

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650232

研究課題名(和文) 骨髄幹細胞の新規ホーミング分子の同定と糖鎖修飾による効率的骨髄移植法の開発

研究課題名(英文) Identification of novel homing molecules of hematopoietic stem cells and development of efficient bone marrow transfer methods by modifying carbohydrates

研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO, Masahide)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：50251450

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：4GalT-1欠損マウスの骨髄細胞はX線照射した野生型マウスに移植しても、レシピエントの骨髄に生着しないことを見いだした。4GalT-1欠損骨髄細胞はレシピエントの造血系を再構築できないだけでなく、移植後短時間での骨髄への生着が顕著に減少しており、骨髄幹細胞(HSC)の骨髄へのホーミングが障害されていた。次に、シアル酸合成の鍵酵素であるGNE遺伝子の点変異マウス(シアル酸の合成が低下)の骨髄細胞を用いて移植を行ったところ、4GalT-1欠損骨髄細胞ほどではないが、骨髄へのホーミングが半分程度に減少し、シアル酸もHSCの骨髄へのホーミングに重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have found that beta4GalT-1-deficient bone marrow (BM) cells cannot engraft in the BM of X-ray radiated wild-type mice. Not only beta4GalT-1-deficient BM cells cannot establish hematopoietic system of recipient mice, but also their engraftment into the BM shortly after BM transfer was markedly reduced, indicating that homing of hematopoietic stem cells (HSC) into the BM was impaired. We next investigated mice having a point mutation in the GNE gene, that encodes a key enzyme for sialic acids biosynthesis. Homing efficiency of BM cells from GNE point-mutant mice was reduced to half that of wild-type mice, although the reduction was not prominent as in beta4GalT-1-deficient mice. These results suggest that sialic acids at the terminus of carbohydrate chains also play a role in HSC homing.

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：糖鎖 骨髄幹細胞 骨髄移植 ホーミング

## 1. 研究開始当初の背景

細胞表面の糖鎖は細胞間相互作用に重要な働きをしており、たとえばリンパ球のリンパ節へのホーミングには、L-セレクチンとそのリガンド糖鎖が重要な役割を果たしている。我々はガラクトースを  $\beta$ 1-4 結合で転移する  $\beta$ 4-ガラクトース転移酵素-I ( $\beta$ 4GalT-I) が合成する糖鎖が、炎症時や皮膚創傷時の好中球やマクロファージの浸潤に重要であることを明らかにした (Asano et al. Blood, 2003, Mori et al. Am J Pathol, 2004)。骨髄移植の時に骨髄幹細胞 (HSC) が骨髄にホーミングする際にも、糖鎖が関与している可能性が考えられる。しかし HSC の骨髄へのホーミングに必須の CXCR4 と CXCL12 の結合や  $\alpha$ 4 $\beta$ 1-integrin と VCAM-1 の結合に糖鎖が関与するというデータはこれまで知られていない。

そこで  $\beta$ 4GalT-I 欠損マウスの骨髄細胞を X 線照射した野生型マウスに移植したところ、レシピエントの造血系が再構成されないことを見いだした。 $\beta$ 4GalT-I 欠損 HSC の骨髄へのホーミングが障害されている可能性が考えられたので、ホーミングにおける HSC 表面の糖鎖の役割を明らかにして、糖鎖修飾が骨髄移植効率の向上につながる可能性を明らかにしたいと考えた。

## 2. 研究の目的

$\beta$ 4GalT-I 欠損マウスの HSC が骨髄移植によってレシピエントマウスに生着しない原因を明らかにして、HSC のホーミングにおける糖鎖の役割を解明する。骨髄微小血管の内皮細胞に発現している E-と P-セレクチンの関与は報告されている (PNAS 95: 14423-28, 1998) が、 $\beta$ 4GalT-I 欠損マウスの異常は、E-と P-セレクチンのダブル欠損マウスより重篤であるので、 $\beta$ 4GalT-I 欠損マウスを解析することで、骨髄定着のキーとなる糖鎖構造を同定し、糖鎖修飾技術を応用して骨髄移植効率の向上につながる知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子改変マウス

$\beta$ 4GalT-I ホモ欠損マウス (mt) とコントロールとして  $\beta$ 4GalT-I ヘテロ欠損マウス (ht) に、阪大微研の岡部先生から分与された GFP マウスを掛け合わせて、ドナー細胞を GFP で標識した。また、シアル酸合成の鍵酵素の UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) 欠損マウスは胎生致死あるが、我々が作製した GNE 点変異マウスは、シアル酸合成が低下するが、生存に問題がなかったので本研究に用いた。

### (2) 骨髄移植

X 線照射装置で致死量の X 線照射 (9.5Gy) 後 24 時間のレシピエントマウスに、ドナー

マウスの大腿骨や脛骨から調製した骨髄細胞 ( $2 \times 10^7$ ) を尾静脈 (IV-BMT 法) あるいは骨髄腔 (IBM-BMT 法) に移植した。

### (3) コロニーアッセイ

X 線照射 (9.5Gy, NOD/SCID マウスは 3.5 Gy) 後 3 時間のマウスに骨髄細胞 ( $5 \times 10^6$ ) を移植し、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た。赤血球を除去した後、コロニーアッセイ培地を混和して、8-10 日間培養した。GFP 陽性コロニーをカウントし、コロニー形成率を算出した。

### (4) 骨髄細胞へのシアリダーゼ処理

調製した骨髄細胞に Biotin mouse Lineage Depletion Cocktail (マウス CD3e と、CD11b, CD45R/B220, Ly-6G, Ly-6C, TER-119 に対するビオチン化モノクローナル抗体 BD Biosciences) を作用させ、Streptavidin particles Plus-DM を加えて、BD IMagnet direct magnet により Lineage 陰性細胞を調製した。この細胞 ( $1 \times 10^6$ /ml) を PBS に懸濁し、シアリダーゼあるいはガラクトシダーゼ (250 mU/cell) を加えて 37 °C で 1 時間反応させた。

## 4. 研究成果

### (1) 骨髄移植におけるレシピエントの生存率

$\beta$ 4GalT-I 欠損マウス由来骨髄細胞の造血系の再構築活性を調べるために、いろいろな組み合わせの骨髄移植実験を行った。 $\beta$ 4GalT-I mt/GFP の骨髄細胞を移植した場合は致死量の X 線照射後に骨髄移植を行わなかった場合と同様に、移植後 15 日以内に死亡した。一方、 $\beta$ 4GalT-I ht/GFP や B6/GFP の骨髄細胞を移植した場合は 60 日以上生存し、 $\beta$ 4GalT-I mt マウスをレシピエントにした場合も同様に生存した。以上のことから、 $\beta$ 4GalT-I 欠損マウス由来骨髄細胞はレシピエントに生着して、造血系を再構築できないことがわかった。

$\beta$ 4GalT-I 欠損マウス由来骨髄細胞が生着・増殖して造血系を再構築する前にレシピエントマウスが死亡してしまうことが考えられたので、 $\beta$ 4GalT-I mt/GFP と  $\beta$ 4GalT-I ht の骨髄細胞を混合して移植した。 $\beta$ 4GalT-I ht の骨髄細胞は生着してレシピエントマウスは生存したが、 $\beta$ 4GalT-I mt/GFP 由来の GFP 陽性細胞がレシピエント骨髄内で検出されることはなかった。以上より、 $\beta$ 4GalT-I 欠損マウス由来骨髄細胞はレシピエントの骨髄内で生着できない可能性が示唆された。

### (2) 骨髄生着細胞のコロニー形成率

$\beta$ 4GalT-I mt/GFP 骨髄細胞を用いてコロニーアッセイを行ったところ、 $\beta$ 4GalT-I ht/GFP 骨髄細胞と比べてコロニー形成率に差はなかったことから、 $\beta$ 4GalT-I mt/GFP の HSC は正常な増殖能を有していることがわかった。

次に骨髄へのホーミング活性を調べるために、 $\beta$ 4GalT-I mt/GFP と  $\beta$ 4GalT-I ht/GFP の

骨髄細胞を移植して、24 時間後にレシピエントマウスの大腿骨髄から細胞を回収してコロニーアッセイを行った。 $\beta$ 4GalT-1 mt/GFP のコロニー形成率はコントロールの 10% 程度に激減しており、骨髄へのホーミングが顕著に障害されていた。

$\beta$ 4GalT-1 mt/GFP の HSC がホーミングできない理由として免疫系による拒絶反応を考慮する必要があるが、レシピエントに免疫不全の NOD/SCID マウスを用いた場合も、移植後 24 時間のコロニー形成率は同様に激減していたので、レシピエントの免疫拒絶の可能性は排除された。

### (3) 骨髄内骨髄移植法 (IBM-BMT) によるホーミング活性測定

これまでの骨髄移植は尾静脈から骨髄細胞を移入する IV-BMT 法であったが、直接骨髄腔に移入する IBM-BMT 法により、レシピエントマウスの生存率と移植後 24 時間の生着率を比較した。いずれの場合も IV-BMT 法と同じ結果、すなわち  $\beta$ 4GalT-1 mt/GFP の骨髄細胞のホーミング活性は顕著に低下していた。

### (4) シアリダーゼ処理による検討

ホーミングに重要な糖鎖がガラクトースなのか、その先に付加するシアル酸であるのかを明らかにするために、骨髄細胞からマグネット粒子を用いて Lineage 陰性の HSC 画分を調製して、その細胞をシアリダーゼ (シアル酸の切断) やガラクトシダーゼ (ガラクトースの切断) で処理して骨髄移植実験を行った。骨髄細胞を酵素処理すると細胞がかなりダメージを受けたが、移植後 24 時間の骨髄への生着率はどちらの処理でも減少する結果を得た。しかし、骨髄細胞全体にシアリダーゼ処理をした場合はそのような違いが見られず、はっきりした結論が得られなかった。

### (5) GNE 点変異マウス由来骨髄細胞のホーミング活性

シアリダーゼ処理の実験ではシアル酸の関与が明確に示すことができなかったので、シアル酸の合成酵素である GNE の活性が低下した GNE 点変異マウスを用いて骨髄移植の実験を行った。このマウスの骨髄細胞を移植して 24 時間後の生着率を測定したところ、有意差を持ってコントロールの約半分に低下していた。 $\beta$ 4GalT-1 欠損骨髄細胞ほどの顕著な減少ではなかったが、シアル酸も HSC の骨髄へのホーミングに重要であることが示唆された。

## 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 4 件)

Sugahara, D., Kaji, H., Sugihara, K., Asano, M., and Narimatsu, H. "Large-scale identification of target proteins of a glycosyltransferase isozyme by Lectin-IGOT-LC/MS, an LC/MS-based glycoproteomic approach." *Scientific Reports*, 2: 680, 2012.

doi:10.1038/srep00680. 査読あり

Shinzaki, S., Iijima, H., Fujii, H., Kuroki, E., Tatsunaka, N., Inoue, T., Nakajima, S., Egawa, S., Kanto, T., Tsujii, M., Morii, E., Takeishi, S., Asano, M., Takehara, T., Hayashi, N. and Miyoshi, E. "Altered oligosaccharide structures reduce colitis induction in mice defective in  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase."

*Gastroenterology* 142: 1172-1182, 2012.

doi: 10.1053/j.gastro.2012.02.008. 査読あり

Ito, M., Sugihara, K., Asaka, T., Toyama, T., Yoshihara, T., Furuichi, K., Wada, T. and Asano, M. "Glycoprotein hyposialylation gives rise to a nephrotic-like syndrome that is prevented by sialic acid administration in GNE V572L point-mutant mice." *PLoS ONE* 7: e29873, 2012.

doi: 10.1371/journal.pone.0029873. 査読あり

Kouno, T., Kizuka, Y., Nakagawa, N., Yoshihara, T., Asano, M. and Oka, S. "Specific enzyme complex of  $\beta$ -1,4-galactosyltransferase-II and GlcAT-P facilitates biosynthesis of N-linked HNK-1 carbohydrate." *J. Biol. Chem.* 286: 31337-31346, 2011.

doi: 10.1074/jbc.M111.233353. 査読あり

## [学会発表](計 5 件)

橋本憲佳, 田畑佳祐, 高垣聡一郎, 西江敏和, 浅野雅秀 「造血幹細胞の骨髄ホーミングにおける糖鎖の役割」第 61 回日本実験動物学会, 札幌コンベンションセンター (北海道), 2014 年 5 月 15 日

田畑佳祐, 高垣聡一郎, 西江敏和, 浅野雅秀 「 $\beta$ -1,4-ガラクトース転移酵素-I が作る糖鎖は造血幹細胞の骨髄ニッチへのホーミングに必須である」第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡国際会議場 (福岡県), 2012 年 12 月 14 日

伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 和田隆志, 浅野雅秀 「シアル酸糖鎖欠損による腎疾患モデルマウスの病態解析とシアル酸投与による治療効果」第 2 回分子腎臓フォーラム, 京都リサーチパーク (京都府), 2012 年 1 月 21 日

Ito, M., Asaka, T., Sugihara, K., Yoshihara, T., Wada, T. and Asano, M. "Hyposialylation of glycoproteins in the

UDP-N-acetylglucosamine-2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) point mutant mice gives rise to a renal impairment that is prevented by sialic acid administration.” Kidney Week 2011, Pennsylvania Convention Center, Philadelphia, USA, November 11, 2011.

伊藤光俊, 浅賀知也, 杉原一司, 吉原亨, 和田隆志, 浅野雅秀「GNE V572L 点変異マウスにおける腎臓の病態解析とシアル酸糖鎖の関与」第 84 回日本生化学会大会, 国立京都国際会館 (京都府), 2011 年 9 月 24 日

〔その他〕

ホームページ等

<http://asrc.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

浅野 雅秀 (ASANO, Masahide)

金沢大学・学際科学実験センター・教授

研究者番号：5 0 2 5 1 4 5 0

### (2) 研究分担者

橋本 憲佳 (HASHIMOTO, Noriyoshi)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：5 0 2 4 2 5 2 4