

平成 21 年 5 月 17 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007 ~ 2008
 課題番号： 19510205
 研究課題名 (和文) 糖ヌクレオチド輸送体による器官形成制御の分子メカニズム
 研究課題名 (英文) The molecular mechanisms regulating organogenesis by the nucleotide-sugar transporters
 研究代表者 平岡 秀一 (HIRAOKA SHUICHI)
 国立成育医療センター (研究所)・移植・外科研究部・共同研究員
 研究者番号：20291156

研究成果の概要:糖ヌクレオチド輸送体 Slc35d1 および Slc35d2 の遺伝子変異マウスを利用し、これらの分子が媒介するグリコサミノグリカン (GAG) 合成の、生体内における機能を検証した。その結果、これら分子は GAG 合成を介して、軟骨成長板や毛胞、マスト細胞の内顆粒の機能発現に必要であることが判明した。さらに、*SLC35D1* 遺伝子の欠損がヒト骨系統疾患である蝸牛様骨盤異形成症の原因であることも突き止めた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 複合新領域

科研費の分科・細目： ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード： 糖ヌクレオチド輸送体、グリコサミノグリカン、蝸牛様骨盤異形成症

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸 (CS) やヘパラン硫酸 (HS) 等のグリコサミノグリカン (GAG) は、ほ乳動物の組織に普遍的に存在し、様々な器官の形成・維持に必須であろうと考えられている。しかし、GAG に関する従来知見は *in vitro* の解析で得られたものが多く、生体内での機能は、十分に理解されていない。

2. 研究の目的

この問題を解決するためには GAG 合成を人

為的に操作できる動物モデルの解析が必要である。本研究では、GAG の合成を人為的に変化させることができる、遺伝子操作マウスを作製、解析することによって、生体内における GAG の機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

GAG は、小胞体やゴルジ体内腔で合成される。Slc35d1 および Slc35d2 は、GAG 合成の材料を細胞質からオルガネラ内腔へ運搬するトランスポーターである (図 1)。これら

の分子の遺伝子変異マウス[ノックアウト (KO)、フロックス (flox)]や、組織特異的に flox 導入遺伝子を破壊することの出来る Cre 組換え酵素発現マウスを利用し (図2)、Slc35d1、 Slc35d2 の機能喪失により誘導される組織の異常を、生化学的、組織化学的に分析、GAG の機能を推定する。

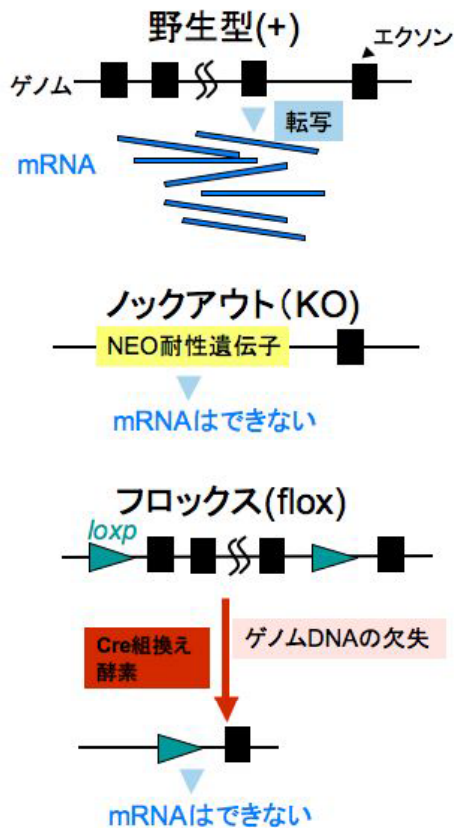
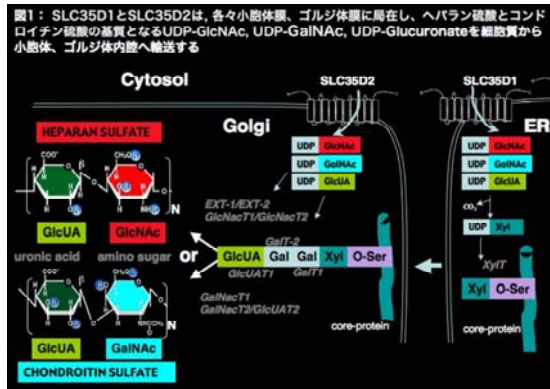


図2 Slc35d1, Slc35d2遺伝子変異アレル

4. 研究成果

遺伝子変異マウスを利用し、骨格、体毛、免疫系、神経系等について分析を行った。

(1) 骨格形成

骨は、軟骨細胞が分化することにより形成される。軟骨には非常に多くの CS が含まれているので、CS は軟骨機能に重要な役割を果たしていると推定されていた。しかし、実際に CS 合成が欠損すると、どのような異常が生じるのか不明であった。骨形成に異常が生じる *Slc35d1* 欠損マウスを解析したところ、軟骨プロテオグリカンに付加される CS が約 1/4 に減少することによって、軟骨成長板増殖層の細胞外マトリクスが顕著に縮退し、骨の形成が低下することが判明した (図3)。さらに、*Slc35d1* 欠損マウスの異常に類似する疾患があるか否か検討したところ、ヒト骨系統疾患である蝸牛様骨盤異形成症2例に、*SLC35D1* 遺伝子の変異が認められた。変異をもつ SLC35D1 蛋白質は、正常型に比べ小さく、糖ヌクレオチドトランスポーター活性が消失していたので、これら SLC35D1 遺伝子の変異によって蝸牛様骨盤異形成症が引き起こされることが明らかになった (図4)。

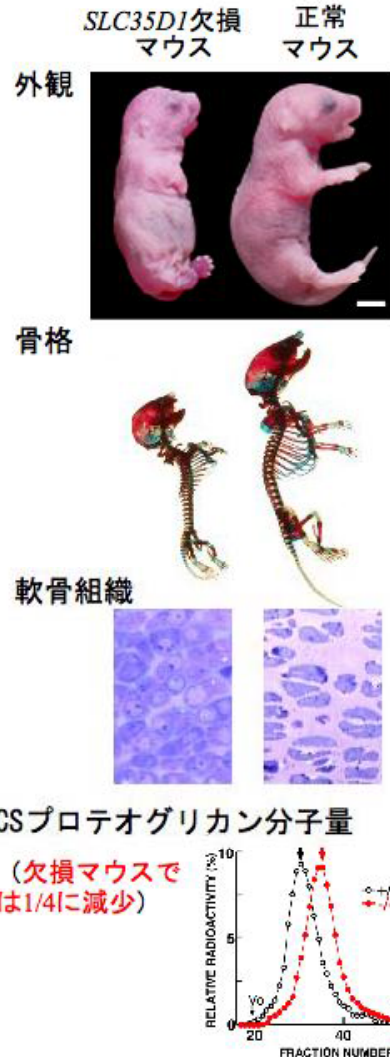
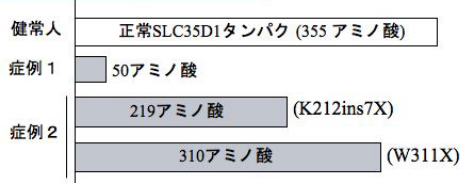


図3 Slc35d1欠損マウスの解析

以上の知見は、蝸牛様骨盤異形成症の診断や治療法の開発に応用が可能であるばかりでなく、CS鎖の異常が原因と推察されている他の骨・関節疾患の治療法の開発に結びつく可能性が考えられる(Hiraoka et al, *Nature medicine*, 2007)。

<変異SLC35D1蛋白のサイズ>



<変異SLC35D1蛋白の輸送活性>

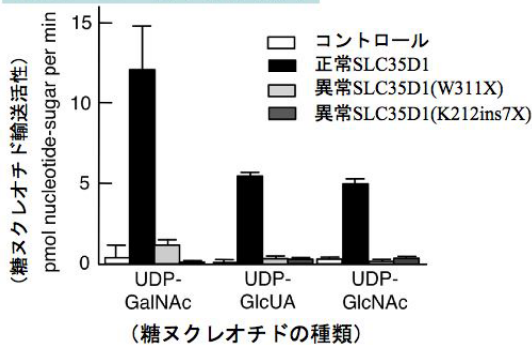


図4 蝸牛様骨盤異形成症で見つかった変異SLC35D1蛋白質の分析

(2) 体毛形成

体毛は、毛胞に局在する細胞群が適切に機能することによって形成される。既に、欠損すると発毛に異常が生じる分子が複数同定されているが、その全貌を理解するには不十分である。体毛は、発毛サイクル（成長期→退行期→休止期）の繰り返しにより、一定の長さには保たれる様、制御されている。毛胞のGAGは、発毛サイクル相によって分子種や含量が変化するので、発毛サイクルの維持を通じて、体毛形成に関与しているであろうと想像されているが、それを支持する知見は無かった。

本研究では、毛胞特異的にCre組換え酵素を発現するマウスとSlc35d系変異マウスを利用し、毛胞でのSlc35d1およびSlc35d2遺伝子の欠損を誘導した。その結果、Slc35d1とSlc35d2を双方欠損させると、対照に比べ体毛が著しく短くなることを見いだした(図5)。この観察は、GAGが、毛サイクルの成長期に機能することを示唆し、発毛サイクルの分子メカニズムを理解する上で重要な知見である。体毛形成には、FGF等のモルフォゲンが重要な働きをすることが数例報告されている。これらモルフォゲンは、GAGとの親和性を有するものが多いので、本研究は、毛

胞モルフォゲンの機能を介したGAGの役割の理解につながると期待される。

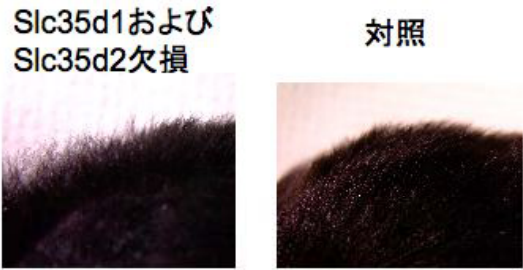


図5 毛胞におけるSlc35d1およびSlc35d2欠損により誘導される体毛の異常

(3) 免疫系および神経系

免疫系では、マスト細胞の分析で新しい知見を得た。マスト細胞は、粘膜や結合組織に分布し、その細胞内顆粒にはアレルギー反応を惹起する種々の化学物質が含まれている。マスト細胞の活性化により、顆粒内物質は細胞外へ放出され、アレルギー反応が始動する。GAGは、この細胞内顆粒の主成分であり、顆粒内物質の安定化やマスト細胞の分化に機能するであろうと考えられている。

本研究では、マウス胎児よりマスト細胞を誘導し、分析した。Slc35d1を欠損するマスト細胞では、細胞内顆粒のGAG含量が低下し、顆粒内酵素の活性がおよそ1/2に低下していた。この観察は、Slc35d1を介したGAG合成が、マスト細胞の細胞内顆粒の機能発現に必要であることを示している。本知見は、Slc35d1の機能低下が、アレルギー反応全体を抑制する可能性を示唆するもので、新たなアレルギー抑制剤開発への発展的応用が期待される。

脳神経系については、神経細胞特異的にCre組換え酵素を発現させ、Slc35d1およびSlc35d2の欠損を誘導したが、顕著な異常は見いだせなかった。

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3件)

- ① 原田理代, 村上宏宇, 大河昭彦, 沖本憲明, 平岡秀一, 他12名. FGF9 monomer-dimer equilibrium regulates extracellular matrix affinity and tissue diffusion. *Nature Genetics*.

- Vol. 41. pp289-298. (2009) 査読あり.
- ② 高橋雄, 高木篤也, 平岡秀一, 他 4 名. Transcription factors Mesp2 and Paraxis have critical roles in axial musculoskeletal formation. *Developmental Dynamics*. Vol. 236. pp1484-1494. (2007) 査読あり.
- ③ 平岡秀一, 他 17 名. Nucleotide-sugar transporter SLC35D1 is critical to chondroitin sulfate synthesis in cartilage and skeletal development in mouse and human. *Nature Medicine*. Vol. 13. pp1363-1367. (2007) 査読あり.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 平岡秀一, 他 7 名. 糖ヌクレオチド輸送体ノックアウトマウスを利用したグリコサミノグリカン機能の解析. 第22回日本軟骨代謝学会. 2009年3月6日. 名古屋国際会議場 (愛知) .
- ② 平岡秀一, 他 9 名. 糖ヌクレオチド輸送体ノックアウトマウスを利用した発生・分化における糖鎖機能の解析. 2008年12月9日. 神戸国際会議場 (兵庫) .
- ③ 平岡秀一, 他 7 名. 糖ヌクレオチド輸送体ノックアウトマウスを利用した器官形成における糖鎖機能の解析. 第40回日本発発生物学会大会. 2007年5月30日. 福岡国際会議場 (福岡) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 秀一 (HIRAOKA SHUICHI)
国立成育医療センター (研究所) ・移植・
外科研究部・共同研究員
研究者番号: 20291156

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし