

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08343

研究課題名(和文)人体病理組織および硫酸転移酵素欠損マウスを用いた潰瘍性大腸炎の病態解析

研究課題名(英文) Histological analysis of ulcerative colitis using human pathology samples and mice deficient in sulfotransferases

研究代表者

小林 基弘 (KOBAYASHI, Motohiro)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：00362137

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)：潰瘍性大腸炎における単核細胞浸潤は、高内皮細静脈(HEV)様血管内腔面の硫酸化糖鎖により惹起される。この硫酸化糖鎖の生合成は、硫酸転移酵素GlcNAc6ST-1, GlcNAc6ST-2により制御される。これらの酵素を欠損した(DKO)マウスを用いて潰瘍性大腸炎のモデルを作製し、組織学的解析を行った。その結果、DKOマウスにおける多形核白血球浸潤の程度は、野生型マウスに比して高度であり、またDKOマウスの炎症部位には腸管粘膜特異的な単核細胞浸潤に関与する接着分子MAdCAM-1陽性HEV様血管が有意に多く認められたことから、MAdCAM-1が硫酸化糖鎖の機能を代償している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mononuclear cell infiltrates in ulcerative colitis (UC) mucosa are considered to be recruited via high endothelial venule (HEV)-like vessels displaying mucosal addressin cell adhesion molecules 1 (MAdCAM-1), the ligand for integrin, and/or peripheral lymph node addressin (PNAd), an L-selectin ligand. 6-O-sulfation of N-acetylglucosamine in PNAd is catalyzed by N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase 1 (GlcNAc6ST-1) and GlcNAc6ST-2. To determine the role of 6-O-sulfation on HEV-like vessels in UC, we employed a colitis model using mice deficient in both sulfotransferases (DKO mice). We found that more inflammatory cells were infiltrated in DKO mouse colitis, and the number of MAdCAM-1-positive vessels was increased in DKO mouse colitis. These findings suggest that MAdCAM-1 compensates PNAd function and contributes to the pathogenesis of UC in DKO mice.

研究分野：糖鎖病理学

キーワード：炎症性腸疾患 硫酸転移酵素 硫酸化糖鎖

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎は、大腸粘膜のびまん性単核細胞浸潤で特徴づけられる慢性炎症性疾患である。これらの炎症細胞浸潤は高内皮細静脈 (high endothelial venule; HEV) 様血管を通して動員されると考えられている。この HEV 様血管内腔面には、リンパ球表面に発現している $\alpha 4\beta 7$ インテグリンのリガンドである粘膜アドレッシン細胞接着分子 1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1; MAdCAM-1), および/または、同じくリンパ球表面に発現している L-セレクトチンのリガンドである末梢リンパ節アドレッシン (peripheral lymph node addressin; PNAd) が発現している。これら 2 系統の分子相互作用により、血流中のリンパ球は HEV 様血管内腔面をローリングしながら速度を落とし、内皮細胞との強固な接着を経て、最終的に血管外に遊走する。

PNAd は 6-硫酸化シアリルルイス X (sialyl Lewis X; sLeX) 糖鎖で修飾された一群の糖タンパク質である。この 6-硫酸化 sLeX 糖鎖は、sLeX 糖鎖の *N*-アセチルグルコサミン (*N*-acetylglucosamine; GlcNAc) 残基の 6 番目の炭素が硫酸基で修飾されたものである。HEV および HEV 様血管におけるこの 6-硫酸化は、GlcNAc-6-*O*-硫酸転移酵素 1 (GlcNAc-6-*O*-sulfotransferase 1; GlcNAc6ST-1) および GlcNAc6ST-2 の二つの酵素によって触媒されている。

2. 研究の目的

上記の GlcNAc6ST-1 および GlcNAc6ST-2 の両方を欠損したマウス (DKO マウス) にデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium; DSS) を経口投与することにより、ヒト潰瘍性大腸炎のマウス疾患モデルを作製し、潰瘍性大腸炎の病態形成における 6-硫酸化 sLeX の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

8 週齢の DKO マウス ($n = 12$) および野生型同腹子 ($n = 12$) をそれぞれ二群に分け (それぞれ $n = 6$)、片方の群に DSS 添加飲用水を 1 週間与えた後、通常の飲用水を 1 週間与えた。このサイクルを 3 回繰り返した後に屠殺し、腸管の病理学的解析を行った。大腸炎の程度は、1) 潰瘍形成、2) 多形核白血球浸潤、3) 陰窩炎、4) 陰窩膿瘍の 4 項目を組織学的に評価し、大腸炎スコアを算出した。また、CD31 (血管内皮細胞のマーカー)、MAdCAM-1、PNAd の免疫組織染色を行い、全血管に占める MAdCAM-1 陽性血管および PNAd 陽性血管の割合を算出した。さらに、DKO マウスの HEV 様血管に発現している非硫酸化 sLeX 糖鎖を機能的に検出するため、可溶性 E-セレクトチン・IgM キメラタンパク質を用いた結合実験を行

った。

4. 研究成果

DSS の投与により、DKO マウス、野生型マウスともヒト潰瘍性大腸炎に類似した大腸炎を発症した。組織学的解析では、潰瘍形成および多形核白血球浸潤の程度は野生型マウスに比して DKO マウスの方が有意に高度であり、その結果としての大腸炎スコアも DKO マウスの方が有意に高値であった (図 1)。一

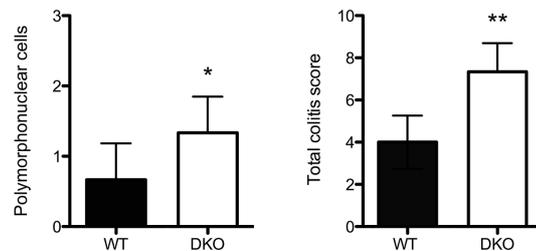


図 1. 多形核白血球浸潤と大腸炎スコア

方で、単核細胞浸潤の程度に明らかな差はなかった。免疫組織化学的解析では、野生型マウスの大腸炎粘膜には、PNAd 陽性 HEV 様血管が誘導されていたが、DKO マウスの大腸炎粘膜にはこれらの血管は全く認められなかった。また、DKO マウスの大腸炎粘膜には、野生型マウスに比べてより多くの MAdCAM-1 陽性 HEV 様血管が認められた (図 2)。可溶性

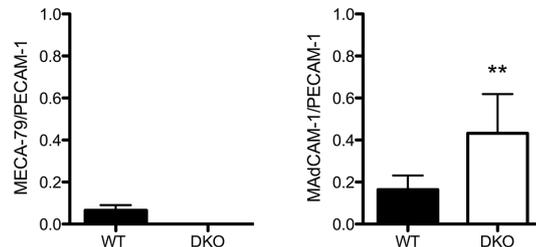


図 2. DKO マウスにおける MAdCAM-1 (+) 血管の増加

E-セレクトチン・IgM キメラタンパク質はこれらの MAdCAM-1 陽性 HEV 様血管にカルシウム依存性に結合した。

6-硫酸化 sLeX が存在しない DKO マウスに誘導した大腸炎の粘膜固有層にも炎症細胞浸潤が認められたことから、これらの炎症細胞は 6-硫酸化 sLeX 非依存性で大腸粘膜に浸潤していると考えられる。Peyer 板などの腸管関連リンパ組織 (gut-associated lymphoid tissue; GALT) における生理的リンパ球ホーミングは 6-硫酸化 sLeX と L-セレクトチンの相互作用よりも、MAdCAM-1 と $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの相互作用が優位に働いていることから、DKO マウス大腸炎で増加していた MAdCAM-1 陽性 HEV 様血管がこのマウスの炎症細胞浸潤に寄与していることが示唆された。

HEV 様血管内腔面に 6-硫酸化 sLeX が存在しない状況では、1) 非硫酸化 sLeX と L-セレクトチンの相互作用、および/あるいは 2) MAdCAM-1 と $\alpha 4\beta 7$ インテグリンの相互作用

が優位に働き、生理的な 6-硫酸化 sLeX と L-セレクトインの相互作用を代償し、これが DKO マウスにおける高度な炎症細胞浸潤に寄与している可能性が示唆された。

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 12 件)

- ① Low S, Hirakawa J, Hoshino H, Uchimura K, Kawashima H, Kobayashi M (corresponding author). Role of MAdCAM-1-expressing high endothelial venule-like vessels in colitis induced in mice lacking sulfotransferases catalyzing L-selectin ligand biosynthesis. *Histochem Cytochem*, in press. doi: 10.1369/0022155417753363. 査読有
- ② Shinagawa T, Hoshino H, Taga M, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M (corresponding author). Clinicopathological implications to micropapillary bladder urothelial carcinoma of the presence of sialyl Lewis X-decorated mucin 1 in stroma-facing membranes. *Urol Oncol* 35: 606.e17-23, 2017. doi: 10.1016/j.urolonc.2017.06.004. 査読有
- ③ Yoshida H, Hoshino H, Imamura Y, Yoshimura H, Sano K, Kobayashi M (corresponding author). Role of sialyl 6-sulfo Lewis X in anti-tumor immunity against oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 46: 759-765, 2017. doi: 10.1111/jop.12585. 査読有
- ④ Inamura S, Shinagawa T, Hoshino H, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M (corresponding author). Appearance of high endothelial venule-like vessels in benign prostatic hyperplasia is associated with lower urinary tract symptoms. *Prostate* 77: 794-802, 2017. doi: 10.1002/pros.23319. 査読有
- ⑤ Low S, Sakai Y, Hoshino H, Hirokawa M, Kawashima H, Higuchi K, Imamura Y, Kobayashi M (corresponding author). High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. *Pathology* 48: 666-674, 2016. doi: 10.1016/j.pathol.2016.08.002. 査読有
- ⑥ Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M (corresponding author). Apical membrane expression of distinct

sulfated glycans represent a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. *Lab Invest* 96: 1246-1255, 2016. doi: 10.1038/labinvest.2016.104. 査読有

- ⑦ Ohtani H, Komeno T, Agatsuma Y, Kobayashi M, Noguchi M, Nakamura N. Follicular dendritic cell-meshwork in angioimmunoblastic T-cell lymphoma is characterized by accumulation of CXCL13⁺ cells. *J Clin Exp Hematop* 55: 61-69, 2015. doi: 10.3960/jslrt.55.61. 査読有
- ⑧ Wayama MT, Yoshimura H, Ohba S, Yoshida H, Matsuda S, Kobayashi J, Kobayashi M, Gomes Filho JE, Sano K. Diminished progression of periapical lesions with zoledronic acid in ovariectomized rats. *J Endod* 41: 2002-2007, 2015. doi: 10.1016/j.joen.2015.08.029. 査読有
- ⑨ Kurokawa T, Zha X, Ito H, Aoki Y, Akino H, Kobayashi M, Yokoyama O. Underlying mechanisms of urine storage dysfunction in rats with salt-loading hypertension. *Life Sci* 141: 8-12, 2015. doi: 10.1016/j.lfs.2015.09.010. 査読有
- ⑩ Nagaoka M, Kobayashi M, Kawai C, Mallanna SK, Duncan SA. Design of a vitronectin-based recombinant protein as a defined substrate for differentiation of human pluripotent stem cells into hepatic progenitor cells. *Plos One* 10: e0136350, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0136350. 査読有
- ⑪ Taga M, Hoshino H, Low S, Imamura Y, Ito H, Yokoyama O, Kobayashi M (corresponding author). A potential role of 6-sulfo sialyl Lewis X in metastasis of bladder urothelial carcinoma. *Urol Oncol* 33: 496.e1-9, 2015. doi: 10.1016/j.urolonc.2015.05.026. 査読有
- ⑫ Sakai Y, Kobayashi M (corresponding author). Lymphocyte 'homing' and chronic inflammation. *Pathol Int* 65: 344-354, 2015. doi: 10.1111/pin.12294. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① Shinagawa T, Hoshino H, Taga M, Sakai Y, Imamura Y, Yokoyama O, Kobayashi M. Clinicopathological implications to micropapillary bladder urothelial carcinoma of the presence of the presence of sialyl Lewis X-decorated mucin 1 in stroma-facing membranes. Annual Conference of the Society for Glycobiology (Portland, OR, USA), 2017.
- ② 酒井康弘, 劉 淑琳, 星野 瞳, 廣川満良,

- 川島博人, 樋口佳代子, 今村好章, 小林基弘. High endothelial venule-like vessels in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. 第106回日本病理学会総会(東京), 2017.
- ③ 星野 瞳, 太田 諒, 伊藤 誠, 内村健治, 酒井康弘, 上原 剛, 劉 淑琳, 福島万奈, 小林基弘. Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. 第106回日本病理学会総会(東京), 2017.
- ④ Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M. Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. 20th Annual San Diego Glycobiology Symposium (San Diego, CA, USA), 2017.
- ⑤ Low S, Kanamori R, Sakai Y, Hoshino H, Hirokawa M, Kawashima H, Higuchi K, Imamura Y, Kobayashi M. High endothelial venule-like vessels and lymphocyte recruitment in diffuse sclerosing variant of papillary thyroid carcinoma. 20th Annual San Diego Glycobiology Symposium (San Diego, CA, USA), 2017.
- ⑥ Hoshino H, Ohta M, Ito M, Uchimura K, Sakai Y, Uehara T, Low S, Fukushima M, Kobayashi M. Apical membrane expression of distinct sulfated glycans represents a novel marker of cholangiolocellular carcinoma. Annual Conference of the Society for Glycobiology (New Orleans, LA, USA), 2016.
- ⑦ 稲村 聡, 品川友親, 堤内真実, 多賀峰克, 伊藤秀明, 横山 修, 小林基弘. 前立腺肥大症における炎症の役割. 第66回日本泌尿器科学会中部総会(四日市), 2016.
- ⑧ 黒川哲司, 品川明子, 知野陽子, 小林基弘, 吉田好雄. 福井県の子宮頸がん検診にHPV検査を導入し感度は向上するのか. 第54回日本癌治療学会学術集会(横浜), 2016.
- ⑨ Taga M, Hoshino H, Low S, Imamura Y, Ito H, Kobayashi M, Yokoyama O. A potential role for 6-sulfo sialyl Lewis X in metastasis of bladder urothelial carcinoma. American Urology Association Annual Meeting (San Diego, CA, USA), 2016.
- ⑩ 多賀峰克, 伊藤秀明, 品川友親, 堤内真実, 星野 瞳, 小林基弘, 横山 修. 膀胱癌に発現する硫酸化シアリルスイス X に関する検討. 第104回日本泌尿器科学会総会(仙台), 2016.
- ⑪ Taga M, Hoshino H, Low S, Imamura Y, Ito H, Yokoyama O, Kobayashi M. A potential role for 6-sulfo sialyl Lewis X in

metastasis of bladder urothelial carcinoma. Annual Conference of the Society for Glycobiology (San Francisco, CA, USA), 2015.

- ⑫ 劉 淑琳, 酒井康弘, 川島博人, 小林基弘. 6-sulfo sLeX-expressing high endothelial venule-like vessels in diffuse sclerosing variant of thyroid papillary carcinoma. 第44回日本免疫学会学術集会(札幌), 2015.
- ⑬ 多賀峰克, 星野 瞳, 品川友親, 堤内真実, 小林基弘, 伊藤秀明, 横山 修. 膀胱癌に発現する硫酸化シアリルスイス X は癌の転移に関与する. 第1回日本泌尿器腫瘍学会(京都), 2015.
- ⑭ 酒井康弘, 岡村卓磨, 星野 瞳, 小林基弘. Superficially located enlarged lymphoid follicles characterize nodular gastritis. 第104回日本病理学会総会(名古屋), 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 基弘 (KOBAYASHI, Motohiro)
福井大学・学術研究院医学系部門・教授
研究者番号: 00362137

(2) 研究分担者

川島 博人 (KAWASHIMA, Hiroto)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 50260336