

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21390428

研究課題名(和文)糖ヌクレオチド輸送体変異マウスを利用した軟骨における糖鎖機能の解析

研究課題名(英文)The functional analysis of the nucleotide-sugar transporter SLC35D1 and SLC35D2 in cartilage using knockout mice model.

研究代表者

平岡 秀一 (HIRAOKA, SHUICHI)

神戸薬科大学・薬学部・研究生

研究者番号：20291156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸(CS)は、軟骨機能の十全な発現に必要である。糖ヌクレオチド輸送体SLC35D1およびSLC35D2はCSの合成基質供給を担当する。軟骨CSの合成制御や機能を明らかにするため、SLC35D1のKOおよび低形質、SLC35D2のKO変異を組み合わせ、CS合成が種々のレベルで低下したマウスの作出を試みた。その結果、これらの遺伝子がCS合成に必要であり、CS量と骨格異常に顕著な相関性がある事が判明した。また、Floxマウスを利用し成体マウスでSLC35D1を欠損させると、腸管機能が著しく障害された。この知見は、未同定のヒトSLC35D1漏出性変異の同定に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The chondroitin sulfate (CS) is required for various cartilage functions. The nucleotide-sugar transporter SLC35D1 and SLC35D2 supply substrates to polymerize CS. I analyzed compound mutant mice harboring in SLC35D1 KO and hypomorphic, and SLC35D2 KO mutations. As a result of investigations, I clarified that both transporters play the essential role for CS synthesis of proteoglycans in cartilage, (2) various combinations of mutant alleles of both coding genes induce to step wise reduction of CS producing level in cartilage, (3) the skeletal abnormalities are observed in response to the reduction level of CS synthesis. I also investigated SLC35D1 function using Flox mutant of SLC35d1 mice. I observed critical loss of intestinal functions in adult mice lacking SLC35D1 by inducible gene disruption strategy. The novel function of SLC35D1 in intestine is useful to survey unidentified leaky-type mutations of SLC35D1 in human, which may survive during perinatal period.

研究分野：整形外科学

科研費の分科・細目：骨軟骨代謝学

キーワード：糖ヌクレオチド輸送体 軟骨疾患 コンドロイチン硫酸

合成の低下レベルに応じた軟骨の機能異常を明確にし、さらに *Slc35d2* の機能を推測した。

(2) *Flox* マウスを用いた組織・時期特異的遺伝子破壊系を用いた解析

Slc35d1^{flox/flox} および *Slc35d1^{flox/flox}Slc35d2^{KO/KO}* マウスに対し、交配により、次の Cre 組換え酵素発現系を導入、成体マウスの関節軟骨や骨端軟骨を生化学的、組織化学的に分析した。

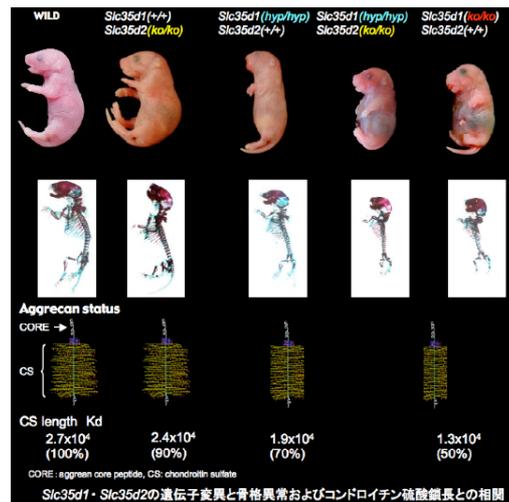
- ・ *Prx1-Cre* : Cre 遺伝子を四肢に発現するトランスジーン系統
- ・ *Col2-CreERT^{tg}* : 軟骨特異的にタモキシフェン(TXF)誘導型 Cre 組換え酵素(*CreERT*)を発現するトランスジーン系統。
- ・ *Rosa-CreERT^{tg}*: 全身に *CreERT* を発現するトランスジーン系統。

4. 研究成果

(1) *SLC35D2* の軟骨コンドロイチン硫酸合成に対する寄与

Conventional KO を用いた研究から、*Slc35d1* が CS 合成に必要であることが明らかとなっていたが、*Slc35d2* 欠損マウスは特に異常を示さないためその機能は分からなかった。*Slc35d2* は *Slc35d1* と共に欠損すると、相乗的に表現型が増加する。この性質を利用して軟骨における *Slc35d2* の機能の解明を試みた(下図)。低形質マウス *Slc35d1^{hyp/hyp}* は、遺伝子発現低下により *Slc35d1^{KO/KO}* より弱い異常を示し、野生型と *Slc35d1^{KO/KO}* の中間程度の骨軟骨異形成症を呈した。*Slc35d2^{KO}* 変異を導入したマウス *Slc35d1^{hyp/hyp} · Slc35d2^{KO/KO}* は約半数が胎齢 13 日前後に死亡、残り半数は周産期まで生存し、*Slc35d1* 単独の KO マウスと同程度の骨軟骨異形成症を呈した。軟骨の PG、CS を分析したところ、*Slc35d1^{hyp/hyp}* マウスでは、*Slc35d2^{KO/KO}* のものより高分子であったが、*Slc35d1^{hyp/hyp} · Slc35d2^{KO/KO}* では *Slc35d1^{KO/KO}* のものと同様分子であった。この観察から、骨端軟骨プロテオグリカンへの CS 付加に対して、*Slc35d2* は *Slc35d1* と相似の機能を有すると結論した。また、コンドロイチン硫酸合成活

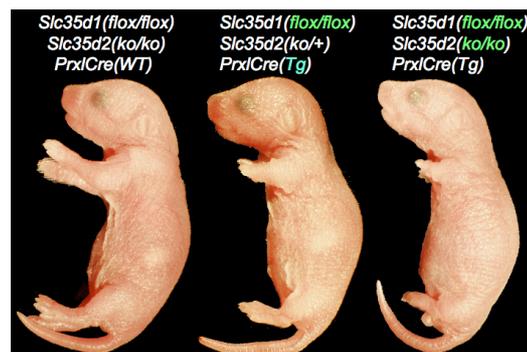
性と骨軟骨異形成症の症状の程度に顕著な相関性があることも明らかとなった(下図)。

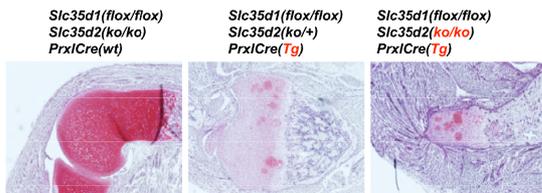


(2) 組織特異的遺伝子破壊マウスを利用した糖ヌクレオチド輸送体 *Slc35d1* および *Slc35d2* の軟骨分化・機能維持における機能解析

研究成果(1)で用いた conventional KO マウスは胸郭の低形成による呼吸不全により出生後に死亡するため、その後の成長・発達過程や成長停止後の軟骨機能を分析する為には、不十分であった。そこで、組織特異的な遺伝子破壊により、この問題を克服し、出生後の軟骨機能におけるこれら輸送体の役割を明らかにすることを試みた。

四肢に Cre の発現系を導入した *Slc35d1^{flox/flox} · Prx1-Cre* および *Slc35d1^{flox/flox}Slc35d2^{KO/KO} · Prx1-Cre* マウスでは、いずれも四肢の著しい短縮が認められたが(下図)、出生後も致死性を示さず、離乳期を超えて生存した。軟骨 CS を組織化学的に分析したところ、CS 含量の顕著な減少が観察された。表現型は *Slc35d2^{KO/KO}* の導入により増加し、前肢の第三指と第四指の間に異



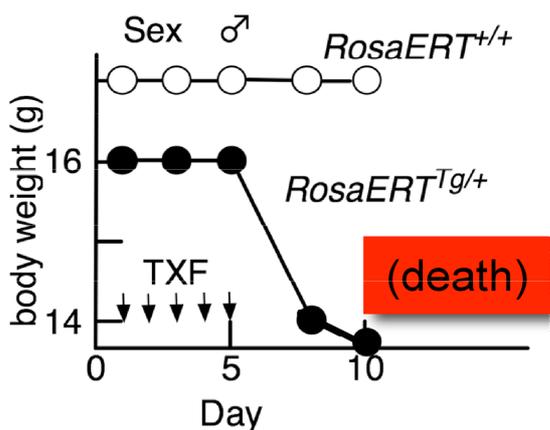


常が生じている個体が認められた。

Col2-CreERT を同様に導入したマウスに対し、出生後 18 日までに TXF を投与すると、成長の遅滞が観察された。この様に、*Prx1-Cre* および *Col2-CreERT* の導入による組織特異的な *Slc35d1* および *Slc35d2* 遺伝子破壊は、出生後の致死性を回避することが可能であった。これらマウスモデルは、異なる分析視点を提供することが出来るため、成長期やそれ以降での四肢軟骨機能の解析に有用であろうと考えられた。

(3) *Slc35d1* の新しい機能

成体マウスにおける *Slc35d1* の全身欠損が軟骨組織にのみ影響を与えるのか、それとも軟骨以外の組織にも影響を与えるのか、解析した。TXF 誘導性の Cre を全身に発現する *Rosa-CreERT^{Tg}* を導入したマウス *Slc35d1^{flox/flox} Rosa-CreERT^{Tg}* を作製した。この遺伝子型の成体マウスに TXF を 5 日間投与し、全身で *Slc35d1* 遺伝子の破壊を誘導したところ、体重が著しく減少し、重度の下痢を発症し死亡した (下図)。



この観察から、*Slc35d1* は腸管の正常な機能維持に必要である事が判明した。腸管では、ムチンなど粘膜層の成分に付加される糖鎖が重要な働きをしているとされている。しかし、*in vivo* でその検証に有用な動物モデルの数は少ない。このマウスモデルは、この問

題を克服するツールになる可能性がある。この問題については、あらたな研究テーマとして継続して研究を行うこととなった (挑戦的萌芽研究(#25670170). 糖ヌクレオチド輸送体による腸管機能制御の分子メカニズム)。

(4) ヒト *SLC35D1* および *SLC35D2* 遺伝子変異の探索

外部研究機関と共同で蝸牛様骨盤異形成症などの原因遺伝子を探索したところ、*SLC35D1* の活性が完全に失われる *functional null mutation* が新たに見つかった。しかし、活性が一部残存する *leaky-type mutation* や、*SLC35D2* の変異は見つからなかった (Furuichi T, Kayserili H, Hiraoka S, et al. J Med Genet. 46:562-868. 2009)。従って、これらの変異は蝸牛様骨盤異形成症とは異なる形態をとると考えられた。本研究で明らかとなった知見は、将来、これら未同定の遺伝子変異の発見に役立つであろうと考えられる。

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 *Shimoyama T, *Hiraoka S et al (*co-first author). CCN3 inhibits neointimal hyperplasia through modulation of smooth muscle cell growth and migration. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 30:675-682. 2010 doi: 10.1161/ATVBAHA.110.203356.

②Furuichi T, Kayserili H, Hiraoka S, et al. Identification of loss-of-function mutations of *SLC35D1* in patients with Schneckenbecken dysplasia, but not with other severe spondylodysplastic dysplasias group diseases. J Med Genet. 46:562-868. 2009 doi: 10.1136/jmg.2008.065201. Epub 2009 Jun 8.

③Matsushita Y, Sakamoto K, Tamamura Y, Shibata Y, Minamizato T, Kihara T, Ito M,

Katsube K, Hiraoka S, CCN3 protein participates in bone regeneration as an inhibitory factor. J Biol Chem. 288:19973-19985. 2013 doi: 10.1074/jbc.M113.454652. Epub 2013 May 7.

〔学会発表〕（計 8 件）

①平岡秀一、他 3 名 糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D2 は軟骨プロテオグリカンのコンドロイチン硫酸合成に寄与する. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 12 日パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

②平岡秀一、他 4 名. 糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D2 の軟骨コンドロイチン硫酸合成に対する寄与 第 23 回日本軟骨代謝学会学術集会 2010 年 4 月 3 日 鹿児島県医師会館

③平岡秀一 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 第 11 回日本運動器科学研究会 2010 年 9 月 9 日 軽井沢万平ホテル

④平岡秀一、他 3 名 組織特異的遺伝子破壊マウスを利用した糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 および SLC35D2 の軟骨分化・機能維持における機能解析. 第 24 回日本軟骨代謝学会学術集会 2011 年 3 月 4 日 九州大学医学部

⑤ 平岡秀一 A practical approach to identify the roles of glycosylations in organ development using Nucleotide-Sugar transporter knockout mice. 第 28 回内藤カンファレンス 2011 年 7 月 29 日 湘南国際村

⑥平岡秀一 糖ヌクレオチド輸送体 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011 年 10 月 20 日 群馬県民会館

⑦平岡秀一、他 4 名 ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 および SLC35D2 を媒介したグリコサミノグリカン合成は初期胚の正常な分化に必要である。第 33 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド 2011 年 12 月 9 日

⑧平岡秀一、他 4 名 組織特異的遺伝子破壊マウスを利用した糖ヌクレオチド輸送体 SLC35D1 および SLC35D2 の軟骨分化・機能維持における機能解析 第 35 回日本分子生物学会年会 マリンメッセ福岡 2012 年 12 月

11 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 秀一 (Hiraoka Shuichi)

神戸薬科大学 薬学部 研究生 研究者番号: 20291156

(2) 連携研究者

浅原 弘嗣 (Asahara Hiroshi)

国立成育医療研究センター 移植外科研究部 部長 研究者番号: 70294460