

皮膚幹細胞の糖鎖を標的とした 新たな老化制御へ向けて

九州大学 生体防御医学研究所

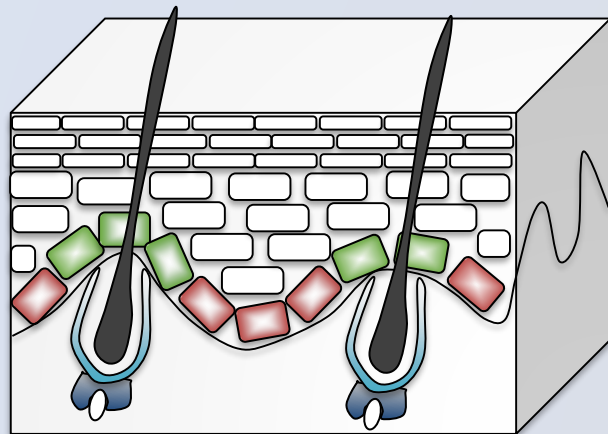
熊本大学 国際先端医学研究機構 (IRCMS)

佐田 亜衣子



Tissue homeostasis

若齢皮膚



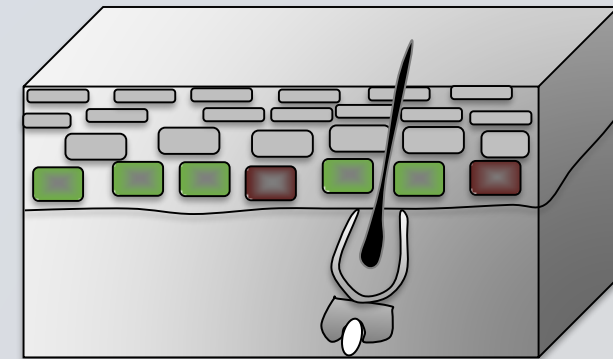
再生能・回復力
(レジリエンス)高い



加齢に伴う
幹細胞の機能低下
(ステムセルエイジング)

Aging

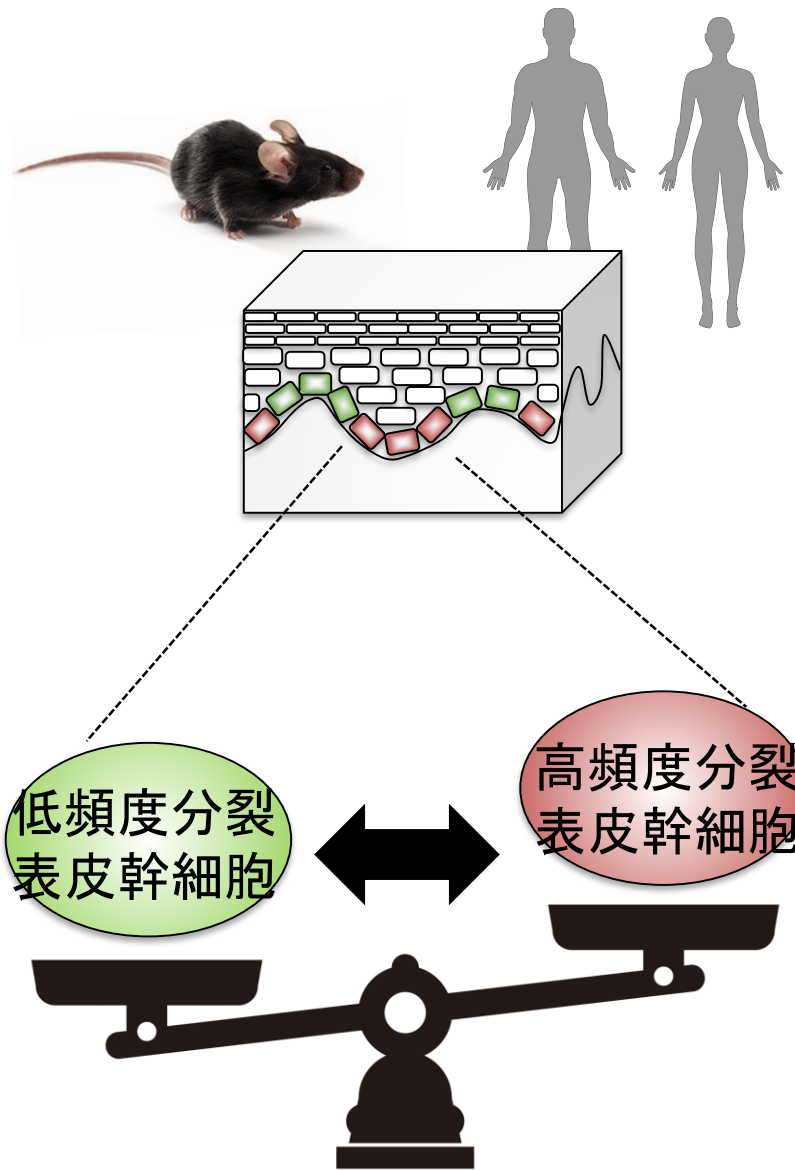
高齢皮膚



再生能・回復力
(レジリエンス)低い

創傷治癒の遅延
バリア機能の低下
DNA損傷の蓄積

皮膚レジリエンスの維持と破綻を制御する幹細胞微小環境



皮膚レジリエンスの維持と破綻

環境因子

炎症、加齢、損傷
ニッチシグナル

微小環境

細胞外マトリクス
膜タンパク質 (糖鎖)

幹細胞
内因性因子

エピゲノム

代謝

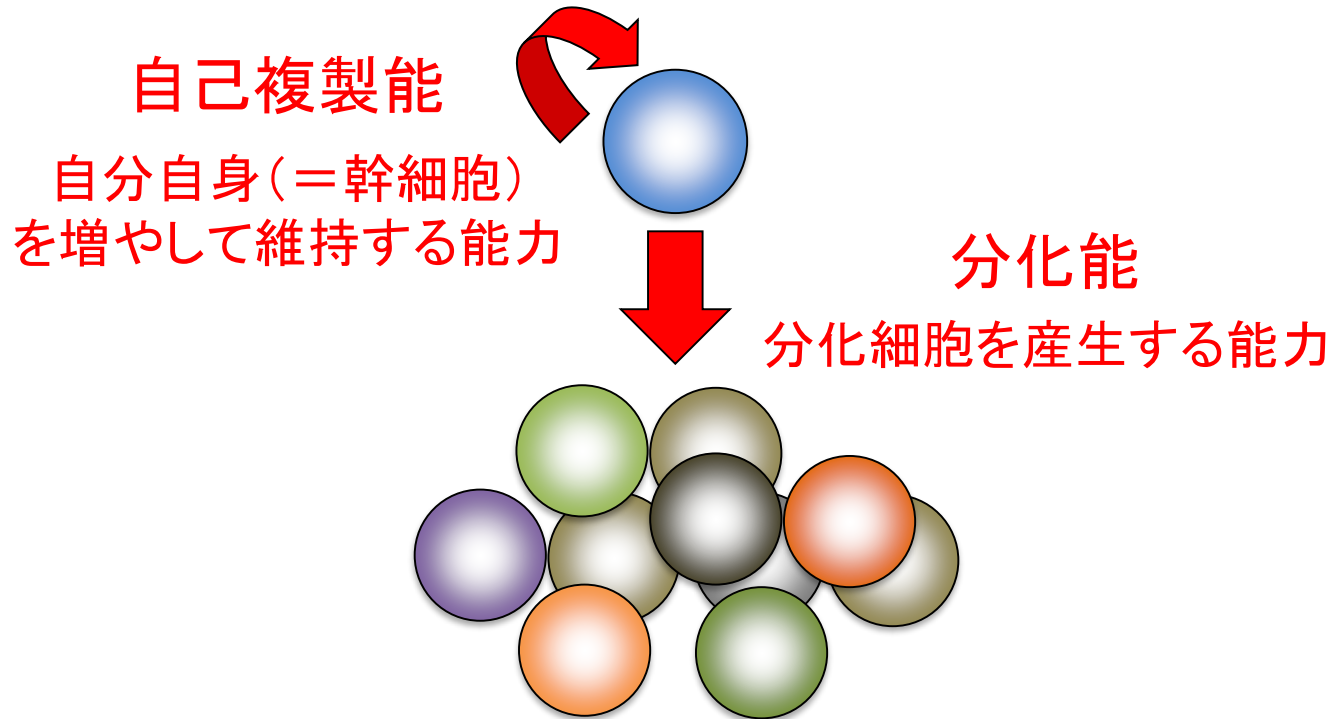
転写ネットワーク

個々の幹細胞運命やアイデンティティ
幹細胞集団の変遷

講義の概要

- ✓ • ステムセルバイオロジーの概論と最近の研究の動向について
- 糖鎖プロファイリング技術を利用した表皮幹細胞老化バイオマーカーの同定
- 糖鎖異常に起因する幹細胞老化プロセスの理解と制御

幹細胞 (Stem Cell)



多能性幹細胞 (pluripotent stem cell)

三胚葉のすべての細胞に分化することができる能力をもつ幹細胞

例) ES細胞、iPS細胞

iPS細胞は、大人の細胞(自分の細胞)からリプログラミングによってつくられる=倫理的問題を回避、免疫拒絶反応が起こりにくい。

組織幹細胞 (Tissue stem cell)

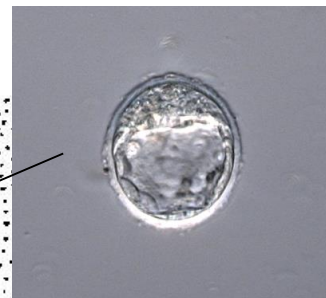
成体組織の全ての細胞を作り出す大元の細胞で、恒常性(homeostasis)の維持や臓器の再生にはたらく。

例) 骨髄移植による白血病治療、皮膚移植医療など。

幹細胞の種類

発生 リプログラミング
(初期化)

受精卵



ES細胞

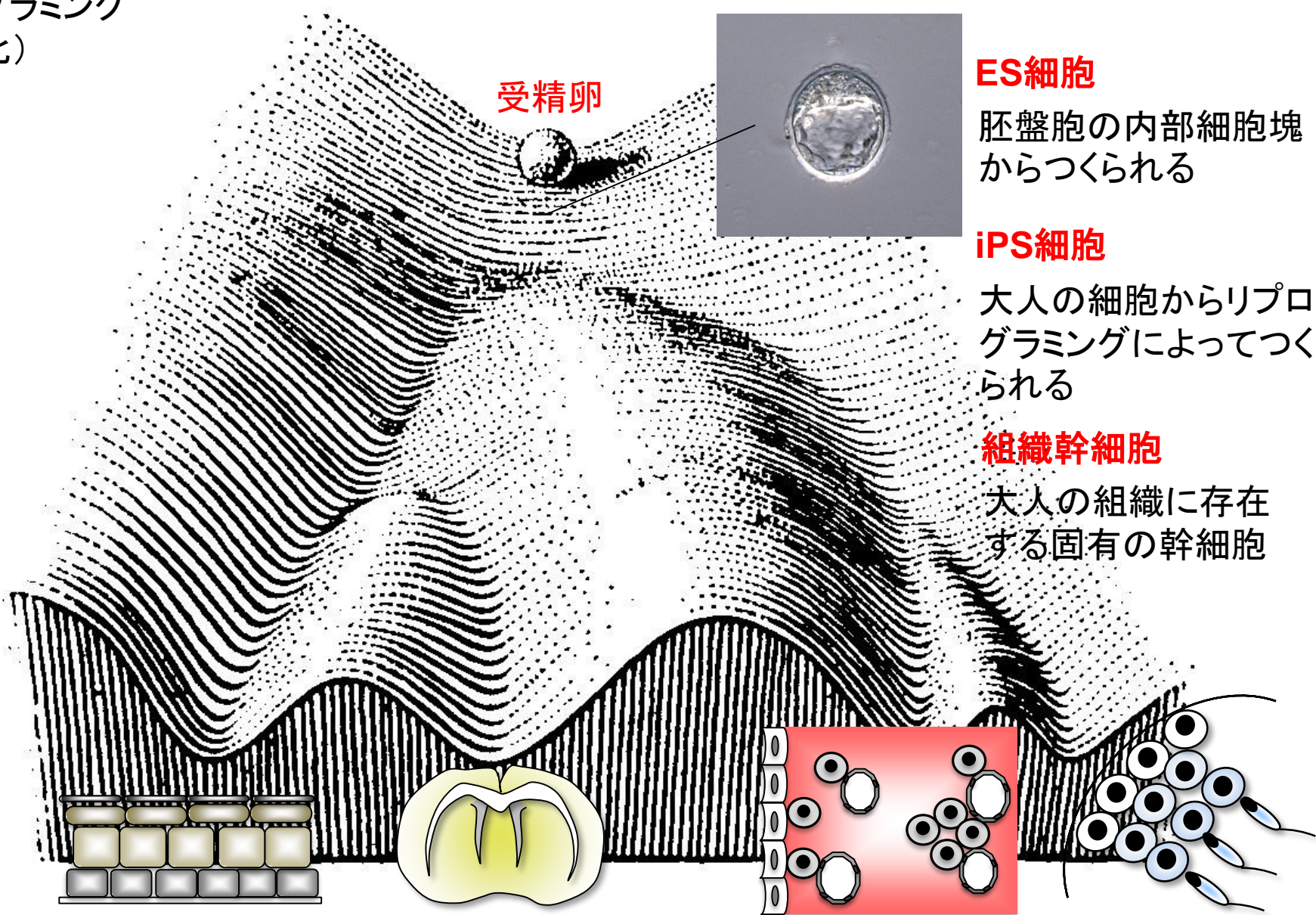
胚盤胞の内部細胞塊
からつくられる

iPS細胞

大人の細胞からリプロ
グラミングによってつく
られる

組織幹細胞

大人の組織に存在
する固有の幹細胞



皮膚

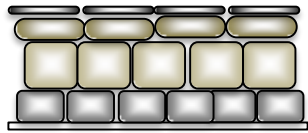
脳

血液

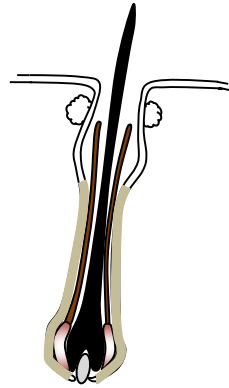
精巣

組織幹細胞の局在

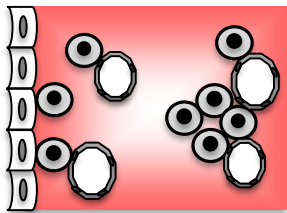
活発にターンオーバーする組織
＝幹細胞が必要



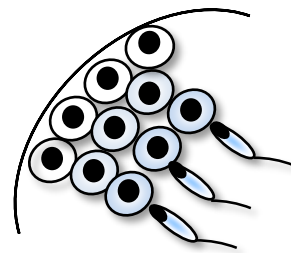
表皮



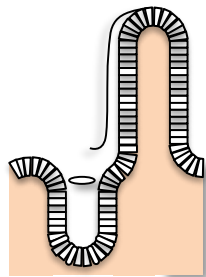
毛包



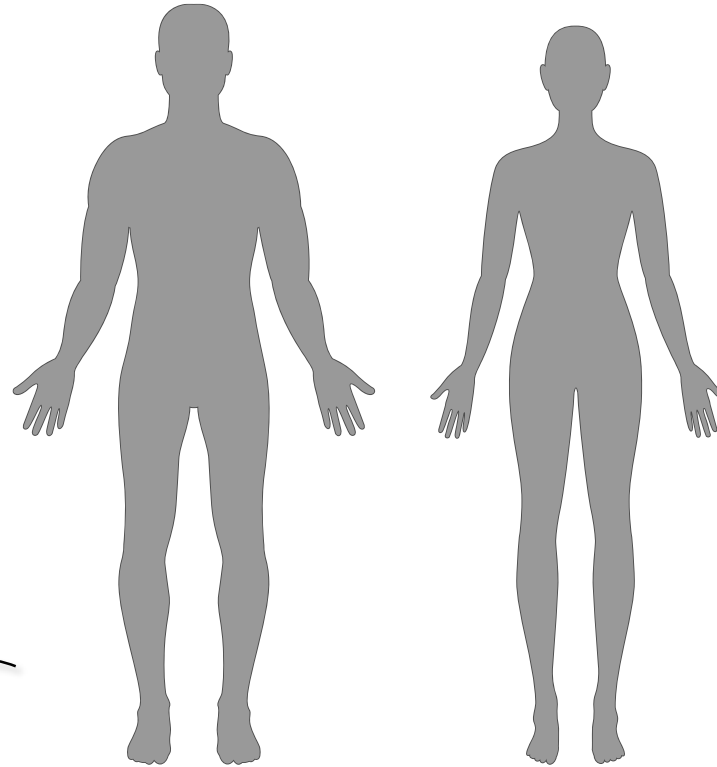
骨髄



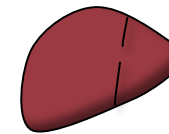
精巣



小腸



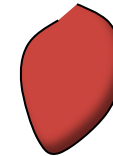
成体では基本的にターンオーバー
しない組織



肝臓



脳



心臓



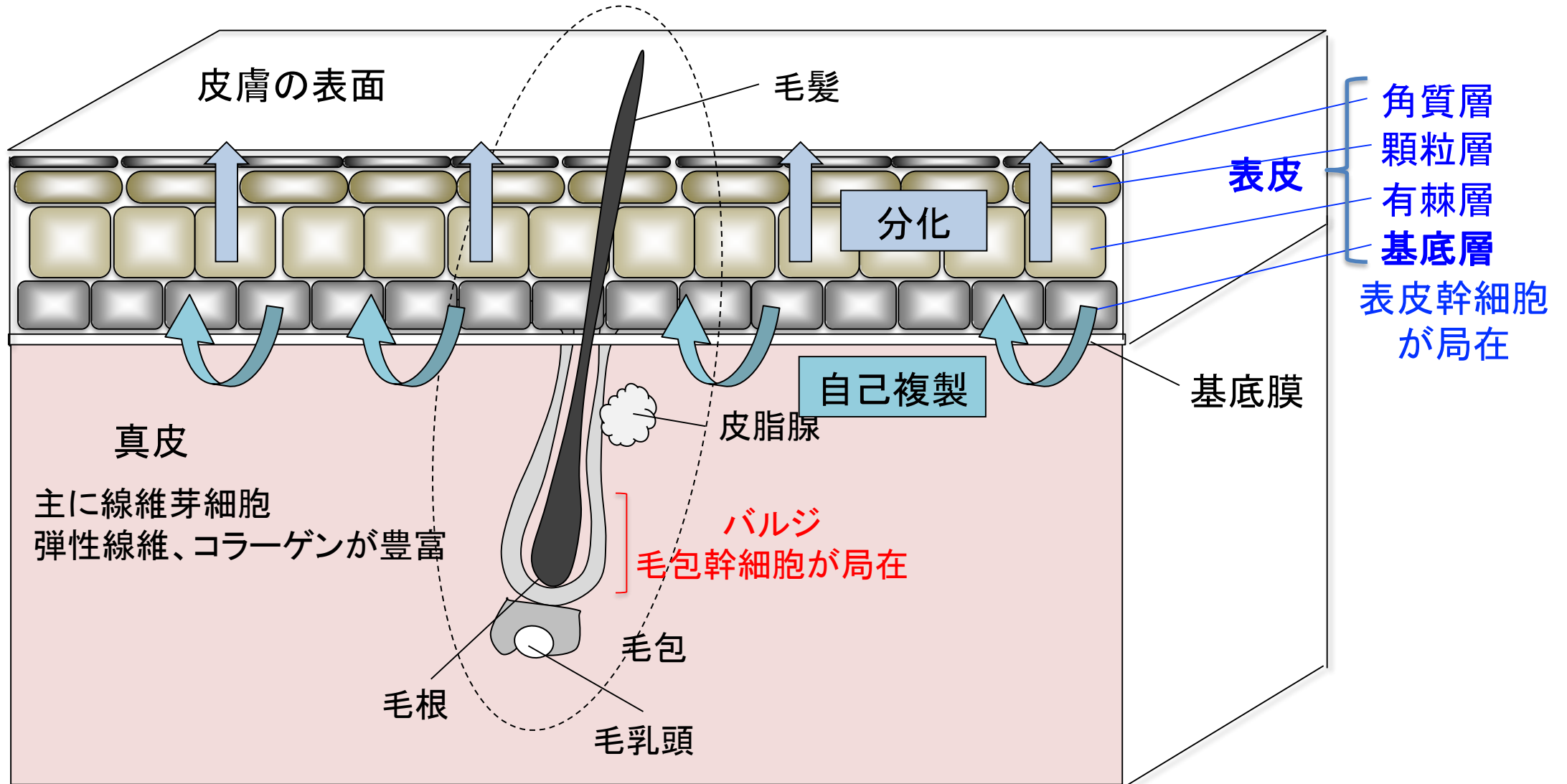
血管

少数の細胞は幹細胞能力を持つ？
損傷時には幹細胞が活発化？

なぜ組織幹細胞に着目するのか？

- 再生医療の細胞ソースとしての有用性
- 幹細胞の視点からがん、疾患、老化を理解する

皮膚の構造と幹細胞



皮膚の高い再生能力やバリア機能を支える表皮幹細胞
～近年では、ゲノム編集を行った表皮幹細胞を用いた治療も成功～

ARTICLE

doi:10.1038/nature24487

Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells

Tobias Hirsch^{1*}, Tobias Rothoeft^{2*}, Norbert Teig^{2*}, Johann W. Bauer^{3*}, Graziella Pellegrini^{4,5*}, Laura De Rosa^{5*}, Davide Scaglione⁶, Julia Reichelt³, Alfred Klausegger³, Daniela Kneisz³, Oriana Romano⁷, Alessia Secone Seconetti⁵, Roberta Contin⁵, Elena Enzo⁵, Irena Jurman⁸, Sonia Carulli⁹, Frank Jacobsen¹, Thomas Luecke¹⁰, Marcus Lehnhardt¹, Meike Fischer², Maximilian Kueckelhaus¹, Daniela Quaglino⁷, Michele Morgante⁸, Silvio Bicciato⁷, Sergio Bondanza⁹ & Michele De Luca⁵

Hirsch et al., *Nature* 2017

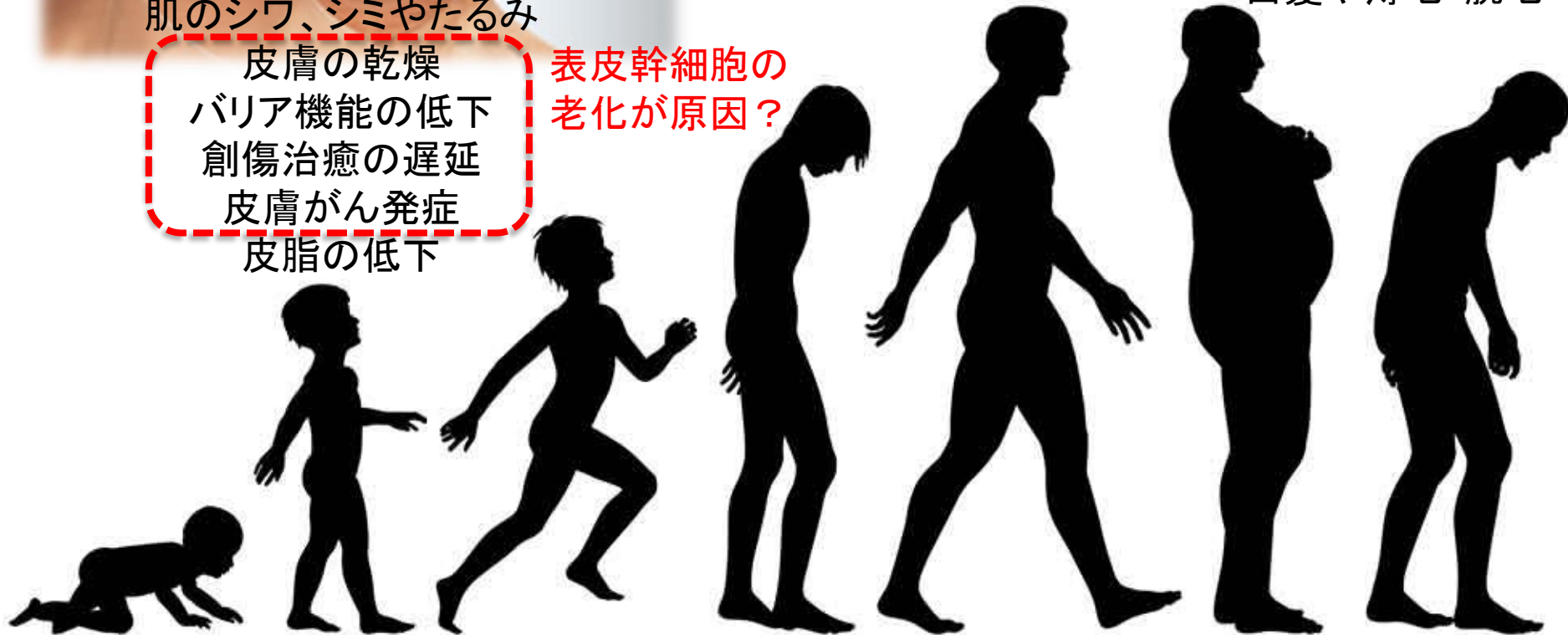
加齢に伴う皮膚の変化と、組織幹細胞の機能低下(ステムセルエイジング)



肌のシワ、シミやたるみ
皮膚の乾燥
バリア機能の低下
創傷治癒の遅延
皮膚がん発症
皮脂の低下

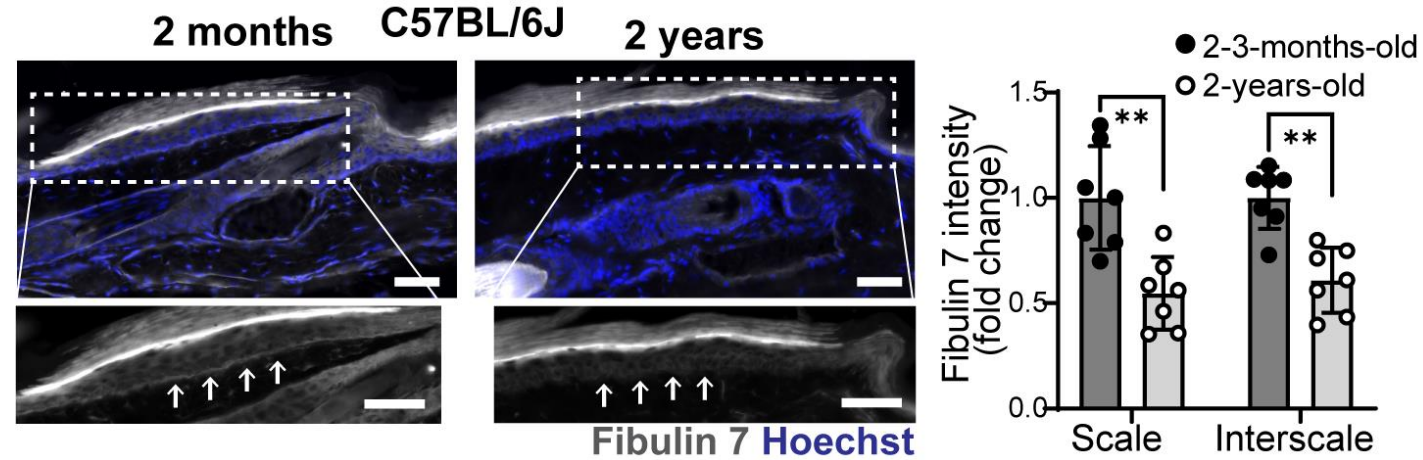
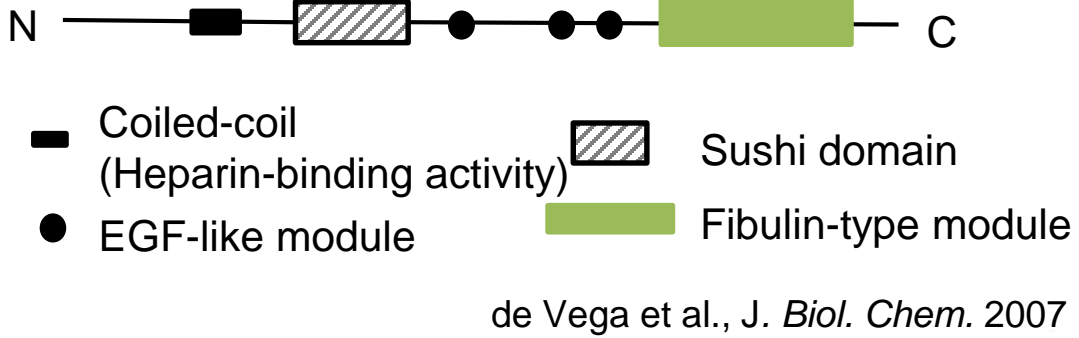
表皮幹細胞の
老化が原因？

白髪や薄毛・脱毛

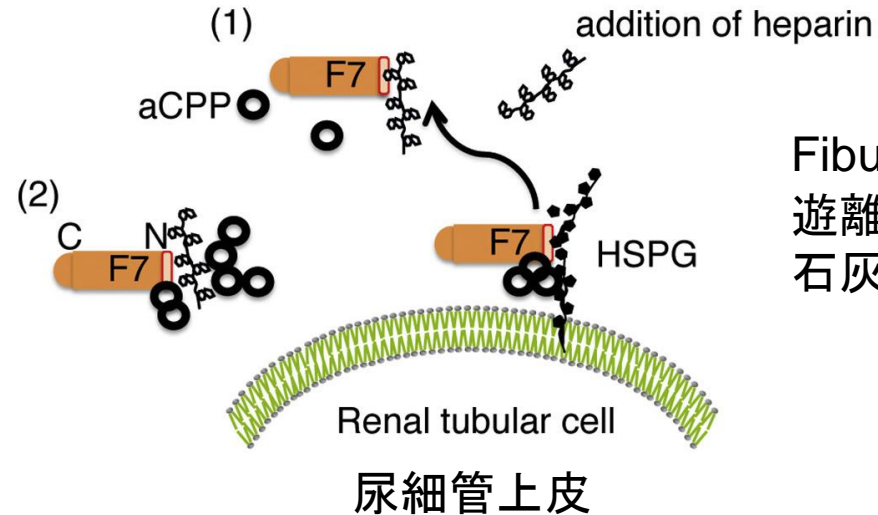
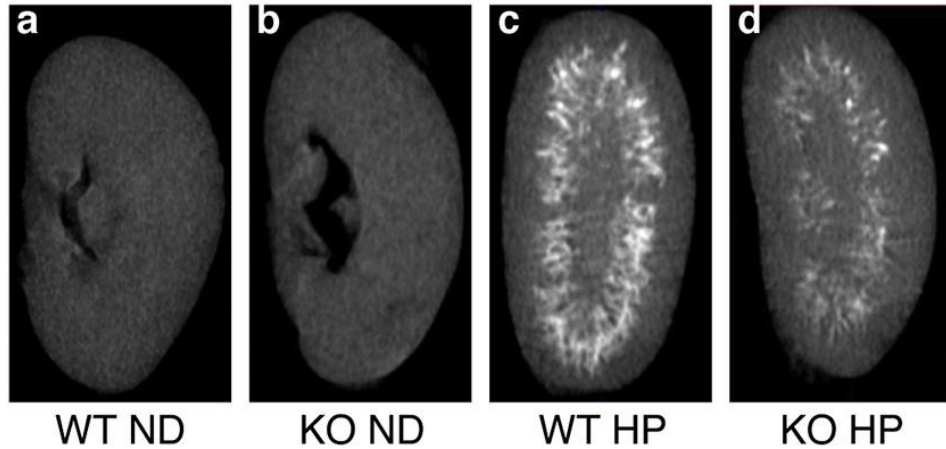


表皮幹細胞の老化、抗老化を制御する分子メカニズムは？ 細胞外マトリクスfibulin-7の機能解析

Fibulin-7 protein



異所性石灰化↓ in *Fbln7* KO



Fibulin-7を細胞表面から遊離させることで、異所性石灰化を予防

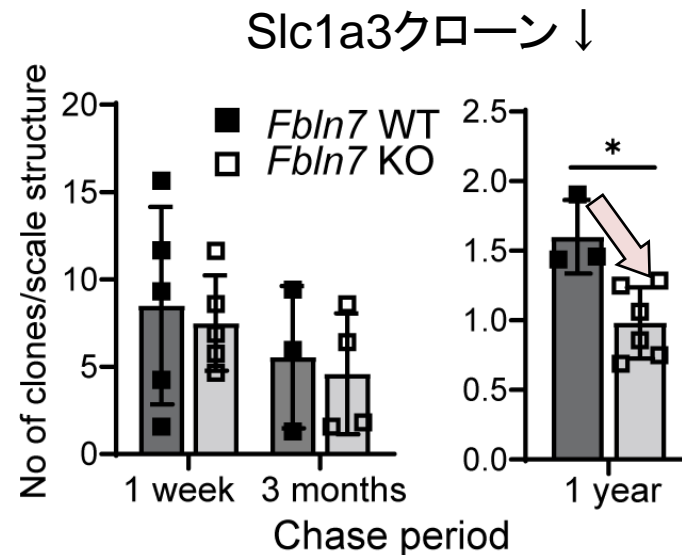
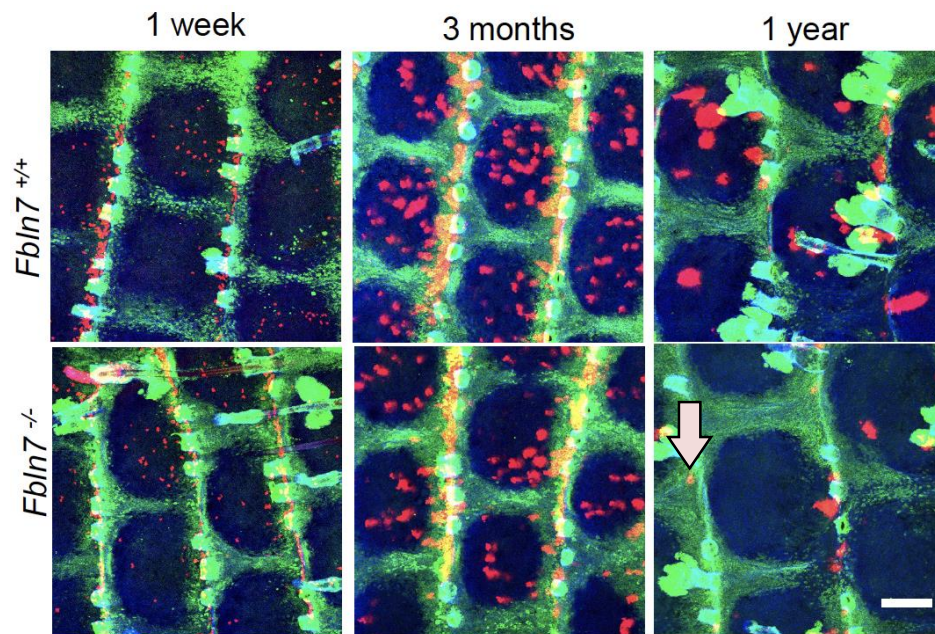
HP: phosphate diet

HSPG: heparan sulfate proteoglycan (ヘパラン硫酸プロテオグリカン)

aCPP: artificial calcium phosphate particles (人工リン酸カルシウム粒子)

Fbln7 KOマウスでは、表皮幹細胞クローンが早期に失われ、創傷治癒が遅延する

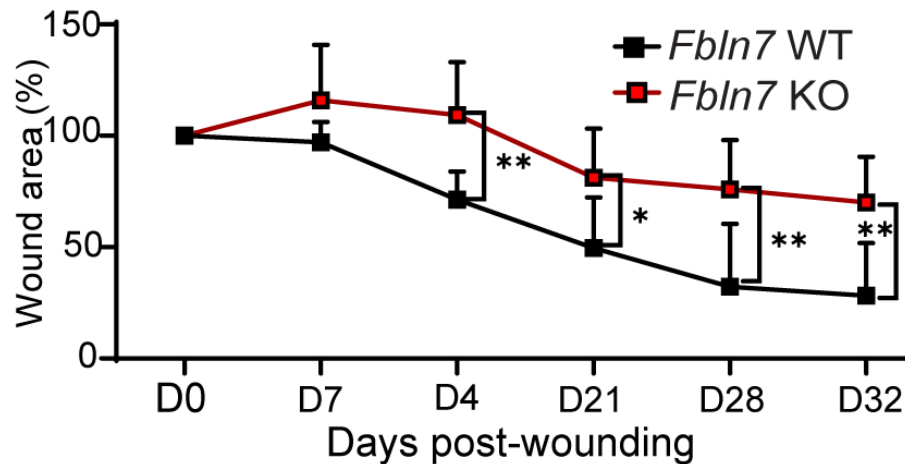
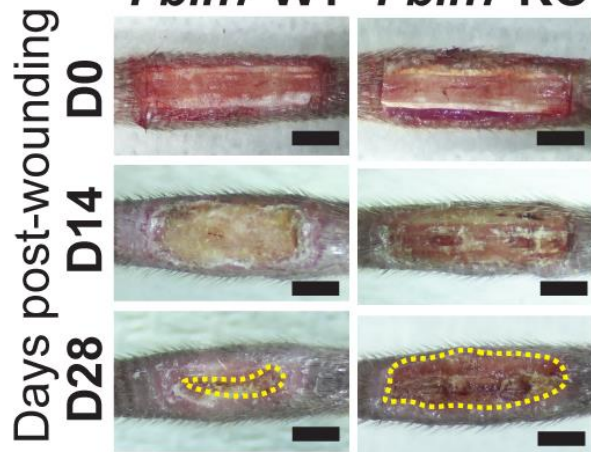
Slc1a3-CreERの細胞系譜解析



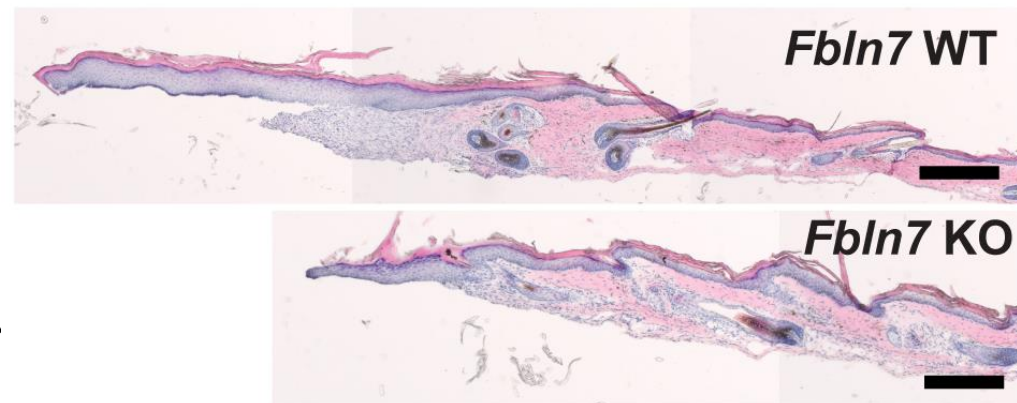
創傷治癒アッセイ

1-year-old

Fbln7 WT *Fbln7* KO

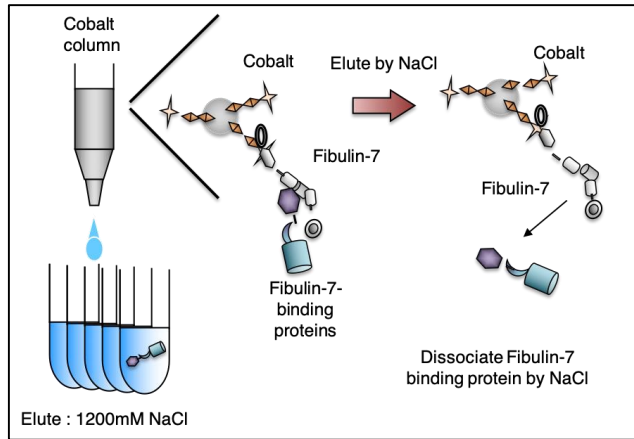


Wound front



Fibulin-7は、基底膜構造や創傷治癒、炎症に関わる他のECM分子と相互作用する

Metal ion affinity chromatography

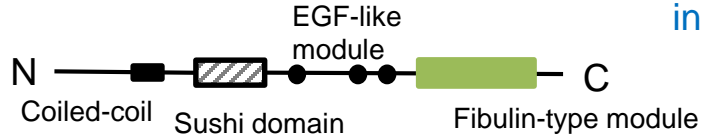


Mass spectrometry

Protein-protein interactions by Solid phase binding assay (ELISA)

Fibulin-7 protein

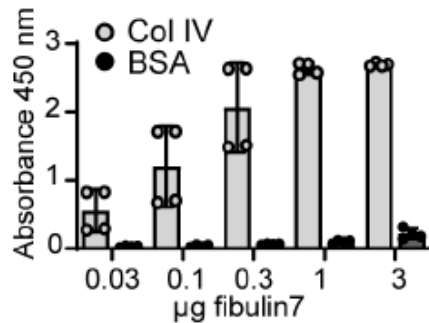
Tethering growth factors?



ECM structural integrity to suppress differentiation
Integrin binding

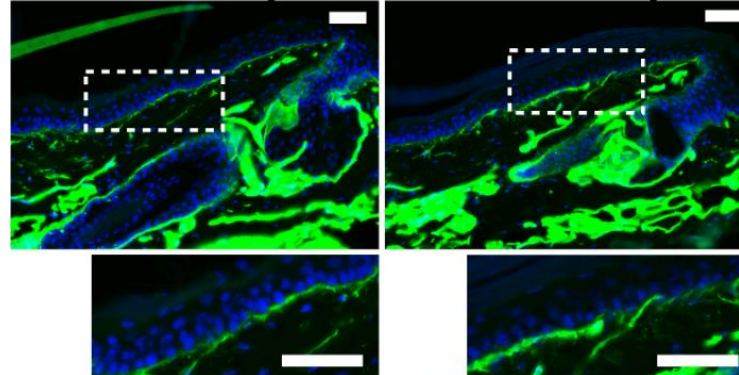
fibulin 7 - binding proteins

	Collagen-related	growth factors signaling	basement membrane	ECM/matricellular proteins	proteases
Full Length fibulin 7	COL3A1 LOXL3 PLOD1 PLOD3	granulins neuropilin-1 semaphorin-3E semaphorin-3C semaphorin-3A semaphorin-3B HGF	BM-HSPC LAMA5 LAMC1 nidogen-1 LAMB-2	fibronectin periostin netrin-4 CCDC80 THBS3 emilin-1	cathepsin Z legumain BMP1
Proliferation & differentiation					
delta CC fibulin 7	COL2A1 COL4A2 COL5A2 COL14A1	neuropilin-2 IGF2BP1 IGFBP-2 SLIT2 FSTL1	fibulin 1	clusterin SMOC1 APP CILP2 fibrillin-2 cochlin tenascin C	PLAT aminopeptidase B BMP1 dermcidin
Differentiation					



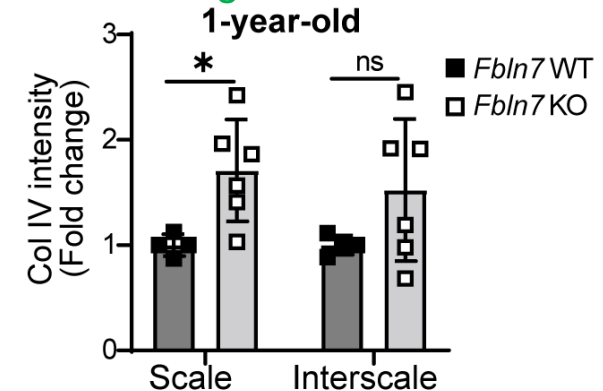
Fbln7 WT, 1 year

Fbln7 KO, 1 year

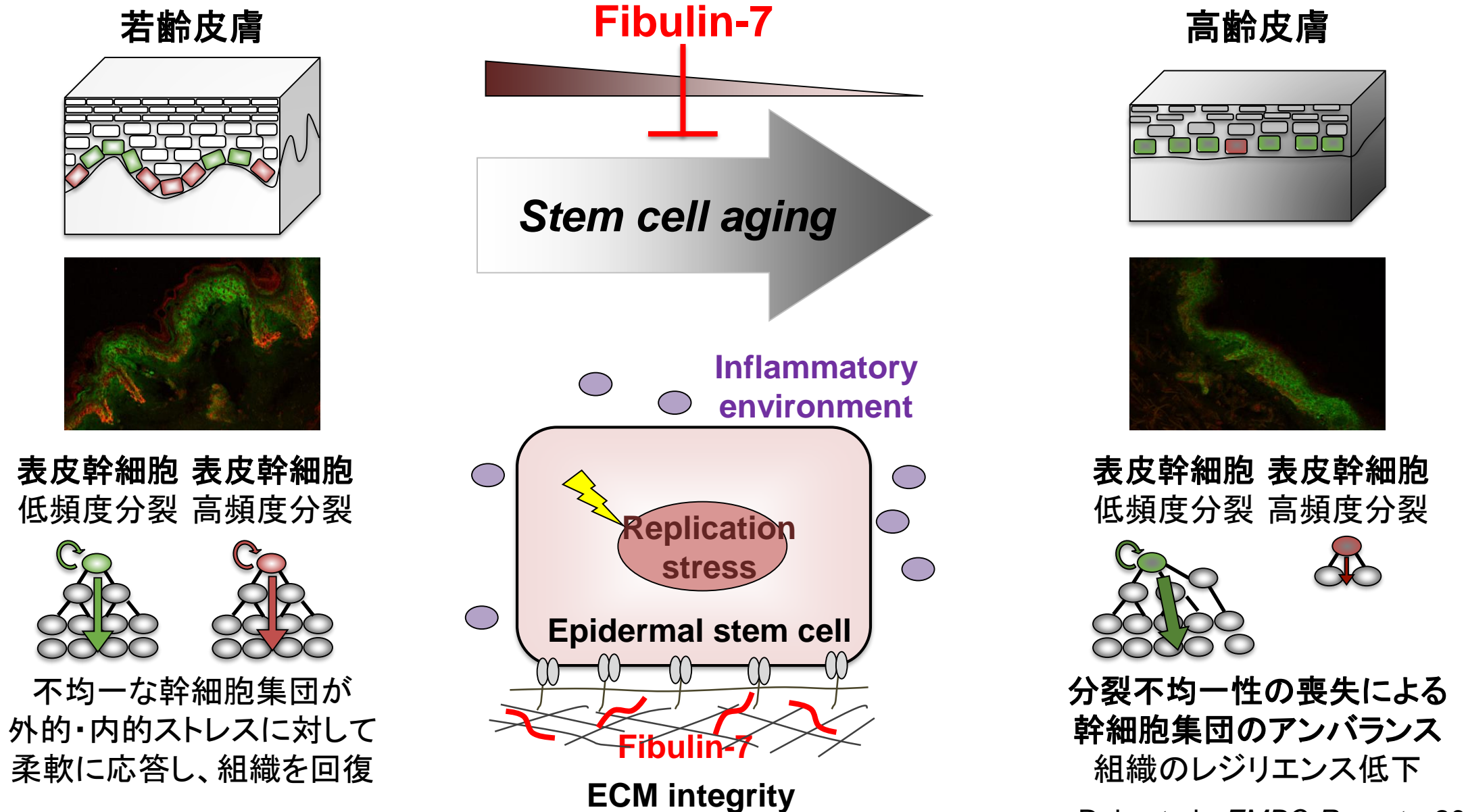


collagen IV Hoechst

collagen IV 染色



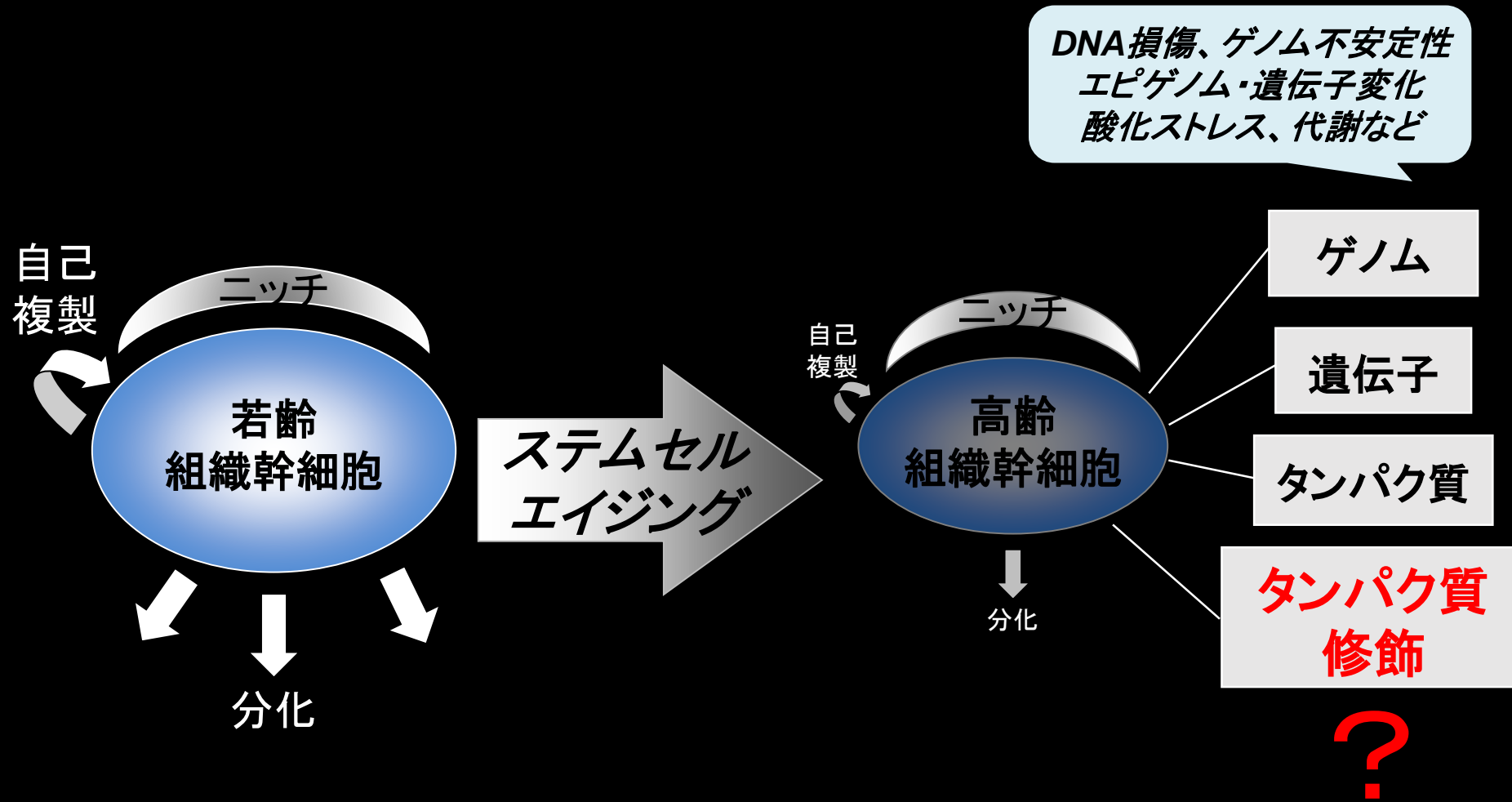
Fibulin-7は、ECMのintegrityを制御し、表皮幹細胞を炎症ストレスから保護することで表皮幹細胞集団のバランス維持にはたらく



講義の概要

- ステムセルバイオロジーの概論と最近の研究の動向について
- ✓ • 糖鎖プロファイリング技術を利用した表皮幹細胞老化バイオマーカーの同定
- 糖鎖異常に起因する幹細胞老化プロセスの理解と制御

ステムセルエイジング: 加齢に伴う組織幹細胞の機能低下



老化制御の標的としての糖鎖

タンパク質の構造
安定性、局在制御

Moremen et al., *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012

細胞間コミュニケーション
シグナル伝達、ECMとの接着

Zhao et al., *Cancer Sci.* 2008

ニッチ

自己複製

組織幹細胞

発生
幹細胞制御

糖鎖
Glycan

がんや疾患

Ohtsubo & Marth, *Cell.* 2006

分化

Haltiwanger et al., *Annu Rev Biochem.* 2004
Nishihara, *FEBS Letters.* 2018

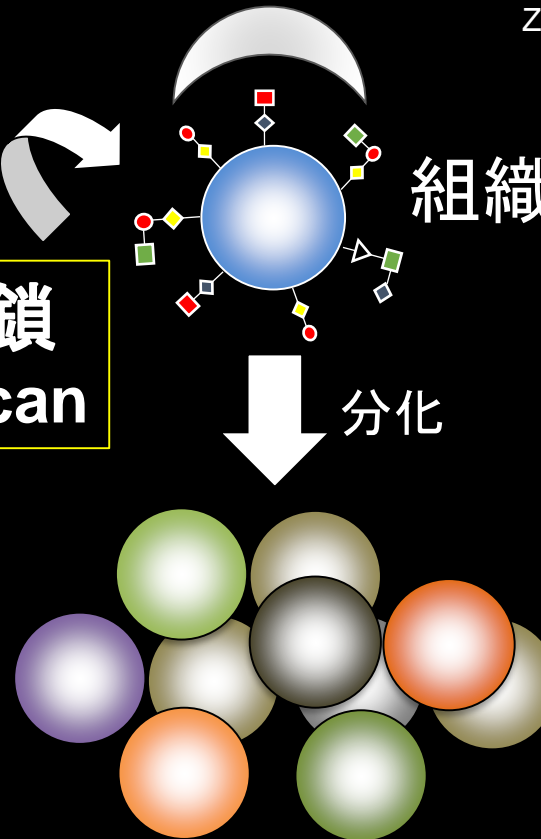
バイオマーカー

Adewumi et al., *Nat Biotechnol.* 2007
Hasehira et al., *Mol Cell Proteomics,* 2012
Tateno et al., *J Biol Chem,* 2011

老化

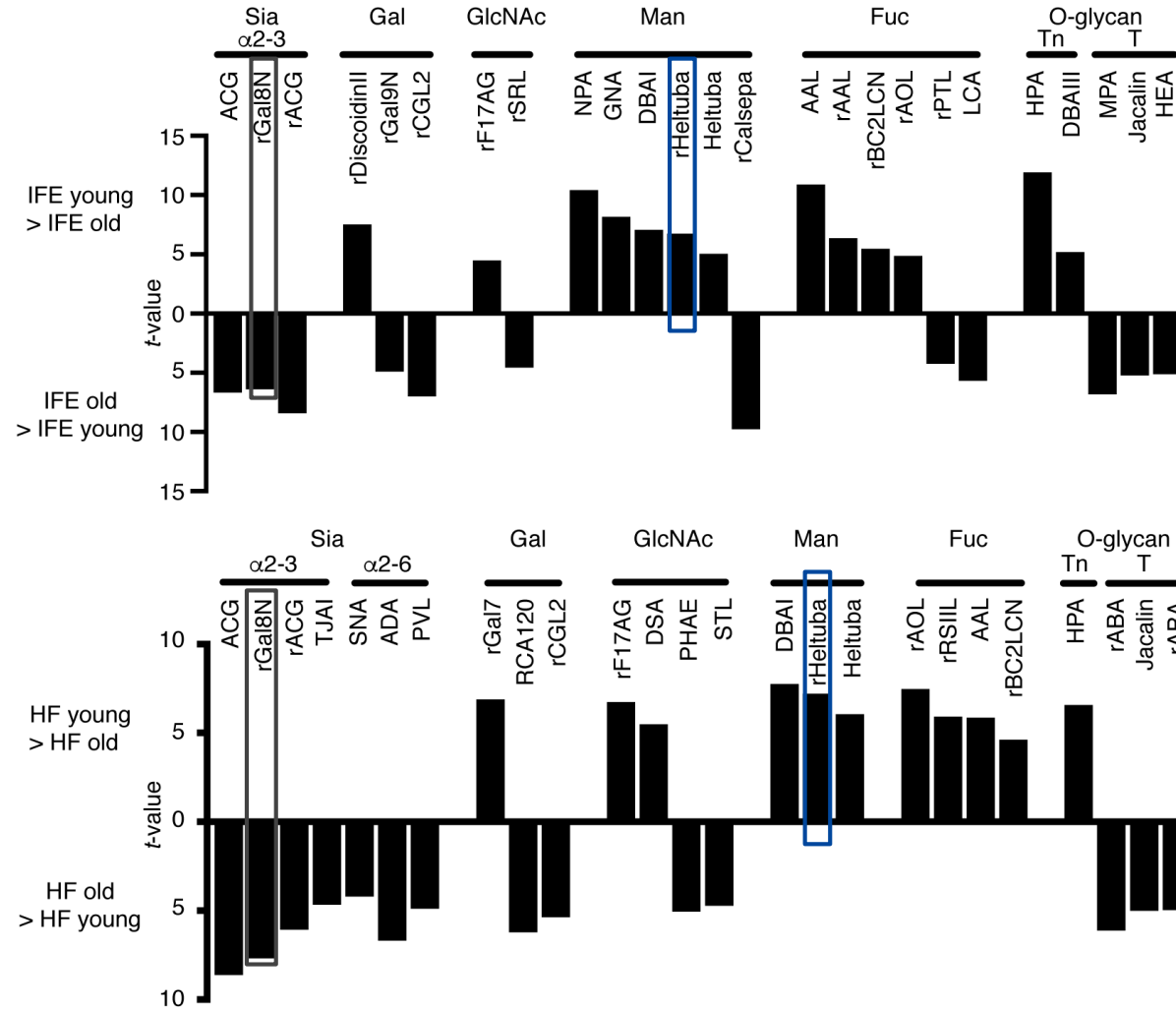
Cindrić et al., *Adv Exp Med Biol.* 2021
Paton et al., *Int Mol Sci.* 2021

組織幹細胞における糖鎖の
加齢変化は不明であった。



若齢・高齡の表皮幹細胞の糖鎖パターンを認識するレクチンプローブの同定

Glycome shift: High mannose type -> Complex type



若齢で高い

rHeltubaレクチン
マンノースに結合

高齡で高い

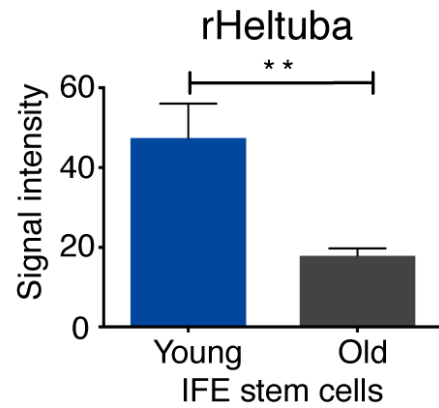
rGal8Nレクチン
α2-3シアル酸に結合

若齢・高齢の表皮幹細胞の糖鎖パターンを認識するレクチンプローブの同定

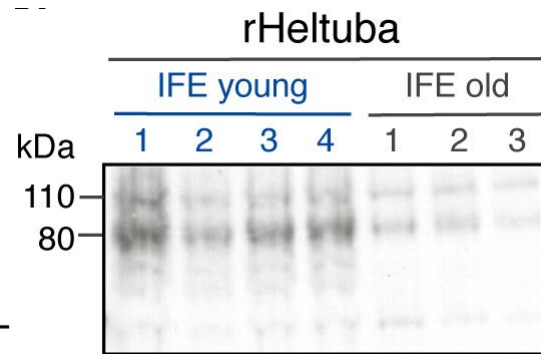
若齢で高い

rHeltuba: マンノースに結合

Lectin microarray

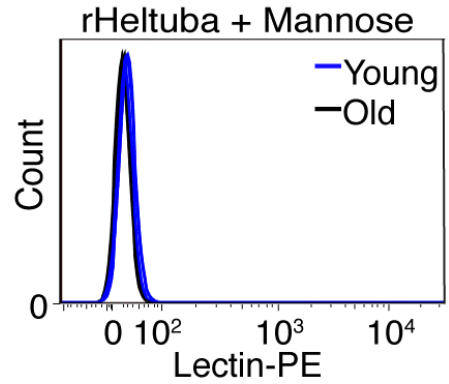
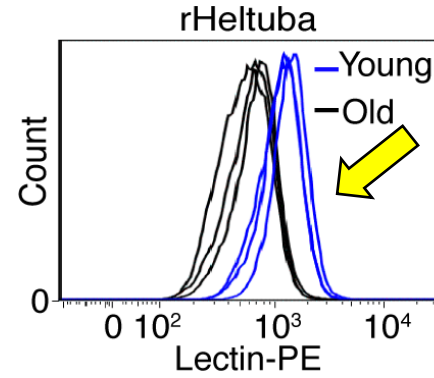


Lectin blotting



Lectin FACS

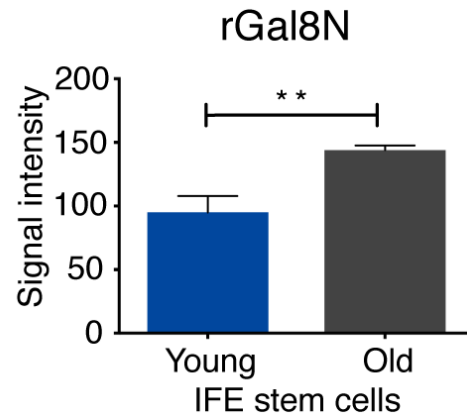
IFE stem cells



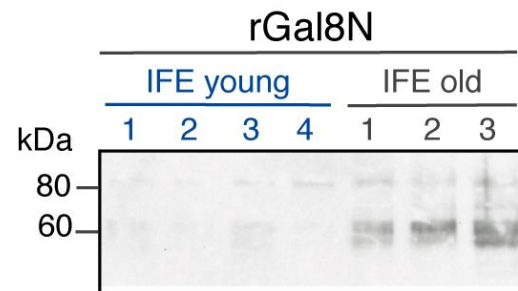
高齢で高い

rGal8N: α 2-3シアル酸に結合

Lectin microarray

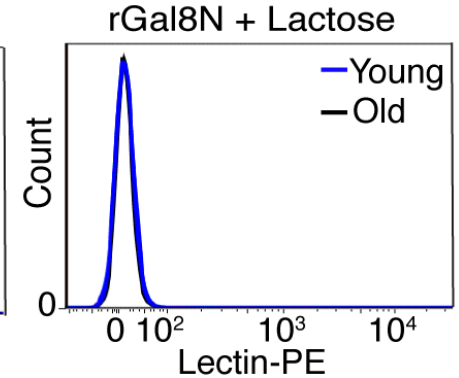
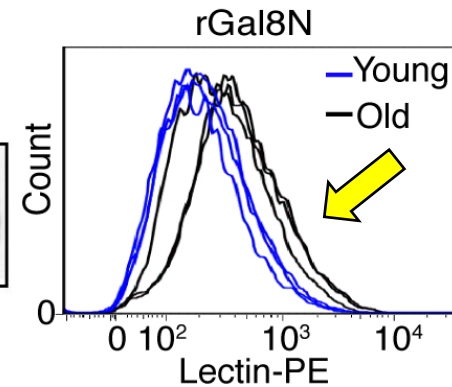


Lectin blotting

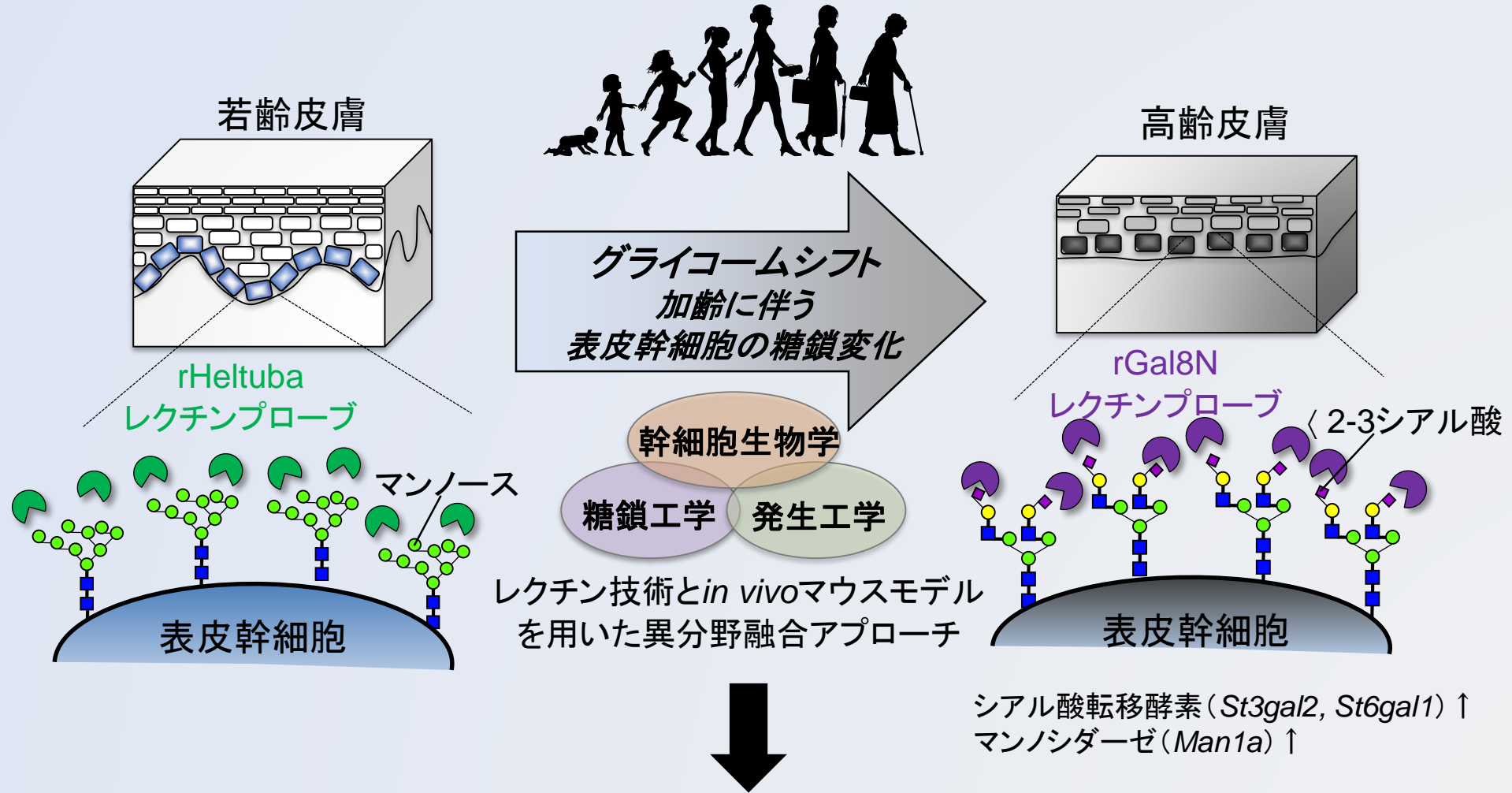


Lectin FACS

IFE stem cells



本研究の全体構想



生体内における糖鎖の役割と制御メカニズムを理解し
糖鎖を標的とした老化診断・制御法の開発に向けた基盤を創出