

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570175

研究課題名(和文) 高硫酸化コンドロイチン硫酸/デルマタン硫酸の生理的・病理学的機能の解明

研究課題名(英文) Study on the physiological and pathological function of highly-sulfated chondroitin/dermatan sulfate

研究代表者

羽瀧 脩躬 (Habuchi, Osami)

愛知医科大学・公立大学の部局等・その他

研究者番号：90024067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝臓には高硫酸化DS(DS-E)が結合したデコリンまたはピグリカンが存在する。DS-E欠損マウス(GalNAc4S-6ST KOマウス)を用いて、CCl4による肝傷害に果たすDS-Eの役割を調べた。CCl4によるALT、APの増加はWTよりもKOの方が高かった。CCl4注射後のコラーゲン量は、6週以降WTよりもKOの方が高かった。コラーゲン分解に關与するMMPのなかで、MMP-9遺伝子の発現と活性はWTよりもKOで低下していた。これらの結果はDS-Eの消失は、CCl4による肝臓の傷害を強くし、修復過程を遅らせることを示している。CS-E欠損は骨芽細胞分化異常により骨密度が低下させた。

研究成果の概要(英文)：GalNAc4S-6ST transfers sulfate to position 6 of GalNAc(4S04) in chondroitin sulfate (CS) or dermatan sulfate (DS) to yield GalNAc(4,6-S04) residues. We found previously that highly sulfated DS (DS-E) containing GalNAc(4,6-S04) are present in the mouse liver as GAG chains of decorin and/or biglycan. To determine if DS-E plays a role in liver fibrosis, we compared liver fibrosis induced by CCl4 between GalNAc4S-6ST KO mice (DS-E deficient) and WT mice. ALT and AP activities after injection of CCl4 were higher in KO mice than in WT mice. The amount of collagen was higher in KO mice than in WT mice on 6 week and later after cessation of CCl4 injection. Among MMPs, expressions MMP-9 (both mRNA and enzyme activity) were lower in KO mice than in WT mice. These results suggest that in the absence of DS-E, liver fibrosis induced by CCl4 was more severe and the healing process was delayed. Deficient in CS-E caused decrease in bone density through abnormal differentiation of osteoblasts.

研究分野：生化学

キーワード：コンドロイチン硫酸 デルマタン硫酸 GalNAc4S-6ST 肝繊維化 デコリン MMP 骨密度

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン/デルマトン硫酸の繰り返し二糖単位に GlcA(DoA)-GalNAc(4,6-SO₄)(E 単位)を含む高硫酸化 CS/DS (CS-E, DS-E) は、神経細胞の軸索突起形成阻害、トロンビンの活性阻害、ヘパリンコファクターII の活性化、ルイス肺ガン細胞の転移、肺ガン細胞の移動阻害、間充織細胞から骨細胞への分化誘導、アストロ細胞腫瘍の促進、ES 細胞の分化促進、抗原投与による関節炎の阻害などの種々の機能を持つことが報告されている。これらの研究の多くは培養細胞を利用した実験系か、CS-E として市販のイカ軟骨 CS-E を利用している。市販のイカ軟骨 CS-E は二糖単位当たりの E 単位含量が約 70%であり、ヒトやマウスの組織に含まれる CS-E よりもかなり高い。さらにイカ軟骨 CS-E にはグルコースやフコースの分枝構造も知られており、哺乳動物 CS-E の機能をどの程度反映するか不確かさが残る。また培養細胞で得られた結果が生体にどの程度当てはまるかは、in vivo の実験と比較しなくては判明しない。In vivo における CS-E, DS-E の機能を解明するには、これらの分子を合成する酵素の遺伝子 KO が最も確実である。私たちは CS-E, DS-E の合成に働く硫酸転移酵素 GalNAc4S-6ST の均一精製、遺伝子クローニング、KO マウスの作製を世界で初めて行った。現時点でも、GalNAc4S-6ST KO マウスは世界的にも私たちが作製した系統のみである。GalNAc4S-6ST KO マウスでは CS-E, DS-E が完全に欠損しており、CS-E, DS-E の機能を調べるための極めて優れた実験系となっている。

2. 研究の目的

私たちはマウスの肝臓に E 単位を約 40%含む高硫酸化 DS がデコリンまたはビグリカンの糖鎖として存在することを発見した。一方デコリンは肝繊維化で著明に発現が増加することが知られている。本研究の第一の目的は、GalNAc4S-6ST KO マウスを用いて、肝繊維化に及ぼす高硫酸化 DS-E の機能を解明することである。第二の目的は、骨形成に及ぼす CS-E の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 肝繊維化における DS-E の機能

7 から 8 週齢の BALB/c マウスに、ミネラルオイル中の CCl₄ (2.0 ml/kg) を腹腔に週 2 回、全体で 9 回注射した。注射終了後 2 日、3 週、6 週、9 週で肝臓を摘出し、血液を採取した。肝臓を用いて Hyp の定量、RNA 抽出、パラフィン切片の作製を行った。種々の遺伝子の発現を real time PCR で測定した。パラフィン

切片は Sirius Red 染色、デコリン免疫染色、Type I コラーゲン免疫染色、バーシカン免疫染色を行った。肝臓の抽出液を用いて、Zymography を行い MMP-9 活性を調べた。血清を用いて、ALT, AP 活性を測定した。

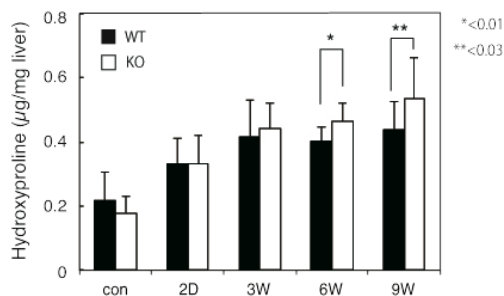
(2) 骨細胞分化における CS-E の機能
エストロジオール投与による骨形成促進を GalNAc4S-6ST KO マウスと野生型マウス (C57BL/6 系統) 比較した。

4. 研究成果

(1) 肝繊維化における DS-E の機能

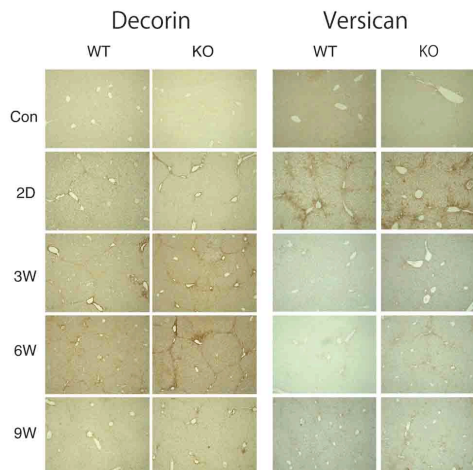
Hydroxyproline の定量

CCl₄ 注射により肝臓組織重量当たりの Hyp が増加する。Hyp の量は WT では注射後 2D, 3W, 6W 9W まで増加を続ける。一方 KO では 3W 以降は増加傾向を示さない。その結果、注射後 6W と 9W では KO の方が有意に高い Hydroxyproline の値を示した。



Decorin, Versican の発現

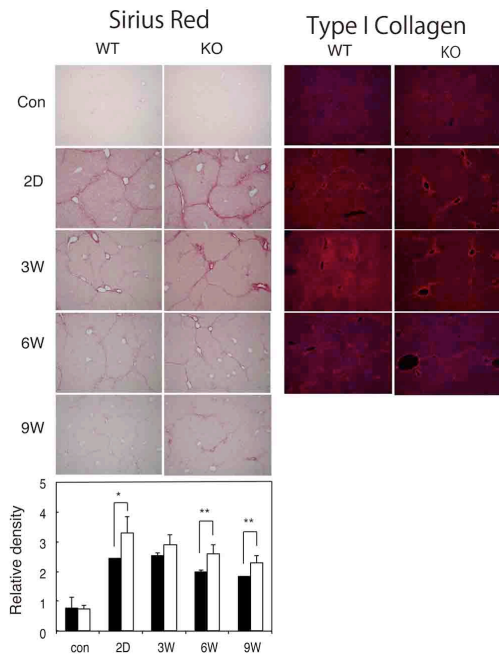
高硫酸化 CS/DS のコアタンパク質である Decorin の発現を免疫組織染色で調べた。WT も KO も CCl₄ の注射により hepatic lobule の境界に発現が増加する。3W と 6W では KO の方が強く発現した。肝臓で発現しているプロテオグリカンの一つある Versican についても調べた。Versican の発現は注射後 2D の組織の血管の周囲で最も強く発現していた。



Sirius Red, Type I collagen 染色

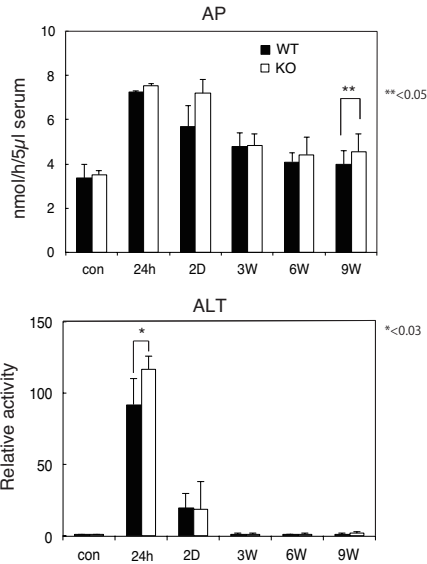
Sirius Red で CC14 注射後の肝臓を染色した。Sirius Red はコラーゲン繊維を染色すると考えられている。Sirius red 染色は CC14 注射前にはほとんど観察されなかったが、注射後 2D の組織では hepatic lobule の境界に明瞭な染色が見られた。中心静脈周囲はあまり染色されなかった。WT と KO の比較では、KO の方が強く染まっていた。染色強度を image analysis により定量すると、2D, 3W, 6W, 9W で KO の方が有意に高かった。

Type I コラーゲンの免疫組織染色では、CC14 注射後の組織の hepatic lobule の境界が主に染まっていた。KO では染色が hepatic lobule の境界にほぼ限定されていたが、WT ではそれ以外の細胞周辺も染まっていた。染色強度における有意な差は観察されなかった。



ALT, AP 活性

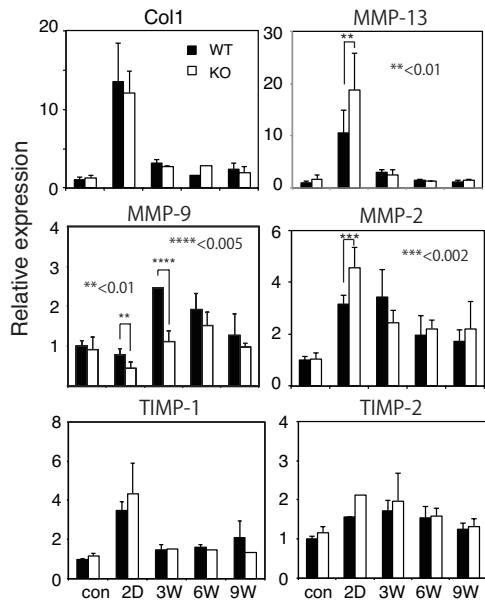
CC14 の投与は肝臓に傷害を引き起こし、傷害にともなう酵素の増加を引き起こす。高硫酸化 CS/DS の欠損がこれらの酵素の増加に影響を及ぼすかどうかを調べた。AP、ALT どちらも注射後 24 時間で oil のみを注射した con に比べて高い値を示した。24h の ALT 活性は WT よりも KO の方が高かった。CC14 を注射しなくなると ALT は 3W で元の値に戻る。一方 AP は徐々に減少するが、9W でもまだ con よりも高い値を示している。9W でもまだ残っている AP 活性は KO の方が WT よりも高かった。これらの結果は、WT に比べて KO の方が CC14 による傷害の程度が大きいことを示唆している。



コラーゲン代謝関連酵素の発現

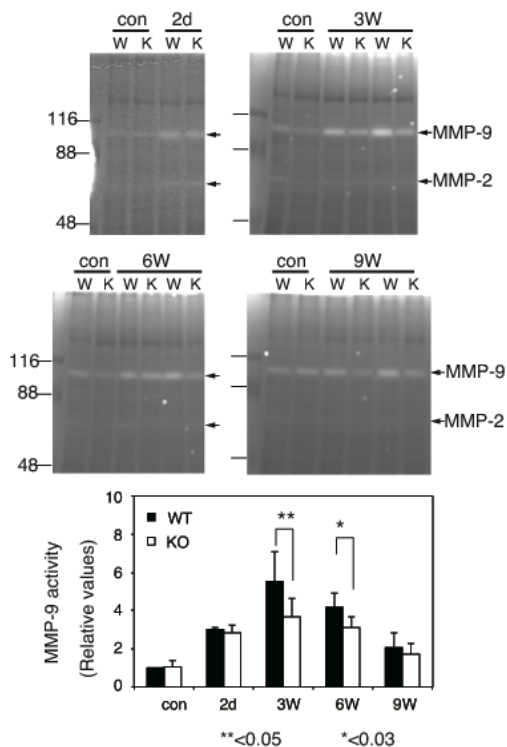
CC14 投与による GalNAc4S-6ST KO マウスで Hypro、コラーゲン繊維の増加の程度が GalNAc4S-6ST KO マウスの方が WT よりも大きい理由としては、KO マウスにおけるコラーゲン合成の増加、あるいはコラーゲン分解の減少が考えられる。そこでコラーゲンの合成と分解に関与する遺伝子の発現を Real time RT-PCR で調べた。COL1 の発現は CC14 投与後 2D で 10 倍以上増加し、3W 以降は急速に減少した。増加の程度は WT と KO で差が無かった。コラーゲンの代謝に影響を及ぼす MMP の発現は調べた限り CC14 注射により発現が増加し注射を停止したあと減少するという共通の変化を示したが、発現パターンおよび WT と KO の比較では種類による違いが見られた。MMP-13 と MMP-2 の発現は注射後 2D でピークを示すが、その後減少し、MMP-13 では 6W 後に注射前の値に戻った。2D においてはどちらの遺伝子発現も WT よりも KO の方が高かった。一方 MMP-9 は注射後 3W でピークとなった。2D と 3W では WT よりも KO の方が有意に低い発現を示した。TIMP 1 と TIMP 2 の発現もまた CC14 注射で増加し注射後減少するパターンを示したが、WT と KO には有意な差は観察されなかった。MMP 類はコラーゲンまたは変性コラーゲンの分解に直接関与するだけでなく、他の MMP の活性化、細胞表面リセプターの活性化などを通して細胞の遺伝子発現にさまざまな影響を与えていることが報告されており、ここで調べた MMP または TIMP がコラーゲン代謝にどのように関与するかについては、現時点でははっきりしたことは云えない。CC14 注射により増加したコラーゲンが CC14 注射の停止後減少する速度は WT よりも KO の方が大きいことを考えると、COL1 遺伝子発現が WT と KO で差が無いので、コラーゲン分解が WT よりも KO で低下している可能性がある。コラーゲン分解に直接かかわっている MMP があるとすれば、この MMP の発現は

WT よりも KO で低くなるのが予想される。この予想と一致する発現パターンの変化を示すのは、調べた限り MMP-9 だけであった。そこで実際に MMP-9 タンパク質の発現が WT と KO で違いがあるかを調べた



Zymography

変性コラーゲン（ゼラチン）を基質とした zymography の結果の代表的な例を示す。Zymography で検出された 2 本のバンドは分子量から判断して 95kDa と 68kDa のバンドは肝臓で発現している主な MMP のうち proMMP-9、MMP-2 にそれぞれ対応すると考えられる。proMMP-9 に対応するバンドの濃さを image

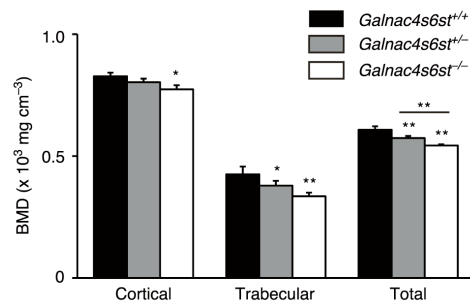


analysis により求めた結果を下の図に示した。CC14 注射後 3W と 6W では WT よりも KO で活性が有意に低かった。この結果は MMP-9 遺伝子の発現と一致しており、組織中で MMP-9 が活性タンパク質として働いていることを示している。

(2) 骨細胞分化における CS-E の機能

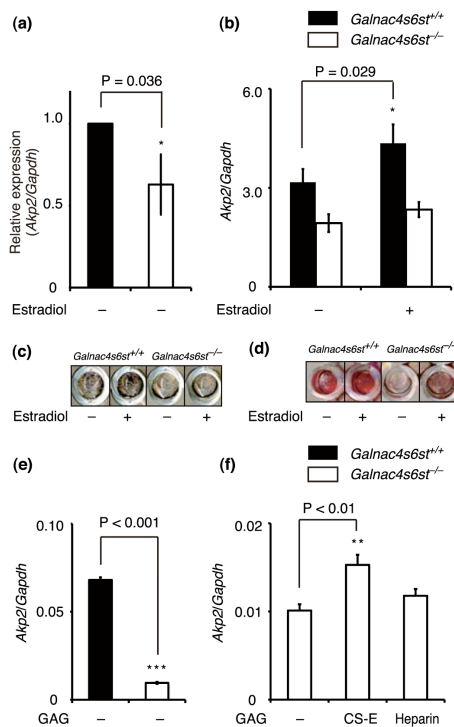
(この研究は神戸薬科大学、北川裕之教授との共同研究として行われた)

16 週齢で Galnac4s6st^{-/-} マウスは骨密度が Galnac4s6st^{+/+} マウスよりも有意に低かった。



Galnac4s6st^{-/-} マウスにおける骨減少/骨粗しょう症的な表現形が骨同化作用の欠損に由来するかどうかを調べるため、WT または Galnac4s6st^{-/-} マウスの骨髄由来ストローマ細胞 (BMSC) の骨芽細胞への分化能力を評価した。骨芽細胞への分化と成熟は ALP 発現に始まり無機質の析出に終わる高度に順序立てられた過程であるので、単離した BMSC を骨細胞分化培地で培養し ALP と石灰化結節形成により染色した。ALP の発現は Galnac4s6st^{-/-} の骨髄由来ストローマ細胞の培養で WT よりも有意に低かった (a, c)。石灰化結節形成もまた著しく減少していた (d)。エストラジオールを与えると、WT BMSC の培養では ALP 発現と石灰化結節形成は有意に増加するが、Galnac4s6st^{-/-} BMSC の培養では増加しなかった (a-d)。

Galnac4s6st^{-/-} BMSCs における ALP mRNA の発現は Galnac4s6st^{+/+} BMSCs に比較して低かったが、CS-E の添加により有意に増加した (e, f)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Koike T, Mikami T, Shida M, Habuchi O, Kitagawa H. (2015) Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. *Sci Rep.* 査読有 2015 Mar 11;5:8994. doi: 10.1038/srep08994.
- (2) Troeberg L, Lazenbatt C, Anower-E-Khuda MF, Freeman C, Federov O, Habuchi H, Habuchi O, Kimata K, Nagase H. (2014) Sulfated Glycosaminoglycans Control the Extracellular Trafficking and the Activity of the Metalloprotease Inhibitor TIMP-3. *Chem Biol.* 査読有 2014 Aug 27. pii: S1074-5521(14)00243-9. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.07.014.
- (3) Md. Ferdous Anower-E-Khuda, Hiroko Habuchi, Naoko Nagai, Osami Habuchi, Takashi Yokochi, and Koji Kimata (2013) Heparan sulfate 6-O-sulfotransferase isoform-dependent regulatory effects of heparin on the activities of various proteases in mast cells and the biosynthesis of 6-O-sulfated heparin *J. Biol. Chem.* 査読有 **288**, 3705-3717
- (4) Anower-E-Khuda MF1, Matsumoto K, Habuchi H, Morita H, Yokochi T, Shimizu K, Kimata K. (2013) Glycosaminoglycans in the blood of hereditary multiple exostoses patients: Half reduction of heparan sulfate to chondroitin sulfate ratio and the possible diagnostic application. *Glycobiology.* 査読有 2013 23:865-876. doi:10.1093/glycob/cwt024.
- (5) Brown JM, Xia J, Zhuang B, Cho KS, Rogers

CJ, Gama CI, Rawat M, Tully SE, Uetani N, Mason DE, Tremblay ML, Peters EC, Habuchi O, Chen DF, Hsieh-Wilson LC (2012) A sulfated carbohydrate epitope inhibits axon regeneration after injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有 **109**, 4768-4773.

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 羽瀨 弘子, 羽瀨 脩躬, 高硫酸化デルマタン硫酸は肝線維化の回復に寄与 Contribution of highly sulfated dermatan sulfate to the liver fibrolysis、第 86 回日本生化学会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 5 件)

- (1) Habuchi, O (2014) Carbohydrate (Chondroitin 6) Sulfotransferase 3; Carbohydrate (N-Acetylglucosamine 6-O) Sulfotransferase 7 (CHST3,7) in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes.* (Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. eds.) pp. 979-987, Springer, Tokyo, ISBN: 978-4-431-54239-1
- (2) Habuchi, O (2014) Carbohydrate (Keratan Sulfate Gal-6) Sulfotransferase 1 (CHST1) in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes.* (Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. eds.) pp. 989-996, Springer, Tokyo, ISBN: 978-4-431-54239-1
- (3) Habuchi, O (2014) Carbohydrate (Chondroitin 4) Sulfotransferase 11-13 (CHST11-13) in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes.* (Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. eds.) pp. 1025-1033, Springer, Tokyo, ISBN: 978-4-431-54239-1
- (4) Habuchi, O (2014) Carbohydrate (N-Acetylgalactosamine 4-Sulfate 6-O) Sulfotransferase 15 (CHST15) in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes.* (Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. eds.) pp. 1157-1163, Springer, Tokyo, ISBN: 978-4-431-54239-1
- (5) Habuchi, H. (2014) Heparan Sulfate 2-O-Sulfotransferase (HS2ST) in *Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes.* (Taniguchi, N., Honke, K. and Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T. eds.) pp. 1053-1065, Springer, Tokyo, ISBN: 978-4-431-54239-1

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

羽渕 脩躬 (Habuchi, Osami)

愛知医科大学・公私立大学の部局等・その他

研究者番号：90024067

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

羽渕 弘子 (Habuchi, Hiroko)

愛知医科大学・公私立大学の部局等・その他

研究者番号：90329821