基礎老化研究 46（1）; 17－21, 2022

【総説】

糖鎖と幹細胞システムから紐解く皮膚老化

佐田　亜衣子
熊本大学国際先端医学研究機構

要約

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克服は大きな課題となっている。皮膚は、外部刺激や異物の侵入から体内を保護するとともに、生体と外部とのインターフェイスとして機能する。一方、加齢に伴い、皮膚のバリア機能や再生能は低下し、がん発症のリスクは増加する。近年、組織の加齢性機能低下の一因として、分化細胞の供給源である幹細胞の老化（ステムセルエイジング）が提唱されている。しかし、幹細胞老化に関する知見の多くは、個々の遺伝子やゲノム制御に着目したもので、解析の難しいタンパク質の修飾やダイナミクスの視点からの研究が遅れている。本稿では、表皮幹細胞の加齢変化を糖鎖の視点から、最新の知見を交えて概説する。表皮幹細胞の老化メカニズムの解明とその克服は、生体内における予防医療への寄与のみならず、幹細胞異常を起因とする皮膚疾患や再生医療上の課題を解決する糸口となることが期待される。

キーワード：幹細胞老化、皮膚、レクチン、シアル酸、炎症

1．皮膚老化とステムセルエイジング

組織幹細胞は、生涯にわたって自分自身を維持しながら、分化細胞を作り出す能力を持つ特別な細胞である。このような細胞が、私たちの体の中の色々な場所に存在するので、古い細胞が失われても、日々新しい細胞を作り出すことができる。一方、組織幹細胞は高い増殖能を持ち、かつ組織の中で最も大元となる細胞なので、これに異常が現れると、組織は正常に機能することができなくなり、がん化や老化、各種疾患を引き起こす原因ともなる。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、細胞死の増加、がん化、ニッチへの応答性の変化等が、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明らかにされつつある。この現象は、幹細胞老化（ステムセルエイジング）と呼ばれ、造血、筋肉、毛包や色素幹細胞などを中心として、関連報告が増えている[1, 2]。

皮膚は、外界から身体を守るバリアとして働くほか、水分量の調節や損傷治癒など、生命維持に必須の役割を果たす。皮膚は、光老化などの外的要因と、分裂ストレスなどの内的要因により老化が進行し、外観や組織学的変化として現れることから、優れた老化モデルとして注目されている。老化した皮膚では、表皮の厚さの減少、表皮 - 真皮接合部の平坦化、創傷治癒の遅延、バリア機能の低下、がんのリスク増加など、組織学的および機能的な変化を示す。しかし、細胞や分子レベルで皮膚老化の決定的な要因が何であるのかは解明されていない。

表皮は、毛包間表皮とその付属物（毛包、皮脂腺、汗腺）からなり、異なる幹細胞集団によって維持される[3]。

毛包間表皮では、基底層に位置する表皮幹細胞が増殖・分化し、組織のターンオーバーや損傷修復に寄与する。毛包幹細胞は、バルジと呼ばれる毛包上部に位置する構造体に局在し、毛包の周期的な再生を担う。表皮と真皮の境界部に位置する基底膜は、細胞外マトリクスに富み、幹細胞の性質や運命に必須の役割を果たす[4]。

毛包間表皮と毛包の幹細胞は、恒常状態では互いに独立して働くが、傷害やストレスに応答し、異なる系統に分化する可塑性を有している。このような幹細胞の可塑性を担うメカニズムとして、スーパーエンハンサーによる遺伝子発現制御が報告された[5, 6]。通常の遺伝子制御領域であるエンハンサーと比べ、遥かに巨大なクラスターを形成するスーパーエンハンサーには、マスター転

連絡先：佐田　亜衣子
〒860-0811　熊本県熊本市中央区本荘 2-2-1
TEL：096-373-6890
E-mail：aisada@kumamoto-u.ac.jp
Website: https://www.aikosada.com

写因子と転写メディエーターが集まり、細胞のアイデンティティを決める遺伝子群を活性化する。スーパーエンハンサーは、毛包、表皮の異なる幹細胞集団を規定し、幹細胞の分化段階を制御する機構として提唱され、損傷やがんによって起こる幹細胞の可塑性の発揮や破綻が、スーパーエンハンサーの書き換えによって起こる可能性も示唆されている[7]。皮膚老化の過程においても、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[8-10]。しかし、毛包幹細胞において加齢に伴うエピゲノム変化や異所性の表皮分化が認められないといった報告もあり[11]、依然としてステムセルエイジングの分子的実体は不明である。また皮膚老化で見られる機構がより広く他の組織幹細胞に当てはまるかについても分かっていない。

2．幹細胞と糖鎖

細胞表面の糖鎖は「細胞の顔」とも呼ばれるように、細胞の種類や状態によって変化する。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も幅広く利用されてきた。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[12]。糖鎖は、糖タンパク質の構造、安定性、局在を決定し、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[13-15]。糖鎖は、幹細胞の自己複製や分化を司るNotch, BMP, Wnt, FGF 等のシグナル分子を調節することで、多能性幹細胞やショウジョウバエの組織幹細胞の制御にも重要な役割を果たすことも報告されている[16]。個体や細胞の老化プロセスにおいても、血清や線維芽細胞、脳や筋肉などの臓器でシアル酸の変化が観察される[5, 17, 18]。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[19]。しかし、生体内において、糖鎖の構造―機能―生物学的意義を結びつけた研究は少なく、未知な部分が多い。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、タンパク質発現、代謝産物等の情報と合わせ、より包括的に細胞や分子の状態を捉えることが求められている。

3．レクチンマイクロアレイ技術を用いた糖鎖解析

組織幹細胞は希少であり、質量分析による糖鎖の構造解析には大量のサンプルが必要であるため、糖鎖解析は困難であった。我々は最近、糖鎖工学を専門とする舘野らとの共同研究により、レクチンマイクロ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[20]。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ある[21]。レクチンマイクロアレイでは、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[22, 23]。レクチン - 糖鎖間の相互作用は、レクチンマイクロアレイ内の蛍光標識された試料とインキュベートした後、蛍光シグナルとして定量的に測定される。この技術を用いることで、様々な生体試料から単離した糖タンパク質を、包括的な糖鎖解析に利用することができ、少数細胞の生化学的特性を理解する上での技術的な制約を克服した[24]。

4．グライコームシフト：加齢に伴う表皮および毛包幹細胞の糖鎖変化

我々は、様々な糖鎖結合特異性を持つ 96 種類のレクチンからなるレクチンマイクロアレイ[25]を用いて、若齢および高齢マウス皮膚から単離した表皮幹細胞（a6-integrin+/CD34-/Sca1+ の集団）と毛包幹細胞（a6-integrin+/CD34+/Sca1- の集団）を用いてグライコーム解析を行った（図１）。その結果、表皮幹細胞は加齢に伴い、高マンノース型からシアル酸に富んだ複合型へと、糖鎖パターンが変化する「グライコームシフト」が起こることを見出した（図２）[20]。毛包幹細胞においても類似の糖鎖変化が見られた。さらに、シアル酸の付加に働く糖転移酵素（St3gal2、St6gal1）、およびマンノースの分解に働く酵素（Man1a）が、加齢した表皮幹細胞では有意に発現が上昇すること、また、培養表皮幹細胞において、老化型糖鎖パターンを誘導すると幹細胞の増

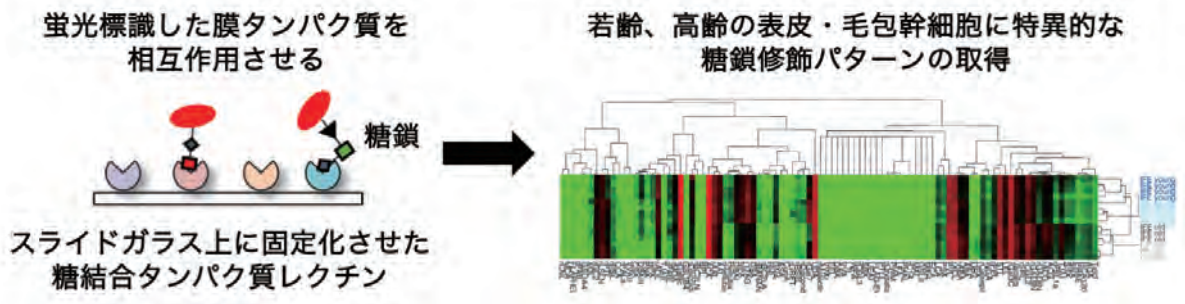

図１：レクチンマイクロアレイ技術を用いた糖鎖プロファイリング
若齢・高齢マウスよりセルソーターを用いて表皮・毛包幹細胞を単離し、レクチンマイクロアレイ法を用いた糖鎖解析を行った。糖結合タンパク質であるレクチンをスライドガラス上に固定化し、細胞から抽出、蛍光標識した膜タンパク質をガラス上のレクチンと相互作用させることで、細胞表面に存在する糖鎖構造を高感度かつ迅速に検出することができる。

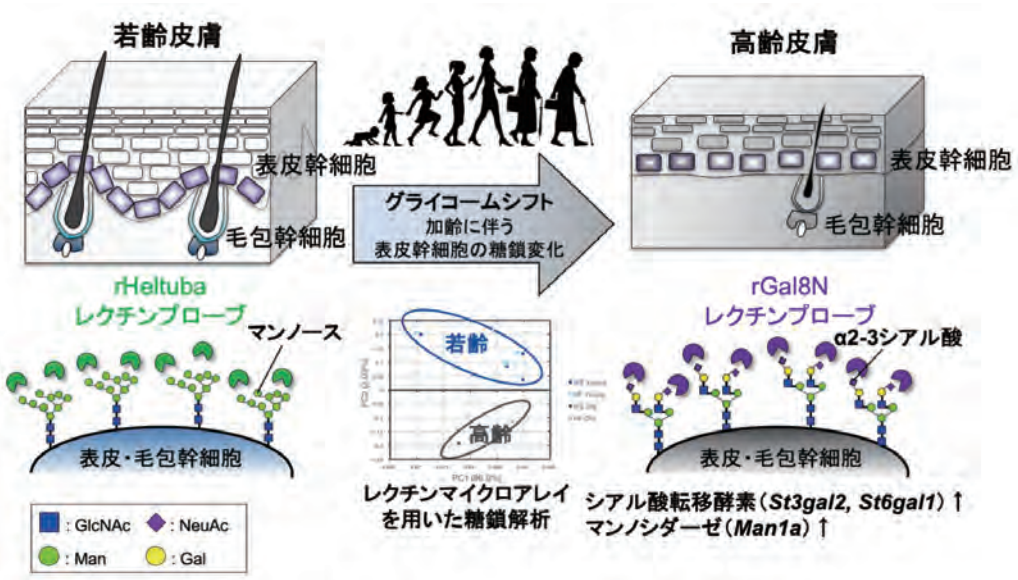

図２：表皮幹細胞の加齢に伴う糖鎖変化に着目した老化の理解と制御
図の中央に示した主成分解析では、レクチンマイクロアレイから得られたグローバルな糖鎖修飾パターンを示している。若齢と高齢サンプルは、主成分１と２で分離されレクチンパターンの違いが示唆された。GlcNAc：N- アセチルグルコサミン、NeuAc：N- アセチルノイラミン酸、Man：マンノース、Gal：ガラクトースを示す。

殖が顕著に低下することから、糖鎖の変化は機能的にも重要である可能性が示唆された[20]。今回同定したレクチンであるマンノース結合型の rHeltuba とシアル酸結合型の rGal8N は、老化した表皮幹細胞を可視化、選択、除去するためのプローブとして用いることができ、将来的には再生治療や皮膚老化の診断への応用が期待される。

５．考察と今後の展望

我々の研究では、老化した表皮幹細胞において、α2-3 および α2-6 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。今回の結果と一致するように、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[5]。また、シアル酸転移酵素の増加は、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[18]。α2-6 シアル酸と St6gal1 は、上皮から間葉への移行や腫瘍形成の際にも発現上昇する[26, 27]。一方、α2-3、α2-6 シアル酸は、ヒト真皮線維芽細胞の細胞老化や加齢の際に減少することが報告されている[17]。ヒトの多能性幹細胞や間葉系幹細胞では、シアル酸が高いほど幹細胞能力が高いとされている[25, 28, 29]。このようなシアル酸の違いは、細胞の種類、動物種、あるいは標的タンパク質の違いによるものと考えられ、シアル酸の生理機能が多様であることを示している。今後、同定した糖転移酵素を条件付きで欠損・過剰発現することで、皮膚や個体の加齢に伴うシアル酸の役割が明らかになるだろう。

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[30]。樹状細胞を含むいくつかの免疫細胞が表皮にマンノース結合受容体を持っていることから[31]、今回我々が見出した表皮幹細胞におけるマンノースの減少は、老化した皮膚における幹細胞と免疫細胞の相互作用の欠陥と関連している可能性があるが、今後さらなる解析が必要である。

糖鎖修飾は、細胞間および細胞と細胞外マトリクスの相互作用に重要な役割を果たしており、表皮幹細胞の糖鎖変化は、隣接する幹細胞、他の種類の細胞（例えば、線維芽細胞、免疫細胞、血管）、基底膜、シグナル分子との相互作用に影響を与えるかもしれない。今後、糖鎖修飾の違いが生じるコアタンパク質を特定し、糖鎖修飾の機能的重要性と生物学的意味を明らかにすることで、糖鎖を基軸とした老化制御へとつながるであろう。糖鎖は、細胞表面に位置し、アクセスしやすいという利点から、創薬や診断の標的分子として注目が高まっている。糖鎖をツールとして、表皮幹細胞や他の臓器における組織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が期待される。

引用文献

1. Ermolaeva M, Neri F, Ori A, et al.. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(9):594-610.
2. Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Cell. 2013;153(6):1194-217.
3. Gonzales KAU, Fuchs E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. Dev Cell. 2017;43(4):387-401.
4. Chermnykh E, Kalabusheva E, Vorotelyak E.

Extracellular Matrix as a Regulator of Epidermal Stem Cell Fate. Int J Mol Sci. 2018;19(4).
5. Hanisch F, Weidemann W, Grossmann M, et al. Sialylation and muscle performance: sialic acid is a marker of muscle ageing. PLoS One. 2013;8(12):e80520.
6. Adam RC, Yang H, Rockowitz S, et al. Pioneer factors govern super-enhancer dynamics in stem cell plasticity and lineage choice. Nature. 2015;521(7552):366-70.
7. Ge Y, Gomez NC, Adam RC, et al. Stem Cell Lineage Infidelity Drives Wound Repair and Cancer. Cell. 2017;169(4):636-50 e14.
8. Liu N, Matsumura H, Kato T, et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing. Nature. 2019;568(7752):344-50.
9. Matsumura H, Mohri Y, Binh NT, et al. Hair follicle aging is driven by transepidermal elimination of stem cells via COL17A1 proteolysis. Science. 2016;351(6273):aad4395.
10. Inomata K, Aoto T, Binh NT, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. Cell. 2009;137(6):1088-99.
11. Ge Y, Miao Y, Gur-Cohen S, et al. The aging skin microenvironment dictates stem cell behavior. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020;117(10):5339-50.
12. Spiro RG. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. Glycobiology. 2002;12(4):43R-56R.
13. Haltiwanger RS, Lowe JB. Role of glycosylation in development. Annu Rev Biochem. 2004;73:491-537.
14. Ohtsubo K, Marth JD. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. Cell. 2006;126(5):855-67.
15. Kitazawa K, Nadanaka S, Kadomatsu K, Kitagawa H. Chondroitin 6-sulfate represses keratinocyte proliferation in mouse skin, which is associated with psoriasis. Commun Biol. 2021;4(1):114.
16. Nishihara S. Glycans in stem cell regulation: from Drosophila tissue stem cells to mammalian pluripotent stem cells. FEBS Lett. 2018;592(23):3773-90.
17. 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. 2016;6:14.
18. Catera M, Borelli V, Malagolini N, Chiricolo M, Venturi G, Reis CA, et al. Identification of novel plasma glycosylation-associated markers of aging. Oncotarget. 2016;7(7):7455-68.
19. Dabelsteen S, Pallesen EMH, Marinova IN, Nielsen MI, Adamopoulou M, Romer TB, et al. Essential Functions of Glycans in Human Epithelia Dissected by a CRISPR-Cas9-Engineered Human Organotypic Skin Model. Dev Cell. 2020;54(5):669-84 e7.
20. Oinam L, Changarathil G, Raja E, Ngo YX, Tateno H, Sada A, et al. Glycome profiling by lectin microarray reveals dynamic glycan alterations during epidermal stem cell aging. Aging Cell. 2020;19(8):e13190.
21. Hirabayashi J. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. Glycoconj J. 2004;21(1-2):35-40.
22. Hirabayashi J, Yamada M, Kuno A, Tateno H. Lectin microarrays: concept, principle and applications. Chem Soc Rev. 2013;42(10):4443-58.
23. Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, Ebe Y, Takashima S, Yamada M, et al. Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling. Nat Methods. 2005;2(11):851-6.
24. Tateno H, Uchiyama N, Kuno A, Togayachi A, Sato T, Narimatsu H, et al. A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. Glycobiology. 2007;17(10):1138-46.
25. Tateno H, Toyota M, Saito S, Onuma Y, Ito Y, Hiemori K, et al. Glycome diagnosis of human induced pluripotent stem cells using lectin microarray. J Biol Chem. 2011;286(23):20345-53.
26. Lu J, Isaji T, Im S, Fukuda T, Hashii N, Takakura D, et al. beta-Galactoside alpha2,6-sialyltranferase 1 promotes transforming growth factor-beta-mediated epithelial-mesenchymal transition. J Biol Chem. 2014;289(50):34627-41.
27. Swindall AF, Londono-Joshi AI, Schultz MJ, Fineberg N, Buchsbaum DJ, Bellis SL. ST6Gal-I protein expression is upregulated in human epithelial tumors and correlates with stem cell markers in normal tissues and colon cancer cell lines. Cancer Res. 2013;73(7):2368-78.
28. Hasehira K, Tateno H, Onuma Y, Ito Y, Asashima M, Hirabayashi J. Structural and quantitative evidence for dynamic glycome shift on production of induced pluripotent stem cells. Mol Cell Proteomics. 2012;11(12):1913-23.
29. Wang YC, Stein JW, Lynch CL, Tran HT, Lee CY, Coleman R, et al. Glycosyltransferase ST6GAL1 contributes to the regulation of pluripotency in human pluripotent stem cells. Sci Rep. 2015;5:13317.
30. Keyes BE, Liu S, Asare A, Naik S, Levorse J, Polak L, et al. Impaired Epidermal to Dendritic T

Cell Signaling Slows Wound Repair in Aged Skin. Cell. 2016;167(5):1323-38 e14.
31. Wollenberg A, Mommaas M, Oppel T, Schottdorf EM, Gunther S, Moderer M. Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases. J Invest Dermatol. 2002;118(2):327-34.

Defining the role of glycans in regulating epidermal stem cell aging

Aiko Sada, Ph.D.
International Research Center for Medical Sciences (IRCMS), Kumamoto University

Abstract

Aging is the gradual decline of physiological functions over time. With the rapid aging of the population on a global scale, identifying and overcoming the causes of age-related diseases has become a significant challenge. The skin protects the body from external stimuli and foreign substances and interfaces between the body and the outside world. On the other hand, as we age, the skin's barrier function and regenerative capacity decline, and the risk of developing cancer increases. Recently, the aging of tissue stem cells (stem cell aging), which are the source of differentiated cells, has been proposed as one of the causes of age-related decline in tissue functions. However, most of the knowledge on stem cell aging has focused on individual genes and genomic regulation, and studies on protein modification and dynamics have lagged behind. In this article, I review the aging process of epidermal stem cells from the perspective of glycans. Elucidating and overcoming the mechanisms of epidermal stem cell aging will provide clues for anti-aging strategies and for resolving skin diseases caused by stem cell abnormalities.

Keywords : Skin, Stem cell aging, Lectin, Glycans, Inflammation