

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：34512

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670033

研究課題名(和文)コンドロイチン硫酸の減少と多核割球形成

研究課題名(英文) Involvement of the decreased chondroitin sulfate production in the presence of multinucleated blastomeres

研究代表者

北川 裕之 (Kitagawa, Hiroshi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40221915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：コンドロイチン硫酸鎖は、コアタンパク質に共有結合し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン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存在する。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、細胞増殖や分化、形態形成をはじめとする様々な生命現象を司ることが報告されているが、その機能の多くは、糖鎖部分であるコンドロイチン硫酸鎖の性質に依存することが知られている。以前我々は、コンドロイチン硫酸鎖の欠損胚は多核割球が形成され致死に至ることを報告した。本研究から、加齢によるコンドロイチン硫酸鎖の減少が卵胞の成熟に対し抑制的に働く可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Chondroitin sulfate, a long linear polysaccharide that is covalently bound to specific core proteins to form chondroitin sulfate proteoglycans, is distributed on the cell surfaces and in the extracellular matrix. To date, chondroitin sulfate proteoglycans have been reported to play important roles in physiological processes, such as cell-cell interactions, cell proliferation, differentiation, and morphogenesis. Many of the physiological roles are attributed to the chondroitin sulfate side chains. We previously reported that mutant mice completely lacking chondroitin sulfate side chains result in embryonic lethality before the 8-cell stage due to incomplete cytokinesis and that chondroitin sulfate side chains are indispensable for embryonic cell division. In this study, we showed that the decreased amount of chondroitin sulfate with age might lead to suppression of follicular maturation.

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 多核形成 加齢 プロテオグリカン 糖転移酵素 細胞外マトリックス エスト
ラジオール 不妊

1. 研究開始当初の背景

コンドロイチン硫酸鎖は、コアタンパク質の Ser 残基に共有結合し、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン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存在する。コンドロイチン硫酸プロテオグリカンは、細胞増殖や分化をはじめとする様々な生命現象を司ることが報告されているが、その機能の多くは、糖鎖部分であるコンドロイチン硫酸鎖の性質に依存することが知られている。実際、コンドロイチン硫酸鎖の性質は、その生合成及び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原因となりうることを我々のグループをはじめとするいくつかのグループより報告されていた。その好例として、初期胚の発生過程が挙げられ、コンドロイチン硫酸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コンドロイチン硫酸鎖の発現が必要不可欠であることを意味する。

一方、高齢の不妊患者の生殖補助医療（人工授精など）によって得られた着床前胚では、多核割球が高頻度に形成され、流産率が高くなり、妊娠率が低下することが知られていた。多核割球の形成機序を解明することは、不妊患者の軽減に貢献し、妊娠出産率の向上につながると思われる。

2. 研究の目的

コンドロイチン硫酸鎖の欠損胚（結合領域四糖の合成完了に関わるグルクロン酸転移酵素-I (GlcAT-I) 欠損マウス由来）は、多核割球が形成され致死に至る。また、加齢に伴うコンドロイチン硫酸鎖の減少は、変形性関節症や骨粗鬆症などの加齢疾患の原因となる。本研究では、加齢による卵巣のコンドロイチン硫酸鎖の減少が多核割球形成（不妊）の原因となるという仮説を検証しようとした。

3. 研究の方法

GlcAT-I ヘテロ変異マウスから過排卵処理により得られた 2 細胞期胚を採取し 24 時間培養した後 PCR 法を用いて着床前胚の遺伝子型判定を行った。

過排卵処理を行った 6 週齢の野生型マウス、*GlcAT-I* ヘテロ変異マウスをそれぞれ 4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定後、卵巣を摘出し、パラフィンに包埋した。パラフィン

ブロックから 30 μm 毎に 5 μm 厚で卵巣の薄切切片を作製し、脱パラフィン処理後、ヘマトキシリン/エオシン染色を行った。顕微鏡下において、卵胞成熟段階（一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞、排卵前胞状卵胞）を区別してカウントを行った。

卵胞刺激ホルモンで刺激を行った 4 週齢のマウスから卵巣を摘出し、顆粒膜細胞を単離した。得られた顆粒膜細胞を卵胞刺激ホルモン及び IGF-1 存在下で培養し RNA 抽出後エストラジオール合成酵素であるアロマターゼ (*Cyp19a1*) の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法によって解析した。

4. 研究成果

(1) 加齢マウス (12 ヶ月齢) 及び若齢マウス (3 ヶ月齢) の卵巣組織におけるコンドロイチン硫酸量を定量すると、卵巣のコンドロイチン硫酸は加齢に伴って減少していた。コンドロイチン硫酸鎖に対する抗体を用いた免疫組織化学的解析により、マウスの卵巣では、卵細胞や顆粒膜細胞でコンドロイチン硫酸が強く発現していることが判明した。また、加齢マウスでは若齢マウスと比較して、コンドロイチン硫酸鎖に対する抗体の反応性が卵細胞や顆粒膜細胞で顕著に減少していたことから、加齢に伴って卵巣のコンドロイチン硫酸鎖が減少することが明らかとなった。

そこで、加齢によるコンドロイチン硫酸鎖減少の原因がコアタンパク質の減少によるのではないかと考え、主に卵巣組織に発現しているコンドロイチン硫酸プロテオグリカンとして知られている *Bamacan*, *Versican*, *Decorin* の発現量を解析したが、加齢マウスと若齢マウスの卵巣では有意な差は認められなかった。次に、コンドロイチン硫酸鎖を合成する酵素として知られている、コンドロイチン合成酵素 (*ChSy-1, -2, -3*) やコンドロイチン重合化因子 (*ChPF*)、コンドロイチン *N*-アセチルガラクトサミン転移酵素 (*ChGn-1, -2*) の発現量を解析したが、加齢に伴った変化は見られなかった。しかしながら、コンドロイチン硫酸鎖の結合領域の合成開始に係るキシロースをセリン残基に転移する酵素 (*XylT-1, -2*) について解析したところ、*XylT-2* の遺伝子発現量に有意な差は見られなかったが、*XylT-1* では加齢マウスで発現量が顕著に低下していた。

(2) 卵胞内の細胞外基質にはヒアルロン酸やコラーゲンと共にコンドロイチン硫酸プロテオグリカンが多く含まれている。しかし

ながら、卵胞成熟過程におけるコンドロイチン硫酸鎖の機能は不明である。そこで卵胞の成熟過程に着目した。*GlcAT-I* ヘテロ変異マウスから過排卵処理により得られた2細胞期胚を採取し24時間培養した後PCR法を用いて着床前胚の遺伝子型判定を行ったところ、過排卵処理によってヘテロ変異体の着床前胚の数が野生型のものに比べ著しく減少することが明らかとなった(ホモ変異体の多くは多核割球が形成され致死に至る)。このことは、卵巣内において*GlcAT-I*欠損によってコンドロイチン硫酸鎖が減少したことが排卵に影響を与えた事を示唆している。事実、卵巣のコンドロイチン硫酸鎖の二糖組成解析を行ったところ、野生型に比較して*GlcAT-I*ヘテロ変異マウスでは約半分程度にまでコンドロイチン硫酸鎖が減少していた。さらに、過排卵処理後の卵巣において実際に排卵されなかった卵胞の数をカウントすることで排卵に与える影響を調べたところ、野生型に比較して*GlcAT-I*ヘテロ変異マウスの卵巣では、胞状卵胞の数が増加し、排卵前胞状卵胞は減少傾向を示したが、一次卵胞及び二次卵胞の数に差は認められなかった。以上のことから、コンドロイチン硫酸鎖の減少は、卵胞の成熟過程の最終段階である胞状卵胞から排卵前胞状卵胞への進行を停滞させる可能性が示唆された。

(3) 卵胞成熟において、卵胞刺激ホルモン(FSH)とインスリン様成長因子(IGF)は協調して卵胞成熟を促すことが明らかとなっている。野生型マウスとコンドロイチン硫酸鎖の合成が減少しているマウスを比較すると、FSHのみの刺激やIGFのみの刺激によってエストロゲン合成酵素であるアロマターゼ(*Cyp19a1*)の遺伝子発現量に変化は見られなかった。しかしながら、コンドロイチン硫酸鎖の合成が減少しているマウスでは、FSH及びIGFを両方添加した場合は、有意に*Cyp19a1*の発現量が減少した。

以上のことから、コンドロイチン硫酸鎖の減少が顆粒膜細胞活性化時のエストロゲン生合成に負の影響を及ぼすことが示唆され、加齢によるコンドロイチン硫酸鎖の減少が卵胞の成熟に対し抑制的に働く可能性が示唆された。今後、ホルモンの分泌量や受容体の発現量について詳細な解析が必要である。

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1件)

1 Tomomi Izumikawa, Hiroshi Kitagawa, et al. (13人中13番目) (2016) Chondroitin 4-O-sulfotransferase is indispensable for sulfation of chondroitin and plays an important role in maintaining normal life span and oxidative stress responses in nematodes. *J. Biol. Chem.*, 291 (44), 23294-23304. 査読有
[doi:10.1074/jbc.M116.757328](https://doi.org/10.1074/jbc.M116.757328)

[学会発表](計9件)

1 北川 裕之

東京理科大学総合研究院バイオオルガノメタリスク研究部門研究交流会(2017.03.07 東京)コンドロイチン硫酸の機能解析に基づく疾患糖鎖生物学-革新的治療薬の開発を目指して-

2 Kitagawa, H.

The 2016 Glycobiology Meeting of China (2016.08.05-07, Nantong, China) Functional analysis of chondroitin sulfate by sugar-remodeling.

3 Kitagawa, H.

Glycoscience Japan-The Netherlands Joint Seminar 2016: Glycobiology in Health and Diseases (2016.04.18, Leiden, Netherlands) Chondroitin sulfate in development and differentiation.

4 Kitagawa, H.

2016 Glycoforum (2016.04.11, New Taipei City, Taiwan) Using sugar-remodeling to study chondroitin sulfate function.

5 北川 裕之

鳥取大学地域学部研究セミナー(2015.12.08 鳥取)コンドロイチン硫酸鎖の機能解析に基づく疾患糖鎖生物学-革新的治療薬の開発を目指して-

6 佐藤 伴, 北川 裕之

BMB2015第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学大会合同大会(2015.12.01-04 神戸)CS鎖の減少とマウス着床前胚の多核割球の形成

7 清川 杏里沙, 佐藤 伴, 北川 裕之

第64回日本薬学会近畿支部総会・大会(2014.10.11 京都)マウス卵巣における加齢に伴ったコンドロイチン硫酸鎖の減少

8 北川 裕之

平成26年度第2回「メディショナルナノテク研究会」(2014.09.19 神戸)糖鎖の機能解析に基づく疾患糖鎖生物学-革新的治療薬の

開発に向けて

9 佐藤 伴, 泉川 友美, 北川 裕之

第33回日本糖質学会年会 ワークショップ
「ES/iPS 細胞と糖鎖」(2014.08.10-12 名古屋)
コンドロイチン硫酸はマウスES細胞の
分化に必須である

〔図書〕(計3件)

1 Tomatsu, S., Shimada, T., Patel, P., Mason, R. W., Mikami, T., Kitagawa, H., Montano, A. M., and Orii, T. (2015) Chondroitin and karatan sulfate. Sulfated Polysaccharides (Gama, M., Nader, H., and de Oliveira Rocha, H., eds), pp. 17-71, Nova Science Publishers. □

2 灘中 里美, 北川 裕之

「糖鎖の新機能開発・応用ハンドブック 創薬・医療から食品開発まで」(NTS 双文社印刷) pp.36-40(2015) 第1章生体内の糖鎖
第3節 プロテオグリカン コンドロイチン硫酸

3 Kitagawa, H., Nadanaka, S. et al. (2014)

Handbook of Glycosyltransferases and Related Genes, 2nd Ed (Taniguchi, N., Honke, K., Fukuda, M., Narimatsu, H., Yamaguchi, Y., and Angata, T., eds) Springer.

〔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

北川 裕之 (KITAGAWA, Hiroshi)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40221915

(2)連携研究者

佐藤 伴 (SATO, Ban)

筑波大学・生命環境系生物科学分野・特任
助教

研究者番号：90443126