

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670182

研究課題名(和文)「臓器の老化」により変化する幹細胞分泌因子の探索と組織再生機序の解明

研究課題名(英文) Role of stem cells for tissue regeneration and the effects of aging changes in organs, tissues and cells.

研究代表者

豊田 雅士 (Toyoda, Masashi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号：50392486

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)：糖鎖は細胞間相互作用に重要な役割を果たし、細胞が存在する周囲環境を反映していると考えられる。臓器を支える幹細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞において、老化に伴う細胞膜上の糖鎖動態を検討した。線維芽細胞では、由来する個体年齢によらず老化に伴い一定の糖タンパク質上の糖鎖構造が一定のプロファイルを取ることがわかった。この踏査構造変化は間葉系幹細胞にも認められることが示された。また血管内皮細胞では、老化に伴い細胞膜上の糖脂質ガングリオシドGM1の発現が亢進し、インスリン抵抗性をもたらすことがわかった。臓器の老化でそれを構成する細胞に機能的な影響を及ぼしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The cell surface is covered with various glycans, which play a crucial role in biological function. The cell surface dynamics changes of glyccans regulate cellular function during development, differentiation and survival. We investigated glycan changes of the cellular senescence process on human fibroblast, vascular endothelial cells and mesenchymal stem cells with cellular senescence process and/or human aging. The glycan profile of cell surface glycoprotein on cellular senescence process and/or human aging had been significantly changed in fibroblast and mesenchymal stem cells. Thus it was easy to speculate that cellular senescence process was concerned with the change of glycan component of cell surface. Also, we reveal that ganglioside GM1 increase on cell surface vascular endothelial cells accompanying with cellular senescence process and human aging, and that the increased GM1 cause a state of insulin resistance in senescent vascular endothelial cells.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：ヒト幹細胞 糖タンパク質 糖脂質 老化 再生

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞などの体性幹細胞や多能性幹細胞である ES/iPS 細胞に対する臨床研究が国内外で始まっている。またそれらを支える幹細胞に関する基盤的研究についても著しい進展が見られる。そうした中、幹細胞が移植環境にあたる影響の重要性が示唆されている。すなわち幹細胞自らが分化誘導して組織等を再生するばかりでなく、サイトカインなどの機能性分子を放出して周囲の細胞を遊走させたり、また分化・増殖させたりしていることが報告されている。こうした効果は、生体内の恒常的機能にも関係し、加齢に伴って起こる機能低下、すなわち「臓器の老化」の影響を、組織内の体性幹細胞が受けていることが考えられた。さらに幹細胞移植後の組織再生や機能回復にも影響を与える可能性が容易に想像されるが、その機能を担う分子やその分子機構についてはよくわかっていない。

2. 研究の目的

高齢者を対象とした幹細胞移植においては細胞ソースとしてなにが適切なのか、また得られた幹細胞は若年者や成人と同じような特性を有し、機能を果たすことが可能かについては不明な点が多い。そこで本研究では、採取可能な、高齢患者由来脂肪、血管内皮、皮膚等の組織から幹細胞を樹立し、それぞれがもつ特性を若年者・成人由来の細胞と比較する。特に「臓器の老化」を反映しやすいとされる幹細胞が放出する液性因子(糖タンパク質)の質的・量的な変化を検出する。ここでは糖タンパク質の糖鎖構造をこれまでの実績を元にしたレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルを足がかりとした研究アプローチを試みる。さらに糖鎖構造変化がもたらす糖タンパク質の機能を通して移植後の安全性や有効性に与える影響についても検証していく。申請者はこれまで多能性幹細胞や体性幹細胞に関する糖鎖解析を進め、糖鎖が細胞の状態を的確に反映していることを示してきた。そこで本研究では、加齢の影響がもたらす幹細胞が有する能力を、細胞膜上の糖脂質や糖タンパク質の量的・質的变化を元に検証していくこととした。

3. 研究の方法

東京都健康長寿医療センターの倫理委員会承認のもと、インフォームドコンセントが得られた患者の手術検体より、研究試料となる組織検体を得て、そこから細胞の樹立を試み、以下の検討を行った。

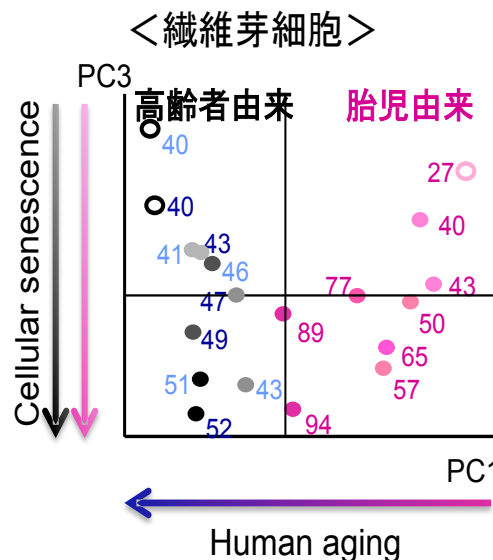
- ① 高齢者由来組織から樹立した幹細胞の特性解析
- ② 「臓器の老化」による高齢者由来細胞の糖鎖プロファイリングにおける検証
- ③ 組織幹細胞を支える線維芽細胞の老化における細胞膜上の糖鎖変化
- ④ 組織幹細胞を支える血管内皮細胞の老化

における細胞膜上の糖鎖変化と機能解析

4. 研究成果

研究試料として脂肪、骨髄、血管、並びに心臓の各組織から細胞を得て、以下のような成果をえた。

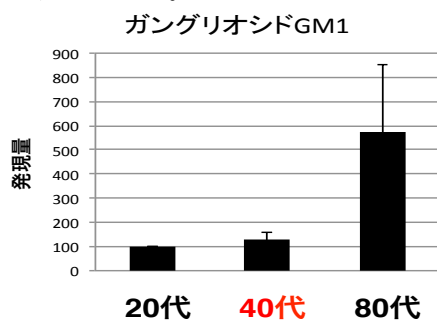
- ① 高齢者由来細胞の増殖、細胞特性：各組織から得られた細胞は、間葉系もしくは上皮系の細胞の形態を有するヘテロな集団であった。増殖活性は、小児もしくは成人由来細胞と比較して低く、分化能等に必要な細胞数を確保できたロットは少なかった。
- ② 組織老化の指標としての糖鎖プロファイル:組織内での老化が細胞に与える影響を調べるため、まず皮膚線維芽細胞を用いて細胞膜上の糖タンパク質糖鎖プロファイルを、細胞老化過程並びに個体年齢の違う細胞で取得した。その結果、個体老化と細胞老化に一定の関係性が存在し、特定の糖鎖構造が関わっていることが示唆された(図1)。



(図1) 線維芽細胞の糖鎖プロファイリング細胞老化(図中の数字は分裂指数を示す)によって胎児、高齢者由来の細胞膜上の糖タンパク質の糖鎖構造は同じようなパターンとなる。

- ③ 間葉系幹細胞における糖鎖プロファイル:組織内の恒常性に重要な幹細胞の一つである間葉系幹細胞について、細胞老化に伴う糖タンパク質糖鎖のプロファイリングと分化能・増殖能との関係について検討した。その結果、老化に伴い分化能が低下し、それと並行して一定の糖鎖構造が変化することがわかった。その変化は、線維芽細胞と同じような傾向を示した。このことは、組織内の老化の指標として糖鎖が有効であることを示唆するものであった。

- ④ 血管内皮細胞の老化:組織再生に重要な役割を担う血管であるが、その中でも内皮細胞の機能における老化への影響について検討した。血管内皮細胞では、細胞膜上の糖脂質の一つガングリオシド GM1 が顕著に発現亢進していることが判明した。これは、継代に伴う細胞老化、酸化ストレス刺激に伴う細胞老化に共通に認められ、かつ高齢者由来の血管内皮細胞においても確認された (図2)。この GM1 の発現亢進がどのような血管機能に影響するかを検討した結果、インスリン抵抗性をもたらすことがわかった。臓器の老化における恒常性機能低下に血管は重要な役割を果たすことが知られており、幹細胞やその周囲環境(ニッチ)との関連性について引き続き検討を行っている。



**血管内皮細胞の由来年齢**

(図2) 血管内皮細胞におけるガングリオシド GM1 の発現量

組織の由来年齢が高いほど、GM1 の発現量は高い

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Tateno H, Saito S, Hiemori K, Kiyoi K, Hasehira K, Toyoda M, Onuma Y, Ito Y, Akutsu H, Hirabayashi J.  $\alpha$ 2-6sialylation is a marker of the differentiation potential of human mesenchymal stem cells. *Glycobiology*, in press, 2016
- ② Itakura Y, Sasaki N, Kami D, Gojo S, Umezawa A, Toyoda M. N- and O-glycan cell surface protein modifications associated with cellular senescence and human aging. *Cell Biosci.*, 査読有, 6:14, 2016.
- ③ Mizukami T, Iso Y, Sato C, Sasai M, Spees JL, Toyoda M, Umezawa A, Miyazaki A, Suzuki H. Priming with erythropoietin enhances cell survival and angiogenic effect of mesenchymal stem cell implantation in rat limb ischemia. *Regenerative Therapy*, in press, 2016.

DOI: 10.1186/s13578-016-0079-5.

- ④ Ojima T, Shibata E, Saito S, Toyoda M, Nakajima H, Yamazaki-Inoue M, Miyagawa Y, Kiyokawa N, Fujimoto J, Sato T, Umezawa A. Glycolipid dynamics in generation and differentiation of induced pluripotent stem cells. *Sci. Rep.*, 査読有, 5:14988, 2015.  
DOI: 10.1038/srep14988.
- ⑤ Sasaki N, Itakura Y, Toyoda M. Ganglioside GM1 contributes to the state of insulin resistance in senescent human arterial endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 290:25475-25486, 2015.  
DOI: 10.1074/jbc.M115.684274.
- ⑥ Watada Y, Yamashita D, Toyoda M, Tsuchiya K, Hida N, Tanimoto A, Ogawa K, Kanzaki S, Umezawa A. Magnetic response monitoring of superparamagnetic iron oxide (SPIO)-labeled stem cells transplanted into the inner ear. *Neurosci. Res.*, 査読有, 95:21-26, 2015.  
DOI: 10.1016/j.neures.2015.01.010.
- ⑦ 許俊鋭、豊田雅士. 外科医の立場から考える心臓の老化と若返り. *進歩する心臓研究-Tokyo Heart J.*-, 査読無, 35(2):19-25, 2015.
- ⑧ Toyoda M, Umezawa A. Stem cells bond our organs/tissues and engineering products. *Circ. J.*, 査読有, 78(7):1582-1583, 2014.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/78/7/78\\_CJ-14-0558/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/circj/78/7/78_CJ-14-0558/_article)
- ⑨ Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Arai T, Toyoda M, Nakamura KI, Takubo K. Arm-specific telomere dynamics of each individual chromosome in induced pluripotent stem cells revealed by quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue cell*, 査読有, 46(6): 470-476, 2014.  
DOI: 10.1016/j.tice.2014.08.005.
- ⑩ Sasaki N and Toyoda M. Glycoconjugates and related molecules in human vascular endothelial cells, *Int. J. Vasc. Med.*, 査読有, 2013:963596, 2013.  
DOI: 10.1155/2013/963596.
- ⑪ Terai M, Izumiyama-Shimomura N, Aida J, Ishikawa N, Kuroiwa M, Poon SS, Arai T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nakamura KI, Takubo K. Investigation of telomere length dynamics in

induced pluripotent stem cells using quantitative fluorescence in situ hybridization. *Tissue Cell*, 査読有, 45(6):407-413, 2013.

DOI: 10.1016/j.tice.2013.07.003.

- ⑫ Tateno H, Matsushima A, Hiemori K, Onuma Y, Ito Y, Hasehira K, Nishimura K, Ohtaka M, Takayasu S, Nakanishi M, Ikehara Y, Nakanishi M, Ohnuma K, Chan T, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Asashima M, Hirabayashi J. Podocalyxin is the predominant glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Trans. Med.*, 査読有, 2(4):265-273, 2013.  
DOI: 10.5966/sctm.2012-0154.
- ⑬ Itakura Y, Kuno A, Toyoda M, Umezawa A, Hirabayashi J. Podocalyxin-Targeting Comparative Glycan Profiling Reveals Difference between Human Embryonic Stem Cells and Embryonal Carcinoma Cells. *J. Glycomics Lipidomics*, 査読有, S5: 004, 2013.  
DOI: 10.4172/2153-0637.S5-004.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 佐々木紀彦、板倉陽子、豊田雅士。ガングリオシド GM1 はヒト血管内皮細胞の老化に伴うインスリン抵抗性に関与する。第 2 3 回日本血管生物医学学会学術集会, 神戸国際会議場 (神戸), 2015. 12. 10-12.
- ② 久野敦、邹霞、吉田真樹、佐藤隆、萩原梢、岩城隼、板倉陽子、譚斌斌、岡谷千晶、野呂絵里花、豊田雅士、陶生策、張延、梶裕之、成松久。Optimization of lectin microarray-based glycomics for N- and O-glycome mapping of mouse FFPE tissue sections. 日本プロテオーム学会 2015, くまもと森都心プラザ (熊本), 2015. 7. 23-24.
- ③ 豊田雅士、神崎誠一、小野世絵、梅澤明弘。疾患特異的多能性幹細胞による糖鎖機能と病態。第 3 4 回日本糖質学会年会, 東京大学 (東京), 2015. 7. 31-8. 2.
- ④ Itakura Y, Hida N, Toyoda M. Characteristic change in the cellular senescence of the multipotent stem cells. ISSCR 2015. Stockholm, Sweden. 2015. 6. 24-27.
- ⑤ 佐々木紀彦、豊田雅士。The identification of ganglioside related in senescence of human endothelial cells. 第 3 8 回日本基礎老化学会, パシフィコ横浜 (横浜), 2015. 6. 12-14.
- ⑥ 板倉陽子、肥田直子、豊田雅士。心臓由来幹細胞の老化に伴う特性変化。第 3 8 回日本基礎老化学会, パシフィコ横浜 (横浜), 2015. 6. 12-14.
- ⑦ 佐々木紀彦、板倉陽子、豊田雅士; ヒト血管内皮細胞における加齢・老化関連複合糖質の同定。第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (横浜), 2014. 11. 25-27.
- ⑧ 豊田雅士; 高齢者にやさしい医療のための再生医療・組織工学とは。第 52 回日本人工臓器学会大会, 京王プラザホテル札幌 (札幌), 2014. 10. 17-19.
- ⑨ 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、阿久津英憲、梅澤明弘; ヒト ES 細胞株間における異常 DNA メチル化領域の解析。第 107 回日本繁殖生物学会学術集会, 帯広畜産大学 (帯広), 2014. 8. 21-24.
- ⑩ 小沼泰子、館野浩章、豊田雅士、阿久津英憲、梅澤明弘、平林淳、伊藤弓弦; rBC2LCN レクチンによるヒト ES/iPS 細胞の特異的検出とその応用。第 33 回日本糖質学会年会, 名古屋大学豊田講堂 (名古屋), 2014. 8. 10-12.
- ⑪ Sasaki N, Toyoda M; The identification of glycoconjugates related in aging and replicable senescence in human ECs. 第 37 回日本基礎老化学会大会, あいち健康プラザ (愛知県知多郡), 2014. 6. 26-27.
- ⑫ Itakura Y, Toyoda M; Analysis of the glycan profile change leading to senescence indicator. 第 37 回日本基礎老化学会大会, あいち健康プラザ (愛知県知多郡), 2014. 6. 26-27.
- ⑬ 西野光一郎、豊田雅士、山崎-井上麻由、阿久津英憲、梅澤明弘; ヒト ES 細胞の DNA メチル化バリエーション。第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 伊藤国際学術研究センター (東京), 2014. 5. 25-27.
- ⑭ Sasaki N, Toyoda M; The identification of aging and senescence-related glycoconjugates in human vascular endothelial cells. The 18th International Vascular Biology Meeting, みやこめっせ (京都), 2014. 4. 14-17.
- ⑮ 豊田雅士、梅澤明弘: 組織幹細胞治療における細胞の品質評価と安全性・有効性。第 1 3 回日本再生医療学会総会, 京都国際会館 (京都), 2014. 3. 3-5.
- ⑯ 板倉陽子、久野敦、平林淳、梅澤明弘、豊田雅士: ポドカリキシンを用いた多能性幹細胞の腫瘍化識別を目指す比較糖鎖プロファイル解析。第 86 回日本生化学会大会, パシフィコ横浜 (横浜), 2013. 9. 11-13.
- ⑰ 三浦ゆり、板倉陽子、豊田雅士、木下英樹、広瀬信義、遠藤玉夫: 日本人超百寿者血漿のグライコプロテオミクス解析。

- 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪国際交流センター (大阪), 2013. 8. 5-7
- ⑱ 板倉陽子、久野敦、平林淳、梅澤明弘、豊田雅士: ヒト胚性幹及び胎児性がん細胞におけるポドカリキシン上の比較糖鎖プロファイリング解析. 第 32 回日本糖質学会年会, 大阪国際交流センター (大阪), 2013. 8. 5-7.
- ⑲ Miura Y, Itakura Y, Arai Y, Iwamoto M, Toyoda M, Kinoshita H, Unuma Y, Toda T, Hirose N, Endo T: Glycoproteomics Study of Plasma Glycoproteins in Japanese Semisuper Centenarians. HUP0 12th Annual World Congress, Pacifico Yokohama (Yokohama), 2013. 9. 14-18.

[図書] (計 2 件)

- ① 豊田雅士、梅澤明弘. 組織幹細胞と糖鎖. 膝島の再生医療-膵β細胞の発生と再生をめぐる新展開- (井村裕夫、清野進監修、石井秀始編集)、診断と治療社、pp86-90, 2015.
- ② 豊田雅士、梅澤明弘. レクチンタイピング-レクチンによる細胞規格化 (第 4 章 iPS と糖鎖). 糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック~創薬・医療から食品開発まで~ (秋吉一成監修)、(株) NTS、pp221-225, 2015. 8. 12.

[その他]

ホームページ等

[http://www.tmghig.jp/J\\_TMIG/kenkyu/team/ketsukanigaku.html](http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/ketsukanigaku.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 雅士 (TOYODA, Masashi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター (東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究副部長

研究者番号: 5 0 3 9 2 4 8 6

(2) 研究協力者

佐々木 紀彦 (SASAKI, Norihiko)

板倉 陽子 (ITAKURA, Yoko)