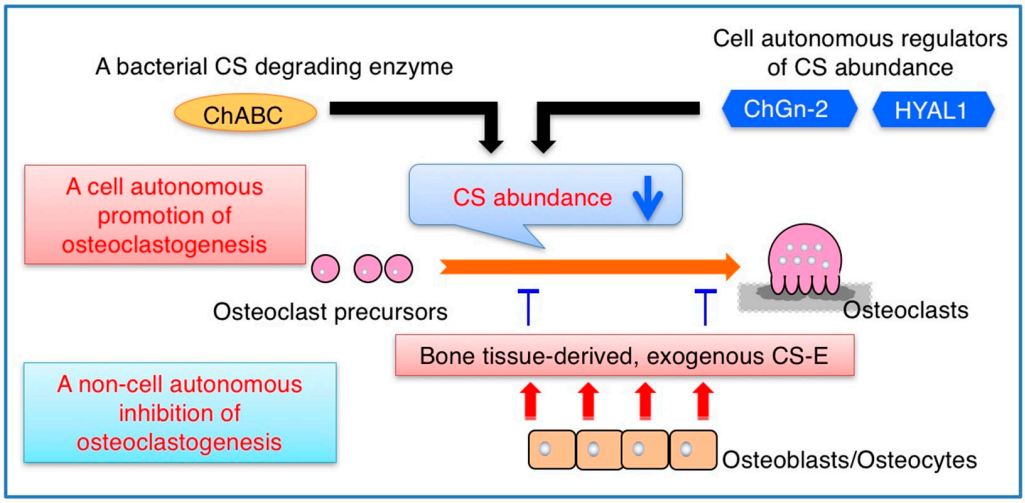
34　骨粗鬆症治療を目指したコンドロイチン硫酸の機能解析	北川　裕之

【目的】骨粗鬆症に代表される骨吸収性疾患は、骨リモデリングのバランスに異常が生じた疾患の一つで、破骨細胞による骨吸収が進み、骨芽細胞による骨形成が追いつかなくなることが主な原因である。その治療には、ビスホスホネート製剤を始めとする破骨細胞の働きを抑える薬剤が主に選択されているが、破骨細胞の機能抑制は、骨吸収に共役した骨形成にも悪影響を及ぼすことが知られている。したがって、骨粗鬆症のより有効な治療法を確立するためには、骨形成および骨吸収に関わる細胞分化過程の制御メカニズムを体系的に理解する必要がある。コンドロイチン硫酸鎖は、骨組織の主要な細胞外マトリックス成分であることから、骨芽細胞分化と破骨細胞分化を包括的に制御し、骨形成ならびに骨吸収の両イベントの仲介役として機能していることが十分期待される。そこで本研究では、破骨細胞分化過程におけるコンドロイチン硫酸鎖の役割と制御メカニズムの解析を試みた。

【方法・結果】骨芽細胞非存在下での破骨細胞分化誘導系（RAW264.7 および骨髄由来マクロファージ）を用いた解析から、コンドロイチン硫酸鎖の発現量が破骨細胞の分化の進行に伴い減少すること、この減少がコンドロイチン硫酸生合成酵素・分解酵素の機能発現とよく相関することを見出した。興味深いことに、コンドロイチン硫酸鎖の発現を減少させると、多核化を指標とした破骨細胞の形成が有意に亢進した。一方で、破骨細胞の分化は、骨芽細胞によって産生される特定のコンドロイチン硫酸サブタイプによって負に制御されることがわかった。これらのことから、破骨細胞の分化・成熟は、細胞自律的なコンドロイチン硫酸鎖の代謝調節と骨芽細胞より供給されるコンドロイチン硫酸サブタイプを介した細胞非自律的な抑制メカニズムのバランスによって成り立っていることが示唆された。

コンドロイチン硫酸（CS）鎖による破骨細胞分化・成熟過程の制御メカニズム



34. 骨粗鬆症治療を目指したコンドロイチン硫酸の機能解析

北川　裕之

神戸薬科大学 薬学部 生化学研究室

Key words：コンドロイチン硫酸，コンドロイチナーゼ，骨リモデリング，破骨細胞，プロテオグリカン

緒　言

骨組織の恒常性は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返すリモデリングと呼ばれる骨代謝のバランスによって保たれている。このバランスが崩れ、骨吸収が優位になることで、骨粗鬆症などの骨代謝疾患が引き起こされる。骨粗鬆症は、本邦における代表的な加齢性疾患の一つであり、寝たきり、要介護など QOL の低下に繋がることから、その克服は重要な課題である。現在治療には、ビスホスホネート製剤をはじめとする骨吸収抑制剤が主に選択されているが、これらの薬剤による破骨細胞の過度な機能抑制は、骨吸収に共役して起こる骨形成にも悪影響を及ぼすことが知られている。したがって、骨粗鬆症のより有効な治療法を確立するためには、骨吸収および骨形成の両イベントの制御メカニズムを体系的に理解する必要がある。その鍵を握る分子として本研究課題では、骨組織の主要な細胞外マトリックス成分であるコンドロイチン硫酸（CS）鎖に着目した。

CS 鎖は、グルクロン酸（GlcA）と *N*-アセチルガラクトサミン（GalNAc）の二糖繰り返し構造からなる直鎖状の硫酸化多糖で、コアタンパク質に結合したプロテオグリカン（CSPG）として、細胞周囲に普遍的に分布している。CS 鎖は、その生合成過程で、発現量や硫酸化パターンにバリエーションが生じ、多様な機能を発揮するようになることが知られている［1］。これまでに我々は、高硫酸化 CS バリアントの一つである CS-E（ジ硫酸化二糖単位の一つである E ユニットを多く含む CS 多糖）が、骨芽細胞により産生され、骨芽細胞分化に促進的であることを明らかにしている［2］。実際、CS-E 生合成酵素である Galnac4s6st のノックアウト（KO）マウスでは、骨密度が低下しており、その原因が骨芽細胞の分化能の低下に起因することも見出している［3］。一方、*in vitro* での破骨細胞の分化は、CS-E によって抑制されることが、幾つかのグループによって報告されている［4］。したがって、CS-E KO マウスでは、破骨細胞への分化能が亢進していると予想されたが、CS-E KO マウス由来の骨髄マクロファージ（bone marrow-derived macrophages, BMMs）自体の破骨細胞への分化能は、野生型と同等であった［3］。これらの知見から、破骨細胞の分化・成熟は、CS-E に依存しない細胞自律的な制御と、周囲の環境から供給される CS-E を介した細胞非自律的な抑制メカニズムによって成り立っている可能性が示唆された。そこで、本研究では、破骨細胞の分化制御における CS の役割について解析した。

方　法

破骨細胞分化系として、破骨細胞分化モデルである RAW264.7 細胞または野生型マウスの骨髄由来マクロファージ（BMMs）を用い、これらの細胞に対して可溶化型 RANKL（破骨細胞分化誘導サイトカイン: sRANKL）で刺激することにより分化を誘導した。sRANKL 誘導性の破骨細胞分化過程における CS 鎖の発現の経時変化を、各段階の培養系から抽出・精製したグリコサミノグリカン（GAG）画分の化学分析（CS 二糖組成解析）により調べた。また、各分化段階の培養系を利用し、CS 鎖の発現制御に関わる主要な生合成／分解酵素や CSPG のコアタンパク質の同定を試みた。さらに、上述の分化誘導系に発現する CS を強制的に減少させるために、バクテリア由来の CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC（ChABC）を添加した。一方で、細胞非自律的な CS 鎖の影響を調べるために、硫酸化パターンの異なる市販の典型的な CS 多糖標品（CS-A、CS-C および CS-E）をコーティングした基質を調製した。CS 多糖

のコーティングには、その効率を上げる目的で、ポリオルニチン（PLO）で前処理した培養皿を用いた。それぞれの解析条件における破骨細胞分化の進行の程度は破骨細胞特異的分化マーカーである酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）の発現ならびにTRAP陽性（赤色に染色される）多核細胞の形態観察により評価した。また、一部の培養系より調製したタンパク質抽出画分を用いて、ChABC処理によって変動する細胞内シグナル伝達系の同定を試みた。

なお、統計解析は、Student's t-test法により行い、統計学的有意差の基準として、$p < 0.05$を採用した。また、全ての値は平均±標準偏差で示した。

結　果

単球／マクロファージ系造血幹細胞に由来する破骨細胞は、分化誘導サイトカインである RANKL の刺激により分化し、互いに融合することでアメーバ様の巨大な多核細胞となる。まず、細胞自律的な破骨細胞分化における CS の役割を明らかにするために、マクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用い、RANKL 誘導性の破骨細胞分化系を構築した。各分化段階の培養系に発現する CS 鎖を回収し、定法にしたがい CS 鎖の二糖組成分析を行ったところ、興味深いことに E ユニットはいずれの分化段階でも検出されず、二糖組成自体に大きな変動がないことが判明した。一方で、CS の発現量は、分化に伴い減少し、特に、高度に多核化した破骨細胞が観察される 7 日目で、有意に減少することがわかった。これらのことから、CS-E による分化制御は細胞非自律的であることが示唆される一方で、CS 発現量の減少は、破骨細胞分化の進行と連動していることが強く示唆された。

そこで、破骨細胞分化の進行に伴い観察された CS 鎖の減少が、破骨細胞分化に直接かつ積極的に関与するかを明らかにするため、バクテリア由来の CS 分解酵素であるコンドロイチナーゼ ABC（ChABC）を添加し、培養系に発現する CS を強制的に減少させた。その結果、ChABC の添加によって、より大きな TRAP 陽性の多核細胞（破骨細胞）が形成されることがわかった（図 1A）。さらに興味深いことに、ChABC 処理によって、破骨細胞分化促進シグナルの一つである Smad2 のリン酸化レベルの増大も観察された（図 1B および C）。これらのことから、CS 発現量の低下は、おそらく TGF-β といった内因性のシグナル経路を活性化することで、破骨細胞分化を直接的に促進していると考えられた。骨髄由来マクロファージ（BMMs）を用いた場合でも同様の結果が得られたことから、CS 発現量の低下は、RAW264.7 細胞や BMM の破骨細胞分化を促進する共通作動原理であると考えられた。

また、これら破骨細胞分化誘導系における CS 鎖の生合成／分解系に関わる酵素遺伝子や CSPG のコアタンパク質遺伝子の発現プロファイルを調べたところ、いずれの細胞系においても、CS 発現量の増加に寄与するコンドロチン GalNAc 転移酵素-2（ChGn-2）の発現が RANKL 刺激量に応じて減少し、CS 分解酵素であるヒアルロニダーゼ-1（Hyal1）の発現が増加すること（図 2）、また破骨細胞分化に対して促進的に作用する TGF-β シグナルの制御に関わりうるコアタンパクが複数存在することを見出した。これらのことから、CS 発現量の減少は、細胞自律的な CS の代謝調節により制御されていることが強く示唆された。

一方で、生体内における破骨細胞分化は、骨芽細胞や骨細胞により産生される骨基質に囲まれた環境下で起こることから、骨基質中に存在する CS 鎖に影響されることが予想された。そこで、破骨細胞分化における外因的な CS の影響を調べる目的で、硫酸化パターンの異なる CS 鎖をコーティングした基質上での分化の程度を調べた。その結果、破骨細胞の分化は、低硫酸化 CS バリアントである CS-A や CS-C をコートした基質上に比べ、CS-E をコートした基質上で明らかに抑制されることが判明した。この結果からも、破骨細胞の分化は、骨基質中に含まれる CS-E といった特定の CS サブタイプによって負に制御されることがわかった。

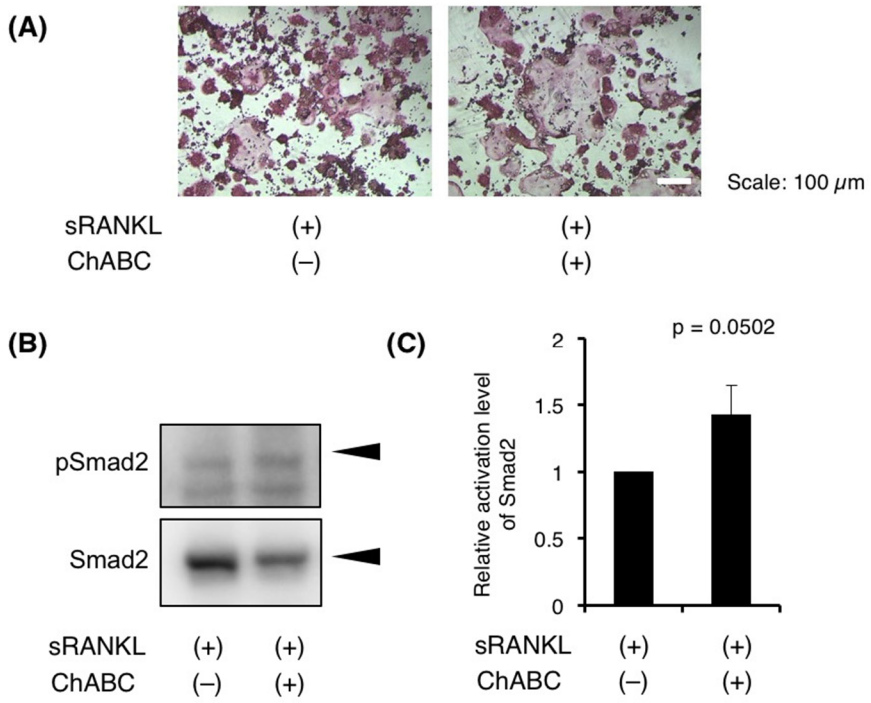


図 1. ChABC による CS 鎖の分解除去は、RAW264.7 細胞の破骨細胞分化を正に制御する

（A）ChABC 処理により、sRANKL 誘導性の破骨細胞分化・成熟は増強された。ChABC 未添加群（–）に比べ、ChABC 添加群（+）では、より大きな TRAP 陽性（赤色）の多核細胞（破骨細胞）が数多く観察された。（B および C）ChABC 処理により、破骨細胞分化シグナルの一つである Smad2 のリン酸化レベルが増大する傾向を示した（n = 7）。

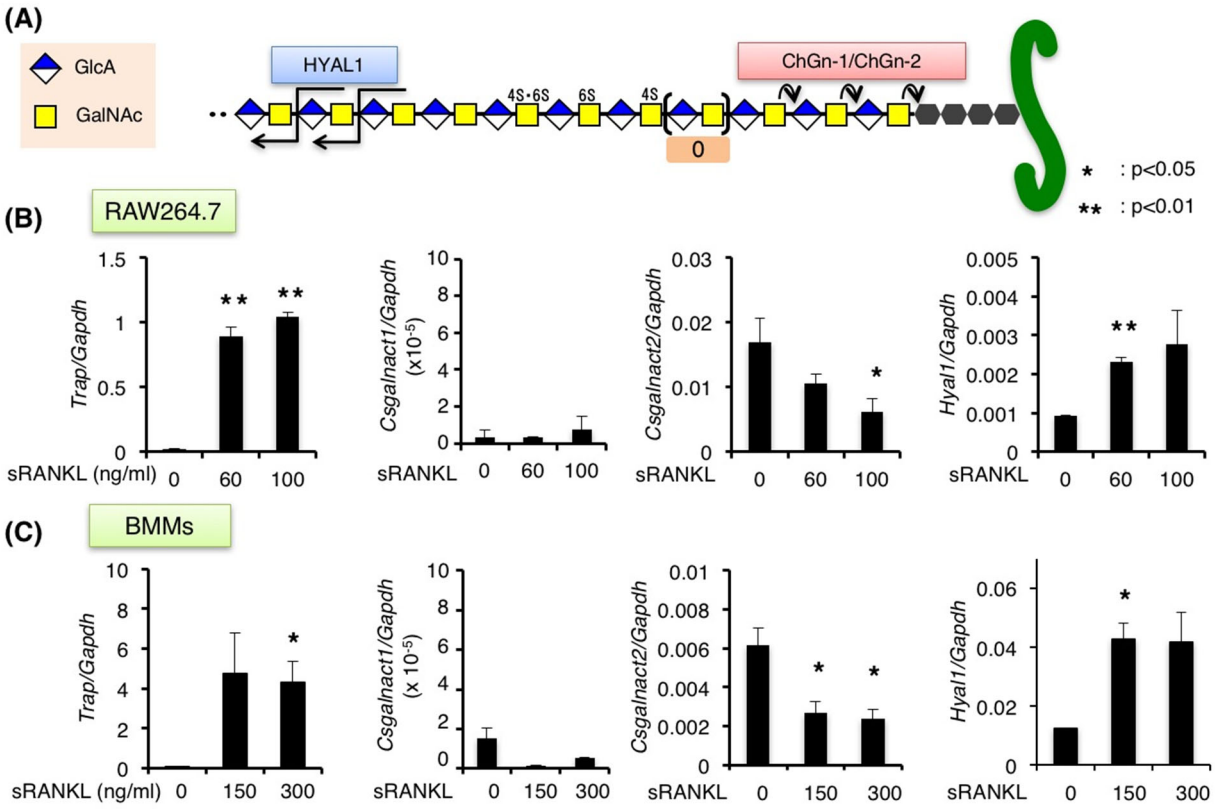


図 2. 破骨細胞分化過程における CS 鎖の発現量の減少は、細胞自律的な CS 鎖の代謝調節により制御される

（A）CS 鎖は GlcA と GalNAc が交互に繰り返した構造を基本骨格にもつ。ChGn-1 および ChGn-2 は CS 基本骨格の GalNAc の転移を触媒する生合成酵素であり、HYAL-1 は、CS 加水分解酵素の一つである。（B および C）RAW264.7 細胞（B）および骨髄由来マクロファージ（BMMs）（C）の sRANKL 誘導性破骨細胞分化における遺伝子発現変化（n = 3）。いずれの細胞においても、sRANKL 刺激により分化マーカーである *Trap* の発現は有意に増加した。CS 鎖の生合成・分解系に着目すると、破骨細胞分化に伴って、生合成酵素の一つである ChGn-2（*Csgalnact2*）の発現が有意に減少する一方、分解酵素である Hyal1 の発現が有意に上昇することがわかった。

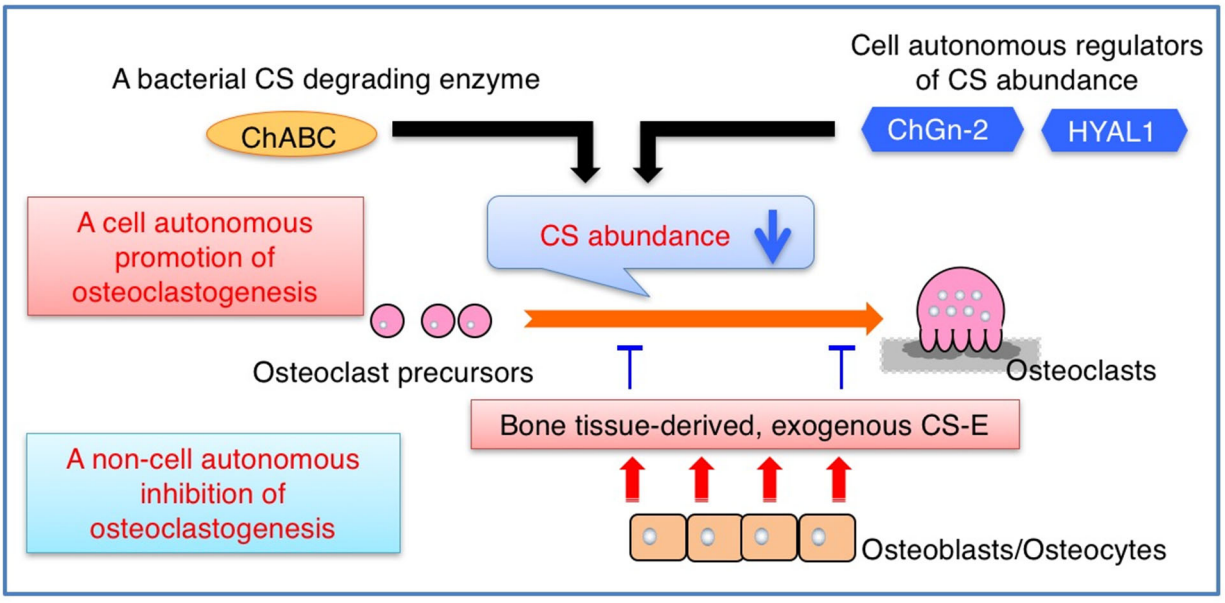


図 3. CS 鎖による破骨細胞分化・成熟過程の制御メカニズム

考　察

本研究の解析結果より、破骨細胞の分化・成熟は、細胞自律的なCSの代謝調節による分化促進メカニズムと、骨組織に由来するCS-Eを介した細胞非自律的な抑制メカニズムのバランスによって成り立っていることが示唆された（図3)。今後、これらのイベントにおけるCS鎖の作用メカニズムの詳細を明らかにすることで、CS鎖による骨リモデリング制御と骨吸収性疾患への治療応用に繋がることが大いに期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、神戸薬科大学薬学部生化学研究室の三上雅久講師、高田哲朗氏、浅野清次朗氏、重廣充孝氏である。

文　献

1) Mikami T, Kitagawa H. Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. Biochim. Biophys. Acta 2013 Oct;1830(10):4719-33. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.006. Epub 2013 Jun 14. Review. PMID: 23774590

2) Koike T, Izumikawa T, Tamura J, Kitagawa H. Chondroitin sulfate-E fine-tunes osteoblast differentiation via ERK1/2, Smad3 and Smad1/5/8 signaling by binding to N-cadherin and cadherin-11. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012 Apr 13;420(3):523-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.024. Epub 2012 Mar 13. PMID: 22440395

3) Koike T, Mikami T, Shida M, Habuchi O, Kitagawa H. Chondroitin sulfate-E mediates estrogen-induced osteoanabolism. Sci Rep. 2015 Mar 11;5:8994. doi: 10.1038/srep08994. PMID: 25759206

4) Miyazaki T, Miyauchi S, Anada T, Tawada A, Suzuki O. Chondroitin Sulfate-E Binds to Both Osteoactivin and Integrin αVβ3 and Inhibits Osteoclast Differentiation. J. Cell. Biochem. 2015 Oct;116(10):2247-57. doi: 10.1002/jcb.25175. PMID: 25820496