



Title	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 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	宝満, 健太郎
Description	配架番号 : 2405
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13026号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70554
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kentarou_Houman_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 宝満 健太郎

学 位 論 文 題 名

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
(Glycomic approach in regulation of cartilage degeneration for elucidation of osteoarthritis pathogenesis mechanism)

【背景と目的】

軟骨の変性を主座とする変形性関節症（OA）は正確な発症メカニズムが未だ解明されておらず、それ故に根治的な治療法も存在しない。軟骨は自己再生能に乏しく再生しないため、軟骨破壊が始まる以前の早期 OA を定義し介入できるようにすることが重要な課題とされている。OA の軟骨細胞は基質分解酵素を能動的に産生しアポトーシスへ向かうといった肥大変化する成長軟骨細胞の分化経路と類似している。そのため軟骨細胞による自己溶解性表現型の獲得を伴った周囲の軟骨破壊が OA の病理メカニズムとして有力であり、そのプログラムを解明し OA の特徴を理解することが期待されている。

我々はマウス OA モデルにおいて軟骨基質の変性に先行して N 型糖鎖に変化が起きていることを見出し、マウスおよびヒト軟骨において N 型糖鎖のうち高マンノース（HM）型糖鎖が減少していることを明らかにした。そこで我々は、軟骨組織の HM 型糖鎖を酵素処理すると軟骨変性を惹起するという仮説を検証した。またその過程で、HM 型糖鎖を酵素処理した軟骨細胞が肥大化マーカーを発現している点に着目し、軟骨細胞の肥大誘導モデルを作製して総合グライコミクスの解析にてその類似性を検証した。本研究の目的は、糖鎖代謝の変化が軟骨変性の開始にどのように関与するか調査することである。

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

【対象と方法】日本白色家兎の膝関節に HM 型糖鎖の分解酵素である α -Man を関節注射し、術後 4、16 週に肉眼的・組織学的評価を行なった。OARSI(国際変形性関節症学会)スコアにより変性の程度を算定した。

【結果】術後 4 週時にサフラニン O 染色性低下を認め、コラーゲン染色に差はなかった。術後 16 週時にはサフラニン O 染色性がコントロールと同程度に回復した。 α -Man 下（術後 4w）において組織学的スコアは早期 OA を示すともに、軟骨細胞柱状配列は乱れ、形状は円形に肥大化を認めた。

実験②：軟骨片培養における α -Man 刺激による軟骨変性モデル (*ex vivo*)

【対象と方法】4 週齢のマウス大腿骨頭軟骨を採取し、 α -Man を添加して器官培養を行った。プロテオグリカン（PG）漏出量や一酸化窒素（NO）産生量、組織学的評価、糖鎖解析を行った。軟骨細胞の影響を除くために、凍結融解処理を施した軟骨で PG 漏出量を再び計測した。さらに刺激した軟骨組織において、glycoblotting 法を用いて網羅的かつ定量的な糖鎖構造のモニタリングを行った。単離した軟骨細胞を α -Man で

刺激して qPCR で解析した。

【結果】軟骨の変性は可逆的であり、酵素暴露中は PG および NO が経時的に増加した。Con A は高マンノース型 N 型糖鎖と特異的に結合するレクチンで、マンノシダーゼに暴露した軟骨細胞は細胞質、細胞膜ともにその染色性は失われ、その後染色性は戻らなかった。HM5 の増加と HM9 の減少という N 型糖鎖プロファイルに加え、フコシル化 N 型糖鎖の発現上昇を認めた。凍結融解処理した軟骨片は、マンノシダーゼ刺激に対してプロテオグリカンの漏出量に差を生じなかった。刺激後の軟骨細胞はフコシル化を担う糖転移酵素 (*Fut8*) と主要なアグリカナラーゼ (*ADAMTS5*) の経時的な発現上昇を認め、軟骨肥大化関連遺伝子 (*Ihh*, *Col10a1*) を一過性に発現した。

実験③：マウス軟骨細胞肥大化における複合糖質糖鎖の網羅的解析 (*in vitro*)

【対象と方法】生後 5 日齢のマウス膝関節から単離した軟骨細胞をインスリン誘導性に肥大分化させた。qPCR と X 型コラーゲン染色により分化過程を評価し、N 型糖鎖、O 型糖鎖、GAG、GSL、および fOS を含む総合グライコームを BEP 法、Glycoblotting 法、MALDI-TOF MS、HPLC を組み合わせて解析した。

【結果】軟骨細胞は誘導後 10 日以降に肥大形態変化を遂げ、X 型コラーゲン染色が経時的に増強した。HM5 の増加と HM9 の減少の N 型糖鎖プロファイルに加え、フコシル化 N 型糖鎖の発現上昇を認めた。肥大分化後に N 型糖鎖のプロファイルは HM 型主体からコンプレックス/ハイブリッド型主体へシフトした。逆に、誘導前に豊富に含有していた fOS は誘導後に大きく減少した。O 型糖鎖は主にムチンで占められ、肥大過程における発現パターンは GAG と類似していた。Gg/(n)Lc シリーズは肥大に伴って有意に増加したが、これは GD1 類似体であると推定される多くの構造異性体を有する Gg シリーズのグリカンの増加によるものであった。一方、Gg シリーズは、肥大分化の 10 日目に減少していた。Gg シリーズの主成分である GD1 類似体の前駆体である GM3 の量は減少していた。

【考察】

関節軟骨において HM 型糖鎖のプロファイル変化は軟骨変性を引き起こし、PG の漏出、アポトーシス、変性の可逆性という早期 OA の特徴を有していた。基質の変性は回復しても、変化した HM 型糖鎖のプロファイルは元に戻らず、代わりにフコシル化 N 型糖鎖と軟骨肥大化マーカーの上昇を認めた。軟骨細胞肥大化における総合グライコーム解析により、軟骨変性を誘起した HM 型糖鎖のプロファイルおよびフコシル化 N 型糖鎖の増加は一致していた。2 つの N-アセチルグルコサミン残基を添加した分枝を有する C/H 型 N 型糖鎖が減少し、生合成経路の下流に位置する C/H 型糖鎖（フコースまたはシアル酸付加）が増加していたことは、膜への分泌および輸送が軟骨細胞の肥大とともに活性化されることが示唆される。N 型糖鎖の分解が阻害されタンパク質分泌および膜輸送が促進されると軟骨細胞の表現型は肥大様となり軟骨変性が開始されるという新たなメカニズムが提唱された。O 型糖鎖（ムチン）と GAG の発現は連動して相互に抑制的であるため、一過性の発現上昇と CS 鎖の伸張に偏り ECM を疎にすることが示唆された。肥大中の GM3 生合成経路はインスリンシグナル伝達を促進し、IGF-1 の発現の増加に寄与したと推定される。

【結論】

グリカン代謝の変化が軟骨細胞肥大化を介して軟骨変性の開始に密接に関連していることを示した。これらの変化の重要性はまだ解明されていないが、診断バイオマーカー、治療標的、および分化マーカーの同定に役立つ可能性がある。