

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06551

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸による骨および骨格筋を軸にした組織リモデリング調節機構の解明

研究課題名(英文)Functional analyses of chondroitin sulfate chains in bone remodeling and skeletal muscle plasticity

研究代表者

三上 雅久(Mikami, Tadahisa)

神戸薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20330425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸(CS)鎖は、代表的な硫酸化多糖の一つであり、コアタンパク質に共有結合したプロテオグリカン(CSPG)の形で存在している。CSPGは、主要な細胞外マトリックス構成成分として、接着、増殖、分化・再生といった細胞の様々な機能を支える微小環境を構築する。こうしたCSPGの機能の多くは、多様な構造を示すCS鎖部分を介して発揮される。

本研究では、骨リモデリングおよび骨格筋可塑性におけるCS鎖の機能解明を目指し、1)CS鎖の破骨細胞分化抑制作用の分子機構の特定に繋がる知見を得た。また、2)骨格筋におけるCS鎖の加齢性構造変化が骨格筋再生・維持機能の低下に密接に関連することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果から、細胞周囲の微細環境を形づくるCS鎖が、骨や骨格筋といった運動器を支える構成要素の分化・再生過程を調節する多機能糖鎖であることを裏付けることができた。CS鎖の質的・量的な発現制御に主眼を置いた本研究の成果は、運動器症候群の原因疾患である骨粗鬆症やサルコペニアに対する新たな治療戦略の基盤構築に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate (CS) chains are representative sulfated glycosaminoglycan polysaccharides covalently attached to distinct protein cores to form proteoglycans (CSPGs). CSPGs are ubiquitous extra/pericellular matrix components that contribute to creating microenvironmental niches to support diverse cellular processes, including cell adhesion, proliferation, differentiation, and regeneration. These multiple actions of CSPGs are largely exerted through the CS moieties with structural heterogeneity.

In this study, we focused on functional roles of CS chains in bone remodeling and skeletal muscle plasticity. We found the potential sites of action for CS chains to inhibit osteoclastogenesis, and the structural and functional characteristics of age-related CS chains in skeletal muscles.

研究分野：生化学、分子生物学、糖鎖生物学

キーワード：コンドロイチン硫酸 組織リモデリング 骨粗鬆症 サルコペニア 筋サテライト細胞

1. 研究開始当初の背景

硫酸化多糖の一つである CS 鎖は、特定のコアタンパク質に共有結合したプロテオグリカン (CSPG) として細胞表面や細胞外マトリックスに普遍的に分布し、形態形成や神経可塑性などの様々な生命現象に関与する。その機能の多くは、糖鎖部分である CS 鎖の性質 (発現量や硫酸化パターン) に大きく依存する。実際、CS 鎖の発現は、その生合成/分解系により厳密に制御されており、これらの破綻は、発生異常や病態発現機序の一因となりうる。

CS 鎖の生合成に関わる幾つかの酵素は、骨系統疾患の原因遺伝子であることが判明しており、CS 鎖が骨格形成に必須であることは明白である。しかしながら、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランスの上に成り立つ骨リモデリング機構において、CS 鎖が果たす役割については解析が不十分であった。これまでに我々は、女性ホルモン刺激により、骨芽細胞における CS-E (高硫酸化 CS バリエーションの 1 つ) の産生が誘導され、CS-E 依存的な骨芽細胞分化が亢進すること、エストロゲン枯渇による骨密度の低下が、骨吸収の亢進のみならず、CS-E 依存的な骨形成能の低下に起因することを明らかにしている。一方予備的な解析から、CS-E の破骨細胞分化に対する効果は抑制的であるという結果を得ていた。

運動機能の主体をなす骨格筋は、再生能力が高く、ダメージを受けても筋組織内に点在する筋サテライト細胞を動員し、速やかに再生する。サルコペニアの発症に繋がる、加齢に伴う骨格筋再生能の低下は、筋組織内の微小環境変化に起因すると考えられているが、その実体はよくわかっていなかった。これまでに我々は、骨格筋組織に発現する主要な CS サブタイプである CS-A の一過的な発現低下が骨格筋分化の進行促進に寄与すること、細菌由来の CS 分解酵素 (ChABC) を単回投与し、筋損傷部位の CS-A を分解することで、筋再生の促進や、筋ジストロフィーモデルマウスの症状が改善することを見出している。これらの知見は、筋組織内の CS-A を一過的に減少させる戦略が、筋サテライト細胞の活性化を介した骨格筋の再生促進に有効であることを支持する。実際、予備的な解析から、CS-A の発現が減少したマウスでは、筋サテライト細胞の数が減少傾向にあることも見出していた。

2. 研究の目的

超高齢社会を迎えた本邦において、健康寿命の延伸は達成すべき重要な課題であり、その実現には自立性の低下を誘引する運動器症候群の克服が不可欠である。本研究では、CS 鎖の発現が加齢に伴い減少することを踏まえ、「運動器全般の正常な組織リモデリング機構が機能的 CS 鎖の発現により担保されている」という仮説を実証すべく、骨および骨格筋を基軸にした運動器の組織リモデリング過程における CS 鎖の役割と作用機序の包括的解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) “CS-E” タイプの CS 鎖による破骨細胞分化抑制の作用機序の解析

CS-E 多糖による外因的刺激が、RANKL (分化誘導サイトカイン) 誘導性の破骨細胞分化系にどのような影響を与えるかを細胞内シグナルの変化を指標に調べ、CS-E による分化抑制の作用点 (RANKL シグナルの直接的阻害、Semaphorin 3A や osteoactivin を介した分化阻害経路の増強、インテグリン $\alpha V \beta 3$ シグナルの調節など) の絞り込みを行なった。次いで、BIAcore を利用した分子間相互作用解析などにより、絞り込んだ作用点に関連した候補分子と CS-E との結合性を明らかにすることで、それら作用点の妥当性を検証した。

(2) 筋サテライト細胞を介した骨格筋再生過程に及ぼす CS-A の役割とその作用機序の解析

CS-A 依存的な骨格筋リモデリング調節機構の解明を目指し、野生型および CS-A 減少マウス (特定の CS 合成酵素の欠損により CS-A タイプの CS 鎖が減少した系統) をはじめ、所属研究室が保有する種々の CS 代謝酵素の遺伝子改変マウスの筋肉量や運動機能などの基礎的データを収集・比較した。また、バクテリア由来の CS 分解酵素を利用した二糖組成解析により、各系統マウスの骨格筋における CS 鎖の加齢性構造変化を網羅的に調べ、CS-A タイプの CS 鎖と筋老化との間に関連性があるかを調べた。さらに、筋サテライト細胞の維持における CS-A の役割とその作用機序の足がかりを得るために、各系統マウスの筋切片や単一筋線維培養系を利用し、休止 (Pax7⁺) および活性化 (MyoD⁺) 状態にある筋サテライト細胞の数や存在頻度を調べた。骨格筋再生過程における CS-A の機能解析に際しては、各系統マウスの骨格筋に塩化バリウム投与し、実験的に筋損傷を誘発させた。塩化バリウム投与後 7 または 14 日後の当該筋から新鮮凍結切片を作製し、免疫蛍光染色により筋線維を可視化した。各系統の損傷筋および非損傷筋の断面積を計測し、骨格筋の再生修復能を比較解析した。

4. 研究成果

(1) “CS-E” タイプの CS 鎖による破骨細胞分化抑制の作用機序の解析

骨髄由来マクロファージを用いた RANKL 誘導性の破骨細胞分化系において、CS-E を処置するタイミングを変えることで、CS-E の破骨細胞分化抑制作用の作用点の絞り込みを行なった。

その結果、CS-E の作用点は、細胞融合・多核化が活発に起こる分化初期段階のみならず、骨吸収能を発揮する成熟後の段階にも存在することが判明した。次に、分化初期段階における CS-E の作用点の分子基盤の解析を行なったところ、CS-E は、弱いながらも RANKL シグナルの入力を直接的に抑制するはたらきをもつこと、また、RANKL 刺激により誘導される、ERK をはじめとする複数の細胞内シグナル分子の活性化状態が、CS-E の存在下で影響を受けることを見出した。加えて、CS-E の作用点のさらなる検索を行い、破骨前駆細胞上に、CS-E を認識する受容体分子が存在することも見出した。この受容体を介する経路は、下流の細胞内シグナル伝達系で、RANKL 誘導性の破骨細胞分化シグナルをブロックすることも判明したことから、分化初期段階における CS-E の主要な作用点であると考えられた。さらに、同細胞分化系を利用し、CS-E と同様に骨芽細胞から産生される既知の破骨細胞分化抑制因子 (Semaphorin 3A および osteoactivin) の抑制効果を比較したところ、両因子と比べて、CS-E がより強い抑制作用を示す因子であることがわかった。

(2) 筋サテライト細胞を介した骨格筋再生過程に及ぼす CS-A の役割とその作用機序の解析

まず、骨格筋リモデリングにおける CS 鎖の構造-機能相関を明らかにする目的で、野生型マウスの骨格筋から、グリコサミノグリカン画分を抽出・精製し、当該画分に含まれる CS 鎖の二糖組成解析により、骨格筋における CS 鎖の加齢性構造変化を調べた。その結果、骨格筋に発現する CS 鎖は、加齢に伴いその量が漸減する傾向を示すのみならず、硫酸化構造が劇的に変動し、特に CS-A タイプの CS 鎖が増加する傾向を示した。本結果を踏まえ、野生型および CS-A 減少マウスをはじめ、所属研究室が保有する種々の CS 代謝酵素の遺伝子改変マウスの筋肉量や運動機能、筋サテライト細胞の数や存在頻度、実験的筋損傷後の再生修復能などを調べたところ、この老齢型 CS 鎖に特徴的な硫酸化構造は、筋サテライト細胞プールの維持やその活性化を介した筋再生修復に対して抑制的であることがわかった。さらに、若齢マウスの骨格筋に検出される特徴的な CS 鎖を過剰発現する遺伝子改変マウスの解析を重点的に行った結果、Wnt シグナルをはじめ筋老化の指標となるパラメータが、野生型マウスに比べ低値を示すことが判明した。これらの結果から、骨格筋における CS 鎖の加齢性構造変化は、サテライト細胞を軸とした骨格筋の再生・維持機能の低下を招く要因の一つであり、CS 鎖の質的・量的な発現制御がサルコペニアの治療・予防法の開発に有用であることが強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mikami, T., Kitagawa, H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Biosynthesis and Degradation of Glycans of the Extracellular Matrix: Sulfated Glycosaminoglycans, Hyaluronan, and Matriglycan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Comprehensive Glycoscience, 2nd edition (ed. Joe Barchi), Elsevier	6. 最初と最後の頁 29-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-819475-1.00018-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Mikami, T., Kitagawa, H.	4. 巻 33
2. 論文標題 Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycans Regulate Distinct Cell Surface Receptor-Mediated Neuronal Functions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Trends in Glycoscience and Glycotechnology	6. 最初と最後の頁 E11-E16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4052/tigg.2004.1E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Katagiri, T., Uemura, S., Ushiki, T., Nakajima-Takagi, Y., Oshima, M., Mikami, T., Kawasaki, A., Ishiguro, H., Tanaka, T., Sone, H., Kitagawa, H., Igarashi, M., Iwama, A., Masuko, M.	4. 巻 96
2. 論文標題 Distinct effects of chondroitin sulfate on hematopoietic cells and the stromal microenvironment in bone marrow hematopoiesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp. Hematol.	6. 最初と最後の頁 52-62.e5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.exphem.2021.02.003.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki, T., Sato, Y., Okuno, Y., Goshima, F., Mikami, T., Umeda, M., Murata, T., Watanabe, T., Watashi, K., Wakita, T., Kitagawa, H., Kimura, H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Genome-wide CRISPR screen for HSV-1 host factors reveals PAPSS1 contributes to heparan sulfate synthesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03581-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Koike, T., Mikami, T., Tamura, J., Kitagawa, H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Altered sulfation status of FAM20C-dependent chondroitin sulfate is associated with osteosclerotic bone dysplasia.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 7952
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35687-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mikami, T., Kitagawa, H.	4. 巻 173
2. 論文標題 Chondroitin sulfate glycosaminoglycans function as extra/pericellular ligands for cell surface receptors.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Biochem.	6. 最初と最後の頁 329-332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac110	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mikami, T., Kitagawa, H.	4. 巻 2619
2. 論文標題 Immunochemical detection and glycosaminoglycan disaccharide-based characterization of chondroitin sulfate proteoglycans.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 25-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvac110.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 三上雅久, 北川裕之
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸の骨格筋可塑性における役割と加齢性変化
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井村 朱里, 藤本 麻里, 香川 倫乃, 伊藤 宜広, 三上 雅久, 北川 裕之
2. 発表標題 骨格筋内コンドロイチン硫酸鎖の加齢性構造変化とサルコペニア発症との関連
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森下 雅子, 藤本 卓也, 志田 美春, 三上 雅久, 北川 裕之
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸-Dによるインテグリン V 3の活性化は神経突起伸長や神経分化を制御する
3. 学会等名 日本薬学会141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上雅久, 北川裕之
2. 発表標題 コンドロイチン硫酸の骨格筋維持機構における役割と加齢性構造変化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三上雅久, 北川裕之
2. 発表標題 骨格筋におけるコンドロイチン硫酸の加齢性構造変化と再生・維持に与える影響
3. 学会等名 第41回日本糖質学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神戸薬科大学生化学研究室ホームページ
<http://www.kobepharma-u.ac.jp/biochem/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	北川 裕之 (Kitagawa Hiroshi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------