

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：34512

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790096

研究課題名（和文）再生医療への応用を目指したコンドロイチン硫酸の細胞分化制御因子としての機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of chondroitin sulfate chains as cell differentiation regulators for regenerative therapies

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

研究成果の概要（和文）：コンドロイチン硫酸（CS）は、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、細胞の接着、増殖、分化や形態形成など様々な現象に関与する。本研究では、細胞分化制御因子としてのCSの潜在的特性を再生医療分野へ応用してゆくための基盤づくりを主目的として、「神経突起形成」や「軟骨形成」におけるCSの機能解析を行い、以下の成果を得た。1）高硫酸化CSによる神経突起伸長の制御機能の発現には、すでに同定したcontactin-1を含め、複数のCSレセプター分子が介在することを見出した。2）時期特異的なCSの発現が、正常な軟骨分化の進行に重要であることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Chondroitin sulfate (CS) chains are ubiquitously distributed in extracellular matrices and on cell surfaces in various tissues. Emerging evidence indicates that CS chains play important roles in diverse physiological phenomena such as cell adhesion, proliferation, differentiation, and morphogenesis. In this project, focusing on their potentials as cell differentiation regulators for regenerative therapies, biological functions of CS in “neuritogenesis” and “chondrogenesis” were investigated, and the following findings were obtained. 1) Several CS receptor molecules including contactin-1 are involved in neuroregulatory functions of oversulfated CS variants. 2) Temporally regulated CS expression is required for normal chondrogenic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：糖鎖、発現制御、発生・分化、細胞・組織、酵素

## 1. 研究開始当初の背景

CS 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）として脳神経系や軟骨組織をは

じめ、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、細胞の増殖、分化、形態形成など、生命活動の根幹を担う様々な現象に関与する。CS は、グルクロン酸と *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）の二糖が繰

返し重合した単純な骨格構造からなるが、様々な部位で硫酸化修飾を受けることで、構造多様性を獲得する。これまで我々は、CS 多糖鎖中に内在する微細な硫酸化構造が、CS の多彩な機能を産み出す構造的基盤であるであることを裏付ける証拠を数多く報告してきた。特に、硫酸化パターン異なる様々な CS バリエント (CS-A~CS-E など) の初代培養神経細胞に与える効果を網羅的に調べた研究から、CS の硫酸化パターンと伸長促進される神経突起の形態との間に相関があることが見出している。その一例として、高硫酸化 CS バリエントである CS-E をコートした基質上で培養した初代培養神経細胞では、軸索様の長い神経突起の伸長が促進されるが、CS-E とは異なる高硫酸化 CS である CS-D を基質にした場合には、樹状突起様の比較的短い (おそらく未熟な) 神経突起が複数本観察されるに過ぎないことが挙げられる。いくつかの研究から、CS-D や CS-E などの高硫酸化 CS には、神経栄養性の液性因子群と強い結合親和性があることが示され、CS を介する生命現象の多くは、細胞外マトリックス中に分布する CS が特定の生理活性液性因子を捕獲し、これを細胞膜上の液性因子の受容体に提示するコレセプター (またはリザーバー) として、補助的に働くことで発揮されるというシナリオが広く受け入れられている。しかしながら、実際に詳細な作用メカニズムの解明に至った例は少なく、多岐に渡る CS の機能が本モデルで全て説明できる訳ではなかった。

最近我々は、CS-E による神経突起伸長が、CS を認識するレセプター分子を介した細胞内シグナル伝達経路の活性化により引き起こされることを見出した。この発見は、CS 自身がリガンドとして直接的に機能し、細胞外から特定のシグナル伝達を制御しうることを意味し、薬学的見地からも重要な知見である。CS が多彩な機能を発揮する分子であることから、脳神経系をはじめとする生体内において、CS レセプター分子が複数存在すること、また各々のレセプター分子で、CS の硫酸化構造に対する結合親和性や発動する下流シグナル伝達経路が異なっていることは想像に難くない。

## 2. 研究の目的

CS が豊富に存在する脳神経系の「神経突起形成」や軟骨組織の「軟骨形成」をモデルに、CS の役割とその作用メカニズムの解明を試み、CS が神経再生医療や軟骨形成不全症/変形性関節症の治療に有効な標的分子となりうるかを探るべく、以下の課題に取り組む。

### (1) 高硫酸化 CS の神経突起伸長に対する

制御メカニズムの解明を目的として、神経細胞膜上に発現する細胞接着分子群の中から、CS-D や CS-E と結合性を示す CS レセプター候補分子のさらなる探索を行い、その妥当性を評価する。

(2) CS の硫酸化に関わる生合成系の異常は、共通して軟骨形成不全症を引き起こすが、CS が軟骨の分化制御にどのように参画しているかは不明である。本研究では、軟骨分化モデル培養細胞系において、CS の硫酸化を担う硫酸基転移酵素 (CSST) 群の発現を分子生物学的手法で攪乱させ、CS の質的変動により影響を受ける軟骨分化段階を同定し、その分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) CS-D および CS-E に対する神経細胞の応答性の違いを明らかにするために、CS-D と CS-E の混合基質上で海馬神経細胞を培養し、それぞれにおける細胞の形態の違いを観察した。

さらに、CS レセプター分子のさらなる同定を目的として、脳神経系に発現する分子であり、これまで文献上、少なくとも CSPG のコアタンパク質と相互作用することが報告されている膜結合型分子群、およびヘパリン結合性ドメインを有する細胞接着分子群の中から、高硫酸化 CS と結合性を示す分子の絞り込みを行った。候補分子の組換えタンパク質と様々な CS バリエント (CS-A~CS-E) との結合親和性を、表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサー (BIAcore) を用いて評価し、高硫酸化 CS と高い結合親和性を示した分子について、その CS レセプターとしての妥当性を検証した。具体的には、Neuro-2a などの神経芽細胞由来株を用いて、当該分子の過剰発現もしくはノックダウン細胞を樹立し、高硫酸化 CS を基質とした場合における突起の形態や伸長の程度に変化が生じるかを調べた。また、得られた効果が当該分子に依存した作用であるかを、それぞれの分子に対する中和抗体を用いた阻害実験によって確認した。さらに当該分子が生体内においても CS レセプターとして機能しうるかを検証するために、様々な初代培養神経細胞において当該分子の発現を確認すると共に、特異的な中和抗体や siRNA を処置することによって、各高硫酸化 CS の神経突起伸長に与える効果が打ち消されるかを調べた。

(2) 軟骨分化における CS の硫酸化の役割と分子基盤を解明する目的で、軟骨組織の一連の分化過程を再現できる細胞培養系

(ATDC5 細胞) において、CS の硫酸化を担う CSST 群の発現をノックダウンさせ、軟骨

分化にどのような影響がでるかを検証した。特に、CSの主要な硫酸化構造である GalNAc の4位の硫酸化を触媒する CSST (コンドロイチン 4-O-硫酸基転移酵素-1: C4ST-1) の発現を恒常的にノックダウンさせた ATDC5 細胞では、軟骨分化が抑制されることをこれまでに見出しているため、C4ST-1 のノックダウンにより、多段階過程を経る軟骨分化のいずれの段階が障害されているかを、細胞の形態観察ならびに II 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨分化マーカーの発現を指標に特定した。また、C4ST-1 の過剰発現株を樹立し、CS の硫酸化パターンを時期特異的に改変させることで、軟骨分化を積極的に亢進させることができるかを検証した。

#### 4. 研究成果

(1) CS-D と CS-E の混合基質上で培養した海馬神経細胞の形態を観察したところ、混合基質中に占める CS-D の割合が増加するにつれて、CS-E 誘導性の長い神経突起の伸長が抑制され、複数本の神経突起をもつ CS-D に特有の形態に収束する傾向が観察された。したがって CS-D には、CS-E 誘導性の神経突起の伸長を打ち消す効果があり、CS による神経突起伸長阻害のメカニズムの解明に向けて、CS-D が良いモデル糖鎖となり得る可能性を見出した。

また、上述した CS-D および CS-E 基質上で培養した初代培養神経細胞の神経突起の形態は、未成熟な神経突起から軸索または樹状突起への運命が決定される神経細胞の特定の極性形成段階の形態とそれぞれ酷似していることから、CS の硫酸化パターンを改変させる手段を講じることによって、神経細胞の極性形成過程を自在に制御できる可能性が示唆された。

CS-D および CS-E に対する新たな CS レセプター候補分子の探索を行った結果、両高硫酸化 CS バリエーションに高い結合親和性を示す細胞接着分子を複数見出し、そのうちの一つに、少なくとも各高硫酸化 CS に対する感受性を増大させる効果があることがわかった。これらの結果より、高硫酸化 CS による神経突起伸長の制御機能の発現には、我々がすでに同定した contactin-1 (CNTN-1) を含め、複数の CS レセプター分子が介在しているものと考えられた。

(2) 軟骨分化における CS の機能を明らかにする目的で、モデル細胞株である ATDC5 細胞の軟骨分化に同調した発現変化を示す C4ST-1 の発現をノックダウンしたところ、C4ST-1 により合成・修飾される CS の発現が減少するとともに、II 型コラーゲンやアグリカンなどの軟骨基質産生を伴う軟骨細胞

への分化過程が著しく障害されることが判明した。

上述の結果をうけて、C4ST-1 の過剰発現株を樹立し、ATDC5 細胞における軟骨分化が助長されるようになるかを調べた。しかしながら予想に反し、C4ST-1 を過剰発現させた場合においても、軟骨分化の進行が、顕著に停滞することが判明した。これらの結果から、C4ST-1 により生合成される CS の時期特異的な発現が、正常な軟骨分化の進行に重要であることがわかった。

#### 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 1 件)

- ① 三上 雅久、北川 裕之 (2011) 「神経系におけるコンドロイチン硫酸鎖の糖鎖暗号」(総説) 生化学 83 (3), 231-239. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 小山慎司, 藪田ゆみ, 三上雅久, 北川裕之 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) (2010 年 12 月 9 日, 神戸) “筋分化過程におけるコンドロイチン硫酸の機能解析”
- ② 金澤弘訓, 山脇美希子, 玉置祐樹, 安永大輝, 三上雅久, 北川裕之 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010) (2010 年 12 月 9 日, 神戸) “高硫酸化コンドロイチン硫酸による神経突起伸長制御とそのメカニズムの解析”
- ③ Tadahisa Mikami, Daiki Yasunaga, Yuhki Tamaki, Hiroshi Kitagawa. The 25<sup>th</sup> International Carbohydrate Symposium (ICS 2010) (2010. 8. 5. Chiba) “Contactin-1 is a functional receptor for neuroregulatory chondroitin sulfate-E: Implication of a potential role for chondroitin sulfate sugar chains as extracellular signaling molecules”

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 骨格筋再生促進剤  
発明者: 北川裕之、三上雅久  
権利者: 同上

種類：特許  
番号：特願 2011-202470  
出願年月日：2011年9月15日  
国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~biochem/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 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

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし