

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月22日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790066

研究課題名（和文）コンドロイチン硫酸合成不全による骨疾患の発症機序の解明

研究課題名（英文）Pathogenic mechanisms of the bone diseases caused by defect in chondroitin sulfate biosynthesis

研究代表者

水本 秀二 (MIZUMOTO SHUJI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・博士研究員

研究者番号：40443773

研究成果の概要（和文）：コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸の生合成に関わる糖転移酵素および硫酸基転移酵素をコードする遺伝子群の変異によって各糖鎖の生合成異常をきたし、骨、皮膚、筋など結合組織を広くに犯す一群の疾患（ラーセン症候群、脊椎骨端骨幹端異形成症、エーラス・ダンロス症候群）を引き起こすことがわかった。

研究成果の概要（英文）：We have identified mutations in the genes encoding biosynthetic enzymes, glycosyltransferases and sulfotransferases, of the chondroitin sulfate and dermatan sulfate. These mutations result in the disturbance of their polysaccharides, and cause bone and skin disorders including Larsen syndrome, spondyloepimetaphyseal dysplasia, and Ehlers-Danlos syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：コンドロイチン硫酸／デルマトン硫酸／骨・皮膚／遺伝病／脊椎骨端異形成症／エーラス・ダンロス症候群／糖転移酵素／硫酸基転移酵素

1. 研究開始当初の背景

デルマトン硫酸（DS）の主要な硫酸化修飾構造である *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）残基の 4-*O*-硫酸化に関与するデルマトン 4-*O*-硫酸基転移酵素-1（D4ST-1）の *in vitro* および *in vivo* における機能を明らかにした。さらに、皮膚の脆弱性や骨異形成を特徴とする新しいタイプのエーラス・ダンロス症候群（EDS）の原因遺伝子が *D4ST-1* の変異であることを見出した。一方、ヒトの脊椎が湾曲した特徴を有する脊椎・骨端異形成症の原因遺伝子として、コンドロイチン硫酸（CS）の硫酸化に関わるコンドロイチン 6-*O*-硫酸基転移酵素-1（C6ST-1）も同定した。本疾患は、低身長、背骨の湾曲、手根骨の異形成、進行性脊柱後側湾症・関節炎・関節拘縮・関節脱臼を特徴とし、高齢者に多い変形性関

節症や関節リウマチの疾患と似ている部分が多い。実際、関節炎を患っている高齢者の数は、一千万人以上いると推定されており、運動機能の低下によって、QOL の低下を引き起こす。その原因は明白ではないが、コラーゲンやプロテオグリカンなどのマトリックスタンパク質の減少が原因の一つであると考えられている。しかし、発症のメカニズムや骨における CS の役割の研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

CS は生体内で軟骨に最も豊富に存在し、関節では水分保持やクッションの役割を担っている。しかし、加齢や骨の疾病とともに CS の合成量は低下し、スムーズな運動機能に障害を受ける。上述したように、CS の合成に関

わる硫酸基転移酵素の遺伝子変異によって、脊椎・骨端異形成症が引き起こされることを見つけた。この疾患は、進行性脊柱後側湾症・関節炎・関節拘縮・関節脱臼を特徴とし、高齢者に多い変形性関節症や関節リウマチの疾患と似ている部分がある。そこで、CSの合成異常で発症する遺伝病の脊椎・骨端異形成症および変形性関節症の発症機序の解明は、将来これらの疾患の治療法の開発へと繋がると予想され、患者数も増加する高齢化社会における波及効果は計り知れない。

3. 研究の方法

(1) 共同研究者の協力のもと、骨・皮膚に異常をきたす遺伝性疾患の変異遺伝子を同定し、そのコードする糖転移酵素あるいは硫酸基転移酵素の活性を測定した。具体的には、野生型および変異型の酵素をコードする発現ベクターを構築し、COS-7細胞に遺伝子導入後、培養液中に分泌された組換え型の酵素を粗精製し、酵素源とする。次に、試験管内で酵素・緩衝液・糖あるいは硫酸基供与体(UDP-グルクロン酸、UDP-ガラクトース、活性硫酸 PAPS)・受容体基質(ガラクトース-ガラクトース、ナフチル-ガラクトース、コンドロイチン、デルマタン等)を混合し、37°Cで反応後、陰イオン交換、疎水性クロマト、ゲルろ過等で解析した。

(2) 患者由来の細胞もしくは尿からCSおよびDSを抽出精製し、定量した。具体的には、培養細胞から常法に従い、CS/DSを抽出精製した。一方、培養液中に分泌されたCS/DSは完全無血清培地(COSMEDIUM H001)で3日間培養し、コンディションドメディウムを回収した。限外ろ過膜を利用した遠心濃縮カラム(AmiconUltra-4, 3Kあるいは10k)で濃縮し、次に細菌由来のコンドロチナーゼABC、コンドロチナーゼAC、コンドロイチナーゼBで消化後、消化物の陰イオン交換HPLCで各二糖組成の分析とCSおよびDS鎖の定量を行った。

(3) CSと特異的に結合するタンパク質を同定するために、まず6-O硫酸構造を豊富に有するサメ軟骨由来CSあるいは4-O、6-Oジ硫酸構造を豊富に有するイカ軟骨由来のCSをアミノセルロース樹脂に共有結合させ、アフィニティーカラムを作製した。次いで、ヒトの軟骨腫細胞の培養液もしくはマウス・ラットの脊椎軟骨、マウス肺から可溶性タンパク質を抽出し、上記のCSカラムに供じた。得られた結合画分について、SDS-PAGEを行い、トリプシンでゲル内消化後、ペプチド断片をLC-ESI-MSあるいはMALDI-TOF-MSを用いた質量分析によって、CSと結合するタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) グルクロン酸転移酵素-I(GlcAT-I)の変異によって引き起こされる新規ラーセン様症候群：

CS、DS、ヘパラン硫酸(HS)などのグリコサミノグリカン、これらの糖鎖をプロテオグリカンのコアタンパク質のセリン残基へ橋渡しする結合領域四糖[グルクロン酸-ガラクトース-ガラクトース-キシロース](GlcA-Gal-Gal-Xyl)を介して、コアタンパク質上のセリン残基に共有結合している。この結合領域四糖の生合成に関わるグルクロン酸転移酵素-I(GlcAT-I)の変異が、ラーセン病に特徴的な先天性の脱臼症と心臓弁の形成不全を引き起こすことをドイツのマックスプランク研究所のkatrin Hoffman博士らが見出した(図1)。



図1. ラーセン症候群患者. 肘が湾曲している。

野生型および変異型(R277Q)のGlcAT-Iタンパク質をCOS-7細胞で発現させ精製後、酵素源とし、GlcAT活性を測定した(図2)。その結果、野生型と比較して変異型GlcAT-Iは有意に活性低下が観察された(図2)。

さらに、患者および健常人由来の繊維芽細胞のホモジェネートを酵素源、UDP-GlcAを糖供与体、ガラクトース-ガラクトース-O-メチルを受容体基質として反応させ、GlcAT-I活性を測定したところ、健常人の酵素活性と比較し、患者ではその活性が劇的に減少していた(図3)。したがって、CS、DS、HSの生合成に影響していることが予想された。

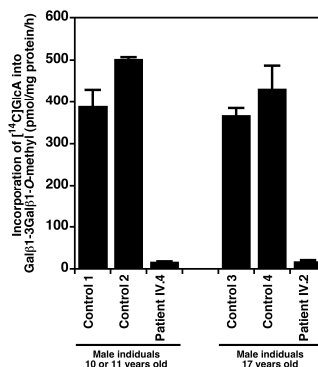


図2. 患者の細胞のGlcAT-Iの酵素活性. Control: 健常人、Patient: 患者。

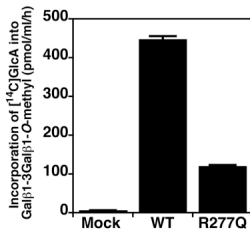


図3. 組換え型GlcAT-Iの酵素活性. WT:野生型GlcAT-I、R277Q:GlcAT-Iの277番目のアルギニンがグルタミンに変異した酵素を表す。

そこで次に、CS および HS に対する抗体を患者由来の繊維芽細胞と反応させ、フローサイトメトリーを用いて両糖鎖を定量したところ、健康人由来の細胞と比べて、その合成量が顕著に低下していた（結果は示さず）。さらに、DS-プロテオグリカンのひとつであるデコリンの western blot 解析を行ったところ、DS 鎖が付加していないデコリンが検出された（図4）。以上のことから、GlcAT-I の変異によって、CS/DS/HS 鎖の部分的な合成不全が起こり、結果として骨の脱臼症や心臓の弁の形成異常など多様な症状を示すことが示唆された。

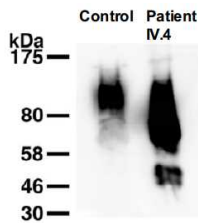


図4. デコリンのウェスタンブロット分析

グ. Control: 健康人、Patient: 患者由来のデコリンを表す。46kDa 付近のバンドが DS フリーのデコリン。

(2) ガラクトース転移酵素-II (GalT-II) の変異によって引き起こされる関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 I 型 (SEMD-JL1) : 関節弛緩を伴う脊椎骨端骨幹端異形成症 I 型 (SEMD-JL1) が四糖結合領域 (GlcA-Gal-Gal-Xyl-) の2番目の Gal 残基の生合成に関わる GalT-II (B3GALT6) の変異によって発症することを見出した。SEMD-JL1 は、脊柱の変形や関節の脱臼などの重度の骨格異常を起こす遺伝性難治疾患である。全エクソーム解析の手法を基盤として、計7家系の患者の遺伝子変異を検索した所、患者はすべて SB3GALT6 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を持っていることが、理研の池川博士らのグループによって同定された。そこで、変異型の組換えタンパク質 (S65G, P67L, D156N, R232C, C300S) を発現させ、Gal 転移活性を測定したところ、野生型のタンパク質の酵素活性と比較して、これらの変異タンパク質では有意にその活性が低下していた（図5）。さらに、特徴的な顔貌、皮膚過伸展、筋緊張の低下を特徴とするエーラス・ダンロス症候群（早老型）患者においても、SEMD-JL1 と同様に B3GALT6 遺伝子の複合ヘテロ接合性変異を

見出した。

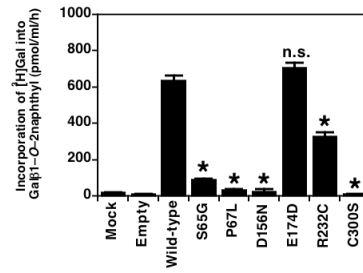


図5. 組換え型GalT-IIの酵素活性.

(3) デルマタン硫酸エピメラーゼ (DSE) の変異によって引き起こされるエーラス・ダンロス症候群 (musculocontractural タイプ) :

DS の生合成は、グルクロン酸-N-アゼチルガラクトサミン (GlcA-GalNAc) のコンドロイチン骨格の二糖繰り返し領域が合成された後、DSE が GlcA のカルボキシ基を異性化することで生合成される。その DSE をコードする遺伝子の変異によって、エーラス・ダンロス症候群が引き起こされることが、オーストリアのインスブリック医科大学の Andreas Janecke 博士らによって発見された。そこで、野生型および変異型 (S268L) の組換え型 DSE を COS-7 細胞で発現させ、酵素活性を測定した。その結果、野生型 DSE と比較して、S268L-DSE では顕著な酵素活性の低下が観察された（図6）。さらに、患者の皮膚の繊維芽細胞から DS を抽出精製し、定量したところ、その合成量が有意に低下していた（結果は示さず）。したがって、患者では、DSE の変異が DS の合成量の低下を引き起こし、結果としてエーラス・ダンロス症候群を引き起こすことがわかった。

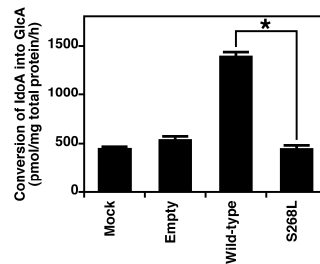


図6. 組換え型DSEの酵素活性.

(4) CS と結合する Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) の同定 :

CS-E を固相化したアフィニティカラムでマウス肺抽出物を分画し、SDS-PAGE で分離後、タンパク質のバンドをトリプシンでゲル内消化した。得られた消化物のペプチド断片を peptide mass fingerprint 法により同定した（図7）。マウスの肺から CS-E 結合タンパク質として、Receptor for Advanced Glycation

End products (RAGE)を同定した。RAGE は肺に特異的に発現し、肺繊維症、がん、糖尿病に関与しているが、最近、軟骨の分化や骨の代謝に関わることが報告されている。したがって、今後 CS と RAGE の軟骨および骨の発生・形成にどのように関わるかを調べる必要がある。

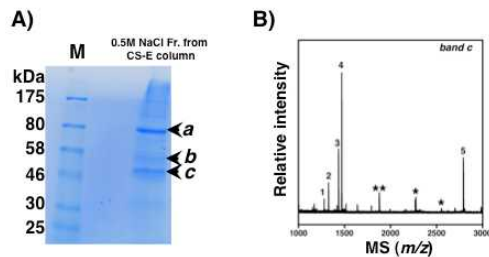


図7. CS-Eと結合するタンパク質の同定。A) CS-Eと結合するマウス肺由来のタンパク質。バンド a: モエシン、バンド b および c: RAGE。 B) バンド c をトリプシンでゲル内消化を行い、その消化物を質量分析器で質量数を求めた。得られたマススペクトル(1~5)を基に、データベース(MASCOT)検索を行い、RAGE を同定した。*はトリプシン由来のピークを表す。

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14件)

*equal contribution

① *Thomas Müller, *Shuji Mizumoto, *Indrajit Suresh, Yoshie Komatsu, Julia Vodopituz, Munis Dünder, Volker Straub, Arno Lingenhel, Andreas Melmer, Silvia Lechner, Johannes Zschocke, Kazuyuki Sugahara, Andreas R Janecke, Loss of dermatan sulfate epimerase (DSE) function results in musculocontractural Ehlers-Danlos syndrome, **Human Molecular Genetics**、査読有、published online、(2013)、doi:10.1093/hmg/ddt227.

② *Masahiro Nakajima, *Shuji Mizumoto, *Noriko Miyake, 他28名、2番目 Mutations in B3GALT6, which Encodes a Glycosaminoglycan Linker Region Enzyme, Cause a Spectrum of Skeletal and Connective Tissue Disorders, **American Journal of Human Genetics**、査読有、92(6)、(2013)、927-934、doi:10.1016/j.ajhg.2013.04.003.

③ *Shuji Mizumoto, *Moto Watanabe, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara, Expression of N-acetylgalactosamine

4-sulfate 6-O-sulfotransferase involved in chondroitin sulfate synthesis is responsible for pulmonary metastasis, **BioMed Research International**、査読有、2013、(2013)、656319、doi:10.1155/2013/656319.

④ Shuji Mizumoto, Duriya Fongmoon, And Kazuyuki Sugahara, Interaction of chondroitin sulfate and dermatan sulfate from various biological sources with heparin-binding growth factors and cytokines, **Glycoconjugate Journal**、査読有、published online、(2013)、doi:10.1007/s10719-012-9463-5.

⑤ *Shuji Mizumoto, *Saori Murakoshi, *Kittiwan Kalayanamitra, Sarama Sathyaseelan Deepa, Shigeyuki Fukui, Prachya Kongtawelert, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara, Novel highly sulfated hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate of shark fin cartilage: Insights into the sugar sequences with bioactivities, **Glycobiology**、査読有、23(2)、(2013)、155-168、doi:10.1093/glycob/cws137.

⑥ Shuji Mizumoto, Shiro Ikegawa, and Kazuyuki Sugahara, Human genetic disorders caused by defective genes encoding biosynthetic enzymes for sulfated glycosaminoglycans, **Journal of Biological Chemistry**、査読有、288、(2013)、10953-10961、doi:10.1074/jbc.R112.437038.

⑦ Shuji Mizumoto Reduction of Chondroitin 4-O-Sulfotransferase-1 Expression Causes Costello Syndrome, **Trends in Glycoscience and Glycotechnology**、査読有、25(142)、(2013)、87-89、doi:10.4052/tigg.25.87.

⑧ Shuji Mizumoto and Kazuyuki Sugahara Glycosaminoglycans are functional ligands for Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) in tumors, **FEBS Journal**、査読有、280(10)、(2013)、2462-2470、doi:10.1111/febs.12156.

⑨ *Shuji Mizumoto, *Jun Takahashi, And Kazuyuki Sugahara, Receptor for Advanced Glycation End

Products (RAGE) Functions as a Receptor for Specific Sulfated Glycosaminoglycans, and Anti-RAGE Antibody or The Sulfated Glycosaminoglycans Delivered in vivo Inhibit Pulmonary Metastasis of Tumor Cells、

Journal of Biological Chemistry、査読有、287(23)、(2012)、18985-18994、doi:10.1074/jbc.M111.313437.

⑩Kazuyuki Sugahara and Shuji Mizumoto、ISCSM2011 Chondroitin sulfate E-type structure at tumor cell surface is involved in experimental metastasis、**Advances in Experimental Medicine and Biology** "Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules", (P. R. Sudhakaran and A. Surolia, eds)、査読有、749、(2012)、33-45、doi:10.1007/978-1-4614-3381-1_3.

⑪Shuji Mizumoto and Kazuyuki Sugahara、Glycosaminoglycan chain analysis and characterization (Glycosylation/Epimerization)、**Methods in Molecular Biology**、"Proteoglycans: Methods and Protocols" (Rédini, Françoise, ed.)、査読有、836、(2012)、99-115、doi:10.1007/978-1-61779-498-8_7.

⑫Taishi Hashiguchi, Shuji Mizumoto, Yuko Nishimura, Jun-ichi Tamura, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara、Involvement of HNK-1 Sulfotransferase in the Biosynthesis of Chondroitin Sulfate and the GlcUA(3-O-sulfate)-Gal-Gal-Xyl Tetrasaccharide Found in α -Thrombomodulin from Human Urine、**Journal of Biological Chemistry**、査読有、286(38)、(2011)、33003-33011、doi:10.1074/jbc.M111.279174

⑬*Sevjidmaa Baasanjav, *Lihadh Al-Gazali, *Taishi Hashiguchi, Shuji Mizumoto, 他19名、4番目
Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects、**American Journal of Human Genetics**、査読有、89(1)、(2011)、15-27、doi:10.1016/j.ajhg.2011.05.021.

⑭Shuji Mizumoto、Disorder of Biosynthesis of Dermatan Sulfate Causes a New Type of Ehlers-Danlos Syndrome (Glycotopic)、**Trends in Glycoscience and**

Glycotechnology、査読有、23(132)、(2011)、197-199、doi.10.4052/tigg.23.197.

[学会発表] (計11件)

○は発表者を表す。

①○水本秀二、村越早織、Kittiwan Kalayanamitra, Sarama Sathyaseelan Deepa, 福井成行, Prachya Kongtawelert, 山田修平, 菅原一幸、
サメヒレ軟骨コンドロイチン硫酸由来の新規な六糖配列の単離、**第85回日本生化学会大会**、2012/12/15、福岡国際会議場およびマリンメッセ福岡、(ポスター発表)

②○Shuji MIZUMOTO, Jun TAKAHASHI, Kazuyuki SUGAHARA、
Receptor for Advanced Glycation End-products (RAGE) functions as a receptor for glycosaminoglycans involved in pulmonary metastasis、**The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care**、2012/10/3、Hokkaido Univ.、(Poster& Short talk)

③○水本秀二、高橋潤、菅原一幸、
RAGEは癌細胞の肺転移に関わるコンドロイチン硫酸の受容体として機能する、**第31回日本糖質学会年会**、2012/9/20、鹿児島市民文化ホール、(口頭発表)

④○Shuji Mizumoto, Saori Murakoshi, Kittiwan Kalayanamitra, Sarama Sathyaseelan Deepa, Shigeyuki Fukui, Prachya Kongtawelert, Shuhei Yamada, and Kazuyuki Sugahara、
Novel highly sulfated hexasaccharide sequences isolated from chondroitin sulfate of shark fin cartilage: Insights into the sugar sequences involved in brain development、**2012年度包括型脳科学研究推進支援ネットワーク・夏のワークショップ**、2012/7/26、仙台国際センター、(ポスター発表)

⑤○水本秀二、高橋潤、菅原一幸、
Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)は癌細胞の肺転移に関わるコンドロイチン硫酸の受容体として機能する、**日本薬学会北海道支部第138回例会**、2012/6/16、札幌コンベンションセンター、(口頭発表)

⑥○水本秀二、Sevjidmaa Baasanjav, Lihadh

Al-Gazali, 橋口太志, 他 19 名、
グルクロン酸転移酵素-I の変異によって引
き起こされる新規ラーセン様症候群、
日本薬学会第 132 年会、2012/3/29、北海道
大学、(口頭発表)

⑦ S. Baasanjav, L. Al-Gazali, T.
Hashiguchi, ○S. Mizumoto, 他 19 名、
Loss-of-function mutation of
glucuronyltransferase-I causes
Larsen-like syndrome、
**7th International Conference on
Proteoglycans**、2011/10/18、Q Station
(Australia)、(Poster presentation)

⑧○Shuji Mizumoto, Noriko Miyake, Tomoki
Kosho, Shuhei Yamada, Kazuyuki Sugahara,
and Naomichi Matsumoto、
Loss-of-function mutations of dermatan
4-O-sulfotransferase-1 cause a new type of
Ehlers-Danlos syndrome、
**The 9th International Symposium for Future
Drug Discovery and Medical Care**、2011/9/30、
Hokkaido Univ、(Poster)

⑨Sevjidmaa Baasanjav, Lihadh Al-Gazali,
Taishi Hashiguchi, ○Shuji Mizumoto, 他
19 名、
A deficiency of glycosaminoglycans causes
cardiac and joint disorders、
第 84 回日本生化学会大会、2011/9/24、国立
京都国際会館、(口頭&ポスター発表)

⑩○水本秀二, 三宅紀子, 古庄知己, Mirjam
H.H. van Roij, Beyhan Tuysuz, Stefan
Mundlos, Stephen P. Robertson, 山田修平,
松本直通, 菅原一幸、
コンドロイチン硫酸/デルマトン硫酸の生合
成に関わる酵素の欠損による骨・皮膚疾患、
第 30 回日本糖質学会年会、2011/7/11、長岡
リリックホール、(口頭発表)

⑪○水本秀二、渡邊基夫、山田修平、菅原一
幸、
コンドロイチン硫酸 E 構造の発現調節による
ルイス肺癌細胞の転移抑制、
日本薬学会北海道支部第 136 例会、2011/5/21、
札幌コンベンションセンター、(口頭発表)

[図書] (計 1 件)

①Shuji MIZUMOTO and Kazuyuki SUGAHARA、
Bone and Skin Disorders Caused by a
Disturbance in the Bioynthesis of
Chondroitin Sulfate and Dermatan Sulfate、
**Extracellular matrix: Pathobiology and
signaling**, (N. Karamanos ed.)、

Walter De Gruyter, Berlin, Germany, (2012)、
97-118.

[その他]

ホームページ等

[http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/inf
mem/main.html](http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infmem/main.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水本 秀二 (MIZUMOTO SHUJI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・
博士研究員

研究者番号：40443937

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

①菅原 一幸 (SUGAHARA KAZUYUKI)

北海道大学大学院先端生命科学研究院・
特任教授

研究者番号：60154449

②山田 修平 (YAMADA SHUHEI)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：70240017

③池川 志郎 (IKEGAWA SHIRO)

理化学研究所・骨関節疾患研究チーム・主
任研究員

研究者番号：30272496

④松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：80325638

⑤三宅 紀子 (MIYAKE NORIKO)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40523494

⑥古庄 知己 (KOSHO TOMOKI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90276311

⑦Stefan Mundlos

Institute of Medical Genetics, Charité
University Medicine, Germany

⑧Lihadh Al-Gazali

United Arab Emirates University, UAE

⑨Katrin Hoffmann

Institute of Medical Genetics, Charité
University Medicine, Germany

⑩Andreas Janecke

Innsbruck Medical University, Austria