

令和元年5月24日現在

機関番号：34512

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07306

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸鎖の発現制御を基軸とした運動器疾患克服のための基盤研究

研究課題名(英文)Physiological and pathological functions of chondroitin sulfate chains in locomotive organs

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸(CS)鎖は、代表的な硫酸化グリコサミノグリカン多糖の一つであり、プロテオグリカンとして細胞外マトリックスに普遍的に存在している多機能糖鎖である。実際これまでに我々は、CS鎖が神経突起伸長や、骨格筋形成、骨形成・骨吸収などの様々なイベントに関与することを見出し

ている。本研究では、「骨格筋分化・再生」ならびに「破骨細胞分化」におけるCS鎖の役割とその制御メカニズムの解明を試み、それぞれの分化過程において固有のCSプロテオグリカンが機能していることを見出した。本研究から、CS鎖の分化制御因子としての重要性と新たな作用メカニズムが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、CS鎖の発現をコントロールすることによって、骨格筋分化・再生や破骨細胞分化が制御可能であることを意味する新たな知見を提供し、学術的にも極めて意義深い。さらには高齢化社会を迎えた本邦において、健康寿命の延伸を達成するための課題であるサルコペニア(加齢性筋肉減少症)や骨粗鬆症などの発症要因や治療が、CS鎖を介する作用機序を通じて理解できる可能性にも繋がることから、社会的意義も兼ね備えている。

研究成果の概要(英文)：A typical sulfated glycosaminoglycan, chondroitin sulfate (CS), is a multifunctional molecule that is ubiquitously expressed in extracellular spaces in the form of proteoglycans, where at least one CS side chain is covalently attached to multiple core proteins. We have demonstrated that CS chains are involved in various cellular events including neurite outgrowth, myogenesis, and bone anabolism/catabolism.

In this study, we focused on regulatory roles of CS chains in skeletal muscle differentiation/regeneration and osteoclastogenesis. We found that distinct core proteins carrying CS chains are participated in the respective biological processes, providing the physiological importance and novel modes of action of CS chains.

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 糖鎖 発現制御 筋萎縮症 骨粗鬆症 酵素

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CS鎖は、代表的な硫酸化グリコサミノグリカン(GAG)多糖の一つであり、コアとなるタンパク質に共有結合したプロテオグリカン(CSPG)としてあらゆる組織の細胞表面や細胞外マトリックスに分布し、形態形成や神経可塑性をはじめとする様々な生命現象に関与する。CSPGの機能の多くは、糖鎖部分であるCS鎖の性質に大きく依存することが知られている。実際、CS鎖の発現は、その生合成/分解システムのバランスにより厳密に制御されており、これらのバランスの破綻は、発生異常や病態発現機序の一因となりうるものが、申請者のグループを中心とした研究から明らかになってきた。その好例として、初期胚の発生過程が挙げられ、CS鎖の発現が十分確保できない胚では、一度分裂した細胞が再度融合し、多核となって死に至る細胞質分裂異常が観察される。このことは、初期胚の細胞分裂が正常に進行する上で一定レベルのCS鎖の発現が必要不可欠であることを意味するが、その一方で、「①骨格筋分化」や「②破骨細胞分化」などのように、細胞融合を経て多核細胞を生じる体細胞分化過程においては、“CS鎖の発現量を低下させる”というイベントを分化の進行を促す原動力として、むしろ積極的に利用している可能性が示唆された。

このような背景の下、申請者らは、「CS鎖の発現量の低下が細胞融合・多核化を伴う細胞分化過程に共通の作動原理である」という挑戦的な仮説を打立て、①骨格筋分化系を対象に本仮説の検証を行ってきた。これまでに、C2C12細胞の骨格筋分化モデル系を用いた解析から、CS鎖の発現量が、細胞融合・多核化を伴う筋管形成期に顕著に減少すること、この減少は、CS鎖の分解酵素であるHYAL1の機能発現とよく相関することを見出し、骨格筋分化過程で観察されるCS鎖の発現量の減少が偶発的なものではなく、細胞自律的なイベントであることを明らかにした(Mikami, T., et al. (2012) J. Biol. Chem. 287, 38531.)。特筆すべきことに、細菌由来のCS分解酵素(コンドロイチナーゼABC: ChABC)を筋損傷部位へ単回投与することによって、筋損傷モデルマウスにおける筋再生の促進や、筋ジストロフィーモデル(mdx)マウスの症状改善に著効を示すことも見出している。骨格筋は比較的再生能力が高く、ダメージを受けて壊死した後も、成熟した筋組織内に点在する筋衛星細胞を動員して速やかに再生する。損傷筋の再生過程も筋衛星細胞に依存した細胞融合・多核化過程を経ることから、ChABC投与のように、筋組織内のCS鎖の発現を一過的に減少させる手段は、骨格筋自身のもつ再生能力を賦活化し、筋萎縮の進行遅延や改善を図る有効な治療戦略として、その応用が期待されている。しかしながら、CS鎖の発現量の低下が、どのような分子メカニズムを介して、骨格筋分化・再生の促進に寄与しているかはよくわかっていない。

骨粗鬆症は、骨リモデリングのバランスに異常が生じた疾患の一つで、破骨細胞による骨吸収が進み、骨芽細胞による骨形成が追いつかなくなることが主な原因である。したがって、両イベントに関わる細胞分化過程の制御メカニズムを体系的に理解することは、骨粗鬆症のより有効な治療法を確立する上で重要である。ごく最近申請者らは、女性ホルモンにより促進される骨芽細胞分化が、固有の硫酸化構造をもつCS鎖の発現の増加に起因していることを明らかにし、特定のCS鎖の発現を増加させる手段が、骨形成促進に有用である可能性を提唱している(Koike, T., Mikami, T., et al. (2015) Sci. Rep. 5, 8994)。一方で、②破骨細胞分化におけるCS鎖の役割については解析途上であったが、骨格筋分化過程と同様に、CS鎖の発現を減少させることによって、多核化を指標にした破骨細胞の形成が亢進することを見出している。

2. 研究の目的

超高齢化社会を迎えた本邦において、“寝たきり”や“要介護”といった自立性喪失の誘因となる筋萎縮症(サルコペニア)や骨粗鬆症・変形性関節症などの運動器疾患の克服は喫緊の課題である。本研究では、申請者らが提案するCS鎖の発現調節による細胞分化制御の共通作動原理に基づき、運動器疾患の中でも、筋萎縮症および骨粗鬆症に焦点を当て、それらを克服するための鍵となる「骨格筋分化・再生」過程ならびに「破骨細胞分化」過程におけるCS鎖の役割とその制御メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1)骨格筋分化・再生モデル系におけるCS鎖の作用機序の解析

骨格筋分化・再生系におけるCS鎖の作用機序の足がかりを得るため、すでに確立しているC2C12細胞の筋分化誘導系に発現するCSPGのコアタンパク質のうち、細胞融合・多核化を牽引する主要な分子、すなわち、「筋管形成期において、CS鎖修飾の程度が低下するコアタンパク質」の同定を試みた。CS鎖修飾の程度は、各コアタンパク質に特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティング法により評価した。選定したコアタンパク質におけるCS鎖の発現量の差異が、その筋分化能に影響を及ぼすかを明らかにするために、当該コアタンパク質の天然型(CS鎖修飾型)ならびにCS鎖非修飾型の組換え体を過剰発現する細胞株を樹立し、各細胞の骨格筋分化能を比較した。CS鎖非修飾型の組換え体は、CS鎖の付加部位に相当する特定のセリン残基をアラニン等に置換することにより作製した。

(2)破骨細胞分化モデル系におけるCS鎖の作用機序の解析

CS鎖の発現量の低下と破骨細胞分化との関連性を明らかにするために、破骨細胞分化モデル細胞であるRAW264.7細胞のRANKL(破骨細胞分化誘導因子)誘導性分化過程における

CS鎖の発現レベルの経時変化を、各段階の培養系から抽出・精製したGAG画分の化学分析(CS二糖組成解析)により調べた。また、破骨細胞の分化過程において、CS鎖の発現制御に関わる主要な生合成/分解酵素を同定し、その過剰発現もしくはロックダウン株を作製することにより、その妥当性を評価した。同様の解析を骨髄由来マクロファージを利用した破骨細胞分化系でも実施し、RAW264.7細胞の分化誘導系で得られた結果の普遍性を検証した。

さらに、(1)に記載した方法論を踏襲して、CS鎖による破骨細胞分化の作用機序の解明に取り組んだ。具体的には、破骨細胞分化系に關与するCSPGのコアタンパク質やCS受容体候補分子の同定を試み、骨格筋分化系におけるCS鎖の作用機序との類似点や相違点を比較検証した。

4. 研究成果

(1)骨格筋分化・再生モデル系におけるCS鎖の作用機序の解析

CS鎖の発現を一過的に減少させることによって、骨格筋の分化・再生能が亢進することをこれまでに見出している。そこで、その分子メカニズムの解明の足がかりとして、C2C12細胞の筋分化過程で発現するCSPGに着目し、筋幹細胞期にCS鎖修飾の程度が低下するコアタンパク質の同定に成功した。本コアタンパク質は、分泌タンパク質であり、そのCS鎖非修飾型の組換え体は、CS鎖修飾型に比べ、有意に骨格筋分化を促進する活性を示したことから、本コアタンパク質上におけるCS鎖の発現が骨格筋分化制御に主要な役割を果たしていると考えられた。さらに、本コアタンパク質上のCS鎖の有無は、筋形成・再生過程に重要なホスファチジルイノシトール3-キナーゼ/Akt(PI3K/Akt)経路の活性化のみならず、TGF-シグナルに対しても影響を及ぼすことが判明した。これらの成果から、本コアタンパク質はCS鎖修飾の程度に依存して骨格筋分化制御サイトカインの働きを調節する役割を果たしていると考えられた。

(2)破骨細胞分化モデル系におけるCS鎖の作用機序の解析

破骨細胞分化におけるCS鎖の役割を明らかにするために、骨芽細胞非存在下での破骨細胞分化誘導系(RAW264.7および骨髄由来マクロファージ)を用いた。本分化系の解析から、CS鎖の発現量が破骨細胞の分化の進行に伴い減少すること、この現象がCS生合成酵素・分解酵素の機能発現とよく相関することを見出した。興味深いことに、CS鎖の発現を強制的に現象させると、多核化を指標にした破骨細胞の形成が有意に亢進したことから、破骨細胞の分化・成熟は、細胞自律的なCS鎖の代謝調節によって成り立っていることが示唆された。また、破骨細胞分化の促進に寄与するCSPGのコアタンパク質の同定を試み、候補タンパク質の絞込みに成功した。本候補タンパク質は、細胞膜タンパク質であり、(1)で同定したコアタンパク質とは異なるメカニズムで、破骨細胞分化で起こる固有の細胞融合・多核化過程を牽引するものと考えられた。

本研究課題の解析結果から、CS鎖の発現調節という手段が、骨格筋分化・再生過程や破骨細胞分化過程の制御に有用であること、すなわち、サルコペニアや骨粗鬆症の治療戦略の一つになりうるということが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Miharu Shida, Tadahisa Mikami, Jun-ichi Tamura, Hiroshi Kitagawa. A characteristic chondroitin sulfate trisaccharide unit with a sulfated fucose branch exhibits neurite outgrowth-promoting activity: Novel biological roles of fucosylated chondroitin sulfates isolated from the sea cucumber *Apostichopus japonicus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 487(3) 678-683 (2017) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.04.114. (査読有)

Tadahisa Mikami, Hiroshi Kitagawa. Sulfated glycosaminoglycans: their distinct roles in stem cell biology. *Glycoconj. J.* 34(6) 725-735 (2017) DOI: 10.1007/s10719-016-9732-9. (査読有)

[学会発表](計10件)

志田美春, 三上雅久, 北川裕之 第37回日本糖質学会年会(2018年8月28~30日 仙台)
“高硫酸化コンドロイチン硫酸Dによる神経突起伸長促進機構の解析”

志田美春, 三上雅久, 北川裕之 2017年度生命科学系学会合同年次大会(第40回分子生物学会年会、第90回生化学会大会)(2017年12月6~9日 神戸)“コンドロイチン硫酸Dによる神経突起伸長の促進機能の解析”

志田美春, 三上雅久, 田村純一, 北川裕之 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会(2017年10月14日 神戸)“ナマコ由来フコシル化コンドロイチン硫酸における神経突起伸長活性の解析”

梅原せいら, 宮武卓海, 松浦綾香, 木村侑希子, 三上雅久, 北川裕之 第67回日本薬学会近畿支部総会・大会(2017年10月14日 神戸)“コンドロイチン硫酸鎖の発現制御による神経

筋接合部の安定形成に関する解析

後藤美沙希, 清水菜央, 松丘佳也, 團野優華, 三上雅久, 北川裕之 第 67 回日本薬学会近畿支部総会・大会(2017年10月14日 神戸)“コンドロイチン硫酸鎖を介した破骨細胞分化・成熟制御メカニズムに関する解析”

三上雅久, 高田哲朗, 浅野清次郎, 重廣充孝, 北川裕之 第 36 回日本糖質学会年会(2017年7月19~21日 旭川)“コンドロイチン硫酸鎖による破骨細胞分化の制御メカニズムの解析”

三上雅久, 高田哲朗, 浅野清次郎, 重廣充孝, 北川裕之 日本薬学会 137 年会(2017年3月24~27日 仙台)“コンドロイチン硫酸鎖による破骨細胞分化制御機構の解析”

山田敦子, 松浦伸明, 今村香奈実, 吉川泰樹, 三上雅久, 北川裕之 第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会(2016年10月15日 高槻)“コンドロイチン硫酸鎖の発現量調節による骨格筋分化・再生促進メカニズムの解析”

志田美春, 三上雅久, 北川裕之 第 63 回日本生化学会近畿支部例会(2016年5月21日 神戸)“高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起の極性形成制御機構の解析”

山田敦子, 松浦伸明, 今村香奈実, 吉川泰樹, 三上雅久, 北川裕之 第 63 回日本生化学会近畿支部例会(2016年5月21日 神戸)“コンドロイチン硫酸鎖の発現量調節を介した骨格筋分化促進メカニズムの解析”

〔図書〕(計1件)

三上雅久, 北川裕之 「糖鎖と骨・関節 骨疾患」未来を創るグライコサイエンス 我が国のロードマップ(日本糖鎖科学コンソーシアム編) pp80-82 総ページ数(333)(2018)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biochem/>