

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05932

研究課題名（和文）運動器疾患の克服に向けた糖ヌクレオチド代謝の基礎研究

研究課題名（英文）Basic research on nucleotide sugar metabolism to overcome diseases of the locomotor system

研究代表者

古市 達哉（Furuichi, Tatsuya）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30392103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：糖ヌクレオチド代謝関連分子の運動器における機能として、以下を示した。(1) Cant1 KOマウス腱ではコラーゲン細繊維の大型化、真円度の低下、集合不全が生じており、デルマタン硫酸含量は著明に減少していた。CANT1はデルマタン硫酸の産生調節を介して腱コラーゲン線維の構築に関与していることが示された。(2) Slc35a3 KOマウスは重度の脊椎形成不全を呈し、出生後、数時間以内に死亡した。KOマウスの成長板では細胞外マトリックスが著明に減少しており、グリコサミノグリカン（GAG）含量が有意に低下していた。SLC35A3はGAG産生を調節することで、軟骨形成に関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化社会を迎えている日本では、運動器疾患が急増しており、その対策が急務となっている。糖鎖は運動器構成細胞の機能においても重要な働きを担っており、糖ヌクレオチド（Nucleotide sugar: NS）代謝関連分子は運動器疾患治療薬の標的分子になり得る可能性を持っている。本研究によって腱の発生または恒常性維持に関わるNS関連分子としてCANT1、脊椎と軟骨形成に関わるNS関連分子としてSLC35A3を同定することができた。両分子の機能解析を継続し、NS代謝関連分子を標的とした創薬研究へと発展させていきたい。

研究成果の概要（英文）：The following functions of the two nucleotide sugar (NS)-related molecules (CANT1 and SLC35A3) in the locomotor system were demonstrated. (1) In the tendon of Cant1-KO mice, the collagen fibrils were larger, less rounded, and poorly assembled, and the content of dermatan sulfate was markedly reduced. These results indicate that CANT1 is involved in the construction of tendon collagen fibers by regulating dermatan sulfate synthesis. (2) Slc35a3-KO mice exhibited severe spinal dysplasia and died within hours after birth. In the growth plate cartilage of Slc35a3-KO mice, the extracellular space was drastically reduced, and the contents of glycosaminoglycan (GAG) were significantly decreased. These results indicate that SLC35A3 is involved in cartilage formation by regulating GAG synthesis.

研究分野：基礎獣医学

キーワード：糖ヌクレオチド 腱 軟骨 CANT1 SLC35A3 運動器疾患

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在はポストゲノム時代にあり、糖鎖はタンパク質、DNA・ゲノムに続く第三の生命鎖と呼ばれ、大きな注目を浴びている。糖鎖は糖転移酵素によって糖受容体に単糖が一つ一つ付加されることによって合成され、この反応における糖供与体の正体は、糖ヌクレオチド (Nucleotide sugar : NS) である。申請者はこれまでに 2 つの NS 代謝関連遺伝子 (CANT1 と SLC35D1) の欠損マウスを作製し、これらの遺伝子が骨格の発生に重要であることを報告してきた<sup>1,2)</sup>。高齢化社会を迎えている日本では、運動器疾患が急増しており、その対策が急務となっている。糖鎖は運動器構成細胞の機能においても重要な働きを担っている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は運動器における NS 代謝関連分子の役割を解明し、将来的に運動器疾患の創薬研究へ発展させることであり、以下の 2 つの研究に取り組んだ。

#### (1) CANT1 の腱組織における役割の検討

ほとんどの NS は細胞質で合成され、NS 輸送体によって、糖鎖合成の場である小胞体とゴルジ体の内腔へ輸送される。CANT1 (calcium activated nucleotidase 1) はゴルジ体と小胞体の内腔に存在し、NS 輸送の調節に関与している。報告者はゲノム編集によって *Cant1* 欠損 (KO) マウスを作製し、同マウスは軟骨形成不全を呈すること、この主な原因は軟骨におけるグリコサミノグリカン (GAG) の合成不全であることを報告してきた<sup>2)</sup>。GAG は腱・靭帯に豊富に存在することから、CANT1 は腱の発生や恒常性維持においても重要な役割を担っていると予測し、*Cant1* KO マウスの腱組織について詳細な組織学的、生化学的解析をおこなった。

#### (2) *Slc35a3* KO マウスの作製と表現型解析

SLC35A3 (solute carrier family 35 member A3) はゴルジ体膜に発現する NS 輸送体であり、主に UDP-*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) を輸送する。SLC35A3 はウシ複合脊椎形成不全症の原因遺伝子として報告されていたことから<sup>3)</sup>、骨格形成に重要な NS 関連分子であることが予測された。そこで、ゲノム編集システムを用いて、*Slc35a3* KO マウスを作製し、表現型解析を行なった。

### 3. 研究の方法

報告者が作製した *Cant1* KO マウスから摘出した腱組織を用いて組織学的解析 [HE 染色、透過型電子顕微鏡 (TEM) 解析]、生化学解析 [GAG 糖鎖の二糖分析、プロテオグカン (PG) のウエスタンブロット解析等]をおこなった。

CRISPER/Cas9 ゲノム編集システムを用いて *Slc35a3* KO マウスを作製し、骨格標本作製、組織学的解析 [HE 染色、BrdU 染色、TUNEL 染色等]、GAG 糖鎖の二糖分析等を実施した。野生型 E9.25 マウス胚を用いたホールマウント in situ ハイブリダイゼーション (WISH) によって、*Slc35a3* mRNA 発現部位を同定した。

### 4. 研究成果

#### (1) CANT1 の腱組織における役割の検討

6 ヶ月齢の *Cant1* KO マウスにおける膝蓋腱および尾腱の幅は、コントロールマウスと比べ短縮していた (図 1 A)。TEM 解析の結果、*Cant1* KO マウスの腱におけるコラーゲン細繊維の面積

は、コントロールと比べ有意に増加しており、真円度は有意に低下していた (図 1 B)。 *Cant1* KO マウスでは長い長径のコラーゲン細線維の割合が増加し、短い長径の細線維の割合は減少していた (データ示さず)。 GAG 二糖分析から *Cant1* KO マウスの腱におけるデルマトン硫酸含量はコントロールと

比べ著しく減少しており (データ示さず)、ウエスタンブロット解析から、デコリンコアタンパクに付加しているデルマトン硫酸の分子量も低下していることが示された (図 2)。

以上の結果から、 *Cant1* KO マウスの腱ではコラーゲン細線維の大型化、真円度の低下、集合不全が生じており、CANT1 はコラーゲン線維の構築に関与している

ことが明らかとなった。デルマトン硫酸鎖を 1 本持つ PG であるデコリンは、コラーゲン細線維の構築、成熟、そして配向性の形成に重要である<sup>4)</sup>。またデルマトンの硫酸化異常は皮膚にコラーゲン細線維の集合不全などの異常を引き起こし、力学的強度を低下させる<sup>5)</sup>。 *Cant1* KO マウスの腱ではデルマトン硫酸の合成不全とそれに伴うデコリンの機能不全が原因で、コラーゲン細線維の構築と成熟、そしてその後の集合過程のいずれかに異常が生じていることが強く示唆された。 CANT1 変異によって発症するヒト遺伝性疾患であるの Desbuquois 骨異形成症 1 型の臨床所見として関節弛緩があり、この病態には今回明らかとなった CANT1 の機能欠損によって引き起こされる腱組織の異常が関係しているのかもしれない。

## (2) *Slc35a3* KO マウスの作製と表現型解析

*Slc35a3* KO マウスは重度の脊椎形成不全を呈し、出生後、数時間以内に死亡した (Fig. 3A, B)<sup>6)</sup>。 WISH 解析によって、 *Slc35a3* mRNA は体節形成期の未分節中胚葉で発現していることが示された (図 4)。

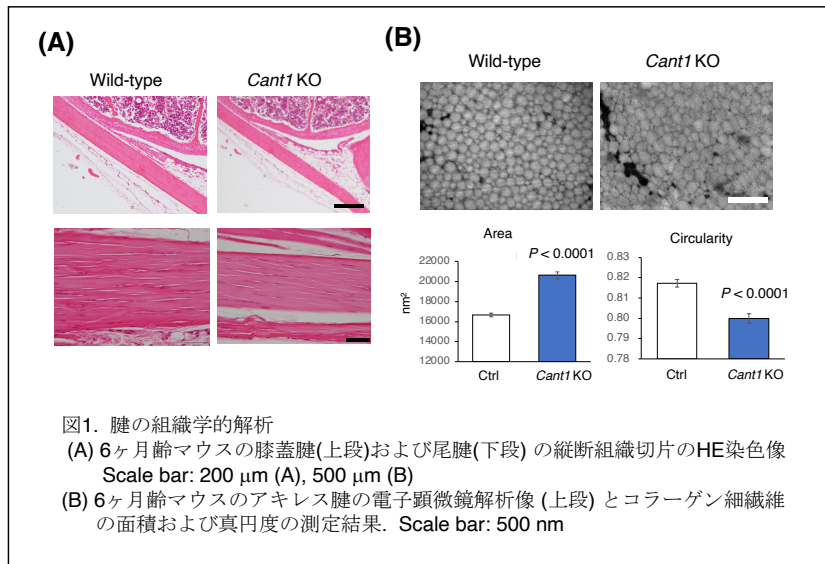


図1. 腱の組織学的解析  
(A) 6ヶ月齢マウスの膝蓋腱(上段)および尾腱(下段)の縦断組織切片のHE染色像  
Scale bar: 200  $\mu\text{m}$  (A), 500  $\mu\text{m}$  (B)  
(B) 6ヶ月齢マウスのアキレス腱の電子顕微鏡解析像 (上段) とコラーゲン細線維の面積および真円度の測定結果. Scale bar: 500 nm

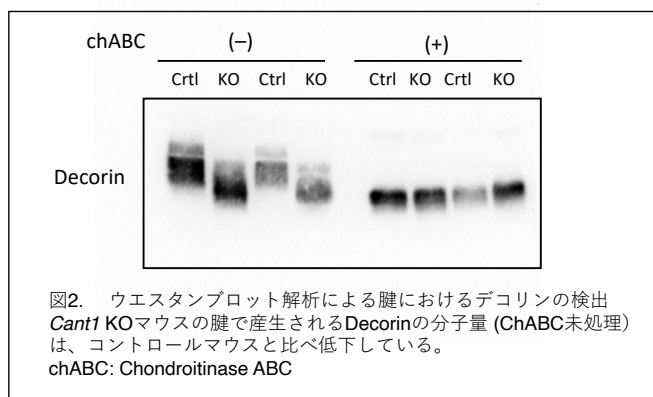


図2. ウエスタンブロット解析による腱におけるデコリンの検出  
*Cant1* KOマウスの腱で産生されるDecorinの分子量 (ChABC未処理) は、コントロールマウスと比べ低下している。  
chABC: Chondroitinase ABC

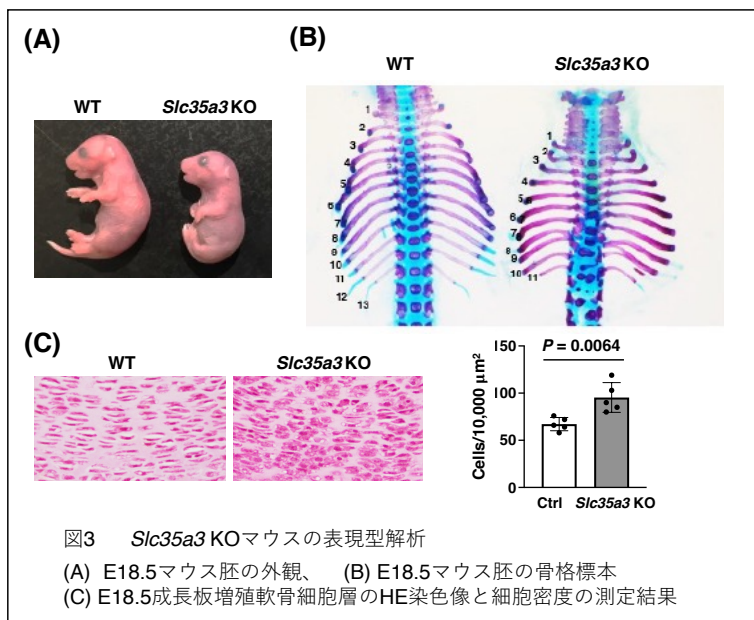


図3 *Slc35a3* KOマウスの表現型解析  
(A) E18.5マウス胚の外観、 (B) E18.5マウス胚の骨格標本  
(C) E18.5成長板増殖軟骨細胞層のHE染色像と細胞密度の測定結果

E18.5 の *Slc35a3* KO マウスの成長板では細胞外マトリックス領域が著明に減少しており、多くの扁平な増殖軟骨細胞は変形していた (Fig. 3C)。 *Slc35a3* KO マウスの脊椎では、コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸、ヘパラン硫酸、そしてケラタン硫酸といった GAG 含量が有意に低下していた (Fig. 5)。

脊椎は胎生期に未分節中胚葉が周期的にくびれ切れることで形成される体節に由来する。体節形成には Notch シグナルが重要な役割を担っており、Notch 受容体上の *O*-フコース残基に GlcNAc を付加する糖転移酵素をコードしている *LFNG* 遺伝子の変異は、ヒトとマウスで重度の脊椎形成不全を引き起こす<sup>7)</sup>。 *Slc35a3* mRNA は体節形成期の未分節中胚葉で発現していることが明らかとなり、SLC35A3 は *LFNG* の基質として用いられる UDP-GlcNAc を輸送することで体節形成に関わっていることが示唆された。 *Slc35a3* KO マウスでは

GAG の産生量が低下しており、認められた軟骨の組織学的異常は、過去に報告されている GAG 産生異常を伴う変異マウスに認められる異常と類似していた<sup>8)</sup>。従って、 *Slc35a3* KO マウスの軟骨形成不全には、GAG の産生異常が関与していることが示唆された。これらのマウスに共通して軟骨における ECM の減少と扁平軟骨細胞の変形が観察されることから、軟骨組織における GAG は ECM のスペース確保と扁平軟骨細胞の形態維持に関与しているのかもしれない。

本研究から、腱の発生または恒常性維持に関わる NS 関連分子として *CANT1*、脊椎と軟骨形成に関わる NS 関連分子として *SLC35A3* を同定することができた。両分子の機能解析を継続し、運動器疾患の創薬研究へつなげていきたい。

## 【引用文献】

- 1) Hiraoka S, et al. Nat Med 13: 1363-1367 (2007)
- 2) Kodama K, et al. FEBS Open Bio 10: 1096-1103 (2020)
- 3) Thomsen B, et al. Genome Res 16: 97-105 (2006)
- 4) Reed CC, et al. Glycoconj J 19: 249-255 (2002)
- 5) Kosho T, et al. Genes 11: 43 (2019)
- 6) Saito S, et al. PLoS One 18: e0284292 (2023)
- 7) Dunwoodie SL, et al. Curr Opin Genet Dev 19: 329-337 (2009)
- 8) Mizumoto S, et al. Biomed Res Int 2014: 495764 (2014)

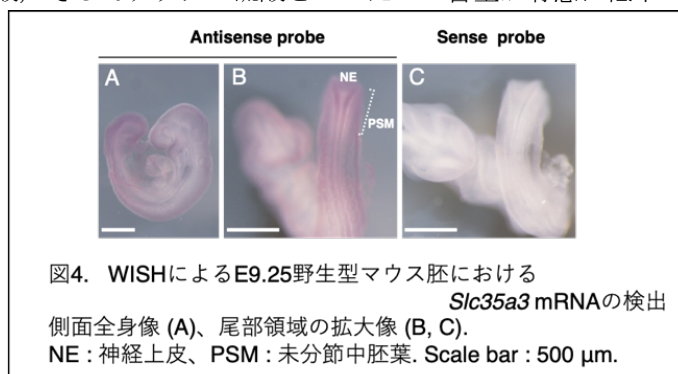


図4. WISHによるE9.25野生型マウス胚における *Slc35a3* mRNAの検出  
側面全身像 (A)、尾部領域の拡大像 (B, C)。  
NE: 神経上皮、PSM: 未分節中胚葉。 Scale bar: 500  $\mu$ m.

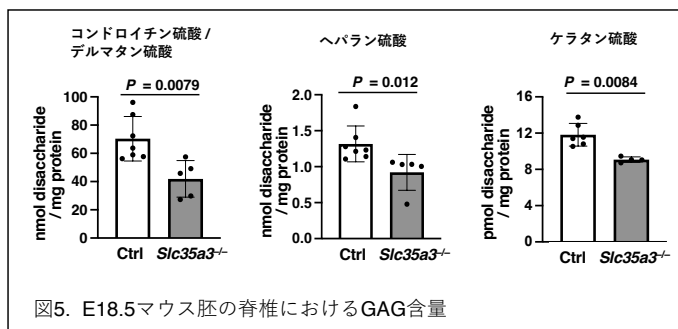


図5. E18.5マウス胚の脊椎におけるGAG含量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamashita R, Lee E, Furuichi T	4. 巻 72
2. 論文標題 Expression profiles of genes encoding glycosyltransferases synthesizing the glycosaminoglycan linker region during chondrogenic differentiation of ATDC5 cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Jpn J Vet Res	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Saito S, Mizumoto S, Yonekura T, Yamashita R, Nakano K, Okubo T, Yamada S, Okamura T, Furuichi T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Mice lacking nucleotide sugar transporter SLC35A3 exhibit lethal chondrodysplasia with vertebral anomalies and impaired glycosaminoglycan biosynthesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284292	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山下莉奈、中野堅太、八重樫大、芝陽子、岡村匡史、古市達哉
2. 発表標題 糖転移酵素B3GalT6は マウス胚の発生に必須であり、同酵素のステム領域はゴルジ体への局在に關与する
3. 学会等名 第166回日本獣医学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古市達哉、齋藤宗一郎、米倉司、中野堅太、岡村匡史.
2. 発表標題 Slc35a3欠損マウスの作製およびウシ複合脊椎形成不全症モデル動物としての評価
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米倉司、齋藤宗一郎、水本秀二、山田修平、大久保直、中野堅太、岡村匡史、古市達哉.
2. 発表標題 糖ヌクレオチド輸送体SLC35A3はグリコサミノグリカン合成に関与し、脊椎及び軟骨形成に必須である
3. 学会等名 第165回日本獣医学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤宗一郎、米倉司、中野堅太、岡村匡史、古市達哉
2. 発表標題 Slc35a3欠損マウスの作製およびウシ複合脊椎形成不全症モデル動物としての評価
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生地伸康、矢神和広、齋藤宗一郎、新美君枝、高橋英機、古市達哉
2. 発表標題 CRIM1は軟骨細胞の増殖とアポトーシスを調節することで、骨格成長を制御する
3. 学会等名 第164回日本獣医学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------