

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590193

研究課題名（和文）糖鎖情報の発現様式と動的変化に関する組織細胞化学的研究

研究課題名（英文）Histochemical studies on the expression patterns and dynamical changes of carbohydrates

研究代表者

川上 速人（KAWAKAMI HAYATO）

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：30146542

研究成果の概要（和文）：ヒトやマウスの各種組織標本に対し、50種類以上のレクチンや糖特異抗体による染色を施すことにより、臓器ごとに異なる糖鎖分布を確認した。加えて血管内皮細胞表面糖鎖にも臓器特異性が認められ、癌転移の臓器特異性などを解明する上でも有効なデータを得ることができた。また糖脂質の局在に関し、ラット小脳や小腸において、機能状態を反映する特異的分布が確認され、腎臓においては糖尿病に伴う局在変化が確認された。糖鎖情報の組織化学的解析は、糖鎖のダイナミックな病態変化を捉える上で極めて有効であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：More than fifty kinds of lectins and sugar-specific monoclonal antibodies were histochemically applied to various kinds of human and mouse tissue specimens. Organ-specific distribution of sugar moieties were demonstrated on both parenchymal cells and vascular endothelial cells. Specific distribution of endothelial cell surface carbohydrates might be an important clue to explain the mechanisms of organ-specific cancer metastasis. Specific distribution of glycolipids were also demonstrated on rat cerebrum, small intestine and kidney under various pathological states including diabetes. Histochemical approaches revealed important aspects of the dynamic changes of sugar expression on various tissues and cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：細胞組織化学

1. 研究開始当初の背景
糖鎖情報は遺伝子の直接支配を受けないため、遺伝子の機能解析が進んでもなお、未知の部分がかかり残されている。例えば組織を

構成する細胞でも、また培養細胞でも、一見均質に見える細胞表面糖鎖は、実は細胞ごとに微妙に異なり、また同一細胞でも周囲の環境変化等に対応して時々刻々と変化するこ

とが知られている。このような細胞の情報発現の最前線では、遺伝子からの直接支配ではなく、細胞表面の情報分子である糖鎖自身が短時間のうちに臨機応変に変化して、周囲との情報交換を行っている可能性を考える必要がある。このような変化を直接解析するには、分子遺伝学的手法では限界があり、糖鎖自身の動態を直接 *in situ* で継時的に観察することが求められる。本研究では、多種類の糖鎖プローブを同時に用いて組織細胞化学的に検討することにより、組織を構成する個々の細胞ごとの糖鎖発現状態を精密に解析し、細胞の置かれた環境の違いと糖鎖発現パターンとの関係を明らかにすると共に、各種疾患特に癌化や癌転移過程に見られる細胞間相互作用と糖鎖との関係を明らかにしていく。

2. 研究の目的

糖鎖の局在を組織細胞化学的に検索するアプローチはレクチンが組織化学に導入されて以来、腫瘍マーカー、分化マーカー、組織マーカーとしてのレクチンの有用性について多くの新知見が呈示されてきた。その後、レクチンに加えて各種の糖鎖抗体が開発され、糖鎖構造特異的な抗体の実用化が、糖鎖の局在解明の精度と信頼性を向上させた。一方で、各種の合成糖鎖と糖鎖プローブを組み合わせた糖鎖プロファイリングシステムの開発が産総研等で成され、糖鎖の微妙な表現型の差異をマッピングしつつ研究を押し進めていく環境が整いつつある。これを組織や細胞レベルに応用すれば、局所的な糖鎖発現状況とその動的変化を、高度な時間分解能・空間分解能で可視化できる。即ち本研究では、新たに開発された糖鎖解析システムを実際の組織や細胞に応用し、また一方で複数の糖鎖関連標識を同時に用いて多重染色することにより、各組織・細胞における糖鎖間の相互作用やそれを認識するレセプターの動態解析を目指す。具体的には、(1) 各種組織の連続切片を用いて、糖鎖プロファイリングシステムによる多種類の糖鎖プローブによる染色パターンを調べ、細胞膜の各ドメインや接着面ごとの糖鎖分布をマッピングする。更に各種接着分子に対する特異抗体との多重標識により、糖鎖局在と細胞接着反応との関連を明らかにする。(2) 組織切片中の特に血管内皮に注目し、(1)と同様の手技により内皮表面における糖鎖発現の臓器差を検索し、例えば癌細胞と血管内皮細胞とが糖鎖を介して臓器特異的な相互作用を行う可能性を、実験的癌転移モデルを用いて解析することにより、癌転移の解明につながる糖鎖相互作用を明らかにする。(3) 神経組織

の活動状況と各種糖脂質の分布との関連を、培養系を用いて継時的に追跡する、(5) 疾患モデル動物（糖脂質欠損マウス、糖尿病モデルマウス、神経疾患マウス、）において、糖鎖発現パターンの変化を主な組織・細胞ごとに比較・解析する。

3. 研究の方法

(1) マウス各臓器（肝、小腸、腎、脳、膵、筋、皮膚等）の組織アレイに対し、多種類（50種類以上）のレクチン、糖鎖抗体または新たに開発された糖鎖プローブの組み合わせによる多重染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡下で観察する。各臓器の個々の細胞の部位差に注目するのみならず、同一細胞内のドメインレベルでの糖鎖の微細局在の違いにも注目する。単染色では均一な染色性を示す部位でも多重染色では各リガンドの微妙な親和性の違いによりモザイクパターンを呈することが期待される。とりわけ細胞間の接着面での局在や細胞同士の位置関係による差異に注目して糖鎖の分布をマッピングする。

(2) 血管内皮細胞の表面糖鎖分布については、臓器差に注目した広汎な研究は成されていない。本研究ではマウスの全身灌流法により、全身の血管内皮、特に毛細血管に対し、多種類の糖鎖プローブの組み合わせによる染色を施し、内皮表面糖鎖の部位差、臓器差を明らかにし、パターン化を行う。

(3) マウス大腸癌細胞を各種レクチンアフィニティーカラムを用いて分離し、特異的糖鎖表現型ごとに細胞をクローニングする。それぞれの癌細胞集団ごとに蛍光ラベルした細胞をマウス静脈に注入して全身灌流させ、数時間後に各臓器の凍結切片を作成、蛍光ラベルした癌細胞が生着した部位を解析する。この結果と、上記(2)で得られた、毛細血管内皮糖鎖パターンとを対比させ、臓器特異的細胞間相互作用と糖鎖の関係を明らかにする。更にそれぞれの細胞に存在する糖鎖構造の詳細を、糖鎖プロファイリングシステムにかけて分析し、糖鎖構造の微妙な違いと特定の細胞表面蛋白質との関連を明らかにする。

(4) 各種組織細胞や培養細胞を用いた糖脂質の局在と機能の検討：糖脂質の局在解析については、市販の数10種類の抗体の適用が可能であり、また光顕・電顕レベルでの適用法については既に当研究室により確立している。本研究では、前固定した各種の組織切片での糖脂質の局在解析に加えて、各種糖脂質もしくは抗糖脂質抗体を培養系に投与し、突起伸長、伝達物質放出等に対する効果について検討する。また、糖鎖合成阻害剤存在下や細胞内輸送系阻害剤存在下での各種糖脂

質の局在を詳細に解析し、小胞体やゴルジ装置からの合成・輸送系、脂質ラフトとの関連性などについても知見を得る。更に、糖脂質欠損マウスや神経疾患マウス、糖脂質ノックアウトマウスを用いることにより、各臓器ごとの機能異常を、発生の各段階で光顕・電顕的に検討し、糖脂質抗体の局在変化と併せて、各臓器における糖脂質の機能的意義について、より詳細な解明を目指す。

4. 研究成果

正常ヒト各臓器の組織アレイやマウス各種組織標本に対し、50種類以上のレクチンや糖特異抗体による染色性をペルオキシダーゼ法により光顕レベルで網羅的に検討した。いくつかの癌組織において、正常組織とは異なる染色パターンを示すレクチンの組み合わせが確認された。また正常組織でも、臓器ごとに異なるレクチン染色パターンが実質細胞のみならず血管内皮細胞でも確認された。用いるレクチンの組み合わせを変えることにより、特定の癌組織の同定や診断、あるいは臓器マーカーとしての糖鎖発現の微妙な違いや、血管内皮細胞表面糖鎖の臓器ごとの差異などの解析が効率的に行える可能性が確認できた。また癌転移の臓器特異性を解明する上でも内皮細胞表面の特異的糖鎖分布が有効な指標となると考えられた。また疾患モデルを用いた実験として、糖尿病発症 GK ラットの腎臓における糖脂質の局在を、各種糖脂質特異的モノローナル抗体を用いて正常ラット腎臓と比較した。光顕的には Cy3 標識により共焦点レーザー顕微鏡にて、電顕的には HRP 標識による包埋前染色法にて観察した。正常ラットでは、糸球体の足細胞の特に基底膜に面する足突起細胞膜に、抗 Gb3 グロボシド抗体陽性反応が認められた。一方 GK ラットにおいては、足突起細胞膜のみならず内皮細胞細胞膜、糸球体基底膜に抗 Gb3 陽性域が拡大した。一方、抗 GD1a など各種ガングリオシド特異抗体は、糸球体基底膜にも内皮細胞にも反応は認められず、足細胞の細胞内膜系の陽性反応が特に GK ラットにおいて認められた。糖脂質の局在は、糸球体における濾過機能を解明するうえで有用な手がかりになると考えられた。更にラット小腸組織での糖脂質局在を検討すると、吸収上皮細胞の側底部細胞膜では抗 Gb3 の、頂部細胞膜では抗 GM1 の特異的局在が確認された。これらの糖脂質が各種病原性細菌の受容体となっていることを考え合わせると、小腸上皮の機能を解析する上で糖脂質の組織化学が有力な手段になるものと考えられた。また小腸の筋層においては、GD2 が外縦筋層のみに発現していることが確認され、電顕的には平滑筋細胞の細胞膜特にカベオラに強く発現していた。発現はカベオラ膜に沿ってドッ

ト状に認められ、カベオラが脂質ラフトの集積部位であることを考え合わせると、脂質ラフトを電顕的に直接検出している可能性が考えられた。一方ラット小脳においては、神経細胞ごとに異なる糖脂質分布が確認され、とりわけ籠細胞やプルキンエ細胞などの抑制性ニューロンでは GQ1b が細胞体や軸索終末に強く発現しており、顆粒層細胞では GD2、GD3 が強く発現していることが判明した。糖脂質合成阻害剤であるフモニシンをラット腹腔内に 24 時間投与したところ、神経組織とりわけ小脳プルキンエ細胞に顕著な萎縮が確認され、併せて GQ1b の発現も低下することが判明した。神経細胞の機能状態や病態地変化を解析する上でも、各種糖脂質抗体の組織化学的適用が極めて有力な手段となることが明らかとなった。

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 16 件)

- (1) Yoshizawa T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Schido Y, Kawate H, Iesato Y, Koyama T, Uetake R, Yang L, Yamauchi A, Tanaka M, Toriyama Y, Igarashi K, Nakada T, Kashihara T, Yamada M, Kawakami H, Nakanishi H, Taguchi R, Nakanishi T, Akazawa H, Hindo T: Novel regulation of cardiac metabolism and homeostasis by the adrenomedullin-RAMP2 system. *Hypertension* 61: 341-351, 2013. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.00647
- (2) Koyama T, Ochoa-Callejero L, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Schido Y, Iinuma N, Arai T, Yoshizawa T, Iesato Y, Lei Y, Uetake R, Okimura A, Yamauchi A, Tanaka M, Igarashi K, Toriyama Y, Kawate H, Adams RH, Kawakami H, Mochizuki N, Martínez A, Shindo T: Vascular endothelial adrenomedullin-RAMP2 system is essential for vascular integrity and organ homeostasis. *Circulation* 127: 842-853, 2013. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000756
- (3) Kawashima S, Arimura Y, Sano K, Kudo A, Komagata Y, Kaname S, Kawakami H, Yamada A: Immunopathologic co-localization of MPO, IgG, and C3 in glomeruli in human MPO-ANCA-associated glomerulonephritis. *Clin Nephrol* 79: 292-301, 2013. DOI 10.5414/CN107675
- (4) Sekiuchi M, Kudo A, Nakabayashi K,

Kanai-Azuma M, Akimoto Y, Kawakami H, Yamada A: Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases 2 and 1 in the glomeruli of human glomerular diseases: the results of studies using immunofluorescence, in situ hybridization, and immunoelectron microscopy. *Clin Exp Nephrol* 16: 863-874, 2012. doi: 10.1007/s10157-012-0633-3

(5) Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Wolfert MA, Wells L, Boons G-J, Hart GW, Endo T, Kawakami H: Morphological changes in diabetic kidney are associated with increased O-GlcNAcylation of cytoskeletal proteins including α -actinin 4. *Clin Proteom* 8: 15, 2011. doi: 10.1186/1559-0275-8-15

(6) Endo Y, Suzuki M, Yamada H, Horita S, Kunimi M, Yamazaki O, Shirai A, Nakamura M, Iso-O N, Li Y, Hara M, Tsukamoto K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Yamauchi T, Kubota N, Kadowaki T, Kume H, Enomoto Y, Homma Y, Seki G, Fujita T: Thiazolidinediones enhance sodium-coupled bicarbonate absorption from renal proximal tubules via PPARgamma-dependent nongenomic signaling. *Cell Metab* 13: 550-561, 2011. doi: 10.1016/j.cmet.2011.02.015

(7) Denda-Nagai K, Aida S, Saba K, Suzuki K, Moriyama S, Oo-puthinan S, Tsuiji M, Morikawa A, Kumamoto Y, Sugiura D, Kudo A, Akimoto Y, Kawakami H, Bovin NV, Irimura T: Distribution and function of macrophage galactose-type C-type lectin 2 (MGL2/CD301b): Efficient uptake and presentation of glycosylated antigens by dendritic cells. *J Biol Chem* 285: 19193-19204, 2010. doi: 10.1074/jbc.M110.113613

(8) Tashiro F, Kanai-Azuma M, Miyazaki S, Kato M, Tanaka T, Toyoda S, Yamato E, Kawakami H, Miyazaki T, Miyazaki M: Maternal-effect gene *Ces5/Ooep/Moep19/Floped* is essential for oocyte cytoplasmic lattice formation and embryonic development at the maternal-zygotic stage transition. *Gene Cells* 15: 813-828, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01420.x

(9) 徳留健, 岸本一郎, 山原健一, 新藤隆行, 川上速人, 白井幹康, 寒川賢治: 内因性ANP・BNPによる血管新生、血管恒常性維持機構。血

管 33: 75-80, 2010.

[学会発表] (計33件)

- (1) 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, 福富俊之, Hart GW, 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病性腎症に伴うタンパク質への糖修飾異常の解析. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会, 高松, 平成25年3月28-30日.
- (2) Akimoto A, Miura Y, Toda T, Wolfert MA, Wells L, Boons G-J, Hart GW, Endo T, Kawakami H: O-GlcNAc modification of proteins and diabetes. International Symposium on Glyco-minded Biology of Diseases as a Basis of Pharmaceutical Sciences, Tokyo, November 30- December 1, 2012.
- (3) Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Wolfert MA, Wells L, Boons G-J, Hart GW, Endo T, Kawakami H: Detection of O-GlcNAcylated proteins by glycoproteomics and in situ proximity ligation assay (PLA). 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, Kyoto, Aug. 26-29, 2012.
- (4) 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, 松原幸枝, Hart GW, 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病角膜炎に伴うタンパク質への糖 (O-GlcNAc) 修飾の変化. 日本顕微鏡学会第68回学術講演会, つくば, 平成24年5月13-16日.
- (5) Kawakami H: Immunohistochemical detection of glycolipids in various tissues of rat. 21st International Symposium on Glycoconjugates (Glyco XXI), Vienna, August 21-26, 2011.
- (6) Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Wolfert MA, Wells L, Boons G-J, Hart GW, Endo T, Kawakami H: Elevated O-GlcNAc modification of proteins in diabetic kidney. 21st International Symposium on Glycoconjugates (Glyco XXI), Vienna, August 21-26, 2011.
- (7) 秋元義弘, 上山盛夫, 一宮智美, 福田稔, 松原幸枝, 川上速人, 西原祥子: *Drosophila* のO-マンノース転移酵素突然変異体における筋組織の微細構造解析. 日本顕微鏡学会第67回学術講演会, 福岡, 平成23年5月16-18日.
- (8) 秋元義弘, Hart GW, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉夫, 川上速人: 糖尿病性角膜炎に伴うタンパク質への糖修飾変化のプロテオミクスによる解析. 第88回日本生理学会大会・第116回日本解剖学会総会・全国学術集合同大会, 横浜, 平成23年3月28-30日
- (9) 秋元義弘, 三浦ゆり, 戸田年総, 遠藤玉

夫, Hart GW, 川上速人: In situ proximity ligation assay 法による腎臓における O-GlcNAc 修飾タンパク質の検出. 第 51 回日本組織細胞化学会総会・学術集会, 東京, 平成 22 年 9 月 4-5 日.

(10) 秋元義弘, 川上速人: 糖修飾の組織化学解析の基礎と応用. 第 35 回組織細胞化学講習会, 甲府, 平成 22 年 8 月 4-6 日.

(11) Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Hart GW, Endo T, Kawakami H: O-GlcNAc-modification of the proteins in diabetic tissues. 7th International Symposium on Glycosyltransferases. Tokyo, July 30-Aug. 1, 2010.

(12) Akimoto Y, Miura Y, Toda T, Hart GW, Endo T, Kawakami H: Proteomic analysis of O-GlcNAc-modified proteins in diabetic kidney. The 28th Naito Conference on Glycan Expression and Regulation [I]: Function and disease mechanism, Hayama, July 27-30, 2010.

[図書] (計 10 件)

(1) 川上速人 (翻訳): 細胞質. ジュンケイラ組織学 第 3 版. 坂井建雄, 川上速人 監訳. 東京, 丸善, 2011. p.19-50.

(2) 秋元義弘, 川上速人: 糖の組織化学. 組織細胞化学 2011. 日本組織細胞化学会編. 学際企画, 東京, 2011, p. 141-153.

(3) Akimoto Y, Kawakami H: Pre-embedding electron microscopy methods for glycan localization in chemically fixed mammalian tissue using horseradish peroxidase-conjugated lectin. In: Immunoelectron Microscopy. Schwartzbach SD, Osafune T (Eds.). New York, Humara Press, Methods Mol Biol 657: 2010. p. 217-224.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上速人 (KAWAKAMI HAYATO)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 30146542