

# 幹細胞を制御する糖鎖

西原 祥子<sup>1,2</sup>

細胞表面に提示される糖鎖は、発生段階および組織特異的に発現が制御され、胚性幹細胞のマーカーとしても使われている。しかし、幹細胞における糖鎖の役割については、不明な点が多かった。一方、さまざまな糖鎖がシグナルの制御に関わっていることがわかっている。ヘパラン硫酸などの硫酸化糖鎖は、FGF, Wnt, BMP, Hhなどの共受容体として機能し、NotchのO-Fuc修飾はNotchシグナルに必須である。O-GlcNAc修飾は細胞内に起こるさまざまな分子のリン酸化と競合している。これらのシグナルは、多能性幹細胞や組織幹細胞、さらには、がん幹細胞の維持や分化を決めており、糖鎖もまた、これらの幹細胞の維持や分化に関与すると考えられた。本稿では、多能性幹細胞、組織幹細胞、がん幹細胞における糖鎖の機能を、筆者らの研究も含めて概説する。

## 1. はじめに

多能性幹細胞は、内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉へ分化する多能性を持ち、自己複製能を有する未分化な細胞である。胚性幹細胞 (ES細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞)、マウスエピブラスト幹細胞 (エピ幹細胞) などが、これに属する。ES細胞は、1981年にマウスで<sup>1,2)</sup>、1998年にヒトで<sup>3)</sup> 樹立された。その後、数種類の遺伝子を線維芽細胞などの体細胞に強制発現させることにより、iPS細胞が樹立された<sup>4)</sup>。現在、多能性幹細胞を用いた創薬や再生医療を目指した研究が盛んに行われている。多能性幹細胞の維持や分化は、内因性の転写因子に加え、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、骨形成タンパク質 (BMP)、Wntなどの細胞外因子からのシグナル伝達が決定的である<sup>5)</sup>。

組織幹細胞は、成体で組織維持に働き、造血幹細胞、神経幹細胞、腸幹細胞、生殖幹細胞などがある。自己複製する一方で、分化した細胞種を生み出す。このためには、幹細胞が幹細胞ニッチと接していること、非対称分裂、そし

て、幹細胞ニッチから幹細胞へのシグナル伝達が必要である<sup>6)</sup>。多能性幹細胞と同様なBMPやWntシグナル、Hedgehog (Hh) やNotchシグナルなどが細胞運命を決定する。

がん幹細胞は、腫瘍組織中に存在する幹細胞の性質を持つ細胞である<sup>7)</sup>。自己複製能を示し、少数から元の腫瘍組織と同じ腫瘍を形成することができるcancer initiation cellである。その幹細胞性の維持には、多能性幹細胞や組織幹細胞と類似したシグナルや幹細胞ニッチが働くと考えられている。

一方、分泌されるタンパク質や細胞膜上のタンパク質は、多くが糖鎖修飾を受けた糖タンパク質である。細胞表面に提示される糖鎖は、生物の発生過程や疾病への過程で、顕著に変化する。約200種の糖転移酵素が、各過程で特異的にその発現を変え、小胞体やゴルジ体でさまざまな糖をタンパク質や脂質に付加し、糖タンパク質や糖脂質の多様な糖鎖を合成する。細胞表面のstage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4) などの糖鎖は、ES細胞やiPS細胞のマーカーとして汎用され<sup>8,9)</sup>、また、シアリル Lewis aなどの糖鎖は腫瘍マーカーとして臨床に用いられている。他方、細胞質や核に唯一存在するO-GlcNAc転移酵素 (OGT) は、細胞質や核のタンパク質のセリン (Ser)、トレオニン残基 (Thr) に、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を1分子付加する。

糖鎖は、このように、細胞や組織の状態を敏感に反映するため、細胞のマーカーとして広く用いられている。しかし、それにとどまらず、細胞外因子からのシグナル伝達も制御している。たとえば、ヘパラン硫酸などの硫酸化された糖鎖は、FGF, BMP, Wnt, Hhに結合し、さまざまな細胞でこれらの因子を安定化したり、共受容体として働いた

<sup>1</sup> 創価大学工学研究科生命情報工学専攻 (〒192-8577 東京都八王子市丹木町1-236)

<sup>2</sup> 創価大学理工学部糖鎖生命システム融合センター (〒192-8577 東京都八王子市丹木町1-236)

**Glycans which regulate the stem cell state**

**Shoko Nishihara<sup>1,2</sup>** (<sup>1</sup>Department of Bioinformatics, Graduate School of Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan, <sup>2</sup>Glycan & Life System Integration Center (GaL-SIC), Faculty of Science and Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-machi, Hachioji, Tokyo 192-8577, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920094

© 2020 公益社団法人日本生化学会

りしている<sup>10-13)</sup>。幹細胞においても、維持や細胞運命の決定に重要なこれらのシグナルに対し、同様な機能を持つと考えられた。また、OGTは、シグナル構成因子のリン酸化部位やその近傍のSerやThrをO-GlcNAc化し、競合してリン酸化を抑制する。ここでも、また、幹細胞を制御するシグナルへの関与が予測された。我々は、マウスES細胞で、糖鎖合成に関わる遺伝子の発現を網羅的にノックダウンし、幹細胞維持や分化に関わる糖鎖のスクリーニングを行った<sup>8, 9, 11, 13-18)</sup>。現在、多能性幹細胞、組織幹細胞、および、がん幹細胞における糖鎖の役割が明らかにされつつある。本稿では、それらを紹介し、幹細胞における糖鎖の働きを我々の結果を含めて概観する。

2. 哺乳類多能性幹細胞における糖鎖の機能

1) 哺乳類多能性幹細胞の異なる状態：ナイーブ状態とプラ임状態

哺乳類の多能性幹細胞は、異なる発生段階に対応する状態にあり、それらを「ナイーブ状態」と「プラ임状態」と呼ぶ(表1)<sup>5, 9)</sup>。ナイーブ状態のマウスES細胞は、受精

後3.5日目の着床前の胚盤胞の内部細胞塊(ICM)から樹立され、ICMに対応し、単一細胞で培養可能で増殖能が高い。白血病抑制因子(LIF)を培地に添加して、未分化性を維持する。その一方、マウスエビ幹細胞は、受精後5.5日目の着床後の卵円筒胚のエピブラストから樹立されたプラ임状態の多能性幹細胞である<sup>19, 20)</sup>。マウスエビ幹細胞の未分化性維持には、LIFではなく、FGF2とNodal/activinが必須である。マウスエビ幹細胞の網羅的な遺伝子発現やエピジェネティックな制御の状態は、マウスES/iPS細胞とはまったく異なっていたが、ヒトES/iPS細胞と酷似していた。このため、ヒトES/iPS細胞も、「プラ임状態」にあるとされた。その後の解析から、両状態では、エネルギー代謝の状態やミトコンドリアの活性化も異なることがわかってきた<sup>21)</sup>。プラ임状態の多能性細胞は、増殖が遅く、単一細胞では生存性が低く、遺伝子導入効率も低い。機能解析や再生医療への応用に向けて、ヒトES/iPS細胞のナイーブ化が望まれている。

ナイーブ状態のマウスES細胞を、LIFの代わりにFGF2とActivin A<sup>22)</sup>、あるいは、FGF2とヤヌスキナーゼ(JAK)阻害剤(LIFシグナル阻害剤)<sup>17)</sup>を添加して培養し続ける

表1 哺乳類多能性幹細胞のナイーブ状態とプラ임状態

項目	状態	
	ナイーブ状態	プラ임状態
対応する発生段階	着床前の胚盤胞	着床後の胚盤胞
樹立されている多能性幹細胞	ES/iPS細胞(マウス)	エピブラスト幹細胞(マウス), ES/iPS細胞(ヒト)
要求される増殖因子	LIF	FGF2, Nodal/activin
2i <sup>*1</sup> への反応	自己再生能	分化
LIF/Stat3への反応	自己再生能	—
Fgf/Erkへの反応	分化	自己再生能
発現している遺伝子	Oct3/4, Sox2, Nanog, Rex1, Klf2, Klf4, Tbx3, Tfcp2l1, Gbx2, Esrrb	Oct3/4, Sox2, Nanog, Fgf5, Otx2, Oct6, Sox3, Foxa2, Cer1, branchyury, Sox1
Oct4のエンハンサー <sup>*2</sup>	遠位	近位
表面の糖鎖マーカー	SSEA-1 <sup>*3</sup> , ST6GAL1 <sup>*4</sup> , Gb3 <sup>*4</sup>	SSEA-3, 4, 5 <sup>*5</sup> , Tra-1-60 <sup>*5</sup> , Tra-1-81 <sup>*5</sup> , R-10G <sup>*5</sup> , rBC2LCN <sup>*5</sup> , Globo-H
DNAのメチル化	低メチル化	—
X染色体の不活性化	Xa <sup>*6</sup> Xa	XaXi <sup>*7</sup>
代謝	酸化的リン酸化, 解糖系	解糖系
ミトコンドリアの活性	高	低
テラトーマの形成	可	可
分化能	多分化能	多分化能(生殖細胞を除く)
キメラ形成能	高	低
コロニーの形態	丸く盛り上がる	平い
1細胞への解離	可	不可 <sup>*8</sup>
増殖速度	速い	遅い

LIF：白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor), FGF：線維芽細胞増殖因子(fibroblast growth factor), SSEA：stage-specific embryonic antigen. <sup>\*1</sup> 2i：Wntシグナル促進剤(GSK3阻害剤)とFGFシグナル阻害剤(MEK阻害剤). <sup>\*2</sup> 時期組織特異的な発現に関与する、遠位エンハンサーと近位エンハンサー. <sup>\*3</sup> マウスES/iPS細胞に対する糖鎖マーカーであるがナイーブ状態様なヒトiPS細胞でも検出された. <sup>\*4</sup> ナイーブ状態と想定されているヒトES/iPS細胞に対する糖鎖マーカー. <sup>\*5</sup> 従来のヒトES/iPS細胞に対する糖鎖マーカー. <sup>\*6</sup> Xa：活性化しているX染色体. <sup>\*7</sup> Xi：不活性化しているX染色体. <sup>\*8</sup> ROCK阻害剤を添加しないとできない.

と、プライム状態のエピ幹細胞様の細胞に分化する。逆に、プライム状態のマウスエピ幹細胞様の細胞を、FGF2の代わりにFGFシグナル阻害剤 (PD0325901, PD03), Wntシグナル促進剤 (CHIR99021, CHIR) とLIFを添加して培養すると、ナイーブ状態のES細胞に戻すこともできる<sup>17, 23, 24)</sup>。しかし、ヒトES/iPS細胞をナイーブ化するのには、マウスほど容易ではない。さまざまな方法が開発され、比較検討されている<sup>25-27)</sup>。

なお、最近、ナイーブ状態とプライム状態の中間に位置する状態、Formative状態が提唱されている<sup>28)</sup>。

## 2) ナイーブ状態とプライム状態の糖鎖マーカー

細胞表面の糖鎖は、発生過程や組織形成の過程で顕著な変化を示す。このため、ES/iPS細胞表面の糖鎖は、ES/iPS細胞マーカーとして汎用されている (表1)。SSEA-1はGal $\beta$ 1,4 (Fuc $\alpha$ 1,3) GlcNAcで表される糖鎖で、Lewis x抗原とも呼ばれ、ナイーブなマウスES/iPS細胞のマーカーとなっている<sup>29, 30)</sup>。マウスES/iPS細胞の糖タンパク質上にも糖脂質上にも見いだされるが、プライムなヒトES/iPS細胞では発現していない<sup>30)</sup>。一方、SSEA-3 (3GalNAc $\beta$ 1,3Gal $\alpha$ 1,4Gal), SSEA-4 (NeuAc $\alpha$ 2,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc), TRA-1-60抗原, TRA-1-81抗原は、プライムなヒトES/iPS細胞のマーカーとなっている<sup>31)</sup>。SSEA-3とSSEA-4は、グロボ系列の糖脂質上にあり<sup>32)</sup>、RA-1-60抗原とTRA-1-81抗原では、type1ラクトサミン構造を含む糖鎖 (Gal $\beta$ 1,3GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,4GlcNAc) がムチン型の糖タンパク質上にある<sup>33)</sup>。さらには、質量分析などを用いた網羅的な構造解析により、SSEA-5<sup>34, 35)</sup> やGlobo-H<sup>35, 36)</sup>、R-10G<sup>37)</sup>、rBC2LCNに結合する糖鎖<sup>38)</sup> などのさまざまな糖鎖構造が、プライムなヒトES/iPS細胞のマーカーとなることがわかり、各々を合成する糖転移酵素も発現していた。これらの多くは、糖脂質やムチン型の糖タンパク質上にあるHType1構造 (Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,3GlcNAc)、あるいは、Htype3構造 (Fuc $\alpha$ 1,2Gal $\beta$ 1,3GalNAc) を含むものである。R-10Gはこれらとは異なり、高硫酸化されていないケラタン硫酸であった<sup>37)</sup>。

さらには、既存の表面マーカーを用いた網羅的検索から、2種の異なる方法で作製したナイーブ状態とされるヒトES細胞で、CD75とCD77が特異的に発現することがわかった<sup>39)</sup> (表1)。CD75は $\alpha$ 2,6シアル酸転移酵素1 (ST6GAL1)、CD77はグロボトリアオシルセラミド (Gb3) であるが、通常ゴルジ体中存在するST6GAL1が、なぜ細胞表面にあるかは不明である。また、最近、ヒトの乳歯の歯髄細胞から作製したiPS細胞を、マウス胎仔由来の線維芽細胞をフィーダー細胞として2iの条件下 (PD03とCHIRを添加: 表1脚注) で培養すると、ナイーブ状態様の細胞になりSSEA-1を発現することが報告された<sup>40)</sup>。

なお、マウスES細胞とヒトES細胞でグライコプロテオーム解析も行われ、糖鎖修飾を受けるアミノ酸の位置と糖鎖構造を含めた情報が蓄積しつつある<sup>41)</sup>。

## 3) ナイーブ状態の多能性幹細胞における糖鎖の機能: ラックダイナック, ヘパラン硫酸, O-GlcNAcはナイーブ状態の維持に必要である

このように、糖鎖はES/iPS細胞マーカーとして汎用されていたが、これらの表面マーカーの機能についての報告はほとんどなく、不明な点が多かった。そこで、我々は、ナイーブなマウスES細胞で、糖鎖合成に関わる糖転移酵素などの遺伝子の発現を網羅的にノックダウンし、アルカリホスファターゼ染色陽性を自己複製能の指標にしてスクリーニングを行った。その結果、ラックダイナック (LacdiNAc) 糖鎖構造 (GalNAc $\beta$ 1,4GlcNAc)、ヘパラン硫酸、O-GlcNAcがナイーブ状態の維持に必要であることがわかった<sup>8, 9, 11, 13-18)</sup>。これらの糖鎖は、ナイーブ状態の維持に働くLIF, BMP, Wntシグナルや分化の出口となるFGF4シグナルに関与し、ナイーブ状態の維持に必要であった (図1)。

LIF/シグナル伝達性転写因子 (Stat) 3シグナルは、その下流でナイーブ状態の未分化性、すなわち、多能性と自己複製能の維持に関わる遺伝子の転写を促進している (図1)。LacdiNAcはショウジョウバエからヒトまで保存された糖鎖構造であり<sup>42)</sup>、LIF受容体 (LIFR) とglycoprotein130 (gp130) は、ナイーブ状態ではこの糖鎖修飾を受けている。LacdiNAcは、LIF/Stat3シグナルを介してナイーブ状態を規定し、ナイーブ状態の維持に必要であった<sup>14)</sup> (図1, 図2a)。LacdiNAcの発現は、ナイーブ状態のマウスES細胞で高く、分化に伴って低下し、プライム状態のマウスエピ幹細胞様の細胞とヒトiPS細胞では、LIFRとgp130はほとんどLacdiNAcの修飾を受けない。一方、ラフト/カベオラは、スフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ細胞膜上の微小領域のうち、カベオリンを含むものである。種々のシグナル受容体がそこに集積し、シグナル伝達場となっている。LIF/Stat3シグナルの効率的な伝達には、LIFRとgp130がラフトに局在することが必要である (図2a)。LacdiNAcの発現が高いナイーブ状態のマウスES細胞では、LIFRとgp130上のLacdiNAcを介して両者はカベオリン-1複合体などのラフト構成因子と結合し、ラフト/カベオラに局在する。このため、LIFシグナル伝達に必要なLIFRとgp130の複合体形成が促進され、効率的にシグナルが伝達されていた。LacdiNAcの発現が低いプライム状態の細胞では、LIFRとgp130はLacdiNAc修飾をほとんど受けず、ラフト/カベオラに局在しない。このため、LIFRとgp130の複合体形成が効率的になされず、強いシグナルが伝達されなかった。なお、カベオリン-1複合体に含まれるLacdiNAcに結合するタンパク質については、解析中である。

LIF/Stat3シグナル以外にも、BMP4/mothers against dpp homolog (Smad) やWnt/ $\beta$ -cateninシグナルがナイーブ状態のマウスES細胞の維持に必要である<sup>5, 8, 9)</sup> (図1)。Wntシグナルは、そのみでは不十分であるが<sup>43)</sup>、LIFシグナルと相乗的に働き、ナイーブ状態を維持する<sup>44)</sup>。一般に、ヘ



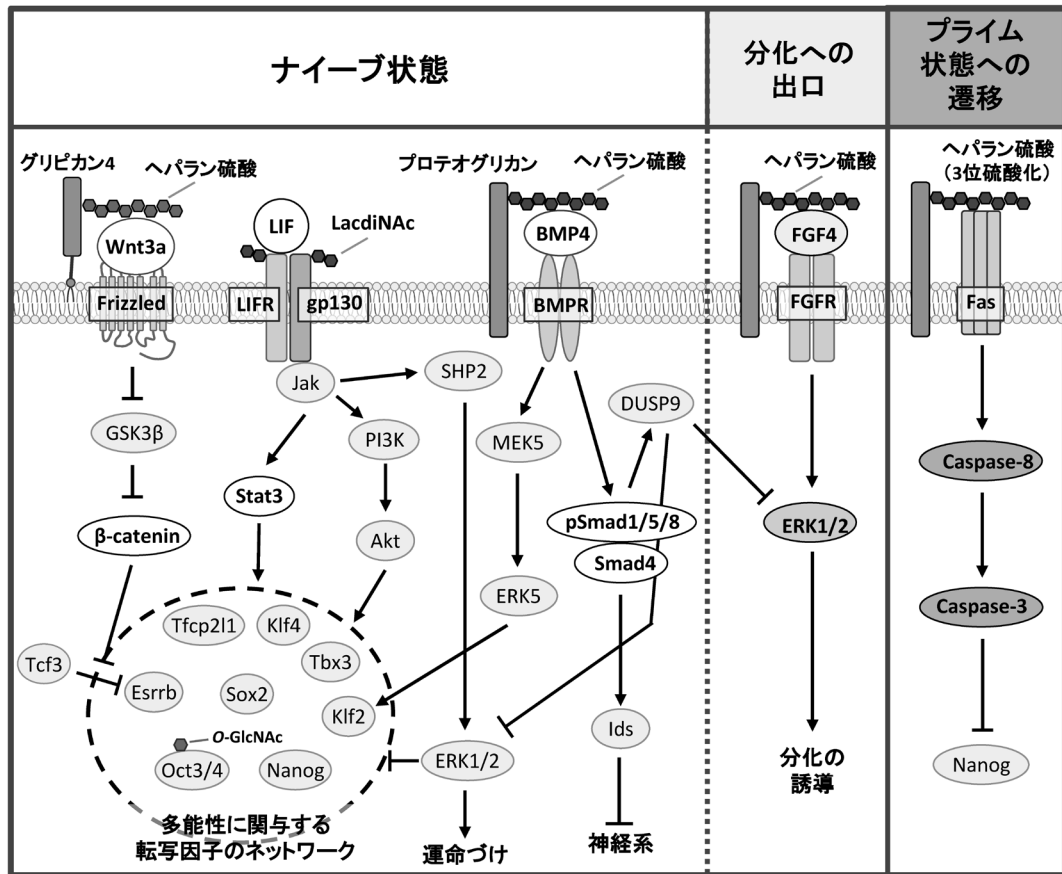


図1 ナীবなマウスES細胞で機能する糖鎖とシグナル  
 ナীব状態のマウスES/iPS細胞で、糖鎖は、未分化状態の維持と分化の出口に働く四つの主要なシグナル〔白血病抑制因子 (LIF)、骨形成タンパク質 (BMP)、Wnt、線維芽細胞増殖因子 (FGF)〕に参与する。LacdiNAc糖鎖構造は、LIF/Statシグナルを介して未分化なナীব状態の維持に働く。ヘパラン硫酸は、Wnt/ $\beta$ -cateninとBMP/Smadシグナルを介して、ナীব状態の維持に働き、FGF4/細胞外シグナル制御キナーゼ (ERK) シグナルを介して、分化の出口に働く。ヘパラン硫酸プロテオグリカンの一つであるグリピカン4は、Wnt/ $\beta$ -cateninシグナルに特異的である。Oct3/4上のO-GlcNAcは、ナীব状態の維持に必須な遺伝子群の転写を促進している。3位が硫酸化されたヘパラン硫酸は、Fasシグナルを介してプライム状態への遷移を促進する。

パラン硫酸などの硫酸化された糖鎖は、BMPやWntに結合し、さまざまな細胞でこれらの因子の安定化や共受容体として働いている<sup>10-12)</sup>。ヘパラン硫酸に構造が類似するヘパリンは、Wnt3a ( $K_D = 26.0$  nM)<sup>11)</sup>にもBMP4 ( $K_D = 69.4$  nM)<sup>13)</sup>にも強く結合する。ヘパラン硫酸の伸長に関わる遺伝子も、本スクリーニングで見いだされた<sup>11)</sup>。我々を含むいくつかのグループの解析から、ヘパラン硫酸がWntとBMPシグナルを制御して、マウスES細胞のナীব状態の維持に働くことがわかり<sup>8,9)</sup>(図1)、そこでは、ヘパラン硫酸の硫酸化が必須であった<sup>13)</sup>。さらに、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのうち、グリピカン4は、Wntシグナルを選択的に制御していた<sup>45)</sup>。ヘパラン硫酸は、種々のコアタンパク質に結合してヘパラン硫酸プロテオグリカンを形成している。シグナルによってコアタンパク質が使い分けられていると推察された。

本スクリーニングで三番目に見いだされた糖鎖は、O-GlcNAcであった<sup>9,17,18)</sup>。O-GlcNAcは、核やミトコンドリア、細胞質に存在するタンパク質に起こる唯一の糖鎖修

飾である。OGTにより、タンパク質のSer/Thr残基にO-GlcNAc修飾が施され、O-GlcNAc分解酵素 (OGA) により加水分解・除去される<sup>46)</sup>。リン酸化されるSer/Thr残基やその近傍でO-GlcNAc修飾が行われることが多く、O-GlcNAc修飾とリン酸化修飾は競合関係にあると考えられている<sup>47)</sup>。実際、ナীবなマウスES細胞においてO-GlcNAcがFGF4シグナルを抑制し、未分化性維持に寄与していた<sup>18)</sup>(図3)。FGF4シグナルは、マウスES細胞の未分化性を抑制し、分化の出口となり、分化を促進する。我々は、未分化性維持のためにFGF4シグナルを抑制する機構が存在すると仮定し、O-GlcNAcによるリン酸化抑制に着目した。FGF受容体の下流でmitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK)-ERK1/2経路がリン酸化され、FGF4シグナルは活性化する。リン酸化ERK1/2は未分化性維持に関わる転写因子であるNanogの発現を抑制する。Ogt KDマウスES細胞では、FGF4-MEK-ERK1/2経路が活性化し、未分化性が低下し、分化が促進していた。一方で、ナীবなマウスES細胞におい

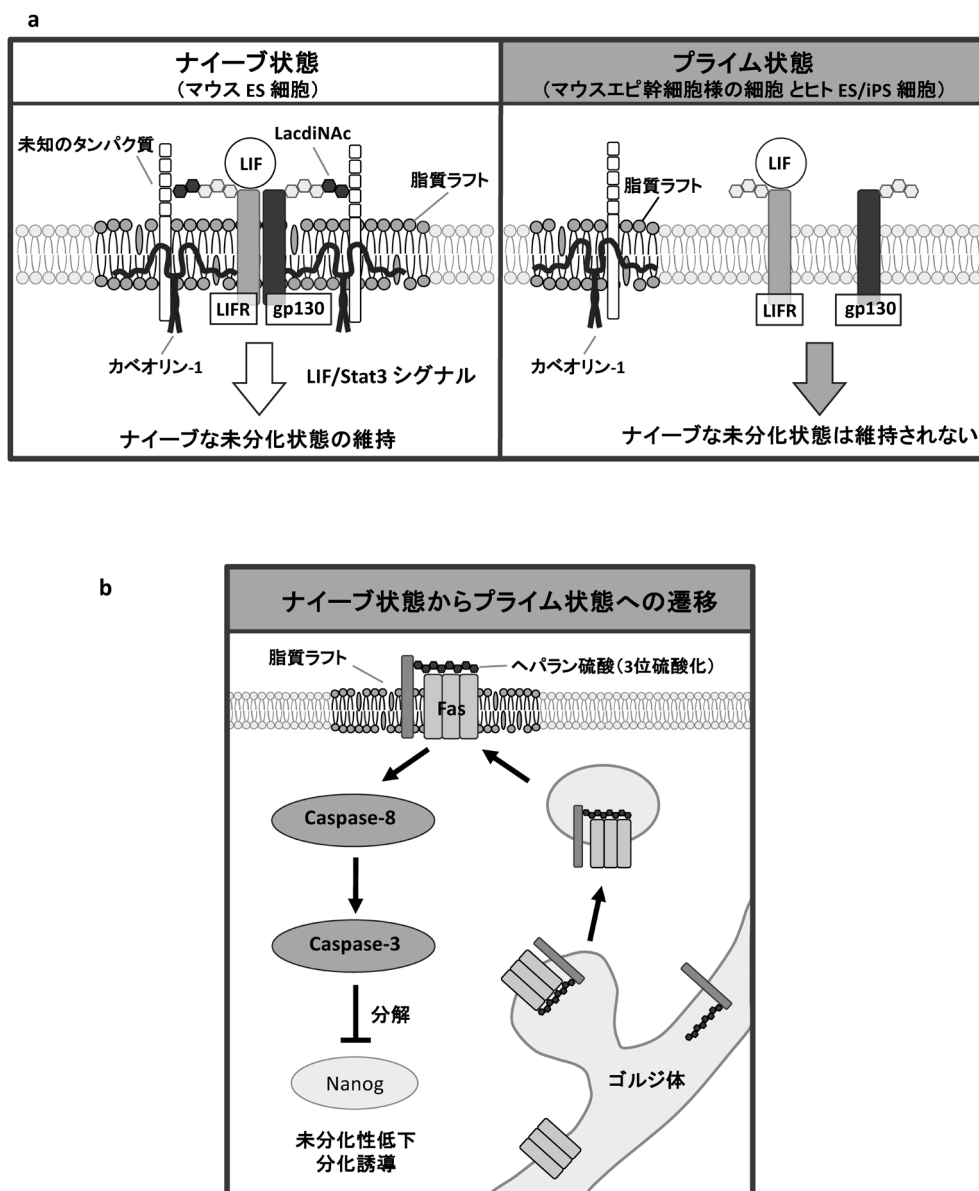


図2 糖鎖を介した受容体のラフトへの局在はシグナルを入力・増強する

(a)ナীব・プライム状態の多能性幹細胞におけるラックダイナック (LacdiNAc) 糖鎖構造による LIF/Stat3 シグナルの制御。LIF 受容体 (LIFR) と gp130 がラフトに局在することが、LIF/Stat3 シグナルの効率的な伝達に必要な。ナীব状態の細胞 (マウス ES 細胞) では、LacdiNAc の発現が高く、LIFR と gp130 上の LacdiNAc 構造を介して、両者はカベオリン-1 複合体などのラフト構成因子と結合して、ラフト/カベオラに局在する。このため、LIF シグナル伝達に必要な LIFR と gp130 の複合体形成が促進され、効率的にシグナルが伝達される。プライム状態の細胞 (マウスエビ幹細胞様の細胞とヒト iPS 細胞) では、LacdiNAc の発現は低く、LIFR と gp130 は、LacdiNAc 修飾をほとんど受けて、ラフト/カベオラに局在しない。このため、LIFR と gp130 の複合体形成が効率的になされず、強いシグナルが伝達されない。(b)ナীব状態からプライム状態への遷移における、3 位が硫酸化されたヘパラン硫酸による Fas の脂質ラフトへの移行と活性化。リガンドがない場合でも、受容体である Fas が細胞表面の脂質ラフトに集積すると、Fas シグナルは活性化される。3 位が硫酸化されたヘパラン硫酸は、ゴルジ体内腔で Fas と結合し、脂質ラフトまで Fas を移行させ、Fas シグナルを活性化させる。Fas シグナルはカスパーゼ経路を活性化し、未分化維持因子である Nanog タンパク質を分解して、分化を誘導する。

て、FGF4 シグナル構成因子の protein kinase c  $\zeta$  (PKC $\zeta$ ) の Thr410 は、O-GlcNAc 修飾を受けていた。PKC $\zeta$  は Thr410 がリン酸化されると活性化し、下流の MEK-ERK1/2 経路を活性化する。ナীবなマウス ES 細胞では、Thr410 が O-GlcNAc 修飾を受け、PKC $\zeta$  のリン酸化が阻害され、FGF4 シグナルが抑制されていることがわかった<sup>18)</sup>。

リン酸化の抑制以外にも O-GlcNAc は、転写因子の転写活性の制御、タンパク質-タンパク質間相互作用の制御、エピジェネティックな制御などの機能を持つ<sup>46)</sup>。多能性に関与する転写因子である Oct4 と Sox2 がナীবなマウス ES 細胞で O-GlcNAc 化されており、分化に伴いそれらは除去される<sup>48)</sup>。しかし、O-GlcNAc 修飾の機能は、Oct4

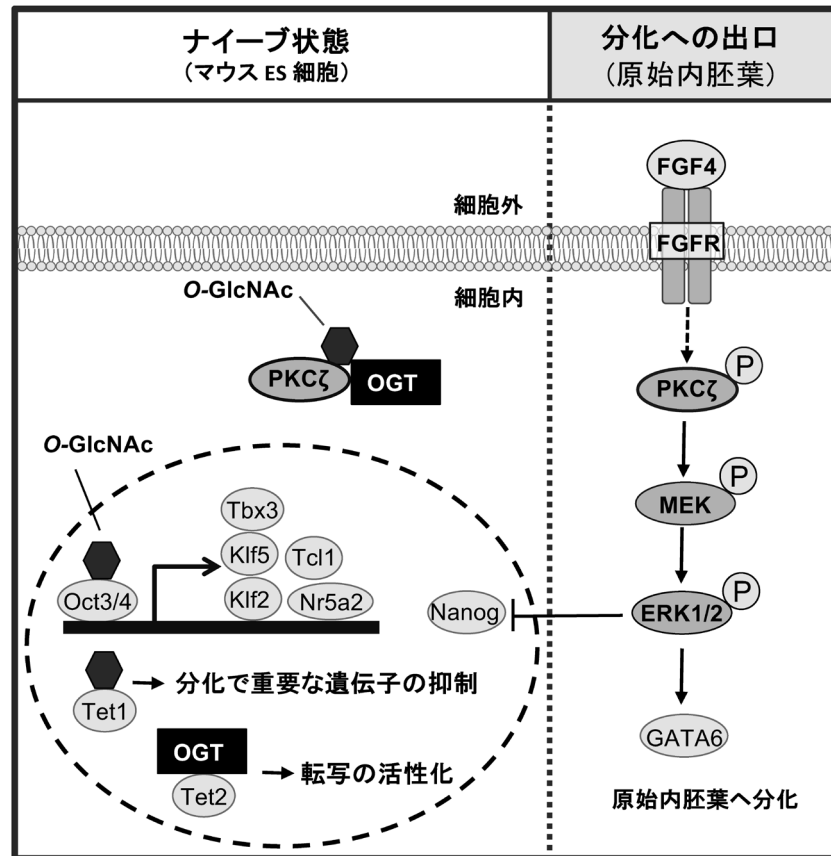


図3 O-GlcNAcはナীব状態の維持に必要なである

Oct4のThr228のO-GlcNAc修飾は、Oct4の転写活性を制御し、多くのナীব状態の維持に必須な遺伝子 (Klf2, Klf5, Nr5a2, Tbx3, Tcl1 など) の誘導に重要である。Ten eleven translocation (Tet) 1はO-GlcNAc修飾を受けると安定化し、Sin3A, NuRDと抑制型クロマチン構造を形成する複合体を作り、分化で重要となる遺伝子の発現を抑えている。その一方で、Tet2はO-GlcNAc転移酵素 (OGT) をヒストンH2Bへリクルートし、ヒストンH2BのSer112をO-GlcNAc化して転写を活性化する。さらに、OGTはPKCζと複合体を形成し、リン酸化部位のThr410をO-GlcNAc化して、リン酸化を阻害している。これにより、分化の出口となるFGF4-PKCζ-MEK-ERK1/2経路を抑制している。

とSox2で逆のものであった。Oct4のThr228のO-GlcNAc修飾は、Oct4の転写活性を正に制御し、ナীব状態の維持に必須な遺伝子、Klf2, Klf5, Nr5a2, Tbx3, Tcl1などの誘導に重要であった<sup>48)</sup>(図3)。一方、Sox2はpoly (ADP-ribose) polymerase 1と複合体を形成し、マウスES細胞の未分化性に寄与するが、Sox2のSer248のO-GlcNAc修飾はこの複合体形成を阻害し、未分化性維持に対し抑制的に働いていた<sup>49)</sup>。O-GlcNAcはエピジェネティックな制御にも関与する。Ten eleven translocation (Tet) 1と2は、ナীবなマウスES細胞に発現しており、シトシンの5位のメチル基をヒドロキシ化し、5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) に変換する活性を持つ酵素群に属する。5hmCは、DNA脱メチル化への中間体である。Tet1はO-GlcNAc化されると安定化し、この場合、Sin3A, NuRDと抑制型クロマチン構造を形成する複合体を作り、分化で重要となる遺伝子の発現を抑えていた<sup>50)</sup>(図3)。一方、Tet2とOGTは複合体を形成し、転写を活性化している<sup>51)</sup>(図3)。Tet2はOGTをヒストンH2Bへリクルートし、ヒストンH2BのSer112をO-GlcNAc化し、転写を活性化する。Tet2もO-GlcNAc修飾を受けているが、その機能はよくわかっていない<sup>52)</sup>。

以上のように、LacdiNAc、ヘパラン硫酸、O-GlcNAcは、多能性維持に働くLIF, BMP, Wntシグナルの促進や分化の出口となるFGF4シグナルの抑制に機能し、ナীব状態の維持に必要であった(図1, 2a, 3)。

#### 4) ナীব状態からの出口における糖鎖の機能：ヘパラン硫酸は、分化への出口にも必要である

ナীব状態のマウスES細胞はFGF4を分泌しているが、FGF4シグナルは分化への出口で働き、分化への引き金を引く<sup>53)</sup>(図1)。ここにも、ヘパラン硫酸が関与することが報告されている<sup>54, 55)</sup>。ヘパラン硫酸の二糖繰り返し領域の骨格を合成するexostosin glycosyltransferase 1 (EXT1)をノックアウトしたマウスのES細胞の胚様体は、NanogとOct4の発現が高く、分化への引き金が引かれず、分化した細胞系譜のマーカーが発現しない<sup>55)</sup>。N-deacetylase/N-sulfotransferase (Ndst)は、はじめに硫酸を転移する硫酸転移酵素であり、この酵素が引き続いて起こる硫酸化の起点となる。Ndst1と2のダブルノックアウトES細胞でも、NanogとOct4の発現が高く、エピプラストのマーカーのFGF5を誘導できず、ヘパラン硫酸の硫酸化がこの過程



で重要であることがわかる<sup>56)</sup>。

一方、コンドロイチン硫酸がE-カドヘリンと結合することによって、Rhoシグナルをコントロールし、分化へのコミットメントに働くことが報告されている<sup>57)</sup>。ヘパラン硫酸とコンドロイチン硫酸は、ここでは異なる働きをしているようだ。

#### 5) ナイーブ状態からプライム状態への遷移における糖鎖の機能：3位が硫酸化されたヘパラン硫酸はFasシグナルを活性化して遷移を促進している

ナイーブ状態のマウスES細胞を、LIFの代わりにFGF2とActivin A<sup>22)</sup>、あるいは、FGF2とJAK阻害剤（LIFシグナル阻害剤）<sup>17)</sup>を添加して培養し続けると、プライム状態のエピ幹細胞様の細胞に分化する。我々は、ナイーブ状態からプライム状態への遷移に伴って、HS 3-O-sulfotransferase-5 (3OST-5)の発現が上昇することを見いだした。ここでは、その生成物である3位が硫酸化されたヘパラン硫酸が、Fasシグナルを介して働いていた<sup>16)</sup>（図1, 2b）。Fasリガンドがない場合も、受容体のFasが細胞表面の脂質ラフトに集積すると、Fasシグナルは活性化される。ゴルジ体内腔で、3位が硫酸化されたヘパラン硫酸はFasのヘパリン結合配列（KLRRRVH）に結合し、Fasを脂質ラフトに移行させ、Fasシグナルを活性化させる<sup>15, 16)</sup>（図2b）。Fasシグナルはカスパーゼ経路を活性化し、未分化維持因子であるNanogタンパク質を分解してプライム状態への移行を促進させていた<sup>16)</sup>。

同様なナイーブ状態からプライム状態への遷移では、細胞質内のOGAの発現は顕著に増加するが、核と細胞質内のOGTの発現に変化はなかった<sup>17)</sup>。しかし、マウスES細胞のナイーブ状態からプライム状態への移行にOGA阻害剤は影響を及ぼさないと報告されており、この過程におけるO-GlcNAcの役割は明らかではない<sup>58)</sup>。

#### 6) プライム状態の多能性幹細胞における糖鎖の機能：OGT, ST6GAL1, ヘパラン硫酸がプライム状態の多能性幹細胞に必要である

プライム状態の多能性幹細胞においても、糖鎖機能の解析が行われ始めている。我々は、マウスES細胞から誘導されたプライム状態のエピ幹細胞様の細胞では、OGTが未分化性維持には関与しないが、生存に必須であることを明らかにした<sup>17)</sup>。

通常使用されているヒトのES/iPS細胞は、プライム状態の多能性幹細胞である（表1）。ヒトES細胞では、高い発現を示すST6GAL1が、Oct4とSox2を制御して多能性の維持に必要であることが示された<sup>59)</sup>。対照的に、NCAM上のポリシアル酸は、内胚葉への運命づけとヒトES細胞からの分化に必要であると報告された<sup>60)</sup>。

ヒトES/iPS細胞に発現する全糖鎖の種類について絶対量を比較すると、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸を含むグリコサミノグリカンが半分以上を占めている<sup>35)</sup>。し

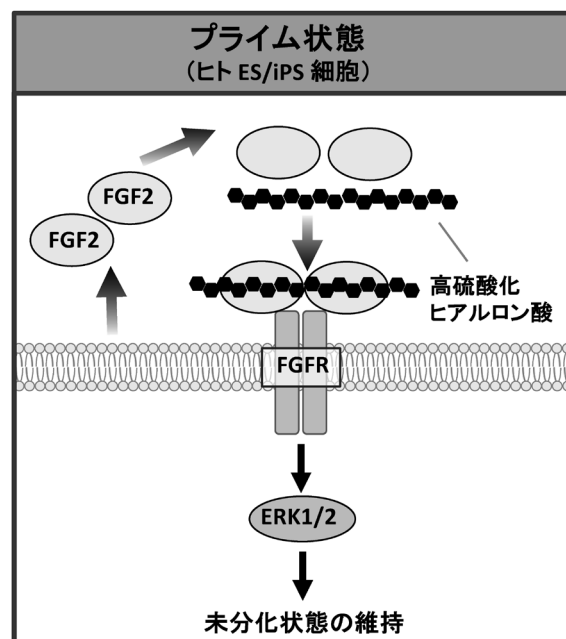


図4 人工的に作製した高硫酸化ヒアルロン酸を培地に加えるとFGF2の添加なしでヒトiPS細胞を培養できる。高硫酸化ヒアルロン酸が複数のFGF2と結合し、FGF受容体の二量体形成が促進され、シグナルが増強していると想定される。

かし、プライムなヒトES/iPS細胞上のグリコサミノグリカンの機能はよくわかっていない。それにもかかわらず、実際には、血清なしの培地ではFGF2とヘパリンが加えられ<sup>61)</sup>、フィーダー細胞から分泌されるヘパラン硫酸はFGF2と結合してFGF2を安定化し、増殖と多能性維持に重要である<sup>62, 63)</sup>。我々は、最近、グリコサミノグリカンの一種であるヒアルロン酸を人工的に硫酸化し、硫酸化度を自在に調節することに成功した。高度に硫酸化したヒアルロン酸を加えてヒトiPS細胞を培養したところ、フィーダー細胞なし、FGF2の添加なし、血清なしの条件で多能性を保って培養することができた（図4）<sup>64)</sup>。実際、高硫酸化ヒアルロン酸はFGF2に対してヘパリンより強い結合性を示し、添加によりFGFシグナルの増強が認められた。高硫酸化ヒアルロン酸が複数のFGF2と結合することにより、FGF受容体の二量体形成が促進され、その結果、シグナルが増強したものと考えている。

#### 7) プライム状態からナイーブ状態への遷移における糖鎖の機能：ラックダイナック, OGT, OGAがナイーブ状態への遷移に必要である

プライム状態のマウスエピ幹細胞様の細胞を、FGF2の代わりにFGFシグナル阻害剤（PD03）、Wntシグナル促進剤（CHIR）とLIFを添加して培養すると、ナイーブ状態のES細胞に戻ることができる<sup>17, 23, 24)</sup>。我々は、ナイーブ状態の維持に必要なOGTのみならず、その分解酵素であるOGAもが、ナイーブ状態への遷移に必要であることを明らかにした<sup>17)</sup>。この事実から、O-GlcNAc化され機能するタンパク質やタンパク質中のアミノ酸の位置が、ナイー

ブ状態とプライム状態で異なっていると考えられる。

ナイーブ状態の維持に必要な LacdiNAc 糖鎖構造もナイーブ状態への遷移に必要であった<sup>14)</sup> (図1, 2b)。プライム状態の多能性幹細胞では、LIF/Stat3 シグナルは未分化性維持に働かない。マウスエピ幹細胞様の細胞とヒト iPS 細胞では、LacdiNAc の発現は非常に低く、LIFR と gp130 のラフト/カベオラへの局在も非常に低下していた。LacdiNAc を合成する  $\beta$ 1,4-*N*-acetylgalactosaminyltransferase をノックダウンすると、マウスエピ幹細胞様の細胞からナイーブ状態のマウス ES 細胞に戻ることができなくなった。これらの事実から、ナイーブ状態のマウス ES 細胞とプライム状態のヒト ES/iPS 細胞やマウスエピ幹細胞の LIF 感受性の違いは、LIFR と gp130 上の LacdiNAc の発現の違いにも起因していると考えられ、LacdiNAc 糖鎖構造がナイーブ状態の誘導にも必要であることがわかった。

### 3. ショウジョウバエ組織幹細胞における糖鎖の機能

生殖幹細胞、腸幹細胞、造血幹細胞や神経幹細胞などの成体で組織維持に働く組織幹細胞は、自己複製する一方で、分化する細胞種を生み出す。このためには、幹細胞の幹細胞ニッチとの接触、非対称分裂、幹細胞ニッチから幹細胞へのシグナル伝達が必要である<sup>6)</sup>。幹細胞ニッチ側に接触する細胞は組織幹細胞として維持され、ニッチに接触しない細胞はその組織を構成する細胞へと分化する。ショウジョウバエの組織幹細胞は、哺乳類の組織幹細胞のよいモデルを与え、ニッチからのシグナルも共通するものが多いことがわかってきた。BMP, Wnt, Hh, FGF, Notch シグナルなどが働いており、ここでもヘパラン硫酸や *O*-Fuc などの糖鎖がシグナル制御に関わっている (図5)。

#### 1) 生殖幹細胞における糖鎖の機能：ヘパラン硫酸プロテオグリカンが BMP シグナルを介して分化を抑制している

細胞表面にある代表的なヘパラン硫酸プロテオグリカンは、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質のグリピカンと膜貫通領域を持つシンデカンである。ショウジョウバエには、Division abnormally delayed (Dally) と Dally-like protein (Dlp) のグリピカン2種がある。キャップ細胞は卵巣の幹細胞ニッチで、Dally を発現している (図5a-I, II)。Dally はキャップ細胞が分泌する BMP ホモログの Decapentaplegic (Dpp) をトラップし、隣接する生殖幹細胞に提示して BMP シグナルを入力し、分化を抑制していた<sup>12, 65-67)</sup>。幹細胞が非対称分裂して生じた二つの娘細胞のうち、キャップ細胞に隣接する娘細胞は幹細胞として維持され、もう一方の娘細胞は分化する。ヘパラン硫酸の合成に関わる糖転移酵素の欠損個体では、Dally はこの機能を持たず、Dally 上のヘパラン硫酸が必須であった。一方、精巣のニッチ細胞であるハブ細胞では、Dlp 上のヘパラン硫酸が同様な機能を持っていた (図

5a-III, IV)。ハブ細胞は、もう一つの BMP ホモログである Glass-bottom boat (Gbb) とインターロイキン-6 のホモログである Unpaired (Upd) を分泌する。Dlp はこれらをトラップし、隣接する生殖幹細胞に提示してシグナルを入力し、分化を抑制しているようだ。また、ハブ細胞で発現する6位が硫酸化されたヘパラン硫酸が、生殖幹細胞の中心体の位置決めに関わり、非対称分裂に関与することも報告された<sup>68)</sup>。

#### 2) 腸幹細胞における糖鎖の機能：Notch の *O*-Fuc は細胞運命の決定に必要であり、硫酸化の位置が異なるヘパラン硫酸が幹細胞の増殖を制御している

腸幹細胞は分裂後、新たな腸幹細胞と腸芽細胞を生じる (図5b-I)。どちらかの娘細胞の Delta が、他の娘細胞の Notch を活性化して強いシグナルを送り、腸芽細胞への運命づけを行う。Notch シグナルの強い活性化には、Notch の *O*-Fuc 修飾が必要であった<sup>69)</sup>。一方、ヘパラン硫酸プロテオグリカンのパールカンは、腸幹細胞から分泌され、基底膜の構成員となり、腸幹細胞のアイデンティティーと増殖性を維持していた<sup>70)</sup>。3位が硫酸化されたヘパラン硫酸が、腸幹細胞で上皮成長因子 (EGF) 受容体からのシグナルを阻害して増殖の抑制に働いて恒常性を維持すること<sup>71)</sup>、損傷後の再生過程では、6位が硫酸化されたヘパラン硫酸が、Jak/Stat, EGF, Hh シグナルを介して、腸幹細胞の分裂を活性化し、その収束には6位の硫酸エステル加水分解酵素 (Sulf1) が必要なこともわかっている<sup>72)</sup>。

#### 3) 造血幹細胞における糖鎖の機能：ヘパラン硫酸プロテオグリカンとムチン型の *O*-結合型糖鎖が幹細胞維持に機能している

リンフグランドの Primary lobe は、幼虫の造血器官であり、造血幹細胞ニッチ、造血幹細胞、成熟血球細胞で構成される<sup>73)</sup> (図5c-I)。成熟血球細胞には、プラズマ細胞、クリスタル細胞、ラメロサイトがある<sup>74)</sup>。成熟血球細胞の90~95%はプラズマ細胞で、哺乳類のマクロファージに相当し貪食作用を持つ。細胞外マトリクスの一員であるパールカンは、造血幹細胞から分泌されるが、FGF をトラップして FGF シグナルを阻害し、造血幹細胞の分化を抑制して幹細胞を維持している<sup>75)</sup> (図5c-I)。Dlp は造血幹細胞ニッチに発現し、BMP シグナルを介してニッチ細胞数を制御していた<sup>76)</sup> (図5c-II)。

一方、血リンパ (体液) 中に、プラズマ細胞はさまざまな分子を分泌する。血リンパは、それに浸っている組織細胞の直接の環境であり、血リンパの恒常性の維持は、組織の生理機能に重要である。我々は糖鎖に関わる初めての例として、プラズマ細胞から分泌される血リンパ構成因子がムチン型の *O*-結合型糖鎖である T 抗原を持ち、造血幹細胞を維持するための環境を整えていることを明らかにした<sup>77)</sup> (図5c-I)。この糖鎖の欠損個体では、ニッチ細胞からのフィロポディアの伸長が阻害され、造血幹細胞が消失した。



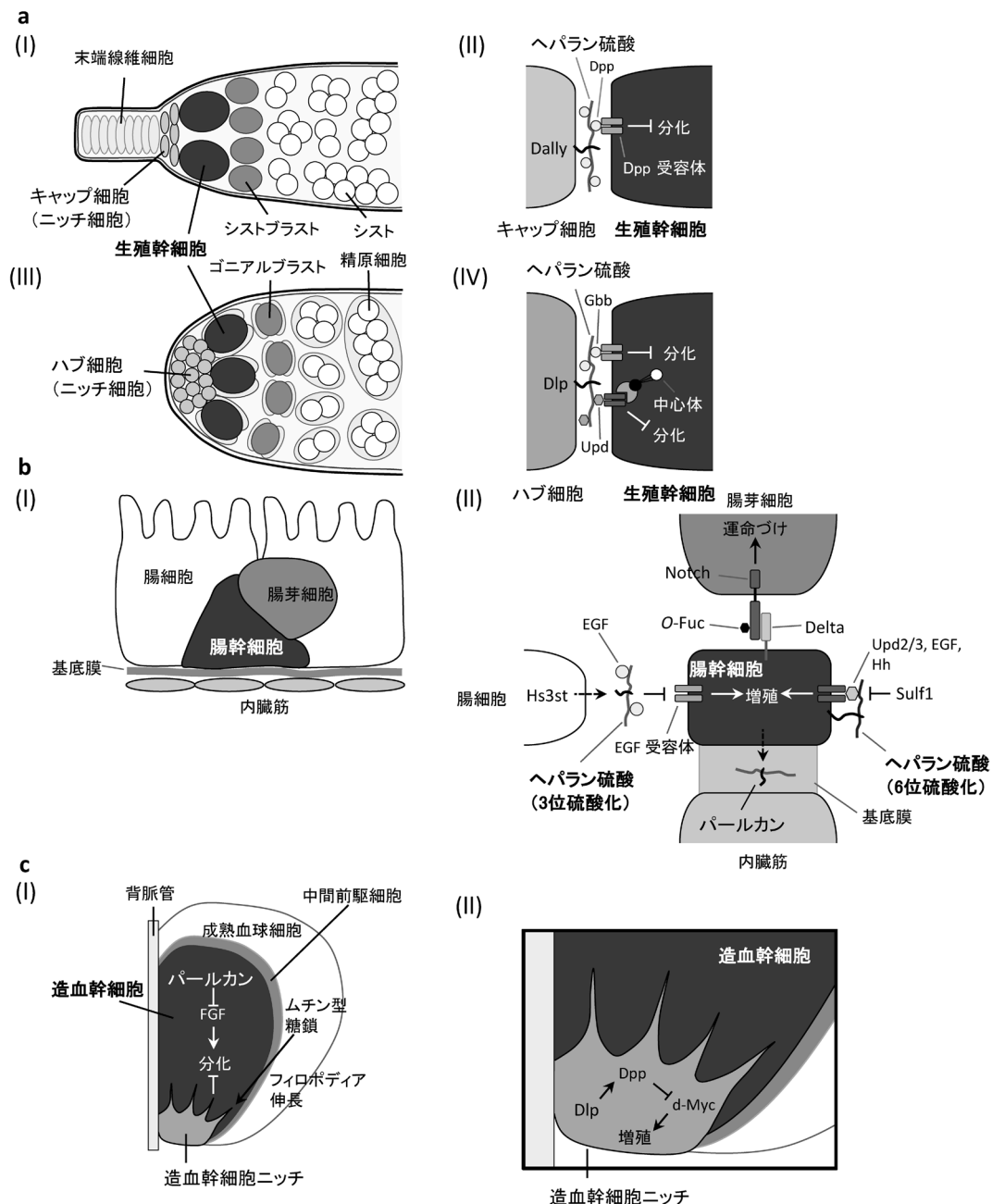


図5 ショウジョウバエ組織幹細胞で機能する糖鎖と制御されるシグナル

(a) 生殖幹細胞. (I) ショウジョウバエ成虫の卵巢と組織幹細胞. (II) キャップ細胞に発現する Division abnormally delayed (Dally) が持つヘパラン硫酸が、キャップ細胞から分泌される Decapentaplegic (Dpp) をトラップし、生殖幹細胞で Dpp シグナルを活性化させ、分化を抑制している. (III) ショウジョウバエ成虫の精巢. (IV) ハブ細胞に発現する Dally-like protein (Dlp) が持つヘパラン硫酸が、ハブ細胞から分泌される Glass-bottom boat (Gbb) と Unpaired (Upd) をトラップし、生殖幹細胞で各シグナルを活性化させ、分化を抑制している. ハブ細胞に発現する 6 位が硫酸化されたヘパラン硫酸は、幹細胞の中心体の位置どりに関与する. (b) 腸幹細胞. (I) ショウジョウバエ成虫の腸と組織幹細胞. (II) 腸幹細胞の分裂後、一方の娘細胞に発現する Delta が、もう一方の娘細胞に発現する O-Fuc 修飾された Notch と結合し、Notch シグナルを強く活性化する. 強い Notch シグナルを受けた娘細胞が腸芽細胞へと運命づけされる. 腸幹細胞から分泌されるパールカンが腸幹細胞の同一性を維持している. 一方、腸細胞から分泌される 3 位が硫酸化されたヘパラン硫酸は腸幹細胞で上皮成長因子 (EGF) 受容体からのシグナルを阻害し、増殖を抑制する. 腸幹細胞上の 6 位が硫酸化されたヘパラン硫酸は、Upd2, Upd3, EGF, Hedgehog (Hh) をトラップしてシグナルを活性化し、増殖を促進する. 逆に、6 位の硫酸エステル加水分解酵素 (Sulf1) がこれらのシグナルの活性化を抑制している. (c) 造血幹細胞. (I) ショウジョウバエ幼虫の造血器官と組織幹細胞. 造血幹細胞から分泌されるパールカンが線維芽細胞増殖因子 (FGF) を抑制し、造血幹細胞の分化を抑制している. 成熟血球細胞で合成されるムチン型糖鎖は、造血幹細胞ニッチのフィロポディア伸長を助け、造血幹細胞の未分化性維持に寄与する. (II) 造血幹細胞ニッチでは、Dlp が Dpp シグナルを促進し、ショウジョウバエ Myc (d-Myc) を抑制して、ニッチ細胞の増殖を制御している.

#### 4) その他の組織幹細胞における糖鎖の機能

他の組織幹細胞においても糖鎖の機能が報告されている。我々は、筋ジストロフィーの原因遺伝子の一つである *O*-Man 転移酵素の変異体で、筋芽細胞の密度が高くなって筋芽細胞のアポトーシスが亢進することを見いだしている<sup>78)</sup>。また、パールカンが、FGF と Hh シグナルを介して神経芽細胞の分裂を促進していること<sup>79)</sup>も報告されている。

#### 4. ヒトがん幹細胞における糖鎖の機能

がんとシアル酸の関連についての研究は歴史が古く、その数も非常に多い。シアリル Lewis x 抗原や CA19-9 とも呼ばれるシアリル Lewis a 抗原は、腫瘍マーカーとして汎用されている。ヒト ES 細胞で高い発現を示す ST6GAL1 がヒト ES 細胞の多能性の維持と iPS 細胞へのリプログラムに重要であることが示され<sup>59)</sup>、がんにおける ST6GAL1 の役割、特にがん幹細胞との関連が、注目されるようになった。大腸がん組織では、ST6GAL1 の発現が高く、大腸がん細胞株においては、ST6GAL1 の増減とがん幹細胞マーカーの CD133 と aldehyde dehydrogenase 1 の発現は相関していた<sup>80)</sup>。ST6GAL1 の発現は卵巣がんや膵臓がんでも亢進しており、発現細胞はがん幹細胞として働き、腫瘍を形成した<sup>81)</sup>。これらから、ST6GAL1 は、がんの幹細胞性に関係していると考えられている。

ヒト ES/iPS 細胞のマーカーとして汎用されている SSEA-3 や Globo-H は、乳がんを含む多くのがんで発現している。2 種の異なるマーカーセットで乳がん細胞から調製したがん幹細胞のうち、SSEA-3 陽性のグループは非常に強い腫瘍形成能を示した<sup>82)</sup>。10 個の細胞を注入した場合でも腫瘍を形成しており、SSEA-3 が機能的がん幹細胞マーカーになると考えられた。なお、SSEA-3 を合成する  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase 5 をノックダウンするとがん細胞特異的に細胞死が誘導されている。

CD44 は、乳がんや膵臓がんをはじめ、さまざまながん種のがん幹細胞マーカーになっている<sup>83)</sup>。ヒアルロン酸は CD44 の主なりガンドであり、がん幹細胞ニッチの性質を規定する。ヒアルロン酸合成酵素を乳がん細胞に過剰発現させると、トランスフォーミング増殖因子  $\beta$  シグナルが亢進して上皮間葉転換が起こり、幹細胞性を獲得した<sup>84)</sup>。他のグリコサミノグリカン、すなわち、ヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸もがん幹細胞性に関与している<sup>85)</sup>。シンデカンとグリピカン は細胞表面にあるヘパラン硫酸プロテオグリカンであり、幹細胞性に関わる Wnt, Hh, Notch シグナルを制御している。シンデカン 1 は、乳がん、前立腺がん、大腸がんなどで、グリピカン 4 は膵臓がんではがん幹細胞への関与が報告されている。また、コンドロイチン硫酸プロテオグリカンの neuron-glia antigen 2/コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 4 は、グリオブラストーマのがん幹細胞マーカーになっている。

この他、elongated core 1 構造 (GlcNAc $\beta$ 1,3Gal $\beta$ 1,3GalNAc-*O*-Ser/Thr) を合成する  $\beta$ 1,3-*N*-acetylglucosaminyltransferase 3 と polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 3 が、膵臓がん幹細胞の自己複製に関与しているという報告もある<sup>86)</sup>。

#### 5. まとめ

本稿では、多能性幹細胞、組織幹細胞、がん幹細胞における糖鎖の機能を、筆者らの研究も含めて概説した。このように、糖鎖は、幹細胞マーカーになるのみならず、幹細胞性に深く関わる Wnt, BMP, LIF, FGF, Fas, Hh, Notch, CD44 シグナルを制御して、幹細胞の維持や分化に働いている。いくつかの糖鎖が異なる種の幹細胞、たとえば多能性幹細胞とがん幹細胞で、共通に働いていることもわかってきた。幹細胞における糖鎖機能の解明は、発展途上の分野であり、そこで得られる情報の応用は、再生医療、遺伝性疾患、がん、恒常性維持と老化へと広がるものと期待される。

#### 文 献

- 1) Evans, M.J. & Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, **292**, 154–156.
- 2) Martin, G.R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7634–7638.
- 3) Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., & Jones, J.M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**, 1145–1147.
- 4) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663–676.
- 5) Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J.H. (2016) Dynamic stem cell states: Naïve to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 155–169.
- 6) Hsu, Y.C. & Fuchs, E. (2012) A family business: Stem cell progeny joins the niche to regulate homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 103–114.
- 7) Battle, E. & Clevers, H. (2017) Cancer stem cells revisited. *Nat. Med.*, **23**, 1124–1134.
- 8) Nishihara, S. (2017) Glycans define the stemness of naïve and primed pluripotent stem cells. *Glycoconj. J.*, **34**, 737–747.
- 9) Nishihara, S. (2018) Glycans in stem cell regulation: From *Drosophila* tissue stem cells to mammalian pluripotent stem cells. *FEBS Lett.*, **592**, 3773–3790.
- 10) Nishihara, S. (2010) Glycosyltransferases and transporters that contribute to proteoglycan synthesis in *Drosophila*: Identification and functional analyses using the heritable and inducible RNAi system. *Methods Enzymol.*, **480**, 323–351.
- 11) Sasaki, N., Okishio, K., Ui-Tei, K., Saigo, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Nishimura, T., Suda, Y., Hayasaka, M., Hanaoka, K., et al. (2008) Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, **283**, 3594–3606.
- 12) Nakato, H. & Li, J.P. (2016) Functions of heparan sulfate proteoglycans in development: Insights from *Drosophila* models. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **325**, 275–293.
- 13) Sasaki, N., Hirano, T., Ichimiya, T., Wakao, M., Hirano, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Suda, Y., & Nishihara, S.

- (2009) The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. *PLoS One*, **4**, e8262.
- 14) Sasaki, N., Shinomi, M., Hirano, K., Ui-Tei, K., & Nishihara, S. (2011) LacdiNAc (GalNAc $\beta$ 1-4GlcNAc) contributes to self-renewal of mouse embryonic stem cells by regulating leukemia inhibitory factor/STAT3 signaling. *Stem Cells*, **29**, 641–650.
  - 15) Hirano, K., Sasaki, N., Ichimiya, T., Miura, T., Van Kuppevelt, T.H., & Nishihara, S. (2012) 3-O-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contributes to the differentiation of mouse embryonic stem cells via Fas signaling. *PLoS One*, **7**, e43440.
  - 16) Hirano, K., Van Kuppevelt, T.H., & Nishihara, S. (2013) The transition of mouse pluripotent stem cells from the naïve to the primed state requires Fas signaling through 3-O sulfated heparan sulfate structures recognized by the HS4C3 antibody. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 1175–1181.
  - 17) Miura, T. & Nishihara, S. (2016) O-GlcNAc is required for the survival of primed pluripotent stem cells and their reversion to the naïve state. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **480**, 655–661.
  - 18) Miura, T., Kume, M., Kawamura, T., Yamamoto, K., Hamakubo, T., & Nishihara, S. (2018) O-GlcNAc on PKC $\zeta$  inhibits the FGF4-PKC $\zeta$ -MEK-ERK1/2 pathway via inhibition of PKC $\zeta$  phosphorylation in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports*, **10**, 272–286.
  - 19) Tesar, P.J., Chenowet, J.G., Broo, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., & McKay, R.D. (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, **448**, 196–199.
  - 20) Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, **448**, 191–195.
  - 21) Ryall, J.G., Cliff, T., Dalton, S., & Sartorelli, V. (2015) Metabolic reprogramming of stem cell epigenetics. *Cell Stem Cell*, **17**, 651–662.
  - 22) Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., & Smith, A. (2009) Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*, **136**, 1063–1069.
  - 23) Zhou, H., Li, W., Zhu, S., Joo, J.Y., Do, J.T., Xiong, W., Kim, J.B., Zhang, K., Schöler, H.R., & Ding, S. (2010) Conversion of mouse epiblast stem cells to an earlier pluripotency state by small molecules. *J. Biol. Chem.*, **285**, 29676–29680.
  - 24) Illich, D.J., Zhang, M., Ursu, A., Osorno, R., Kim, K.P., Yoon, J., Araúzo-Bravo, M.J., Wu, G., Esch, D., Sabour, D., et al. (2016) Distinct signaling requirements for the establishment of ESC pluripotency in late-stage EpiSCs. *Cell Rep.*, **15**, 787–800.
  - 25) Takashima, Y., Guo, G., Loos, R., Nichols, J., Ficiz, G., Krueger, F., Oxley, D., Santos, F., Clarke, J., Mansfield, W., et al. (2014) Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, **158**, 1254–1269.
  - 26) Theunissen, T.W., Powell, B.E., Wang, H., Mitalipova, M., Faddah, D.A., Reddy, J., Fan, Z.P., Maetzel, D., Ganz, K., Shi, L., et al. (2014) Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naïve human pluripotency. *Cell Stem Cell*, **15**, 471–487.
  - 27) Guo, G., von Meyenn, F., Rostovskaya, M., Clarke, J., Dietmann, S., Baker, D., Sahakyan, A., Myers, S., Bertone, P., Reik, W., et al. (2017) Epigenetic resetting of human pluripotency. *Development*, **144**, 2748–2763.
  - 28) Smith, A. (2017) Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Development*, **144**, 365–373.
  - 29) Atwood, J.A. 3rd, Cheng, L., Alvarez-Manilla, G., Warren, N.L., York, W.S., & Orlando, R. (2008) Quantitation by isobaric labeling: applications to glycomics. *J. Proteome Res.*, **7**, 367–374.
  - 30) Muramatsu, T. & Muramatsu, H. (2004) Carbohydrate antigens expressed on stem cells and early embryonic cells. *Glycoconj. J.*, **21**, 41–45.
  - 31) Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P.W., Beighton, G., Bello, P.A., Benvenisty, N., Berry, L.S., Bevan, S., et al. International Stem Cell Initiative (2007) Characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. *Nat. Biotechnol.*, **25**, 803–816.
  - 32) Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P.W., Knowles, B.B., & Solter, D. (1983) Stagespecific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.*, **2**, 2355–2361.
  - 33) Natunen, S., Satomaa, T., Pitkanen, V., Salo, H., Mikkola, M., Natunen, J., Otonkoski, T., & Valmu, L. (2011) The binding specificity of the marker antibodies Tra-1-60 and Tra-1-81 reveals a novel pluripotency-associated type 1 lactosamine epitope. *Glycobiology*, **21**, 1125–1130.
  - 34) 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., et al. (2011) An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nat. Biotechnol.*, **29**, 829–834.
  - 35) Fujitani, N., Furukawa, J., Araki, K., Fujioka, T., Takegawa, Y., Piao, J., Nishioka, T., Tamura, T., Nikaido, T., Ito, M., et al. (2013) Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2105–2110.
  - 36) Liang, Y.J., Kuo, H.H., Lin, C.H., Chen, Y.Y., Yang, B.C., Cheng, Y.Y., Yu, A.L., Khoo, K.H., & Yu, J. (2010) Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22564–22569.
  - 37) Kawabe, K., Tateyama, D., Toyoda, H., Kawasaki, N., Hashii, N., Nakao, H., Matsumoto, S., Nonaka, M., Matsumura, H., Hirose, Y., et al. (2013) A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures. *Glycobiology*, **23**, 322–336.
  - 38) Tateno, H., Toyota, M., Saito, S., Onuma, Y., Ito, Y., Hiemori, K., Fukumura, M., Matsushima, A., Nakanishi, M., Ohnuma, K., et al. (2011) Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. *J. Biol. Chem.*, **286**, 20345–20353.
  - 39) Collier, A.J., Panula, S.P., Schell, J.P., Chovanec, P., Plaza Reyes, A., Petropoulos, S., Corcoran, A.E., Walker, R., Douagi, I., Lanner, F., et al. (2017) Comprehensive cell surface protein profiling identifies specific markers of human naïve and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, **20**, 874–890.
  - 40) Inada, E., Saitoh, I., Kubota, N., Iwase, Y., Murakami, T., Sawami, T., Yamasaki, Y., & Sato, M. (2019) Increased expression of cell surface SSEA-1 is closely associated with naïve-like conversion from human deciduous teeth dental pulp cells-derived iPS cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1651.
  - 41) Stadlmann, J., Taubenschmid, J., Wenzel, D., Gattinger, A., Dürnberger, G., Dusberger, F., Elling, U., Mach, L., Mechtler, K., & Penninger, J.M. (2017) Comparative glycoproteomics of



- stem cells identifies new players in ricin toxicity. *Nature*, **549**, 538–542.
- 42) Aoki, K. & Tiemeyer, M. (2010) The glycomics of glycan glucuronylation in *Drosophila melanogaster*. *Methods Enzymol.*, **480**, 297–321.
  - 43) Ogawa, K., Nishinakamura, R., Iwamatsu, Y., Shimosato, D., & Niwa, H. (2006) Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 159–166.
  - 44) Niwa, H. (2014) The pluripotency transcription factor network at work in reprogramming. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **28**, 25–31.
  - 45) Fico, A., De Chevigny, A., Egea, J., Bösl, M.R., Cremer, H., Maina, F., & Dono, R. (2012) Modulating Glypican4 suppresses tumorigenicity of embryonic stem cells while preserving self-renewal and pluripotency. *Stem Cells*, **30**, 1863–1874.
  - 46) Hart, G.W. (2014) Minireview series on the thirtieth anniversary of research on *O*-GlcNAcylation of nuclear and cytoplasmic proteins: Nutrient regulation of cellular metabolism and physiology by *O*-GlcNAcylation. *J. Biol. Chem.*, **289**, 34422–34423.
  - 47) Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., & Lagerlof, O. (2011) Cross talk between *O*-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 825–858.
  - 48) Jang, H., Kim, T.W., Yoon, S., Choi, S.Y., Kang, T.W., Kim, S.Y., Kwon, Y.W., Cho, E.J., & Youn, H.D. (2012) *O*-GlcNAc regulates pluripotency and reprogramming by directly acting on core components of the pluripotency network. *Cell Stem Cell*, **11**, 62–74.
  - 49) Myers, S.A., Peddada, S., Chatterjee, N., Friedrich, T., Tomoda, K., Krings, G., Thomas, S., Maynard, J., Broeker, M., Thomson, M., et al. (2016) SOX2 *O*-GlcNAcylation alters its protein-protein interactions and genomic occupancy to modulate gene expression in pluripotent cells. *eLife*, **5**, e10647.
  - 50) Shi, F.T., Kim, H., Lu, W., He, Q., Liu, D., Goodell, M.A., Wan, M., & Songyang, Z. (2013) Ten-eleven translocation 1 (Tet1) is regulated by *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (Ogt) for target gene repression in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, **288**, 20776–20784.
  - 51) Chen, Q., Chen, Y., Bian, C., Fujiki, R., & Yu, X. (2013) TET2 promotes histone *O*-GlcNAcylation during gene transcription. *Nature*, **493**, 561–564.
  - 52) Bauer, C., Göbel, K., Nagaraj, N., Colantuoni, C., Wang, M., Müller, U., Kremmer, E., Rottach, A., & Leonhardt, H. (2015) Phosphorylation of TET proteins is regulated via *O*-GlcNAcylation by the *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (OGT). *J. Biol. Chem.*, **290**, 4801–4812.
  - 53) Kunath, T., Saba-El-Leil, M.K., Almousaillekh, M., Wray, J., Meloche, S., & Smith, A. (2007) FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, **134**, 2895–2902.
  - 54) Johnson, C.E., Crawford, B.E., Stavridis, M., Ten Dam, G., Wat, A.L., Rushton, G., Ward, C.M., Wilson, V., van Kuppevelt, T.H., Esk, J.D., et al. (2007) Essential alterations of heparan sulfate during the differentiation of embryonic stem cells to Sox1-enhanced green fluorescent protein-expressing neural progenitor cells. *Stem Cells*, **25**, 1913–1923.
  - 55) Kraushaar, D.C., Yamaguchi, Y., & Wang, L. (2010) Heparan sulfate is required for embryonic stem cells to exit from self-renewal. *J. Biol. Chem.*, **285**, 5907–5916.
  - 56) Lanner, F., Lee, K.L., Sohl, M., Holmborn, K., Yang, H., Wilbertz, J., Poellinger, L., Rossant, J., & Farnebo, F. (2010) Heparan sulfation-dependent fibroblast growth factor signaling maintains embryonic stem cells primed for differentiation in a heterogeneous state. *Stem Cells*, **28**, 191–200.
  - 57) Izumikawa, T., Sato, B., & Kitagawa, H. (2014) Chondroitin sulfate is indispensable for pluripotency and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Sci. Rep.*, **4**, 3701.
  - 58) Speakman, C.M., Domke, T.C., Wongpaiboonwattana, W., Sanders, K., Mudaliar, M., van Aalten, D.M., Barton, G.J., & Stavridis, M.P. (2014) Elevated *O*-GlcNAc levels activate epigenetically repressed genes and delay mouse ESC differentiation without affecting naïve to primed cell transition. *Stem Cells*, **32**, 2605–2615.
  - 59) 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., et al. (2015) Glycosyltransferase ST6GAL1 contributes to the regulation of pluripotency in human pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, **5**, 13317.
  - 60) Berger, R.P., Sun, Y.H., Kulik, M., Lee, J.K., Nairn, A.V., Moremen, K.W., Pierce, M., & Dalton, S. (2016) ST8SIA4-dependent polysialylation is part of a developmental program required for germ layer formation from human pluripotent stem cells. *Stem Cells*, **34**, 1742–1752.
  - 61) Furue, M.K., Na, J., Jackson, J.P., Okamoto, T., Jones, M., Baker, D., Hata, R., Moore, H.D., Sato, J.D., & Andrews, P.W. (2008) Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 13409–13414.
  - 62) Levenstein, M.E., Berggren, W.T., Lee, J.E., Conard, K.R., Llanas, R.A., Wagner, R.J., Smith, L.M., & Thomson, J.A. (2008) Secreted proteoglycans directly mediate human embryonic stem cell-basic fibroblast growth factor 2 interactions critical for proliferation. *Stem Cells*, **12**, 3099–3107.
  - 63) Stelling, M.P., Lages, Y.M., Tovar, A.M., Mourão, P.A., & Rehen, S.K. (2013) Matrix-bound heparan sulfate is essential for the growth and pluripotency of human embryonic stem cells. *Glycobiology*, **23**, 337–345.
  - 64) Miura, T., Yuasa, N., Ota, H., Habu, M., Kawano, M., Nakayama, F., & Nishihara, S. (2019) Highly sulfated hyaluronic acid maintains human induced pluripotent stem cells under feeder-free and bFGF-free conditions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **518**, 506–512.
  - 65) Losick, V.P., Morris, L.X., Fox, D.T., & Spradling, A. (2011) *Drosophila* stem cell niches: A decade of discovery suggests a unified view of stem cell regulation. *Dev. Cell*, **21**, 159–171.
  - 66) Hayashi, Y., Kobayashi, S., & Nakato, H. (2009) *Drosophila* glypicans regulate the germline stem cell niche. *J. Cell Biol.*, **187**, 473–480.
  - 67) Guo, Z. & Wang, Z. (2009) The glypican Dally is required in the niche for the maintenance of germline stem cells and short-range BMP signaling in the *Drosophila* ovary. *Development*, **136**, 3627–3635.
  - 68) Levings, D.C., Arashiro, T., & Nakato, H. (2016) Heparan sulfate regulates the number and centrosome positioning of *Drosophila* male germline stem cells. *Mol. Biol. Cell*, **27**, 888–896.
  - 69) Perdigoto, C.N., Schweisguth, F., & Bardin, A.J. (2011) Distinct levels of Notch activity for commitment and terminal differentiation of stem cells in the adult fly intestine. *Development*, **138**, 4585–4595.
  - 70) You, J., Zhang, Y., Li, Z., Lou, Z., Jin, L., & Lin, X. (2014) *Drosophila* perlecan regulates intestinal stem cell activity via cell-matrix attachment. *Stem Cell Reports*, **2**, 761–769.
  - 71) Guo, Y., Li, Z., & Lin, X. (2014) Hs3st-A and Hs3st-B regulate

- intestinal homeostasis in *Drosophila* adult midgut. *Cell. Signal.*, **26**, 2317–2325.
- 72) Takemura, M. & Nakato, H. (2017) *Drosophila* Sulfl is required for the termination of intestinal stem cell division during regeneration. *J. Cell Sci.*, **130**, 332–343.
- 73) Jung, S.H., Evans, C.J., Uemura, C., & Banerjee, U. (2005) The *Drosophila* lymph gland as a developmental model of hematopoiesis. *Development*, **132**, 2521–2533.
- 74) Shim, J. (2015) *Drosophila* blood as a model system for stress sensing mechanisms. *BMB Rep.*, **48**, 223–228.
- 75) Dragojlovic-Munther, M. & Martinez-Agosto, J.A. (2013) Extracellular matrix-modulated Heartless signaling in *Drosophila* blood progenitors regulates their differentiation via a Ras/ETS/FOG pathway and target of rapamycin function. *Dev. Biol.*, **384**, 313–330.
- 76) Penner, D., Oyallon, J., Morin-Poulard, I., Dejean, S., Vincent, A., & Crozatier, M. (2012) Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 3389–3394.
- 77) Fuwa, T.J., Kinoshita, T., Nishida, H., & Nishihara, S. (2015) Reduction of T antigen causes loss of hematopoietic progenitors in *Drosophila* through the inhibition of filopodial extensions from the hematopoietic niche. *Dev. Biol.*, **401**, 206–219.
- 78) Ueyama, M., Akimoto, Y., Ichimiya, T., Ueda, R., Kawakami, H., Aigaki, T., & Nishihara, S. (2010) Increased apoptosis of myoblasts in *Drosophila* model for the Walker–Warburg syndrome. *PLoS One*, **5**, e11557.
- 79) Park, Y., Rangel, C., Reynolds, M.M., Caldwell, M.C., Johns, M., Nayak, M., Welsh, C.J., McDermott, S., & Datta, S. (2003) *Drosophila* perlecan modulates FGF and hedgehog signals to activate neural stem cell division. *Dev. Biol.*, **253**, 247–257.
- 80) Swindall, A.F., Londoño-Joshi, A.I., Schultz, M.J., Fineberg, N., Buchsbaum, D.J., & Bellis, S.L. (2013) ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines. *Cancer Res.*, **73**, 2368–2378.
- 81) Schultz, M.J., Holdbrooks, A.T., Chakraborty, A., Grizzle, W.E., Landen, C.N., Buchsbaum, D.J., Conner, M.G., Arend, R.C., Yoon, K.J., Klug, C.A., et al. (2016) The tumor-associated glycosyltransferase ST6Gal-I regulates stem cell transcription factors and confers a cancer stem cell phenotype. *Cancer Res.*, **76**, 3978–3988.
- 82) Cheung, S.K., Chuang, P.K., Huang, H.W., Hwang-Verslues, W.W., Cho, C.H., Yang, W.B., Shen, C.N., Hsiao, M., Hsu, T.L., Chang, C.F., et al. (2016) Stage-specific embryonic antigen-3 (SSEA-3) and  $\beta$ 3GalT5 are cancer specific and significant markers for breast cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, 960–965.
- 83) Skandalis, S.S., Karalis, T.T., Chatzopoulos, A., & Karamanos, N.K. (2019) Hyaluronan-CD44 axis orchestrates cancer stem cell functions. *Cell. Signal.*, **63**, 109377.
- 84) Chanmee, T., Ontong, P., Mochizuki, N., Kongtawelert, P., Konno, K., & Itano, N. (2014) Excessive hyaluronan production promotes acquisition of cancer stem cell signatures through the coordinated regulation of Twist and the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )-Snail signaling axis. *J. Biol. Chem.*, **289**, 26038–26056.
- 85) Vitale, D., Kumar Katakam, S., Greve, B., Jang, B., Oh, E.S., Alaniz, L., & Götte, M. (2019) Proteoglycans and glycosaminoglycans as regulators of cancer stem cell function and therapeutic resistance. *FEBS J.*, **286**, 2870–2882.
- 86) Barkeer, S., Chugh, S., Karmakar, S., Kaushik, G., Rauth, S., Rachagani, S., Batra, S.K., & Ponnusamy, M.P. (2018) Novel role of O-glycosyltransferases GALNT3 and B3GNT3 in the self-renewal of pancreatic cancer stem cells. *BMC Cancer*, **18**, 1157.

## 著者寸描

### ●西原 祥子 (にしはら しょうこ)



創価大学工学研究科生命情報工学科教授。創価大学理工学部糖鎖生命システム融合センター・センター長。理学博士。

■略歴 東京に生る。東京大学理学部化学学科卒業。同大学院理学系研究科化学専攻博士課程修了。慶応義塾大学、東京慈恵会医科大学、University of North Carolina、三菱化成生命科学研究所、創価大学生命科学研究所を経て2003年より現職。

■研究テーマと抱負 糖鎖が担う生物学的役割の解明をショウジョウバエ、マウスおよびヒトの多能性幹細胞を用いて網羅的に行なっている。

■ウェブサイト <https://www.soka.ac.jp/faculty-profiles/shoko-nishihara/>

<https://www.soka.ac.jp/glycan/overview>

■趣味 温泉めぐり、音楽、読書。