

令和 5 年 10 月 24 日現在

機関番号：32690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06139

研究課題名(和文) シグナル受容体の不均一な細胞膜局在が決めるES細胞の新規分化方向決定機構の解明

研究課題名(英文) Determining differentiation from ES cells by localization of signal receptors on the cell membrane

研究代表者

西原 祥子(Nishihara, Shoko)

創価大学・糖鎖生命システム融合研究所・教授

研究者番号：00164575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マウスES細胞は多能性幹細胞であり、分化の引き金が引かれると、エピブラスト、あるいは、原始内胚葉へと分化する。一方、シグナル受容体は、細胞膜上で不均一な分布、すなわち脂質ラフトに選択的に局在し、その局在がシグナル伝達に必須なことが、我々を含む研究から明らかにされてきた。本研究では、マウスES細胞における脂質ラフトを構成する糖脂質に注目し、マウスES細胞における組成とエピブラスト幹細胞への分化による変化を明らかにした。また、この変化を担う糖転移酵素をトータルに制御する新たな機構も見出した。これらの結果から、糖脂質の変化が、未分化性からの脱却と分化の決定に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の遂行の過程で、マウスES細胞の分化における、糖脂質をはじめとする細胞表面の糖鎖構造をトータルに制御する機構が初めて明らかになり、糖脂質を含む糖鎖の変化がES細胞からの分化に統一して関与している可能性が見出された。糖脂質や糖タンパク質上の糖鎖構造が一緒に制御を受けていることを示した例は、これまでになく、学術的な意義も大きい。また、様々な分化細胞をES細胞から作製する再生医療への応用の基盤形成にも寄与する。

研究成果の概要(英文)：Mouse ES cells are pluripotent stem cells; they differentiate into epiblast or primitive endoderm when the differentiation is triggered. On the other hand, studies including us have revealed that signal receptors are selectively localized in lipid rafts on the cell membrane, and that localization is essential for signal transduction. In this study, we focused on the glycolipids that constitute lipid rafts in mouse ES cells and analyzed changes in their composition during differentiation of mouse ES cells into epiblast stem cells. Then, we found a novel mechanism that totally controls the glycosyltransferases responsible for these changes. These results suggest that glycolipid changes may be involved in the exit from undifferentiation state and the decision to differentiate.

研究分野：糖鎖生物学、幹細胞生物学

キーワード：糖鎖 マウスES細胞 シグナル

1. 研究開始当初の背景

(1) マウス ES 細胞は、胎生 3.5 日目の内部細胞塊(ICM)から樹立された多能性幹細胞である。FGF4 により分化の引き金が引かれると、エピプラスト、あるいは、原始内胚葉へと分化する。エピプラストは、その後、胎児を構成するすべての細胞へと分化し、原始内胚葉は母体と胎児をつなぐ支持組織となる。しかし、どのようなシグナルが、どのようにして、エピプラストと原始内胚葉への分化を決定づけるかは、明らかとは言えない。

(2) 一方、シグナル受容体が、細胞膜上で不均一な分布、すなわち脂質ラフトに選択的に局在し、その局在がシグナル伝達に必須なことが、我々を含む研究から明らかにされてきた。分化方向を決定するシグナルダイナミズムにおいても、シグナル受容体の脂質ラフトへの局在が鍵となると予測された。

2. 研究の目的

本研究では、脂質ラフトに局在するシグナル受容体を探索し、未分化性からの脱却、分化を決定するシグナルを明らかにする。さらに、脂質ラフト構成因子を解析し、これらを統合して、マウス ES 細胞から分化への機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞、ES 細胞から分化させたマウスエピプラスト幹細胞などを準備し、1%TritonX-100 不溶性画分 (DRM:ラフト画分) を調整した。主要シグナル受容体 (FGFR1 と 2, BMPR-II, ActR-II/-IIB, Lrp5/6, gp130, LIFR) のラフト画分への存在の有無を Western blot 解析などにより検討した。

(2) マウス ES 細胞、ES 細胞から分化させたマウスエピプラスト幹細胞を準備し、質量分析による糖脂質の絶対量の解析、real-time PCR と RNA-seq による糖脂質を合成する糖転移酵素の絶対量の解析を行い、両細胞における糖脂質の合成を検討した。

(3) ChIP-Atlas の包括的なデータベース (<https://chip-atlas.org>) [1]を用いて、これまでに公開されているマウス ES 細胞のクロマチン免疫沈降-シーケンス (ChIP-seq) データセットを詳細に解析し、糖脂質を合成する糖転移酵素のプロモーター領域で濃縮されている因子を検索した。PRC2 複合体が濃縮されていることを見出したので、H3K27me3 修飾を顕著に減少させる PRC2 阻害剤 EED226 を用いてそれを確認した。

4. 研究成果

(1) マウス ES 細胞から、1%TritonX-100 不溶性画分 (DRM:ラフト画分) を調整して、ラフトに局在するラックダイナック糖鎖構造をもつ LIF 受容体と gp130 をラックダイナック糖鎖構造と結合するレクチンを用いて免疫沈降したところ、マウス ES 細胞の未分化性維持に関わると考えられる分子が得られた。

(2) マウス ES 細胞とマウスエピプラスト幹細胞は、それぞれナイーブ状態とプライム状態という 2 つの異なる多能性状態を反映しており、着床に伴う多能性状態の遷移を調べるための in vitro の有用なモデルとなる。質量分析による解析から、マウス ES 細胞からマウスエピプラスト幹細胞への遷移において、糖脂質の総量が顕著に減少し、その組成は、グロブ Gb およびネオラクト

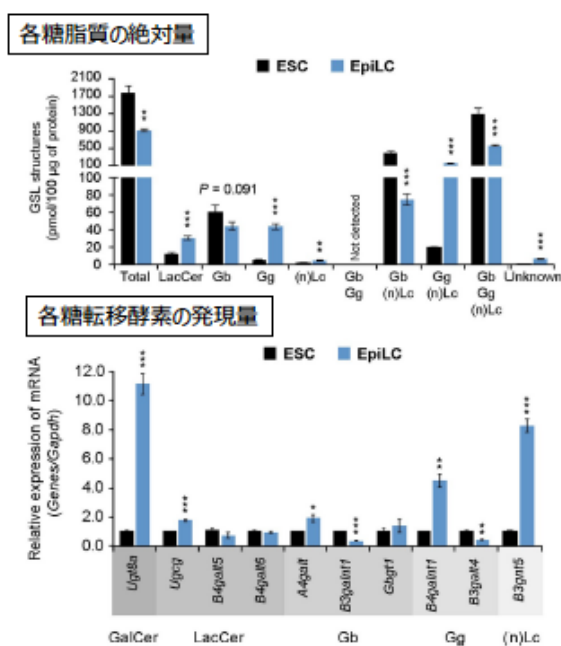


図1: マウスES細胞(ESC)と誘導したエピプラスト幹細胞(EpiLC)における糖脂質と糖転移酵素の発現

/ラクト (n) Lc からガングリオ Gg シリーズへシフトすることが明らかになった(図 1) [2]。また、糖転移酵素もそれに対応した発現変化を示した。

(3) ポリコーム抑制複合体 2 (PRC2) は、ヒストン H3 リジン 27 (H3K27me3) をトリメチル化し、遺伝子の発現を抑制する [3]。PRC2 阻害剤 EED226 を用いて検討したところ、PRC2 が、糖脂質を合成する糖転移酵素の 90% を直接、あるいは、間接的に、制御していた (図 2)。PRC2 が、マウス ES 細胞からマウスエピプラスト幹細胞への遷移で引き起こされる糖脂質の変化をトータルに調整するネットワークの中心となっていることが明らかになった。

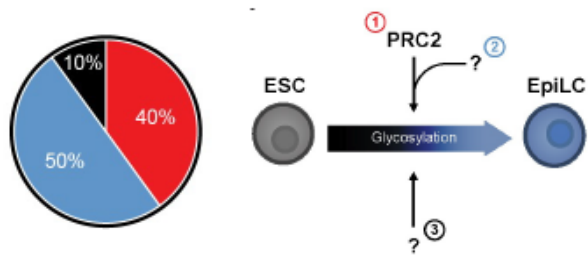


図2 : マウスES細胞(ESC)とエピプラスト幹細胞(EpiLC)への遷移における糖脂質発現調節ネットワークの概略図 : PRC2が直接調節 (1、赤)、PRC2と他の未確認因子による調節 (2、青)、PRC2非依存経路 (3、黒)

以上の結果から、糖脂質の変化が、未分化性からの脱却と分化の決定に関与する可能性が示唆された。

【引用文献】

- [1] Oki S, Ohta T, Shioi G, Hatanaka H, Ogasawara O, Okuda Y, Kawaji H, Nakaki R, Sese J, Meno C. ChIP-Atlas: a data-mining suite powered by full integration of public ChIP-seq data. EMBO Rep. 2018 Dec;19(12):e46255.
- [2] Pecori F, Yokota I, Hanamatsu H, Miura T, Ogura C, Ota H, Furukawa JI, Oki S, Yamamoto K, Yoshie O, Nishihara S. A defined glycosylation regulatory network modulates total glycome dynamics during pluripotency state transition. Sci Rep. 2021 Jan 14;11(1):1276.
- [3] Deevy O, Bracken AP. PRC2 functions in development and congenital disorders. Development. 2019 Oct 1;146(19):dev181354.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pecori Federico, Nishihara Shoko	4. 巻 -
2. 論文標題 Transient Induction and Characterization of Mouse Epiblast-Like Cells from Mouse Embryonic Stem Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/7651_2021_403	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pecori Federico, Yokota Ikuko, Hanamatsu Hisatoshi, Miura Taichi, Ogura Chika, Ota Hayato, Furukawa Jun-ichi, Oki Shinya, Yamamoto Kazuo, Yoshie Osamu, Nishihara Shoko	4. 巻 11
2. 論文標題 A defined glycosylation regulatory network modulates total glycome dynamics during pluripotency state transition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-79666-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ogura Chika, Hirano Kazumi, Mizumoto Shuji, Yamada Shuhei, Nishihara Shoko	4. 巻 169
2. 論文標題 Dermatan sulphate promotes neuronal differentiation in mouse and human stem cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 55～64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvaa087	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Pecori Federico, Akimoto Yoshihiro, Hanamatsu Hisatoshi, Furukawa Jun-ichi, Shinohara Yasuro, Ikehara Yuzuru, Nishihara Shoko	4. 巻 133
2. 論文標題 Mucin-type O-glycosylation controls pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor endocytosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs245845
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.245845	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 西原 祥子	4. 巻 92
2. 論文標題 幹細胞を制御する糖鎖	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 94 ~ 106
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920094	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Taichi, Yuasa Noriyuki, Ota Hayato, Habu Masato, Kawano Mitsuko, Nakayama Fumiaki, Nishihara Shoko	4. 巻 518
2. 論文標題 Highly sulfated hyaluronic acid maintains human induced pluripotent stem cells under feeder-free and bFGF-free conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 506 ~ 512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.08.082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinchi Hiroyuki, Nakamura Tomoya, Ota Hayato, Nishihara Shoko, Wakao Masahiro, Suda Yasuo	4. 巻 20
2. 論文標題 Cell Profiling Based on Sugar Chain?Cell Binding Interaction and Its Application to Typing and Quality Verification of Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 1810 ~ 1816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbic.201900028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Miura Taichi, Nishihara Shoko	4. 巻 31
2. 論文標題 The Functions of α -GlcNAc in Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E69 ~ E75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4052/tigg.1954.2E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishihara Shoko	4. 巻 592
2. 論文標題 Glycans in stem cell regulation: from Drosophila tissue stem cells to mammalian pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEBS Letters	6. 最初と最後の頁 3773 ~ 3790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1873-3468.13167	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計21件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 Pecori F, Akimoto Y, Hanamatsu H, Furukawa J, Nishihara S
2. 発表標題 Mucin-type O-glycosylation regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor internalization
3. 学会等名 The ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 19th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ota H, Miura T, Yuasa N, Habu M, Kawano M, Nakayama F, Nishihara S
2. 発表標題 Highly sulfated hyaluronic acid maintains undifferentiated state of human iPS cells
3. 学会等名 The ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 19th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ogura C, Hirano K, Mizumoto S, Yamada S, Nishihara S
2. 発表標題 The addition of dermatan sulfate promotes neuronal differentiation from mouse and human stem cells
3. 学会等名 Annual Conference of the Society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pecori F, Akimoto Y, Hanamatsu H, Furukawa J, Shinohara Y, Ikehara Y, Nishihara S
2. 発表標題 antigen regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells by directly modulating Galectin-3 mediated frizzled-5 endocytosis
3. 学会等名 Annual Conference of the Society for Glycobiology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太田隼人、三浦太一、湯浅徳行、羽生正人、川野光子、中山文明、西原祥子
2. 発表標題 高硫酸化ヒアルロン酸はヒトiPS細胞の未分化性を維持する
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三浦太一、湯浅徳行、太田隼人、羽生正人、川野光子、中山文明、西原祥子
2. 発表標題 人工硫酸化糖鎖を用いた支持細胞とサイトカインの添加を必要としないヒトiPS細胞の新規維持法の開発
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉千佳、平野和己、水本秀二、山田修平、西原祥子
2. 発表標題 デルマタン硫酸はマウスとヒト幹細胞における神経分化を促進する
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 ペーコリ・フェデリーコ、秋元 義弘、花松 久寿、古川 潤一、篠原 康郎、池原 謙、西原祥子
2. 発表標題 Frizzled-5のT抗原は、マウス胚性幹細胞の多能性を調節する
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pecori F, Akimoto Y, Hanamatsu H, Furukawa J, Shinohara Y, Ikehara Y, Nishihara S
2. 発表標題 Galectin-3 binding to T antigen directly modulates Wnt signaling via frizzled-5 endocytosis in mouse embryonic stem cells.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉 千佳、平野 和己、水本 秀二、山田 修平、西原 祥子
2. 発表標題 デルマタン硫酸はマウスES細胞における神経分化を促進する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小倉 千佳、平野 和己、水本 秀二、山田 修平、西原 祥子
2. 発表標題 マウスES細胞はデルマタン硫酸の添加により神経分化が促進される
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西原祥子
2. 発表標題 多能性幹細胞におけるヘパラン硫酸とO-GlcNAc修飾によるシグナル制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会、横浜（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishihara S, Miura T, Ota H, Yuasa N, Habu M, Pecori F, Nakayama F, Ogura C
2. 発表標題 Functional analyses of glycans in mammalian stem cells
3. 学会等名 11th Asian Community of Glycoscience and Glycotechnology Conference, Busan, South Korea, South Korea（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishihara S, Miura T, Ota H, Yuasa N, Habu M, Pecori F, Nakayama F, Ogura C
2. 発表標題 Function of glycans in pluripotent stem cells
3. 学会等名 1st International Symposium on Glycans, Zhuhai, China（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pecori F, Hanamatsu H, Furukawa J, Nishihara S
2. 発表標題 Mucin-type O-glycosylation regulates pluripotency in mouse embryonic stem cell
3. 学会等名 The ISSCR (International Society for Stem Cell Research) 18th Annual Meeting, Los Angeles, USA（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Pecori F, Ota H, Miura T, Nishihara S
2. 発表標題 O-GlcNAc on PKC inhibits differentiation of mouse embryonic stem cells
3. 学会等名 The 25th International Symposium on Glycoconjugates (GLYCO XXV), Milano, Italy (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦太一、中山文明、西原祥子
2. 発表標題 マウスES細胞におけるO-GlcNAc糖鎖修飾による新規FGF4シグナル抑制機構
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会、神戸
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦太一、湯浅徳行、太田隼人、羽生正人、川野光子、中山文明、西原祥子
2. 発表標題 bFGFおよびフィーダー細胞を必要としない高硫酸化ヒアルロン酸を用いたヒトiPS細胞の新規培養法の確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会、福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishihara S
2. 発表標題 O-GlcNAc Regulates Signaling in Embryonic Stem Cells.
3. 学会等名 the 24th IUBMB Congress & 15th FAOBMB Congress, Seoul, Korea. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西原祥子
2. 発表標題 幹細胞における糖鎖の機能
3. 学会等名 第12回多糖の未来フォーラム、京都（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nishihara S
2. 発表標題 O-GlcNAc inhibits FGF4 signaling via inhibition of PKC zeta phosphorylation to maintain naive state in mouse embryonic stem cells.
3. 学会等名 Glycobiology Gordon Research Conference, Lucca (Barga), IT.（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	古川 潤一 (Furukawa Junichi) (30374193)	北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授 (10101)	
研究協力者	佐藤 主税 (Sato Chikara) (00357146)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長 (82626)	
研究協力者	工藤 崇 (Kudo Takashi) (20288062)	筑波大学・医学医療系・准教授 (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------