

# 研究シーズ探索プログラム 研究課題別評価書

## 1. 研究課題名

多能性幹細胞の未分化維持に関与する糖鎖の探索

## 2. 研究代表者

佐藤 智典（慶應義塾大学 理工学部 教授）

## 3. 研究シーズ探索成果の概要

幹細胞の未分化の指標として SSEA (Stage-specific Embryonic Antigens) 等の糖鎖抗原が抗体法により検出されている。しかしながら幹細胞には SSEA 抗原以外の糖鎖合成経路が存在していると考えられるが、未だ十分に明らかにされていない。複数の糖鎖合成経路により合成される糖鎖を解析することで、細胞の発生や分化に関わる基礎的な情報を得ることを目指した。さらに、再生医療においては未分化状態の品質保証の精度を向上する手法の開発に展開することができる。そこで、本研究では、胚性癌腫細胞、サル ES 細胞およびヒトの iPS 細胞などに発現する糖鎖の解析を行った。特に、ヒトの体細胞と iPS 細胞間での糖鎖生合成経路の比較検討を行った。体細胞から多分化能を獲得して iPS 細胞になることで、特定のスフィンゴ糖脂質の生合成経路が変化することが見いだされた。さらに、リアルタイム PCR により生合成経路の調節に関わる糖鎖合成遺伝子を明らかにした。

## 4. 研究シーズ探索のねらい

細胞表面の糖鎖分子は、増殖などの細胞機能の制御、病原性分子や微生物に対する受容体などに関与している。初期胚の研究においては、発生や分化過程におけるマーカー分子として利用されている。胚性幹細胞 (ES) および人工多能性幹細胞 (iPS) では未分化の指標として糖鎖抗原である SSEA 等が知られている。SSEA 以外の糖鎖マーカーを探索することで、再生医療の分野で必要な未分化状態の品質保証の精度を向上できると期待される。

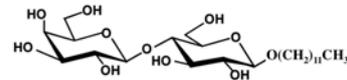
本研究では細胞に発現する糖鎖構造の解析手法の確立を行った。幹細胞では少ない細胞数での構造解析が望まれる。そこで、LC-MS を用いることで  $10^3 \sim 10^5$  程度の細胞数で糖鎖構造を決定するための高感度な分析を行った。細胞としては胚性癌腫 (EC) 細胞 F9、サルの ES 細胞、ヒトの iPS 細胞を用いた。フィーダー細胞に発現する糖鎖構造の解析、フィーダー細胞の有無による幹細胞での発現糖鎖の相違、iPS 細胞がヒト胎児肺組織由来細胞 MRC5 から多分化能を獲得した過程での発現糖鎖の変化を解析した。用いた細胞における内在性の糖脂質の構造解析と糖鎖プライマー法を用いた糖鎖生合成経路の解析を行った。これにより、多能性を有した細胞に特徴的な糖鎖生合成経路を明らかにすることを目指した。

## 5. 研究シーズ探索の方法と成果

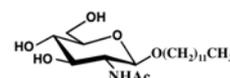
### 5.1 方法

#### 糖脂質の解析

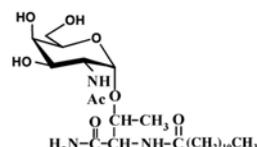
細胞画分はクロロホルム/メタノール = 2/1 (v/v)を加えて超音波照射した後、遠心分離した上清を回収した。沈殿物にはクロロホルム/イソプロピルアルコール/水 = 7/11/2 (v/v/v)を加えて、超音波照射を行い、遠心分離した上清を回収し、遠心エバポレーターで濃縮した。アミノカラムにより糖脂質を回収し、中性糖脂質の分離を行った。得られた糖脂質はLC-MSにより構造解析を行った。



1) Lac-C12



2) GlcNAc-C12



3) GalNAc-Thr-C12

図1 本研究で用いた糖鎖プライマーの構造

#### 糖鎖プライマー法による解析

糖鎖プライマーとしては図1に示す3種類を採用した。細胞培養用無血清培地に10~50 μMの糖鎖プライマーを混合し、細胞と1~2日間インキュベーションした。培地画分を回収し、糖鎖伸長生成物はSep-Pak C18を用いて抽出した。得られた生成物はLC-MSにより構造解析を行った。

### 5.2 成果

#### 1) マウス胚性癌腫細胞F9に発現する糖鎖生合成経路の解析

マウス胚性癌腫細胞F9に糖鎖プライマーであるLac-C12およびGlcNAc-C12を投与して得られた糖鎖伸長生成物の構造を解析した。Lac-C12由来の糖鎖伸長生成物としては、グロボ系列やガングリオ a/b 系列の糖鎖が検出された。GlcNAc-C12由来の生成物は、ラクト/ネオラクト系列およびルイス抗原を含んでいた。これまでにF9細胞にはForssmanやSSEA-1が発現されていることが知られており、それらの糖鎖を含んだ構造が検出されていた。それに加えて、ラクト/ネオラクト系列のGal-GlcNAc-C12およびNeuNAc-Gal-GlcNAc-C12等の糖鎖構造が存在していることが新たに見いだされた。それらの糖鎖は、レチノイン酸とdcAMPで処理して分化誘導することで、発現量の有意な上昇が見られた。糖鎖伸長生成物の発現量の上昇は、糖鎖合成遺伝子であるB3GALT1およびST3GAL6の発現上昇と関連していることがRT-PCRの結果から示された。このように、糖鎖プライマー法を用いることで分化マーカーとして利用できる糖鎖の候補が簡便に見いだされることが示された。

#### 2) フィーダー細胞に発現する糖鎖生合成経路の解析

ES/iPS細胞の培養はフィーダー細胞の共存下で行われることが多い。幹細胞に発現する糖鎖構造を知る上でも、フィーダー細胞に発現する糖鎖構造を解析する必要がある。そこで、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)に発現している糖鎖構造の解析を行った。糖鎖プライマーLac-C12を用いて得られた糖鎖伸長生成物からは、ガングリオ系列の糖鎖と、グロボ系列の糖鎖合成経路の存在が示された。また、GlcNAc-C12を用いて得られた糖鎖伸長生成物からは、ラクト/ネオラクト系列の糖鎖生合成経路の存在が示された。

#### 3) サルES細胞に発現する糖鎖生合成経路の解析

フィーダー細胞共存下で培養したカニクイザル胚性幹細胞(CMES)に、糖鎖プライマーLac-C12を投与して得られる糖鎖構造の解析を行った。グロボ/イソグロボ系列の糖鎖の発現が検出されたが、それ以外の糖鎖伸長生成物の検出はできなかった。そこで、内在性のスフィンゴ糖脂質の構造解析を行った。その結果、両方の系でほぼ同様の糖脂質が検出された。そのために検出された糖脂質がどちらの細胞由来であるかを定めることはできなかった。ただし、細胞数としては、MEFはCMES細胞よりも少ないことを考慮すると、CMES細胞では、

主にグロボ／イソグロボ系列の糖鎖生合成経路が存在していることが推察された。この結果により、幹細胞での糖鎖構造の解析には、フィーダーフリーで培養する必要があることが示された。

#### 4) フィーダーフリーで培養されたヒト iPS 細胞に発現する糖鎖の解析

iPS 細胞の糖鎖構造を解析するために、複数の iPS においてフィーダーフリーで培養できる細胞株の取得を試みた。その結果、未分化状態を維持したまま、フィーダーフリーで培養できる 3 種類の iPS 細胞株を取得した。未分化状態の維持は、SSEA4, TRA-1-60, Nanog, Oct3/4, および Sox2 を用いた免疫組織化学的な染色により確認した。

ヒト胎児肺組織由来線維芽細胞 (MRC5 細胞) とそれから誘導された iPS 細胞 (MRC5iPSA)、および子宮内膜 (UtE) 細胞とそれから誘導された 2 種類の iPS 細胞 (UtEiPSA および UtEiPSB) を用いて、各細胞に発現する糖脂質の構造解析を行った。その結果は表 1 に示した。主にグロボ系列とガングリオ系列の糖脂質が検出された。グロボ系列の糖脂質においては、MRC5 細胞や UtE 細胞で検出された種類が異なっていた。一方、3 種類の iPS 細胞では由来によらず殆ど同一の糖脂質が検出された。iPS 細胞では、SSEA3 や globoH が検出された。SSEA3 はこれまでに、ヒトの ES/iPS 細胞の未分化マーカーとして利用されているが、globoH の発現については知られていない。また Lc4Cer (もしくは nLc4Cer) に Fuc が結合した生成物である H 型抗原が検出された。幹細胞における H 型抗原の発現についてもこれまでに報告されていない。次に、ガングリオ系列の糖脂質においては、MRC5 と UtE 細胞ではガングリオ a および b 系列の糖鎖の発現が見られていたが、iPS 細胞では GM3 のみが発現しており、その発現量も少なかった。体細胞から多分化能を有する幹細胞に誘導される際に、ガングリオ系列の糖鎖の生合成が抑制されることが初めて見いだされた。

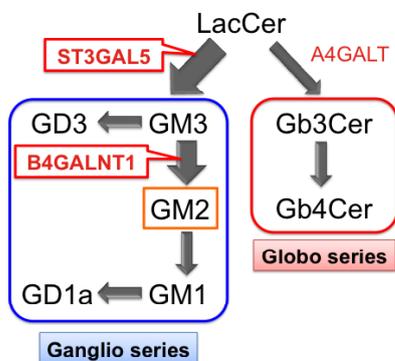
図 2 には表 2 で見られた糖脂質の生合成経路とそれに関わる糖鎖合成遺伝子の概要を示した。そこで、各細胞に発現する糖脂質の生合成に関与する糖鎖合成遺伝子を特定するために、表 2 に示した糖鎖合成遺伝子の発現をリアルタイム PCR により測定し、単位 RNA 当たりのコピー数を算出して定量的な解析を実施した。体細胞の場合には GM3 合成遺伝子である ST3GAL5 の高い発現が見られており、Gb3 合成遺伝子である A4GALT の発現量は ST3GAL5 と同等か低いことが示された。Lc3Cer 合成酵素である B3GNT5 の発現も低いながら検出された。一方、iPS 細胞では、ST3GAL5 の発現が顕著に低下していた。これに対して、A4GALT と B3GNT5 の高い発現が見られた。iPS 細胞では GM2 合成酵素である B4GALNT1 の発現が低下しており、ガングリオ a 系列の生合成が抑制されていることと良い相関性を示した。また、SSEA3 合成酵素である B3GALT5 および FUT1/FUT2 の発現の上昇も見られたことから、SSEA3、globoH、H 抗原の発現と良い対応を示していた。

以上の結果を総合すると、体細胞では、GM3 および GM2 合成遺伝子の発現が他の糖鎖合成遺伝子に比較して高い発現を示すことから、ガングリオ系列の糖鎖の発現が有意に高いと考えられた。一方、iPS 細胞では GM3 合成遺伝子の発現が抑制されているにもかかわらず、他の糖鎖合成遺伝子の発現が低下しないことから、グロボ系列や H 型抗原等の糖脂質の生合成が主に行われていることが明らかとなった。

表1 糖鎖パネル：各細胞に発現する糖脂質の発現パターンを示した。+：全てのロットで発現、△：一部のロットで僅かな発現、N.D：全てのロットで発現がない。

	MRC5	UtE	MRC5 iPS A	UtE iPS A	UtE iPS B
GlcCer	+	△	+	+	+
LacCer	+	+	+	+	+
Gb3Cer	+	△	+	+	+
Gb4Cer	+	N.D.	+	+	+
SSEA3	N.D.	N.D.	+	+	+
Globo H	N.D.	N.D.	+	+	+
SSEA4	N.D.	N.D.	N.D.	△	N.D.
NeuAc+SSEA4	N.D.	N.D.	△	△	△
Lc3Cer	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Lc4Cer	N.D.	N.D.	△	△	△
H antigen	N.D.	N.D.	+	+	+
GM3	+	+	+	+	+
GM2	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
GM1	+	+	N.D.	N.D.	N.D.
GD3	+	+	△	△	N.D.
Ac-GD3	N.D.	N.D.	△	N.D.	N.D.
GD2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
GD1a	+	+	△	△	N.D.
GD1b	N.D.	N.D.	△	△	N.D.

a) 体細胞



b) iPS 細胞

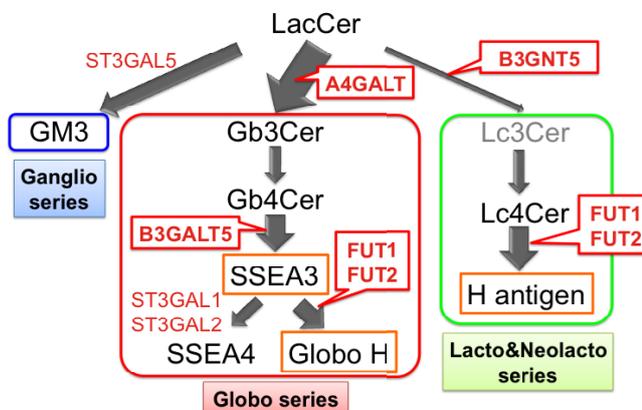


図2 本研究で使用したヒト体細胞 (MRC5 および UtE 細胞) およびヒト iPS 細胞における糖鎖生成経路とそれに関与する糖鎖合成酵素の概要

## 6. 自己評価

本研究では特に ES/iPS 細胞の未分化状態に関与する糖鎖の解析を行うことを目的にした。当初は、フィーダー細胞共存下で ES 細胞を培養して解析を行っていたが、フィーダー細胞と ES 細胞での発現糖鎖が類似している可能性が示されたので、ES 細胞に特徴的な糖鎖の解析が十分にできなかった。そこで、ヒト iPS 細胞の解析では、フィーダーフリーでの培養可能な細胞株の取得を行うことにした。未分化能を維持した細胞株を取得することは難しい実験であり、失敗した細胞もあったが、結果的に3種類の iPS 細胞株を取得できた。その細胞を用いて、糖脂質の生合成経路を解析し、さらに糖鎖合成に関与する遺伝子の発現をリアルタイム PCR により定量的に解析することを研究期間内に達成することができた。得られた結果は明快であり、体細胞から多能性細胞へと誘導されることで生じた糖鎖生合成経路の変化を発現糖鎖と遺伝子レベルで明らかにすることができた。このような検討を糖タンパク質型の糖鎖に展開することも目指したが、今後の課題として残された。

## 7. PO の見解

初期胚の研究において発生や分化過程におけるマーカー分子として細胞表面の糖鎖分子が利用されるが、本研究では、これまで胚性幹細胞 (ES) および人工多能性幹細胞 (iPS) では未分化の指標として知られている糖鎖抗原、SSEA 抗原以外の糖鎖マーカーを探索することで、再生医療の分野で必要な未分化状態の品質の明確にしようとするものである。サル ES 細胞、ヒト iPS 細胞に発現する糖脂質を糖鎖プライマー法による LC-MS/MS 解析で明らかにした。また、関連糖鎖合成遺伝子の発現検索を行い、iPS 細胞では特定のスフィンゴ糖脂質の整合性が変化することを見いだした。

今回見いだされた糖脂質合成変化が ES/iPS の生存、分化、増殖などに対して本質的な役割を果たしていることが確認されれば、糖脂質科学、発生学、再生医学など多方面への貢献が期待され、融合領域が形成される可能性がある。

## 8. 研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

なし

### (2) 特許出願

なし

### (3) 口頭発表

#### ① 学会

国内 3件, 海外 1件

1) 第32回日本分子生物学会、2009年12月9～12日

“Comparative analysis of glycosinngolipids expressed in various human pluripotent stem cells”

T. Ojima, M. Toyoda, H. Nakajima, M. Ymazasaki-Inoue, N. Kiyotaka, J. Fujimoto, T. Sato, A. Umezawa

2) 2010 環太平洋国際化学会議 (Pacifichem2010)、2010年12月15～20日

“Glycan analysis of human pluripotent stem cells in undifferentiation status”

T. Ojima, M. Toyoda, H. Nakajima, A. Umezawa, J. Fujimoto, T. Sato

- 3) 第10回日本再生医療学会総会、2011年3月1～2日  
「ヒト人工多能性幹(iPS)細胞における糖脂質の比較解析」  
尾島 琢磨、豊田 雅士、中島 英規、井上 麻由、清河 信敬、藤本 純一郎、佐藤 智典、梅澤 明弘
- 4) 日本化学会第91春季年会、2011年3月26～29日  
「ヒト人工多能性幹(iPS)細胞における糖脂質の比較解析」  
尾島 琢磨、豊田 雅士、中島 英規、井上 麻由、清河 信敬、藤本 純一郎、梅澤 明弘、佐藤 智典

②その他

国内 0件, 海外 0件

**(4)その他の成果(受賞、著書、招待講演、特記事項等)**

2010年2月 バイオビジネスコンペ JAPAN バイオ先端知賞