

骨髄移植における糖鎖の重要性

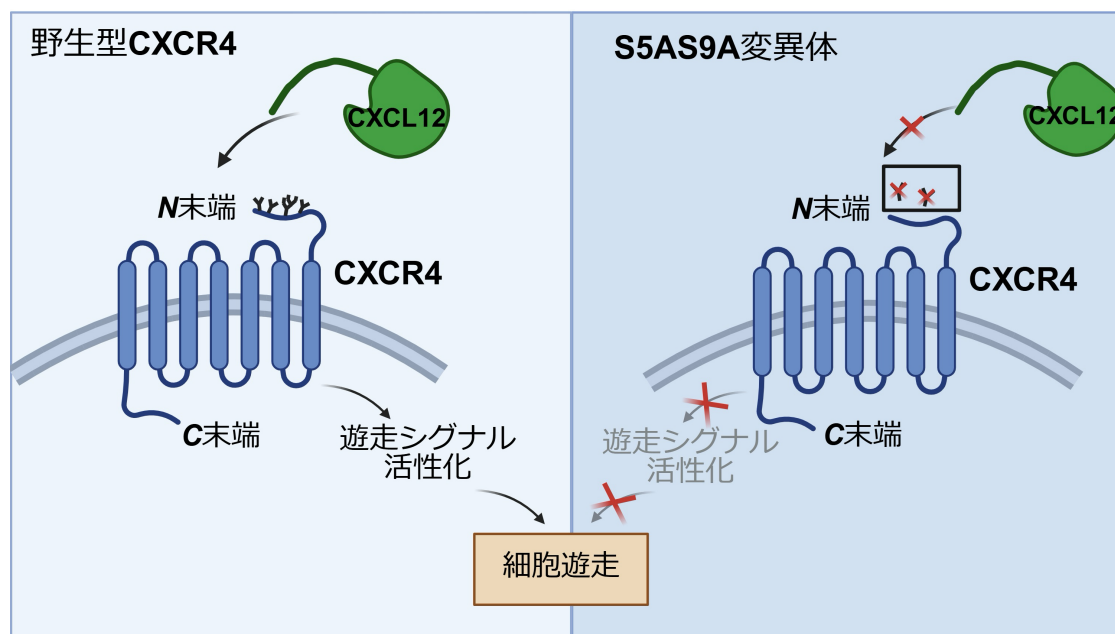
— 2つのアミノ酸が移植効率を決める可能性 —

概要

京都大学大学院医学研究科 PAN XUCHI 博士課程学生（研究当時）、成瀬智恵 同准教授、浅野雅秀 同教授（研究当時）らの共同研究グループは、ケモカイン受容体^{※1}CXCR4 の潜在的な O 型糖鎖付加部位が細胞の遊走と造血幹／前駆細胞(HSPC)のホーミング^{※2}に重要な役割を果たすことを発見しました。

当研究グループはこれまでに、糖鎖が HSPC 移植後の骨髄へのホーミングに重要であることを報告してきました。また、CXCR4 は HSPC のホーミングに関わる重要な分子ですが、CXCR4 を修飾する糖鎖の役割は不明でした。本研究で、培養細胞への CXCR4 変異遺伝子の導入や Crispr/Cas9 法^{※3}により作製した CXCR4 の O 型糖鎖^{※4}付加可能部位の 2 つのアミノ酸である Ser-5 と Ser-9 の変異（S5AS9A）マウスを用いて実験を行った結果、S5AS9A 変異 CXCR4 による培養細胞や HSPC の遊走能力と骨髄へのホーミング能力が有意に低下することがわかりました。この研究結果は、骨髄移植用造血幹細胞の移植後の生着効率向上の研究への展開が期待されます。

本研究成果は、2025 年 5 月 4 日に、国際学術誌「*Stem Cells*」にオンライン掲載されました。



CXCR4-CXCL12 結合メカニズム

（左）野生型 CXCR4 の N 末端にリガンド CXCL12 が結合して、下流の遊走シグナルが活性化され、細胞の遊走が促進されます。

（右）CXCR4 の N 末端の O 型糖鎖付加部位を欠損させた場合、リガンド CXCL12 と結合が弱くなり、下流の遊走シグナルが活性化されません。そのため、細胞の遊走が促進されませんでした。

1. 背景

造血幹／前駆細胞（HSPC）の移植後に、骨髄へのホーミング・生着効率を決める因子の同定とその向上は臨床現場の大きな課題です。細胞と細胞の接着・結合に重要な役割を果たす細胞表面分子の多くは、その活性が糖鎖修飾により制御されていることがわかってきましたが、HSPC のホーミングにおける糖鎖の役割はよくわかっていません。当研究室の先行研究において、ガラクトース転移酵素の一つである β 4GalT-1 を欠損したマウスから採取した HSPC を野生型マウスに移植すると、骨髄へのホーミング効率が著しく低下したことから、ガラクトース糖鎖は HSPC 移植後の骨髄へのホーミングに重要な役割を果たしていることを報告しました (Takagaki *et al.* *Scientific Reports*, 2019)。しかし、HSPC の骨髄ホーミング・生着におけるガラクトース糖鎖の具体的な役割については、わかっていませんでした。

2. 研究手法・成果

HSPC の骨髄ホーミング・生着に重要な分子がいくつか知られていますが、本研究では CXCR4 の糖鎖に注目して研究を進めました。まず、培養細胞 HEK293 と NIH/3T3 細胞に CXCR4 遺伝子を強制発現させ、Wound healing assay^{※5} および Transwell assay^{※6} により、CXCR4 のリガンドである CXCL12 への遊走活性を測定しました。CXCL12 は CXCR4 の N 末端 38 アミノ酸領域に結合することが知られているので、その配列に含まれるアスパラギン (Asn) (*N* 型糖鎖^{※7} が結合) やセリン (Ser) /スレオニン (Thr) (*O* 型糖鎖が結合) を、グルタミン (Gln) やアラニン (Ala) に置換して糖鎖が付かないようにした変異 CXCR4 を発現する細胞を作製しました。その結果、*O* 型糖鎖付加可能部位である 2 つのアミノ酸—5 番目の Ser (Ser-5) と 9 番目の Ser (Ser-9) —を Ala に置換した変異体 (S5AS9A 変異体) では、細胞遊走活性が有意に抑えられました。また、細胞遊走に関するシグナル伝達分子を解析したところ、S5AS9A 変異体の細胞は、細胞遊走に関するシグナルの活性化が見られませんでした。さらに、CXCR4 発現細胞への CXCL12 の結合も S5AS9A 変異体細胞では減弱していました。*O* 型糖鎖付加部位の予測プログラム (NetOGlyc 4.0 Server) や電気泳動による分子量の解析およびレクチンブロットにより、Ser-5 と Ser-9 には *O* 型糖鎖が付加していることが示唆されたことから、CXCR4 の 2 つのアミノ酸の糖鎖修飾が遊走活性に重要であることが示唆されました。

続いて、レンチウイルスベクター^{※8}を用いて、野生型 CXCR4 遺伝子と S5AS9A 変異遺伝子を CXCR4 欠損 HSPC へ導入し、致死量の γ 線を照射した野生型マウスに移植することにより、骨髄へのホーミング活性を解析しました。野生型 CXCR4 導入 HSPC はホーミング活性が増加しましたが、S5AS9A 変異体導入ではその効果がありませんでした。また、Crispr/Cas9 法で S5AS9A 変異マウスを作製し、その骨髄細胞の CXCL12 への遊走活性を Transwell assay により測定したところ、野生型細胞に比べて S5AS9A 変異細胞では有意に低下しました (図 1)。さらに、S5AS9A 変異 CXCR4 の HSPC を致死量の γ 線を照射した野生型マウスに移植した結果、HSPC の骨髄へのホーミングが有意に低下しました (図 2)。以上の結果から、CXCR4 の Ser-5 と Ser-9 は骨髄へのホーミングに重要であり、そこに結合する *O* 型糖鎖が機能する可能性が示唆されました。本研究はマウス CXCR4 について解析しましたが、ヒト CXCR4 も同じ位置に *O* 型糖鎖付加部位があるので、ヒト CXCR4 でも同様の現象が起こる可能性があります。

3. 波及効果、今後の予定

本研究は、HSPC の骨髄へのホーミングに関わるタンパク質 CXCR4 の糖鎖付加部位を予測し、さらにその糖鎖付加部位を欠損させることで、HSPC のホーミング活性への重要性を示しました。この発見は、骨髄移植用造血幹細胞の移植後の生着効率向上の研究への展開が期待されます。また、造血幹細胞の表面タンパク質の糖鎖修飾を操作することによる、骨髄移植の新たな技術開発の可能性を示しています。

CXCR4 は G タンパク質共役型受容体 (GPCR)^{※9} のため、タンパク質の精製が困難であり、本研究では CXCR4 に付加した糖鎖の同定ができませんでした。今後、CXCR4 の精製方法の改善や、糖鎖の同定、ヒトの HSPC を用いた研究が進められることで、より効果的な骨髄移植技術開発への応用が期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は、文部科学省科学研究費補助金 JP21H02389 (浅野雅秀)、京都大学メディカルイノベーション大学院プログラム (異分野) 共同研究プロジェクト (PAN XUCHI)、京都大学教育研究振興財団 (成瀬智恵) の支援を受けて実施されました。

<用語解説>

※1 ケモカイン受容体

ケモカインと呼ばれるサイトカインの一種と相互作用する受容体で、ケモカインのシグナルを細胞内に伝達します。ケモカイン受容体は、CXC ケモカイン受容体、CC ケモカイン受容体、CX3C ケモカイン受容体、XC ケモカイン受容体の 4 つのファミリーに分類されます。

※2 ホーミング

幹細胞が、特定の場所に移動し、定着する現象を指します。

※3 Crispr/Cas9 法

Crispr/Cas9 法とは、DNA の二本鎖切断を原理とする遺伝子改変ツールです。CRISPR-Cas9 は、標的とする DNA 配列を特異的に認識して結合できるガイド RNA (gRNA) と、DNA の二本鎖を切断できるヌクレアーゼである Cas9 から構成されます。Crispr/Cas9 法は、DNA 二本鎖を切断してゲノム配列の任意の場所を削除、置換、挿入することができる新しい遺伝子改変技術です。

※4 O型糖鎖

O型糖鎖はセリン (Ser) あるいはスレオニン (Thr) 側鎖の酸素原子に結合し、細胞の遊走、接着、細胞間相互作用に重要な機能を持っています。どのような条件の時にどんな種類の O型糖鎖が結合するのかは、まだ不明な点が多く残されています。

※5 Wound healing assay

細胞を細胞培養プレートに培養し、単層に成長させます。ピペットチップ等で細胞のシートに傷を作り、時間経過とともに細胞が傷を埋めていく様子を顕微鏡で観察します。この実験は、細胞遊走および細胞間相互作用を研究するために使用される実験技術です。

※6 Transwell assay

上部チャンバーに細胞を配置し、下部チャンバーに CXCL12 を添加します。細胞は CXCL12 に誘導されて、多孔質膜の孔を通過し、下部チャンバーに移動します。この実験は、移動した細胞の数を測定することで、細胞の移動能力を評価します。

※7 N型糖鎖

N型糖鎖とは、アスパラギン (Asn) の側鎖の中のアミド窒素原子に結合します。このときのタンパク質のアミノ酸配列は Asn-X-Ser/Thr (X は任意のアミノ酸残基) です。

※8 レンチウイルスベクター

ヒト免疫不全ウイルス 1 型 (HIV-1) を改変した自己増殖能欠損型ウイルスベクターです。HSPC をはじめ様々な細胞に感染して遺伝子を効率よく導入できます。

※⁹ G タンパク質共役型受容体

細胞膜上に存在し、細胞外からのシグナルを認識し、細胞内シグナル伝達を担うタンパク質の一種です。細胞膜を 7 回貫通する特徴的な構造から 7 回膜貫通型受容体と呼ばれることもあります。

<研究者のコメント>

「この研究を通じて、糖鎖は造血幹細胞の骨髄へのホーミングに重要であることがわかりました。移植用造血幹細胞表面の糖鎖付加状態の解析やタンパク質の糖鎖修飾を操作することにより、骨髄移植の新たな技術開発ができることが期待されます。」(PAN XUCHI)

<論文タイトルと著者>

タイトル：Critical role of the potential *O*-linked glycosylation sites of CXCR4 in cell migration and bone marrow homing of hematopoietic stem progenitor cells

(CXCR4 の潜在的な *O*型糖鎖付加部位が細胞の遊走と造血幹／前駆細胞のホーミングに重要な役割を果たす)

著者：Xuchi Pan, Chie Naruse, Tomoko Matsuzaki, Ojiro Ishibashi, Kazushi Sugihara, Hidetsugu Asada, Masahide Asano (PAN XUCHI、成瀬 智恵、松崎 朋子、石橋 旺士郎、杉原 一司、浅田 秀基、浅野 雅秀)

掲載誌：Stem Cells DOI：10.1093/stmcls/sxaf025

<参考図表>

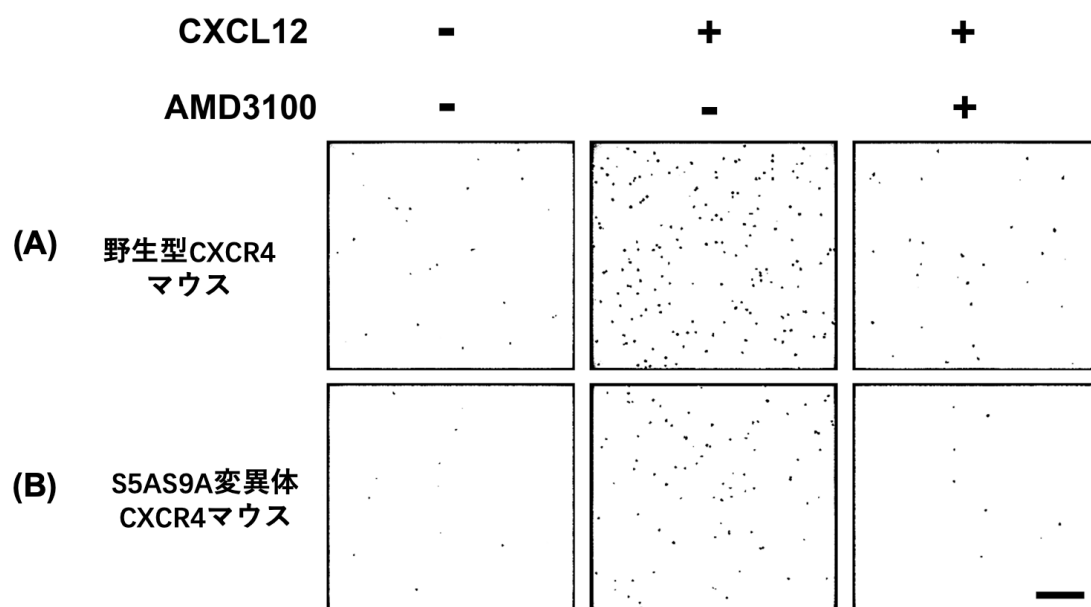


図1 CXCR4 の Ser-5 と Ser-9 を Ala に置換した変異マウスの骨髄細胞を用いて、骨髄細胞の CXCL12 への遊走活性を測定しました。(A) リガンド CXCL12 存在下での野生型骨髄細胞の遊走活性が増加しました。

(B) S5AS9A 変異骨髄細胞では CXCL12 存在下での遊走活性が野生型に比べて低い状態でした。CXCL12 結合阻害剤の AMD3100 存在下ではどちらも遊走活性が消失したことから、この実験における遊走活性の上昇は CXCL12 を加えたためであると確認できました。

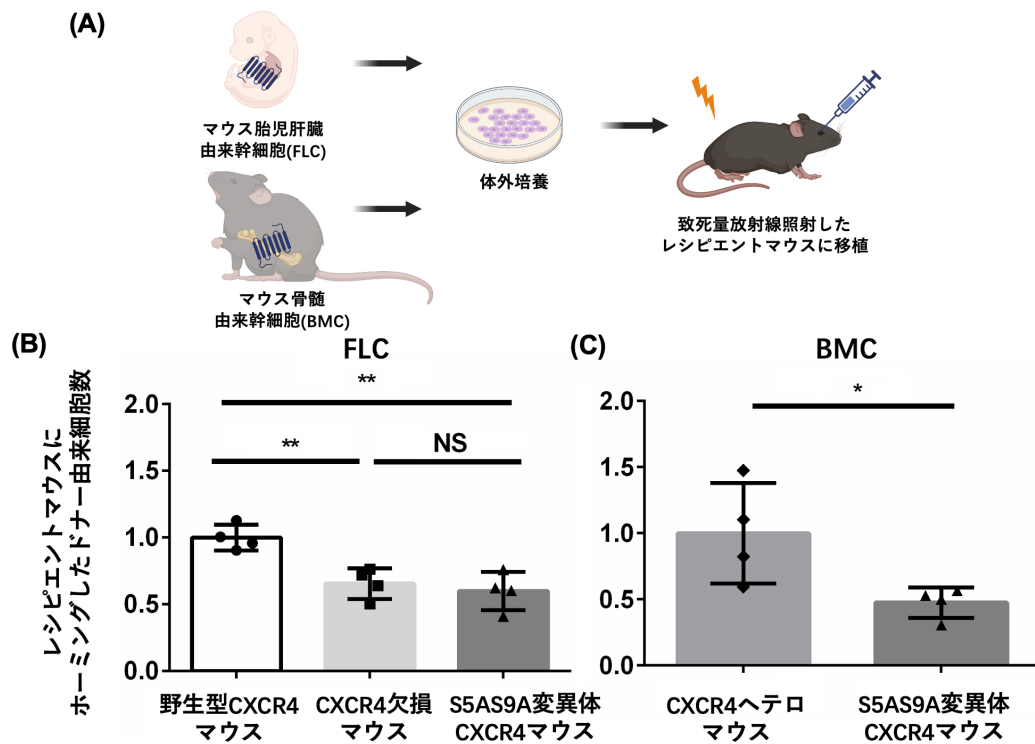


図2 (A) マウスの胎児肝臓由来幹細胞 (FLC) と骨髄由来幹細胞 (BMC) を用いて、致死量放射線照射したレシピエントマウスに移植しました。(B) S5AS9A 変異体 CXCR4 マウス由来 FLC のホーミング能力は野生型に比べて、有意に低下しました。そのホーミング能力は CXCR4 欠損マウスと同じレベルでした。(C) S5AS9A 変異体 CXCR4 マウス BMC の CXCR4 の発現量は CXCR4 ヘテロマウスと同じですが、ホーミング能力が有意に低下しました。