

幹細胞グライコミクス：構造，機能，応用

舘野 浩章

1. はじめに

我々の体を構成するすべての細胞表面は糖鎖で覆われている。糖鎖は糖タンパク質，糖脂質，プロテオグリカンなどの複合糖質として細胞表面に存在し，細胞-細胞間相互作用を媒介することによりさまざまな生命機能に関与している。ヒトに存在する糖鎖は主に9種類の単糖（基幹9糖）で構成されている。すなわち，グルコース（D-Glc），マンノース（D-Man），ガラクトース（D-Gal）を基本とし，*N*-アセチルグルコサミン（D-GlcNAc），グルクロン酸（GlcA），フコース（L-Fuc），キシロース（D-Xyl），*N*-アセチルノイラミン酸（Neu5Ac），*N*-アセチルガラクトサミン（D-GalNAc）である。これらの単糖が硫酸化，リン酸化，アセチル化などの修飾を受け，さらにグリコシド結合により分岐構造を形成することにより，多様な糖鎖構造が作られる。糖鎖は多数の酵素で合成される遺伝子の二次産物であり，酵素の発現量，活性，局在に大きな影響を受ける。すなわち，細胞の種類，状態，細胞内外の環境変化に応じて，その構造は劇的に変化する。そのため，糖鎖は細胞のがん化や分化度を調べるための指標（マーカー）として古くから使われてきた。たとえば，ヒトiPS/ES細胞を識別する際に一般的に用いられている細胞表面マーカーであるSSEA-3/4やTra-1-60/81に対する抗体のエピトープは糖鎖であることが知られている。また，がんの診断に用いられる血清マーカーであるCA19-9やがん胎児抗原（CEA）は，がん細胞が作る特徴的な糖鎖構造を提示する糖タンパク質であることが知られている。それゆえ，糖鎖は「細胞の顔」と呼ばれる。

2. ヒトiPS細胞グライコームの構造

2007年京都大学の山中らにより，分化したヒトの皮膚

の線維芽細胞に四つの初期化遺伝子を導入することで，ヒトES細胞に類似の自己複製能と多分化能を持つヒトiPS細胞を作製する方法についての論文が報告された。我々はレクチンアレイと呼ぶ独自の糖鎖解析技術を用いて，各種組織から作製したヒトiPS細胞糖鎖の網羅解析を世界に先駆けて実施した¹⁾。レクチンアレイとは，数十種のレクチン（糖結合タンパク質）をガラス基板上に固定したチップを示す²⁾。そのチップに蛍光標識した糖タンパク質溶液（糖タンパク質を含む細胞抽出液，血清等の希釈液）を反応させて，蛍光スキャナーで結合した蛍光標識糖タンパク質を検出・計測する。そして，レクチンの反応パターンからサンプル中の糖鎖のプロファイルを明らかにする（図1）。この際，糖鎖-レクチンの相互作用は抗原-抗体反応と比べて弱いと想定される。そこで筆者らは，弱い相互作用も洗浄操作なしに検出可能なエバネッセント波励起蛍光型スキャナーを企業と共同で開発した（図1）。ヒトiPS細胞を解析するにあたり，レクチンのリコンビナント化に着手し，ライブラリー化した組換えレクチンを搭載することにより従来のレクチンアレイ（市販品LecChipの場合，45種）と比べ搭載するレクチン数を倍増させることで，プロファイリングの性能向上を図った。スポット径を小さくすることでコストパフォーマンスに優れた高密度レクチンアレイ（38組換えレクチンを含む96レクチン）を開発した（図1）。ヒト胎児肺，羊膜，子宮内膜，胎盤動脈，皮膚に山中4因子（Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc）を導入することで，これら5種の組織から由来と継代数の異なるヒトiPS細胞，計114種を調製し，5種の親細胞（体細胞）やヒトES細胞と比較糖鎖プロファイリングを行った²⁾。1×10⁵~10⁶個程度の細胞から疎水性画分を調製し，Cy3で蛍光標識化した後に，50ngのタンパク質をレクチンアレイに反応させた。得られたデータをクラスター解析した結果，1) 親細胞（体細胞）はそれぞれ別のグループに分類され，2) 114種のヒトiPS細胞はヒトES細胞と同じグループに分類され，由来や継代数による明確な違いは観察されなかった。以上の結果から，未分化なヒトiPS/ES細胞は，分化した体細胞とは明確に異なる「細胞の顔」を持つことがわかった。

では，ヒトiPS/ES細胞はどのような「顔」をしているのか？ 得られたレクチンアレイの結果から，未分化なヒトiPS細胞では， α 2-6シアル酸， α 1-2フコース，1型ラク

国立研究開発法人産業技術総合研究所創薬基盤研究部門
(〒305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-1)

Stem cell glycomics: Structure, function, and application

Hiroaki Tateno (Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, 1-1-1 Umezono, Tsukuba, Ibaraki 305-8568, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880761

© 2016 公益社団法人日本生化学会

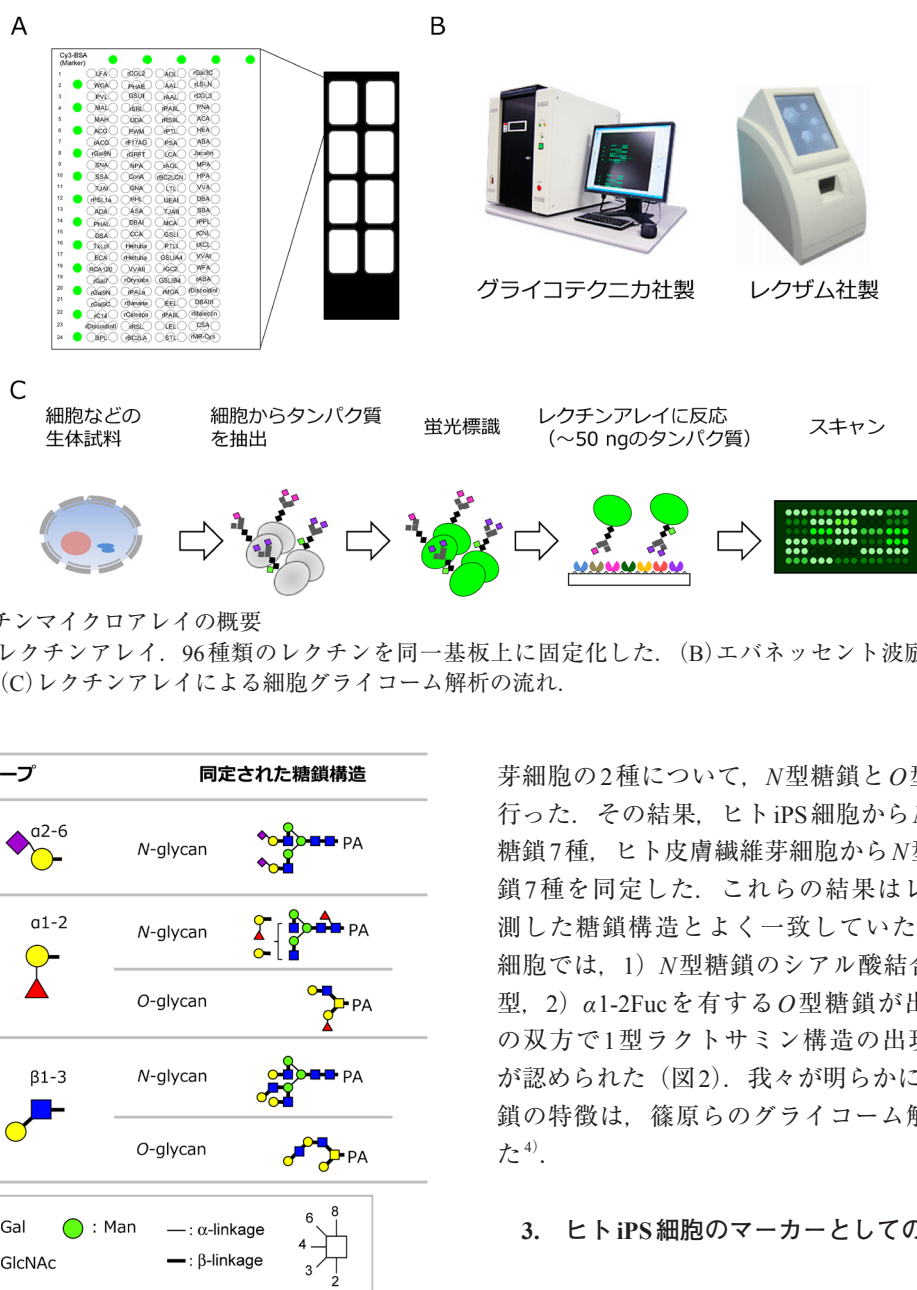


図2 ヒトiPS細胞に発現する特徴的な糖鎖構造

トサミン構造が特徴的な糖鎖構造として存在することが予想された(図2)。糖転移酵素遺伝子の発現においても、これら糖鎖エピトープの合成に関与するST6Gal1, FUT1/2, B3GalT5の発現がヒトiPS細胞で顕著に増加していることがわかった。さらに、これらの予測を実証するため、液体クロマトグラフィーと質量分析計を用いた構造決定を行った³⁾。レクチンアレイを用いた解析では多数のサンプルを短時間で解析することが可能であったが、構造決定では多大な労力と時間、サンプル量が必要となる。そこでヒトiPS細胞の代表である201B7株と、由来するヒト皮膚線維

芽細胞の2種について、N型糖鎖とO型糖鎖の構造決定を行った。その結果、ヒトiPS細胞からN型糖鎖37種とO型糖鎖7種、ヒト皮膚繊維芽細胞からN型糖鎖20種、O型糖鎖7種を同定した。これらの結果はレクチンアレイで予測した糖鎖構造とよく一致していた。すなわちヒトiPS細胞では、1) N型糖鎖のシアル酸結合様式はすべて α 2-6型、2) α 1-2Fucを有するO型糖鎖が出現、3) N型とO型の双方で1型ラクトサミン構造の出現(Gal β 1-3GlcNAc)が認められた(図2)。我々が明らかにしたヒトiPS細胞糖鎖の特徴は、篠原らのグライコーム解析でも裏づけられた⁴⁾。

3. ヒトiPS細胞のマーカーとしての糖鎖

上記したようにヒトiPS/ES細胞マーカーとして一般的に用いられているSSEA3/4抗体やTra-1-60/81抗体のエピトープは糖鎖である。SSEA3/4抗体はいずれもグロボ系糖脂質を認識する(SSEA3: R-Gal β 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-R, SSEA4: NeuAca2-3Gal β 1-3GalNAc β 1-R)。一方、Tra-1-60/81抗体はポドカリキシン上のケラタン硫酸を認識すると報告されたが⁵⁾、その後糖鎖アレイでの解析の結果、1型ラクトサミンの2回繰り返し構造(Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc)を最小単位として認識すると報告された⁶⁾。これらの結果を総合すると、Tra-1-60/81はポドカリキシン上のケラタン硫酸の非還元末端に位置する1型ラクトサミン構造を認識しているのではないかと考えられる。

一方、新たなマーカーの開発も進んでいる。レクチンアレイによる解析の結果、解析に用いた親細胞（体細胞）やマウスフィーダー細胞にはまったく反応しないものの、ヒトiPS/ES細胞のすべてと反応するレクチンを1種同定した。このレクチンは、高密度レクチンアレイで新たに搭載したグラム陰性菌*Burkholderia cenocepacia*由来のレクチンBC2L-CのN末端ドメインのリコンビナント体（rBC2LCN）である¹⁾。rBC2LCNの糖結合特異性を解析したところ、Fuc α 1-2Gal β 1-3モチーフを認識することがわかった⁷⁾。ヒトiPS細胞から同定したN型およびO型糖鎖のうち、このモチーフは1種類のO型糖鎖[Gal β 1-4GlcNAc β 1-6（Fuc α 1-2Gal β 1-3）GalNAc]にのみ見いだされた⁷⁾。rBC2LCNはヒトiPS/ES細胞に特異的に反応することから、糖鎖エピトープであるFuc α 1-2Gal β 1-3モチーフはヒトiPS/ES細胞のマーカーであるといえる。我々の結果と一致するように、その後Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc（Hタイプ1）を認識する抗体がヒトiPS/ES細胞に特異的に反応することが明らかにされ、SSEA5として命名された⁸⁾。

rBC2LCNが認識するHタイプ3と呼ばれる糖鎖エピトープは、ポドカリキシンと呼ばれる1型膜タンパク質上にあることがわかった⁷⁾。ポドカリキシンは5個のN型糖鎖付加部位、3個のグリコサミノグリカン付加部位、多数のO型糖鎖付加部位を持ち、計算分子量 55×10^3 であるにも関わらず、ヒトiPS/ES細胞での見かけの分子量は 240×10^3 を以上示す高度に糖鎖修飾された糖タンパク質である。rBC2LCNはポドカリキシンのO型糖鎖上に提示されるHタイプ3エピトープを認識していると考えられている。フロンタルアフィニティクロマト法と呼ばれる技術でrBC2LCNのHタイプ3含有O型糖鎖（Fuc α 1-2Gal β 1-3（Gal β 1-3GlcNAc β 1-6）GalNAc-PA）への結合を調べたところ、その結合親和性（ K_a ）は $2.5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ と低かった⁷⁾。しかしこのO型糖鎖はヒトiPS細胞で高い発現を示すポドカリキシン上に多数提示され、ヒトiPS細胞表面に高い密度で存在していると想定された。実際、rBC2LCNのヒトiPS細胞への結合親和性をフローサイトメーターで測定したところ、 $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と強く結合することがわかった⁹⁾。この2万倍にも及ぶ結合力の増強は、「クラスター効果」と呼ばれる糖鎖密度に依存した結合力の増強が理由であると推定される。糖鎖密度に応じた親和性の劇的な増強は、レクチンが持つ大きな特徴の一つである。ポドカリキシンは腎臓の足細胞にも発現しているが、重要な点は、ヒトiPS/ES細胞に発現するポドカリキシンと腎臓に発現するポドカリキシンでは、提示される糖鎖構造が違うという点である。すなわち、rBC2LCNが認識するHタイプ3はヒトiPS/ES細胞のポドカリキシンには付加されているが、腎臓のポドカリキシンには修飾されていない。区別するた

めに、ヒトiPS/ES細胞に発現するポドカリキシンをHタイプ3陽性ポドカリキシンと呼ぶ。最近、川畠らのグループはヒトiPS細胞に特異的に結合する抗体を複数種開発することに成功しており^{10, 11)}、そのうちの1種であるR-10G抗体はポドカリキシン上に提示された低硫酸化ケラタン硫酸であると報告した¹⁰⁾。もう1種のR-17F抗体は、Fuc α 1-2Gal β 1-3モチーフを持つ糖脂質の一種であるLNFP I（Fuc α 1-2Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc）に反応することが明らかにされた¹¹⁾。Fuc α 1-2Gal β 1-3モチーフがヒトiPS/ES細胞のマーカーであることを強く裏づける結果である。

4. ヒトiPS細胞糖鎖の機能

ヒトiPS細胞に発現する糖鎖構造についてはすでに述べたとおりであるが、はたしてどのような機能を持つのであろうか？。ヒトiPS細胞のN型糖鎖に付加するシアル酸の結合様式がすべて α 2-6シアル酸であることはすでに述べた。さらに最近筆者らはヒト体性幹細胞の糖鎖に関する研究を行い、分化ポテンシャルの高い体性幹細胞では α 2-6シアル酸の割合が高いことを見いだした^{12, 13)}。すなわち α 2-6シアル酸は細胞の分化ポテンシャルと密接な関係があることを示している。Wangらは α 2-6シアル酸転移酵素であるST6Gal1に注目、本酵素遺伝子の発現を抑制すると、Oct4などの未分化マーカー遺伝子の発現が低下すると報告した¹⁴⁾。またシアル酸合成阻害剤を添加することで、細胞のリプログラミングを阻害することがわかった。 α 2-6シアル酸の発現はがん幹細胞の機能にも重要であることが報告されていることから、 α 2-6シアル酸は細胞の未分化性と密接に関係していると考えられる。Fuc α 1-2Gal β 1-3モチーフの機能についての報告はないが、血液型抗原の一種のH抗原であることから、血液型の産生に関係があるのかもしれない。さらなる研究が期待される。

5. ヒトiPS細胞糖鎖の応用

筆者らはヒトiPS細胞に反応するレクチンrBC2LCNを利用することで、ヒトiPS細胞を用いた再生医療の最大の課題である造腫瘍性を克服する技術を開発した。再生医療ではヒトiPS細胞から心筋細胞や肝細胞等の分化した細胞を作製し、移植治療に用いる。しかし、作製した移植用細胞に未分化な細胞がわずかに残存し、腫瘍を形成する可能性がある。そのため、移植用細胞に残存する未分化細胞を検出し、除去する技術が切望されている。こうした中、rBC2LCNは、ヒトiPS/ES細胞に結合した後に細胞内に取り込まれることがわかり、rBC2LCNを未分化細胞に薬剤を送り込むためのドラッグキャリアに使うことにした¹⁵⁾。

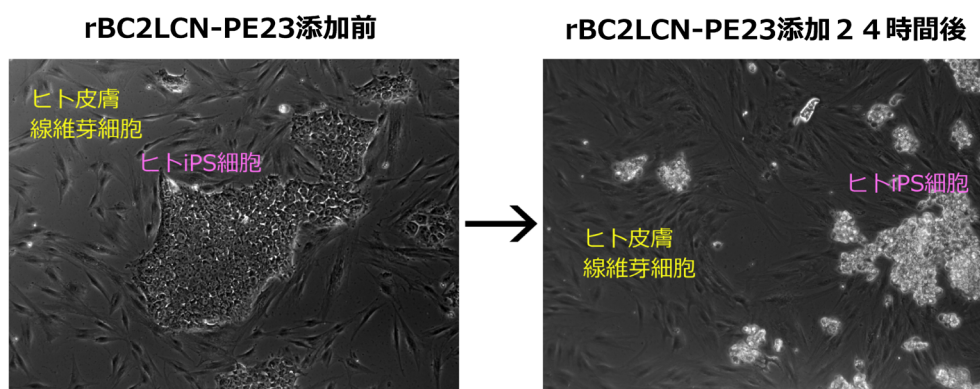


図3 rBC2LCN-PE23によるヒトiPS細胞の殺傷効果

そこで、細胞内に取り込まれるとタンパク質合成を阻害して、細胞死を引き起こす緑膿菌由来外毒素の触媒ドメインの23kDa部分(*Pseudomonas aeruginosa* 23kDa: PE23)をrBC2LCNのC末端部分に融合させた組換えタンパク質(rBC2LCN-PE23)を作製した。rBC2LCN-PE23を培養液に添加すると、24時間後にはヒトiPS細胞のみが死滅して培養皿への接着能力を失い、培養液中に浮遊した(図3)。一方、ヒト皮膚線維芽細胞の生存には影響がなかった。rBC2LCN-PE23はヒトES細胞に対しても同様の効果を示した。そのため、rBC2LCN-PE23は移植用細胞に残存するヒトiPS/ES細胞を殺傷除去するための試薬として利用できる。一方、川壽らはR-17F抗体を用いて未分化細胞を除去できることを報告している¹¹⁾。

さらに筆者らは、rBC2LCNを用いて非破壊で未分化細胞を検出する技術を開発した¹⁶⁾。rBC2LCNはヒトiPS/ES細胞上のポドカリキシン(Hタイプ3陽性ポドカリキシン)に結合することはすでに述べたとおりである。このHタイプ3陽性ポドカリキシンが培養液中に分泌されることを見いだした。そこで、rBC2LCNを用いて培養液中のHタイプ3陽性ポドカリキシンを定量測定するためのサンドイッチアッセイ系を構築した。Hタイプ3陽性ポドカリキシンを測定することで、移植用細胞中に残存する未分化細胞を検出することができる。他の未分化細胞検出技術として、定量PCR法、フローサイトメトリー法、デジタルPCR法、高効率培養法などがあるが、いずれも移植に用いる細胞の一部を回収し、測定に用いる必要がある。筆者らが開発した技術は貴重な移植用細胞を破壊することがないため、培養している細胞中に存在する未分化細胞数をモニタリングすることができる。再生医療に用いる移植用細胞の造腫瘍性試験への応用が期待されている。

6. まとめ

このようにヒトiPS細胞の糖鎖の構造が明らかにされ、

ヒトiPS細胞糖鎖を認識するレクチンや抗体の再生医療への応用が進んでいる。その一方で、ヒトiPS細胞糖鎖の機能は十分には理解されていない。未分化性における糖鎖の存在意義は何か？ヒトiPS細胞糖鎖の構造を改変することで、分化指向性を制御できるのか？さらなるブレイクスルーが期待される。

文 献

- 1) Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., Akutsu, H., Umezawa, A., Horimoto, K., Hirabayashi, J., & Asashima, M. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345–20353.
- 2) Hirabayashi, J., Yamada, M., Kuno, A., & Tateno, H. (2013) *Chem. Soc. Rev.*, **42**, 4443–4458.
- 3) Hasehira, K., Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Asashima, M., & Hirabayashi, J. (2012) *Mol. Cell. Proteomics*, **11**, 1913–1923.
- 4) Fujitani, N., Furukawa, J., Araki, K., Fujioka, T., Takegawa, Y., Piao, J., Nishioka, T., Tamura, T., Nikaido, T., Ito, M., Nakamura, Y., & Shinohara, Y. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2105–2110.
- 5) Schopperle, W.M. & DeWolf, W.C. (2007) *Stem Cells*, **25**, 723–730.
- 6) Natunen, S., Satomaa, T., Pitkanen, V., Salo, H., Mikkola, M., Natunen, J., Otonkoski, T., & Valmu, L. (2011) *Glycobiology*, **21**, 1125–1130.
- 7) Tateno, H., Matsushima, A., Hiemori, K., Onuma, Y., Ito, Y., Hasehira, K., Nishimura, K., Ohtaka, M., Takayasu, S., Nakanishi, M., Ikehara, Y., Ohnuma, K., Chan, T., Toyoda, M., Akutsu, H., Umezawa, A., Asashima, M., & Hirabayashi, J. (2013) *Stem Cells Transl. Med.*, **2**, 265–273.
- 8) Tang, C., Lee, A.S., Volkmer, J.P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A.R., Inlay, M.A., Ardehali, R., Chavez, S.L., Pera, R.R., Behr, B., Wu, J.C., Weissman, I.L., & Drukker, M. (2011) *Nat. Biotechnol.*, **29**, 829–834.
- 9) Onuma, Y., Tateno, H., Hirabayashi, J., Ito, Y., & Asashima, M. (2013) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **431**, 524–529.
- 10) Kawabe, K., Tateyama, D., Toyoda, H., Kawasaki, N., Hashii, N., Nakao, H., Matsumoto, S., Nonaka, M., Matsumura, H., Hirose, Y., Morita, A., Katayama, M., Sakuma, M., Kawasaki, N., Furue, M.K., & Kawasaki, T. (2013) *Glycobiology*, **23**, 322–336.

- 11) Matsumoto, S., Nakao, H., Kawabe, K., Nonaka, M., Toyoda, H., Takishima, Y., Kawabata, K., Yamaguchi, T., Furue, M.K., Taki, T., Okumura, T., Yamazaki, Y., Nakaya, S., Kawasaki, N., & Kawasaki, T. (2015) *J. Biol. Chem.*, **290**, 20071–20085.
- 12) Tateno, H., Saito, S., Hiemori, K., Kiyoi, K., Hasehira, K., Toyoda, M., Onuma, Y., Ito, Y., Akutsu, H., & Hirabayashi, J. (2016) *Glycobiology*.
- 13) Hasehira, K., Hirabayashi, J., & Tateno, H. (2016) *Glycoconj. J.*
- 14) Wang, Y.C., Stein, J.W., Lynch, C.L., Tran, H.T., Lee, C.Y., Coleman, R., Hatch, A., Antontsev, V.G., Chy, H.S., O'Brien, C.M., Murthy, S.K., Laslett, A.L., Peterson, S.E., & Loring, J.F. (2015) *Sci. Rep.*, **5**, 13317.
- 15) Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Minoshima, F., Saito, S., Shimizu, M., Aiki, Y., Asashima, M., & Hirabayashi, J. (2015) *Stem Cell Rep.*, **4**, 811–820.
- 16) Tateno, H., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Aiki, Y., Shimizu, M., Higuchi, K., Fukuda, M., Warashina, M., Honda, S., Asashima, M., & Hirabayashi, J. (2014) *Sci. Rep.*, **4**, 4069.

著者寸描

● 館野 浩章 (たての ひろあき)



国立研究開発法人産業技術総合研究所創薬基盤研究部門主任研究員。博士（農学）。

■略歴 1975年栃木県に生る。97年東北大学農学部卒業，2002年同大学院農学研究科修了。同年ミシガン大学博士研究員，04年スクリプス研究所（05年より海外特別研究員），06年より産業技術総合研究所。12年より現職。

■研究テーマと抱負 研究テーマはレクチンの構造，機能，応用。現在は，糖鎖プロファイリング技術の開発とレクチンの医療応用を主なテーマとして研究を進めています。糖鎖・レクチンの普及化を理念としています。支援できることがありましたらお気軽にお声がけください。

■ウェブサイト <https://unit.aist.go.jp/brd/jp/groups/cgtrg/cgtrg.html>

■趣味 テニス，ジョギング，読書。