

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790105

研究課題名(和文)新規糖鎖リガンドを創製した間葉系幹細胞のホーミングコントロール

研究課題名(英文)The glycan engineering for mesenchymal stem cell migration

研究代表者

酒井 信夫(Shinobu, Sakai)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号：60370938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞に発現するCD44分子に結合するシアリルラクトサミンユニットをフコース転移酵素を用いて糖鎖修飾することで、ex vivoにおけるE-セレクトインリガンドの効率的な創製に成功した。更に、E-セレクトインリガンドを有する間葉系幹細胞を自己免疫疾患モデルマウスの静脈内に投与して炎症部位への遊走を確認し、疾患に対してプリベンティブな活性を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed whether enforced E-selectin ligand expression on murine mesenchymal stem cells (MSCs) could impact their effect in reversing autoimmune disease model mice. Although murine MSCs natively do not express the E-selectin-binding determinant sialyl Lewis x (sLex), we found that fucosyltransferase-mediated alpha (1,3)-exofucosylation of murine MSCs resulted in sLex display uniquely on cell surface CD44 thereby creating hematopoietic cell E-/L-selectin ligand (HCELL), the E-selectin-binding glycoform of CD44. The findings provide evidence that glycan engineering to enforce HCELL expression boosts trafficking of infused MSCs to inflamed site and substantially improves their efficacy in reversing autoimmune disease.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：間葉系幹細胞 糖鎖修飾

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、神経幹細胞、造血幹細胞とともに「再生医療」の重要な一翼を担い、造血幹細胞の生着促進を目的に、骨髄移植と同時に骨髄間質細胞移植が既に行われている。また、骨髄移植における生着不全を防ぐことを目的に、骨髄間質細胞の移植が始められている。これらの臨床試験は、移植細胞の生着促進のみならず、移植片対宿主反応を抑制する可能性を示した。

近年、未分化な骨髄由来前駆細胞を用い、*in vivo* において中枢神経細胞、心筋細胞、肝細胞に分化したという報告が相次いでいる。それらの報告では、分化した細胞の同定はなされていないが、間葉系幹細胞が最も近い位置にあると考えられている。さらに、齧歯類だけでなくヒト骨髄からも比較的増殖能力の高い(寿命の長い)間葉系幹細胞を分離、培養する技術が考案されている。しかしながら、これらの細胞も通常の培養法では細胞増殖に限界があり、細胞治療の応用までには至らず、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞の寿命を延長させるには内在遺伝子の導入を必要としている。また、間葉系幹細胞の表面には、血管内皮のホーミングに参与する分子群が発現しておらず、局所的なトランスマイグレーションをコントロールすることができないため、移植した(寿命の短い)幹細胞を疾患部位において効率的に機能させることは非常に困難である。

間葉系幹細胞を“treatment modality”として利用した自己免疫疾患の治療研究は数多く行われており、潰瘍性大腸炎、移植片対宿主病、関節リウマチ、1型糖尿病、多発性硬化症などに対して、一定の治療効果が証明されている。これらの報告では、移植(静脈内投与)した間葉系幹細胞の多くは肺、肝臓、および脾臓においてトラップされ、疾患組織に到達する幹細胞はごく僅かであると考察している。研究代表者は、米国ブリガムアンドウィミンズ病院において「糖鎖-接着分子の相互作用が関与する免疫応答の機序解明」を遂行し、フコース転移酵素およびシアル酸転移酵素を用いた *ex vivo* における細胞表面分子の糖鎖修飾法を修得した。上述の学術的背景に鑑み、本研究において創製する間葉系幹細胞には、内皮炎症部位に発現するタンパク質に対する特異的リガンドが賦与されることから、効率的かつ安定的にターゲットとする組織に幹細胞を供給することが可能であると考えられる。本研究では、新規糖鎖リガンドを有する間葉系幹細胞を用いて、自己免疫疾患の治療を目的とした新たな細胞移植療法を確立する。

2. 研究の目的

近年、幹細胞、前駆細胞の定着、増幅および機能発現に参与する糖鎖-接着分子群の免

疫応答の機序解明が望まれ、細胞、組織を用いた生理的な治療法である再生医療においては、幹細胞、前駆細胞をターゲットとする臓器に効率的に定着、機能させる戦略が必要となっている。本研究では、炎症性疾患における局所的な免疫応答に参与する細胞と接着分子との二分子間相互作用に着目し、新規糖鎖リガンドを創製した間葉系幹細胞を用いた自己免疫疾患に対する新たな細胞移植療法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

マウス大腿骨より骨髄前駆細胞を単離し、10% ウシ胎児血清, 10 ng/mL 繊維芽細胞増殖因子, 100 U/mL ペニシリン, および 100 µg/mL ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地中で間葉系幹細胞に分化させた。すべての実験には継代回数 4-6 の間葉系幹細胞を用いた。間葉系幹細胞の表面分子を *ex vivo* において糖転移酵素(シアル酸転移酵素 および フコース転移酵素)を用いて糖鎖修飾し、血管内皮炎症部位に発現するタンパク質に対する特異的糖鎖リガンド(hematopoietic cell E-/L-selectin ligand; HCELL)を創製した。これらの間葉系幹細胞のクオリティは、生化学的、分子生物化学的な研究手法を用いて多角的に評価した。

また、ホーミングレセプターとなる接着分子を高度に発現する正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いたバインディングアッセイにより、糖鎖-接着分子の二分子間相互作用を可視的に解析した。さらに、それらの間葉系幹細胞を炎症性自己免疫疾患(1型糖尿病および潰瘍性大腸炎)モデルマウスに移入し、治療効果および機能発現のメカニズムを詳細に解析することで、糖鎖に賦与される生物学的意義の解明を試みた。

4. 研究成果

自己免疫疾患に特徴的な炎症性疾患の治療を指向した間葉系幹細胞の表面分子の糖鎖リガンドの創製に着手した。まず、マウス大腿骨骨髄より骨髄前駆細胞を採取し、間葉系幹細胞の分化・増殖を行い、それらの細胞表面分子の発現をフローサイトメトリーで解析すること、更に光学顕微鏡下モルフォロジーを観察することでクオリティチェックを行った。その結果、CD106 (VCAM-1), CD105, CD73, CD29 (β -integrin), CD44 マーカー陽性、CD11b, CD45 マーカー陰性の極めて純度の高いファイブプロプラスティックな幹細胞を調製することに成功した。更に、本研究課題の協力研究者であるロバート・サックス博士(米国ハーバード大学医学部)よりフコース転移酵素(α 1-3-フコシルトランスフェラーゼ)を入手し、供与体 GDP フコースを用いた酵素科学的修飾法による、*ex vivo* における間葉系幹細胞上の新規糖鎖

リガンド (HCELL) の効率的な創製を試みた。マウス間葉系幹細胞表面上の CD44 分子の非還元末端のラクトサミンユニット (Gal β 1-4GlcNAc, Gal β 1-3GlcNAc)、およびシアリルラクトサミンユニット (NeuAc α 2-3Gal β 1-4GlcNAc, NeuAc α 2-3Gal β 1-3GlcNAc) を特異的に糖鎖修飾するシアル酸転移酵素 (α 2-3-シアリルトランスフェラーゼ, STGal IV) およびフコース転移酵素 (α 1-3-フコシルトランスフェラーゼ, FT VI) のパターンを種々検討した。その結果、STGal IV および FT VI の反応条件を最適化することで、HCELL の効率的な創製法を確立した (図 1)。

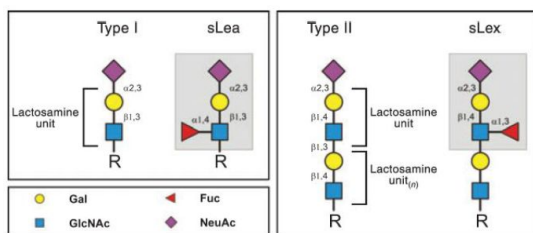


図 1 糖鎖修飾の酵素反応の概要

フローサイトメトリーおよびウェスタンブロットングより、HCELL 発現プローブである抗 Cutaneous Lymphocyte Antigen 抗体 (HECA-452) およびリコンビナント マウス E-Selectin (CD62E) Fc キメラ抗体の陽性率が従前約 80% 程度であったのに対し、95% 以上の高頻度に HCELL を調製することが可能であることを示した。

更に、HCELL を発現する間葉系幹細胞を E-セレクトリンを高度に発現する正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いたバインディングアッセイ (パラレルプレートフローチャンバーアッセイ) に供したところ、HCELL を発現する間葉系幹細胞は高い接着性を示した。他方、シアリダーゼでシアル酸を脱離させたグループ、抗ヒト CD62E 抗体で競合的にブロックしたグループ、および糖鎖修飾を施さなかった間葉系幹細胞の 3 つのグループにおいては、いずれも接着性を認めなかった (図 2)。

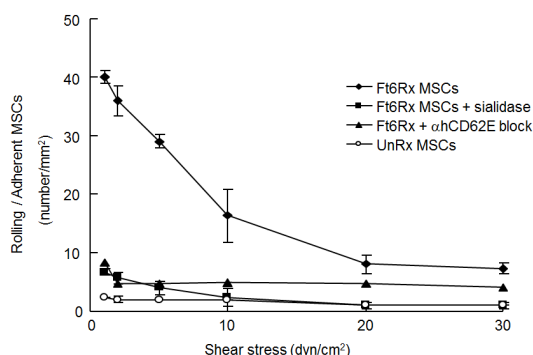


図 2 パラレルプレートフローチャンバーアッセイ

次に、HCELL を発現した間葉系幹細胞を

自己免疫疾患モデルマウスに移入し、炎症局所へのホーミングと炎症性疾患に対する効果を調べた。自然発症 1 型糖尿病モデル動物である雌性 NOD マウスに、HCELL を発現した間葉系幹細胞 0.5×10^6 cells を静脈内投与 (発症 2, 7, 30 日後の 3 回) した。膵臓組織の免疫染色においては内皮 E-セレクトリン近傍への HCELL を発現した間葉系幹細胞の局在を認め (図 3)、疾患発症は無処置のコントロール群および糖鎖修飾を施さない間葉系幹細胞を投与した群と比較して顕著に低減された。

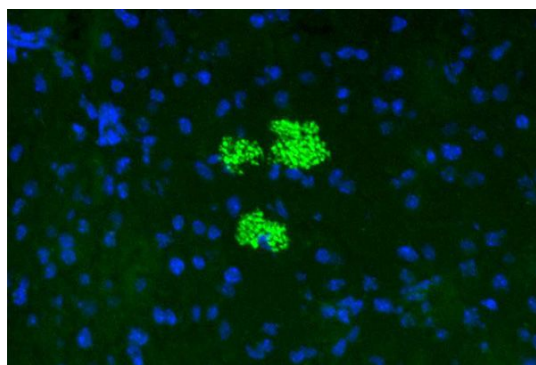


図 3 1 型糖尿病モデルマウスの膵島にコロニーを形成する HCELL 発現間葉系幹細胞

他方、5% (w/v) デキストラン硫酸 (平均分子量: 36,000-50,000) 経口投与により惹起される潰瘍性大腸炎モデルマウス (Balb/c) に HCELL を発現した間葉系幹細胞 0.5×10^6 cells を静脈内投与 (惹起 2 日前, 惹起当日, 惹起 2 日後の 3 回) した。PKH26 リンカーキットで生細胞染色した HCELL を発現した間葉系幹細胞は、重篤な炎症腸管内皮に局在していることをフローサイトメトリーで明らかにした。更に、疾患発症は無処置のコントロール群および糖鎖修飾を施さない間葉系幹細胞を投与した群と比較して遅延する傾向が認められた。

これらの知見は、炎症局所に発現する接着分子である E-セレクトリンに対するリガンド糖鎖である HCELL を賦与させることによって、間葉系幹細胞のホーミングおよびトランスマイグレーションをコントロールすることができることを実証した。今後の展望としては、自己免疫疾患に対するプリベンティブな作用機序の詳細を明らかにし、新たな細胞移植療法の確立を目指す。

<引用文献>

- Liu, D., et al., *Biol. Blood Marrow Transplant*, **16**: 1567 (2010)
- Nandie Tewarie, RD., et al., *Cell Transplant*, **15**: 563 (2006)
- Psaltis, PJ. et al., *Stem Cells*, **26**: 2201 (2008)
- Piryaei A., et al., *Stem Cell Rev.*, **7**: 103

(2011)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

【雑誌論文】(計1件)

Reza ABDI, Robert MOORE, Shinobu SAKAI, Conor B. DONNRLLY, Marwan MOUNAYAR, Robert SACKSTEIN, HCELL Expression on Murine MSC Licenses Pancreatotropism and Confers Durable Reversal of Autoimmune Diabetes in NOD Mice, *Stem Cells*, 査読有, **33**, 2015, 1523-1531.
DOI: 10.1002/stem.1948

【その他】

ホームページ等

<http://news.harvard.edu/gazette/story/2015/01/steering-stem-cell-trafficking-into-pancreas-reverses-type-1-diabetes/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 信夫 (SAKAI, Shinobu)
国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官
研究者番号：60370938

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

ロバート・サックスティン博士
米国ハーバード大学医学部・教授