

# 幹細胞におけるデルマトン硫酸の機能

2022年3月

小倉 千佳

# 目次

1.	序論	1
2.	実験方法	
2-1.	使用したデルマタン硫酸ナトリウムについて	6
2-2.	マウス ES 細胞の培養	6
2-3.	ヒト神経幹細胞の培養	7
2-4.	トランスフェクション	7
2-5.	リアルタイム PCR 解析	8
2-6.	DS/CS 二糖構造解析	9
2-7.	免疫染色	9
2-8.	ウェスタンブロット解析	10
2-9.	細胞遊走アッセイ	11
2-10.	アルカリフォスファターゼ染色	11
2-11.	細胞増殖アッセイ	11
2-12.	統計解析	11
3.	結果	
3-1.	幹細胞の神経分化におけるデルマタン硫酸の機能	
3-1-1.	マウス ES 細胞からの EB 形成に伴うデルマタン硫酸合成関連酵素の発現	12
3-1-2.	デルマタン硫酸添加によるマウス ES 細胞の神経分化への影響	13
3-1-3.	デルマタン硫酸添加による神経突起伸長への影響	20
3-1-4.	デルマタン硫酸添加によるヒト神経幹細胞における神経分化への影響	21
3-2.	D4ST1 のマウス ES 細胞における未分化性への寄与	
3-2-1.	<i>D4ST1</i> のマウス ES 細胞における自己複製能への寄与	24
3-2-2.	<i>D4ST1</i> KD によるマウス ES 細胞の内胚葉への分化	27
3-2-3.	<i>D4ST1</i> KD マウス ES 細胞におけるシグナルの変化	29
4.	考察	
4-1.	幹細胞の神経分化におけるデルマタン硫酸の機能	30
4-2.	D4ST1 のマウス ES 細胞における未分化性への寄与	33
5.	結論	34
6.	謝辞	35
7.	参考文献	36

# 1. 序論

マウスの胚発生では、受精した日を胚性 0 日目として、2 細胞期と 4 細胞期を経て桑実胚となり、着床前の胚性 3.5 日には胚盤胞と呼ばれる構造を構築する。胚盤胞は内部細胞塊が栄養膜に包まれた構造をしており、この内部細胞塊から樹立された細胞がマウス胚性幹(ES)細胞である(1, 2)。マウス ES 細胞は自己複製能と身体を構成する全ての細胞に分化する能力、すなわち多能性を有している。この二つの性質を維持して増殖することを未分化状態という。胚性 3.5 日から発生が進んだ胚性 4.5 日では、内部細胞塊がエピブラストと原始内胚葉に分化し、エピブラストを原始内胚葉が覆う構造となる。さらに発生が進むと胚盤胞は卵筒胚となり、胚性 6.5 日目には原始線条と呼ばれる溝が現れ、ここからエピブラストが胚の内部へ侵入し、内胚葉と中胚葉を形成する。この時に陥入しなかったエピブラストが外胚葉へと分化する。発生に伴い胚の多能性状態が変化するため、胚性 3.5-4.5 日をナイーブ状態、胚性 4.5-5.5 日をフォーマティブ状態、胚性 5.5-7.5 日をプライム状態と定義し(3-5)(図 1)、それぞれのステージにおける多能性の維持機構や発生が進む機構を解明するための研究が多く行われている。

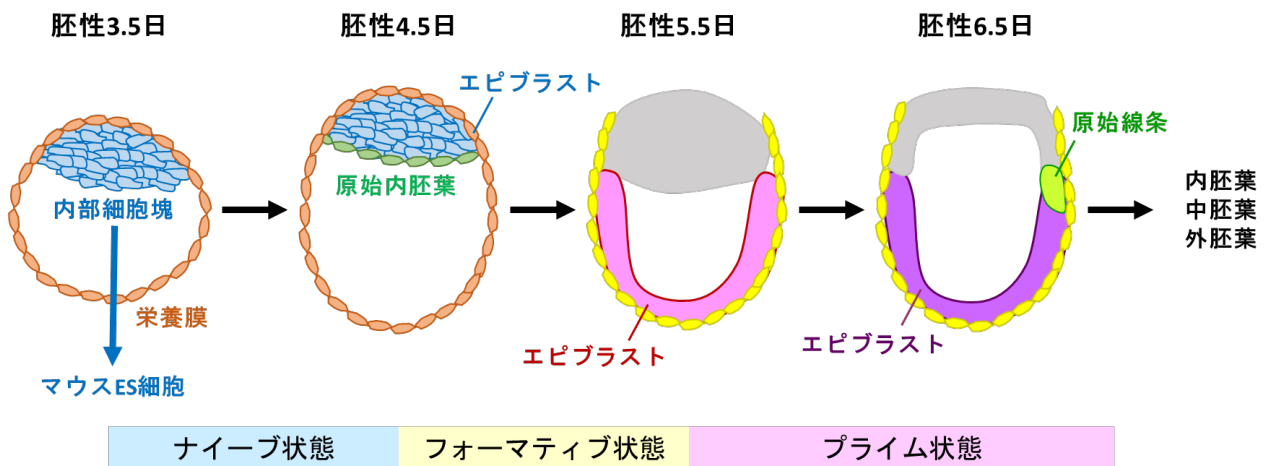


図 1 マウスの胚発生

マウス ES 細胞の未分化性維持と分化誘導には、様々なシグナルや成長因子が関与しており、多くの報告が存在する。マウス ES 細胞で機能している主要なシグナルとしては、LIF(Leukemia inhibitory factor)/Stat3(Signal transducer and activator of transcription)、BMP4(Bone morphogenetic protein 4)/Smad1/5/8、Wnt/ $\beta$ -catenin、FGF4(Fibroblast growth factor 4)/Erk1/2(Extracellular signal-regulated kinases)シグナルがある。これら 4 つのシグナルのうち、LIF、BMP4、Wnt シグナルは未分化性維持に、FGF4 シグナルは分化の引き金として機能する(6-8)。LIF シグナルの下流因子である Stat3 が多能性マーカーである *Klf4*(*Kruppel like factor 4*)の転写を促進し、さらに *Klf4*が、未分化マーカーとして知られる *Sox2*(*Spy-box transcription factor 2*)の転写を促進する(9)。BMP4 シグナルは、下流因子の Smad1/5/8 が *Id1,2,3*(*Inhibitor of differentiation protein 1,2,3*)の発現

を誘導し、外胚葉分化を抑制して未分化性を維持する(10)。Wnt シグナルは、受容体の Frizzled と共受容体である LRP5/6(Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6) に Wnt リガンドが結合し、下流因子の  $\beta$ -catenin が核移行して転写因子と複合体を形成する。この複合体によって様々な標的遺伝子の転写が促進される(11)。一方 FGF4 シグナルは、下流因子の Erk1/2 が未分化維持因子である *Nanog* の発現を抑え、分化を促進する(12)。この Erk1/2 のリン酸化を、BMP4 シグナルの標的遺伝子である *Dusp9* (*Dual specificity phosphatase 9*) が脱リン酸化して活性を失わせることにより、神経への分化を阻害することも報告されている(13)。これらのシグナルがバランスを保ち、また他のシグナルとクロストークしながら、下流の転写因子の発現を調節してマウス ES 細胞の未分化性を維持している(図 2)。

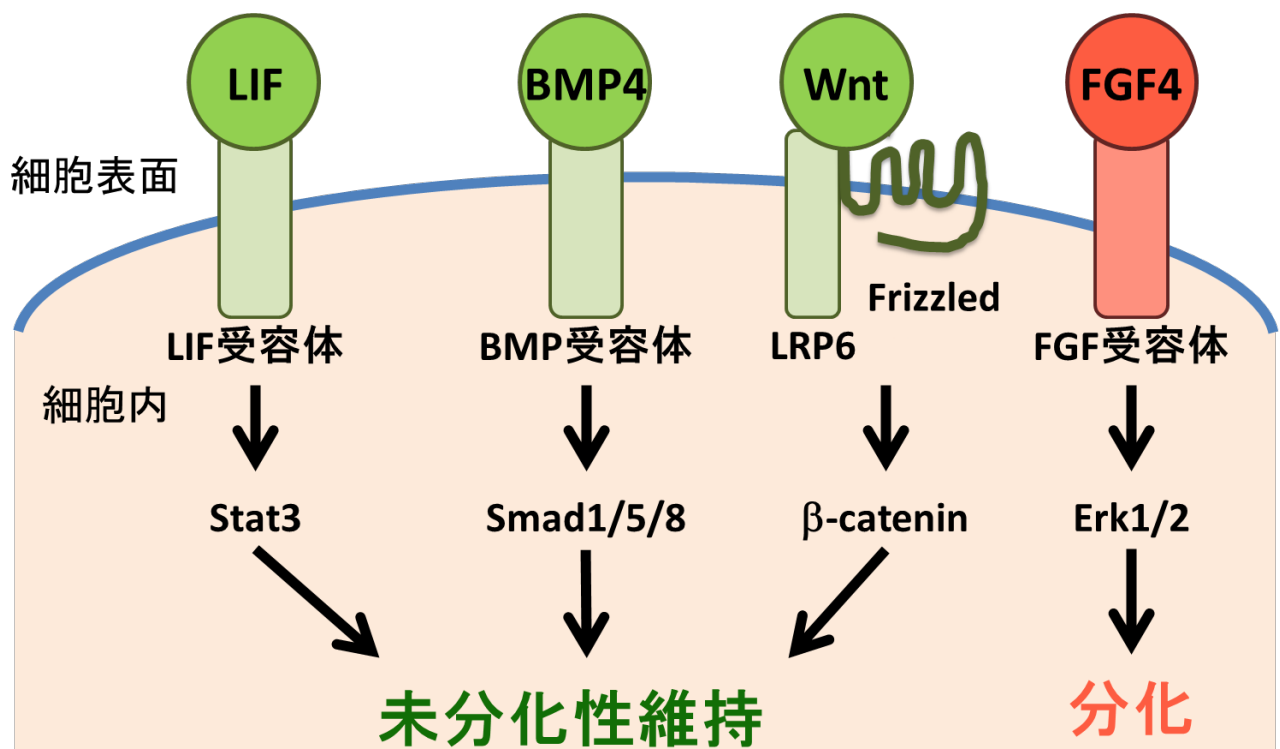


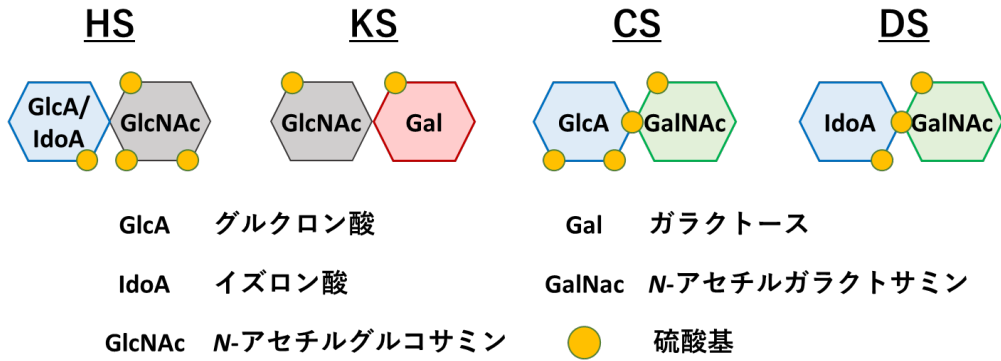
図 2 マウス ES 細胞において作用する主要なシグナル

糖鎖は「第三の生命鎖」とも呼ばれる、翻訳後修飾の一種である。糖鎖は多様な構造を持ち、タンパク質や脂質に付加されている。細胞表面上のタンパク質や分泌されるタンパク質の多くが糖鎖修飾を受けており、多くの重要な生命現象に寄与している。シグナルの制御もその中で一つで、特定の糖鎖構造にシグナルリガンドや受容体が結合する。我々は過去に、①LacdiNAc 構造(GalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc)(14)、②ヘパラン硫酸(HS)(15-18)、③O-GlcNAc(19-21)、④T 抗原(Gal  $\beta$  1-3GalNAc) (22)といった糖鎖がシグナル制御を介してマウス ES 細胞のナীব状態を維持するために必要であることを報告している。

①の LacdiNAc 構造は、マウス ES 細胞がナীব状態の時に多く存在し、分化に伴い減少する。LIF シグナルは、LIF 受容体と gp130(glycoprotein 130)が複合体を形成するこ

とで促進される。LacdiNAc 構造を介して LIF 受容体と gp130 が脂質ラフトの構成因子である Caveolin-1 などと結合して脂質ラフト上に局在することで、LIF 受容体と gp130 との複合体形成が促進し、LIF シグナルが伝達されていた。つまり、LacdiNAc 構造が LIF シグナルを介してマウス ES 細胞の未分化性維持に機能することを明らかにした(14)。②では HS と BMP4 及び Wnt3a が結合して共受容体として機能し、BMP シグナルと Wnt シグナルを促進した(15, 16)。また、3 位が硫酸化された HS がゴルジ体で Fas と結合し、脂質ラフトへの移行が促進されると Fas シグナルが活性化し、下流の Caspase 経路が活性化された。活性化した Caspase-3 が Nanog を分解し、その結果自発的なプライム状態への分化が誘導された(17, 18)。これらの事実は、HS がマウス ES 細胞の未分化性の維持、さらにはナイーブ状態からプライム状態への分化のどちらにも機能することを示している。③の *O*-GlcNAc は細胞質と核に存在する唯一の糖鎖修飾である。マウス ES 細胞において、FGF4 シグナルの構成因子である PKC $\zeta$  (Protein kinase C  $\zeta$ )が *O*-GlcNAc 修飾を受けるとリン酸化が阻害され、下流の Mek(Mitogen-activated protein kinase kinase)-Erk1/2 経路が活性化されずに、未分化性が維持されていた(20)。一方、Psme3(Proteasome activator subunit 3)は 20S プロテアソームと結合し、タンパク質分解を活性化する。Psme3 が *O*-GlcNAc 修飾されると、mRNA の分解や貯蔵を調節する P ボディの形成に必要な Ddx6(DEAD-box helicase 6)が Psme3 に結合し、プロテアソームにおいて分解されることを明らかにした。また、マウス ES 細胞の分化に伴って Ddx6 と P ボディが増加していた。さらに、Psme3 の *O*-GlcNAc 修飾部位に変異挿入すると Ddx6 が分解されずに P ボディが増加し、多能性コア因子である Klf2 や Klf4 の発現がタンパク質レベルで低下すると共に、マウス ES 細胞が分化に向かっていった(21)。すなわち、*O*-GlcNAc 修飾は FGF4 シグナルの抑制やプロテアソームによるタンパク質の分解制御を介した P ボディ形成の阻害によって、マウス ES 細胞のナイーブ状態を維持していることが分かった。④の T 抗原はムチン型 *O*-結合型糖鎖である。Wnt の共受容体である Frizzled-5 は T 抗原を持ち、この T 抗原に Galectin-3 が結合するとエンドサイトーシスにより取り込まれ、Wnt シグナルの過剰な活性化を抑えることで、未分化状態を調節していた(22)。以上①~④で明らかにした事実は、マウス ES 細胞のナイーブ状態を維持するためのシグナルや転写因子の発現の調節に糖鎖が非常に重要な役割を担っていることを示している。

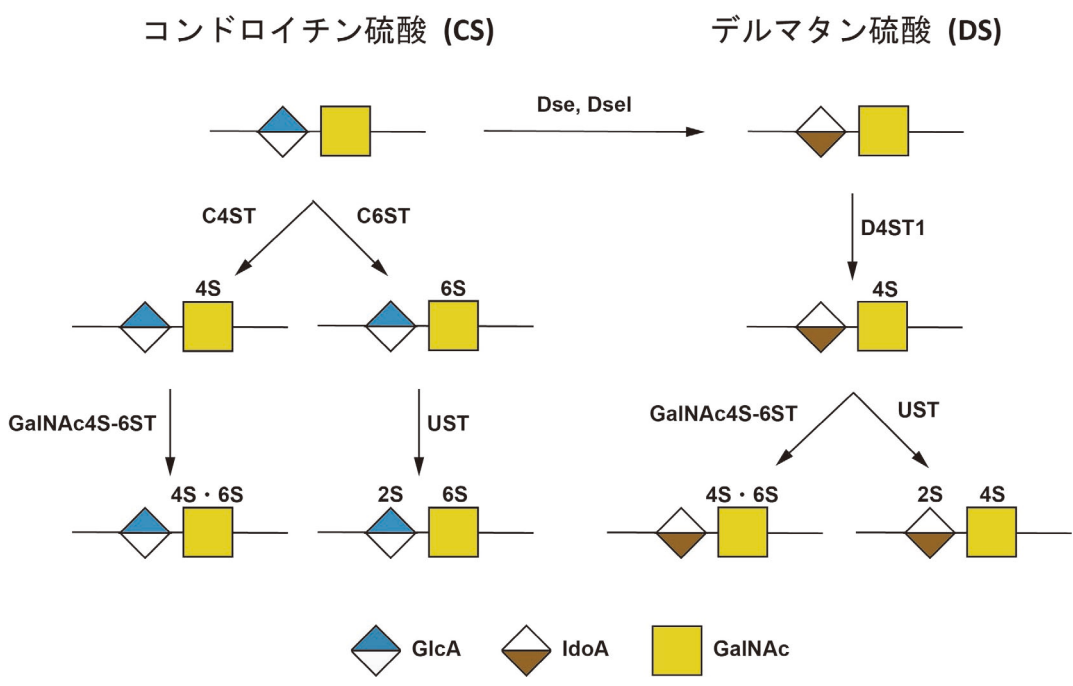
HS などのグリコサミノグリカン(GAG)は、コアタンパク質と結合してプロテオグリカン形成し、細胞表面や細胞マトリックスに存在する。代表的な GAG には、HS、コンドロイチン硫酸(CS)/デルマトン硫酸(DS)、ケラタン硫酸(KS)がある。HS、CS/DS はコアタンパク質のセリン残基(ser)に GlcA $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-3Gal $\beta$ 1-4Xyl $\beta$ -*O*-ser の四糖から成る橋渡し領域(23-25)が結合した先に、それぞれの特徴的な二糖繰り返し構造(図 3)を持つ(26)。一方、KS の二糖構造はコアタンパク質に *N* 結合もしくは *O* 結合で結合している。それぞれの二糖繰り返し構造が硫酸化修飾を受け、二糖構造と硫酸化パターンの組み合わせにより結合できるリガンド分子と受容体が異なる。



**図3 代表的な GAG の二糖繰り返し構造**

前述の通り、これまでに我々と他のグループにより HS がマウス ES 細胞において BMP4、Wnt、FGF4、Fas シグナルの活性を促進することで未分化性維持と分化誘導を制御していることが明らかになっている(15-18, 27-31)。また、マウス ES 細胞の多能性及び分化に CS が必要であること(32)や、KS がヒト ES 細胞のマーカであることも報告されている(33-36)。しかし、マウス ES 細胞における DS の機能に関しては未だに不明なままである。

DS では、CS の二糖構造である *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)とグルクロン酸(GlcA)の GlcA が、Dermatan sulfate epimerase(Dse) (37, 38)と Dermatan sulfate epimerase like(Dsel)(39, 40)によりエピマー化されてイズロン酸(IdoA)となる。その後 Dermatan-4-*O*-sulfotransferase 1(D4ST1)(41)により GalNAc の 4 位に硫酸基が転移され、続いて GalNAc の 6 位が *N*-acetylgalactosamine-4-sulfate 6-*O*-sulfotransferase (GalNAc4S-6ST)(42)に、もしくは IdoA の 2 位が Uronyl-2-sulfotransferase(UST)(43)により硫酸化修飾を受ける。D4ST1 は DS 特異的に機能するが、GalNAc4S-6ST と UST は CS でも機能することが知られている(44)(図4)。



**図4 CS/DS 合成経路**

これまでに、マウスの神経幹細胞からの分化に *D4ST1* が必要であることが報告されている(45)。*D4ST1*, *Dse* のノックアウトマウスは、体の大きさと生存率が低下し、皮膚の脆弱性が増す(46, 47)。また、*D4ST1* は、現在根本的な治療法が開発されていない、エーラス・ダンラス症候群(EDS)の原因遺伝子とされている。EDS とは、皮膚と関節が伸びやすく、血管がもろく出血しやすくなる病気である(48, 49)。*D4ST1*, *Dse* のノックアウトマウスが示す皮膚の表現型は、EDS の症状と同じである。一方、*Dsel* のノックアウトマウスでは明らかな表現型は認められていない(50)。*Dsel* は脳での発現が多く、またヒトにおいては先天性のうつ病に関与していると報告されている(51)。これらの報告から、*Dse* は *Dsel* と機能が異なるのではないかと考えられている。

以上の背景を基に、本研究では、これまでにマウス ES 細胞における機能が明かされていない DS の機能を明らかにするため、①精製した DS を添加した幹細胞の神経分化実験及び、②マウス ES 細胞における硫酸転移酵素である *D4ST1* のノックダウン実験と過剰発現実験を行った。①では DS がマウス ES 細胞とヒト神経幹細胞の神経分化を促進すること、②では *D4ST1* がマウス ES 細胞の未分化性と自己複製能に必要なことを新規に明らかにした。

## 2. 方法

### 2-1. 使用したデルマタン硫酸ナトリウムについて

本研究では、マウス ES 細胞及びヒト神経幹細胞の神経分化誘導実験において、ニワトリ由来のデルマタン硫酸ナトリウム(東京化成工業, 東京)を、それぞれの培地に溶解して添加した。

### 2-2. マウス ES 細胞の培養

マウス ES 細胞(R1 株)(52)は、マウス ES 細胞用培地(DMEM(Gibco, ニューヨーク, アメリカ), 15% ウシ胎児血清(Nichirei Bioscience, 東京), 1% ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco), 0.1mM 2-メルカプトエタノール(Gibco), 0.1mM 非必須アミノ酸(Gibco))に 1000U/ml LIF(オリエンタル酵母, 東京)を添加して培養した。ゼラチンコートしたディッシュ(日本ジェネティクス, 東京)にマウス胎児繊維芽細胞(MEF)を接着させ、その上にマウス ES 細胞を  $5 \times 10^5$  個となるように播種した。継代と培地交換を 1 日おきに行い、細胞を回収する時は 0.25% トリプシン-EDTA(Gibco)を用いた。MEF は 10 $\mu$ g/ml マイトマイシン C(Sigma, シドニー, オーストラリア)処理をして不活性化したものを使用した。

マウス ES 細胞の神経分化誘導時には、まず LIF を除いて低接着ディッシュ(住友ベークライト, 東京)で浮遊培養して胚様体(Embryonic body; EB)を形成した。EB 4 日目(EB day4)に 1 $\mu$ M レチノイン酸(Sigma)を添加後、EB day6 に 15 $\mu$ g/ml ポリ-L-オルニチン(Sigma)/4 $\mu$ g/ml ラミニン(Cornig, ニューヨーク, アメリカ)コートしたディッシュに接着させて神経分化用培地(DMEM/F-12(Gibco), 1% N2 サプリメント(Gibco), 1% ペニシリン/ストレプトマイシン)を用いて培養した。神経分化誘導中には、1 日おきに培地交換を行い、DS は EB day0 の時点から 100 $\mu$ g/ml で添加した(図 5)。

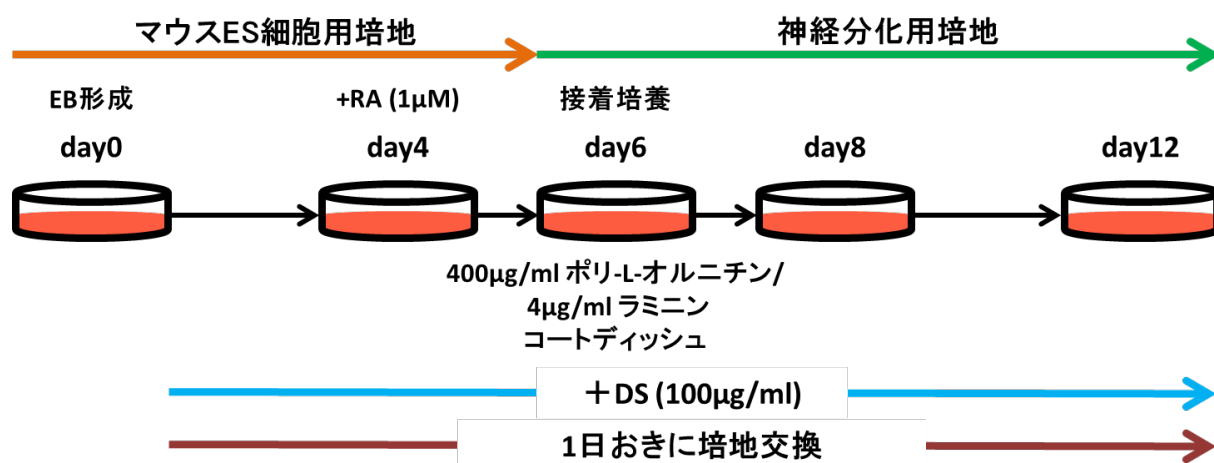


図 5 マウス ES 細胞の神経分化誘導方法



### 2-3. ヒト神経幹細胞の培養

14 週胎児(男性)の脳皮質由来初代神経幹細胞(PhoenixSongs Biologicals, コネチカット, アメリカ)を使用した。ポリ-L-オルニチン/ラミニンコートしたディッシュに播種し、ヒト神経幹細胞用培地(DMEM/F-12(Gibco), N2 サプリメント, 0.1% B-27 サプリメント(Gibco))に 10ng/ml bFGF(wako, 大阪)と 20ng/ml EGF(Epidermal growth factor)(PeproTech, ニュージャージー, アメリカ)を添加して培養した(53)。

ヒト神経幹細胞の神経分化誘導時には、培地を神経分化用培地(Neurobasal(Gibco), 2% B-27 サプリメント, 0.5mM GlutaMAX(Gibco))に変更し、DS は誘導 0 日目から 10 $\mu$ g/ml で添加した。

### 2-4. トランスフェクション

マウス ES 細胞において、RNA 干渉を利用して *D4ST1* を一過的にノックダウン(KD)するため、pSilencer 3.1-H1 を用いて siRNA 発現ベクターを作製した。用いた siRNA 配列は siDirect(<http://sidirect2.rnai.jp/>)で 2 種類設計した(54)。コントロールには、*EGFP* に対する siRNA 配列を作製した。これらの配列を含むオリゴ DNA をアニーリングして二本鎖にした後、pSilencer 3.1-H1 の HindIII 及び BamH I 認識部位間に挿入した。本研究で用いた KD 配列を以下に示す。

*Egfp*: 5'-GATCCCGCCACAACGTCTATATCATGGGGAAAATCCATGATATAGACGTTGTGGCTTTTTTGGAAA-3';

*D4ST1* KD1: 5'-GATCCCCAGCACTACTTCAAGTTCCTGTTTGGCTTCCTGTCACCAAACAGGAAGTGAAGTAGTGCTGTTTTTTTA-3';

*D4ST1* KD2: 5'-GATCCCTCCTCTTGCTAGGTCTGAATCATTTGCTTCCTGTCACAAATGATTCAGACCTAGCAAGAGGATTTTTTTTA-3'.

また、*D4ST1* の過剰発現(O/E)のために pCAGI-Puro(程先生より寄贈)を用いて過剰発現ベクターを作製した。ベクターの作製には pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector Systems(Promega, ウィスコンシン, アメリカ)を使用した(55)。過剰発現実験では、空ベクターをコントロールとした。

トランスフェクションの前日にゼラチンコートした 6cm ディッシュ上にマウス ES 細胞を 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 個播種し、16 時間後に作製したベクター(4 $\mu$ g)を Lipofectamine 2000 (Invitrogen, マサチューセッツ, アメリカ)を用いてトランスフェクションした。さらに 24 時間後(TF day1)に 2 $\mu$ g/ml ピューロマイシン(Sigma)を培地に添加し、セレクションを開始した。TF day2 に *D4ST1* O/E 細胞、TF day4 に *D4ST1* KD 細胞をそれぞれ回収し、各種解析を行った。

## 2-5. リアルタイム PCR 解析

TRIzol Reagent(Invitrogen)を用いて回収した細胞からtotal RNAを抽出し、25ng/ $\mu$ l Oligo dT Primer(Invitrogen)、0.5mM dNTPs(Invitrogen)、10units/ $\mu$ l Super Script II (Invitrogen)、2units/ $\mu$ l RNase OUT(Invitrogen)、10mM DTT(Invitrogen)により逆転写反応を行った。その後、0.1units/ $\mu$ l RNase H(Invitrogen)処理をし、cDNAサンプルとした。

作製したcDNAサンプルとFast Start Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche, バーゼル, スイス)を各目的遺伝子特異的なプライマー(表 1)と共に混合し、リアルタイム PCR 反応により各遺伝子の mRNA 発現量を定量した。PCR 反応、及び解析にはQuantStudio 12K Flex リアルタイム PCR システム(Applied Biosystems, マサチューセッツ, アメリカ)を使用した。

遺伝子の絶対定量では、pGEM-T Easy Vector Systems (Promega)を用いて *Dse*, *Dsel*, *D4ST1* を pGEM-T ベクターに挿入して検量線を作成し、コピー数を測定した。

表 1 リアルタイム PCR で使用したプライマー配列

遺伝子名	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>m.Gapdh</i>	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
<i>m.Dse</i>	CCCACAGCTTCTCCTTCTTG	CTCCTCAAAGGGACATCCA
<i>m.Dsel</i>	GAGCTTCTGGATGTATGGAG	CTGAACCAGGGAGTGAGG
<i>m.D4ST1</i>	GCCTGCTCTAACTGGAAACG	CTGCCAGAAACACCAAGTCA
<i>m.Nestin</i>	TGCAGACACCTGGAAGAAGTTC	CCCAAGGAAATGCAGCTTCA
<i>m.Musashi1</i>	GGTGGCCTTTCTCGAAGAG	GCCCCCCCACGAAGATC
<i>m.Pax6</i>	AACCTGGCTAGCGAAAAGCA	CCCGTTCAACATCCTTAGTTTATCA
<i>m.Mash1</i>	CCTCCCCAAACCCACAT	ACAAAGATTGGAAGCATTCTATGAAG
<i>m.NeuroD1</i>	CCAGCCCACTACCAATTTGG	GGGTTCTGCTCAGGCAAGAA
<i>m.<math>\beta</math>-III-tubulin</i>	ATCAGCAAGGTGCGTGAGGAG	ATGGACAGGGTGGCGTTGTAG
<i>m.Map2</i>	TGCCTCTAGCAGCCGAAGA	GTTTGTCTGAGGCTGGCGA
<i>m.Cdk5r1</i>	CCACTTGCATGCTAAGGCCT	CCTCCCCCAACGATACAG
<i>m.Tau</i>	TCCGCACTCCCCCTAAGTC	GTCTGGCATGGGCACAGG
<i>h.GAPDH</i>	CAAAGTTGTCATGGATGACC	CCATGGAGAAGGCTGGGG
<i>h.DSE</i>	GAGTCCCTTGGAGACAGCAG	GCCAGTATCGTCCATCCAGT
<i>h.DSEL</i>	TCTGGTATGATCCCCAGCTC	ACCCAGCCCCATAAGTAACC

<i>h.D4ST1</i>	TCCAAGGAAAGGAAAACGGAAG	CAGCCACAGTCACAACCTCAAAG
<i>m.β-actin</i>	GCTCTGGCTCCTAGCACCAT	GCCACCGATCCACACAGAGT
<i>m.Oct3/4</i>	CTCACCCCTGGGCGTTCTCT	AGGCCTCGAAGCGACAGA
<i>m.Nanog</i>	CAGAAAAACCAAGTGGTTGAAGACTAG	GCAATGGATGCTGGGATACTC
<i>m.Sox2</i>	GTGGAAACTTTTGTCCGAGACC	CGCAGCCGCTTGGC
<i>m.Fgf5</i>	GCAGCCCACGGGTCAA	CGGTTGCTCGGACTGCTT
<i>m.Otx2</i>	CATGATGTCTTATCTAAAGCAACCG	GTCGAGCTGTGCCCTAGTA
<i>m.T</i>	TGCTGCAGTCCCATGATAACTG	ATGACTCACAGGCAGCATGCT
<i>m.Mixl1</i>	GCACGTCGTTTCAGCTCGGAGCAGC	AGTCATGCTGGGATCCGGAACGTGG
<i>m.Sox17</i>	GCACAACGCAGAGCTAAGCA	CTGCCAAGGTCAACGCCT
<i>m.Cdx2</i>	GAGCTGGCTGCCACACTTG	GCTTCTTCTTGATTTTCCTCTCCTT
<i>m.Gata6</i>	CCCCTCATCAAGCCACAGAA	GTGACAGTTGGCACAGGACAGT

## 2-6. DS / CS 二糖構造解析

マウス ES 細胞の EB day0 と EB day12 をセルスクレーパーで回収し、ペレット状にした。細胞ペレットを超音波破碎後、アクチナーゼ E(科研製薬, 東京)を用いてタンパク質を分解した。5% トリクロロ酢酸でタンパク質除去、ジエチルエーテル抽出によってトリクロロ酢酸を除去した後、Amicon Ultra-4(3K)(Merk, ダルムシュタット, ドイツ)を使用して脱塩を行った。さらに、コンドロイチナーゼ(CSase)ABC、CSaseAC-II、CSaseB で DS/CS、CS、DS をそれぞれ消化し、2-aminobenzamide(2AB)で蛍光標識した後、ポリアミンカラム PA-G(YMC, 京都)を用いた陰イオン交換 HPLC を行った(56, 57)。二糖構造量は、それぞれのクロマトグラムのピーク面積を測定することで定量した。

## 2-7. 免疫染色

マウス ES 細胞を神経分化誘導した細胞に対して免疫染色を行う際には、EB day6 にポリ-L-リジンコートされたカバーガラス(Iwaki, 東京)上に細胞を播種した。マウス ES 細胞は EB day12、ヒト神経幹細胞は神経分化誘導 7 日目に 4% パラホルムアルデヒド(Wako)/PBS(ニッスイ, 東京)で固定し、ブロッキングバッファー(5% BSA(Iwai), 0.3% Triton X-100(Sigma)/PBS)を用いてブロッキング反応を行った。一次抗体反応後に、蛍光ラベルされた二次抗体と核染色色素である Hoechst(Invitrogen)を共に反応させた。観察には LSM700 confocal laser microscope(Carl Zeiss, オーバーコッペン, ドイツ)を使用した。本研究で用いた抗体は表 2 に示す。

## 2-8. ウェスタンブロット解析

回収した細胞を、可溶化バッファ(50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl(Wako), 1% Triton X-100, 5mM EDTA(Sigma), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>(Sigma), 10mM NaF(Wako), 100mM PMSF(Sigma), 200μg/ml Leupeptin(Sigma), 100μg/ml Pepstatin A(Sigma), 200μg/ml Aprotinin(Sigma), 100μg/ml Antipain(Sigma))を用いて可溶化した。タンパク質サンプルを用いてSDS-PAGEを行った後、セミドライ法でタンパク質をPVDFメンブレン(Milipore, マサチューセッツ, アメリカ)に転写した。転写後に、ブロッキングバッファ(1% BSA, 0.1% Tween20(Sigma)/TBS)を用いて室温で1時間ブロッキング反応を行った。一次抗体反応後に TBST(0.1% Tween20/TBS)でメンブレンを洗浄し、HRP 標識された二次抗体と反応させた。メンブレンを TBST で再び洗浄後、ECL plus(GE Healthcare, イリノイ, アメリカ)で化学発光させ、X 線フィルムで検出した。本研究で用いた抗体は表 2 に示す。

表 2 免疫染色、ウェスタンブロット解析で使した抗体

抗体	メーカー	希釈濃度
Gapdh	Santa Cruz, テキサス, アメリカ	1:1000
p-Erk1/2	Cell Signaling, マサチューセッツ, アメリカ	1:2000
Erk1/2	Cell Signaling	1:2000
p-Stat3	BD Biosciences, ニュージャージー, アメリカ	1:1000
Stat3	BD Biosciences	1:1000
Active-β-catenin	Cell Signaling	1:2000
β-catenin	Cell Signaling	1:2000
p-Smad1/5/8	Cell Signaling	1:2000
p-Smad5	Novus, コロラド, アメリカ	1:1000
Smad5	Novus	1:1000
β-III-tubulin	Millipore	1:200
DCX	Santa Cruz	1:500
β-actin	Sigma	1:10000
CHST14	Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ, アメリカ	1:1000
Nanog	Santa Cruz	1:1000
mouse IgG Cy3	Thermo Fisher	1:1000
goat IgG CF568	Biotium, カリフォルニア, アメリカ	1:500
mouse IgG HRP	Cell Signaling	1:10000
rabbit IgG HRP	Cell Signaling	1:10000

## 2-9. 細胞遊走アッセイ

ディッシュの中央をポリ-L-オルニチン/ラミニンコートし、ヒト神経幹細胞を播種した。接着後、細胞遊走の足場となる 0.25% マトリゲル(Corning, ニューヨーク, アメリカ)を加えた神経分化誘導用培地に置き換え、遊走した細胞数をカウントした。DS は誘導 0 日目から 10 $\mu$ g/ml で添加した(図 6)。

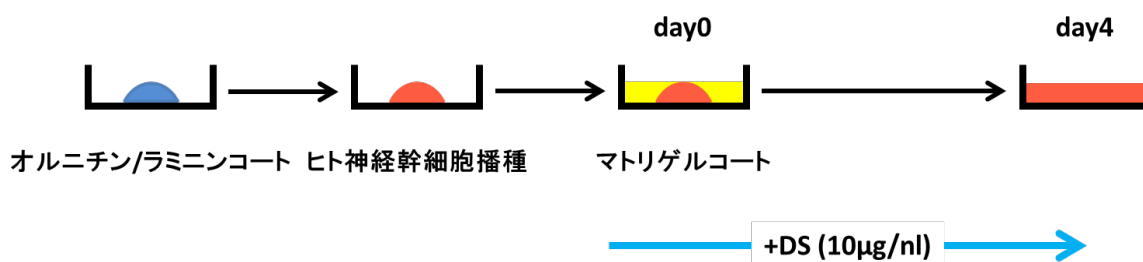


図 6 ヒト神経幹細胞の細胞遊走アッセイ方法

## 2-10. アルカリフォスファターゼ(ALP)染色

マウス ES 細胞をゼラチンコートした 24well プレートに 1.25 $\times$ 10<sup>5</sup> 個/well になるように播種した日を 0 日目として、5 日目に StemTAG™ Alkaline Phosphatase Staining Kit(Cell Biolabs, カリフォルニア, アメリカ)を用いて ALP 染色した後に、ALP 陽性コロニー数をカウントした。

## 2-11. 細胞増殖アッセイ

TF day4 の *D4ST1* KD マウス ES 細胞をゼラチンコートした 96well プレートに 8 $\times$ 10<sup>3</sup> 個/well になるように播種し、24 時間後に生細胞数をカウントした。

## 2-12. 統計解析

本研究における統計的有意差は、DS 添加実験及び *D4ST1* O/E 実験においては t 検定、*D4ST1* KD 実験では Dunnett 検定を用いて評価した。アスタリスクは統計的有意差を表している(n.s.,  $P > 0.05$ ; \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ )。

### 3. 結果

#### 3-1 幹細胞の神経分化における DS の機能

##### 3-1-1. マウス ES 細胞からの EB 形成に伴う DS 合成関連酵素の発現

まず始めに、DS 特異的な合成関連酵素である Dse、Dsel、D4ST1 に着目し、マウス ES 細胞の三胚葉分化(内胚葉、中胚葉、外胚葉)を模倣している EB を形成させて、各遺伝子の mRNA 発現量を検討した。リアルタイム PCR 解析の結果、*Dsel* 及び *D4ST1* の mRNA 発現量が EB 形成に伴って増加していることが分かった(図 7)。特に、神経細胞といった外胚葉分化に対応している EB day12 において *D4ST1* の mRNA 発現量が有意に増加していた。D4ST1 がマウス神経前駆細胞の分化に必要であること(45)、*Dsel* がマウスの脳において発現していること(58)が報告されており、また、EB 形成に伴って *Dsel* と *D4ST1* の mRNA 発現量が増加していることから、*Dsel* 及び *D4ST1* がマウス ES 細胞の神経分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

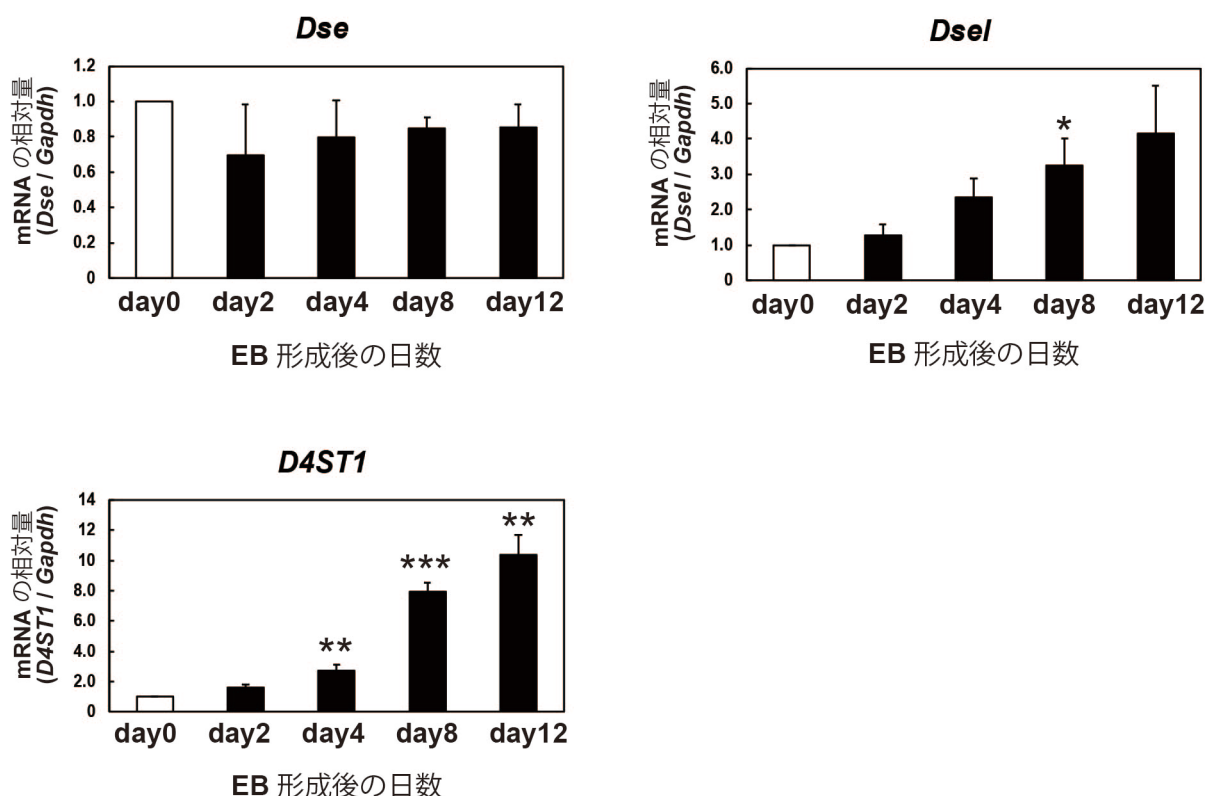


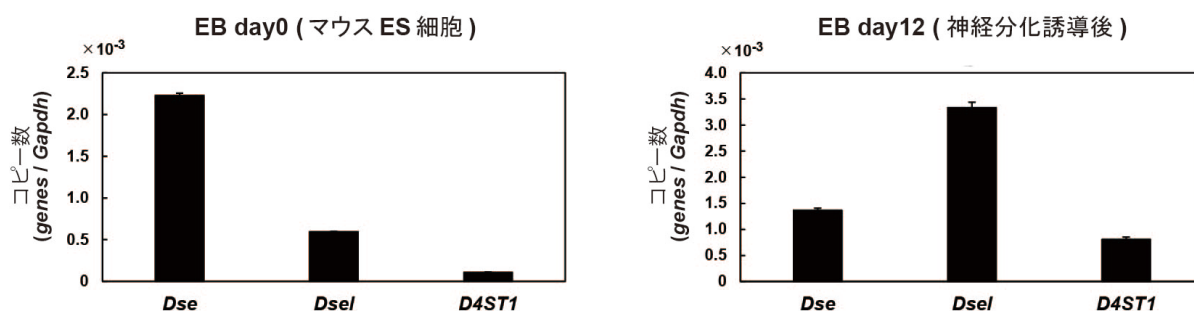
図 7 マウス ES 細胞の EB 形成に伴い *Dsel* と *D4ST1* の発現が増加した

マウス ES 細胞から EB を形成し、EB day0, 2, 4, 8, 12 における DS 合成関連酵素の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。N=3, EB day0=1, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

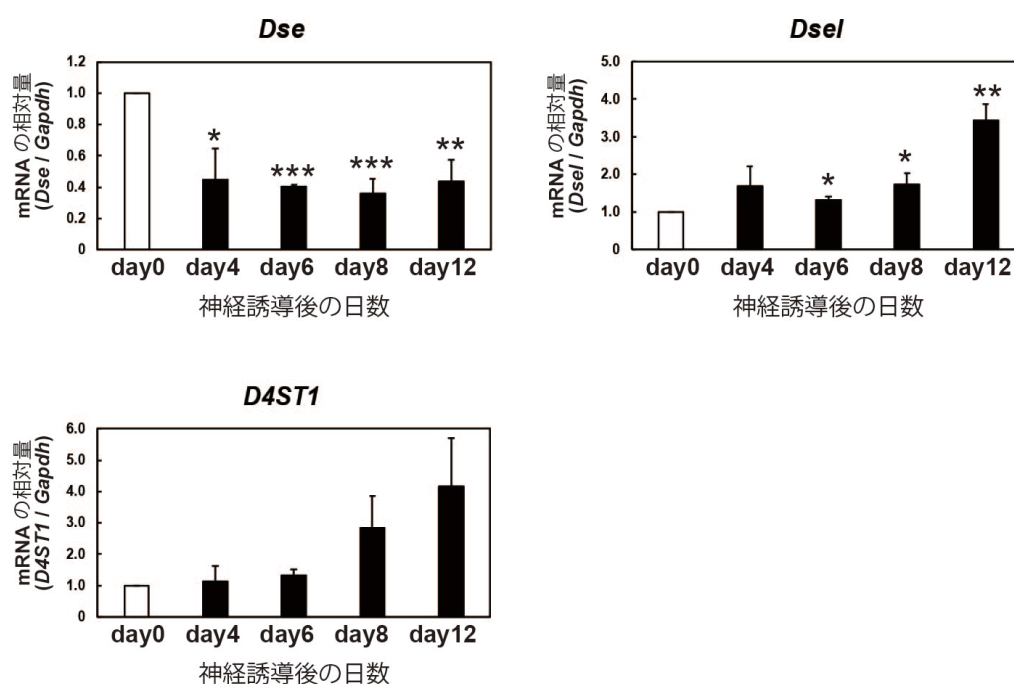
### 3-1-2. DS 添加によるマウス ES 細胞の神経分化への影響

マウス ES 細胞の神経分化における DS の機能を明らかにするため、マウス ES 細胞を神経分化誘導し(図 5)、DS 合成関連酵素の mRNA 発現量を検討した。マウス ES 細胞(EB day0)と神経分化誘導後の細胞(EB day12)における DS 合成関連酵素の絶対量を定量したところ、マウス ES 細胞では *Dse*、*Dsel*、*D4ST1* の順番で発現量が多く、EB day12 では *Dsel*、*Dse*、*D4ST1* の順番で発現量が多かった(図 8A)。また、神経分化に伴い、*Dsel* 及び *D4ST1* の mRNA 発現量は増加し、*Dse* の mRNA 発現量は低下していた(図 8B)ことから、神経分化に伴い DS 構造が増加していることが考えられた。そこで、EB day0 と EB day12 において、それぞれの細胞を DS 特異的に作用する CSaseB で処理し、蛍光標識後、陰イオン交換 HPLC を用いて二糖構造解析を行った。その結果、マウス ES 細胞が神経分化するのに伴って DS 二糖構造、特に GalNAc の 4 位が硫酸化されている構造が有意に増加していた(図 8C)。

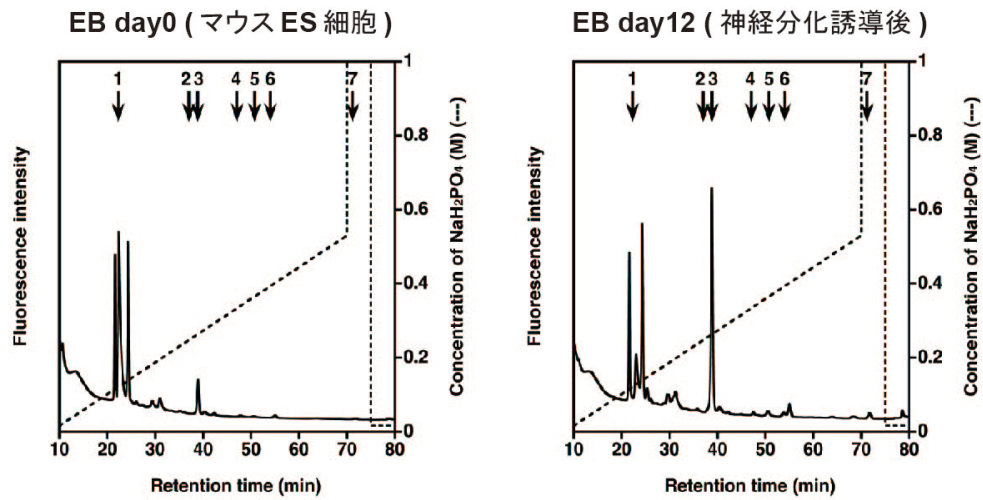
**A**



**B**



C



	EB day0 (マウス ES 細胞)	EB day12 (神経分化誘導後)
	<i>pmol disaccharide /mg protein</i>	
$\Delta$ HexUA-GalNAc	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA-GalNAc(4S)	22 ± 2.6	54 ± 1.3*
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S)	N.D.	1.9 ± 0.1
$\Delta$ HexUA-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.
<b>DS 二糖構造</b>	22 ± 2.6	56 ± 1.3*

図8 マウス ES 細胞の神経分化に伴い *Dsel* と *D4ST1* の発現及び DS 二糖構造が増加した

A: マウス ES 細胞を神経分化誘導し、EB day0, 12 における DS 合成関連酵素の発現を絶対定量した。N=3.

B: マウス ES 細胞を神経分化誘導し、EB day0, 4, 8, 12 における DS 合成関連酵素の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。N=4, EB day0=1, \*P<0.05; \*\*P<0.01; \*\*\*P<0.001.

C: 二糖構造解析により、EB day0, 12 における DS の二糖構造量を定量した。ヒストグラム(上)は、HPLC の結果を示している。ヒストグラム内の矢印は、検出したそれぞれの二糖構造を示している。

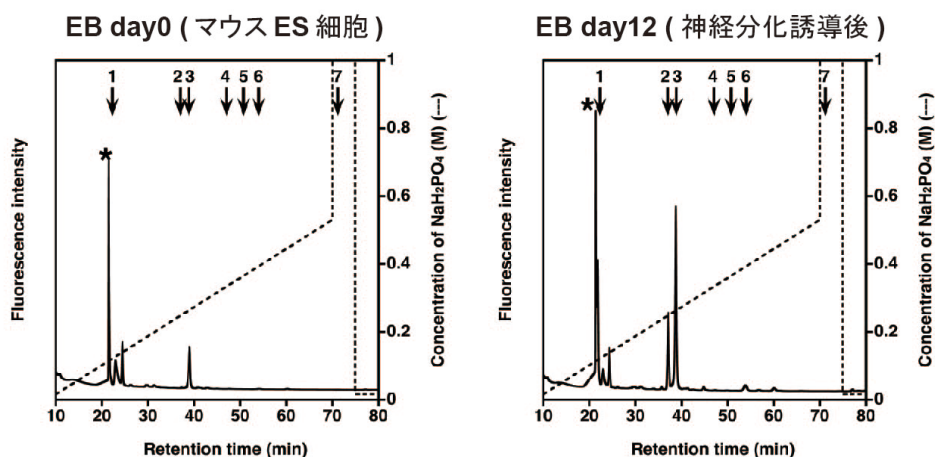
(1) $\Delta$ 4,5-unsaturated hexuronic acid (HexUA)-GalNAc; (2) $\Delta$ HexUA-GalNAc(6S); (3) $\Delta$ HexUA-GalNAc(4S); (4) $\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(6S); (5) $\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S); (6) $\Delta$ HexUAGalNAc(4S,6S); (7) $\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S,6S).

N=3, ND: Not detected, \*P<0.05.



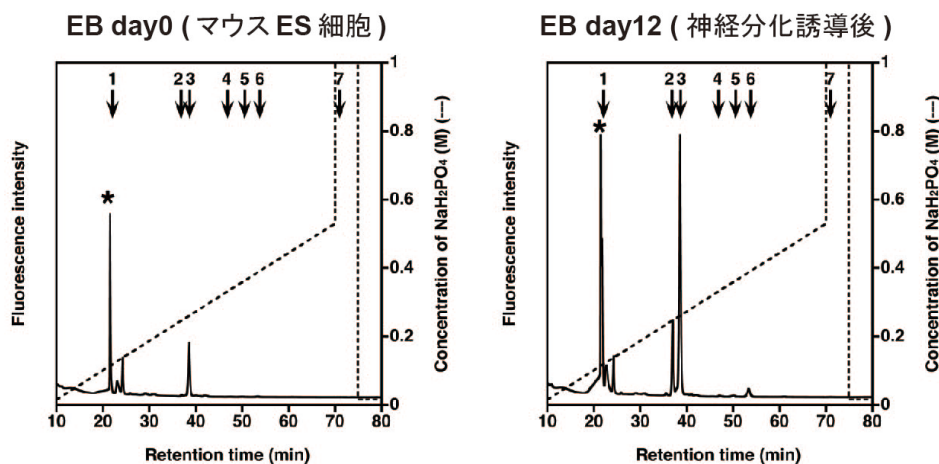
CSaseB 処理に加えて、EB day0 と EB day12 の細胞を CS と DS の両糖鎖を二糖単位で切断する CSaseABC で処理し、蛍光標識後、陰イオン交換 HPLC を用いて二糖構造解析を行った。CS のみ、さらには CS と DS を区別せずに CS/DS の総量を算出し、図 9 に示した。神経分化に伴って CS(図 9A)及び CS/DS(図 9B)の多くの二糖構造が顕著に増加していることが明らかになった。一方、硫酸化糖鎖の一種であるヒアロロン酸(HA)の二糖構造には変化が認められなかった(図 9C)。二糖解析により、マウス ES 細胞の神経分化では DS 及び CS は増加するが、HA は分化前と比較して変化が無いことが分かった。

**A**



	EB day0 (マウス ES 細胞)	EB day12 (神経分化誘導後)
	<i>pmol disaccharide /mg protein</i>	
$\Delta$ HexUA-GalNAc	N.D.	100 ± 1.3
$\Delta$ HexUA-GalNAc(6S)	N.D.	73 ± 1.0
$\Delta$ HexUA-GalNAc(4S)	91 ± 21	207 ± 5.7**
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S)	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA-GalNAc(4S,6S)	N.D.	11 ± 0.2
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.
<b>CS 二糖構造</b>	91 ± 21	390 ± 7.0*

**B**



	EB day0 (マウス ES 細胞)	EB day12 (神経分化誘導後)
	<i>pmol disaccharide /mg protein</i>	
$\Delta$ HexUA-GalNAc	N.D.	110 $\pm$ 1.8
$\Delta$ HexUA-GalNAc(6S)	N.D.	73 $\pm$ 1.3
$\Delta$ HexUA-GalNAc(4S)	151 $\pm$ 30	410 $\pm$ 60*
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(6S)	N.D.	N.D.
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S)	N.D.	2.4 $\pm$ 0.1
$\Delta$ HexUA-GalNAc(4S,6S)	N.D.	15 $\pm$ 0.4
$\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S,6S)	N.D.	N.D.
<b>CS/DS 二糖構造</b>	151 $\pm$ 30	611 $\pm$ 63**

**C**

	EB day0 (マウス ES 細胞)	EB day12 (神経分化誘導後)
	<i>pmol disaccharide /mg protein</i>	
$\Delta$ HexUA-GlcNAc	380 $\pm$ 45	465 $\pm$ 10 <sup>n.s.</sup>

**図9** マウス ES 細胞の神経分化に伴い DS と CS の二糖構造が増加した

A, B, C: 二糖構造解析により、EB day0, 12 における CS (A)、CS/DS (B)、HA (C) の二糖構造量を定量した。ヒストグラム(上)は、HPLC の結果を示している。ヒストグラム内の矢印は、検出したそれぞれの二糖構造を示している。

(1) $\Delta$ 4,5-unsaturated hexuronic acid (HexUA)-GalNAc; (2) $\Delta$ HexUA-GalNAc(6S); (3) $\Delta$ HexUA-GalNAc(4S); (4) $\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(6S); (5) $\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S); (6) $\Delta$ HexUAGalNAc(4S,6S); (7) $\Delta$ HexUA(2S)-GalNAc(4S,6S).

*N* = 3, ND: Not detected, \**P* < 0.05; \*\**P* < 0.01.

次に、マウス ES 細胞の神経分化誘導時に精製された DS を添加した。EB day12 において神経幹細胞マーカーである *Nestin*、*Musashi1*、神経前駆細胞マーカーである *Pax6* (*Paired box 6*)、未熟ニューロンマーカーである *Mash1*、*NeuroD1* (*Neuronal differentiation 1*)、成熟ニューロンマーカーの  $\beta$ -III-tubulin (*Tubulin beta 3 class III*)、*Map2* (*Microtubule associated protein 2*) の mRNA 発現量がコントロールと比較して増加していた(図 10)。この事実より、DS 添加により、マウス ES 細胞の神経分化が促進されたことが示された。

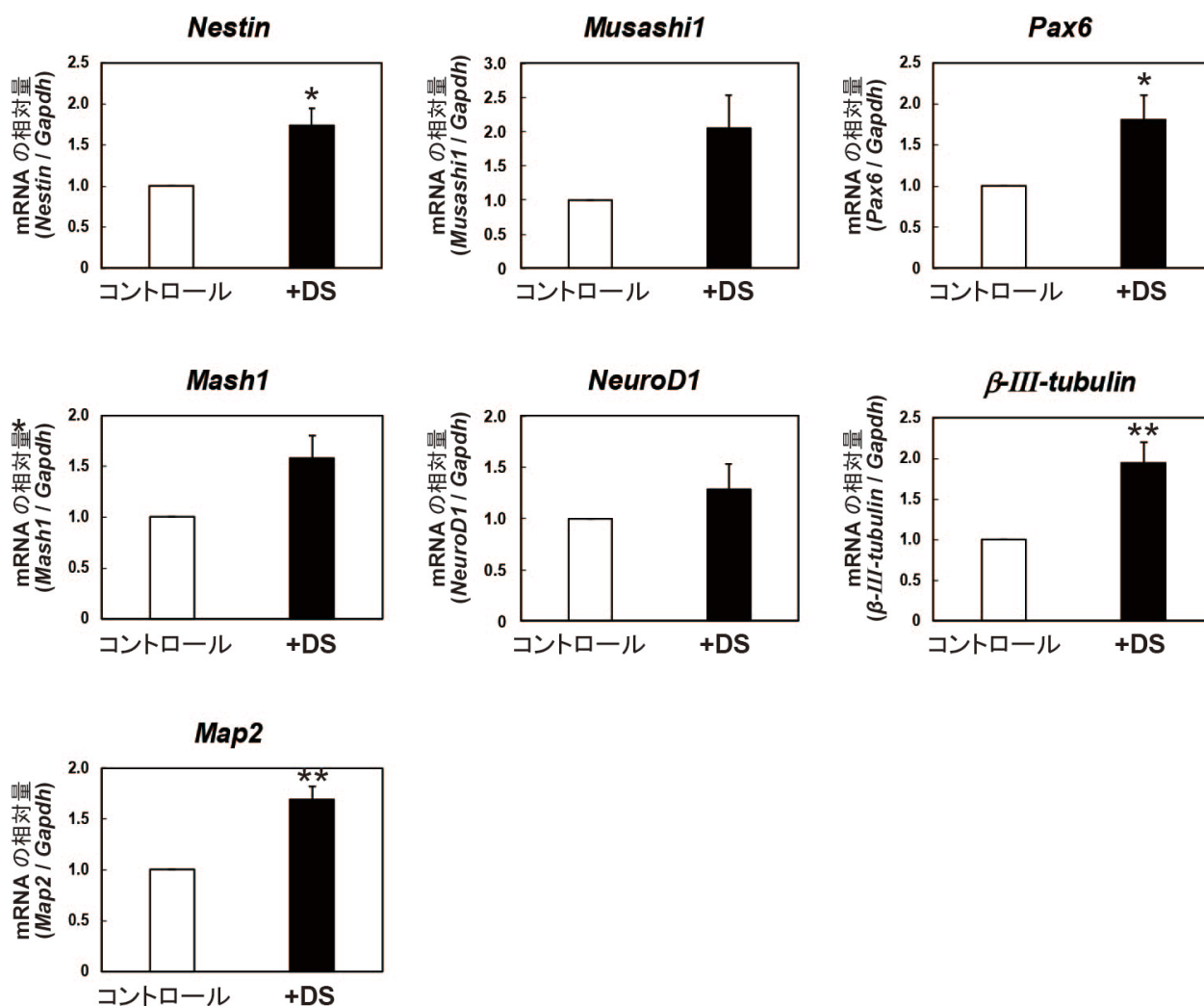
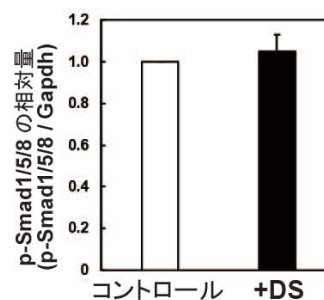
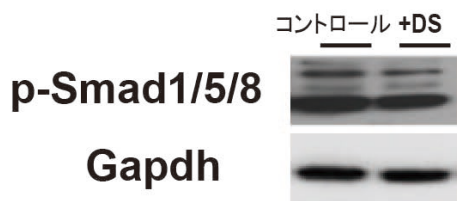
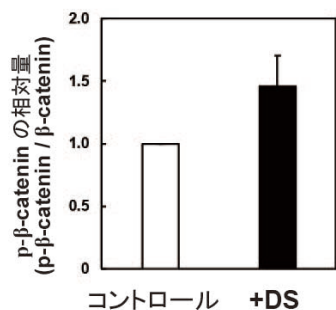
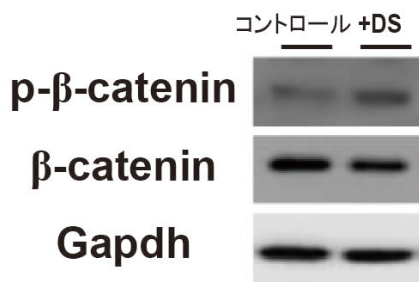
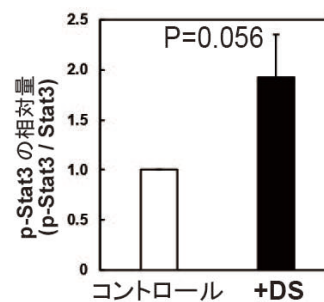
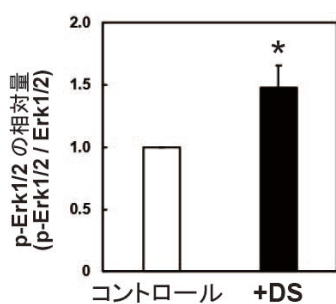
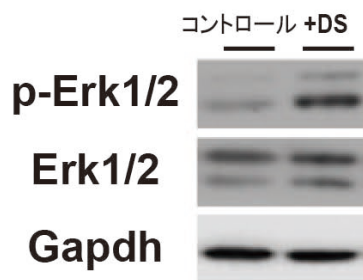


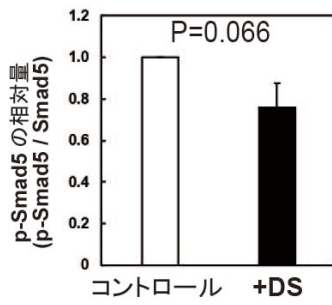
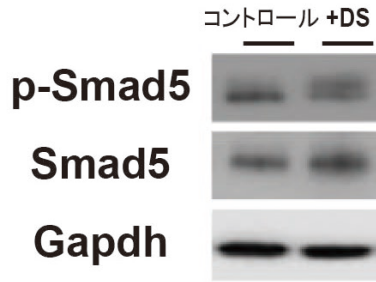
図 10 DS 添加によりマウス ES 細胞の神経分化が促進した

マウス ES 細胞を神経分化誘導し、EB day12 における神経分化マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。DS は 100 $\mu$ g/ml で添加した。

$N=4$ , コントロール=1, \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ .

DS がマウス ES 細胞の神経分化においてシグナルに影響を及ぼすかを検討するため、EB day12 においてウェスタンブロット解析を行った。コントロールと比較して、DS 添加により Erk1/2 と Stat3 は活性化し、 $\beta$ -catenin と Smad1/5/8 の活性に有意な変化は無く、Smad5 においては活性が低下していた(図 11)。DS が Erk1/2 と Stat3 を活性化し、Smad5 の活性を抑制することでマウス ES 細胞からの神経分化を促進したと考えられた。





**図 11 DS 添加により Erk1/2 と Stat3 が活性化した**

マウス ES 細胞を神経分化誘導し、EB day12 におけるシグナルの変化をウエスタンブロット解析により検討した。DS は 100 $\mu$ g/ml で添加した。

$N=6$ , コントロール=1, \* $P<0.05$ .

### 3-1-3. DS 添加による神経突起伸長への影響

マウス ES 細胞の神経分化誘導時における形態を観察した(図 12A)。EB の外周と面積を測定したところ、EB のサイズにおいては、DS 添加による変化は観察されなかった。そこで、EB から伸長している神経突起を  $\beta$ -III-tubulin で染色した(図 12B)。EB 1 個あたりの長さとな数を測定した結果、DS の添加により増加していた。さらに、神経突起を伸長する *Cdk5r1* (*Cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit 1*) と *Tau* (*Microtubule associated protein Tau*) の mRNA 発現量を検討すると、DS 添加により両遺伝子の mRNA 発現量が増加していた(図 12C)。これらの結果により、マウス ES 細胞の神経分化誘導時に DS を添加することで、神経分化と神経突起伸長が促進されることが明らかになった。

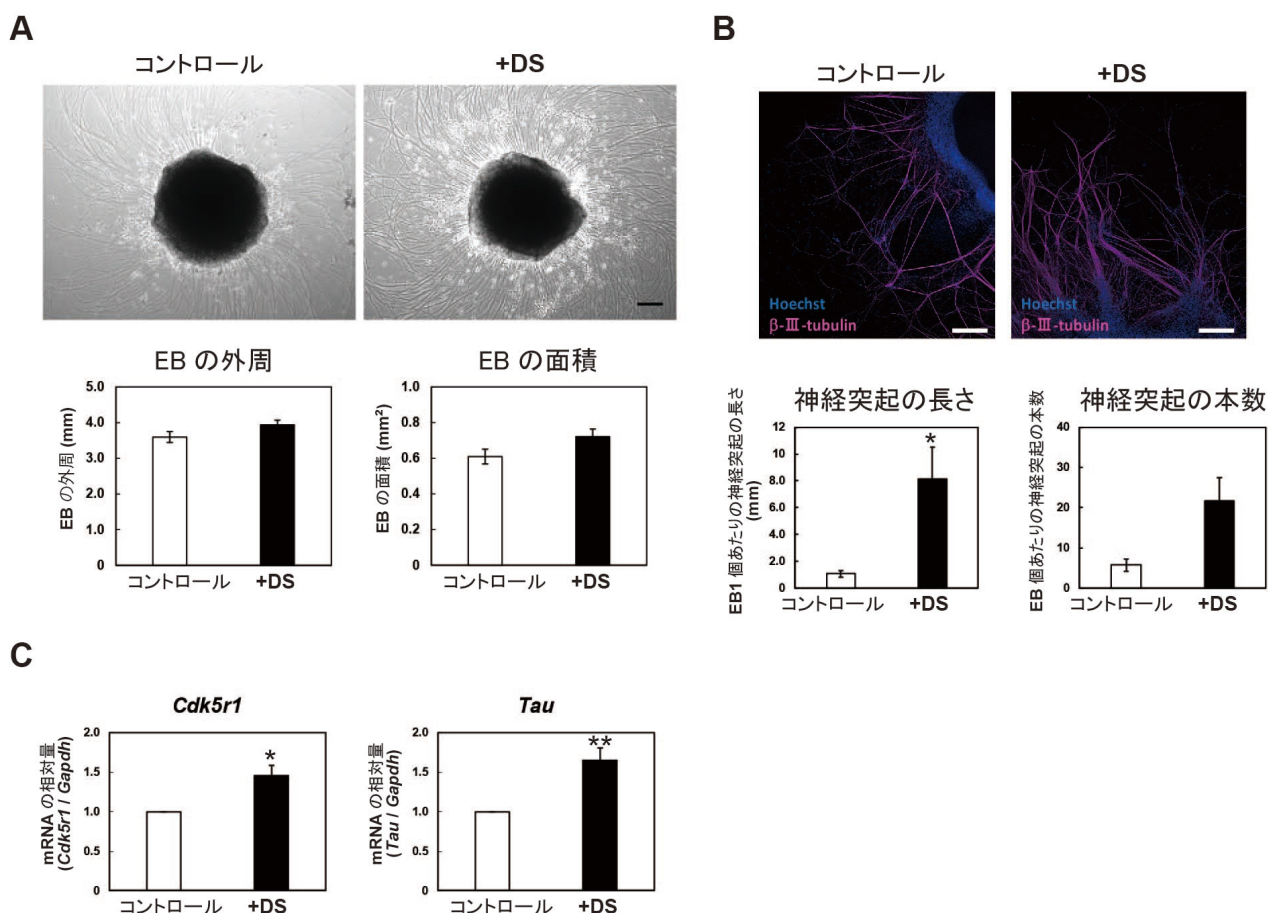


図 12 DS 添加によりマウス ES 細胞の神経突起伸長が促進された

A: マウス ES 細胞からの神経分化誘導時に DS(100 $\mu$ g/ml)を添加した細胞を観察し、EB の外周と面積を測定した。コントロール:  $N=27$ ; +DS:  $N=24$ , スケールバー: 200 $\mu$ m。

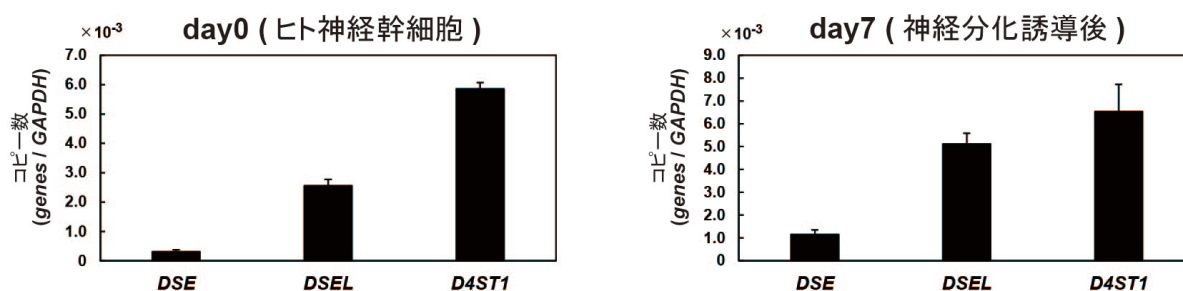
B: マウス ES 細胞からの神経分化誘導時に DS(100 $\mu$ g/ml)を添加した細胞を  $\beta$ -III-tubulin(マゼンダ)で染色した。核染色には Hoechst(青色)を用いた。 $\beta$ -III-tubulin で染色された神経突起の長さとな数を測定した。コントロール:  $N=7$ ; +DS:  $N=11$ , スケールバー: 100 $\mu$ m。

C: マウス ES 細胞からの神経分化誘導時に DS(100 $\mu$ g/ml)を添加し、EB day12 における *Cdk5r1* と *Tau* の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。  $N=4$ , コントロール=1, \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ 。

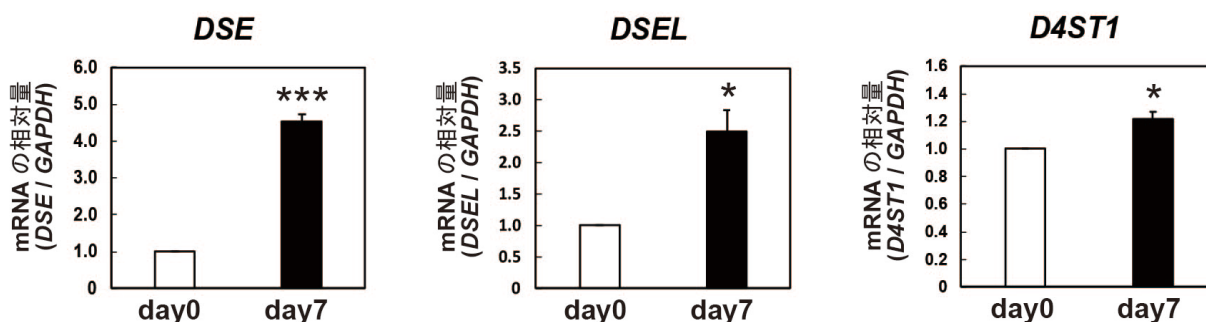
### 3-1-4. DS 添加によるヒト神経幹細胞における神経分化への影響

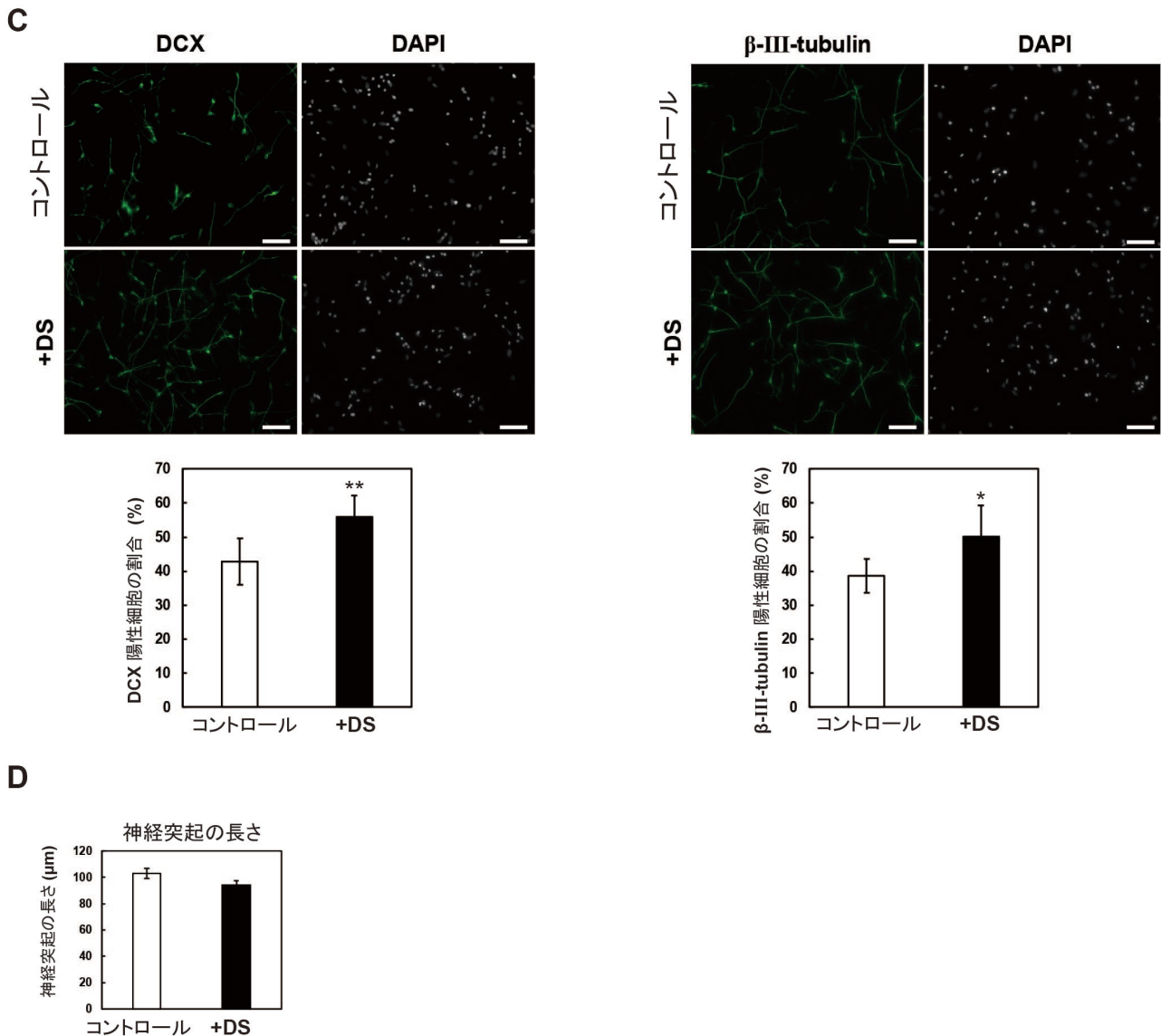
次に、DS がヒトの神経分化を促進するのかを検討した。ヒト神経幹細胞を用いて神経分化を誘導した。ヒト神経幹細胞(day0)と神経分化誘導後の細胞(day7)における DS 合成関連酵素の絶対定量を行ったところ、day0 及び day7 共に *D4ST1*、*DSEL*、*DSE* の順で発現量が多かった(図 13A)。また、ヒト神経幹細胞の神経分化に伴い、3 種の酵素すべての mRNA 発現量が増加していた(図 13B)。さらに、神経分化が DS 添加により促進されるかを検討するため、神経分化誘導したヒト神経幹細胞を未熟ニューロンマーカーである DCX(Doublecortin)と成熟ニューロンマーカーである  $\beta$ -III-tubulin で染色し、陽性細胞数をカウントした結果、DCX と  $\beta$ -III-tubulin 陽性細胞の割合は DS 添加により増加していた(図 13C)。DS 添加によりヒト神経幹細胞の神経分化が促進されたことが分かった。しかし、ヒト神経幹細胞の神経分化誘導後に神経突起の長さを測定すると、マウス ES 細胞とは異なり、DS 添加による変化は観察されなかった(図 13D)。これらの結果より、DS はヒト神経幹細胞においても神経分化を促進するが、神経突起伸長に対しては影響しないことが明らかになった。

A



B





**図 13 DS 添加によりヒト神経幹細胞の神経分化が促進された**

A: ヒト神経幹細胞を神経分化誘導し、day0, 7 における DS 合成関連酵素の発現を絶対定量した。N=3.

B: ヒト神経幹細胞を神経分化誘導し、day0, 7 における DS 合成関連酵素の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。N=3.

C: ヒト神経幹細胞からの神経分化誘導時に DS(10 $\mu$ g/ml)を添加した細胞を DCX と  $\beta$ -III-tubulin で染色した(緑色)。核染色には DAPI(グレー)を用いた。全細胞数に対する DCX と  $\beta$ -III-tubulin 陽性細胞の割合を測定した。N=6, スケールバー: 200 $\mu$ m.

D: ヒト神経幹細胞からの神経分化誘導時に DS(10 $\mu$ g/ml)を添加した細胞において、 $\beta$ -III-tubulin で染色された神経突起の長さを測定した。N=6.

\* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01; \*\*\* $P$ <0.001.



次にヒト神経幹細胞において細胞遊走を検討した(図 6)。図中(図 14)の黄色の線で示した最初の位置から遊走した細胞の数をカウントすると、細胞遊走開始後 2, 3, 4 日目において、DS の添加により遊走した細胞数が有意に増加しており、細胞遊走が促進したことが示された。

以上の結果により、DS 添加により、マウス ES 細胞においては神経分化及び神経突起伸長、ヒト神経幹細胞では神経分化と細胞遊走が促進されることが分かった。

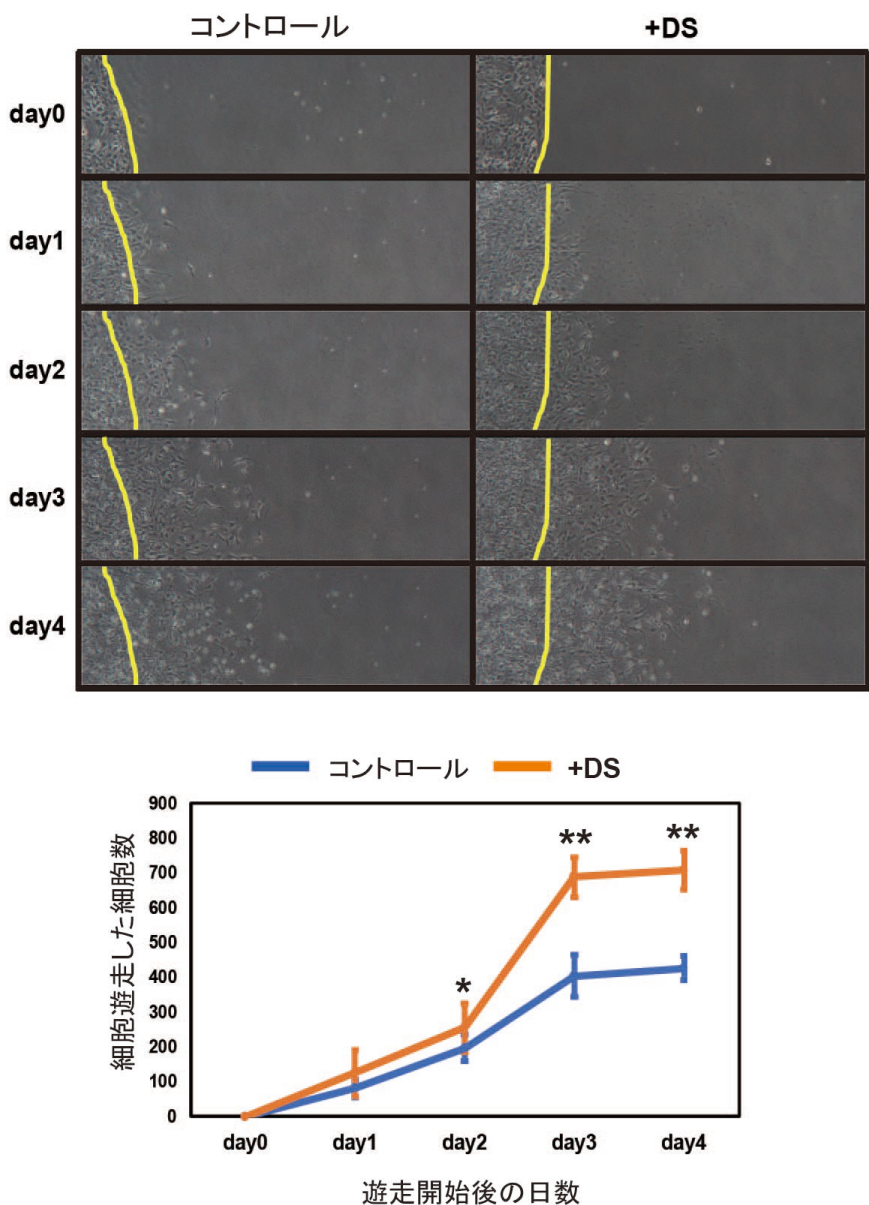


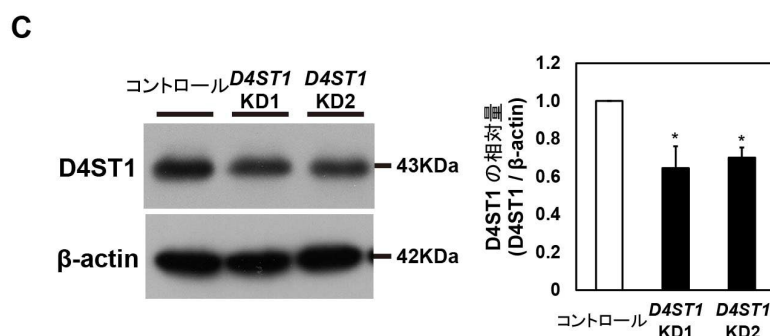
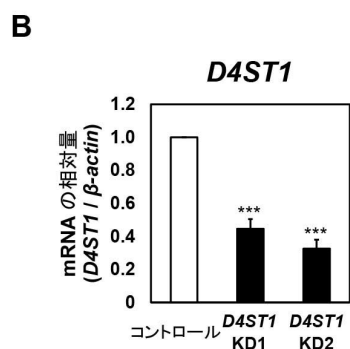
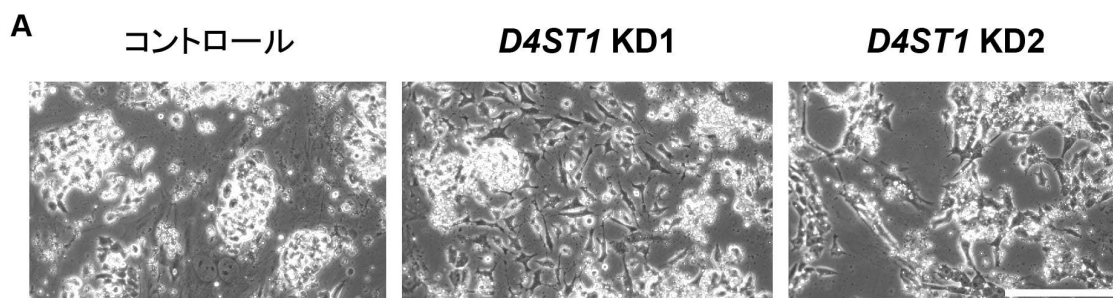
図 14 DS 添加によりヒト神経幹細胞の細胞遊走が促進した

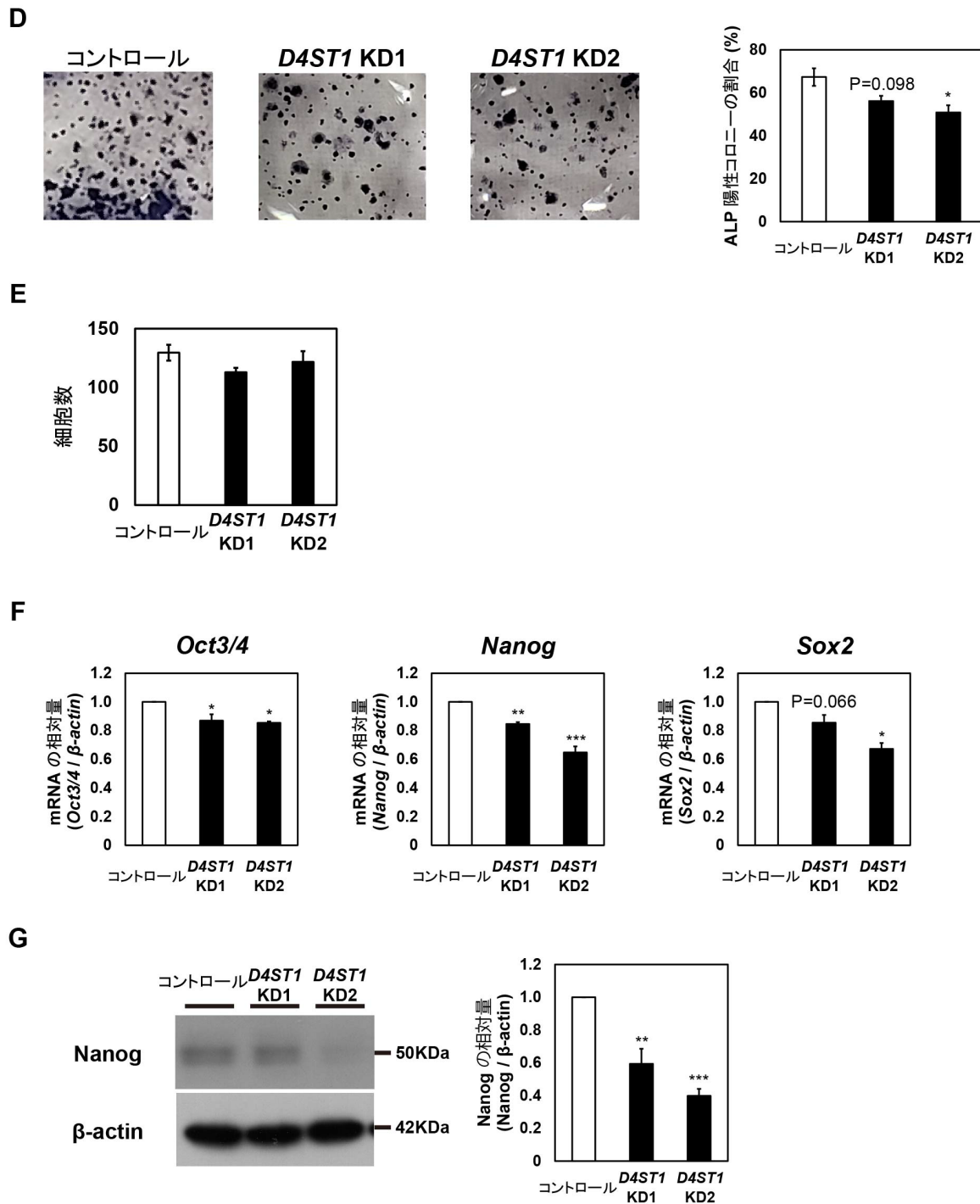
ヒト神経幹細胞の神経分化誘導時に DS(10 $\mu$ g/ml)を添加した。day0 の時点で細胞が接着している縁(黄色の線)から遊走した細胞数をカウントした。N=4, \*P<0.05; \*\*P<0.01.

## 3-2. D4ST1 のマウス ES 細胞における未分化性への寄与

### 3-2-1. D4ST1 のマウス ES 細胞における自己複製能への寄与

マウス ES 細胞は未分化性を維持している時はドーム状のコロニー形態を示し、分化すると扁平なコロニーに変化する。マウス ES 細胞において *D4ST1* をノックダウン(KD)したところ、*D4ST1* KD 細胞ではコントロールと比較して扁平な形態を示し(図 15A)、*D4ST1* KD により未分化性が損なわれたことが示唆された。リアルタイム PCR 解析とウエスタンブロット解析によって、*D4ST1* KD により mRNA レベルでは 30-40%、タンパク質レベルでは約 60%、*D4ST1* の発現が低下したことを確認した(図 15B, 15C)。未分化なマウス ES 細胞は自己複製能を有しており、ALP で染色される。*D4ST1* KD による自己複製能への影響を検討するために ALP 染色を行ったところ、*D4ST1* KD により ALP 陽性コロニーの割合が減少し、自己複製能が低下していた(図 15D)。細胞増殖アッセイでは、*D4ST1* KD による変化は観察されなかった(図 15E)。さらに、*D4ST1* KD マウス ES 細胞における未分化性を検討すると、*D4ST1* KD により未分化マーカーである *Oct3/4* (*Octamer-binding transcription factor*)、*Nanog*、*Sox2* の mRNA 発現量が低下し(図 15F)、また、タンパク質レベルでの *Nanog* の発現低下が確認された(図 15G)。D4ST1 がマウス ES 細胞の未分化性に必要であることが明らかになった。





**図 15** *D4ST1* KD によりマウス ES 細胞の未分化性及び自己複製能が低下した

A: *D4ST1* KD したマウス ES 細胞(TF day4)の形態を観察した。スケールバー: 200 $\mu$ m。

B, C: *D4ST1* KD の KD 効率をリアルタイム PCR 解析(B)とウエスタンブロット解析(C)により測定した。

D: *D4ST1* KD 細胞において ALP 染色後、総コロニー数に対する ALP 陽性コロニーの割合を算出した。

E: *D4ST1* KD 細胞において細胞増殖アッセイを行い、生細胞数をカウントした。

F: *D4ST1* KD 細胞において未分化マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。

G: *D4ST1* KD 細胞において Nanog の発現をウエスタンブロット解析により検討した。

N=3, コントロール=1, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

次に、*D4ST1* をマウス ES 細胞において過剰発現(O/E)させた。細胞の形態観察では、*D4ST1* O/E による変化は観察されなかった(図 16A)。リアルタイム PCR 解析とウエスタンブロット解析によって、*D4ST1* O/E により mRNA レベルでは約 400 倍、タンパク質レベルでは約 1.4 倍、*D4ST1* の発現が増加していることを確認した(図 16B, 16C)。ALP 染色を行ったところ、*D4ST1* KD における結果とは逆に、*D4ST1* O/E により ALP 陽性コロニーの割合が増加していた(図 16D)。この結果より、*D4ST1* がマウス ES 細胞の自己複製能に必要であることが分かった。

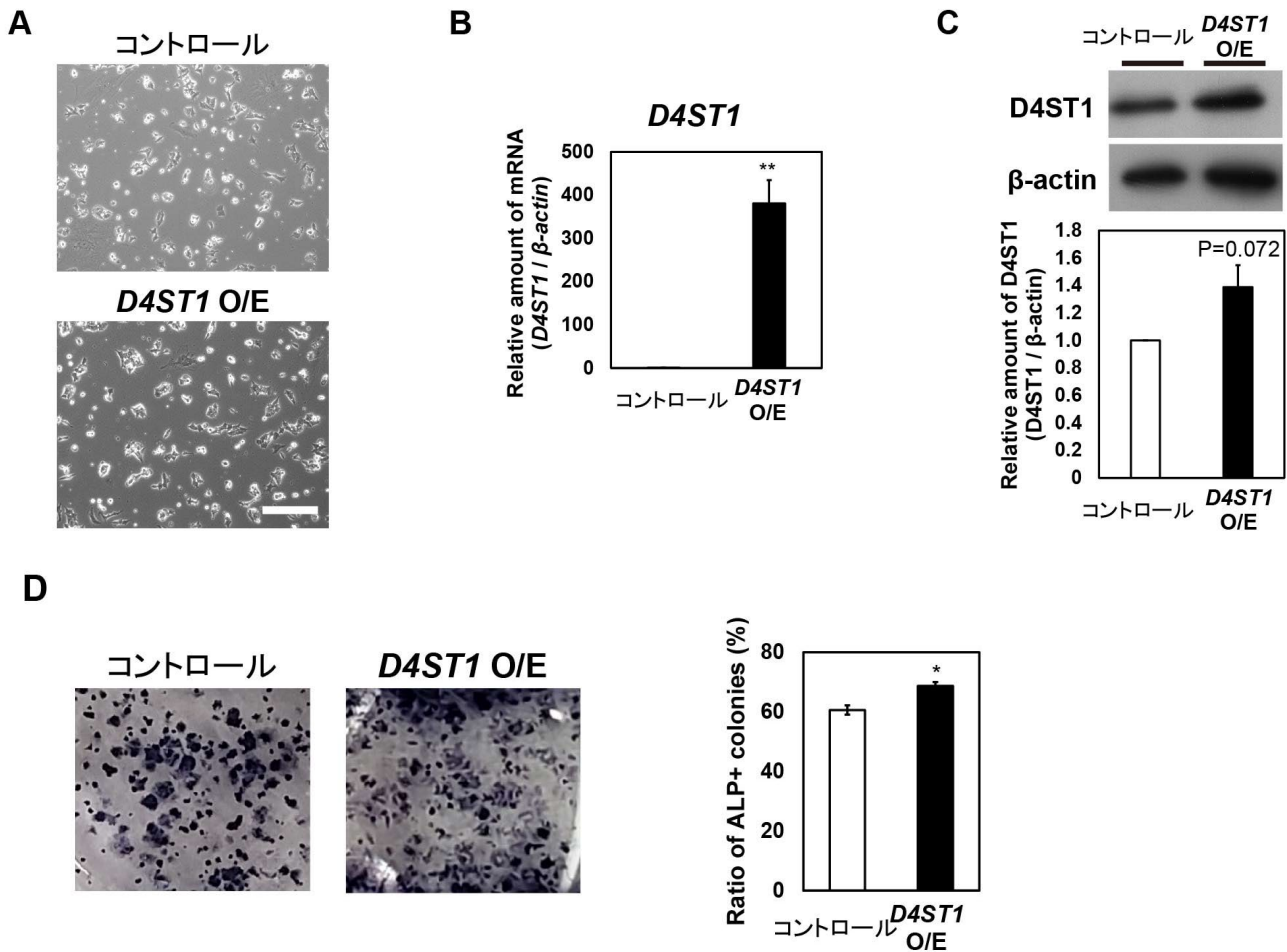


図 16 *D4ST1* O/E によりマウス ES 細胞の自己複製能が亢進した

A: *D4ST1* O/E したマウス ES 細胞(TF day2)の形態を観察した。スケールバー: 200μm.

B: *D4ST1* O/E において *D4ST1* の mRNA 発現量の増加をリアルタイム PCR 解析により確認した。コントロール=1.

C: *D4ST1* O/E において、*D4ST1* の発現の増加をウエスタンブロット解析により確認した。コントロール=1.

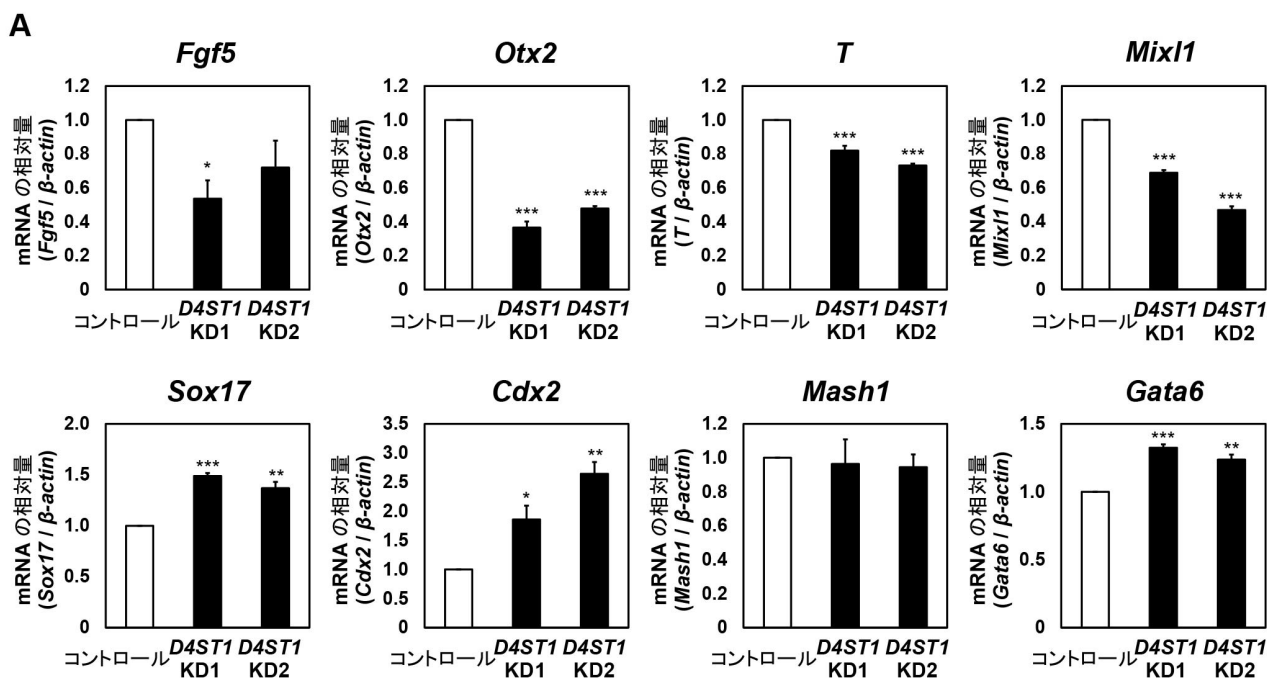
D: *D4ST1* O/E 細胞において ALP 染色を行い、総コロニー数に対する ALP 陽性コロニーの割合を算出した。

$N=3$ , \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ .

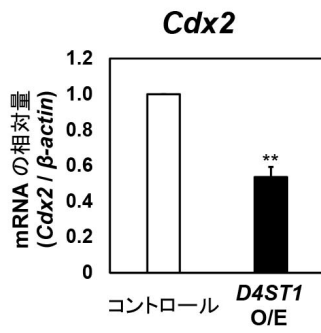
### 3-2-2. *D4ST1* KD によるマウス ES 細胞の内胚葉への分化

次に、*D4ST1* KD マウス ES 細胞において、各種分化マーカーの mRNA 発現量を検討した(図 17A)。コントロールと比較して、*D4ST1* KD によりエピブラストマーカーである *Fgf5*、*Otx2* (*Orthodenticle homeobox 2*) の mRNA 発現量は低下していた。さらに、*D4ST1* KD マウス ES 細胞において、中胚葉マーカーである *T*、*Mixl1* (*Mix paired-like homeobox 1*) の mRNA 発現量は有意に低下し、また内胚葉マーカーである *Sox17* と *Cdx2* (*Caudal type homeobox 2*) の mRNA 発現量は有意に増加していた。外胚葉マーカーである *Mash1* の mRNA 発現量は、*D4ST1* KD による変化が認められなかった。原始内胚葉マーカーの *Gata6* (*GATA binding protein 6*) は *D4ST1* KD により mRNA 発現量が増加していた。これらの結果は、*D4ST1* KD により内胚葉及び原始内胚葉への分化が誘導されることを示し、また *D4ST1* がマウス ES 細胞の多能性維持に関与することを示唆している。

*D4ST1* O/E マウス ES 細胞における *Cdx2* の mRNA 発現量を検討したところ、*D4ST1* KD とは反対に有意に減少していた(図 17B)。*Cdx2* は内胚葉よりもさらに分化の進んだ後腸分化に必要であることが報告されており(59, 60)、*D4ST1* KD 及び *D4ST1* O/E マウス ES 細胞における *Cdx2* の mRNA 発現量の挙動から、*D4ST1* が後腸を含む内胚葉分化を制御している可能性を見出した。



**B**



**図 17 *D4ST1* KD により内胚葉分化が誘導された**

A: *D4ST1* KD マウス ES 細胞における分化マーカーの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 解析により検討した。

B: *D4ST1* O/E マウス ES 細胞における *Cdx2* の発現をリアルタイム PCR 解析により検討した。

N=3, コントロール=1, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3-2-3. *D4ST1* KD マウス ES 細胞におけるシグナルの変化

*D4ST1* KD によるシグナルへの影響を検討するため、ウエスタンブロット解析を行った。神経分化を抑制することでマウス ES 細胞の自己複製能を維持すること(10)、細胞の運命決定に必要であること(13)が報告されている BMP/Smad1/5/8 シグナルの活性は *D4ST1* KD により低下していた(図 18A)。この結果により、*D4ST1* KD マウス ES 細胞において自己複製能が低下したのは BMP シグナルの活性が低下したためであると考えられた。

次に、マウスにおける内胚葉分化の誘導(61)、さらにその先の後腸への分化を誘導すること(62)が知られている Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性を検討した。*D4ST1* KD により、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性は有意に増加していた(図 18B)。反対に、*D4ST1* O/E により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性が有意に低下していた(図 18C)。以上により、*D4ST1* KD による内胚葉分化の誘導は、Wntシグナルの活性化によるものであることが示された。

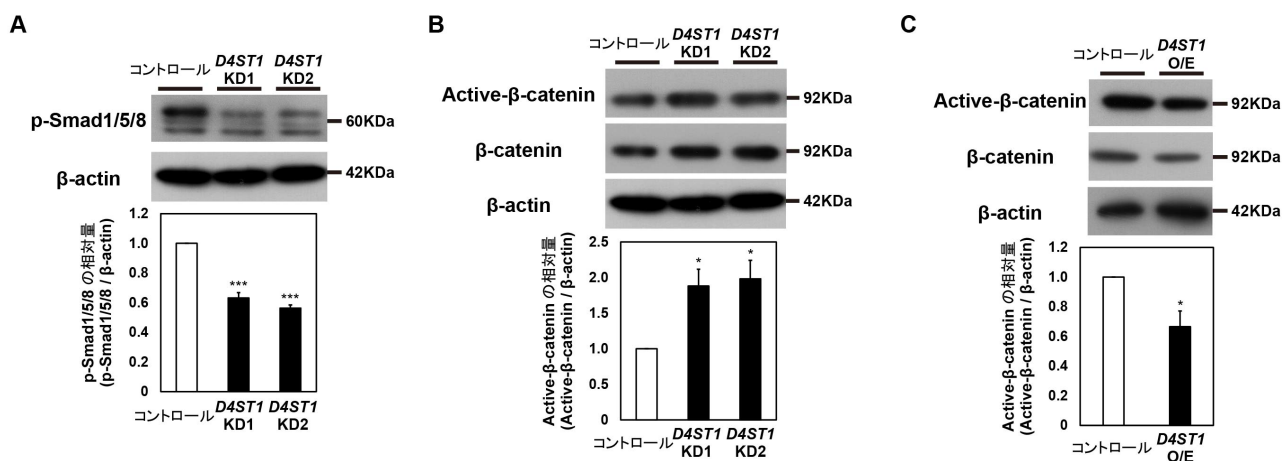


図 18 *D4ST1* KD により内胚葉分化が誘導された

A: *D4ST1* KD マウス ES 細胞における BMP/Smad1/5/8 シグナルの活性をウエスタンブロット解析により検討した。

B: *D4ST1* KD マウス ES 細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性をウエスタンブロット解析により検討した。

C: *D4ST1* O/E マウス ES 細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性をウエスタンブロット解析により検討した。

$N=3$ , コントロール=1, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ .

## 4. 考察

### 4-1. 幹細胞の神経分化における DS の機能

マウス ES 細胞の EB 形成及び神経分化に伴い、*Dsel* と *D4ST1* の mRNA 発現量が増加していた。この結果は、マウスの脳において *Dsel* と *D4ST1* が発現していること (58, 63, 64) と一致している。序論でも述べたが、EDS は、皮膚、関節、血管といった結合組織が過伸展性、脆弱性を示す遺伝性疾患である (49)。EDS にはいくつかのタイプがあり、その中の一つに *D4ST1* 欠損タイプ (古庄型とも呼ばれる) が存在する (48)。*D4ST1* 欠損による EDS は、前述のような進行性の結合組織の脆弱性に加え、発生異常による特徴的な顔貌及び多発関節拘縮を示す。皮膚の過伸展性に関しては、デルマトン硫酸プロテオグリカンの一つである Decorin の減少によりコラーゲン繊維の構造が崩壊することが原因であることが報告されている (65)。マウス ES 細胞の EB 形成においては、EB day12 のみではなく、中胚葉分化及び内胚葉分化に相当する EB day2 と EB day4 においても *Dsel* と *D4ST1* の mRNA 発現量の増加が観察された (図 7)。これらの事実から、DS が本研究で示した神経分化の他にも、中胚葉と内胚葉の分化にも寄与していることが示唆された。

マウス ES 細胞は、胚発生のステージとしてはナীব状態に相当する。EB 形成は、ナীব状態からフォーマティブ状態を経てプライム状態、そしてさらに三胚葉分化への過程を模倣している。EB day4 で RA を添加すると神経幹細胞及び神経前駆細胞が誘導され、ヒト神経幹細胞と同じステージになる (図 19)。マウス ES 細胞から神経分化誘導した EB day12 で成熟ニューロンマーカーである *Map2* と  $\beta$ -III-tubulin が発現し、対するヒト神経幹細胞は神経分化誘導した day7 で未熟ニューロンマーカーである *DCX* と  $\beta$ -III-tubulin が発現する。神経分化マーカーの発現から、ヒト神経幹細胞を神経分化誘導した day7 よりもマウス ES 細胞を神経分化誘導した EB day12 の方がよりステージが進んでいることが示唆された。

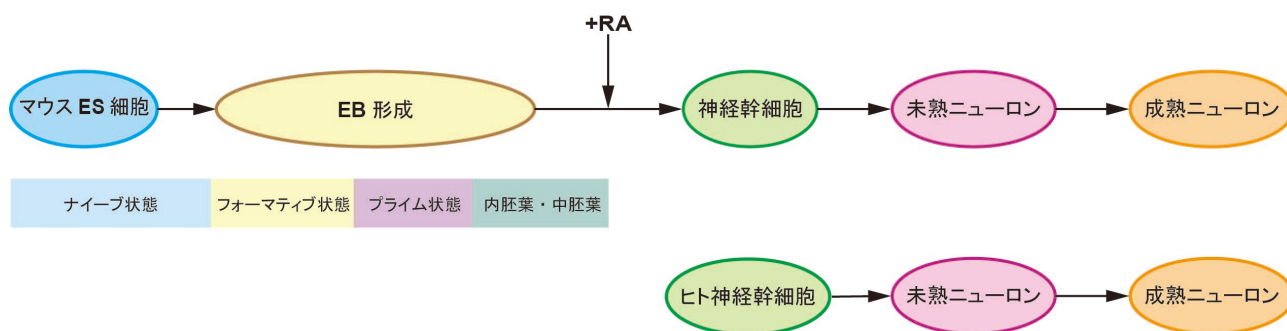


図 19 マウス ES 細胞とヒト神経幹細胞の発生ステージ



DS 添加により、マウス ES 細胞及びヒト神経幹細胞において神経分化が促進されたことから、より効率よく神経分化誘導を行う手法となり得る。マウス胎児由来の海馬において、CS/DS コートにより神経突起伸長が促進されることが報告されている(66)。本研究では、マウス ES 細胞の神経分化誘導時に DS を添加することで神経突起伸長が促進されたが、ヒト神経幹細胞の神経分化誘導では神経突起伸長に変化は認められなかった。また、DS 添加によりヒト神経幹細胞の細胞遊走は促進されていた。*D4ST1* KD したマウス的大脑皮質においては細胞遊走に影響が無いことが報告されており(64)、神経突起伸長と細胞遊走についてマウスとヒトで結果が異なっていた。このような相違は、種の違いによるものであると考えられるが、前述した実験に使用した細胞の発生ステージの違いである可能性も否定できない。

マウス ES 細胞の神経分化誘導後の EB day12 において、DS 添加により Erk1/2 の活性は有意に増加、Stat3 の活性は増加傾向にあった。同時に、Smad5 の活性は低下傾向にあった。GAG は硫酸化により多様な構造を持ち、シグナルリガンドと結合することで共受容体として機能すること、もしくはシグナルリガンドをトラップすることが知られている(67)。DS は bFGF、FGF7、EGF と相互作用することが報告されている(45, 68)。bFGF と EGF は神経幹細胞の維持に機能し(69)、また BMP シグナルと Notch シグナルとのクロストークを介して神経分化を制御する(70–72)。海馬においては、CA3 錐体ニューロンにおける FGF7 の発現が抑制性前シナプス末端の分化、つまりシナプス小胞の形成を促進する(73)。さらに、bFGF は軸索の枝分かれ、EGF は神経突起伸長を促進すること(74–76)、cAMP により Erk1/2 が活性化されることで神経突起伸長が促進することが報告されている(77)。以上の事実により、bFGF、EGF、FGF7 のいずれかと DS が結合し、Erk1/2 を活性化した結果、マウス ES 細胞の神経分化及び神経突起伸長が促進されたということが考えられる。また、LIF/Stat3 シグナルは神経前駆細胞への分化を決定づけること(78–80)、BMP/Smad1/5 シグナルがアストロサイトへの分化を促進することが報告されている(81)。培養中に添加した DS が BMP/Smad1/5 と LIF/Stat3 シグナルシグナルを介してアストロサイトへの分化を妨げ、神経前駆細胞への分化を促進したことが考えられるが、DS と BMP 及び LIF との結合はこれまでに報告されていない。

培養中に添加した DS とシグナル受容体やリガンドとの作用機序も、興味深い点である。我々は、人工的に作製した高硫酸化 HA を hiPS 細胞の培地に添加すると、bFGF と結合して FGF シグナルが活性化していることを報告している(82)。通常、hiPS 細胞の培養には bFGF の添加が必須であるが、高硫酸化 HA の添加により、bFGF の添加無しに多能性を維持できた。FGF シグナルの活性化には、FGF 受容体の二量体化が必要で、高硫酸化 HA の添加によって FGF シグナルが活性化したことから、高硫酸化 HA が bFGF と結合することで FGF 受容体の二量体化が促進されたと考えている。この知見から、添加した DS がシグナルリガンドと結合した後、受容体へと移行し、シグナルに作用することが考えられる。

DSEL はうつ病や双極性 II 型障害への関連が報告されているが(51)、*Dsel* ノックアウトマウスでは表現型が観察されていない(50)。遺伝子欠損による表現型は、ヒトとマウスで

異なる可能性があるため、ヒトの神経分化に DS がどのようなメカニズムで寄与するのか、ヒト神経幹細胞やヒト ES 細胞を用いたさらなる解析が必要である。

マウス ES 細胞から EB 形成中に CS が欠乏すると、*Nestin* の発現が減少することが分かっている(32)。また、HS の合成関連酵素である *Ext1* (*Exostosin glycosyltransferase 1*) をノックアウトしたマウス ES 細胞では、神経前駆細胞への分化が妨げられる(28)。さらに、ヒト神経幹細胞においてヘパラン硫酸プロテオグリカンが分化系列決定を制御していることが報告されている(83)。これらの研究と本研究における結果は、DS を含む GAG がマウス ES 細胞及びヒト神経幹細胞の神経分化において重要であることを示している。

#### 4-2. D4ST1 のマウス ES 細胞における未分化性への寄与

*D4ST1* KD によりマウス ES 細胞の自己複製能と未分化性が損なわれ、内胚葉分化が誘導されていた。特に、後腸のマーカである *Cdx2* の mRNA 発現量は *D4ST1* KD では有意に増加し、*D4ST1* O/E では有意に減少した。また、*D4ST1* KD では Wnt シグナルが活性化していたのに対して、*D4ST1* O/E では Wnt シグナルが抑制されていた。

*Cdx2* は中胚葉もしくは内胚葉分化の方向決定に必要であることが報告されている(84)。中胚葉と内胚葉は、プライム状態を経た後に中内胚葉となり、その後中胚葉と内胚葉へとそれぞれ分化する。内胚葉の分化には、*Sox17* を含む内胚葉系列の転写因子ネットワークの発現を促進する *Nodal* の発現を維持するために Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが必要で、内胚葉分化後に腸管を形成する。その後、腸管は背腹軸と前後軸に沿って前腸、中腸、後腸を形成する(85)。マウスの発生において、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは後腸と前後腸の位置決めに必要な *Cdx2* の発現を誘導することで後腸形成を促す(86)。これらの事実により、*D4ST1* はマウス ES 細胞の未分化性維持に必要であり、また *D4ST1* KD により Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化することで内胚葉及びその後続く後腸への分化が誘導されたことが示された。

CDX2 はまた、ヒト多能性幹細胞における腸の発生にも必要で、内胚葉-後腸への分化を WNT シグナルが促進することが報告されている(87)。ヒトの発生における *D4ST1* の機能についてはさらに解析が必要であるが、前述の通り *D4ST1* は EDS の原因遺伝子である。*D4ST1* をコードする CHST14(Carbohydrate sulfotransferase 14)に、ナンセンス変異やアミノ酸置換が起こることにより、*D4ST1* の硫酸基転移活性が失われる。*D4ST1* の機能欠損により、進行性の結合組織の脆弱性に加え、発生異常による特徴的な顔貌及び多発関節拘縮を示す(48)。関節や血管などの結合組織は中胚葉由来の器官であり、またマウス ES 細胞における *D4ST1* KD により中胚葉マーカーの mRNA 発現量が低下している結果を得ているため(図 17A)、*D4ST1* がヒトの中胚葉分化にも寄与している可能性がある。

*D4ST1* は DS の硫酸転移酵素であるため、DS が Wnt シグナルを制御している可能性があるが、DS と Wnt の結合は現在までに証明されていない。また、デルマトン硫酸プロテオグリカンには Decorin、Biglycan、Fibromodulin などがあるが、前述の DS 添加による神経分化の促進と、*D4ST1* KD による未分化性の低下と内胚葉分化の誘導に機能するデルマトン硫酸プロテオグリカンは何かということは分かっていない。

## 5. 結論

マウス ES 細胞の神経分化において、DS 添加により①神経分化が促進されること、また②Erk1/2 と Stat3 が活性化され、Smad5 の活性が抑制されたこと、さらに③神経突起伸長が促進されることが分かった。ヒト神経幹細胞においても、DS 添加により①神経分化が促進されること、②細胞遊走が促進されることが明らかになった。また、マウス ES 細胞における *D4ST1* KD 及び *D4ST1* O/E により、①*D4ST1* がマウス ES 細胞の未分化性と自己複製能に必要であること、②*D4ST1* が Wnt シグナルを介して内胚葉分化とその後の後腸形成を制御していることが示唆された。

本研究の成果は、これまでに報告されていなかった幹細胞における DS の機能について新たな知見を与えるものである。

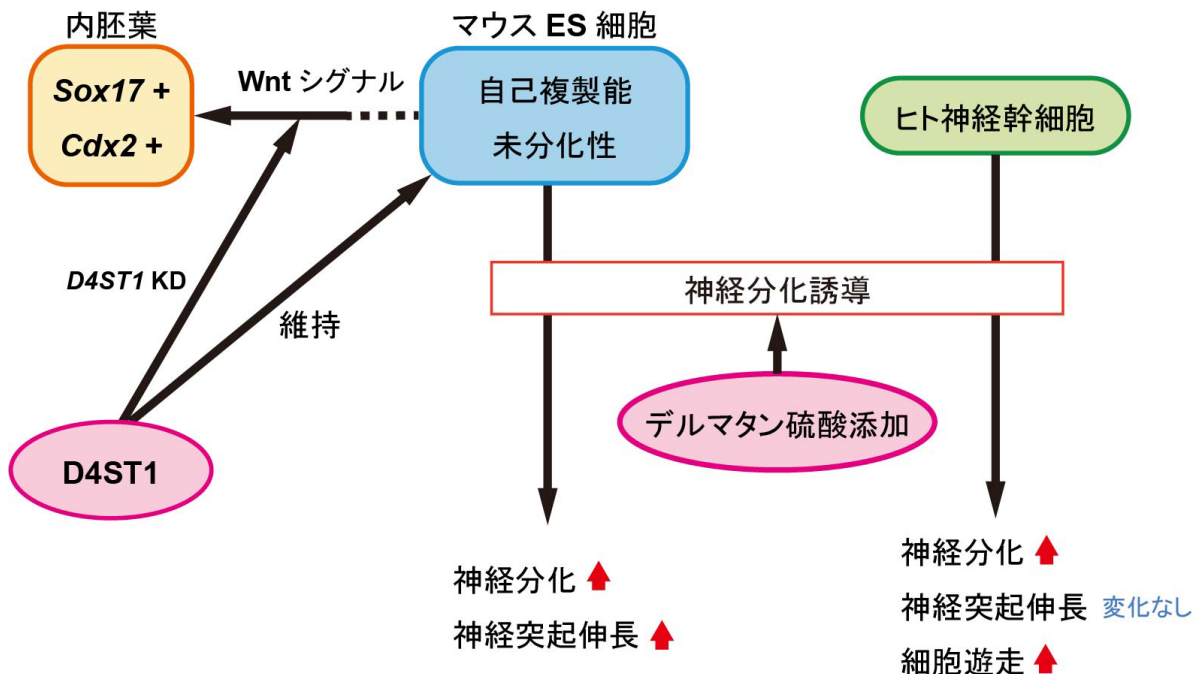


図 20 幹細胞における DS の機能

マウス ES 細胞の神経分化誘導時に DS を添加することで神経分化と神経突起伸長が促進された。ヒト神経幹細胞においても、DS 添加により神経分化が促進されるが、神経突起伸長には変化は無く、細胞遊走が促進された。

*D4ST1* はマウス ES 細胞の未分化性と自己複製能の維持に必要で、また Wnt シグナルを介して内胚葉分化とその後の後腸形成を制御していることが示唆された。

## 6. 謝辞

本論文は、創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻に在籍中、西原祥子教授のご指導の下行った研究の成果をまとめたものです。西原教授には、本研究を行う機会を頂き、また12年間に渡って御指導頂き、感謝の念に堪えません。

水本先生(名城大学)、山田先生(名城大学)には、二糖構造解析にご協力頂き、深く感謝致します。平野先生(産業技術総合研究所)には、実験へのアドバイスと議論をして頂き、深く感謝致します。

デルマタン硫酸ナトリウムは東京化成、pCAGI-Puro は程先生から頂きました、感謝致します。

また、副査として御助言頂いた高瀬明教授と柁谷内晶教授に、深く感謝致します。

さらに、様々ご協力を頂いて研究生活を支えて下さった西原研究室の皆様にも、この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、創立者池田先生、また長い学生生活を見守りながら支えてくれた両親、兄、祖母にも心より感謝致します。

## 7. 参考文献

1. Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292, 154–156
2. Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc National Acad Sci*. 78, 7634–7638
3. Nichols, J., and Smith, A. (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 4, 487–492
4. Hackett, J. A., and Surani, M. A. (2014) Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*. 15, 416–430
5. Smith, A. (2017) Formative pluripotency: the executive phase in a developmental continuum. *Dev Camb Engl*. 144, 365–373
6. Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336, 688–690
7. Berge, D. ten, Kurek, D., Blauwkamp, T., Koole, W., Maas, A., Eroglu, E., Siu, R. K., and Nusse, R. (2011) Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol*. 13, 1070–1075
8. Lanner, F., and Rossant, J. (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*. 137, 3351–3360
9. Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M. S. H., and Niwa, H. (2006) Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 26, 7772–7782
10. Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., and Smith, A. (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 115, 281–292

11. Li, V. S. W., Ng, S. S., Boersema, P. J., Low, T. Y., Karthaus, W. R., Gerlach, J. P., Mohammed, S., Heck, A. J. R., Maurice, M. M., Mahmoudi, T., and Clevers, H. (2012) Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex. *Cell*. 149, 1245–1256
12. Hamazaki, T., Kehoe, S. M., Nakano, T., and Terada, N. (2006) The Grb2/Mek pathway represses nanog in murine embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 26, 7539–7549
13. Li, Z., Fei, T., Zhang, J., Zhu, G., Wang, L., Lu, D., Chi, X., Teng, Y., Hou, N., Yang, X., Zhang, H., Han, J.-D. J., and Chen, Y.-G. (2012) BMP4 signaling acts via dual-specificity phosphatase 9 to control ERK activity in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 10, 171–182
14. Sasaki, N., Shinomi, M., Hirano, K., Ui - Tei, K., and Nishihara, S. (2011) LacdiNAc (GalNAc  $\beta$  1-4GlcNAc) contributes to self-renewal of mouse embryonic stem cells by regulating leukemia inhibitory factor/STAT3 signaling. *Stem Cells*. 29, 641–650
15. Sasaki, N., Okishio, K., Ui-Tei, K., Saigo, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Nishimura, T., Suda, Y., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Hitoshi, S., Ikenaka, K., and Nishihara, S. (2008) Heparan sulfate regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 283, 3594–3606
16. Sasaki, N., Hirano, T., Ichimiya, T., Wakao, M., Hirano, K., Kinoshita-Toyoda, A., Toyoda, H., Suda, Y., and Nishihara, S. (2009) The 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporters, PAPST1 and 2, contribute to the maintenance and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Plos One*. 4, e8262
17. Hirano, K., Sasaki, N., Ichimiya, T., Miura, T., Kuppevelt, T. H. V., and Nishihara, S. (2012) 3-*O*-sulfated heparan sulfate recognized by the antibody HS4C3 contribute to the differentiation of mouse embryonic stem cells via Fas signaling. *Plos One*. 7, e43440
18. Hirano, K., Kuppevelt, T. H. V., and Nishihara, S. (2013) The transition of mouse pluripotent stem cells from the naïve to the primed state requires Fas signaling through 3-*O* sulfated heparan sulfate structures recognized by the HS4C3 antibody. *Biochem Bioph Res Co*. 430, 1175–1181
19. Miura, T., and Nishihara, S. (2016) *O*-GlcNAc is required for the survival of primed pluripotent stem cells and their reversion to the naïve state. *Biochem Bioph Res Co*. 480, 655–661

20. Miura, T., Kume, M., Kawamura, T., Yamamoto, K., Hamakubo, T., and Nishihara, S. (2018) *O*-GlcNAc on PKC  $\zeta$  inhibits the FGF4-PKC  $\zeta$ -MEK-ERK1/2 pathway via inhibition of PKC  $\zeta$  phosphorylation in mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Rep.* 10, 272–286
21. Pecori, F., Kondo, N., Ogura, C., Miura, T., Kume, M., Minamijima, Y., Yamamoto, K., and Nishihara, S. (2021) Site-specific *O*-GlcNAcylation of Psme3 maintains mouse stem cell pluripotency by impairing P-body homeostasis. *Cell Reports.* 36, 109361
22. Pecori, F., Akimoto, Y., Hanamatsu, H., Furukawa, J., Shinohara, Y., Ikehara, Y., and Nishihara, S. (2020) Mucin-type *O*-glycosylation controls pluripotency in mouse embryonic stem cells via Wnt receptor endocytosis. *J Cell Sci.* 133, jcs245845
23. Aubert, J.-P., Biserte, G., and Loucheux-Lefebvre, M.-H. (1976) Carbohydrate-peptide linkage in glycoproteins. *Arch Biochem Biophys.* 175, 410–418
24. Oegema, T. R., Kraft, E. L., Jourdain, G. W., and Valen, T. R. V. (1984) Phosphorylation of chondroitin sulfate in proteoglycans from the swarm rat chondrosarcoma. *J Biol Chem.* 259, 1720–1726
25. Sugahara, K., Yamashina, I., Waard, P. D., Halbeek, H. V., and Vliegenthart, J. F. (1988) Structural studies on sulfated glycopeptides from the carbohydrate-protein linkage region of chondroitin 4-sulfate proteoglycans of swarm rat chondrosarcoma. Demonstration of the structure Gal(4-*O*-sulfate) beta 1-3Gal beta 1-4XYL beta 1-*O*-Ser. *J Biological Chem.* 263, 10168–74
26. Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D. (1996) Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J Official Publ Fed Am Soc Exp Biology.* 10, 598–614
27. Johnson, C. E., Crawford, B. E., Stavridis, M., Dam, G. ten, Wat, A. L., Rushton, G., Ward, C. M., Wilson, V., Kuppevelt, T. H. van, Esko, J. D., Smith, A., Gallagher, J. T., and Merry, C. L. R. (2007) Essential alterations of heparan sulfate during the differentiation of embryonic stem cells to Sox1-enhanced green fluorescent protein-expressing neural progenitor cells. *Stem Cells.* 25, 2389–2389



28. Kraushaar, D. C., Rai, S., Condac, E., Nairn, A., Zhang, S., Yamaguchi, Y., Moremen, K., Dalton, S., and Wang, L. (2012) Heparan sulfate facilitates FGF and BMP signaling to drive mesoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem.* 287, 22691–22700
29. Kraushaar, D. C., Yamaguchi, Y., and Wang, L. (2010) Heparan sulfate is required for embryonic stem cells to exit from self-renewal. *J Biol Chem.* 285, 5907–5916
30. Lanner, F., Lee, K. L., Sohl, M., Holmborn, K., Yang, H., Wilbertz, J., Poellinger, L., Rossant, J., and Farnebo, F. (2010) Heparan sulfation-dependent fibroblast growth factor signaling maintains embryonic stem cells primed for differentiation in a heterogeneous state. *Stem Cells.* 28, 191–200
31. Fico, A., Chevigny, A. D., Egea, J., Bösl, M. R., Cremer, H., Maina, F., and Dono, R. (2012) Modulating glypican4 suppresses tumorigenicity of embryonic stem cells while preserving self-renewal and pluripotency. *Stem Cells.* 30, 1863–1874
32. Izumikawa, T., Sato, B., and Kitagawa, H. (2014) Chondroitin sulfate is indispensable for pluripotency and differentiation of mouse embryonic stem cells. *Sci Rep.* 4, 3701
33. Kawabe, K., Tateyama, D., Toyoda, H., Kawasaki, N., Hashii, N., Nakao, H., Matsumoto, S., Nonaka, M., Matsumura, H., Hirose, Y., Morita, A., Katayama, M., Sakuma, M., Kawasaki, N., Furue, M. K., and Kawasaki, T. (2013) A novel antibody for human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells recognizes a type of keratan sulfate lacking oversulfated structures. *Glycobiology.* 23, 322–336
34. Pera, M. F., Blasco-Lafita, M. J., Cooper, S., Mason, M., Mills, J., and Monaghan, P. (1988) Analysis of cell-differentiation lineage in human teratomas using new monoclonal antibodies to cytostructural antigens of embryonal carcinoma cells. *Differentiation.* 39, 139–149
35. Adewumi, O., Aflatoonian, B., Ahrlund-Richter, L., Amit, M., Andrews, P. W., Beighton, G., Bello, P. A., Benvenisty, N., Berry, L. S., Bevan, S., Blum, B., Brooking, J., Chen, K. G., Choo, A. B. H., Churchill, G. A., Corbel, M., Damjanov, I., Draper, J. S., Dvorak, P., Emanuelsson, K., Fleck, R. A., Ford, A., Gertow, K., Gertsenstein, M., Gokhale, P. J., Hamilton, R. S., Hampl, A., Healy, L. E., Hovatta, O., Hyllner, J., Imreh, M. P., Itskovitz-Eldor, J., Jackson, J., Johnson, J. L., Jones, M., Kee, K., King, B. L., Knowles, B. B., Lako, M., Lebrin, F., Mallon, B. S., Manning, D., Mayshar, Y., McKay, R. D. G., Michalska, A. E., Mikkola, M., Mileikovsky, M., Minger, S. L., Moore, H. D., Mummery,

C. L., Nagy, A., Nakatsuji, N., O'Brien, C. M., Oh, S. K. W., Olsson, C., Otonkoski, T., Park, K.-Y., Passier, R., Patel, H., Patel, M., Pedersen, R., Pera, M. F., Piekarczyk, M. S., Pera, R. A. R., Reubinoff, B. E., Robins, A. J., Rossant, J., Rugg-Gunn, P., Schulz, T. C., Semb, H., Sherrer, E. S., Siemen, H., Stacey, G. N., Stojkovic, M., Suemori, H., Szatkiewicz, J., Turetsky, T., Tuuri, T., Brink, S. van den, Vintersten, K., Vuoristo, S., Ward, D., Weaver, T. A., Young, L. A., Zhang, W., Andrews, P. W., Gokhale, P. J., Healy, L. E., Andrews, P. W., Benvenisty, N., Mallon, B. S., McKay, R. D. G., Pera, M. F., Rossant, J., Semb, H., and Stacey, G. N. (2007) Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol.* 25, 803–816

36. Andrews, P. W., Banting, G., Damjanov, I., Arnaud, D., and Avner, P. (1984) Three monoclonal antibodies defining distinct differentiation antigens associated with different high molecular weight polypeptides on the surface of human embryonal carcinoma cells. *Hybridoma.* 3, 347–361

37. Malmström, A., and Fransson, L. A. (1975) Biosynthesis of dermatan sulfate. I. Formation of L-iduronic acid residues. *J Biological Chem.* 250, 3419–25

38. Maccarana, M., Olander, B., Malmström, J., Tiedemann, K., Aebersold, R., Lindahl, U., Li, J., and Malmström, A. (2006) Biosynthesis of dermatan sulfate chondroitin-glucuronate C5-epimerase is identical to SART2. *J Biol Chem.* 281, 11560–11568

39. Malmström, A. (1984) Biosynthesis of dermatan sulfate. II. Substrate specificity of the C-5 uronosyl epimerase. *J Biological Chem.* 259, 161–5

40. Pacheco, B., Malmström, A., and Maccarana, M. (2009) Two dermatan sulfate epimerases form iduronic acid domains in dermatan sulfate. *J Biol Chem.* 284, 9788–9795

41. Evers, M. R., Xia, G., Kang, H.-G., Schachner, M., and Baenziger, J. U. (2001) Molecular cloning and characterization of a dermatan-specific *N*-acetylgalactosamine 4-*O*-sulfotransferase. *J Biol Chem.* 276, 36344–36353

42. Ito, Y., and Habuchi, O. (2000) Purification and characterization of *N*-acetylgalactosamine 4-sulfate 6-*O*-sulfotransferase from the squid cartilage. *J Biol Chem.* 275, 34728–34736

43. Kobayashi, M., Sugumaran, G., Liu, J., Shworak, N. W., Silbert, J. E., and Rosenberg, R. D. (1999) Molecular cloning and characterization of a human uronyl 2-sulfotransferase that sulfates iduronyl and glucuronyl residues in dermatan/chondroitin sulfate. *J Biol Chem.* 274, 10474–10480
44. Mikami, T., and Kitagawa, H. (2013) Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta.* 1830, 4719–33
45. Bian, S., Akyüz, N., Bernreuther, C., Loers, G., Laczynska, E., Jakovcevski, I., and Schachner, M. (2011) Dermatan sulfotransferase Chst14/D4st1, but not chondroitin sulfotransferase Chst11/C4st1, regulates proliferation and neurogenesis of neural progenitor cells. *J Cell Sci.* 124, 4051–4063
46. MacCarana, M., Kalamajski, S., Kongsgaard, M., Magnusson, S. P., Oldberg, A., and Malmström, A. (2009) Dermatan sulfate epimerase 1-deficient mice have reduced content and changed distribution of iduronic acids in dermatan sulfate and an altered collagen structure in skin. *Mol Cell Biol.* 29, 5517–28
47. Akyüz, N., Rost, S., Mehanna, A., Bian, S., Loers, G., Oezen, I., Mishra, B., Hoffmann, K., Guseva, D., Laczynska, E., Irintchev, A., Jakovcevski, I., and Schachner, M. (2013) Dermatan 4-*O*-sulfotransferase1 ablation accelerates peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol.* 247, 517–530
48. Kosho, T. (2016) CHST14/D4ST1 deficiency: new form of Ehlers-Danlos syndrome. *Pediatr Int.* 58, 88–99
49. Malfait, F., Francomano, C., Byers, P., Belmont, J., Berglund, B., Black, J., Bloom, L., Bowen, J. M., Brady, A. F., Burrows, N. P., Castori, M., Cohen, H., Colombi, M., Demirdas, S., Backer, J. D., Paepe, A. D., Fournel - Gigleux, S., Frank, M., Ghali, N., Giunta, C., Grahame, R., Hakim, A., Jeunemaitre, X., Johnson, D., Juul-Kristensen, B., Kapferer-Seebacher, I., Kazkaz, H., Kosho, T., Lavalley, M. E., Levy, H., Mendoza - Londono, R., Pepin, M., Pope, F. M., Reinstein, E., Robert, L., Rohrbach, M., Sanders, L., Sobey, G. J., Damme, T. V., Vandersteen, A., Mourik, C. van, Voermans, N., Wheeldon, N., Zschocke, J., and Tinkle, B. (2017) The 2017 international classification of the Ehlers-Danlos syndromes. *Am J Medical Genetics Part C Seminars Medical Genetics.* 175, 8–26

50. Bartolini, B., Thelin, M. A., Rauch, U., Feinstein, R., Oldberg, Å., Malmström, A., and Maccarana, M. (2012) Mouse development is not obviously affected by the absence of dermatan sulfate epimerase 2 in spite of a modified brain dermatan sulfate composition. *Glycobiology*. 22, 1007–1016
51. Smith, P. D., Coulson-Thomas, V. J., Foscarin, S., Kwok, J. C. F., and Fawcett, J. W. (2015) “GAG-ing with the neuron”: The role of glycosaminoglycan patterning in the central nervous system. *Exp Neurol*. 274, 100–114
52. Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., and Roder, J. C. (1993) Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc National Acad Sci*. 90, 8424–8428
53. Hirano, K., and Namihira, M. (2016) LSD1 mediates neuronal differentiation of human fetal neural stem cells by controlling the expression of a novel target gene, HEYL. *Stem Cells*. 34, 1872–1882
54. Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res*. 32, 936–948
55. Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., and Nishihara, S. (2006) Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2. *J Biol Chem*. 281, 10945–10953
56. Kinoshita, A., and Sugahara, K. (1999) Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high-performance liquid chromatography: application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides. *Anal Biochem*. 269, 367–378
57. Mizumoto, S., and Sugahara, K. (2012) Glycosaminoglycan chain analysis and characterization (glycosylation/epimerization). *Methods Mol. Biol*. 836, 99–115
58. Akatsu, C., Mizumoto, S., Kaneiwa, T., Maccarana, M., Malmström, A., Yamada, S., and Sugahara, K. (2011) Dermatan sulfate epimerase 2 is the predominant isozyme in the formation of the chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid structure in postnatal developing mouse brain. *Glycobiology*. 21, 565–574

59. Beck, F., Erler, T., Russell, A., and James, R. (1995) Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra - embryonic membranes. *Dev Dynam.* 204, 219–227
60. Sherwood, R. I., Jitianu, C., Cleaver, O., Shaywitz, D. A., Lamenzo, J. O., Chen, A. E., Golub, T. R., and Melton, D. A. (2007) Prospective isolation and global gene expression analysis of definitive and visceral endoderm. *Dev Biol.* 304, 541–555
61. Zhong, W., Lai, Y., Yu, T., Xia, Z. S., Yuan, Y. H., Ouyang, H., Shan, T. D., and Chen, Q. K. (2017) Wnt and Nodal signaling simultaneously induces definitive endoderm differentiation of mouse embryonic stem cells. *Romanian J Morphol Embryology Revue Roumaine De Morphol Et Embryologie.* 58, 527–535
62. Engert, S., Burtscher, I., Liao, W. P., Dulev, S., Schotta, G., and Lickert, H. (2013) Wnt/ $\beta$ -catenin signalling regulates Sox17 expression and is essential for organizer and endoderm formation in the mouse. *Development.* 140, 3128–3138
63. Mitsunaga, C., Mikami, T., Mizumoto, S., Fukuda, J., and Sugahara, K. (2006) Chondroitin sulfate/dermatan sulfate hybrid chains in the development of cerebellum spatiotemporal regulation of the expression of critical disulfated disaccharides by specific sulfotransferases. *J Biol Chem.* 281, 18942–18952
64. Ishii, M., and Maeda, N. (2008) Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex. *J Biol Chem.* 283, 32610–32620
65. Hirose, T., Takahashi, N., Tangkawattana, P., Minaguchi, J., Mizumoto, S., Yamada, S., Miyake, N., Hayashi, S., Hatamochi, A., Nakayama, J., Yamaguchi, T., Hashimoto, A., Nomura, Y., Takehana, K., Kosho, T., and Watanabe, T. (2018) Structural alteration of glycosaminoglycan side chains and spatial disorganization of collagen networks in the skin of patients with mcEDS-CHST14. *Biochimica Et Biophysica Acta Bba-Gen Subj.* 1863, 623–631
66. Hikino, M., Mikami, T., Faissner, A., Vilela-Silva, A.-C. E. S., Pavão, M. S. G., and Sugahara, K. (2003) Oversulfated Dermatan sulfate exhibits neurite outgrowth-promoting activity toward embryonic mouse hippocampal neurons implications of dermatan sulfate in neuritogenesis in the brain. *J Biol Chem.* 278, 43744–43754
67. Wang, M., Liu, X., Lyu, Z., Gu, H., Li, D., and Chen, H. (2017) Glycosaminoglycans (GAGs) and GAG mimetics regulate the behavior of stem cell differentiation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 150, 175–182

68. Taylor, K. R., Rudisill, J. A., and Gallo, R. L. (2005) Structural and sequence motifs in dermatan sulfate for promoting fibroblast growth factor-2 (FGF-2) and FGF-7 activity. *J Biol Chem.* 280, 5300–5306
69. Nieto-Estévez, V., Pignatelli, J., Araúzo-Bravo, M. J., Hurtado-Chong, A., and Vicario-Abejón, C. (2013) A global transcriptome analysis reveals molecular hallmarks of neural stem cell death, survival, and differentiation in response to partial FGF-2 and EGF deprivation. *Plos One.* 8, e53594
70. Lillien, L., and Raphael, H. (2000) BMP and FGF regulate the development of EGF-responsive neural progenitor cells. *Dev Camb Engl.* 127, 4993–5005
71. Ota, M., and Ito, K. (2006) BMP and FGF-2 regulate neurogenin-2 expression and the differentiation of sensory neurons and glia. *Dev Dynam.* 235, 646–655
72. Voelkel, J. E., Harvey, J. A., Adams, J. S., Lassiter, R. N., and Stark, M. R. (2014) FGF and Notch signaling in sensory neuron formation: a multifactorial approach to understanding signaling pathway hierarchy. *Mech Develop.* 134, 55–66
73. Terauchi, A., Johnson-Venkatesh, E. M., Toth, A. B., Javed, D., Sutton, M. A., and Umemori, H. (2010) Distinct FGFs promote differentiation of excitatory and inhibitory synapses. *Nature.* 465, 783–787
74. Walicke, P. A. (1988) Interactions between basic fibroblast growth factor (FGF) and glycosaminoglycans in promoting neurite outgrowth. *Exp Neurol.* 102, 144–148
75. Pollock, J. D., Krempin, M., and Ruby, B. (1990) Differential effects of NGF, FGF, EGF, cAMP, and dexamethasone on neurite outgrowth and sodium channel expression in PC12 cells. *The Journal of Neuroscience.* 10(8), 2626–2837
76. Szebeny, G., Dent, E. W., Callaway, J. L., Seys, C., Lueth, H., and Kalil, K. (2001) Fibroblast growth factor-2 promotes axon branching of cortical neurons by influencing morphology and behavior of the primary growth cone. *The Journal of Neuroscience.* 21(11), 3932–3941
77. Tojima, T., Kobayashi, S., and Ito, E. (2003) Dual role of cyclic AMP-dependent protein kinase in neuritogenesis and synaptogenesis during neuronal differentiation. *Journal of Neuroscience Research.* 74, 829–837

78. He, Z., Li, J., Zhen, C., Feng, L., and Ding, X. (2006) Effect of leukemia inhibitory factor on embryonic stem cell differentiation: implications for supporting neuronal differentiation. *Acta Pharmacol Sin.* 27, 80–90
79. Pacherník, J., Horváth, V., Kubala, L., Dvorák, P., Kozubík, A., and Hampl, A. (2007) Neural differentiation potentiated by the leukaemia inhibitory factor through STAT3 signalling in mouse embryonal carcinoma cells. *Folia Biologica (Praha)*. 53, 157–163
80. Foshay, K. M., and Gallicano, G. I. (2008) Regulation of Sox2 by STAT3 initiates commitment to the neural precursor cell fate. *Stem Cells Dev.* 17, 269–278
81. Scholze, A. R., Foo, L. C., Mulinyawe, S., and Barres, B. A. (2014) BMP signaling in astrocytes downregulates EGFR to modulate survival and maturation. *Plos One.* 9, e110668
82. Miura, T., Yuasa, N., Ota, H., Habu, M., Kawano, M., Nakayama, F., and Nishihara, S. (2019) Highly sulfated hyaluronic acid maintains human induced pluripotent stem cells under feeder-free and bFGF-free conditions. *Biochem Bioph Res Co.* 518, 506–512
83. Oikari, L. E., Okolicsanyi, R. K., Qin, A., Yu, C., Griffiths, L. R., and Haupt, L. M. (2016) Cell surface heparan sulfate proteoglycans as novel markers of human neural stem cell fate determination. *Stem Cell Res.* 16, 92–104
84. Stringer, E. J., Pritchard, C. A., and Beck, F. (2008) Cdx2 initiates histodifferentiation of the midgut endoderm. *Febs Lett.* 582, 2555–2560
85. Zorn, A. M., and Wells, J. M. (2009) Vertebrate endoderm development and organ formation. *Cell Dev Biology.* 25, 221–251
86. Sherwood, R. I., Maehr, R., Mazzoni, E. O., and Melton, D. A. (2011) Wnt signaling specifies and patterns intestinal endoderm. *Mech Develop.* 128, 387–400
87. Kumar, N., Tsai, Y.-H., Chen, L., Zhou, A., Banerjee, K. K., Saxena, M., Huang, S., Toke, N. H., Xing, J., Shivdasani, R. A., Spence, J. R., and Verzi, M. P. (2019) The lineage-specific transcription factor CDX2 navigates dynamic chromatin to control distinct stages of intestine development. *Development.* 146, dev172189