

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 15 日現在

機関番号：82612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670487

研究課題名(和文) 幹細胞の老化を規定する細胞表面糖鎖の探索と臨床応用に向けた技術開発

研究課題名(英文) Identification of carbohydrate structures defining ageing of human stem cells for cell therapy products

研究代表者

中村 京子 (Nakamura, Kyoko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・細胞医療研究部・研究員

研究者番号：30124481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、iPS細胞の研究が進む一方で、成人の体内にも種々の幹細胞が存在することが明らかになり注目されている。しかし、再生医療製品等の原料の元となる細胞のきょう子宮由来の組織や月経血の使用に際しては「幹細胞の老化」という視点が重要であり、効率良い分化誘導の為には、幹細胞そのものの性質を理解することが必須と考えられる。体細胞の老化過程における細胞表面糖鎖を検討し、細胞の分化、増殖、老化に際して、細胞表面の糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖が動的に変動することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Human somatic stem cells have been focused in addition to iPS cells and ES cells as a source of cell therapy products. However, somatic cells have a limited cell life span. It remains unclarified whether their properties of the somatic cells may alter during cellular ageing in culture. In this study, we investigated carbohydrate structures of human somatic cells during cellular ageing. Structures of glycoproteins and glycolipids dynamically changed in differentiation, proliferation, and ageing.

研究分野：細胞生物学

キーワード：糖鎖 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞の研究が進む一方で、成人の体内にも種々の幹細胞が存在することが明らかになり注目されている。特に、女性の場合には、入手が容易な子宮内膜組織や、医療廃棄物である月経血から幹細胞を調製することが可能であり、我々はすでにその細胞を分化させて心筋細胞を効率よく作成することに、成功した。しかし、子宮由来の組織や月経血の使用に際してはドナーの年齢的影響、すなわち「幹細胞の老化」という視点が重要であり、効率良い分化誘導の為には、幹細胞そのものの性質を理解することが必須と考えられる。一方、iPS 細胞においても、使用した体細胞の老化による影響については、これまで全く検討されていなかった。細胞表面の糖タンパク質や糖脂質上の糖鎖は細胞の分化、増殖、老化に際して変化しており、SSEA-1 や SSEA-4 など分化段階をあらわす優れたマーカーとなることが知られている。そこで、申請者らは、幹細胞や iPS 細胞における糖タンパク質や糖脂質の糖鎖発現に注目し、老化との関係に焦点を絞った解析を試みた。

子宮内膜組織や月経血から体性幹細胞を調製する手法は、倫理面や技術的な欠点が少なく、再生医療や細胞移植治療の実現において、最も期待される手法のひとつである。しかし、これら子宮由来の組織材料は、入手が容易であるという利点がある一方で、加齢による採取年齢の制限があり、良好な状態の細胞が得られる時期が限られているという可能性も高い。将来の治療に際しての利用を考えて、子宮内膜組織や月経血を冷凍保存しておくことが考えられるが、果たして何歳までに採取した細胞が相応しいのであろう

か？さらに目的の良質な幹細胞を濃縮単離して、コンパクトに保存はできないものか？ここで、申請者らは、これまで幹細胞において議論されることの少なかった“個体の老化”と“細胞の老化”との関係を「幹細胞の老化」という視点にたって理解することが不可欠であると考えに至った。

また、体細胞から iPS 細胞を作成する際においても、細胞を初期化することのみが注目されてきたが、得られた iPS 細胞は作成に用いた体細胞の年齢、即ち老化の影響を本当に受けていないのか？新しい視点にたった解析が必要と考えられる。

細胞表面の糖タンパク質・糖脂質上の糖鎖は、細胞の分化、増殖、老化や細胞を取り巻く環境に応じて刻々と変化しており、タンパク質のみでは説明できない生体内の多様性を担うとともに、細胞の種類や分化段階を表す優れたバイオマーカーであることが知られている。

申請者らは、上記の状況に鑑み、子宮由来の体性幹細胞や iPS 細胞における糖鎖発現を、老化を規定するテロメラーゼ活性や分化マーカータンパク質の発現と関連させて「老化」との関係から解析する。良好な幹細胞に特有な糖タンパク質または糖脂質の存在が確認された場合には、その糖鎖が、幹細胞の質を担保する新しいマーカーとなる可能性がある。さらに、その糖鎖に対する抗体を入手できれば、幹細胞の質の検証は勿論、細胞の選別さらには凍結保存用幹細胞の抗体カラムによる濃縮という全く新しい手法も可能となる。

2. 研究の目的

子宮内膜組織や月経血由来の幹細胞において、加齢に伴う糖鎖発現の変化の全体像を、網羅的レクチンマイクロアレイ解析によりとらえる。それをもとに、特定の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖が幹細胞の質を担保するマーカーとなる可能性を探る。さらに、鍵となる糖鎖に対する抗体を用いて、良質な幹細胞の検出方法を確立し、抗体カラムによる幹細胞の分取・保存の手法を検討する。また、新たに体細胞から作成した iPS 細胞に関して、細胞老化の影響について、糖鎖発現との関係から解析した。子宮内膜組織や月経血由来の幹細胞において、加齢に伴う糖鎖発現の変化の全体像を、網羅的レクチンマイクロアレイ解析によりとらえる。それをもとに、特定の糖タンパク質や糖脂質の糖鎖が幹細胞の質を担保するマーカーとなる可能性を探る。さらに、鍵となる糖鎖に対する抗体を用いて、良質な幹細胞の検出方法を確立し、抗体カラムによる幹細胞の分取・保存の手法を検討する。また、新たに体細胞から作成した iPS 細胞に関して、細胞老化の影響について、糖鎖発現との関係から解析する。

3. 研究の方法

子宮由来幹細胞の調製

年齢の異なる成人から採取した正常子宮内膜組織あるいは月経血を用いて幹細胞を調製する。また、一方で、同様な組織から iPS 細胞の作製も試みた。

レクチンマイクロアレイを使用した糖タンパク質糖鎖の解析

得られた幹細胞から、糖タンパク質を可溶化し、タンパク部分に蛍光ラベルをいれる。この蛍光タンパク質を、

レクチンマイクロアレイにアプライし、糖鎖を介した結合を解析した。本方法には、当研究室が保有する装置（Glycostation Reader1200, MORITEX 社製）を使用した。

4. 研究成果

様々な組織由来のヒト細胞はヘテロな集団であり、細胞の老化の程度も様々である。細胞老化のマーカーとして細胞表面糖鎖が有効であることが示された。これまで進めた数種類の細胞では、ある特徴的なレクチンが細胞老化と関係性が高いことが示唆された。

移植した細胞がどのような動態を示すのかは、安全性や有効性を検証するために必須である。そのためには、先ず移植する細胞の品質をきちんと規定しておくことが求められる。細胞表面糖鎖は、癌や細胞を規定するマーカーとして有効であることが数多く示されている。しかし未知のものを見出していくには網羅的な解析技術が必要であった。レクチンマイクロアレイは特異的な糖鎖構造を認識するレクチンをチップ上に45種類並べこれまでにない感度を有して、細胞表面の糖鎖構造を調べることができる技術である。我々はこの技術を再生医療のソースとなる幹細胞の品質管理に応用できないかと検討を進めてきた。今回の実験で明らかのように、種々の分化能を有し、ヘテロな集団であるヒト細胞について、糖鎖解析により一定の分類が可能であることが強く示唆された。これまでの細胞表面抗原マーカーと組み合わせることによって、移植細胞の品質をより安全性と有効性を示すことに繋がる可能性がある。また移植細胞の動態の検証にも有効であると考えられた。今後移植源となる可能性がある骨髄を始めとした組織から細胞の有効性・安全性を評価する系として、投与法の比較、さらに長

期観察による造腫瘍性、生体内動態を経時的に観察する系に展開可能となる。

5．主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

氏名：中村京子(Nakamura Kyoko)

機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

所属部局名：細胞医療研究部

職名：研究員

研究者番号：30124481

(2)研究分担者

氏名：梅澤明弘(Umezawa Akihiro)

機関名：国立研究開発法人国立成育医療研究センター

所属部局名：再生医療センター

職名：副所長/再生医療センター長

研究者番号：70213486

(3)連携研究者

なし