

# 加齢皮膚の幹細胞で見られる特徴的糖鎖の機能解析

熊本大学国際先端医学研究機構

佐田 亜衣子

## [ I ]本研究の背景と目的

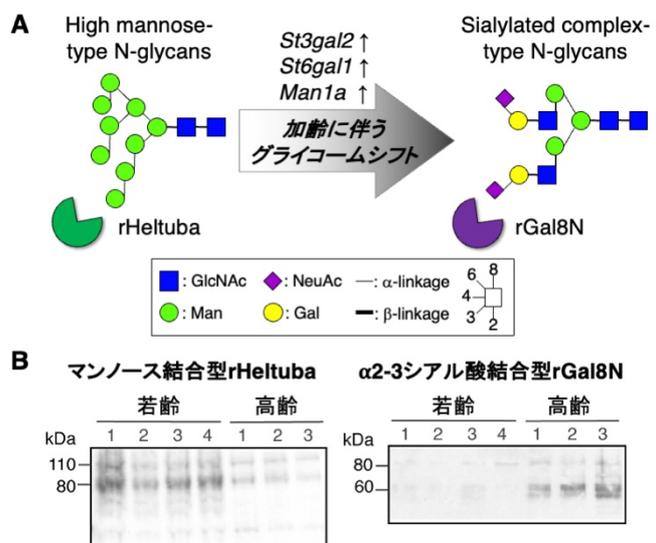
世界規模で急速に高齢化が進む中、加齢関連疾患の原因究明とその克服は大きな課題となっている。近年、組織の加齢性機能低下の一因として、分化細胞の供給源である幹細胞の老化（ステムセルエイジング）が提唱されている。しかし、幹細胞老化に関する知見の多くは、個々の遺伝子やゲノム制御に着目したもので、解析の難しいタンパク質修飾の視点からの研究が遅れている。

細胞表面の糖鎖は「細胞の顔」とも呼ばれるように、細胞の種類や状態によって大きく変化する。タンパク質や脂質を修飾する糖鎖は、細胞間コミュニケーションやシグナル伝達、細胞外マトリクスとの接着などに関わり、発生やがん化、炎症といった多様な生命現象を司る。血液型や腫瘍マーカーをはじめ、糖鎖の違いは優れた分子マーカーとしても幅広く利用されてきた。個体や細胞の老化の過程で、血清や線維芽細胞、脳や筋肉などの臓器でシアル酸の変化が観察されるが（Hanisch et al., PLoS One 2013, Itakura et al., Cell & Bioscience 2016, Catera et al., Oncotarget 2016）、その生物学的意義は不明である。近年、ヒト3D皮膚モデルを用い、糖鎖関連遺伝子をゲノム編集法により欠損させ、その生理機能を調べる“Glycoskin”が開発され、皮膚における糖鎖の重要性が注目されている（Dabelsteen et al., Dev Cell 2020）。しかし、生体内において、糖鎖の構造—機能—生物学的意義を結びつけた研究は少なく、未知な部分が多い。特に成体幹細胞は、組織を構成する全細胞の1パーセント以下の割合で存在するごく少数の細胞であり、微量の生体サンプルを用いた糖鎖解析は技術的に困難であった。

佐田らはこれまでに、糖鎖工学を専門とする舘野浩章（産業技術総合研究所）との共同研究により、若年、老年マウスの皮膚から単離した表皮幹細胞を用いた網羅的な糖鎖プロファイリングを行った。舘野らが開発したレクチンアレイ法は、糖結合タンパク質であるレクチンをスライドガラス上に固定化することで、糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出可能とし、幹細胞の生化学的特性を理解する上での技術的な制約を克服した。この系を用い、我々は、加齢に伴い、表皮幹細胞の糖鎖修飾パターンがダイナミックに変化する「グリコームシフト」が起こることを発見した（図1、Oinam et al., Aging Cell, 2020）。

さらに、若年、老化幹細胞に有意に存在するマンノース、 $\alpha$ 2-3シアル酸をそれぞれ認識する糖結合タンパク質であるレクチン（rHeltuba、rGal8N）を同定し、新たな老化バイオマーカーとしての可能性を見出した。このような糖鎖変化に伴い、シアル酸の付加に働く糖転移酵素（St3gal2、St6gal1）、およびマンノースの分解に働くMan1aが、表皮幹

図1. 表皮幹細胞の老化状態を検出するレクチンプローブの同定



細胞の老化に伴い有意に発現が上昇していた。表皮幹細胞の初代培養において、これら3種の糖修飾酵素を、単独あるいは組み合わせで過剰発現させることで老化型糖鎖パターンを誘導すると幹細胞が徐々に増殖能力を失うことから、加齢に伴う糖鎖変化が、単に老化の結果ではなく、幹細胞の機能低下を引き起こす原因となる可能性が示唆されている。しかし、なぜ老化した幹細胞で糖鎖が変化するのか、その生物学的意義や分子機構は不明である。そこで本研究は、*in vitro*、*in vivo*において表皮幹細胞の糖鎖を若齢一加齢型へと改変し、分子機構を解明することで、糖鎖を基軸とした老化制御へ向けた基盤を創出することを目的に実施した。

## [II]研究方法

**トランスジェニックマウスの作出と解析**：全ての動物実験は、熊本大学の動物実験委員会のガイドラインに従って実施した。糖鎖関連遺伝子 (*Man1a*, *St3 Gal2*, *St6gal1*) のN末にc-MycまたはFlagタグを挿入し、DNA断片はpTRE2 (Clontech) ベクターにクローニングした。マイクロインジェクションは、熊本大学生命資源研究・支援センター 資源開発分野 動物資源開発研究施設 (CARD) に受託した。得られたマウスは、*Rosa-rtTA*、*K14-rtTA*、*Pdgfra-rtTA*マウスと交配し、二重トランスジェニックマウスを得た。外来遺伝子発現誘導のため、マウスにドキシサイクリンを含む餌を与え、PCRによる遺伝子型確認後、QRT-PCR、ウェスタンブロット、免疫染色によって発現を確認し、マウスラインの選別を行った。皮膚の表現型は、外見変化の観察に加え、H-E染色、免疫染色、ホールマウント染色によって解析した。

**マウス初代ケラチノサイトの培養とレンチウイルスを用いた遺伝子導入**：マウス初代ケラチノサイトは、C57BL6/J新生児マウス皮膚から単離した。ケラチノサイトをマイトマイシン処理したマウス胚性線維芽細胞に播種し、低カルシウム培地 (15%ケレックス処理血清、0.05 mM CaCl<sub>2</sub>) 中で培養した。*Man1a*、*St3gal2*、*St6gal1*、またはEGFPをコードするマウスcDNAをCSII-CMV-MCS-IRES2-Bsdベクター (理研) にクローニングし、Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、パッケージングベクターpRSV-Rev, pMD2.G およびpMDLg/pRRE (Addgene) とともに293 T細胞にトランスフェクションさせた。トランスフェクション後2日目と3日目にレンチウイルスを含む培地を回収し、Lenti-X concentrator (Takara Bio) を用いて濃縮した。コラーゲンIV (シグマ社製) でコートした24ウェル培養プレートにマウスケラチノサイトを播種した1日後、ケラチノサイトを4  $\mu$ g/mLポリブレンとともにレンチウイルスに16時間感染させた。糖鎖関連遺伝子 (*Man1a*, *St3 Gal2*, *St6gal1*) を単独または3つ同時に発現させたものを実験に使用した。16時間後に培地を交換し、1  $\mu$ g/mlの濃度のblasticidinを用いて感染したケラチノサイトを選択した。

**レクチン免疫沈降とレクチンブロット**：抗体を結合した磁性ビーズとサンプルを混合後、磁石を使ってビーズをチューブ側面に集め、上清を除去した。溶出バッファーを加え免疫沈降物をビーズから解離し回収した。糖鎖の違いを検出するレクチンブロットに使用するレクチン (rHeltuba, rGal8N, SNA) は、大腸菌を用いて調製したものを舘野より分与してもらい使用した (Tateno et al., 2011)。レクチンは、HRP labeling kit (Dojindo) を用いて HRP と結合させ、最終濃度が 0.1  $\mu$ g/ml となるように調整した。各細胞集団から1  $\mu$ gのタンパク質を5-20%ゲルでSDS-PAGEにより分離し、トランスファー後、Carbo-Free blocking solution (Vector Laboratories) で1時間ブロッキングした。HRP標識レクチンと4°Cで一晩インキュベートし、シグナルを検出した。ゲルバンド中のタンパク質は、株式会社かずさゲノムテクノロジーズ、およびプロメガに受託し、LC-MS分析を行った。得られた MSデータから PEAKS Studioを用い解析し、タンパク質・ペプチドの同定を行った。

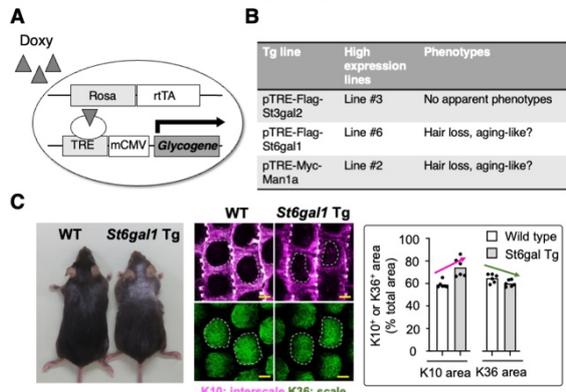
### [III]結果

#### 老化型糖鎖パターンを持つマウスモデルの作出と表現型解析

高齢皮膚で見られる糖鎖を持つトランスジェニック (Tg) マウスを作出し、高マンノース型からシアル酸を含む複合型へ糖鎖修飾パターンが変化することで皮膚や表皮幹細胞の老化が加速される可能性について検討を行なった。ドキシサイクリン依存的にシアル酸の付加に働く糖転移酵素 (St3gal2、St6gal1)、およびマンノースの分解に働くMan1a遺伝子の発現が誘導されるTet-ONマウスを作製し、qRT-PCR、ウェスタンブロット、免疫染色、レクチンブロットによりトランスジェニックの発現とそれに伴う糖鎖変化の誘導を確認した。

6~8週間の発現誘導により、St6gal1、Man1aを過剰発現するTgマウスにおいては、脱毛や炎症といった皮膚老化様の表現型が認められた(図2)。さらに、免疫染色により表皮幹細胞の表現型を調べたところ、C57BL/6Jの高齢(24ヶ月齢)マウスで見られるような分化や増殖の異常、および老化マーカーであるLaminの発現低下が、Tgマウスでは早期に誘導されている可能性が示唆された。一方St3gal2過剰発現マウスにおいては顕著な表現型が認められなかった。糖鎖の構造によって表皮幹細胞に及ぼす影響が異なる可能性が示唆され、現在さらなる表現型解析を進めている。

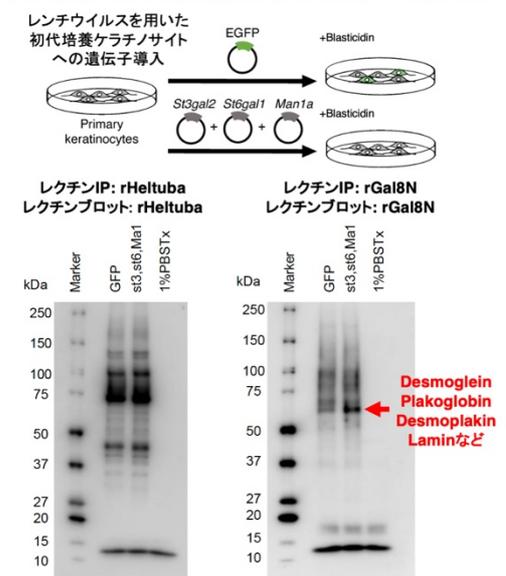
図2. 高齢型糖鎖の誘導による老化様表現型の解析



#### 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定

マウス初代培養表皮幹細胞に、加齢に伴って発現上昇する3種の糖修飾酵素 (St3gal2、St6gal1、Man1a) を、レンチウイルスを用いて単独または同時に発現させることで、高齢型の糖鎖パターンをin vitroで誘導した。細胞から抽出した膜タンパク質を材料にレクチンプローブ (rHeltuba、rGal8N、SNA) を用いた免疫沈降・質量分析を行なった。その結果、高齢型の糖鎖α 2-3シアル酸を認識するレクチンプローブrGal8Nに対して、デスモソーム構成タンパク質 (Desmoglein、Plakoglobin、Desmoplakin) と核膜タンパク質Laminが結合性を示す可能性が示唆された。若齢型糖鎖 (マンノース) 結合レクチンrHeltubaについても同様に免疫沈降・質量分析を行ったが膜タンパク質は含まれていなかったためさらなる検討が必要である。

図3. 加齢に伴う糖鎖修飾が変化するコアタンパク質の同定



### [IV]考察と今後の展望

本研究では、老化した表皮幹細胞において、α 2-3およびα 2-6シアル酸の増加と、それに対応するシアル酸転移酵素 (St3gal2およびSt6gal1) の発現上昇の機能的意義について解析を進めた。今回の結果と一致するように、老化したマウスの筋肉ではシアル酸の充進が観察される (Hanisch et al., PLoS One 2013)。また、シアル酸転移酵素の増加は、ヒトにおける老化マーカーとして示唆されており、80歳以上の人の血漿中でSt6gal1の活性が高いことが示されている (Catera et al., Oncotarget 2016)。一方、α 2-3、α 2-6シ

ル酸は、ヒト真皮線維芽細胞の細胞老化や加齢の際に減少することが報告されている (Itakura et al., Cell Biosci. 2016)。このようなシアル酸の違いは、細胞の種類、動物種、あるいは標的タンパク質の違いによるものと考えられ、シアル酸の生理機能が多様であることを示している。また、老化した皮膚は創傷治癒能力の低下を示すが、これは表皮幹細胞と樹状突起上皮T細胞間のクロストークが損なわれていることが一因である (Keyes et al., Cell. 2016)。樹状細胞を含むいくつかの免疫細胞が表皮にマンノース結合受容体を持っていることから (Wollenberg et al., J Invest Dermatol. 2002)、今回我々が見出した表皮幹細胞におけるマンノースの減少は、老化した皮膚における幹細胞と免疫細胞の相互作用の欠陥と関連している可能性がある。

今後は、糖鎖修飾の違いが生じるコアタンパク質の機能解析を進め、糖鎖修飾の機能的な重要性と生物学的意味を明らかにすることで、糖鎖を基軸とした老化制御へとつながる。糖鎖は、細胞表面に位置し、アクセスしやすいという利点から、創薬や診断の標的分子として注目が高まっている。糖鎖をツールとして、表皮幹細胞の老化状態を簡便に検出し、制御することが可能となれば、老化を予防し、健康長寿を目指す糸口となるとともに、より精度の高い再生医療の実現が期待される。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なご支援をいただきました公益財団法人アステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。本研究は、舘野浩章先生（産業技術総合研究所）との共同研究の成果であり、日頃からレクチン解析に関する議論やサポートをいただけますことを御礼申し上げます。トランスジェニックマウスの作出にあたっては、竹田直樹先生、荒木喜美先生（共に熊本大学 生命資源研究・支援センター）にご支援いただき、非常に円滑にマウス作製を行うことができました。

## [V] 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Aiko Sada: Skin stem cells shuffle sugars as they age: Glycome profiling reveals dynamic glycan alterations during epidermal stem cell aging, Singapore International Skin Conference 2021, Online, February 24-26, 2021 (招待講演、国際)
2. Nguyen Thi Kim Nguyen, Erna Raja, Lalhaba Oinam, Yen Xuan Ngo, Hiromi Yanagisawa, Hiroaki Tateno, Aiko Sada: ST6GAL1 sialyltransferase, a potential player in epidermal stem cell aging、第45回日本分子生物学会年会、千葉、ポスター発表、2022年11月30日（国内）