

# 論文概要

## ○論文題目

『コンドロイチン硫酸 N-アセチルガラクトサミン転移酵素 1 と 2 の両方が正常な軟骨発生に必須である』

## ○指導教員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 高橋 智 教授

所属： 筑波大学大学院人間総合科学研究科 生命システム医学専攻

氏名：新保 未来

## ○目的

日本の高齢化社会において、変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) に代表される運動器疾患は健康寿命を縮める影響力が極めて大きく、新規治療法の開発が望まれている。しかし軟骨の分化や変性、再生の機構についてはそのほとんどが未解明である。コンドロイチン硫酸 (CS) は非常に長い直鎖状の糖鎖であるグリコサミノグリカン (Glycosaminoglycan: GAG) の一種であり、軟骨の細胞外マトリックスの主要構成物であるアグリカンの側鎖として豊富に存在する。OA 患者の軟骨ではコンドロイチン硫酸が減少することが知られており、軟骨におけるコンドロイチン硫酸の生合成機構を解明することは、疾患の原因解明および新規治療法、予防法の開発につながると期待される。*In vitro* の解析により、CS の生合成に必須な様々な基質特異性をもつ6種類の糖転移酵素が同定されているが、*in vivo* においてそれぞれの酵素がどのように CS の生合成に寄与するかはほとんど明らかになっていない。これらの酵素のうち Chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase-1 (t1) と Chondroitin sulfate *N*-acetylgalactosaminyltransferase-2 (t2) の2種類が *in vitro* において CS の合成を開始する活性 (Initiation 活性) を示すことから、生体内でも CS 合成開始に必要な不可欠であると予想された。そこで本研究は、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* における t1 と t2 の CS 合成の機構解明、および軟骨発生における CS の機能解明を目的とした。

## ○対象と方法

*t2* ノックアウト (*t2* KO) マウス、*t1::t2* double KO (DKO) マウス、軟骨特異的 *t1::t2* double KO マウス (Col12-DKO) を作製し、表現型解析を行なった。まず、骨格形成異常の確認のため骨格標本を作製した。次に組織学的解析および GAG 鎖の発現量を確認するため、脛骨近位成長板の切片を作製し、GAG 鎖を認識する Safranin-O 染色を行なった。さらに、X型コラーゲンに対する免疫染色により軟骨細胞の分化段階の評価、Ki67 免疫染色による軟骨細胞増殖評価および TUNEL 染色を行なった。また、CS のコアタンパク質であるアグリカンの細胞外マトリックス中の局在変化を免疫染色により評価した。最後に軟骨初代細胞の培養を行い、*in vitro* における軟骨細胞の増殖率および硫酸化 GAG 鎖の合成量を測定した。

## ○結果

*t1* ノックアウト (*t1* KO) マウスは軟骨内骨化の異常に起因する矮小表現型を示すのに対し、*t2* KO マウスは正常に成長し、骨格異常を示さなかった。一方、DKO マウスは出生直後に致死となり、*t1* KO マウスよりも深刻な矮小表現型を示した。Col2-DKO マウスも DKO マウスとほぼ同等の表現型を示したことから、*t1* と *t2* が軟骨において重要な役割を果たすことが示された。Col2-DKO マウスの脛骨近位成長板では、成長板構造異常、軟骨の分化異常、細胞増殖率の低下およびアポトーシス細胞の増加など、著しい軟骨内骨化の異常が観察された。また、CS など GAG 鎖を認識する Safranin-O 染色によって、細胞外マトリックスにおける CS 量および細胞外マトリックスの面積が減少したことがわかった。さらに、CS のコアタンパク質であるアグリカンの発現分布異常が見られた。一方、Col2-DKO の軟骨初代培養細胞は、硫酸化 GAG 鎖合成の低下を示したにも関わらず、細胞増殖率は野生型と同じであった。

## ○考察

*t1* KO マウスはわずかに矮小となり、軟骨における CS が半分程度減少することがわかっている。*t2* KO マウスでは異常が全く見られなかったが、*t1* と *t2* の両方を欠損した DKO マウスおよび Col2-DKO マウスでは、生後直後の致死や E18.5 からの体躯の矮小化など、*t1* KO マウスよりも重篤な軟骨内骨化異常が見られた。これらの結果は、生体内において、*t1* は *t2* よりも強い酵素活性を示すために *t2* の機能を代償できるが、*t2* は *t1* の機能を完全に代償できないことを示唆し、さらに、*t1* と *t2* が協調して CS 合成を行うという可能性が考えられた。また、DKO マウスの脛骨軟骨成長板において、CS 残存の可能性が示されたことから、*t1* と *t2* 以外の糖転移酵素が *in vivo* において Initiation 活性を示すことが示唆された。

Col2-DKO マウスでは、軟骨内骨化の異常に起因する骨格形成異常を示し、CS のコアタンパク質であるアグリカンの局在が軟骨小腔の周辺部に限られていたことから、細胞外マトリックスの異常が軟骨内骨化の異常を引き起こすことが考えられた。また、Col2-DKO の軟骨初代培養細胞が、外的因子に応答して野生型と同様の細胞増殖率を示したことも、細胞外マトリックス異常が Col2-DKO マウスの表現型に起因することを強く裏付けている。

## ○結論

t1 と t2 の両方によって合成される CS 鎖は、正常な軟骨内骨化に必須であることが明らかとなった。また、*in vitro* で Initiation 活性を示した酵素は t1 と t2 のみであったにも関わらず、t1 と t2 を欠損しても CS の残存が見られたことから、*in vivo* では t1 と t2 以外の糖転移酵素も Initiation 活性を担う可能性のあることをほ乳類ではじめて示唆した。