

学位論文題名

Alterations of High-mannose Type N-Glycosylation in Human and Mouse Osteoarthritis Cartilage

(変形性関節症におけるヒト軟骨とマウス軟骨での高マンノース型糖鎖の変化に関する研究)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】変形性関節症(osteoarthritis; OA)は、最も発生頻度の高い関節疾患であり、関節軟骨の退行変性を基盤として軟骨下骨の骨硬化、骨棘などが生じて疼痛を引き起こす疾患である。OA 発症に関与する要因としては、年齢、または関節の不安定性や肥満から来る過度の力学的ストレスなどが挙げられる。また、近年では分子生物学的メカニズムの関与も多数報告されているが、その明確なメカニズムについては未だ特定できておらず、OA 進行を抑制する有効な治療法も確立されていない。

遺伝情報は RNA に転写された後に、蛋白質という形で存在するが、その機能は蛋白質だけでは表現できず、翻訳後修飾によってはじめて機能を持つ場合が少なくない。その翻訳後修飾において最も多いのが糖鎖による修飾である。糖鎖とは単糖が結合してできた鎖状の分子であり、その糖鎖の形成に必要な酵素を糖転移酵素という。これまで、その糖鎖の異常が癌やリウマチ、アトピー性皮膚炎、腎不全などの発病に関係しているとの報告があり、そのほかにも慢性疾患や老化などの生命現象にまで糖鎖が深く関わっていると言われており、糖鎖の機能を解明する上で、糖鎖構造の解析は非常に重要である。糖鎖は蛋白質との結合様式によって N 型糖鎖、O 型糖鎖の 2 種類あり、今回我々が着目した N 型糖鎖はアスパラギン残基に結合する糖蛋白質糖鎖であり、さらにその構造により高マンノース型、混合型、複合型に分類される。

我々はこれまでにウサギ OA モデルにおいて OA 早期より N 型糖鎖の構造変化が生じることを報告したが、今回はヒト OA 軟骨でも同様に糖鎖構造変化が生じ、また、構造変化に伴い関連する糖転移酵素の発現変化も生じ、これらが軟骨変性に関与していると仮説をたてた。本研究の目的はヒト OA 軟骨およびマウス OA 軟骨における糖鎖構造変化を比較し、その糖鎖構造変化に関連する糖転移酵素と OA 関連遺伝子発現との関連について明らかにすることである。

【材料と方法】ヒト OA 軟骨には人工関節置換術患者の軟骨を採取し用いた。コントロールには大腿骨頸部骨折、腱板断裂手術時に変性変化のない軟骨を採取し用いた。これらの軟骨に酵素処理を行い、組織より糖鎖を精製した。その糖鎖を蛍光標識し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、質量分析を用いて OA 軟骨で変化のあった糖鎖構造を決定した。その中でも OA 軟骨において減少していた糖鎖に着目し、糖鎖と結合するレクチンを用いて染色を行った。

次に我々は野生型マウス (C57BL6、雌、8 週齢) を使用し右膝内側側副靭帯切除と内側半

月板部分切除を行って OA モデルを作成し(左膝には sham ope として関節包切開を行った)、術後 2, 4, 8 週でレクチン染色を行いヒト OA 軟骨において減少していた糖鎖の OA 進行に伴う変化を確認した。さらに、野生型マウス(C57BL6、雌、4 週齢)からマウス大腿骨頭軟骨を採取、組織培養を行い interleukin-1 α (IL-1 α) を添加することにより軟骨変性を誘導し、その糖鎖構造変化を HPLC、質量分析で解析した。また、その構造変化に関連する糖転移酵素および OA 関連酵素(MMP-13、ADAMTS-5)の経時的な遺伝子発現変化を IL-1 α 刺激後 12, 24, 48, 72 時間で real-time RT-PCR にて確認した。また、野生型マウス(C57BL6、生後 6 日)の軟骨組織(大腿骨頭、膝関節)から採取した軟骨細胞において IL-1 α 刺激後の糖転移酵素の発現変化を Western blot で確認し、さらに糖転移酵素をノックダウン/過剰発現させ、IL-1 α 刺激に対する MMP-13、ADAMTS-5 の発現変化を real-time RT-PCR で確認した。

【結果】ヒト OA 軟骨における N 型糖鎖構造解析では、高マンノース型糖鎖である M6.1、M5.1 がコントロールと比べて有意に減少していた。レクチン染色では高マンノース型糖鎖と結合する ConA を使用した。ConA 染色では軟骨細胞周囲、細胞質内に染色性が見られ、高マンノース型糖鎖は軟骨組織において軟骨細胞周囲、細胞質内に局在していることが示された。また、OA 軟骨ではその染色性は低下し構造解析の結果と一致していた。

マウス膝軟骨組織においてもヒト軟骨と同様にレクチン染色において軟骨細胞周囲および細胞質内に染色性が見られた。マウス膝関節軟骨は術後 4 週より変性変化が見られていたが、ConA 染色では変性変化の生じる前の術後 2 週より染色性が低下していた。マウス大腿骨頭軟骨の組織培養後の糖鎖構造解析ではヒト軟骨と同様に高マンノース型糖鎖である M5.1 が変性軟骨において減少していた。また、高マンノース型糖鎖 M5.1 を混合糖鎖である H5.11 に変換させる糖転移酵素である N-acetylglucosaminyltransferase-I (GnT-I) の遺伝子発現量は IL-1 α 刺激後 12 時間で最も発現量が上昇していた。一方、MMP-13、ADAMTS-5 は 24 時間で発現量が最も上昇していた。マウス軟骨細胞では、Western blot において IL-1 α 刺激にて GnT-I の蛋白レベルでの発現上昇が確認された。また、GnT-I をノックダウンさせることにより IL-1 α 刺激に対する MMP-13、ADAMTS-5 の発現上昇は抑制され、GnT-I 過剰発現により IL-1 α 刺激に対する発現量は増加した。

【考察】本研究により、ヒト OA に伴い変性軟骨において軟骨細胞での高マンノース型糖鎖の変化が示された。また、マウス OA 軟骨では OA の早期より高マンノース型糖鎖の構造変化がおこっており、また、高マンノース型糖鎖に関連した酵素である GnT-I の発現は MMP-13、ADAMTS-5 といった OA 関連酵素より早期に発現上昇がみられており、高マンノース型糖鎖は OA 早期の変化に関連しているのではないかと考えられた。また、高マンノース型糖鎖に関連した酵素である GnT-I の遺伝子発現を調節することにより MMP-13 および ADAMTS-5 の遺伝子発現量も変化することが示された。これは、高マンノース型糖鎖および GnT-I が OA 関連酵素の遺伝子発現を制御することにより軟骨変性を抑制する可能性を示唆するもので、今後 OA の治療戦略において重要な分子となりうる可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安 田 和 則

副 査 教 授 清 水 宏

副 査 教 授 三 浪 明 男

学位論文題名

Alterations of High-mannose Type N-Glycosylation in Human and Mouse Osteoarthritis Cartilage

(変形性関節症におけるヒト軟骨とマウス軟骨での高マンノース型糖鎖の変化に関する研究)

変形性関節症(osteoarthritis; OA)は、関節軟骨の退行変性を基盤とした骨関節疾患であり、近年では分子生物学的メカニズムの関与も多数研究されているが、その明確なメカニズムについては未だ特定できておらず、OA 進行を抑制する有効な治療法も確立されていない。一方、また、蛋白質の機能を修飾する働きを持つ糖鎖とは単糖が結合してできた鎖状の分子であり、その糖鎖の形成に必要な酵素を糖転移酵素という。これらが様々な疾患との関連の報告があるが、OA との関連についての報告はほとんどない。申請者らはこれまでウサギ OA モデルにおいて OA 早期より N 型糖鎖の構造変化が生じることを報告したが、今回はヒト OA 軟骨でも同様に糖鎖構造変化が生じ、また、構造変化に伴い関連する糖転移酵素の発現も変化し、これらが軟骨変性に関与しているとの仮説をたて、ヒト OA 軟骨およびマウス OA 軟骨における糖鎖構造変化およびその糖鎖構造変化に関連する糖転移酵素と OA 関連遺伝子発現との関連について解析した。糖鎖構造解析には高速液体クロマトグラフィー、質量分析を用いて行い、変化のあった糖鎖の局在をレクチン染色にて確認した。また、マウス OA は 8 週齢の野生型マウス膝関節の内側側副靭帯切離と半月板部分切除を行い誘発させ OA 進行に伴う N 型糖鎖の変化を組織学的に検討した。さらに 4 週齢のマウス大腿骨頭軟骨を採取、培養し IL-1 刺激にて軟骨変性を誘発させ N 型糖鎖構造解析、糖転移酵素の経時的発現量を解析した。また、マウス軟骨細胞を用い N 型糖鎖の構造変化に関連のある糖転移酵素を knockdown、過剰発現させることにより IL-1 刺激に対する MMP-13、ADAMTS-5 の発現変化を解析した。

その結果、ヒト OA 軟骨では高マンノース型糖鎖が減少しており、その局在は軟骨細胞表面、軟骨細胞質であった。マウス OA 軟骨では OA 早期より高マンノース型糖鎖が減少しており、高マンノース型糖鎖を代謝する酵素 GnT-I は IL-1 刺激により早期より遺伝子発現が上昇していた。軟骨細胞において GnT-I を knockdown させることにより IL-1 刺激に対する MMP-13、ADAMTS-5 の発現上昇は抑制された。また、GnT-I を過剰発現させると IL-1 刺激に対する MMP-13、ADAMTS-5 の発現量は増加した。本研究結果はヒト OA 軟骨において、高マンノース型糖鎖の減少を示し、マウス OA 軟骨では OA の早期より高マンノース型糖鎖の構造変化を示すことにより高マンノース型糖鎖は OA 早期の変化に関連していることが示唆された。またマウス軟骨細胞を用い、IL-1 刺激に対する糖転移酵素 GnT-I と OA 関連酵素 MMP13,ADAMTS5 の関連を示すことにより、高マンノース型糖鎖および GnT-I が OA 関連酵素の遺伝子発現を制御することにより軟骨変性を抑制する可能性を示唆しており、今後 OA の治療戦略において重要な分子となりうる可能性があると考えられた。

審査に当たり、副査清水宏教授から、糖鎖が OA にどの程度関わっているのか、高マンノ

ース型糖鎖の減少は原因か結果か、また RA と比較した場合、OA は何か特殊なのか、などについての質問があった。次いで、主査安田和則教授から、ヒト OA 軟骨は広い関節面のどこから採取したか、OA 患者間でのデータのばらつきはどの程度であったか、高齢者である頸部骨折患者の軟骨はコントロールとして適当か、不安定性を誘発したマウス OA モデルはこの研究の OA のモデルとして妥当か、などについての質問があった。最後に副査三浪明男教授から、将来的な創薬へのつながり、発展についてはどう考えているのか、などについての質問があった。これらの質問に対し申請者は今回行った実験結果と過去の文献を引用し、適切に回答した。

申請者は、早期 OA に高マンノース型糖鎖、糖転移酵素 GnT-I が深く関与していることを初めて示し、また高マンノース型糖鎖および GnT-I が OA 関連酵素の遺伝子発現を制御することにより軟骨変性を抑制する可能性を示唆し、今後の OA の新たな予防、治療法の開発に貢献するものと期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。