAdCAM-1 の糖鎖付加およびその硫酸化に関するこれまでの基礎的研究は、マウス MAdCAM-1 に関するものが多く、マウス MAdCAM-1 よりも糖鎖付加部位が豊富なヒト MAdCAM-1 に関する研究は少ない。

シアリルルイス X 糖鎖の硫酸化は *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) の 6 位の炭素に硫酸基を転移する GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase (GlcNAc6ST) によって行われる。これまでに 5 種類の GlcNAc6ST がクローニングされているが、申請者らのグループは、二次リンパ臓器の高内皮細静脈におけるシアリルルイス X 糖鎖の硫酸化は、GlcNAc6ST-1 と GlcNAc6ST-2 によって協調的に行われていることを明らかにした (Kawashima, *et al. Nat Immunol* 6: 1096-1104, 2005)。興味深いことに、リンパ

節、扁桃といった二次リンパ臓器の高内皮細静脈におけるシアリルルイス X 糖鎖の硫酸化で優位に働く GlcNAc6ST-2 をノックアウトしても、腸管粘膜パイエル板の高内皮細静脈では硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成が保たれることから、腸管粘膜固有層では GlcNAc6ST-1 の働きが優位であることが示唆される。GlcNAc6ST-1 の基質として、MAdCAM-1 上のシアリルルイス X 糖鎖が好まれる可能性も否定できない。

2. 研究の目的

本研究では、潰瘍性大腸炎で誘導される高内皮細静脈様血管、特に MAdCAM-1 陽性血管における硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関わる硫酸転移酵素を明らかにするため、以下の方法を用いて、臨床病理学および分子生物学的に解析する。

(1) 潰瘍性大腸炎のホルマリン固定パラフィン切片に対し、血管内皮細胞マーカー、MAdCAM-1、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗原に対する免疫染色を行い、MAdCAM-1 および硫酸化シアリルルイス X 糖鎖陽性血管の出現頻度を定量する。さらに組織学的に MAdCAM-1 と硫酸化シアリルルイス X 糖鎖が共存することをレーザー共焦点顕微鏡を用いて明らかにする。

(2) 上記組織切片に対して、硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関わる一連の糖転移酵素および硫酸転移酵素の発現を mRNA レベル (*in situ* ハイブリダイゼーション) およびタンパクレベル (酵素タンパクに対するペプチド抗体を用いた免疫染色) で明らかにする。

(3) 上記(1)および(2)で得られた染色結果と、患者の臨床病理学的因子との相関を統計学的に解析する。

(4) 培養細胞を用いて硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の付加されたコアタンパク (CD34 および MAdCAM-1) を作製し、免疫沈降およびウェスタンブロットによる解析で、それぞれのコアタンパクにおいて、GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 のどちらがより効率的に硫酸基を転移するかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 潰瘍性大腸炎における MAdCAM-1 および硫酸化シアリルルイス X 陽性血管の出現頻度を

定量化する：信州大学医学部附属病院で生検された潰瘍性大腸炎（活動期，寛解期の両方を含む）のホルマリン固定パラフィン切片に対し，血管内皮細胞マーカー（CD31，CD34），MAdCAM-1，硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗原に対する免疫染色を行い，大腸粘膜全血管に対する MAdCAM-1 陽性血管の頻度，および MAdCAM-1 陽性血管に対する硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗原血管の頻度を定量化する。

(2) 組織切片上で MAdCAM-1 と硫酸化シアリルルイス X 糖鎖が共存していることを明らかにする：上記組織切片に対し，MAdCAM-1 および硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗原に対する蛍光二重免疫染色を行い，これら二つの分子が組織切片上で共存していることをレーザー共焦点顕微鏡を用いた解析で明らかにする。

(3) 硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関与する硫酸転移酵素の発現と局在を mRNA レベルで確認する：上記組織切片に対し，硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関与する硫酸転移酵素（GlcNAc6ST-1，GlcNAc6ST-2）の *in situ* ハイブリダイゼーションを行い，潰瘍性大腸炎で誘導される高内皮細静脈様血管で各酵素の遺伝子転写が行われていることを確認する。

(4) 硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関与する硫酸転移酵素の発現と局在をタンパクレベルで明らかにする：硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の生合成に関与する硫酸転移酵素（GlcNAc6ST-1，GlcNAc6ST-2）に対するペプチド抗体を作製し，これを用いて潰瘍性大腸炎の組織切片を免疫染色し，上記酵素の発現と局在をタンパクレベルで明らかにする。上記(3)で行われた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果との整合性を確認する。

(5) 組織学的解析で得られた結果と，患者の臨床病理学的因子との関連性を統計的に解析する：上記の実験で得られた染色結果と，患者の臨床病理学的因子（UCDAI による臨床的活動度の Grading (Schroeder, *et al.*, *N Engl J Med* 317: 957-969, 1987)，組織学的活動度の Grading (Geoboes, *et al.*, *Gut* 47: 404-409, 2000)) との相関を統計的に解析する。

(6) GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 の硫酸転移能が，基質糖鎖のコアタンパクの違いによって変化するか否かを明らかにする：CHO 細胞に 2 種類のコアタンパク（CD34 あるいは MAdCAM-1）遺伝子のいずれかを導入し，安定発現株を樹立する。引き続き，それぞれの安定発現株に対して，硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の付加に必要な糖転移酵素 FucT-VII，

C1β3GnT，および硫酸転移酵素（GlcNAc6ST-1，GlcNAc6ST-2，あるいは vector のみ）遺伝子を順次導入し，硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の付加されたそれぞれのコアタンパクを安定発現した細胞株を樹立する。これらの細胞株から糖タンパクを回収し，それぞれのコアタンパク（CD34 あるいは MAdCAM-1）を認識する単クローン抗体を用いて免疫沈降を行った後，硫酸化シアリルルイス X 糖鎖抗原に対する単クローン抗体（MECA-79）でウェスタンブロットを行い，それぞれのコアタンパクにおいて，GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 のどちらがより効率的に硫酸基を転移するかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 活動期潰瘍性大腸炎で発現する MAdCAM-1 陽性血管に占める MECA-79 陽性血管の比率の上昇：潰瘍性大腸炎生検材料の免疫組織化学的解析では，CD34（血管内皮細胞マーカー）陽性血管に占める MAdCAM-1 陽性血管の比率には活動期，寛解期の間で有意な差がみられなかったが，MAdCAM-1 陽性血管に占める MECA-79（L-セレクトインリガンド糖鎖を認識する）陽性血管の比率は活動期で有意に増加していた（図 1，図 2）。

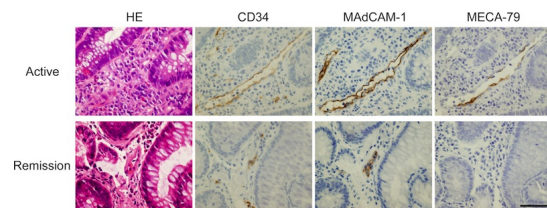


図 1 潰瘍性大腸炎における高内皮細静脈様血管の免疫組織化学

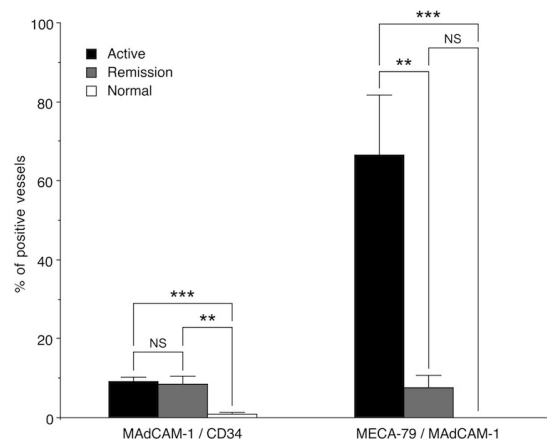


図 2 潰瘍性大腸炎活動期および寛解期における MAdCAM-1 および MECA-79 陽性血管の出現頻度

(2) MAcCAM-1 タンパクと MECA-79 陽性セレクトリリガンド糖鎖の共在：レーザー共焦点顕微鏡を用いた解析では、活動期で出現する高内皮細静脈様血管内腔面には MAcCAM-1 と L-セレクトリリガンド糖鎖が同部位に局在しており、活動期特異的に MAcCAM-1 が L-セレクトリリガンド糖鎖によって翻訳後修飾されている可能性が示された (図 3)。

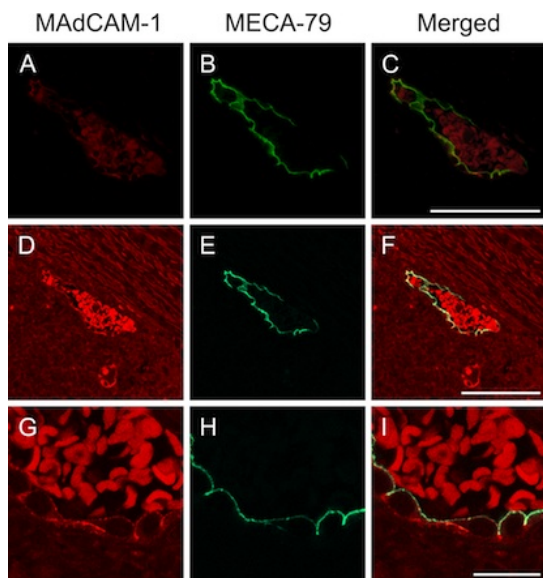


図 3 レーザー共焦点顕微鏡を用いた MAcCAM-1 タンパクと MECA-79 陽性セレクトリリガンド糖鎖の共在解析

(3) 活動期潰瘍性大腸炎における GlcNAc6ST-1 遺伝子発現の上昇と GlcNAc6ST-1 の基質タンパク特異性：RT-PCR による解析では、硫酸転移酵素 GlcNAc6ST-1, GlcNAc6ST-2 のうち、GlcNAc6ST-1 の発現が活動期に特異的にみられ、L-セレクトリリガンド糖鎖の硫酸化は GlcNAc6ST-1 が主に行っている可能性が示された (図 4)。培養細胞を用いた系では、GlcNAc6ST-2 はコアタンパク CD34 および MAcCAM-1 上のシアリルルイス X 糖鎖にほぼ同様に硫酸基を転移したが、GlcNAc6ST-1 は MAcCAM-1 タンパク上のシアリルルイス X 糖鎖に特異的に硫酸基を転移した (図 5)。

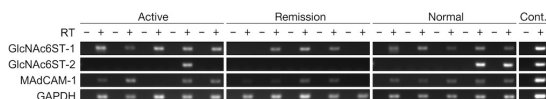


図 4 RT-PCR を用いた潰瘍性大腸炎における硫酸転移酵素の発現解析

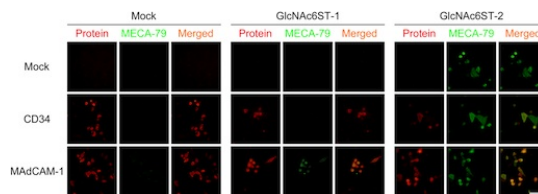


図 5 CHO 遺伝子導入株を用いた MAcCAM-1 の GlcNAc6ST-1 を介した硫酸化シアリルルイス X 糖鎖の発現

以上の結果から、高内皮細静脈様血管における GlcNAc6ST-1 を介した MAcCAM-1 タンパクの翻訳後修飾が、潰瘍性大腸炎の臨床的活動度を規定する因子として重要である可能性が示された。本研究課題申請時の目標は概ね達成され、硫酸化糖鎖による MAcCAM-1 タンパク翻訳後修飾の重要性を英文論文で報告することができた。また、その内容は既に他論文で引用されている。今後は本研究課題では取り上げなかった MAcCAM-1 と $\alpha 4 \beta 7$ インテグリンの潰瘍性大腸炎をはじめとする炎症性腸疾患における機能と発現意義を探求したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Bao X, Kobayashi M, Hatakeyama S, Angata K, Gullberg D, Nakayama J, Fukuda MN, Fukuda M. Tumor suppressor function of laminin-binding α -dystroglycan requires a distinct $\beta 3$ -N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12109-12114, 2009. (査読有)
2. Benoit NB, Kobayashi M, Kawakubo M, Takeoka M, Sano K, Zou J, Itano N, Tsutsui H, Noda T, Sagara J, Fukuda M, Nakayama J, Taniguchi S. Role of ASC in the mouse model of *Helicobacter pylori* infection. *J Histochem Cytochem* 57: 327-338, 2009. (査読有)
3. Kobayashi M, Fukuda M, Nakayama J. Role of sulfated O-glycans expressed by HEV-like vessels in pathogenesis of chronic inflammatory gastrointestinal diseases. *Biol Pharm Bull* 32: 774-779, 2009. (査読有)
4. Kobayashi M, Lee H, Nakayama J, Fukuda M. Roles of mucin-type O-glycans in the pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Glycobiology* 19: 453-461, 2009. (査読有)

5. Kobayashi M, Lee H, Nakayama J, Fukuda M. Carbohydrate-dependent defense mechanisms against *Helicobacter pylori* infection. *Curr Drug Metab* 10: 29-40, 2009. (査読有)

6. Kobayashi M, Hoshino H, Masumoto J, Fukushima M, Suzawa K, Kageyama S, Suzuki M, Ohtani H, Fukuda M, Nakayama J. GlcNAc6ST-1-mediated decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrates directs disease activity of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 15: 697-706, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. Kobayashi M, Mitoma J, Fukuda M, Nakayama J. The HECA-452-positive but MECA-79-negative immunohistochemical profile of HEV-like vessels is characteristic for the diagnosis of gastric MALT lymphoma. Annual Conference of the Society for Glycobiology, San Diego, CA, USA, 2009.

2. 小林基弘, 伊藤 誠, 岩谷 舞. Primary colonic signet-ring cell carcinoma presenting carcinocythemia: an autopsy case. 第98回日本病理学会総会, 京都, 2009.

3. Kobayashi M, Hoshino H, Masumoto J, Fukushima M, Suzawa K, Fukuda M, Nakayama J. Decoration of MAdCAM-1 protein with L-selectin ligand carbohydrate mediated by GlcNAc6ST-1 directs disease activity of ulcerative colitis. Annual Conference of the Society for Glycobiology, Fort Worth, TX, USA, 2008.

4. Bao X, Kobayashi M, Hatakeyama S, Yu SY, Angata K, Gullberg D, Khoo KH, Nakayama J, Fukuda MN, Fukuda M. Laminin-binding glycans attached to α -dystroglycan function as a novel tumor suppressor. Annual Conference of the Society for Glycobiology, Fort Worth, TX, USA, 2008.

5. 小林基弘, 福島万奈, 大谷明夫, 中山 淳. Preferential glycosylation of MAdCAM-1 on high endothelial venule-like vessels in ulcerative colitis. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008.

6. 酒井康弘, 小林基弘, 大谷明夫, 中山 淳. Preferential induction of PNAd on HEV-like vessels in active phase of ulcerative colitis. 第97回日本病理学会総会, 金沢, 2008.

小林 基弘 (KOBAYASHI MOTOHIRO)

信州大学・医学系研究科・講師

研究者番号 : 00362137

6. 研究組織

(1) 研究代表者