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［全文の要約］
Author(s)	宝満, 健太郎
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2405 他
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/2115/70555
Type	doctoral thesis
File Information	Kentarou_Houman_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文（要約）

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

宝 満 健 太 郎
Kentaro Homan

学 位 論 文（要約）

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)

2018 年 3 月

北 海 道 大 学

宝 満 健 太 郎
Kentaro Homan

軟骨は、滑膜性関節の重要な構成要素であり、唯一の細胞として存在する軟骨細胞は、高密度かつ高度に組織化された細胞外マトリックス（ECM）に埋め込まれている。軟骨 ECM は、軟骨細胞によって合成され、ヒアルロン酸などのグリコサミノグリカン（GAG）、各種プロテオグリカン（コラーゲンネットワークに結合した GAG 含有タンパク質）とともに、主にⅡ型コラーゲンを含むコラーゲンネットワークから構成される。ECM は関節軟骨の滑動性および衝撃吸収特性のために構造上の土台を築くのみならず、埋め込まれた軟骨細胞との直接的な相互作用ならびに可溶性メディエータを保持するという役割によって軟骨細胞の表現型安定性の維持や代謝活性に寄与している。軟骨細胞の分化は、間葉系細胞の凝集からマスター転写因子 Sox9 の発現を開始点とし、Ⅱ型コラーゲンやアグリカンを発現する増殖軟骨細胞、さらに X 型コラーゲンを発現する肥大軟骨細胞へと成熟して周囲の基質を石灰化し、最終的に基質分解酵素（MMP13 や ADAMTS5）を発現して終末分化を遂げることが知られている[1,2]。

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。OA の軟骨細胞は異常な表現型を示す[3–7]。基質分解酵素を能動的に産生しアポトーシスへ向かうなど、肥大変化を発現する成長軟骨細胞の分化経路と類似点が多く見られることから、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病理メカニズムとして受け入れられている[8–11]。つまり、関節軟骨細胞の表現型安定性の喪失および胚性軟骨内骨化の側面に似たプログラムの開始を紐解くことが OA の重要な特徴を理解することに繋がると期待されている。OA メカニズムの解明が待たれる最大の要因は軟骨の自己再生能の低さにあり、1743 年に Hunter は“ヒポクラテスから現代まで、潰瘍化した軟骨ほど厄介なものはなく、(軟骨は)一度破壊されると修復されることがない”と謳っている[12]。近年では、軟骨破壊が始まる以前の早期 OA を定義し、そこへ介入できるようにすることが極めて重要な国民的課題となっている。

マウス OA モデルにおいて軟骨基質の変性に先行して N 型糖鎖の変化が起こる（Fig. 1）[13]。さらに、この変化はマウスのみならずヒト軟骨でも生じており、N 型糖鎖のサブクラスのうち高マンノース型糖鎖が減少していることを明らかにされてきた[14]。糖鎖とは炭水化物や糖が連なることによって機能性や物性を発揮するタンパク質の翻訳後修飾の最も一般的な形態である。タンパク質や脂質への糖鎖付加は糖転移酵素により行われる。糖鎖は極めて多様性に富むと同時に、個体の種、組織および細胞に発現するパターンは非常に限局的、特異的である[15]。タンパク質の糖鎖修飾はアスパラギンに結合する N 結合型糖鎖、セリンまたはスレオニンに結合する O 結合型糖鎖の 2 種類がある。N 型糖鎖は他のクラスの糖鎖と比べて特殊な生合成経路を持ち、小胞体において合成される 14 糖（ドリコールリン酸結合型糖鎖）を前駆体としてα-グルコシダーゼ、α-マンノシダーゼ等の作用によって Man8GlcnAc2 にトリミングされゴルジ体へ送られる。この過程はタンパク質の品質管理を担うタグとしても機能している。N 型糖鎖はアスパラギン残基に近い還元末端側の 5 糖を共通構造に持ち、非還元末端側が全てマンノースで構成されるものを高マンノース型、非還元末端側にシアル酸やガラクトース、N-アセチルグルコサミンを付与されたものがコンプレックス型、その中間的な構造をハイブリット型としてサブクラスに分類される。

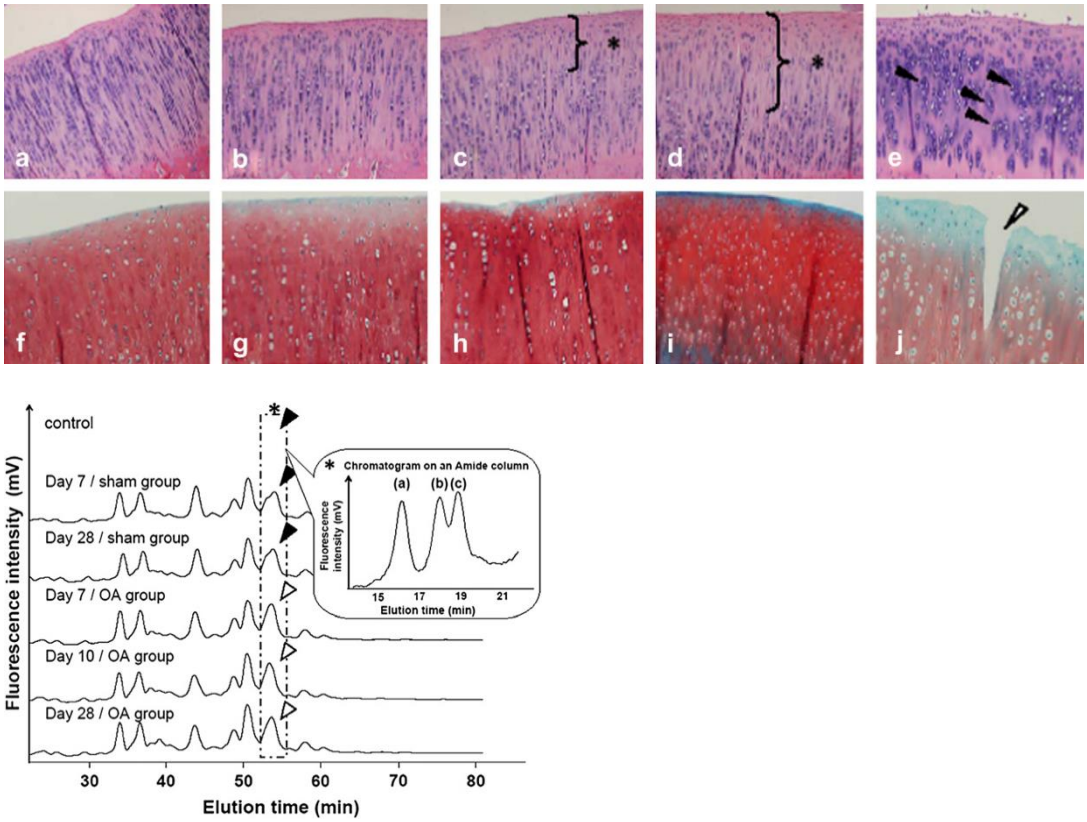

Figure 1　白色家兎の膝関節において前十字靭帯を切離した OA モデルの内側脛骨プラトーの組織学的変化とクロマトグラフィー

（上）ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色(a-e)、サフラニン O 染色(f-g)の切片が左から施術後 0、7、10、14、28 日目と時系列で示されている。10 日目(c, h)から軟骨表面の不規則性とプロテオグリカンの損失が認められ、（左）クロマトグラフによって蛍光標識された N 型糖鎖 (a)が 7 日目から減少していくことが明らかとなった。（Matsuhashi et al., 2008. Osteoarthritis Cartilage.より）

これまでの先行研究から、軟骨に存在する N 型糖鎖の中でも特に高マンノース型糖鎖が軟骨変性に深く関与しており、高マンノース型糖鎖が軟骨変性の初期において重要な役割を担う可能性が示唆される。そこで、正常な軟骨組織の高マンノース型糖鎖を減少させることにより軟骨変性が惹起されるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、まず野生型マウスの膝関節軟骨の器官培養において高マンノース型糖鎖を加水分解する酵素であるα-マンノシダーゼを添加することを試みた。

高マンノース型糖鎖が減少した軟骨に早期 OA を模した表現型を見出すとともに軟骨細胞の肥大化との関連を示す知見を得たため、次に、軟骨細胞の肥大誘導モデルを用いて肥大分化過程における総合グライコミクスの解析を行った。先行研究として、マウスの軟骨前駆細胞を軟骨細胞へ分化させる際に未分化状態から切り替わる段階において高マンノース型 N 型糖鎖の発現が上昇することは報告している（Fig. 2）[16]。し

かし、軟骨細胞の肥大分化と糖鎖構造変化に関する生物学的関連は知られていない。また、細胞は様々なクラスのサブグライコームによって構成され相互に密接に連動するにも関わらず、技術的な困難さのためこれまで N 型糖鎖、遊離オリゴ糖鎖（fOS）、グリコサミノグリカン（GAG）、糖脂質（GSL）、O 型糖鎖すべての発現プロファイルを提示することはできなかった。

本研究において、軟骨細胞の肥大化が軟骨変性初期において重要な役割を果たしていることが明らかになり、糖鎖代謝の変化が軟骨細胞肥大と密接に関連していることを示したのでここに報告する。

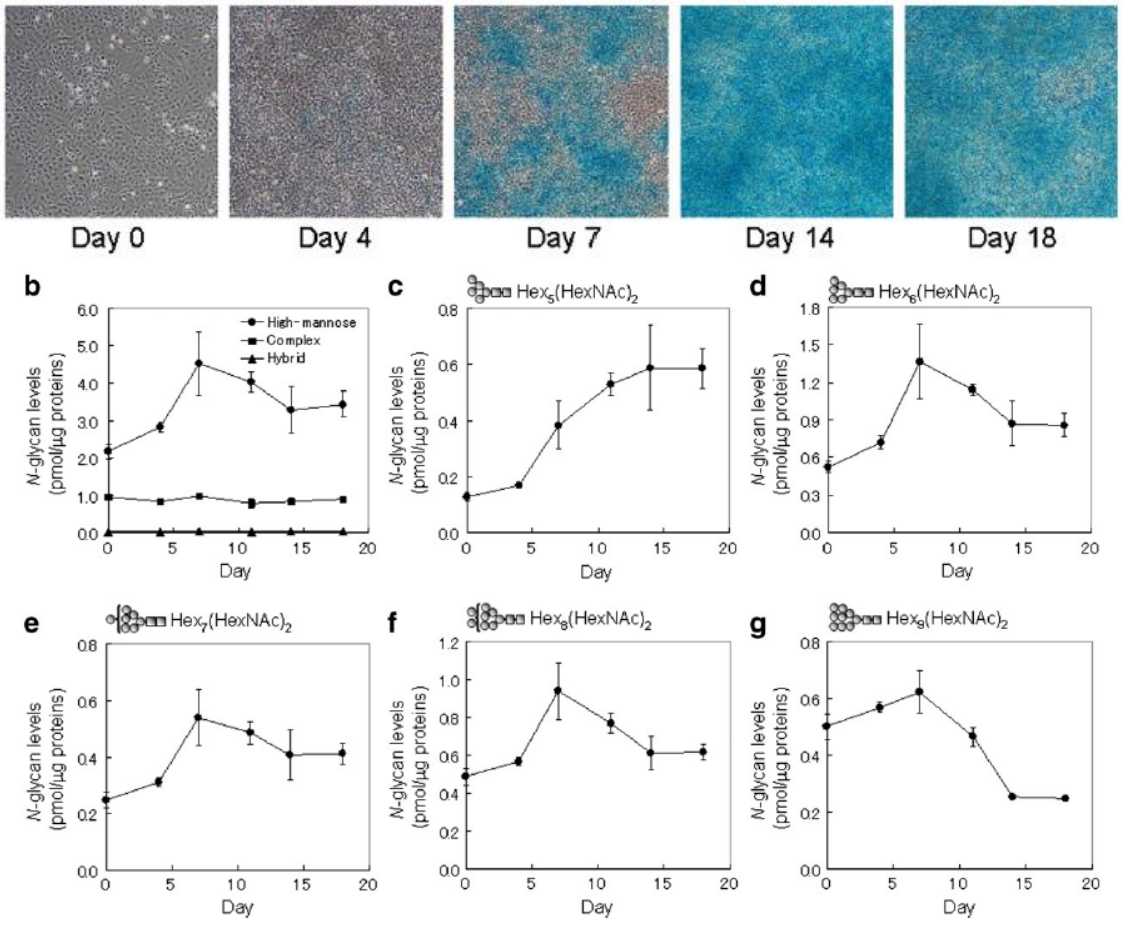

Figure 2　軟骨前駆細胞の分化誘導後の細胞染色像と N 型糖鎖プロファイリング

（上）分化刺激後 0、7、10、14、28 日目の細胞の基質産生能をアルシアンブルー染色により示す。7 日目から 14 日目の間で染色が強まる。（下）高マンノース型、コンプレックス型およびハイブリッド型の N 型糖鎖のサブタイプの相対発現レベルを示す。高マンノース型 N 型糖鎖は主要成分であり、発現レベルは軟骨分化を通じて増加する。（Ishihara et al., 2014. Biochim. Biophys. Acta.より）

正常な軟骨 ECM の構造を再生する関節軟骨細胞の能力は限られており損傷は不可逆的であるとされているが、変性初期に正常な恒常性を維持する可能性がある場合、早期診断のための方法の同定が重要となる。これまで軟骨変性に先行した糖鎖変化を報告してきたが、本研究ではこの糖鎖破壊の段階であれば軟骨の変性は可逆的であることをつきとめた。また、これら超早期のフェーズにおける軟骨細胞の HM 型糖鎖変化は肥大分化との関連を強く示唆した。

これまで関節内注射による生化学的 OA モデルでは collagen-induced arthritis (CIA)[17] やパパインなどのタンパク質分解酵素 [18-20]、コラゲナーゼ [21,22]、モノヨード酢酸 [23-27] など関節炎を引き起こし後期 OA が想定される病態を再現してきた。OA 関節軟骨破壊においては、ヒアルロン酸–アグリカンネットワークが分解され、次いで、コラーゲン線維分解へと進行する。これら ECM の分解には MMP と ADAMTS 遺伝子ファミリー分子が重要な役割を果たしている。関節軟骨破壊初期のアグリカン分解にはアグリカナーゼと呼ばれる ADAMTS4 や ADAMTS5 分子が主役を演じており、一方、コラーゲン分解にはコラーゲン分解性 MMP（MMP-1, 8, 13, 14）が中心的な役割を果たしている。HM 型糖鎖を特異的に分解するα-マンノシダーゼを関節内へ投与すると、軟骨組織からプロテオグリカンが失われつつもコラーゲン構造は保たれた。また。巨視的には軟骨表面に異常は見られないにも関わらず、軟骨細胞の形態および配列には肥大化様の著明な変化を認めた。加えて、軟骨基質の変性は可逆性を有していた。これらは早期 OA としての要件 [28-31] を満たすものだった。これらの性質は軟骨の器官培養系でも保持され、凍結融解処理や他の糖鎖分解酵素ではこの表現型を再現できないことから、軟骨細胞における HM 型糖鎖に起因していることがわかった。基質変性からの回復時に HM 型糖鎖が再生しないことが Con A 染色および N 型糖鎖の網羅的解析より明らかとされ、他の糖鎖によって補償される可能性に目を向けた。

マウス初代軟骨細胞へのマンノシダーゼ刺激は興味深い結果をもたらした。軟骨組織片の糖鎖構造解析は、マンノシダーゼによって HM 型糖鎖の側鎖からマンノースが切り出され、マンノース数の少ない HM5 の増加とマンノース数の多い HM9 の減少を招く一方で N 型糖鎖の根本の GlcNAc にフコースが転移されたコアフコースと呼ばれる糖鎖構造の発現が上昇していることを示していた。マンノシダーゼ刺激された軟骨細胞の遺伝子発現は *ADAMTS5* と *Fut8* の発現上昇を認め、器官培養系におけるプロテオグリカンの漏出の責任分子が HM 型糖鎖であり、コアフコシル化もまた HM 型糖鎖変化に対する反応であることを裏付けた。更に、*in vitro* の実験において示唆された軟骨細胞の肥大化様変化を、*Ihh* や *Col10a1* の発現が支持していた。

軟骨細胞肥大分化モデルにおける主要な糖鎖クラス全てを細胞グライコームとして分析することによって、軟骨変性とHM型糖鎖の関わりを他のクラスの糖鎖によって補償される可能性も踏まえて包括的に見ることにした。最近の研究では、総グライコームプロファイルは高度に細胞表現型特異的であることが報告されている[32,33]。クラスター分析は、肥大分化時に主だってN型糖鎖が滴定され、O型糖鎖およびGAGの変化が一時的であることを示した。以前に、マウスの軟骨前駆細胞においてHM型N型糖鎖の発現が分化の後期にアップレギュレートされることを報告しており[16]、HM5の量が軟骨細胞分化の間に5倍増加し、成熟軟骨細胞においてこの上昇したレベルにとどまった。本研究において、軟骨細胞が肥大分化を始めたときにHM5の量が増加することを明らかにした。HM型糖鎖に特異的に結合するレクチンであるConAに曝露された軟骨細胞が休止期から肥大期に移行するとした報告もある[34,35]。これらの知見は、N型糖鎖を有する細胞表面糖タンパク質が軟骨細胞分化に重要な役割を果たすことを示唆している。N型糖鎖プロセッシングの後期にみられるように、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）が増加するため、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された。*Man2a1*および*Mgat2*はオリゴマンノシドをコンプレックス型に変換する。OAおよびヒト軟骨細胞の糖表現型の報告によると、コア置換N型（Fut8および*Mgat3*遺伝子によるGnt-Ⅲ）を有する複合型N型糖鎖（*Mgat2*遺伝子によるGnt-Ⅱ）の合成を含んでいる[36]。軟骨細胞の肥大分化中の遺伝子発現も同様に、*Mgat2*および*Fut8*の発現を増加させた（Figure 22）。肥大化に伴ってN型糖鎖は増加したが、軟骨細胞におけるfOSの量は急激に減少した。 fOSはN型糖鎖の異化作用によって生成されるため、fOS対N型糖鎖の比率は、肥大性分化の20日目に57.8%から3.5%に有意に低下した。Bastowら[37]は、肥大性軟骨細胞においてリソソームエキソサイトーシスが増強されることを確認している。これらの知見に基づいて、休止軟骨細胞は、N型糖鎖の分解を促進することにより、タンパク質分泌および膜輸送を阻害し得ると考えている。

軟骨細胞、プロテオグリカンおよびムチンに由来するO型糖鎖によって産生される主要なECMは、樹形図上の単一のクレードに首尾よく分類された。関節軟骨におけるプロテオグリカンはアグリカンが主要なタイプである。アグリカンの重要な特徴は、それが大量のコンドロイチン硫酸（CS）を含み、アグリカン以外の分子はこの特徴を有さないことである。本研究では、CS、特にCS-4S（GAG-4）がGAGの総量の70%～80%を占めることを見出した。また、CSGalNAcT-1（CSN-アセチルガラクトサミン糖転移酵素-1）およびCSGalNAcT-2はそれぞれ1つの糖転移酵素ドメインを有し、開始および伸長の両方の間にGalNAc転移活性を示す。さらに、それらは、四糖鎖に第

1 の GalNAc 残基を付加する役割を果たすと考えられている[38-41]。qPCR 分析は、軟骨細胞肥大の間に *Csgalnact-2* 転写物が高度に発現されることを明らかにした。CSGalNAcT-1 はコンドロイチン硫酸合成の開始に関与するが、CSGalNAcT-2 は主に鎖の伸長に関与する[42]。コンドロイチン 4 スルホトランスフェラーゼ-1（*C4st-1*）の発現が減少したにもかかわらず、軟骨細胞の肥大分化は、CS 鎖の伸長による CS 合成を促進することが明らかになった。他方、GALNT の発現は、O 型糖鎖の合成にとって重要である。*Galnt3* は、休止期、増殖期、および肥大前の軟骨細胞において発現される。*Galnt3* は、GalNAc をセリン/スレオニン残基に付加し、キシロース残基へのキシロースのキシロース残基への付加と拮抗することを除けば、基本的に Tn を特徴とするムチン型 O 型糖鎖の合成を増加させる。キシロシル化は、四糖類結合領域の合成における第一段階であり、GAG の減少をもたらす[43]。コンドロイチン硫酸の量は減少するがコンドロイチン硫酸鎖の伸長は妨げられないということは、本結果と一致した。これらの GAG および O 型糖鎖の協調作用は、OA で報告されることが多い軟骨の質の低下のメカニズムに関与している可能性がある[44]。

インスリン誘導性の軟骨肥大化過程で細胞は IGF-1 を高発現した。IGF-1 は軟骨細胞肥大を増強する[45]。正常な関節軟骨では、IGF-1 受容体は、軟骨の中間層および深層に局在する軟骨細胞によって大部分が発現される[46]。IGF-1 はまた、軟骨細胞プロテオグリカンの合成を誘導することができる。軟骨細胞の肥大は、GM3 シンテターゼの mRNA レベルでの発現の増加とは対照的に、GM3（GSL-2）の相対量を有意に減少させた。さらに、GD1 類似体（GSL-22）の量が増加し、GM3 からの生合成経路の下流のガングリオシド分子種を同定することができた。脂肪細胞における GM3 の増加が、インスリンシグナル伝達を阻害する静電相互作用によるマイクロドメイン内の細胞膜カベオラからのインスリンレセプターの解離を引き起こすことという報告がある[47–49]。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。これらの結果は、GSL が胚発生およびいくつかの組織の分化に必須であり、これらのプロセスを媒介する重要な細胞相互作用に関与しているという概念を支持している[48,50]。これまでに、GSL が OA のマウスモデルにおいて抑制的役割を果たすこと、および軟骨変性は下流分子種の増加を伴うことが報告されている[51–54]。

軟骨細胞肥大化における複合糖質構造を包括的に分析することにより、統合された情報が得られた。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化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。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。OA の軟骨細胞反応における早期プロテオグリカン喪失を説明し、OA における軟骨リモデリングおよび軟骨細胞分化の自己永続的サイクルを示唆した。この研究の限界には、ケラタン硫酸塩（この技術はまだ確立されていない）およびセレブロシド（特定の EGCase 酵素が使用された）を分析することができないことが挙げられる。

本研究の結果は、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、N 型糖鎖の分解系を調整することは関節軟骨修復を促進する新しい治療戦略となりうるものと期待される。

引 用 文 献

1. Dreier, R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res. Ther.* **12,** 216 (2010).
2. Sandell, L. J. & Aigner, T. Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Res.* **3,** 107–113 (2001).
3. Song, R.-H. *et al.* Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5. *Arthritis Rheum.* **56,** 575–585 (2007).
4. Moldovan, F., Pelletier, J. P., Hambor, J., Cloutier, J. M. & Martel-Pelletier, J. Collagenase-3 (matrix metalloprotease 13) is preferentially localized in the deep layer of human arthritic cartilage in situ: in vitro mimicking effect by transforming growth factor beta. *Arthritis Rheum.* **40,** 1653–1661 (1997).
5. Shlopov, B. V., Gumanovskaya, M. L. & Hasty, K. A. Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* **43,** 195–205 (2000).
6. Wang, X. *et al.* Regulation of MMP-13 expression by RUNX2 and FGF2 in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **12,** 963–973 (2004).
7. Plaas, A. *et al.* Aggrecanolysis in human osteoarthritis: confocal localization and biochemical characterization of ADAMTS5-hyaluronan complexes in articular cartilages. *Osteoarthritis Cartilage* **15,** 719–734 (2007).
8. van der Kraan, P. M. & van den Berg, W. B. Chondrocyte hypertrophy and osteoarthritis: role in initiation and progression of cartilage degeneration? *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **20,** 223–232 (2012).
9. Pap, T. & Korb-Pap, A. Cartilage damage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis–two unequal siblings. *Nat. Rev. Rheumatol.* **11,** 606–615 (2015).
10. Buckland, J. Osteoarthritis: Control of human cartilage hypertrophic differentiation. *Nat. Rev. Rheumatol.* **8,** 368 (2012).
11. Martel-Pelletier, J. *et al.* Osteoarthritis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2,** 16072 (2016).
12. Hunter, W. Of the structure and disease of articulating cartilages. 1743. *Clin. Orthop.* 3–6 (1995).
13. Matsuhashi, T. *et al.* Alteration of N-glycans related to articular cartilage deterioration after anterior cruciate ligament transection in rabbits. *Osteoarthritis Cartilage* **16,** 772–778 (2008).
14. Urita, A. *et al.* Alterations of high-mannose type N-glycosylation in human and mouse osteoarthritis cartilage. *Arthritis Rheum.* **63,** 3428–3438 (2011).
15. *Essentials of Glycobiology*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009).
16. Ishihara, T. *et al.* Discovery of novel differentiation markers in the early stage of chondrogenesis by glycoform-focused reverse proteomics and genomics. *Biochim. Biophys. Acta* **1840,**

645–655 (2014).
17. Ishikawa, T. *et al*. Cartilage destruction in collagen induced arthritis assessed with a new biochemical marker for collagen type II C-telopeptide fragments. *J. Rheumatol.* **31,** 1174–1179 (2004).
18. Inoue, S. & Glimcher, M. J. The reaction of cartilage and osteophyte formation after the intraarticular injection of papain. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* **56,** 415–430 (1982).
19. Siebelt, M. *et al.* Increased physical activity severely induces osteoarthritic changes in knee joints with papain induced sulphate-glycosaminoglycan depleted cartilage. *Arthritis Res. Ther.* **16,** R32 (2014).
20. Farkas, T., Bihari-Varga, M. & Biró, T. Thermoanalytical and histological study of intra-articular papain-induced degradation and repair of rabbit cartilage. II. Mature animals. *Ann. Rheum. Dis.* **35,** 23–26 (1976).
21. Kikuchi, T., Sakuta, T. & Yamaguchi, T. Intra-articular injection of collagenase induces experimental osteoarthritis in mature rabbits. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **6,** 177–186 (1998).
22. van der Kraan, P. M., Vitters, E. L., van Beuningen, H. M., van de Putte, L. B. & van den Berg, W. B. Degenerative knee joint lesions in mice after a single intra-articular collagenase injection. A new model of osteoarthritis. *J. Exp. Pathol. Oxf. Engl.* **71,** 19–31 (1990).
23. Kobayashi, K. *et al.* Sodium iodoacetate-induced experimental osteoarthritis and associated pain model in rats. *J. Vet. Med. Sci. Jpn. Soc. Vet. Sci.* **65,** 1195–1199 (2003).
24. Bove, S. E. *et al.* Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **11,** 821–830 (2003).
25. Zhang, R.-X., Ren, K. & Dubner, R. Osteoarthritis pain mechanisms: basic studies in animal models. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **21,** 1308–1315 (2013).
26. Udo, M. *et al.* Monoiodoacetic acid induces arthritis and synovitis in rats in a dose- and time-dependent manner: proposed model-specific scoring systems. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* (2016). doi:10.1016/j.joca.2016.02.005
27. Guingamp, C. *et al.* Mono-iodoacetate-induced experimental osteoarthritis: a dose-response study of loss of mobility, morphology, and biochemistry. *Arthritis Rheum.* **40,** 1670–1679 (1997).
28. Lorenz, H. & Richter, W. Osteoarthritis: cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog. Histochem. Cytochem.* **40,** 135–163 (2006).
29. Goldring, M. B. Update on the biology of the chondrocyte and new approaches to treating cartilage diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **20,** 1003–1025 (2006).
30. Aigner, T., Zien, A., Gehrsitz, A., Gebhard, P. M. & McKenna, L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array

technology. *Arthritis Rheum.* **44,** 2777–2789 (2001).

31. Aigner, T. *et al.* Suppression of cartilage matrix gene expression in upper zone chondrocytes of osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* **40,** 562–569 (1997).

32. Fujitani, N. *et al.* Total cellular glycomics allows characterizing cells and streamlining the discovery process for cellular biomarkers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 2105–2110 (2013).

33. Yoshida, Y. *et al.* Quantitative analysis of total serum glycome in human and mouse. *Proteomics* **16,** 2747–2758 (2016).

34. Yan, W. Q., Nakashima, K., Iwamoto, M. & Kato, Y. Stimulation by concanavalin A of cartilage-matrix proteoglycan synthesis in chondrocyte cultures. *J. Biol. Chem.* **265,** 10125–10131 (1990).

35. Yan, W. *et al.* Effects of concanavalin A on chondrocyte hypertrophy and matrix calcification. *J. Biol. Chem.* **272,** 7833–7840 (1997).

36. Toegel, S. *et al.* Glycophenotyping of osteoarthritic cartilage and chondrocytes by RT-qPCR, mass spectrometry, histochemistry with plant/human lectins and lectin localization with a glycoprotein. *Arthritis Res. Ther.* **15,** R147 (2013).

37. Bastow, E. R. *et al.* Evidence for lysosomal exocytosis and release of aggrecan-degrading hydrolases from hypertrophic chondrocytes, in vitro and in vivo. *Biol. Open* **1,** 318–328 (2012).

38. Sato, T. *et al.* Molecular cloning and characterization of a novel human beta 1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase, beta 4GalNAc-T3, responsible for the synthesis of N,N'-diacetyllactosediamine, galNAc beta 1-4GlcNAc. *J. Biol. Chem.* **278,** 47534–47544 (2003).

39. Gotoh, M. *et al.* Enzymatic synthesis of chondroitin with a novel chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase that transfers N-acetylgalactosamine to glucuronic acid in initiation and elongation of chondroitin sulfate synthesis. *J. Biol. Chem.* **277,** 38189–38196 (2002).

40. Uyama, T. *et al.* Molecular cloning and expression of a second chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase involved in the initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate. *J. Biol. Chem.* **278,** 3072–3078 (2003).

41. Uyama, T., Kitagawa, H., Tamura Ji, J. & Sugahara, K. Molecular cloning and expression of human chondroitin N-acetylgalactosaminyltransferase: the key enzyme for chain initiation and elongation of chondroitin/dermatan sulfate on the protein linkage region tetrasaccharide shared by heparin/heparan sulfate. *J. Biol. Chem.* **277,** 8841–8846 (2002).

42. Sato, T. *et al.* Differential roles of two N-acetylgalactosaminyltransferases, CSGalNAcT-1, and a novel enzyme, CSGalNAcT-2. Initiation and elongation in synthesis of chondroitin sulfate. *J. Biol. Chem.* **278,** 3063–3071 (2003).

43. Yoshida, C. A. *et al.* Overexpression of Galnt3 in chondrocytes resulted in dwarfism due to the increase of mucin-type O-glycans and reduction of glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **289,** 26584–

26596 (2014).
44. Ishimaru, D., Sugiura, N., Akiyama, H., Watanabe, H. & Matsumoto, K. Alterations in the chondroitin sulfate chain in human osteoarthritic cartilage of the knee. *Osteoarthritis Cartilage* **22,** 250–258 (2014).
45. Mushtaq, T., Bijman, P., Ahmed, S. F. & Farquharson, C. Insulin-like growth factor-I augments chondrocyte hypertrophy and reverses glucocorticoid-mediated growth retardation in fetal mice metatarsal cultures. *Endocrinology* **145,** 2478–2486 (2004).
46. Verschure, P. J., van Marle, J., Joosten, L. A. & van den Berg, W. B. Chondrocyte IGF-1 receptor expression and responsiveness to IGF-1 stimulation in mouse articular cartilage during various phases of experimentally induced arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **54,** 645–653 (1995).
47. Tagami, S. *et al.* Ganglioside GM3 participates in the pathological conditions of insulin resistance. *J. Biol. Chem.* **277,** 3085–3092 (2002).
48. Go, S. *et al.* Altered expression of ganglioside GM3 molecular species and a potential regulatory role during myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* (2017). doi:10.1074/jbc.M116.771253
49. Kabayama, K. *et al.* Dissociation of the insulin receptor and caveolin-1 complex by ganglioside GM3 in the state of insulin resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 13678–13683 (2007).
50. Yamashita, T. *et al.* A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96,** 9142–9147 (1999).
51. Matsuoka, M. *et al.* Depletion of Gangliosides Enhances Articular Cartilage Repair in Mice. *Sci. Rep.* **7,** 43729 (2017).
52. Tsukuda, Y. *et al.* Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis. *PloS One* **7,** e40136 (2012).
53. Sasazawa, F. *et al.* Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* **22,** 313–322 (2014).
54. Seito, N. *et al.* Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice. *Arthritis Rheum.* **64,** 2579–2588 (2012).