

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02389

研究課題名（和文）骨髄ニッチにおいてホーミングと造血幹細胞分化を制御するガラクトース糖鎖の解析

研究課題名（英文）Analysis of galactose carbohydrates regulating homing and differentiation of HSC in the bone marrow niche

研究代表者

浅野 雅秀（ASANO, Masahide）

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50251450

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：造血幹細胞（HSC）の移植後の骨髄へのホーミングに重要なCXCR4の糖鎖機能の研究から、CXCR4のN末端に位置する2つのO型糖鎖付加部位の重要性を見出した。この部位にO型糖鎖が付加しない変異型CXCR4は培養細胞の遊走活性を促進できなかった。この変異型CXCR4を導入したCXCR4欠損胎仔肝由来HSCをレシピエントに移植しても、野生型とは異なりHSCのホーミングは亢進せず、ゲノム編集で作製したCXCR4変異マウスの骨髄由来HSCを移植しても、コントロールに比べてホーミング活性が半分以下に低下した。以上からCXCR4のO型糖鎖付加部位はHSCのホーミングに需要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりHSCの移植後の骨髄へのホーミングにCXCR4の糖鎖が重要な役割を担っていることがわかった。造血幹細胞移植、特に臍帯血移植において生着不全の原因の一つに糖鎖不全が関わる可能性が考えられる。まずはCXCR4分子などの糖鎖不全をスクリーニングすることで生着不全のHSCを排除することができるかもしれない。また、HSCの糖鎖不全をin vitroで酵素的に修復することも今後研究が進むことが期待される。より安全で効率的なHSC移植医療の発展への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：From studies on the glycan function of CXCR4, which is important for homing of hematopoietic stem cells (HSCs) to the bone marrow after transplantation, we found that two O-glycosylation sites located at the N-terminus of CXCR4 are important. Mutant CXCR4 without O-glycosylation at these sites failed to promote migration activity of cultured cells. Transplantation of CXCR4-deficient fetal liver-derived HSCs transfected with the mutant CXCR4 did not enhance homing of HSCs, unlike the wild type, and transplantation of bone marrow-derived HSCs from genome-edited CXCR4 mutant mice reduced homing activity to less than half that of the control HSCs. These results indicate that the O-glycosylation site of CXCR4 is required for homing of HSCs.

研究分野：実験動物学

キーワード：骨髄移植 造血幹細胞 ホーミング ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

同種造血幹細胞移植は難治性造血器腫瘍や再生不良性貧血などに対する根治的治療法として広く実施されている。移植ソースとして骨髄や末梢血、臍帯血が用いられるが、ドナーに負担がないことやHLA不適合の許容範囲が広いことから臍帯血が注目されている。しかし臍帯血中に含まれる造血幹細胞(HSC)数は骨髄に比して少なく、臍帯血移植の20-30%は生着不全により致命的となるとの報告がある(Bone Marrow Transplant, 2019)。

HSCが移植後に骨髄にホーミング・生着し、自己複製あるいは各種血液細胞に分化する際には、HSCと骨髄ニッチとの相互作用が重要である。HSCは各分化段階の前駆細胞を経て、リンパ球系(B, T, NK細胞)、ミエロイド系(赤血球, 巨核球), 顆粒球系(単球, 顆粒球)のすべての血液細胞に最終分化する(Nature, 2000など)。各段階の前駆細胞への分化には様々な液性分子(ケモカインやサイトカイン)や細胞表面分子が作用することが徐々に解明されてきているが、各分化段階に進む分子機構は不明な点が多い。細胞と細胞の接着・結合に重要な役割を果たす細胞表面分子は糖鎖修飾により制御されていることが、セレクトインとそのリガンド糖鎖などいくつかのシステムで解明された。しかし、HSCのホーミング・生着や分化における糖鎖の役割はほとんどわかっていない。

我々は生体内での糖鎖機能を解明するために、各種の機能性糖鎖の形成に重要なガラクトースの転移酵素群(β4GalTs)に注目して、遺伝子改変マウスの手法を用いて研究を行ってきた(Asano M, *Exp. Anim.*, 2020)。その中でガラクトース転移酵素の一つβ4GalT-1が、細胞接着に重要なセレクトインのリガンド糖鎖の合成を担っていることがわかり、β4GalT-1欠損マウスは白血球のセレクトインリガンド糖鎖の発現が減少したために、炎症反応が減弱し(Asano M, *et al.*, *Blood*, 2003)、皮膚の創傷治癒が遅延すること(Mori R, *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 2004)を明らかにした。

以上のことから糖鎖はHSCの移植後の骨髄へのホーミング・生着やHSCの増殖や分化にも関与している可能性が考えられる。実際にβ4GalT-1欠損マウスの骨髄におけるHSCの数やコロニー形成率は正常であったが、β4GalT-1欠損HSCを移植した場合にレシピエントマウスの骨髄にほとんど生着せず、致死量の放射線照射したレシピエントの生存を維持できなかった。さらにβ4GalT-1欠損HSCを移植して24時間後に、レシピエントの骨髄から細胞を調製してコロニー形成率を測定したところ、コントロールの10%程度に低下しており、ホーミングに大きな異常があることがわかった(Takagaki S, *et al.*, *Sci Rep.*, 2019)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、β4GalT-1欠損マウスのHSCのホーミング・生着と分化の異常がHSC表面のどのような糖タンパク質のどのような糖鎖不全に起因するのかを明らかにすることである。ホーミングや分化を制御する糖タンパク質が同定できた場合は、その糖鎖付加部位を欠損したマウスを作製して、ホーミングや分化における糖鎖の重要性を証明する。さらに糖鎖部分の改良を行うことでホーミング活性を亢進させ、移植効率の向上を目指す。

3. 研究の方法

(1) 野生型および変異型CXCR4強制発現細胞の遊走活性の測定

CXCR4をほとんど発現していないHEK293細胞とNIH3T3細胞に、野生型と変異型のCXCR4遺伝子を導入して、G418で選別後それぞれ複数個のクローンを選別した。それぞれのクローンにおける導入CXCR4の発現量をウエスタンブロットとRT-PCRにより定量し、同程度の発現量を示すクローンを遊走活性測定に回した。CXCL12依存的な遊走活性測定はWound healing assayとTranswell assayの二つの方法により行なった。

(2) CXCR4強制発現細胞のCXCL12への結合と細胞遊走シグナル伝達の測定

CXCR4とCXCL12の結合は抗体の結合と同程度の強い結合を示すので、CXCR4強制発現細胞への蛍光標識したCXCL12の結合をFACSで解析した。また、CXCR4強制発現細胞をCXCL12で刺激後、細胞遊走シグナル伝達分子であるFAK, MEK1/2, PI3Kのリン酸化の程度をウエスタンブロットにより定量した。

(3) CXCR4強制発現HSCの移植後の骨髄へのホーミング活性の測定

野生型と変異型CXCR4を発現するレンチウイルスベクターを作製し、CXCR4欠損胎仔の肝細胞に感染させた。導入CXCR4遺伝子が発現していることを確認後、9.5 greyのγ線照射したレシピエントマウスに眼窩静脈より移植した。移植24時間後にレシピエントマウス的大腿骨から骨髄細胞を調製し、FACSによりKSL細胞を定量した。

(4) ゲノム編集により作製したCXCR4変異HSCの骨髄へのホーミング活性の測定

CRISPR-Cas9法を用いてCXCR4の2カ所のO型糖鎖付加部位であるSerをAlaに置換したゲ

ノム編集マウスを作製した。CXCR4 欠損マウスとは異なり、この変異マウスは正常に出生して成長した。そこでこの変異マウスとコントロールマウスの骨髄細胞を調製し、(3)と同様に γ 線照射したレシピエントマウスに移植した。この移植ではドナー細胞とレシピエント細胞を明確に区別するためにドナーマウスは CD45.2, レシピエントマウスは CD45.1 のものを用いた。移植 24 時間後にレシピエントマウスの大腿骨から骨髄細胞を調製し、FACS により CD45.2 細胞を定量した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた細胞遊走活性に重要な CXCR4 の糖鎖付加部位の同定

HSC の骨髄へのホーミングには CXCR4 や $\alpha 4/\beta 1$ -integrin などのタンパク質が重要な役割を果たしていることが知られているが、特に CXCR4 の N 末端の 38 アミノ酸がリガンドである CXCL12 への結合に必須であり、この領域には N 型 (Asn 結合型) 糖鎖や O 型 (Ser/Thr 結合型) 糖鎖が付加することが知られている (図 1)。そこで HEK293 細胞と NIH3T3 細胞に CXCR4 を強制発現させて、Wound healing assay と Transwell assay の二つの方法による CXCL12 依存的な遊走活性の測定方法を確立した。CXCR4 を強制発現させた細胞に CXCL12 を添加すると遊走活性が促進し、CXCR4 の阻害剤である AMD3100 を添加するとその活性は消失したので、CXCL12 依存的な遊走活性が測定できた。

次に CXCR4 の N 末端の 38 アミノ酸には N 型糖鎖付加可能部位が 1 つと O 型糖鎖付加可能部位が複数存在するので、これらのサイトにひとつずつあるいは複数のアミノ酸置換 (Asn \rightarrow Gln, Ser \rightarrow Ala) を行い、それぞれのサイトに糖鎖が付加しない変異型 CXCR4 を網羅的に作製した。これらの変異体を HEK293 細胞と

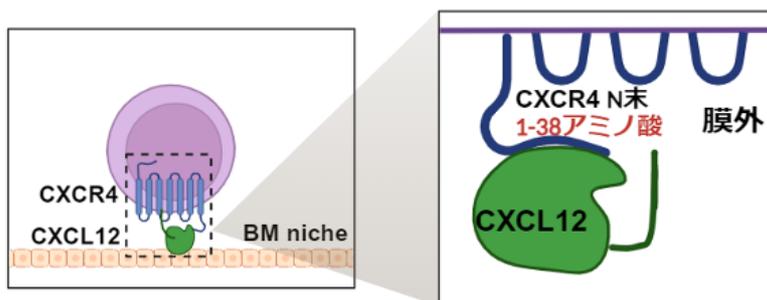


図 1 CXCR4 の N 末端 38 アミノ酸は CXCL12 との結合に必須

NIH3T3 細胞に強制発現して、CXCL12 依存的な遊走活性を測定したところ、2カ所の O 型糖鎖付加可能部位の変異体だけが遊走活性が消失した (図 2)。さらにこの変異体は CXCL12 との結合が弱くなり、細胞遊走シグナル伝達に参与する FAK などのタンパク質のリン酸化が、この変異体では CXCL12 の刺激で亢進しないことを明らかにした。以上のことからこの 2カ所の O 型糖鎖付加可能部位が遊走活性に必須であることが明らかとなった。

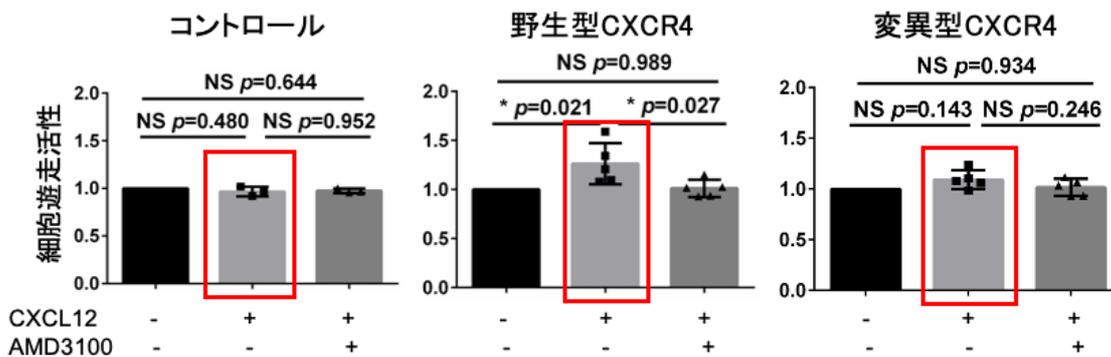


図 2 細胞遊走活性の測定 (Wound healing assay, HEK293細胞)

(2) 同定した部位への O 型糖鎖付加の可能性

1 つの N 型糖鎖付加可能部位には実際に N 型糖鎖が付加していることが報告されているが、O 型糖鎖付加可能部位に O 型糖鎖が付加している可能性については、O 型糖鎖付加部位を予測する NetOGlyc4.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/NetOGlyc-4.0/>) によって計算した。CXCR4 の全長には 49 カ所の Ser あるいは Thr が存在するが、今回同定した 2カ所の O 型糖鎖付加可能部位のスコアは 0.7 を超えており、他のサイトより明らかに高い値を示したことから、O 型糖鎖が付加している可能性が高いと考えられた。さらに作製した変異型 CXCR4 をウエスタンブロットで分子量を比較したところ、N 型糖鎖が付加しない変異体は野生型より分子量が小さくなり、さらにこの 2カ所に O 型糖鎖が付加しない変異体はさらに分子量が小さくなり、O 型糖鎖が付加している可能性が示唆された。

(3) CXCR4 強制発現胎仔肝細胞の移植後の骨髄へのホーミング

CXCR4 の野生型とこの変異型を発現するレンチウイルスベクターを作製して、感染により HSC への導入を行った。CXCR4 欠損マウスは出生時致死となるため、胎仔期の HSC が存在する胎仔肝細胞への導入を行った。CXCR4 欠損胎仔の肝細胞に導入し、野生型と変異型の CXCR4 が同程度発現していることを確認した後、 γ 線照射したレシピエントマウスに移植した。野生型 CXCR4 を発現する HSC のホーミング活性は4倍程度上昇したが、変異型 CXCR4 はその効果が消失した。以上のことからこの変異型 CXCR4 は胎仔肝臓 HSC のホーミングを促進しないことがわかった。

(4) ゲノム編集により作製した CXCR4 変異骨髄細胞の骨髄へのホーミング

骨髄由来 HSC のホーミング活性を解析するために、ゲノム編集によりこの2カ所の O 型糖鎖付加可能部位に点変異を導入したマウスを作製した。この変異マウスとコントロールマウスの骨髄細胞を γ 線照射したレシピエントマウスに移植したところ、予想通り変異型 CXCR4 マウスの HSC のホーミング活性はコントロールの半分以下に低下した (図3)。胎仔肝臓細胞についても移植実験を行なった。それぞれの O 型糖鎖付加可能部位の1カ所に変異を導入したマウスの HSC のホーミング活性は野生型と差がなかったが、2カ所の O 型糖鎖付加可能部位に点変異を導入したマウスの HSC は野生型の半分程度で、CXCR4 欠損マウスの HSC と同程度であった。以上の結果から CXCR4 の N 末端に付加する2つの O 型糖鎖は、CXCR4 のホーミング活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。ホーミング活性の低下が CXCR4 欠損 HSC と同程度であったことから、CXCR4 のホーミング活性にはこの2つの O 型糖鎖が必須であることが考えられた。

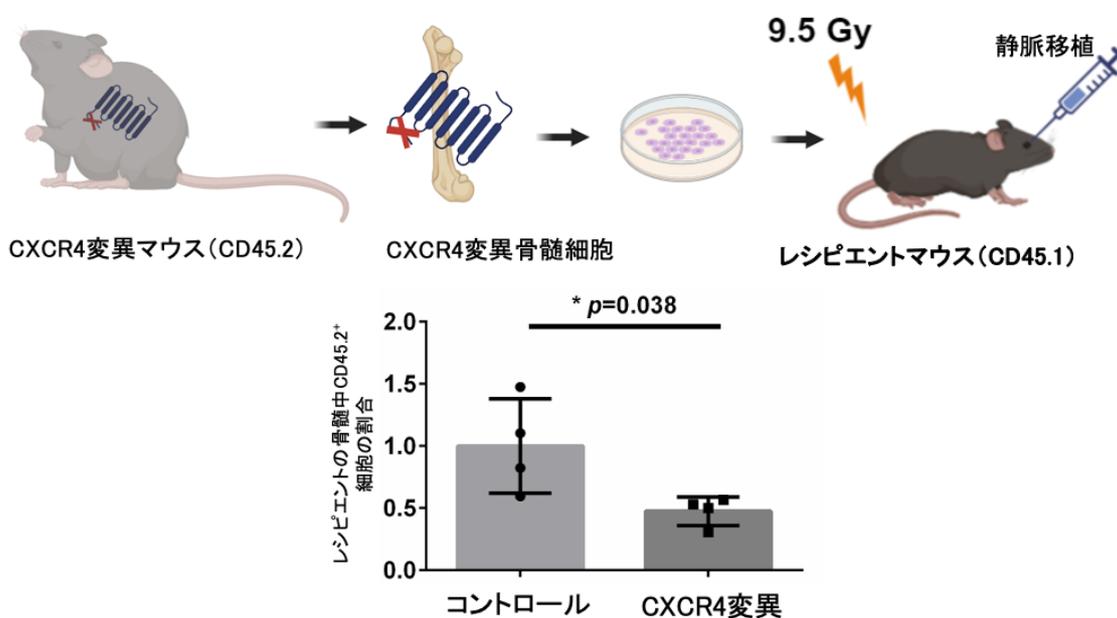


図3 CXCR4変異マウス由来骨髄細胞のホーミング活性の測定

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 XUCHI PAN, Chie Naruse, Tomoko Matsuzaki, Masahide Asano
2. 発表標題 Study on proteins and glycans that play an important role in bone marrow homing of hematopoietic stem cells
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 PAN XUCHI, 成瀬智恵, 松崎朋子, 杉原一司, 浅野雅秀
2. 発表標題 造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要な働きをするタンパク質とその糖鎖構造についての研究
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 PAN XUCHI, 成瀬智恵, 松崎朋子, 杉原一司, 浅野雅秀
2. 発表標題 造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要な働きをするタンパク質とその糖鎖構造についての研究
3. 学会等名 第71回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

実験動物学分野研究室

<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html>

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	成瀬 智恵 (Naruse Chie) (30372486)	京都大学・医学研究科・准教授 (14301)	

	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 協力者	杉原 一司 (Sugihara Kazushi) (10377418)	京都大学・医学研究科・技術専門職員 (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------