

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18516

研究課題名（和文）軟骨細胞グライコーム解析による変形性関節症発症機序の解明

研究課題名（英文）Chondrocyte glycome analysis reveals the pathogenesis of osteoarthritis

研究代表者

宝満 健太郎（Homan, Kentaro）

北海道大学・医学研究院・博士研究員

研究者番号：40823331

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）：変形性関節症（OA）病変の首座である軟骨の変性は、プロテオグリカン中の糖鎖構造の破壊から始まるとされている。これまでOAの発症に関する研究は軟骨細胞の肥大分化に着目したものが多数あるが、複合糖質糖鎖の変化に言及したものはなかった。我々は軟骨基質の組織学的変化の出現前にN型糖鎖が変化するを明らかにするとともに、糖脂質が軟骨細胞肥大やOA進行に関わることを示してきた。そこで、軟骨組織変性および軟骨細胞の分化過程において相同的な糖鎖変動を検出するために、1種類の糖鎖クラスに限定せずに全クラスの糖鎖構造変化を定性・定量的に比較解析を行うことによりOA発症に中心的役割を果たす糖鎖の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖鎖は同一のエピトープ構造にN-、O-結合型糖鎖、糖脂質などの異なるクラスの複合糖質を一塊として発現しており、あるクラスの糖鎖の合成不全が他の糖鎖で代償される可能性がある。軟骨変性や軟骨細胞の肥大分化の開始を理解するためには細胞全体が提示する糖鎖を網羅的に解析する必要がある。これまでグライコーム解析は時間や感度の問題から技術的に困難であったが、糖鎖の固相担体からの切断と同時に液体クロマトグラフィーや質量分析を用いて大規模かつ高速に糖鎖を解析できるグライコプロッティング法とピラソロン試薬共存下に脱離反応を行う手法を確立することによってこの問題を克服した。

研究成果の概要（英文）：Degeneration of cartilage, the main component of osteoarthritis (OA) lesions, is believed to begin with the destruction of glycan structures in proteoglycans. Although many studies on the pathogenesis of OA have focused on the hypertrophic differentiation of chondrocytes, none have addressed changes in glycoconjugate sugar chains. We have shown that N-glycans are altered before the appearance of histological changes in the cartilage matrix and that glycosphingolipids are involved in chondrocyte hypertrophy and OA progression. Therefore, in order to detect homologous glycan variation during cartilage tissue degeneration and chondrocyte differentiation, we succeeded in identifying glycans that play a important role in the onset of OA by performing qualitative and quantitative comparative analysis of glycan structural changes in all classes of glycans without limiting to one glycan class.

研究分野：整形外科学

キーワード：グライコーム 変形性関節症 軟骨変性 糖鎖解析

1. 研究開始当初の背景

OA 病変の首座である軟骨は治癒能力にきわめて乏しく、疾患が発症するとその進行を予防することはきわめて困難である。したがって、発症後早期からの積極的な治療介入が必要である。軟骨における 2 型コラーゲンの分解は致命的で、その前段階であれば軟骨組織は自己修復が可能である。しかし、既存の OA バイオマーカーはコラーゲン分解産物など基質破壊を前提条件としており、X 線ならびに MRI もまた変性が生じてはじめてシグナル変化として捉えることができる。糖鎖とはタンパク質や脂質に結合して複合糖質として細胞表面や組織中に存在し細胞や組織の機能を調節しておりポストゲノム研究において多くの疾患で研究が推進されている。我々は OA において糖タンパク質の一種である高マンノース型糖鎖構造が軟骨基質の変性に先行して変化することを発見した(Osteoarthritis Cartilage 2008, Arthritis & Rheumatism 2011)。また、マウス軟骨前駆細胞から軟骨細胞への分化において高マンノース型糖鎖のプロファイルが変化することを明らかにした (Biochim Biophys Acta 2014)。高マンノース型糖鎖に特異的に結合するレクチン (コンカナバリン A) は強力なマイトジェンとして知られ、休止軟骨細胞を肥大分化へ誘導するという報告が複数ある。一方で、糖鎖修飾が関節軟骨の修復過程において軟骨細胞の肥大化に重要な過程であり、ガングリオシドと呼ばれる糖脂質がインディアンヘッジホッグ経路を介した軟骨細胞の肥大化を抑制していた (Sci Rep 2017)。また、糖脂質の糖転移酵素を軟骨特異的に欠損させると OA が進行することもすでに明らかにしている (Arthritis & Rheumatism 2012)。これまで軟骨の糖タンパク質と糖脂質は個別に研究され、糖鎖の相補的な関係性には着目されていない。肥大分化過程における糖鎖情報は過去に報告はなく、軟骨細胞の肥大分化に糖タンパク質あるいは糖脂質が関与すると仮説立てた。

2. 研究の目的

本研究では、軟骨細胞の肥大分化に高マンノース型糖鎖とガングリオシドが関与するという仮説を証明し、軟骨変性初期に機能的に働く糖鎖を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 軟骨変性モデルにおけるグライコーム解析

① ex vivo 軟骨変性組織の作成

C57BL/6 マウスより大腿骨頭軟骨を採取し器官培養を行う。実験群は軟骨変性を惹起させるための Interleukin-1 β (10ng/ml) 添加群、高マンノース型糖鎖を分解する α -mannosidase (0.1mg/ml) 添加群、コントロール群を作成する。前培養 48 時間を経た後、試薬を添加し、24、48、72 時間後に軟骨片と培養上清を回収する。培養後の軟骨組織は Hematoxylin & eosin、Safranin O 染色に組織学的評価、Type II コラーゲン、Type X コラーゲンによる免疫染色、real-time RT-PCR による遺伝子発現の解析、培養液中のプロテオグリカン量等を測定することで軟骨変性を確認し、糖鎖解析へ供する。

(2) 軟骨細胞分化におけるグライコーム解析

② 初代軟骨細胞による肥大分化モデル

5 日齢の C57BL/6 マウスの膝関節軟骨を採取しコラゲナーゼ処理することにより初代軟骨細胞を単離する。単離した軟骨細胞を単層培養で、1 \times ITS ユニバーサルカルチャーサプリメント (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸を含有する) および 300ng/ml の濃度で BMP-2 を添加することにより肥大分化を誘導する。誘導開始から 0、7、14、21、28 日で細胞を回収し、Type X コラーゲンによる免疫染色および real-time RT-PCR による遺伝子発現により肥大化を確認のうえ糖鎖解析へ供する。

③ 軟骨前駆細胞による肥大分化モデル

マウス軟骨細胞株 ATDC5 を用いて、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) と DMEM/Ham's F12 (1:1)+10% FBS 培養液でサブコンフルエントの状態まで維持し、軟骨細胞への分化誘導は ITS 添加剤および 50 μ g/ml のアスコルビン酸により開始する。肥大誘導は培地を α -修飾必須培地 (α -MEM) に変え、CO₂ 濃度を下げて促進する。成熟軟骨ステージ (20 日目)、肥大化軟骨ステージ (35 日目) のタイミングで Type II コラーゲン、Type X コラーゲンによる免疫染色および real-time RT-PCR による遺伝子発現により分化状態を確認し糖鎖解析へ供する。

①-③ で得られた軟骨組織および軟骨細胞の総合的な糖鎖情報はクラスター解析により分類し、主要な糖鎖構造変化を軟骨変性初期における候補分子として検出する。

4. 研究成果

(1) 初期 OA モデルの確立と軟骨変性可逆性

野生型マウスの器官培養にマンノシダーゼ処理を加えて軟骨変性の評価を行った。その結果、プロテオグリカンの漏出と一酸化窒素の産生を検出し、組織学評価にてサフランin O の染色性低下、TUNEL 陽性細胞の増加、コンカナバリン A (Con A) によるレクチン染色の染色性低下を認めた。培養系からマンノシダーゼを除去し通常培地に戻したところ、変性軟骨組織のサフランin O 染色の染色性が回復した (図 1)。軟骨組織を凍結融解処理し軟骨細胞を死滅させた後に器官培養を行ったところ、上記の所見は消失し、マンノシダーゼと反応して変性変化を起こしているのが軟骨細胞であることが判明した。

一方で、高マンノース型 N 型糖鎖と特異的に結びつく Con A の染色性は回復しないことが明らかとなり、他の糖鎖分子による代償メカニズムの存在が疑われた。そこでマンノシダーゼ処理下の軟骨組織とマンノシダーゼ除去後の軟骨組織に対して糖鎖解析を行なったところ、高マンノース型糖鎖とは別に変動するフコシル化糖鎖を検出した。

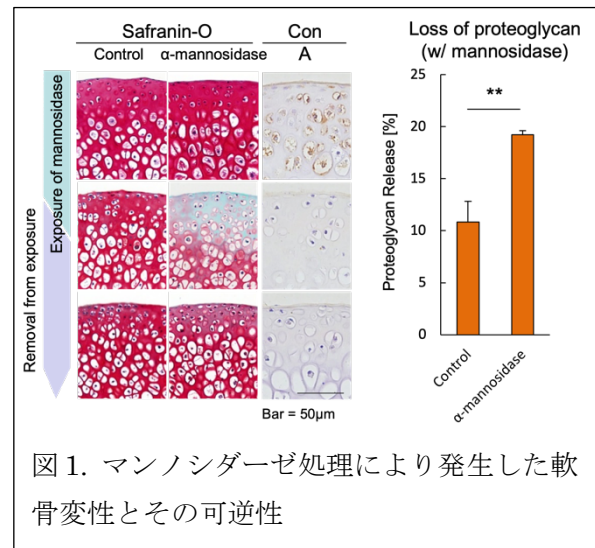


図 1. マンノシダーゼ処理により発生した軟骨変性とその可逆性

(2) 軟骨細胞分化におけるグライコームの確認

マウス初代軟骨細胞をインスリン誘導性軟骨-骨分化モデルで分化させた。0 日、10 日、20 日培養後の軟骨細胞について、N 型糖鎖、O 型糖鎖、遊離オリゴ糖鎖、グリコサミノグリカン、スフィンゴ糖脂質などを網羅した統合グライコムクスを行なった (図 2)。初代軟骨細胞の肥大様変化に伴う糖鎖変化についてクラスター解析でグループ分けした。その結果、複合糖鎖に由来する様々な糖鎖のレベルが肥大分化の過程で相補的に変化することがわかった。また、糖鎖の生合成や代謝に関連する遺伝子の発現が、糖鎖の変化と有意に相関していた。①で検出されたフコシル化糖鎖は肥大化過程の最終状態で確認された。この結果は、細胞全体の糖鎖変化が軟骨細胞の肥大と密接に関連していることを示しており、軟骨細胞による糖鎖表現型とその肥大分化を説明するのに役立つ。

本来、永久軟骨に存在する軟骨細胞は分化を停止しているが、OA に罹患した関節軟骨には肥大化した軟骨細胞が存在することが知られている。これまでの一連の研究成果より、軟骨細胞の高マンノース型糖鎖とガングリオシドはともに OA の発症および進行の重要な制御分子であることが明らかになり、軟骨細胞肥大化との関連も示唆された。

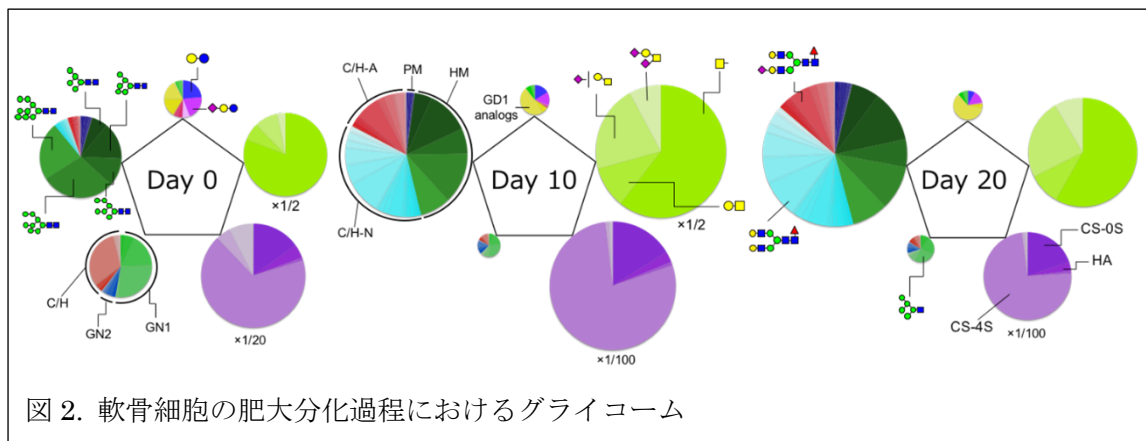


図 2. 軟骨細胞の肥大分化過程におけるグライコム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Homan Kentaro, Hanamatsu Hisatoshi, Furukawa Jun-ichi, Okada Kazue, Yokota Ikuko, Onodera Tomohiro, Iwasaki Norimasa	4. 巻 20
2. 論文標題 Alteration of the Total Cellular Glycome during Late Differentiation of Chondrocytes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3546 ~ 3546
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20143546	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 3件）

1. 発表者名 宝満健太郎、小野寺智洋、古川潤一、花松久寿、濱崎雅成、徐亮、宮崎拓自、細川吉暁、岩崎倫政。
2. 発表標題 関節軟骨におけるフコシル化糖鎖の欠損は可逆的修復を阻害し軟骨変性を進行させる
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kentaro Homan, Tomohiro Onodera, Hisatoshi Hanamatsu, Jun-ichi Furukawa, Takuji Miyazaki, Jun Yamaguchi, Taku Ebata, Dawei Liang, WooYoung Kim, Masatake Matsuoka, Norimasa Iwasaki.
2. 発表標題 Deficiency of core-fucosylated glycan in articular cartilage inhibits recovery from cartilage damage and promotes cartilage degeneration.
3. 学会等名 The 67th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kentaro Homan, Tomohiro Onodera, Jun-ichi Furukawa, Masanari Hamasaki, Liang Xu, Takuji Miyazaki, Norimasa Iwasaki.
2. 発表標題 Identification of M9 high-mannose glycan regulating hypertrophy in articular cartilage.
3. 学会等名 The 66th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kentaro Homan, Tomohiro Onodera, Jun-ichi Furukawa, Hisatoshi Hanamatsu, Ryosuke Hishimura, WooYoung Kim, Masanari Hamasaki, Liang Xu, Norimasa Iwasaki.
2. 発表標題 Identification of M9 high-mannose glycan regulating hypertrophy in articular cartilage.
3. 学会等名 The15th World Congress of International Chemical Reference Substances (ICRS) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宝満健太郎, 小野寺智洋, 花松久寿, 古川潤一, 菱村亮介, 金佑泳, 濱崎雅成, 徐亮, 岩崎倫政
2. 発表標題 M9高マンノース型糖鎖は関節軟骨における肥大化を制御する
3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------