

皮膚幹細胞の糖鎖をターゲットとした老化制御に向けての基盤研究

九州大学生体防御医学研究所

佐田 亜衣子

The disruption of communication between epidermal stem cells and their surrounding microenvironment, including adjacent cells and their extracellular matrix (ECM), contributes to the cellular and molecular impairments associated with skin aging. Glycans modify plasma membrane proteins post-translationally and have a role in tissue homeostasis and diseases by regulating cell-cell interactions, ligand-receptor binding, and ECM function. Glycans also play a crucial role in regulating stem cells by modulating signaling pathways that control their self-renewal and differentiation. Our previous study demonstrated age-related alterations in glycosylation patterns in mouse skin, characterized by an upregulation of sialic acid and a downregulation of mannose in aged epidermal stem cells. However, the functional importance of these alterations of glycans in vivo remains still unknown. In this study, we aim to investigate the function of glycosylation in skin aging at the stem cell level. We show that the elevation of α -2,6 sialylation by overexpressing glycogenes (St6gal1 and Man1a) in vivo exhibits phenotypes associated with skin aging, including hair loss, epidermal thinning, and decreased proliferative capacity of epidermal stem cells. Mass spectrometry, using membrane proteins pulled down by lectin probes, identified several potential core protein candidates modified by α -2,6 sialic acid. These findings indicate that changes in glycosylation regulate epidermal stem cell aging by modifying the membrane proteins. The functional relationship between glycogenes and core proteins in regulating epidermal stem cell function is being further investigated, which may provide a molecular basis and a biomarker for skin aging.

1. 緒 言

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、国内外の研究により、加齢に伴い、組織幹細胞の増殖の低下・停止、分化異常、がん化、ニッチへの応答性の変化などが、単独、あるいは複合的に起こり、組織の機能低下や病変の要因となることが示されている。この現象は、幹細胞の老化（ステムセルエイジング）と呼ばれ、造血、筋肉、神経幹細胞などを中心として関連報告が増えている。皮膚においても、細胞外マトリクスの加齢性欠陥により、毛包幹細胞から表皮系譜への異所的分化や、色素や表皮幹細胞の枯渇が起こることが報告されている。しかし老化に関する知見の多くは、個々の遺伝子の機能に着目したものが多く、解析の難しいタンパク質修飾レベルでの加齢変化が、組織幹細胞や個体老化に及ぼす影響には未知な部分が多い。

タンパク質のグリコシル化は、糖鎖の段階的な付加と除去を伴い、主に糖転移酵素と糖加水分解酵素によって媒介される。糖鎖は、タンパク質の構造、安定性、局在を決定し、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を介して、発生、腫瘍形成、炎症などの

多種多様な生物学的プロセスに影響を与える。糖鎖は、幹細胞の自己複製や分化を司る Notch、BMP、Wnt、FGF などのシグナル分子を調節することで、多能性幹細胞やシヨウジョウバエの組織幹細胞の制御に重要な役割を果たす。さらに近年、ヒト三次元皮膚モデルを用い、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¹⁾。しかし、糖鎖修飾の変化と生理機能を結びつけた研究は少なく、皮膚老化プロセスにおいて糖鎖修飾の機能的役割は不明である。

我々は、糖鎖工学を専門とする館野浩章（産業技術総合研究所）との共同研究により、レクチンアレイ法を用いることで、糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出し、加齢に伴って起こる表皮幹細胞の糖鎖変化を捉えることに成功した²⁾（図1）。レクチンは、様々な糖鎖構造を認識する糖鎖結合タンパク質の一種で、レクチンアレイでは、様々な糖鎖結合特異性を持つ一連のレクチンがスライドガラス上に固定化されている。この系を用い、若齢、高齢マウスの皮膚から単離した表皮幹細胞を用い、網羅的な糖鎖プロファイリングを行った。その結果、加齢に伴い、高マンノース型からシアル酸に富んだ複合型へと、表皮幹細胞の糖鎖修飾パターンが変化することを見出した。若齢、高齢の表皮幹細胞に有為に存在する糖鎖構造を認識するプローブとして、マンノース、 α 2-3 シアル酸と結合するレクチン（rHeltuba、rGal8N）を同定し、老化バイオマーカーとしての可能性を示した。さらに、表皮幹細胞のトランスクリプトーム解析により、マンノースの分解にはたらく Man1a、およびシアル酸の付加にはたらく糖転移酵素



Division of Skin Regeneration and Aging, Medical Institute of Bioregulation

Aiko Sada

Kyushu University

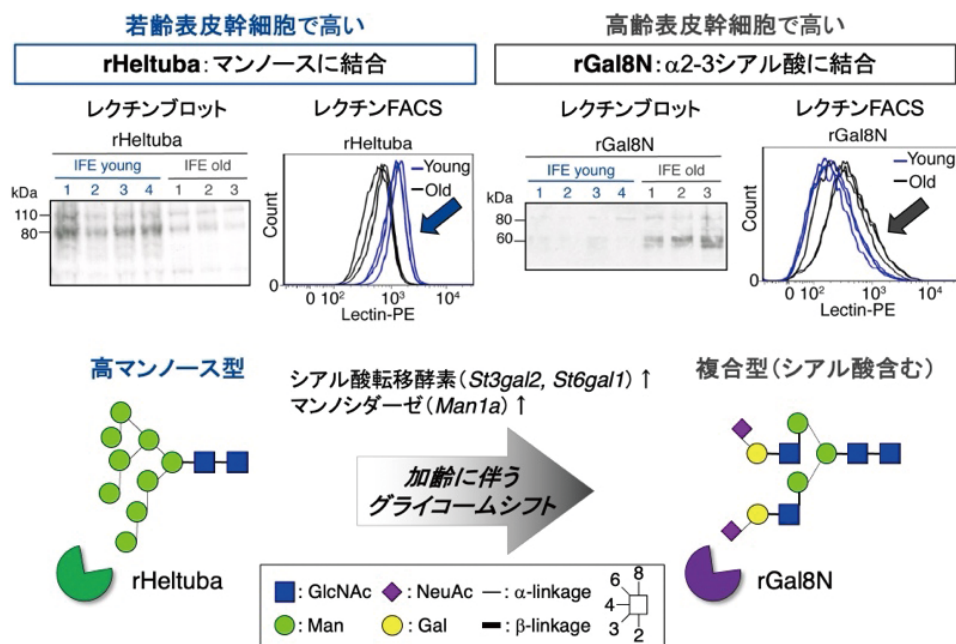


図1 加齢に伴う表皮幹細胞のグリコームシフト

(St3gal2, St6gal1) が、加齢した表皮幹細胞で有意に発現が上昇することを見出した。本研究は、これらの糖鎖遺伝子の機能に着目し、タンパク質の修飾が皮膚老化や幹細胞機能に及ぼす役割を解明することを目的として実施した。

2. 方法

2.1. 高齢型糖鎖パターンを持つ老化モデルマウスの作出と皮膚表現型解析

ドキシサイクリン依存的に糖鎖遺伝子 (St3gal2, St6gal1, Man1a) を過剰発現するトランスジェニック (Tg) マウス pTRE-Flag-St6gal1, pTRE-Flag-St3gal2, pTRE-Myc-Man1a は、熊本大学生命資源研究・支援センター (CARD) にてマイクロインジェクション法によって作製された。マウスは、熊本大学動物資源開発研究施設 (CARD) 本館および九州大学生体防御医学研究所別館において温度制御された SPF 環境下で飼育された。

Tg マウスは、Rosa-rtTA または K14-rtTA と交配し、2 重トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスを解析に使用した。ドキシサイクリンを含んだ餌 (1g doxy/1kg 餌) を、1、2、3、6、8 週間経口投与し、1 週間ごとに経過観察と体重測定を行った。眼窩静脈叢採血法を用いて採血を行い、全自動血球計数器 Celltac α (日本光電株式会社) を使用し、白血球、赤血球、血小板などの血液成分を測定した。脾臓の重量は、サンプリング時に測定した。

マウス皮膚組織は、OCT コンパウンドに包埋し、組織学的解析や免疫染色に使用した。Tg の発現は、凍結皮膚組織を用いた qRT-PCR、Flag または Myc 抗体を用いた免

疫沈降、レクチンブローブ (SNA, rGal8N, rHeltuba) を用いたレクチンブロットによって確認された。

皮膚組織のホルマリン染色には、5mm×5mm 角に切った尾部皮膚を EDTA (20mM) 溶液中で、37℃ の振盪器で 2 時間反応させた後、ピンセットを用いて表皮と真皮を分離した。分離した表皮シートは、4℃ の 4% PFA で一晩固定した。表皮シートは、1×PBS で洗浄後、0.2% アジ化ナトリウム溶液で冷蔵保存した。ブロッキング溶液 (1% BSA, 2.5% NDS, 2.5% NGS, 0.8% Triton/PBS) でブロッキング処理を 3 時間行った後、1 次抗体で一晩、染色を行った。1 次抗体染色後、0.2% Tween/PBS で 1 時間、4 回の洗浄を室温で行った。2 次抗体の染色は、一晩、4℃ で行った。0.2% Tween/PBS で 1 時間、4 回の洗浄を室温で行い、1×PBS を溶媒にした Hoechst (1:1000) で 1 時間室温にて染色し、蛍光退色防止剤入りの封入剤で封入した。

RNA シークエンス (RNA-seq) 解析のため、マウス皮膚を 0.25% トリプシン/EDTA に 4℃ で一晩、その後 37℃ で 30 分間反応させ、スカルベリによって表皮細胞を真皮から分離した。抗体は CD34-biotin, Streptavidin-APC, α 6-integrin-BUV395, Sca1-BV421 を使用した。FACS Aria フローサイトメーター (BD Biosciences) でコンペンセーションを行った後、表皮の基底細胞集団 (α 6-integrin 陽性, Sca1 陽性, CD34 陰性) を Trizol 中に分取した。単離した表皮幹細胞は、つくば i-Laboratory LLP に提出し、RNA 抽出～シークエンスを行った。得られたデータは、CLC genomics ソフトウェア (Qiagen) を用いて正規化し、PCA 解析を行った。ヒートマップ・クラスター解析

には、Clustvisを用いた。発現が2倍以上変化した遺伝子を対象に、Metascapeを使用して遺伝子オントロジーエンリッチメント (GO) 解析を行った。

2.2. 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定

マウス初代培養ケラチノサイトに、レンチウイルスを用いて3種の糖修飾酵素 (St3gal2、St6gal1、Man1a) を単独または同時に発現させた。糖鎖遺伝子が導入された細胞を、1 μ g/mLの濃度でプラスミドサイジンを用いて選別した。

膜タンパク質を含む疎水性画分は、CelLytic MEMタンパク質抽出キット (Sigma-Aldrich) を用いて製造元のプロトコルに従って単離した。タンパク質濃度は、マイクロBCAアッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を使用して測定した。膜タンパク質は5-20%ゲル (Perfect NT Gel システム) を用いて分離し、ウェットトランスファーシステム (BIO-RAD) を使用してPVDF膜 (Millipore) に転写した。

レクチンブロットに使用するレクチンrGal8N (α -2, 3 シアル酸結合) およびrHeltuba (マンノース結合) は、館野浩章 (産業技術総合研究所) から提供された。レクチンSNA (α -2, 6 シアル酸結合) はSigma-Aldrichから購入した。すべてのレクチンは、HRP標識キット (同仁化学研究所) を使用して標識した。0.1% Tween/Carbo-Freeブロッキング溶液 (Vector Laboratories) でブロッキング後、HRP結合レクチンで室温1時間インキュベートした。シグナルはECL TM Western Blotting Detection Reagentで検出され、Amersham Imager 600 (GE Healthcare) で視覚化された。

レクチン沈降に使用するレクチン (rHeltuba, rGal8N, SNA) は、Biotin Labeling Kit-NH2 (同仁化学研究所) を

用いて製造元のプロトコルに従ってビオチン標識を行った。ビオチン結合レクチンは、Dynabeads M280 ストレプトアビジン (Invitrogen) に固定化され、4度で1時間ダイナビーズとインキュベートした。膜タンパク質を、レクチン結合ダイナビーズとインキュベート後、結合分画を沈降した。レクチン結合が見られたバンドを切り出し、コアタンパク質候補を質量分析 (プロメガ) により同定した。

3. 結果

3.1. 高齢型糖鎖パターンを持つ老化モデルマウスの作出と皮膚表現型解析

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を検討するため、加齢に伴って発現上昇する3種の糖鎖遺伝子 (St3gal2、St6gal1、Man1a) をドキシサイクリン依存的に誘導するTet-ONマウスを新たに作製した (図2)。ドキシサイクリン投与後、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ーン発現とそれに伴う糖鎖変化の誘導を確認した。その結果、St6gal1とMan1a Tgマウスにおいては、mRNA、タンパク質、糖鎖変化が誘導されたが、St3gal2 TgマウスにおいてはmRNAレベルでトランスジーンが発現するものの糖鎖変化が認められなかった。よって、その後の解析は、St6gal1とMan1a Tgマウスに絞って進めることにした。

1~8週間のTg発現誘導後、皮膚および全身性の表現型を調べたところ、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 (St6gal1) を過剰発現するTgマウスにおいて、脱毛や皮膚炎症といった肉眼所見が観察されるとともに、炎症の指標である脾臓重量の増加や炎

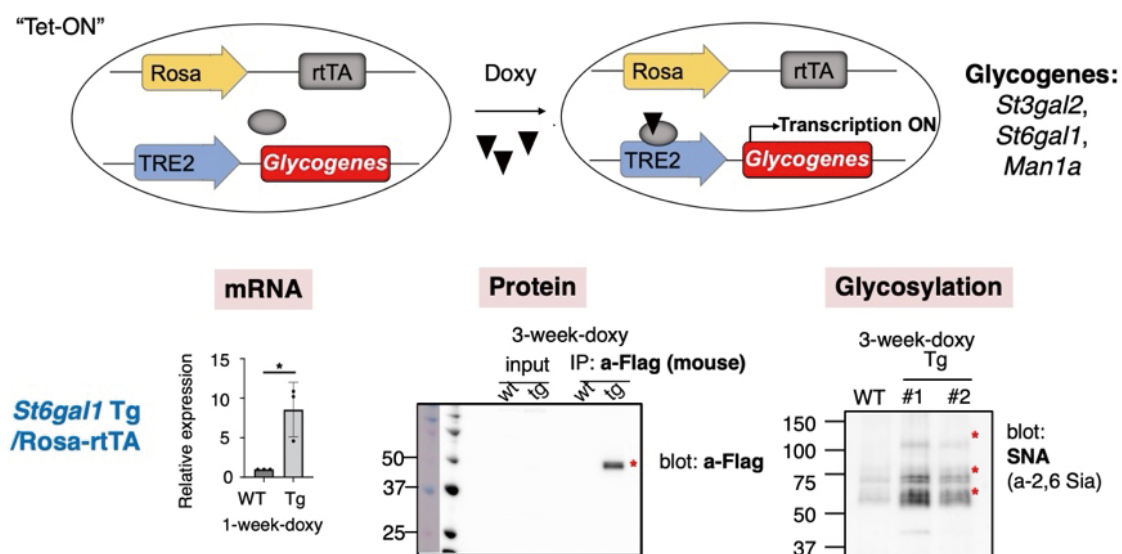


図2 高齢型糖鎖パターンを持つ老化モデルマウスの作出

症性サイトカインの発現上昇が見られた (図3)。さらに、*St6gal1* Tgマウスでは表皮幹細胞の増殖低下や表皮の菲薄化が見られた。一方、*Man1a* Tgマウスにおいては、表皮幹細胞の表現型は現れるものの炎症の所見はほとんど見られず、糖鎖修飾の違いにより影響が異なることが分かった。

St6gal1 Tgマウスにおいて表皮幹細胞の機能低下が誘導される分子メカニズムを探るため、RNA-seq解析を行った。表皮幹細胞は、基底細胞マーカーである $\alpha 6$ -integrin+/CD34-/Sca1+ の集団を単離し、コントロール、

Tgマウス群で比較した。主成分分析を行った結果、コントロール、Tgマウス群が異なるクラスターに区別されることから、*St6gal1* の誘導は表皮幹細胞の遺伝子発現をグローバルに変化させることが分かった (図4)。*St6gal1* 誘導による分子変化の特徴を明らかにするため、発現が2倍以上変化した遺伝子群を用い、GO解析を行った。その結果、*St6gal1* Tgマウス群では、TNF (腫瘍壊死因子) と IFN (インターフェロン) を含む炎症性サイトカインが顕著に上昇しており、炎症様の表現型が分子レベルでも示された。一方、遺伝子発現が2倍以上低下した遺伝子群には、皮膚の

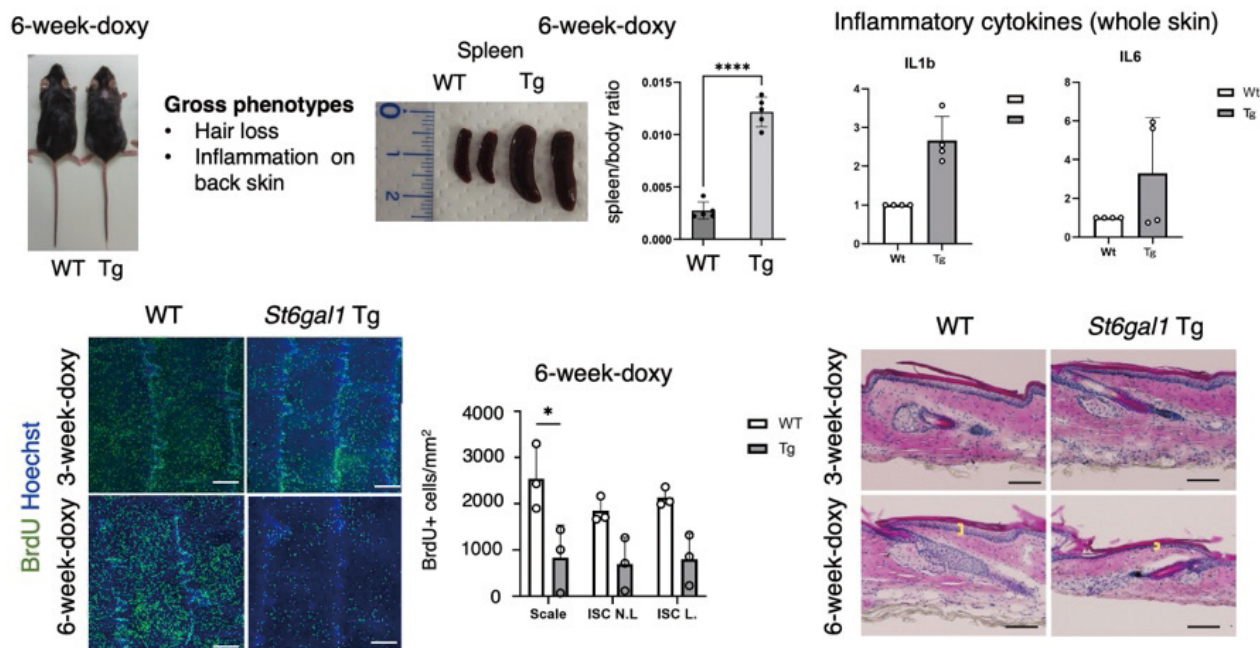


図3 *St6gal1* Tgマウスでは、表皮幹細胞の機能低下および炎症様の表現型が見れる

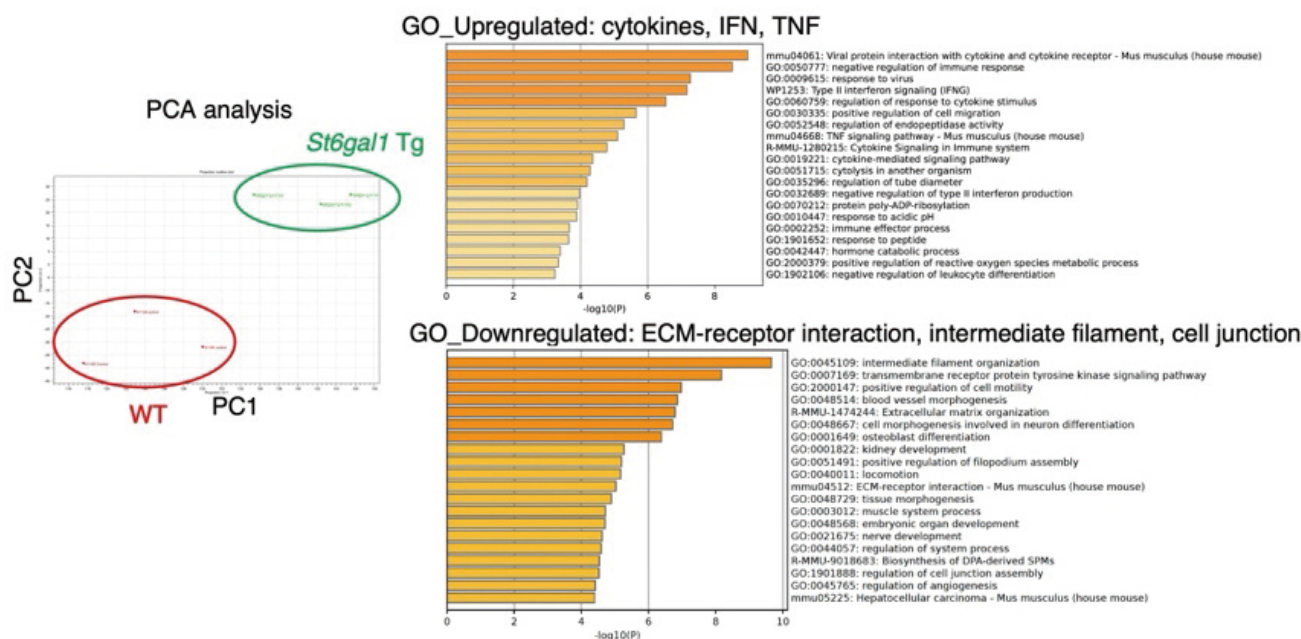


図4 *St6gal1* Tgマウスの表皮幹細胞を用いたトランスクリプトーム解析

発生や細胞接着、細胞外マトリックスに関わる因子が含まれており、表皮幹細胞の機能低下が示唆された。

3.2. 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定

糖鎖修飾の違いが生じるコアタンパク質を同定するため、マウス初代培養ケラチノサイトに、3種の糖鎖遺伝子(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、高齢型の糖鎖パターンを誘導した(図5)。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を用いた免疫沈降・質量分析を行い、コアタンパク質の候補を同定した。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。 α 2-6シアル酸に結合するSNAを用いた免疫沈降・質量分析を行い、コアタンパク質の候補として、N型糖鎖への結合能を持ち、表皮幹細胞制御に働くイ

ンテグリンファミリータンパク質を同定し、現在機能解析を進めている。

4. 総括

本研究では、皮膚老化現象をステムセルバイオロジーの切り口で研究する佐田と、糖鎖科学の分野でレクチンを用いた最先端技術の開発に取り組む館野とが連携することで、世界的に見てもほとんど例がない組織幹細胞の糖鎖解析と老化プロセスにおける生理機能の解明に取り組んだ。In vivoにおいて糖鎖遺伝子を誘導することで糖鎖改変モデルマウスを作成し、細胞・分子レベルでの変化の一端を解明した(図6)。

申請者の先行研究で、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)の発現上昇が見られた。この結果と一致して、老化したマウスの筋肉ではシアル酸の亢進が観察される³⁾。シアル酸転移酵素の増

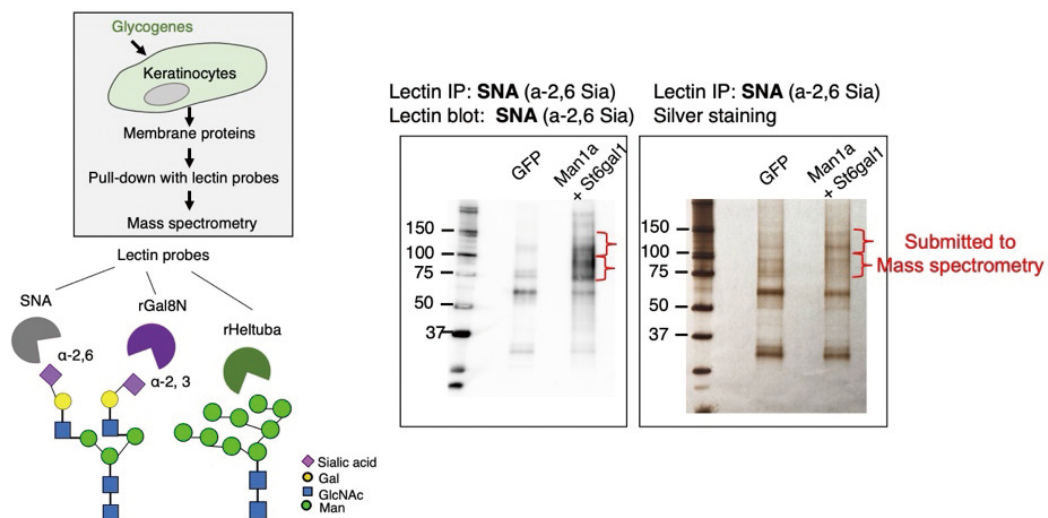


図5 糖鎖修飾を受けるコアタンパク質の同定と生化学的特性の解明

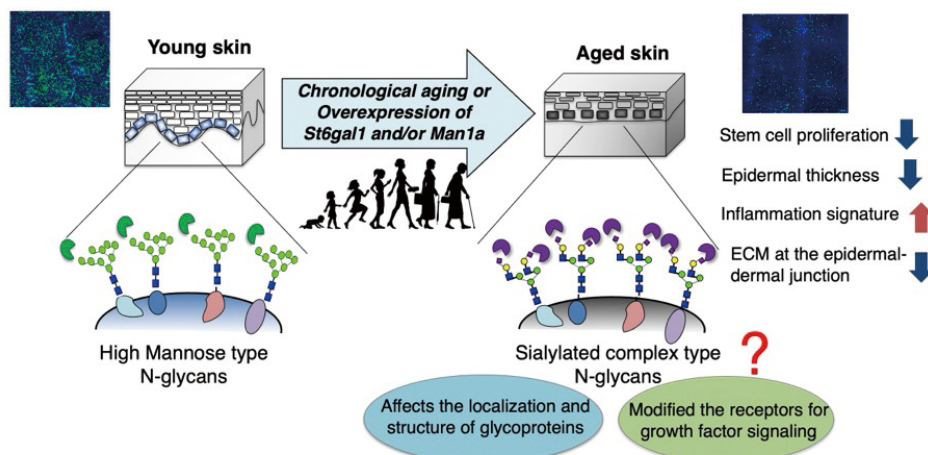


図6 総括

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⁴⁾。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細胞の間の相互作用が損なわれていることが一因である⁵⁾。樹状細胞を含むいくつかの免疫細胞はマンノース結合受容体を持っていることから、老化した皮膚における幹細胞と免疫細胞の相互作用と関連している可能性が考えられた。

糖鎖は、DNA、タンパク質に次ぐ「第3の生命鎖」として、老化や疾患の新たなターゲットとして期待されている。血液型や腫瘍マーカーをはじめ、糖鎖の違いは優れたバイオマーカーとして幅広く利用されてきた。近年、複雑な糖鎖構造をハイスループットで解析する技術の発展に伴い、ゲノム、遺伝子の発現情報と合わせ、より包括的にタンパク質の糖鎖修飾状態を捉えることが可能となった。糖鎖をツールとして、皮膚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へとつながることが期待される。

(引用文献)

- 1) Dabelsteen S et al. Essential Functions of Glycans in Human Epithelia Dissected by a CRISPR-Cas9-Engineered Human Organotypic Skin Model. *Dev Cell*. 2020; 54 (5): 669-684. e7.
- 2) Oinam L et al. Glycome profiling by lectin microarray reveals dynamic glycan alterations during epidermal stem cell aging. *Aging Cell*. 2020; 19 (8): e13190.
- 3) Hanisch F et al. Sialylation and muscle performance: sialic acid is a marker of muscle ageing. *PLoS One*. 2013; 8 (12): e80520.
- 4) Catera M et al. Identification of novel plasma glycosylation-associated markers of aging. *Oncotarget*. 2016; 7 (7): 7455-7468.
- 5) Keyes BE et al. Impaired Epidermal to Dendritic T Cell Signaling Slows Wound Repair in Aged Skin. *Cell*. 2016; 167 (5): 1323-1338. e14.