

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15650

研究課題名(和文)変形性関節症発症機序の解明に向けた軟骨変性制御機構における糖鎖機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of cartilage glycans for the elucidation of osteoarthritis pathomechanisms

研究代表者

岩崎 倫政 (Iwasaki, Norimasa)

北海道大学・医学研究科・教授

研究者番号：30322803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、これまでの研究成果より軟骨変性早期の糖鎖変化は可逆的变化であるという仮説を立てた。本研究では、in vivoおよびin vitro軟骨変性モデルを用いてこの仮説を証明し、変形性関節症(OA)早期の病態解明と新規治療法開発のための分子基盤の構築を目指した。ウサギ膝関節内および軟骨器官培養系への高マンノース型糖鎖分解酵素の投与により早期OA変化を導くという結果を得た。さらに、酵素の投与中止により組織変性は回復を認めた。今後、得られた可逆的OA修復メカニズムを解明するための研究を推進していく方針である。

研究成果の概要(英文)：Our hypothesis was that early osteoarthritic changes induced by alterations in cartilage glycans would be reversible. To test this hypothesis, we created in vivo and in vitro early osteoarthritic models based on alpha-mannosidase administration. The administration of alpha-mannosidase induced early osteoarthritis in in vivo and in vitro models. Additionally, this histological changes were recovered by the discontinuation of alpha-mannosidase administrations. Future studies will be performed to clarify this recovery mechanism in early osteoarthritis pathogenesis.

研究分野：整形外科

キーワード：骨・軟骨代謝 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

(1) 糖タンパク質、糖脂質やプロテオグリカンなどの複合糖質は、発生、分化、老化などの生命現象において重要な機能を担っている。これらの複合糖質中でタンパク質や脂質に結合して、その機能や多様性を決定づけている分子がグルコースやマンノースをはじめとする単糖が連なり形成されている糖鎖である。

(2) 糖鎖はセントラルドグマ仮説に支配されない。そのため、従来の遺伝子やタンパク質研究では解明困難な多くの生命現象や疾患の病態が糖鎖研究により解明されるものと期待されている。申請者は、これまで糖鎖工学的的手法を用いて変形性関節症(以下、OA)の病態解明に関する研究を行い、以下の新たな知見を得てきた: 1) ウサギ OA 疾患モデルにおいて、OA に特徴的な組織学的変化が出現する前に糖タンパク質に結合している糖鎖構造が有意に変化する(Osteoarthritis Cartilage 2008)、2) OA 発症早期の軟骨内において、N 型糖鎖の一種である高マンノース型糖鎖が変化している(Arthritis Rheum 2011)。これらの研究成果より、申請者は OA 早期の病態において高マンノース型糖鎖は重要な機能を有する、という着想に至った。

2. 研究の目的

(1) 全体構想: OA における軟骨変性は、最初にプロテオグリカンの糖鎖構造の破壊が生じるとされている。申請者は、軟骨変性早期の糖鎖変化は可逆的変化であるという仮説を立てた。本研究では、in vivo および in vitro 軟骨変性モデルを用いてこの仮説を証明し、OA 早期の病態解明と新規治療法開発のための分子基盤の構築を目指す。

(2) 具体的目的: 1) 日本白色家兎膝関節内に糖鎖分解酵素を投与し、その変性変化を組織学的および分子生物学的手法により評価する、2) マウス関節軟骨の器官培養系に上記糖鎖分解酵素を投与して上述した評価を行う、3) 軟骨変性およびその可逆性変化-修復現象-を証明する。将来的には、得られた成果を基盤として、変性ならびに修復メカニズムを糖鎖工学的的手法により解明し、OA に対する新規治療法の開発を目指す。

3. 研究の方法

高マンノース型糖鎖の特異的な加水分解酵素である α -マンノシダーゼ (Sigma, St. Louis, MO) を実験に使用した。

(1) 家兎の膝関節への α -マンノシダーゼ関節注射による軟骨変性モデル (in vivo)

本研究の動物実験はすべて北海道大学動物実験に関する規程に従って実施した。OA を自然発症しない若い個体で性成熟を迎えた young-adult (19 週齢) の雄の日本白色家兎を対象とした。関節注射は、全身麻酔下に膝

蓋靭帯中央を貫通し、右膝へ α -マンノシダーゼ 0.5 ml、左膝へはコントロールとしてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 0.5 ml をそれぞれ関節腔へ注入することで統一した。関節後 4 週と 16 週の時点で安楽死させ、脛骨大腿骨顆部を露出し、肉眼的評価を行なった。その後、大腿骨遠位部および脛骨近位部で切断した組織切片を作成し、HE 染色、サフランin-O 染色、Type II コラーゲンの免疫染色を行い、OARSI (国際変形性関節症学会) スコアの算定に用いた。

(2) 軟骨片培養における α -マンノシダーゼ刺激による軟骨変性モデル (ex vivo)

4 週齢のマウス大腿骨頭軟骨を採取し、DMEM (1% antibiotic solution + 10% FBS) 37 °C、5% CO₂ で 48 時間の前培養の後、serum-free DMEM に 0.1 mg/ml α -マンノシダーゼを添加し 72 時間培養した。上記の染色に加え、TUNEL 染色、dimethylmethylene blue (DMMB) によるプロテオグリカン放出量、Griess Reagent System (Promega, Madison, WI) を用いた一酸化窒素 (NO) を評価した。凍結融解処理した軟骨片に対しても同様に評価を行った。マンノシダーゼが特異的に基質変性に関与するかを検証するためにシアリダーゼに対する反応も評価した。

(3) 培養軟骨片中の N 型糖鎖の定量化

軟骨片を薄切し PNGase F および endoglycoceramidas II (EGCase II) (Takara Bio, Otsu, Japan) によって糖鎖部分を遊離し、還元末端を蛍光標識することにより Glycoblotting 法を適用した。Ultraflex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) を使用して、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) 解析により定量化した。

4. 研究成果

(1) 関節内への高マンノース型糖鎖分解酵素の投与が早期 OA 様の変化を導くという結果を得た。2 型コラーゲンの分解を伴わずに軟骨表層からプロテオグリカンが失われており、巨視的な表面の変形を認めない (OARSI スコア 1~1.5)。酵素の投与中止により組織変性は回復を認めた。

(2) 器官培養の軟骨組織へ高マンノース型糖鎖分解酵素を添加すると (1) と同様に 2 型コラーゲンの分解を伴わずプロテオグリカンが漏出した。シアリダーゼのような高マンノース型糖鎖以外に特異性のある酵素、凍結融解処理によって軟骨細胞が死滅した組織を用いた場合、プロテオグリカンの有意な漏出は生じなかった。TUNEL 陽性細胞の増加と NO の漸増は軟骨細胞のアポトーシスを示唆した。しかし、培養液から高マンノース型

糖鎖分解酵素を除去すると、基質の回復を認めた。一方、失われた高マンノース型糖鎖は回復しないことが明らかとなった(図)。

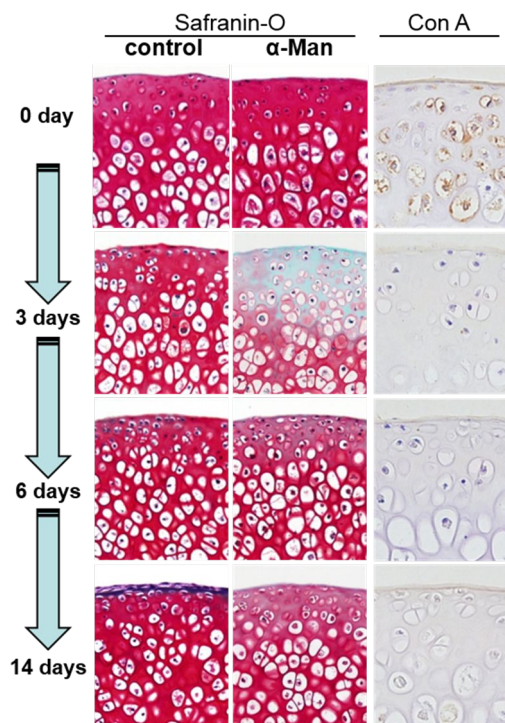


図 高マンノース型糖鎖分解酵素による基質変性およびその可逆的修復

(3) 高マンノース型糖鎖分解酵素で処理された軟骨組織のN型糖鎖プロファイルではマンノース数の多い糖鎖が減少していた。これらの変化したプロファイルは酵素を除去して再培養しても維持され、レクチン(Con A)染色の結果と一致した。

(4) プロテオグリカン破壊の段階において軟骨変性は可逆的修復を示すことが証明された。

(5) 今後は、基質の可逆的 OA 修復メカニズム解明を目指し、Glycoblotting 法を用いた糖鎖構造解析を中心とした研究を推進していく方針である。

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 0 件)

[学会発表](計 7 件)

K Homan, T Onodera, J Furukawa, M Matsuoka, D Momma, R Baba, K Hontani, Z Joutoku, S Matsubara, R Hishimura, K WooYoung, M Hamasaki, L Xu, Y Tian, N Iwasaki. The candidates of

glyco-biomarker of chondrocyte hypertrophy detected by Comprehensive N-glycan profiling. The 64th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), March 10-13, 2018, New Orleans, LA, USA

K Homan, T Onodera, J Furukawa, D Momma, M Matsuoka, R Baba, K Hontani, Z Joutoku, S Matsubara, R H, K WooYoung, M Hamasaki, L Xu, N Iwasaki. The enzymatic cleavage of high-mannose type N-glycan induces recoverable cartilage degradation. The 63th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), March 19-22, 2017, San Diego, California, USA

宝満健太郎、小野寺智洋、古川潤一、門間太輔、松岡正剛、馬場力哉、本谷和俊、上徳善太、松原新史、菱村亮介、金佑泳、濱崎雅成、徐亮、田園、岩崎倫政。高マンノース型糖鎖の減少は可逆的軟骨変性を引き起こす。第 30 回 日本軟骨代謝学会(平成 29 年 3 月 3~4 日、京都)

K Homan, T Onodera, R Baba, Da Momma, M Matsuoka, K Hontani, S Matsubara, Z Joutoku, R Hishimura, K WooYoung, N Iwasaki. Depletion of High-mannose Type N-glycans Lead to Cartilage Degradation. The 62th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society (ORS), March 5-8, 2016, Orlando, Florida, USA

宝満健太郎、小野寺智洋、花松久寿、古川潤一、上徳善太、松原新史、菱村亮介、金佑泳、濱崎 雅成、徐亮、宮崎 拓自、田園、岩崎倫政。軟骨細胞肥大分化における統合グライコミクス。第 31 回 日本軟骨代謝学会(平成 28 年 3 月 2~3 日、名古屋)

宝満健太郎、小野寺智洋、門間太輔、松岡正剛、馬場力哉、本谷和俊、松原新史、上徳善太、菱村亮介、金佑泳、岩崎倫政。軟骨細胞の高マンノース型糖鎖の減少は生体内で軟骨変性を惹起する。第 29 回 日本軟骨代謝学会(平成 28 年 2 月 19~20 日、広島)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 倫政 (IWASAKI, Norimasa)
北海道大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：30322803

(2) 研究分担者

小野寺 智洋 (ONODEARA, Tomohiro)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：70547174

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

宝満 健太郎 (HOMAN, Kentaro)
北海道大学・大学院医学研究院・博士研究員
研究者番号：40823331