HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（医　学）　　氏名　　宝　満　健　太　郎

	主査	教授	岩　永　敏　彦
審査担当者	副査	教授	畠　山　鎮　次
	副査	教授	廣　瀬　哲　郎
	副査	教授	大　場　雄　介

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)

変形性関節症（OA）は高い有病率を有する進行性疾患であり、その発症メカニズムは不明である。関節軟骨において唯一の細胞として存在する軟骨細胞は増殖および最終分化に抵抗するが、OA 軟骨では肥大分化することが有力な発症メカニズムの候補とされている。近年、グリコシル化（タンパク質への糖鎖付加）の欠陥と疾患との関連により、糖タンパク質に生物学的情報が含まれることが示されている。軟骨変性に関しても基質破壊に先行して N 型糖鎖、中でも高マンノース型（High-mannose: HM）糖鎖が変化することが報告されてきた。本研究では、軟骨細胞・組織に糖鎖生物学的負荷を与えることで、軟骨組織の変性を惹起することが可能かどうかを検証した。

まず、*in vivo* ウサギ膝マンノシダーゼ関節注射モデルを用いて、HM 糖鎖の酵素分解処理が関節軟骨へ与える影響を解析した。組織学的評価により、酵素影響下の軟骨組織においてサフラニン-O 染色の染色性低下と TUNEL 陽性細胞の増加、軟骨細胞肥大および柱状配列不整を認めた。また、酵素除去により染色性および細胞の形態変化が回復した。滑膜や炎症反応の関与を考慮した *ex vivo* マウス軟骨器官培養モデルでも同様の結果を得た。軟骨組織への凍結融解処理により、軟骨からのプロテオグリカン漏出とその回復が阻害された。単離した軟骨細胞への直接的な HM 糖鎖の酵素分解処理による遺伝子発現は軟骨マーカー（*Col2a1*, *Aggrecan*）の低下および変性マーカー（*Adamts5*）の上昇とともに肥大分化マーカー（*Col10a1*, *Ihh*）を一過性に発現した。酵素処理下において N 型糖鎖プロファイルは HM9 の減少と HM5 の上昇を示し、同時にコアフコシル化糖鎖の増加を示した。以上の結果から、HM 糖鎖変化は変性を惹起し、コアフコースの増加とともに軟骨細胞肥大化との関連が示唆された。

次に、軟骨細胞肥大誘導モデルを用いて肥大過程における細胞グライコームを解析し、前述の HM 糖鎖変化との類似性および他の糖鎖クラスとの発現比較を行った。クラスター解析において、N 型糖鎖が単一のクレードに分類され肥大過程における増加パターンを示した。HM 糖鎖変化とコアフコシル化糖鎖の増加および遊離オリゴ糖の急激な減少を認め

た。これらは肥大化により N 型糖鎖の生合成経路が分解系から分泌系へ転換されることを示唆した。以上の結果から、HM 型糖鎖プロファイル変化は軟骨細胞肥大化と関連して軟骨変性を惹起することが明らかとなり、軟骨細胞のコアフコシル化が軟骨組織の変性制御の一端を担う可能性が示唆された。

審査に当たり副査の畠山教授から、マクロファージの侵入や関節液の糖鎖組成について質問があった。申請者は、本研究では詳細なマクロファージの侵入や関節液糖鎖組成の評価は行っていないが、関節内へのマンノシダーゼ投与の実験系に加えて軟骨組織の器官培養系および凍結融解処理の使用により本結果における液性因子の関与を間接的に否定していると回答した。次いで副査の廣瀬教授より、N 型糖鎖の分解系を標的とする医療の実現可能性について質問があった。申請者は、分解酵素による治験は現行で存在しないが、細胞表面の糖鎖をレクチンにより標的にするアプローチが行われており、既存の抗体－薬剤融合体よりも数千倍の薬効を示す事例を挙げて回答した。副査の大場教授から、軟骨細胞肥大モデルにおいてインスリン様成長因子（IGF-1）の遺伝子発現が上昇していた点に言及し、IGF-1 の軟骨への投与が軟骨変性を引き起こす可能性について質問があった。申請者は、軟骨細胞の IGF-1 受容体がどのような糖鎖修飾を受けているかは不明であるが、糖鎖構造変化により結合能が変化していれば軟骨変性を引き起こす可能性はあると回答した。主査の岩永教授から、軟骨下骨付近のタイドマーク領域で軟骨細胞の肥大化が起こるかについて質問があった。申請者は 19 週齢の日本白色家兎を用いており、性成熟は迎えているが体重増加曲線がプラトーに達していないため 16 週間の長期観察では骨成長があり、成長帯域では肥大軟骨細胞を認めると回答した。その他のそれぞれの質問に対しても、自己の実験データや文献的考察に基づいて，概ね適切に返答した。

この論文は、糖鎖変化による軟骨変性の発症に軟骨細胞の肥大化が深く関与していることを示し，また HM 糖鎖の変化には N 型糖鎖のフコシル化が併発することを示した。これらのメカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、本結果は変形性関節症における早期バイオマーカーあるいは新規治療ターゲットとして、今後有用な候補となりうると期待される。

審査員一同はこれらの成果を評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受ける資格を有すると判定した。