

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07135

研究課題名(和文)造血幹細胞の骨髄ホーミングにおける糖鎖の機能解析と糖鎖付与による効率向上の試み

研究課題名(英文)Functions of B4galt1 in the homing of hematopoietic stem cells.

研究代表者

成瀬 智恵(Naruse, Chie)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：30372486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：4ガラクトシルトランスフェラーゼ-1ノックアウト(4GalT-1^{-/-})骨髄由来造血幹細胞がレシピエントマウスに生着できないことを、コロニー形成アッセイや、直接的観察で示した。また、胎仔性4GalT1^{-/-}造血幹細胞が野生型マウスに生着するかどうかを解析した結果、胎仔性4GalT1^{-/-}造血幹細胞も、成体同様、移植後生着できないことがわかった。さらに、多能性前駆細胞数は4GalT-1^{-/-}骨髄細胞において若干増加していたが、造血幹細胞数は野生型と差が認められなかった。よって、4GalT-1は造血幹細胞の数や増殖能には関与せず、ホーミングに必須であろうと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

造血幹細胞が骨髄にホーミングするためには4GalT-1によって合成されるN型糖鎖が必須であることが明らかになった。臍帯血の造血幹細胞は、成人骨髄中の造血幹細胞と比較すると糖鎖修飾に違いがあることが報告されているので、これが臍帯血に含まれる造血幹細胞の低いホーミング活性が糖鎖修飾の違いによるものだとすれば、糖鎖修飾技術を応用して臍帯血に含まれる造血幹細胞のホーミング活性を増強することで、移植効率の飛躍的向上をもたらす方法の開発につながる可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Colony formation assay and direct observation showed that 4-galactosyltransferase-1 knockout (4GalT-1^{-/-}) bone marrow-derived hematopoietic stem cells could not engraft in recipient mice. In addition, as a result of analyzing whether or not fetal 4GalT1^{-/-} hematopoietic stem cells engraft in wild-type mice, it was found that fetal 4GalT1^{-/-} hematopoietic stem cells cannot engraft after transplantation as in adults. Furthermore, the number of pluripotent progenitor cells was slightly increased in 4GalT-1^{-/-} bone marrow cells, but the number of hematopoietic stem cells was not different from that of wild type. Therefore, 4GalT-1 was considered to be essential for homing, not related to the number and proliferative capacity of hematopoietic stem cells.

研究分野：発生生物学, 糖鎖生物学, 実験動物学

キーワード：造血幹細胞 ホーミング 糖鎖 マウス B4galt1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨髄移植は白血病や悪性リンパ種、再生不良性貧血など、多くの血液疾患の治療法として確立されているが、ヒト骨髄細胞の採取は全身麻酔が必要であるためドナーへの負担が大きい。また、ヒト白血球抗原 (HLA) が一致しないと移植ができない。骨髄移植に代わる方法として近年臍帯血移植の実施例が増加している。臍帯血移植は、出産後不要になる臍帯を提供するのみなのでドナーの負担が軽く、HLA が完全に一致しない場合でも実施可能であるのが利点である。しかし、生着の効率が悪く、レシピエントへの生着の遅延や失敗が多いことが欠点であり、これらの欠点を克服することは移植医療にとって急務である。

骨髄移植や臍帯血移植の成否は、これらの細胞集団に含まれる造血幹細胞が、骨髄中の造血幹細胞ニッチと呼ばれる、造血幹細胞を維持・増殖させる場所に生着できるかどうかにかかっている。造血幹細胞表面には CD34, セレクチンのリガンド糖鎖, インテグリン, ケモカイン受容体 CXCR4 などの細胞表面糖タンパク質が多数存在しており、骨髄移植の際に造血幹細胞がニッチにホーミングするためには、これらの分子やリガンドの糖鎖修飾が必要であることが示唆されている (Immunity 19, 257-67 2003; JBC 283, 26364-73 2008)。しかしながら、野生型骨髄細胞をセレクチン欠損マウスに移植した場合、ホーミング活性が低下するものの、全く生着しないということはない (PNAS 95, 14423-28 1998)。インテグリンや CXCR4 の糖鎖修飾がパートナーとの結合に重要であるとの報告もあるが、造血幹細胞が骨髄にホーミングする際に糖鎖修飾が必要かどうかは、研究開始当初は不明であった。

これまで1つの遺伝子の欠損で骨髄移植が全く成立しなくなる例はほとんどなく、造血幹細胞の骨髄ホーミングに決定的に必要な因子は、現在でも同定されていない。また、糖鎖の関与もあまり注目されなかった。そのような中、我々はN型あるいはO型糖鎖にガラクトースを転移する $\beta 4$ ガラクトシルトランスフェラーゼ1のノックアウト ($\beta 4gal t1^{-/-}$) 造血幹細胞の、骨髄へのホーミング能が非常に低いという結果を得た。骨髄移植 24 時間後にレシピエントの骨髄、脾臓、末梢血に存在するドナー由来の造血幹細胞をコロニー形成法で測定した結果、骨髄にホーミングした $\beta 4gal t1^{-/-}$ 造血幹細胞は野生型の 1/10 以下しかなかった。NOD/SCID マウスに $\beta 4gal t1^{-/-}$ 骨髄細胞を移植した場合でも骨髄へのホーミングができなかったため、免疫学的な排除の可能性は低いと考えられた。また、野生型骨髄細胞と $\beta 4gal t1^{-/-}$ 骨髄細胞を混合してレシピエントマウスに移植した場合、レシピエントマウスが死亡することはなくなった。しかし、再構築された血球細胞はほぼ野生型骨髄細胞由来であり、 $\beta 4gal t1^{-/-}$ 骨髄細胞由来の血球細胞はほとんど存在しなかった。これらの結果は、 $\beta 4gal t1$ が合成する糖鎖構造が、造血幹細胞の骨髄ホーミングに必須であることを示唆していた。さらに、 $\beta 4gal t1^{-/-}$ マウスの末梢血では赤血球が減少しているという表現型が認められたため、骨髄での造血幹細胞の分化にも $\beta 4gal t1$ の合成する糖鎖構造が関与している可能性が示唆されていた。

2. 研究の目的

$\beta 4gal t1$ が造血幹細胞の生着および造血幹細胞から血液細胞への分化にどのように関与しているかを解析する。

(1) $\beta 4gal t1^{-/-}$ 骨髄細胞の移植によりレシピエントマウスが生存できない原因が、骨髄中の造血幹細胞ニッチへ到達しているのに生着できないためか、それ以前に幹細胞ニッチへ到達できていないためかを、直接観察法によって明らかにする。

(2) $\beta 4gal t1$ が合成する糖鎖構造が造血幹細胞のホーミングをサポートするのであれば、発生時に胎仔肝臓に存在し、出生直後に骨髄内に移入する造血幹細胞の移動もサポートする可能性がある。しかしながら、 $\beta 4gal t1^{-/-}$ マウスの骨髄に含まれる造血幹細胞は野生型マウスと同様の数であったため、胎仔期の造血幹細胞の移動には問題がないようであった。そこで、胎仔肝臓に存在する造血幹細胞のホーミングも $\beta 4gal t1$ 依存的に起こるのか、解析する。

(3) $\beta 4gal t1^{-/-}$ 骨髄細胞の移植はこれまで致死量放射線を照射したマウスに対して単回で行なっていたが、これまでの報告により、長期にわたり血液細胞を共有することで、ドナーの造血幹細胞がレシピエントに生着することがわかっている。そこで、単回の移植ではなく、長期にわたって造血幹細胞を移入すれば $\beta 4gal t1^{-/-}$ マウス造血幹細胞も生着する可能性を検討する。

(4) 野生型および $\beta 4gal t1^{-/-}$ マウスの Hoxb5 陽性長期造血幹細胞の数および割合を解析し、長期造血幹細胞の維持に $\beta 4gal t1$ が関与しているかどうかを解析する。さらに、 $\beta 4gal t1^{-/-}$ 骨髄細胞の分化の状態を野生型と比較する。

3. 研究の方法

(1) レシピエント骨髄における $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞の直接的検出

骨髄の直接観察は先行文献 (Blood 97, 3292–99 2001, Nature 530, 223–7 2016) に従って行った。 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}/\text{CAG-GFP}$ 骨髄細胞を、致死量放射線を照射した野生型 C57BL/6J マウスに移植した。移植から 24 時間後にレシピエントマウス的大腿骨を採取、固定し、川本法により切片を作製した。顕微鏡下で DAPI 陽性細胞および GFP 陽性細胞数をカウントし、解析を行なった。また、同時にコロニー形成アッセイを行った。

(2) 胎仔造血幹細胞の移植

造血幹細胞は胎仔期には肝臓に存在することから、胎仔性 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 造血幹細胞が移植後に野生型マウスに生着するかどうかを解析した。 $\beta 4gal\text{t}1^{+/-}/\text{CAG-GFP}$ マウスと $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスの卵子と精子を体外受精させて ICR 偽妊娠マウスに移植し、胎生 15 日目の胚より肝臓を回収し、放射線を致死量照射した C57BL/6 野生型マウスに静脈移植した。また、胎仔肝臓の細胞を用いてコロニー形成アッセイを行なった。

(3) パラバイオーシスによる造血幹細胞の移入

CAG-GFP トランスジェニック (GFP⁺) マウスと野生型マウスの 2 匹をつなぎ、血液細胞を共有させるパラバイオーシスを行い、2, 3 週間後に野生型マウスに GFP⁺ マウスの造血幹細胞が移行したかどうかを、野生型マウスの骨髄細胞をコロニー形成アッセイで調べた。

(4) 骨髄における長期造血幹細胞および骨髄細胞の分化状態の解析

Hoxb5-mCherry ノックインマウス (Nature 2016: スタンフォード大より入手) と $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスを交配して、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}/\text{Hoxb5-mCherry}$ マウス (以下 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}/\text{mC}$) を作製し、フローサイトメーターを用いて、骨髄細胞における長期造血幹細胞の数や割合を解析した。

4. 研究成果

(1) レシピエント骨髄における $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞の直接的検出

レシピエント的大腿骨中の GFP 陽性細胞を移植 24 時間後という早期に観察した。その結果、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}/\text{CAGGFP}$ 骨髄細胞を移植した時の GFP 陽性細胞は、 $\beta 4gal\text{t}1^{+/-}/\text{CAGGFP}$ を移植した時と比べて、全く存在しないわけではないものの約 1/5 に低下していた (図 1)。よって、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞は、大腿骨中には侵入できるものの、骨髄中のニッチに留まることができずに生着できないことが示唆された。

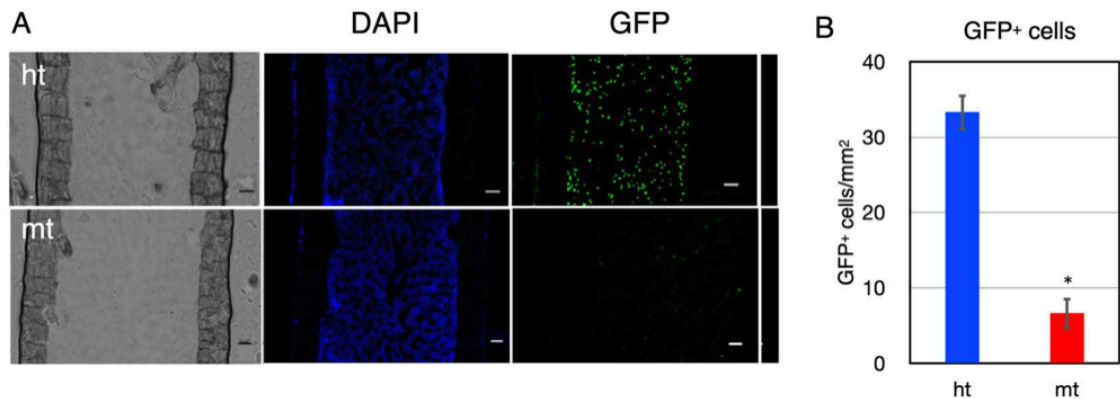


図 1 大腿骨中の GFP 陽性細胞の観察 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}/\text{CAGGFP}$ 骨髄細胞 (mt) を移植した時は、 $\beta 4gal\text{t}1^{+/-}/\text{CAGGFP}$ 骨髄細胞 (ht) を移植した時よりも GFP 陽性細胞数が低下していた。

(2) 胎仔造血幹細胞の移植

造血幹細胞は胎仔期には肝臓に存在することから、胎仔性 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 造血幹細胞が移植後に野生型マウスに生着するかどうかを解析した。 $\beta 4gal\text{t}1^{+/-}$ 胚および $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 胚より肝臓を回収し、放射線を致死量照射した C57BL/6 野生型マウスに静脈移植した結果、 $\beta 4gal\text{t}1^{+/-}$ 細胞を移植されたマウスはほとんどが 2 週間以上生存したが、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 細胞を移植されたマウスは、移植されなかった対照群同様、全て 10

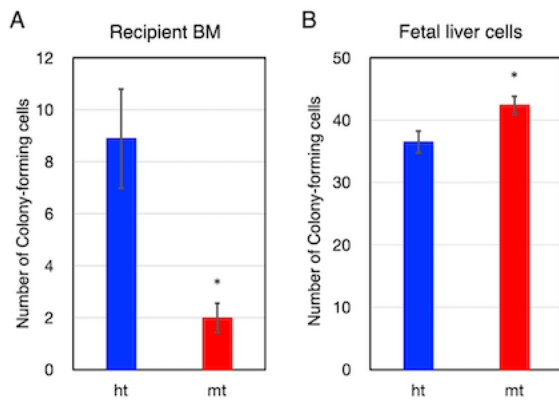


図 2 胎仔造血幹細胞移植後のコロニー形成アッセイ

日以内に死亡した。レシピエントの骨髄における造血幹細胞の数を調べた結果、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 細胞を移植されたマウスでは $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 細胞を移植されたマウスよりも減少していた (図 2A)。また、胎子の肝臓に含まれる造血幹細胞数をコロニー形成アッセイにより調べたところ、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 肝臓にむしろ多く含まれることから (図 2B)、胎仔性 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 造血幹細胞も、成体の造血幹細胞と同様、移植後生着できないことがわかった。これらの結果から、生体の骨髄造血幹細胞と胎仔性造血幹細胞は、レシピエントの骨髄に生着する際、同じメカニズムで生着していることが示唆された。

(3) パラバイオーシスによる造血幹細胞の移入

2匹のマウスの血流をつないで共有させるパラバイオーシスを用いて、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 造血幹細胞が野生型マウスに生着するかどうかを解析した。CAG-GFP トランスジェニック (GFP⁺) マウスと野生型マウスの2匹をつなぐパラバイオーシスを行い、2, 3週間後に野生型マウスにGFP⁺マウスの造血幹細胞が移行したかどうかを、野生型マウスの骨髄細胞をコロニー形成アッセイで調べた。野生型マウスの骨髄細胞をMethocult3434培地で培養したところ、GFP陽性細胞が1-6%程度得られたので、パラバイオーシスによって数%の造血幹細胞が移行すると考えられた。しかしながら、全く得られないこともあり、実験結果が安定しないので、遺伝背景を考慮する必要などがあると考えられた。

(4) 骨髄における長期造血幹細胞および骨髄細胞の分化状態の解析

$\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスの骨髄細胞を、フローサイトメーターを用いて定量的に解析した。骨髄細胞のコロニー形成アッセイによって $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスの広義な造血幹細胞が野生型と同数存在することがわかっていた (図 3C) が、さらにフローサイトメーターを用いて定量的に造血幹細胞の割合を調べた。Lineage⁻; c-kit⁺; Sca-1⁺; Flk2⁻; CD34⁻; CD150⁺である造血幹細胞 (pHSC) の割合を調べた結果 (図 3A), $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスと野生型で差がないことが確認された (図 3B)。またHoxb5発現を標識したmCherry陽性細胞 (長期造血幹細胞) 数も、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスと野生型で差がなかった。さらに、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞の分化状態を、フローサイトメーターを用いて解析した。多能性造血前駆細胞 (MPP) 数は $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞において3倍増加していたが、造血幹細胞 (pHSC) 数は野生型と差が認められなかった (図 3B)。よって、 $\beta 4gal\text{t}1$ は造血幹細胞の数や増殖能には関与せず、ホーミングに必須であろうと考えられた。

またHoxb5発現を標識したmCherry陽性細胞 (長期造血幹細胞) 数も、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスと野生型で差がなかった。さらに、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞の分化状態を、フローサイトメーターを用いて解析した。多能性造血前駆細胞 (MPP) 数は $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ 骨髄細胞において3倍増加していたが、造血幹細胞 (pHSC) 数は野生型と差が認められなかった (図 3B)。よって、 $\beta 4gal\text{t}1$ は造血幹細胞の数や増殖能には関与せず、ホーミングに必須であろうと考えられた。

$\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスにおいて、骨髄における造血幹細胞の数やコロニー形成能は正

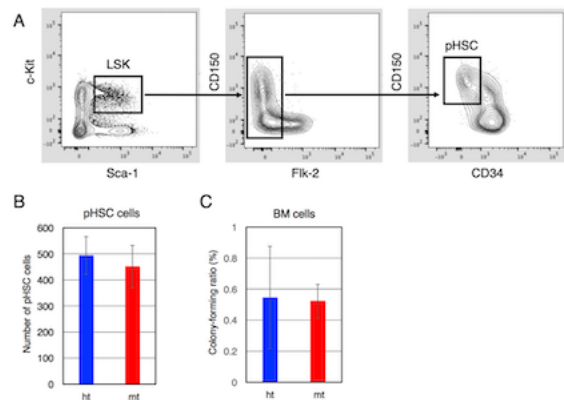


図3 フローサイトメーターによる造血幹細胞の定量

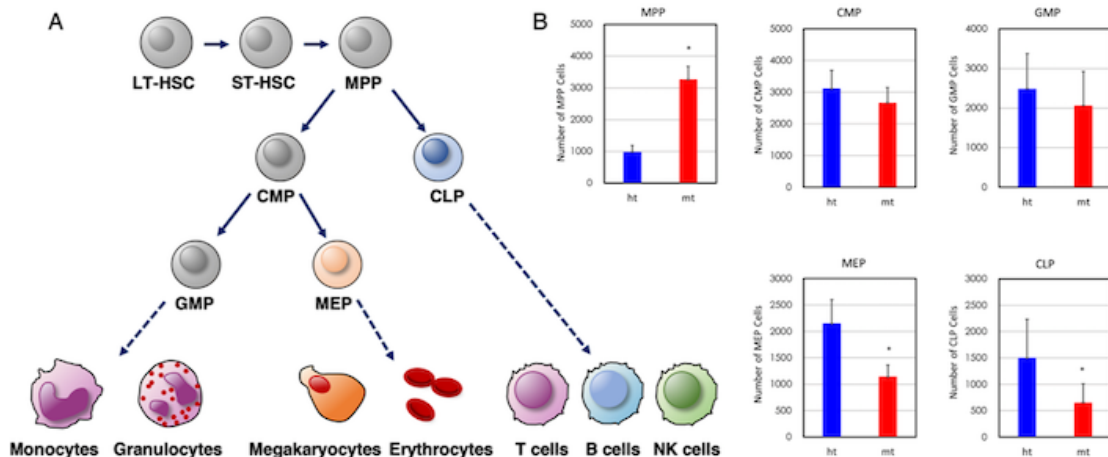


図4 フローサイトメーターによる各種造血前駆細胞の定量

常であったが、次の分化段階である、造血前駆細胞への分化に異常が見られた。フローサイトメーターを用いて解析した結果、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスの骨髄ではコントロールマウスと比較して、MPP (多能性造血前駆細胞) は約3倍に増加していたが、MEP (巨核球・赤芽球前駆細胞) とCLP (リンパ球系共通前駆細胞) は約半分に減少していた。このことから、 $\beta 4gal\text{t}1$ 欠損マウスにおいてミエロイド系やリンパ球系の前駆細胞への分化に異常があることがわかった (図4)。

そこで、末梢血での血小板、赤血球、リンパ球の数について2ヶ月、6ヶ月、10ヶ月と、月齢を追って調べた。まだ予備的な結果であるが、月齢を追うごとに $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスの血小板と赤血球の数が顕著に減少していた。したがって、 $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスでは、血小板、赤血球への分化にも異常があることがわかった。この結果は $\beta 4gal\text{t}1^{-/-}$ マウスが貧血を示すという我々の以前の報告 (Asano, et al, Blood, 2003) と合致するものであり、 $\beta 4gal\text{t}1$ が造血幹細胞の正常な分化に必須であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Soichiro Takagaki, Rieko Yamashita, Noriyoshi Hashimoto, Kazushi Sugihara, Kanako Kanari, Keisuke Tabata, Toshikazu Nishie, Shogo Oka, Masanori Miyanishi, Chie Naruse, and Masahide Asano	4. 巻 9
2. 論文標題 Galactosyl carbohydrate residues on hematopoietic stem/progenitor cells are essential for homing and engraftment to the bone marrow.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43551-6	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下莉映子, 成瀬智恵, 杉原一司, 金成香奈子, 高垣聡一郎, 宮西正憲, 岡昌吾, 浅野雅秀
2. 発表標題 造血幹細胞のホーミングおよび分化におけるB4Gal t1の役割
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会（博多）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院医学研究科 実験動物学分野研究室 http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/research/index.html
--

