

## 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 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22790303

研究課題名（和文）

脳血管内細胞ローリングにおけるセレクトインーリガンド糖鎖分子間相互作用の役割

研究課題名（英文）

Role of selectin-carbohydrate interactions in rolling of cells in blood vessels of the brain

研究代表者

内村 健治 (UCHIMURA KENJI)

名古屋大学・医学系研究科・特任准教授

研究者番号：20450835

研究成果の概要（和文）：骨髄由来細胞の血管を介した脳内侵入が、アルツハイマー病（AD）モデルマウスの病態脳において報告された。本研究は細胞表面セレクトインおよびその糖鎖リガンドの分子間相互作用のAD脳細胞浸潤における役割を明らかにすることを目的とする。マウス骨髄由来細胞株の細胞表面においてセレクトイン糖鎖リガンドの発現を確認した。ADモデル脳血管である種のセレクトインの発現が増加し、骨髄由来細胞のローリングおよび接着が亢進することが明らかとなった。骨髄由来細胞のローリングおよび接着能の増加とAD病態との関わりを今後明らかにする。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that bone marrow derived cells extravasate into the brain of Alzheimer model mice. Molecular interactions between selectins and their carbohydrate ligands are the first step of leukocyte infiltration into tissues through the blood. Here, we investigated possible involvement of selectins and their ligands in diapedesis of bone marrow derived cells into Alzheimer brain. We have detected cell surface expression of sialyl Lewis X, a ligand of selectins, in a mouse bone marrow cell line. We also found that expression of one of selectins was up-regulated in brain vasculature of aged Alzheimer model mice. We have shown that the selectin ligand was involved in rolling and adhesion of bone marrow cells in the brain of Alzheimer model mice. These results indicated that selectin-carbohydrate ligand interaction might be important for extravasation of bone marrow derived cells into Alzheimer brain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

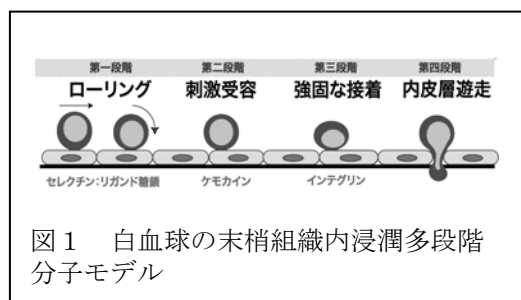
キーワード：細胞・組織、生体分子、糖鎖、脳・神経

## 1. 研究開始当初の背景

血液中の細胞が末梢組織内へ移行する分子メカニズムは国内および海外において勢力的に解析されておりその詳細が明らかに

なっている。血管内の細胞は多段階の分子相互作用により末梢組織内へ浸潤する(図1)。対照的に脳・脊髄といった中枢神経組織内移行の分子機序は未だ不明である。生理条件下

では血液由来細胞はマウス脳内へ移行性を示さないがアルツハイマー病やある種のてんかん発作、脳炎においては、血液由来細胞



が血行性脳内移行を示すことが報告されている。アルツハイマー病態脳においては、骨髄由来細胞が脳内移行すると報告されている。アルツハイマー病態における脳内移行において多段階分子モデルが摘要できるのか、また第一段階であるローリングは起きるのか、という点は明らかになっていない。

白血球ローリングに関与する細胞表面セレクトインはL-, E-, P-セレクトインの3種がヒトおよびマウスで存在し、いずれもシアリルルイスXと呼ばれる特殊な糖鎖構造を認識する。申請者はこれまでにL-セレクトインリガンド糖鎖硫酸転移酵素遺伝子欠損マウスの作製解析によりリンパ組織における白血球のローリング分子機序を明らかにした (Uchimura et al. Nature Immunol 2005; Veerman et al. Nature Immunol 2007 など)。これらの研究では生体内ビデオ蛍光顕微鏡技術を用いたマウスのリンパ組織血管内における蛍光標識白血球のローリングや接着を定量測定した。この技術を応用し、近年マウス脳血管内測定を可能にした。アルツハイマー病モデルトランスジェニックマウス (APP-Tg) 脳血管内において骨髄由来細胞のローリングや接着が誘発されるのか否かは不明である。申請者が所有する解析技術、モデルマウスおよび細胞を活用することにより脳内細胞浸潤分子メカニズムにおけるセレクトインおよびそのリガンド糖鎖の役割解明が可能ではないかと期待し本研究課題の着想に至った。申請者がこれまでに従事してきた L-セレクトインとその硫酸化シアリルルイス X 糖鎖リガンドのリンパ節内浸潤における機能の知識・技術をさらに発展させ、脳内細胞浸潤におけるセレクトイン-糖鎖分子間相互作用の意義を解明する点が本研究課題の特色である。

## 2. 研究の目的

免疫担当細胞などが血管から末梢組織内へ浸潤する分子機序は詳細に解析されている。例外的に血管から脳内への細胞浸潤分子メカニズムについては不明な点が多い。骨髄由来細胞の血管外脳内侵入がアルツハイマ

ー病態脳において近年報告された。本研究は骨髄由来細胞と脳血管内皮細胞との細胞間相互作用における細胞表面セレクトインおよびその糖鎖リガンドの分子間相互作用の生物学的意義を in vivo において明らかにする事を目的とした。

## 3. 研究の方法

脳内移行時に働くと思われる細胞表面シアリルルイス X リガンド糖鎖のマウス骨髄由来細胞株における発現量をフローサイトメーターで定量解析した。当該細胞を一定期間培養し細胞数を増やした後、リン酸バッファードでリンスし、遠心器により細胞画分をペレットとして回収した。液体窒素を使用することにより、細胞ペレットの凍結融解を3度繰返した。1% Triton 溶液にサスペンドし遠心分離の後、上清を細胞膜画分として回収した。細胞膜画分に含まれるシアリルルイス X リガンド糖鎖を担うコアタンパク質の数、サイズ等をウェスタンブロッティングにより詳細に解析した。各種コアタンパク質特異的モノクローナル抗体を用いた免疫沈降と合わせて解析した。一方、アルツハイマー病モデルマウス脳を摘出後、ホモジナイザーで組織を破砕し、メッシュに当該組織液を通しフィルターレーションした。メッシュを通過せずに残る組織を血管濃縮画分として回収した。本画分の TBS 不溶性 1% SDS 可溶性フラクションを超音波破砕器の使用により調製した。モデルマウス脳内血管で発現が確認されるセレクトインの定量をセレクトイン特異的モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、当該血管画分サンプルを対象に解析した。また、摘出したモデルマウス脳を OCT に凍結包埋し、ブロックを作製した。脳組織凍結切片をクライオスタットを用いて調製した。免疫組織化学染色により当該セレクトインの脳凍結切片血管における発現を検討した。骨髄由来細胞株を培養後、蛍光標識プローブにより標識後、モデルマウスの尾静脈より注入した。モデルマウス脳血管内における当該細胞のローリングおよび接着を生体内ビデオ蛍光顕微鏡を用いて in vivo で解析した。

## 4. 研究成果

マウス骨髄由来細胞株の細胞表面においてセレクトインリガンド糖鎖であるシアリルルイス X の発現が確認された。野生型およびアルツハイマーモデルマウス脳血管細胞においてセレクトインの発現が観察された。アルツハイマーモデル脳血管で、ある種のセレクトインの発現が野生型脳に比べて有意に増加している事が明らかとなった。また、マウス脳血管内における末梢投与蛍光標識骨髄細胞株のローリングおよび接着能をアッセイ

するシステムを生体内ビデオ蛍光顕微鏡の使用により確立した。野生型に比べて、アルツハイマーモデルマウス脳血管内において骨髄由来細胞のローリングおよび接着の亢進が明らかとなった。シアリルルイスX糖鎖はラクトサミン構造にシアル酸およびフコースが修飾されたオリゴ糖鎖である。これらの糖鎖を転移する酵素が無いと、シアリルルイスX糖鎖は合成されない。細胞表面シアリルルイスXの合成に関わる酵素の遺伝子ノックアウトマウスを入手した。当該ノックアウトマウスを繁殖させ、一定匹数を確保した。これらのマウスを骨髄由来細胞のドナーとして使用した。生体内ビデオ蛍光顕微鏡解析した結果、アルツハイマーモデルマウス脳血管内における当該ノックアウトマウス骨髄由来細胞のローリングおよび接着能が減少した。アルツハイマーモデルマウス脳血管内におけるローリングおよび接着にシアリルルイスX糖鎖が関わるのが強く示唆された。今後、アルツハイマー病モデルマウスとシアリルルイスX糖鎖合成酵素ノックアウトマウスを交配繁殖させ、ノックアウトモデルマウスを作製する予定である。このマウスの解析から、シアリルルイスX糖鎖が関わるローリングおよび接着とアルツハイマー病脳病変との関わりを明らかにすることが期待された。

#### 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6件)

1. Fujiwara, M., Kobayashi, M., Hoshino, H., Uchimura, K., Nakada, T., Masumoto, J., Sakai, Y., Fukuda, M., Nakayama, J. Expression of long-form N-acetylglucosamine-6-O-sulfotransferase 1 in human high endothelial venules. **J. Histochem. Cytochem.**, 60: 397-407, 2012 査読有
2. Hosono-Fukao, T., Ohtake-Niimi, S., Hoshino, H., Britschgi, M., Akatsu, H., Hossain, M. M., Nishitsuji, K., van Kuppevelt, T. H., Kimata, K., Michikawa, M. Wyss-Coray, T., and Uchimura, K. Heparan sulfate subdomains that are degraded by Sulf accumulate in cerebral amyloid  $\beta$  plaques of Alzheimer's disease: evidence from mouse models and patients. **Am. J. Pathol.**, 180: 2056-2067, 2012 査読有
3. Hosono-Fukao, T., Ohtake-Niimi, S., Nishitsuji, K., Hossain, M. M., van Kuppevelt, T. H., Michikawa, M. and Uchimura, K. RB4CD12 epitope expression and heparan sulfate disaccharide composition in brain vasculature. **J. Neurosci. Res.**, 89:1840-1848, 2011 査読有
4. Nishitsuji, K., Hosono, T., Uchimura, K. and Michikawa, M. Lipoprotein lipase is a novel Abeta-binding protein that promotes glycosaminoglycan-dependent cellular uptake of Abeta in astrocytes. **J. Biol. Chem.**, 286:6393-6401, 2011 査読有
5. Uchimura, K. Sulfs: extracellular endosulfatases that regulate physiological functions of heparan sulfate. **生化学** 83: 216-223, 2011 査読有
6. Uchimura, K., Lemjabbar-Alaoui, H., van Kuppevelt, T. H. and Rosen, S. D. Use of a phage display antibody to measure the enzymatic activity of the Sulfs. **Methods Enzymol**, 480: 51-64, 2010 査読有

[学会発表] (計11件)

1. Keratan sulfate: development and pathology  
Kenji Uchimura  
IBMS Glycobiology meeting, Taiwan, Jan 10 2012
2. アルツハイマー病モデルマウス脳に発現する細胞外マトリックスクンドロイチン硫酸糖鎖の構造解析  
新美しおり, 星野瞳, 細野友美, 道川誠, 内村健治  
第30回日本認知症学会 2011年11月12日、東京
3. Sulfotransferases that regulate expression of the 5D4 keratan sulfate epitope in early postnatal mouse brain  
Hitomi Hoshino, Shiori Ohtake-Niimi, Makoto Michikawa, Reiji Kannagi, and Kenji Uchimura  
Annual meeting of Glycobiology 2011, Seattle, USA, Nov 11, 2011
4. Carbohydrate-protein interactions in the vasculature  
Kenji Uchimura  
IBMS Seminar, Academia Sinica, Taiwan, Oct 17, 2011

5. セレクチンリガンド形成に関わる硫酸転移酵素は生後マウス発達脳における 5D4 ケラタン硫酸糖鎖抗原の発現を制御する星野瞳, 新美しおり, 道川誠, 神奈木玲児, 内村健治  
第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日、京都
6. アルツハイマー病モデルマウス脳に発現するコンドロイチン硫酸グリコサミノグリカンの構造解析  
新美しおり, 星野瞳, 道川誠, 門松健治, 内村健治  
第 84 回日本生化学会大会 2011 年 9 月 23 日、京都
7. アルツハイマー病モデルマウス大脳皮質に発現するヘパラン硫酸グリコサミノグリカンの構造解析  
細野友美, 新美しおり, ホサインモトラブ, 菅谷典子, 赤津裕康, トニーワイスコレイ, 木全弘治, 道川誠, 内村健治  
第 83 回日本生化学会大会 2010 年 12 月 9 日、神戸
8. Immunolocalization of the RB4CD12 Anti-Heparan Sulfate Epitope in Brain Microvessels and Its Degradation by Sulf-1 and Sulf-2  
Hosono-Fukao T, Hossain M, Ohtake-Niimi S, van Kuppevelt T, Michikawa M, Rosen S and Uchimura K  
Annual meeting of Glycobiology 2010, St. Pete Beach, USA, Nov 8, 2010
9. アルツハイマー病モデルマウス脳内に発現するヘパラン硫酸糖鎖の内部ドメイン構造の解析  
細野友美, 新美しおり, モトラブホサイン, マーカスブリッチギ, 赤津裕康, 菅谷典子, 木全弘治, 道川誠, トニーワイスコレイ, 内村健治  
第 29 回日本認知症学会 2010 年 11 月 5 日、名古屋
10. Immunolocalization of the RB4CD12 anti-heparan sulfate epitope in the brain and its degradation by Sulfs, extracellular endosulfatases  
Hossain M, Hosono T, Niimi S, van Kuppevelt T, Michikawa M, Rosen S, Uchimura K.  
25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010) Makuhari Messe, Makuhari, Aug, 5, 2010
11. The Sulf-degrading heparan sulfate epitope accumulates in cerebral amyloid  $\beta$  plaques of mouse models and patients of Alzheimer's disease  
Hosono T, Hossain M, Britschgi M, Akatsu H, van Kuppevelt T, Michikawa M,

Wyss-Coray T, Uchimura K.  
25th International Carbohydrate Symposium (ICS2010) Makuhari Messe, Makuhari, Aug, 2, 2010

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/biochem/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
内村 健治 (UCHIMURA KENJI)  
名古屋大学・医学研究科・特任准教授  
研究者番号：20450835

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし