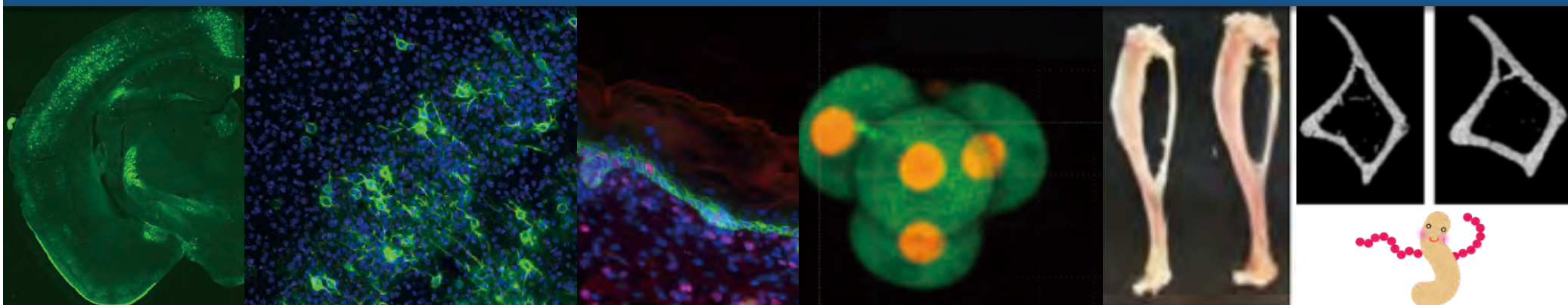


神戸薬科大学

Kobe Pharmaceutical University

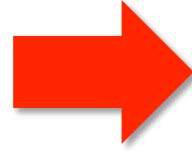
# グリコサミノグリカンの生合成と疾患

神戸薬科大学 北川 裕之

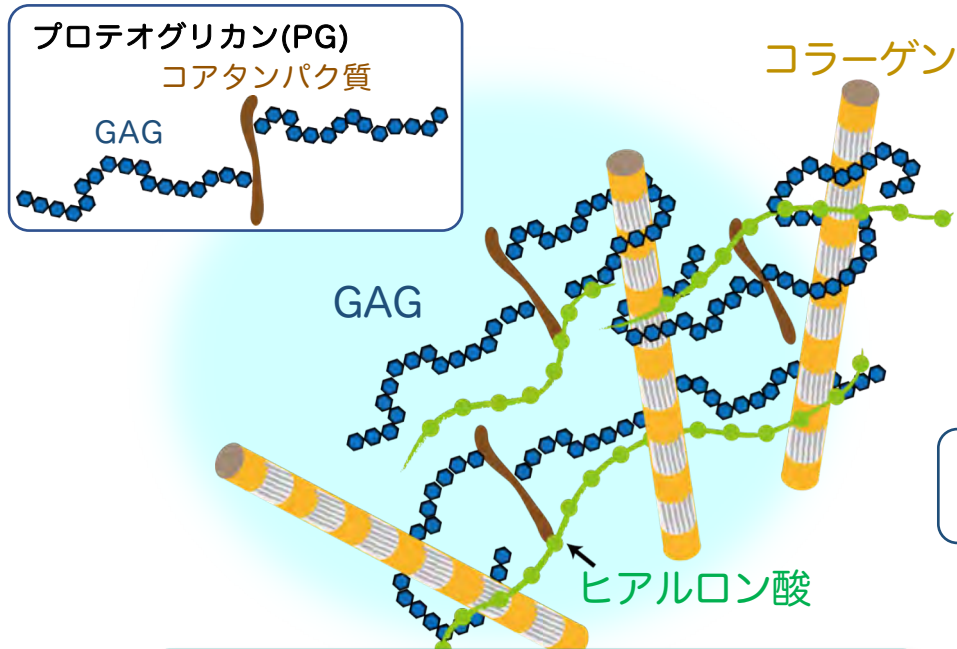


# グリコサミノグリカン (GAG) の機能

物性に基づいた保水作用、  
組織の支持体、  
関節の潤滑油としての役割



生物活性をもった低親和性受容体、  
シグナル分子としてののはたらき



古典的なGAGの機能



new normal な  
GAGの機能

## 我々の目指すゴール

GAGの機能異常は  
様々な病気に関連

多彩な機能を担う

応用

体内あるいは細胞のあらゆる部位で  
積極的にはたらくGAG

GAGの機能発現のための分子機構を理解することで  
GAGの機能を自在に操ることができる

- ・ GAGの機能解明とGAGの機能異常に起因する疾患発症機構の解明
- ・ GAGの機能の作動原理に基づいた診断・治療への応用

# 本日のセミナーの内容

## 1. CS の硫酸化異常と病気

C unit の合成異常

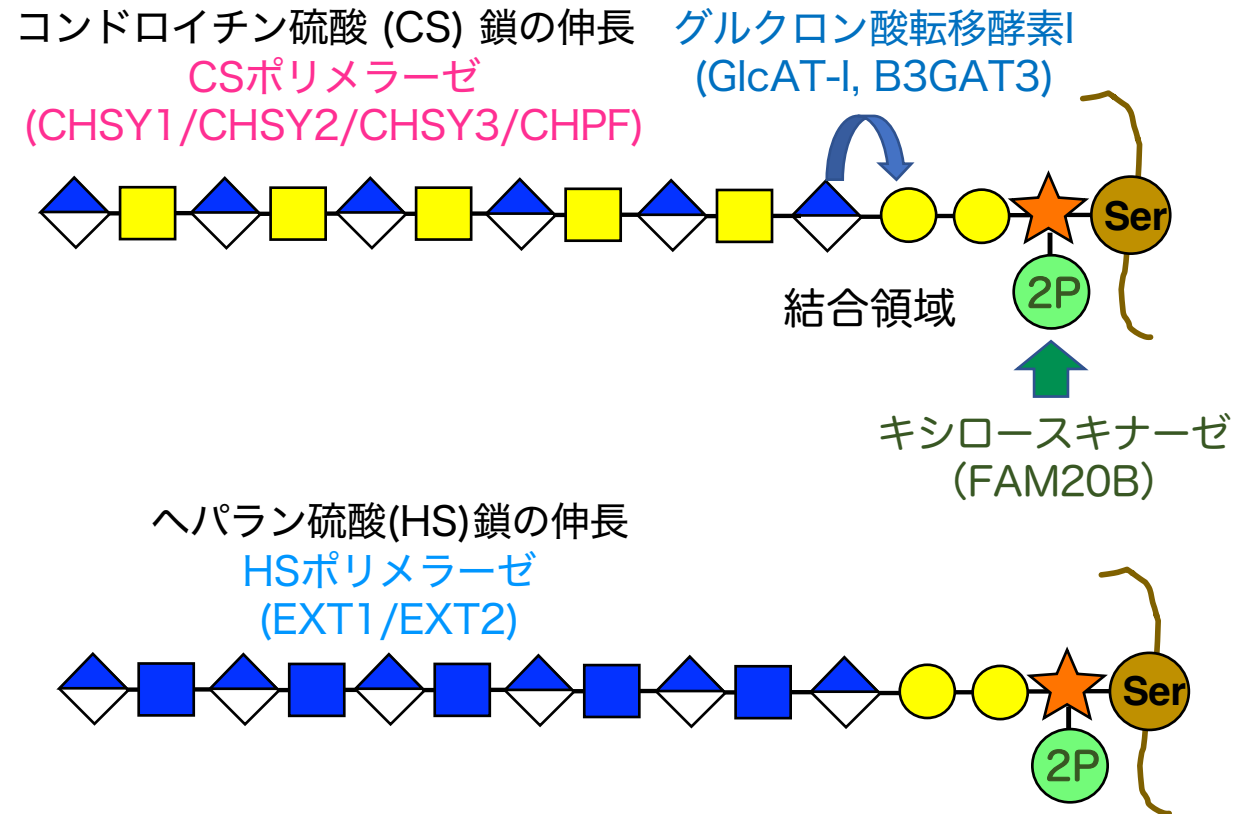
E unit の合成異常

4S/6S比のバランス異常

## 2. 炎症性GAGが合成される仕組みとこれに関連する疾患

# GAGの生合成機構

- ★ キシロース
- ガラクトース
- ◊ グルクロン酸
- N-アセチルガラクトサミン
- N-アセチルグルコサミン

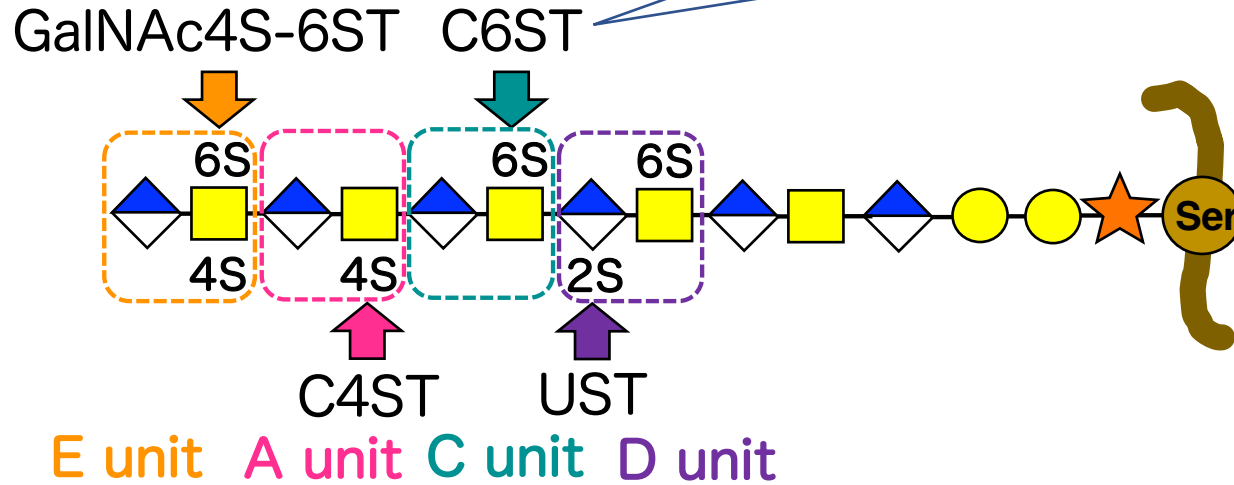




# CS鎖の硫酸化

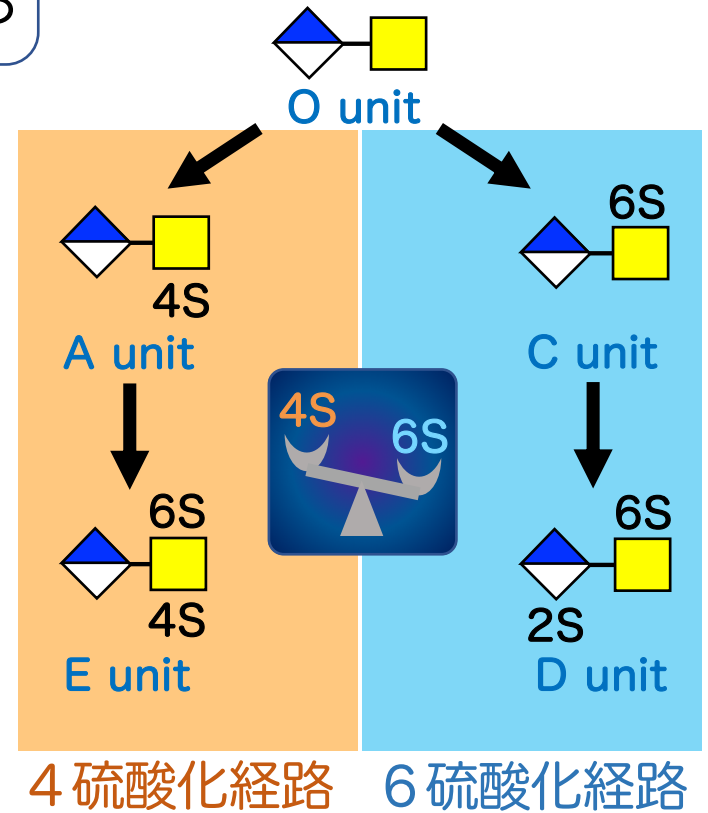
4S: 4位の硫酸化  
6S: 6位の硫酸化

硫酸基転移酵素の発現操作で  
硫酸化糖鎖構造の機能を知る

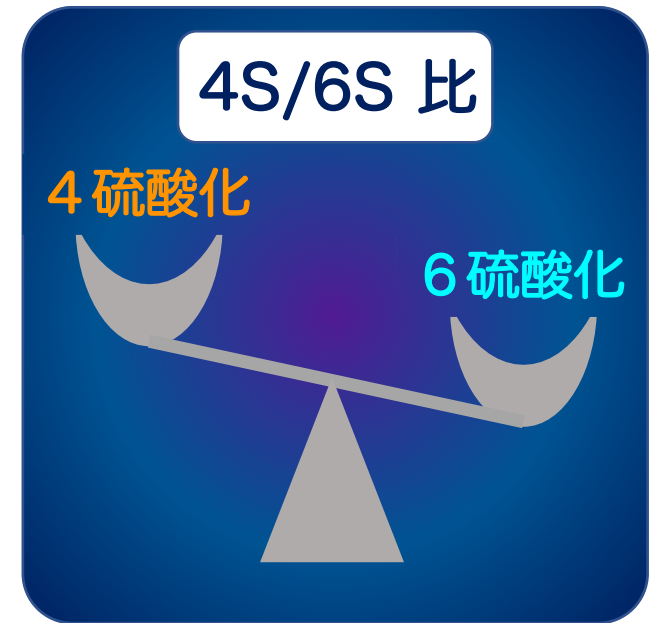
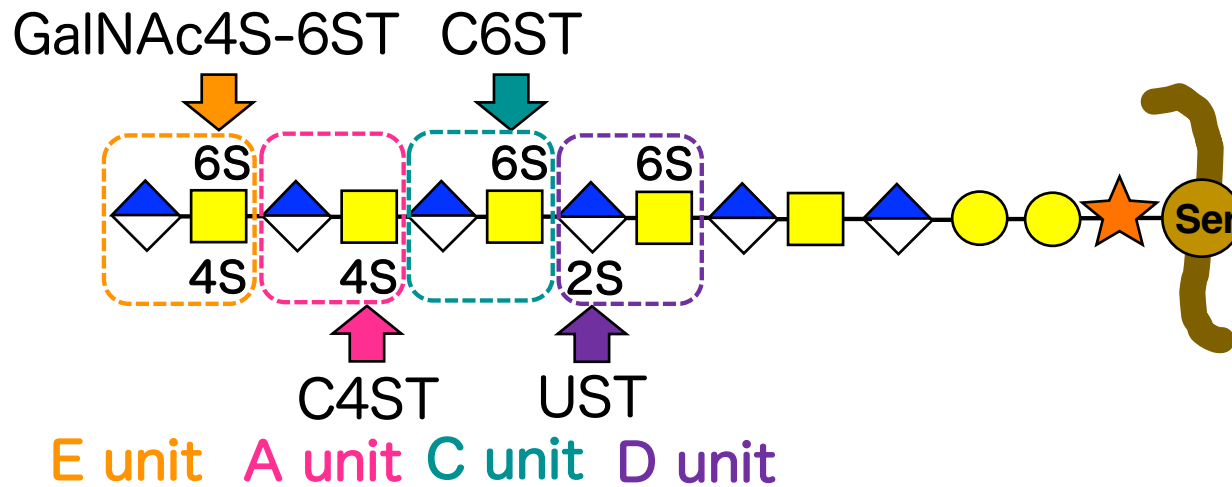


硫酸化パターンの違う二糖構造により  
CSの機能ドメインが形成される

CSの機能発現に  
硫酸化のバランスも重要

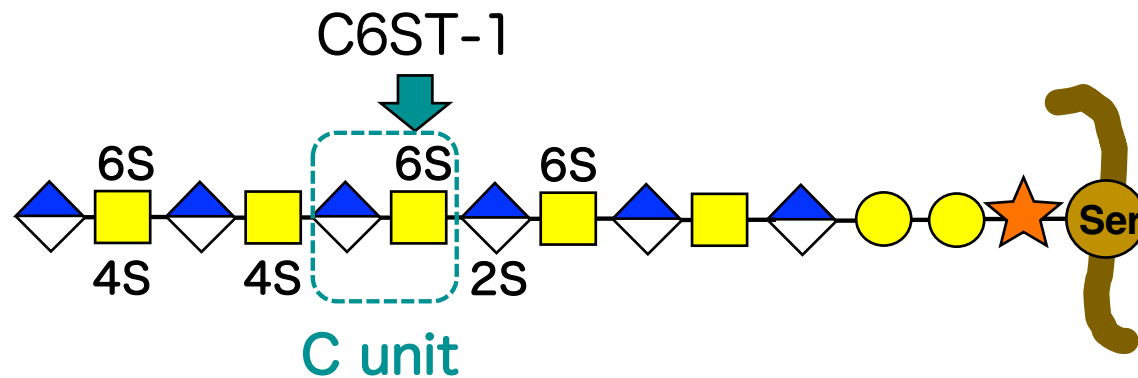


# 1. CS鎖の硫酸化異常と疾患



- ▶ C unit の合成異常
- ▶ E unit の合成異常
- ▶ 4S/6S比のバランス異常

# C unit (6 硫酸化CS) の合成異常



## C6ST-1ノックアウトマウス

脾臓におけるTリンパ球の減少

Uchimura, K., *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 1443-1450

➤ 加齢にともなう記憶・認知機能の低下

Yang, S., *et al.* (2021) *Mol. Psychiatry* 26, 5658-5668

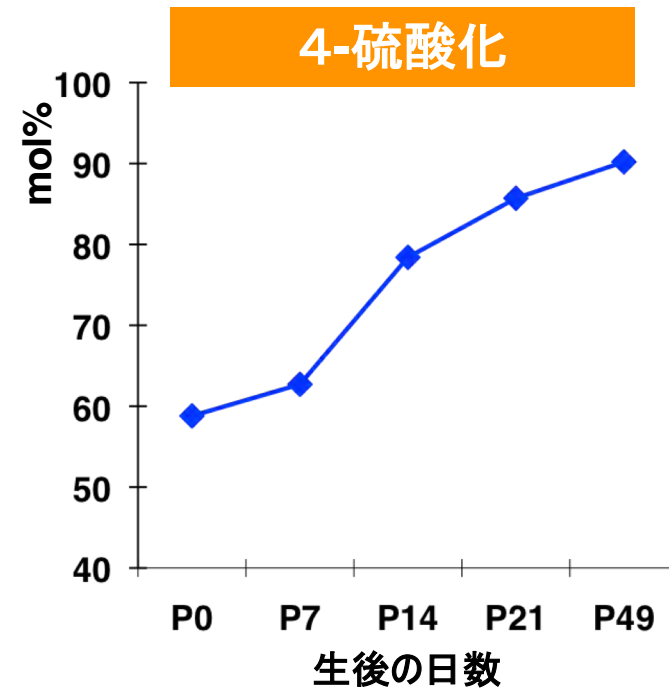
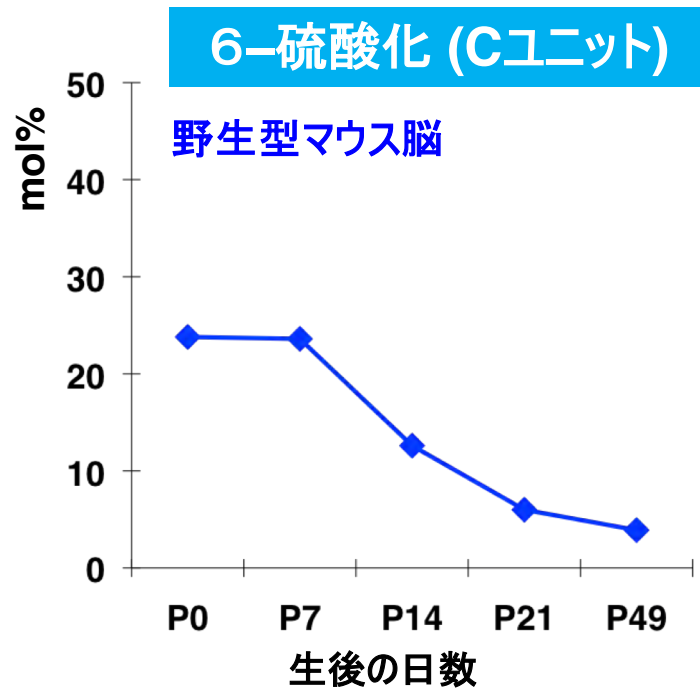
➤ 皮膚のバリア機能の低下

Kitazawa, K. *et al.* (2021) *Commun. Biol.* 4, 114

ヒト  
骨系統疾患  
PNAS (2004) 101, 10155-10160



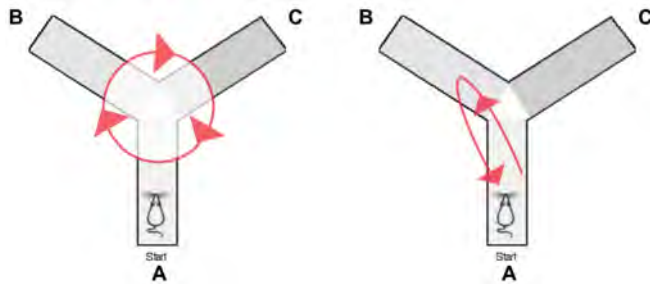
# 加齢にともなう記憶・認知機能の低下 に関するCSの6硫酸化



加齢にともない、6硫酸化は減少し、4硫酸化が増加する

# Y迷路を用いた記憶・認識試験

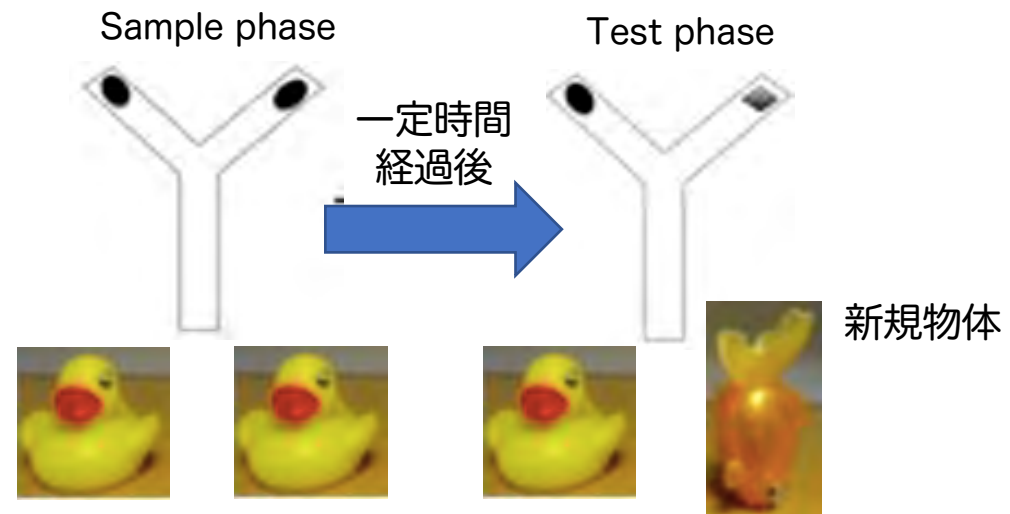
## 自発的交替行動



マウスが探索行動で自発的に異なるarmに入る性質を利用した試験方法

記憶認知機能が落ちると  
同じarmに入る頻度が増加する

## 新規物体記憶認識試験

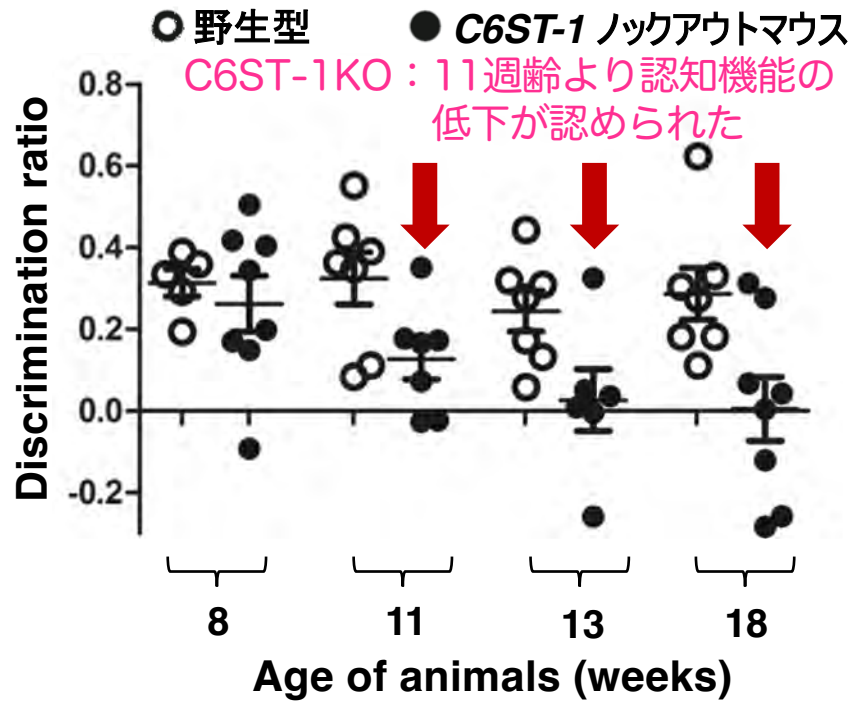


マウスは、記憶している物体に対しては「探索行動」はとらないか、もしくは新奇物体に比べ短時間で終了する

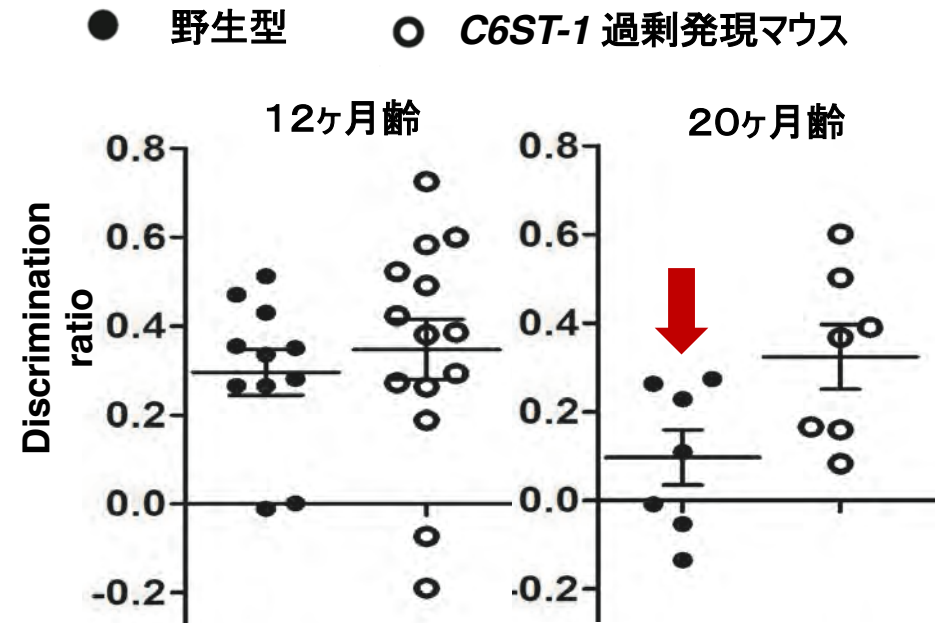
Sample phaseでは両アームにアヒルを置いて「探索行動」をとらせ、Test phaseでは、右側のアームを金魚に置き換え、それぞれの物体を探索した時間を計測し、記憶力・認知機能を評価する

# Y迷路を用いた新規物体認識試験

Yang, S., *et al.* (2021) *Mol. Psychiatry* 26, 5658-5668



野生型：若齢期～中年期における認知機能の低下は認められない



野生型：20ヶ月齢では認知機能の低下

C6ST-1過剰発現マウス（20ヶ月齢）：  
12ヶ月齢と同等の認知機能を維持している

# Y迷路を用いた新規物体記憶認識試験

嗅周野(PRh)

物体に関わる記憶に関与する脳領域

ウイルスベクター  
の注入



AAV-GFP :  
コントロールベクター

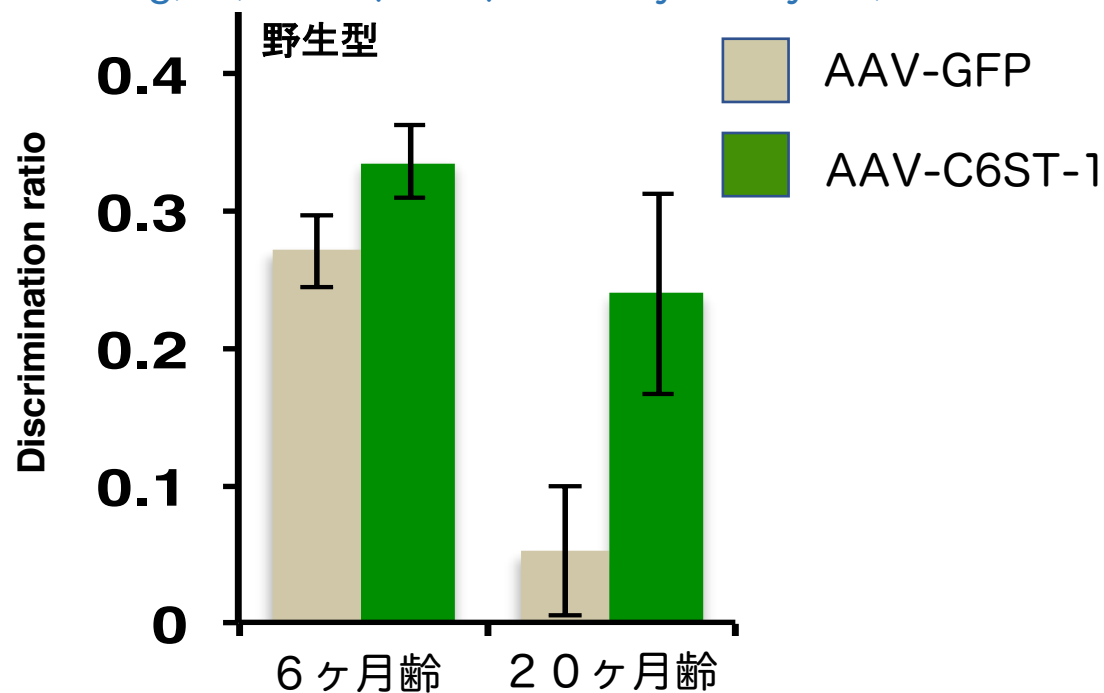
AAV-C6ST-1 :  
C6ST-1発現ベクター



4~5週間  
嗅周野でC6ST-1が発現し  
C unit を含むCSが発現

新規物体記憶認識試験

Yang, S., *et al.* (2021) *Mol. Psychiatry* 26, 5658-5668



加齢により記憶認知機能が低下してもC unit を増やすことができれば記憶認知機能は回復する

# 加齢にともなう記憶認知機能の維持に 6硫酸化CSはどのように寄与するのか

野生型マウス

週齢

若  
高

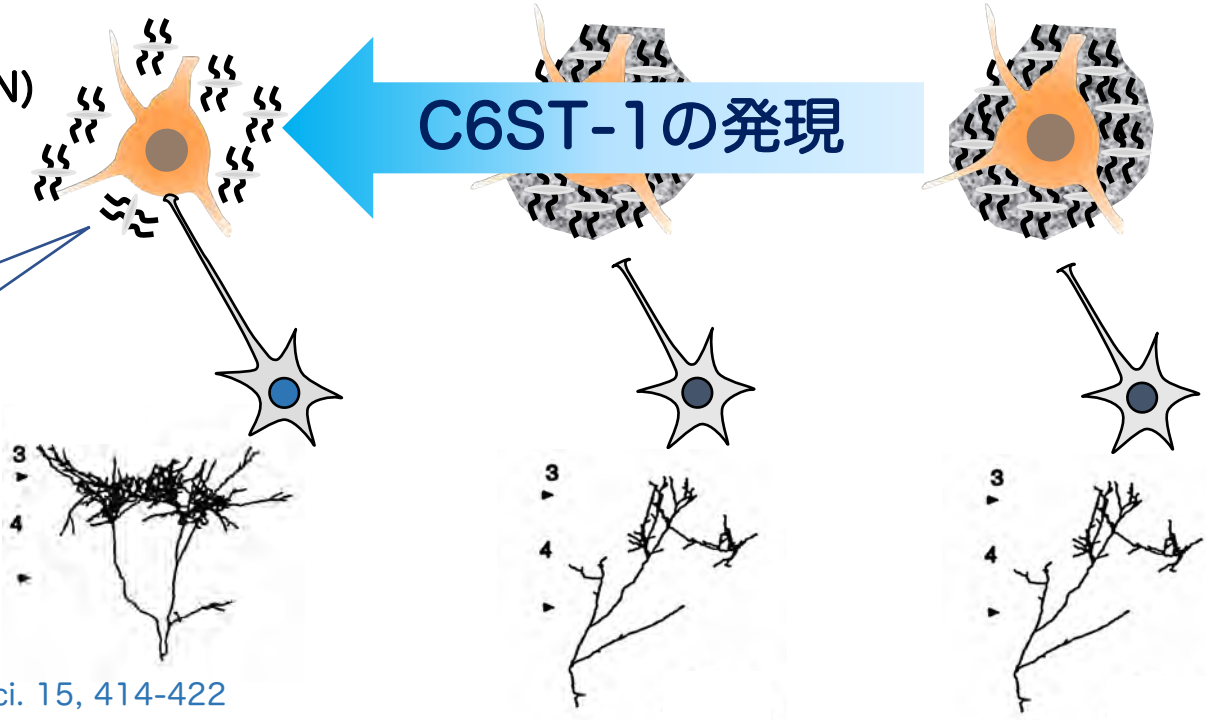
老  
低

6硫酸化CSの  
発現レベル

ペリニューロナルネット (PNN)  
神経細胞の周囲を覆う  
細胞外マトリックス

可塑性を取り戻し  
記憶認知機能が回復

C6ST-1の発現

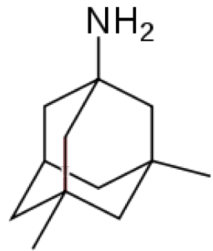


# メマンチンによる記憶認知機能改善にCSの与える影響

九州大学 神野研究室との共同研究

Maeda, S., *et al.* (2022) BJP 179, 4857-4877

## メマンチン



中等度から高度アルツハイマー型認知症患者の認知症症状の進行を抑制する

NMDA受容体拮抗薬

過剰なグルタミン酸によるNMDA受容体の活性化を抑制し、神経障害を防ぐ  
記憶を妨げる持続的電気シグナルを減少させ、記憶の定着を助ける

老齢(52~60週齢)野生型マウス

自発的交替行動の低下がメンチン投与により改善される

メマンチン投与によりC6ST-1の発現が上昇し、6硫酸化CSが増加する

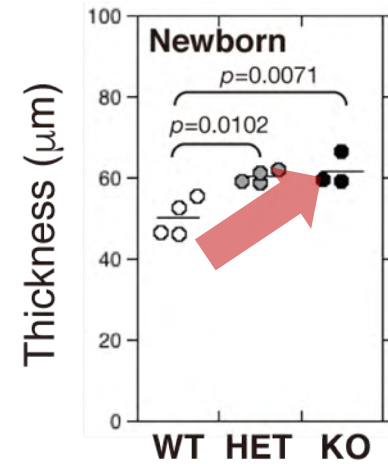
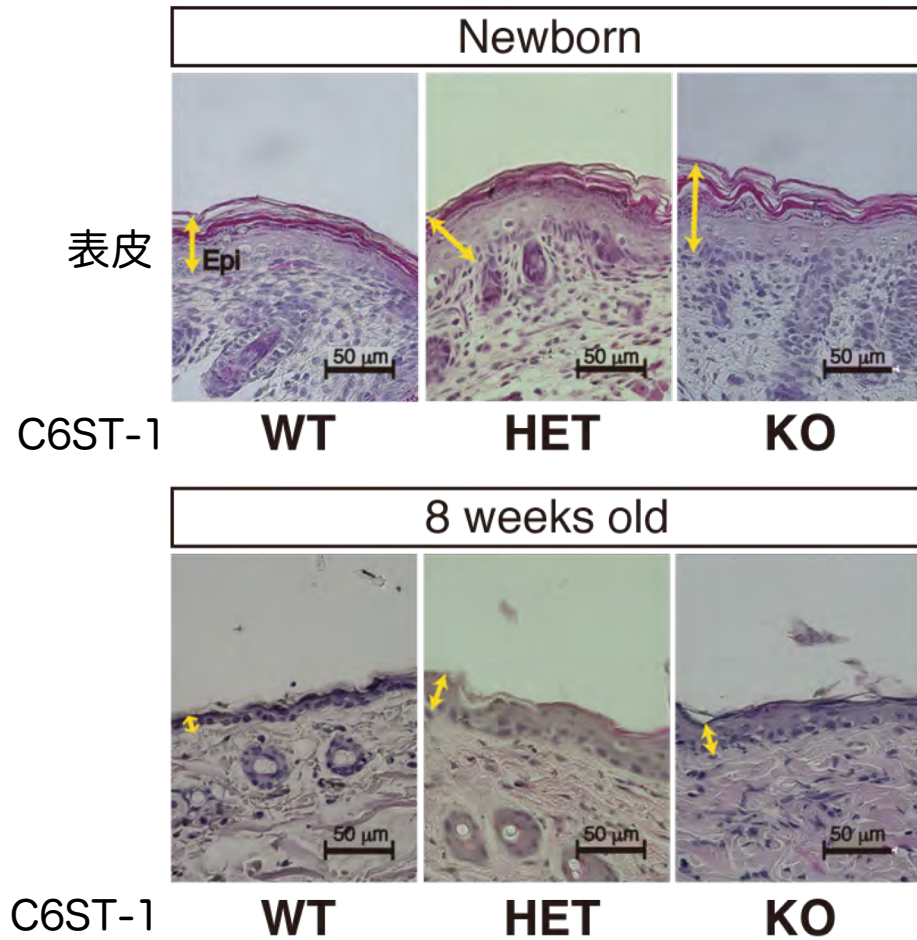
コンドロイチナーゼABCの投与によりメンチンの改善効果は消失する

メマンチンは過剰なグルタミン酸によるシグナルを抑えるだけでなく、CSを標的として記憶認知機能を改善させている可能性がある

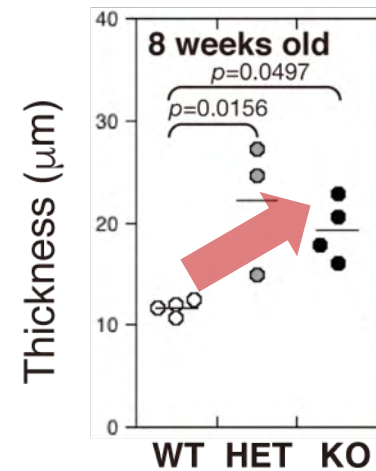


# 皮膚における6硫酸化CSの役割

Kitazawa, K., *et al.* (2021) *Commun. Biol.* 4, 114

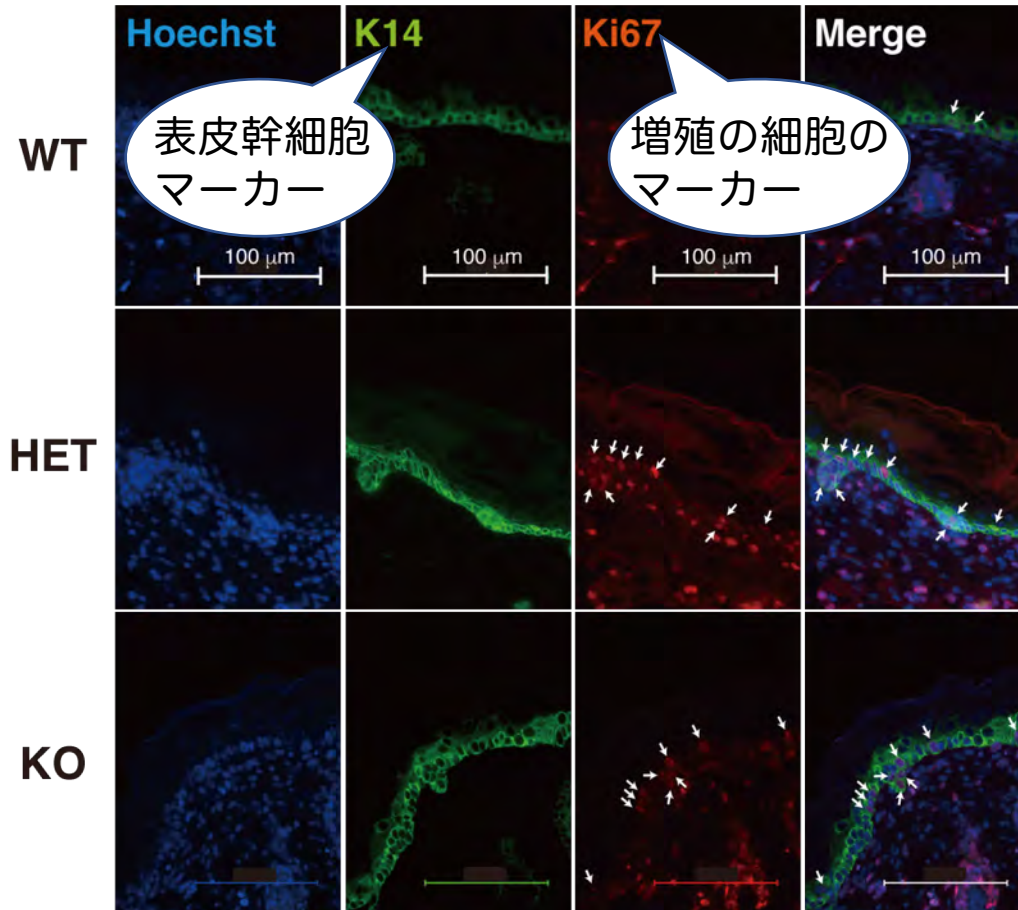


6硫酸化CSの欠損により皮膚が肥厚する

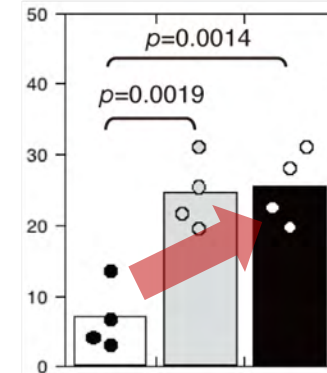


# 皮膚における 6 硫酸化CSの表皮幹細胞の増殖に与える影響

Kitazawa, K., *et al.* (2021) *Commun. Biol.* 4, 114

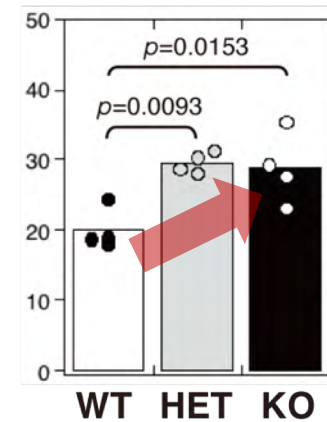


Ki67+ (% K14+ cells)



6 硫酸化CSの発現レベルの低下は表皮幹細胞の増殖を亢進させる

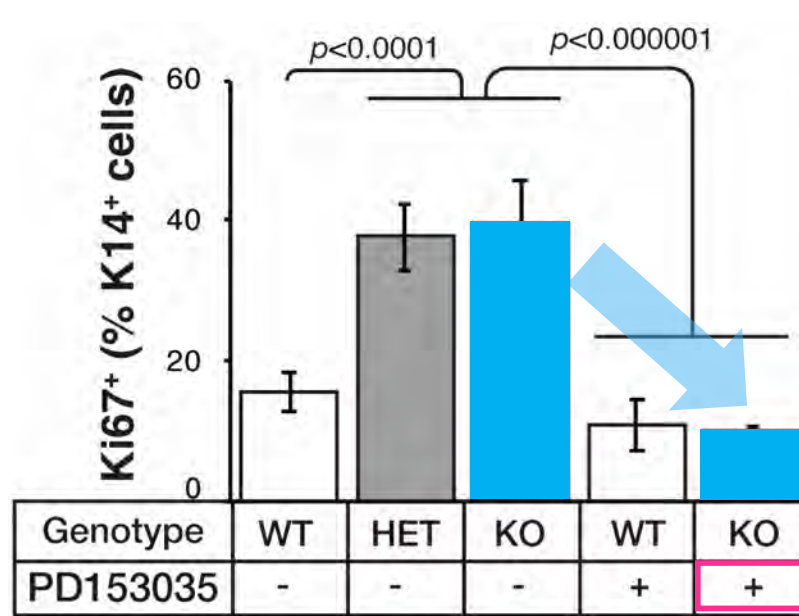
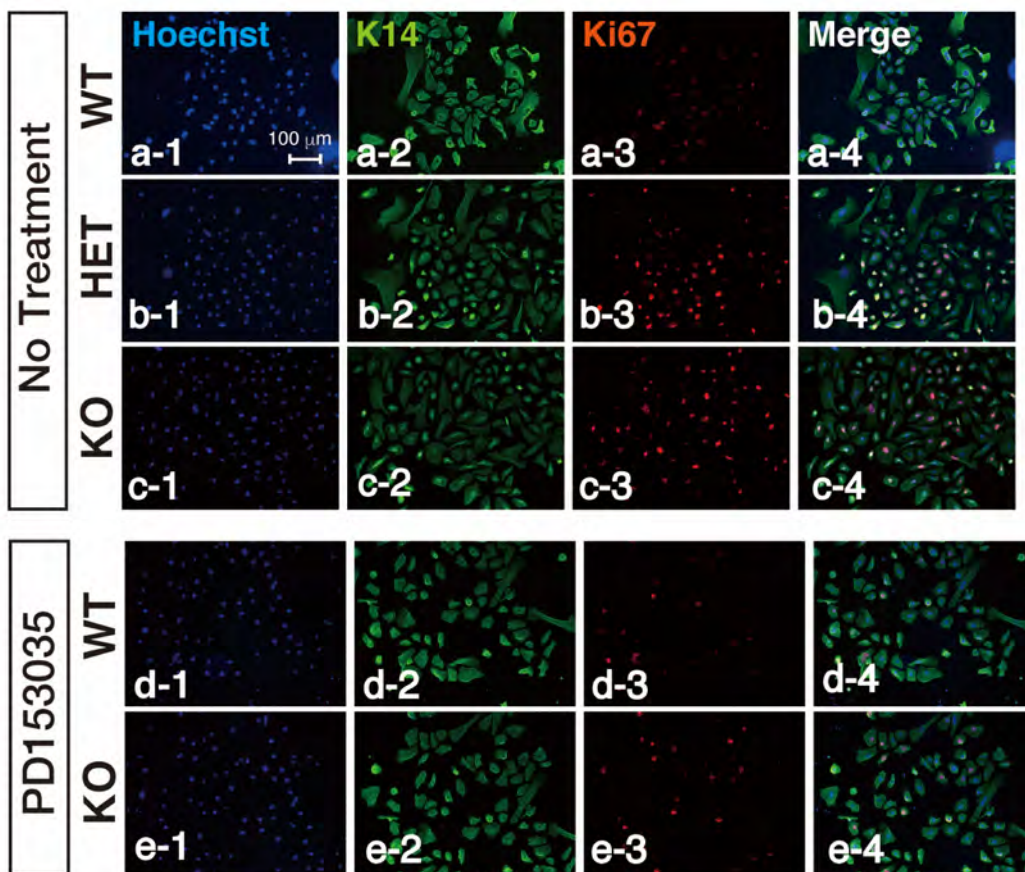
Thickness of K14+ layer (μm)



# 6 硫酸化CSの発現レベルの低下により影響を受ける増殖シグナル

初代培養表皮角化細胞

Kitazawa, K., *et al.* (2021) *Commun. Biol.* 4, 114



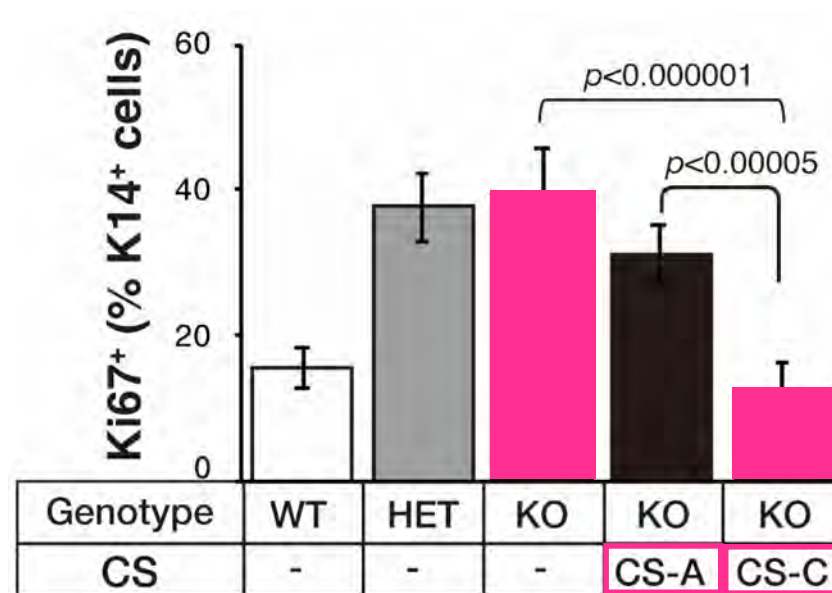
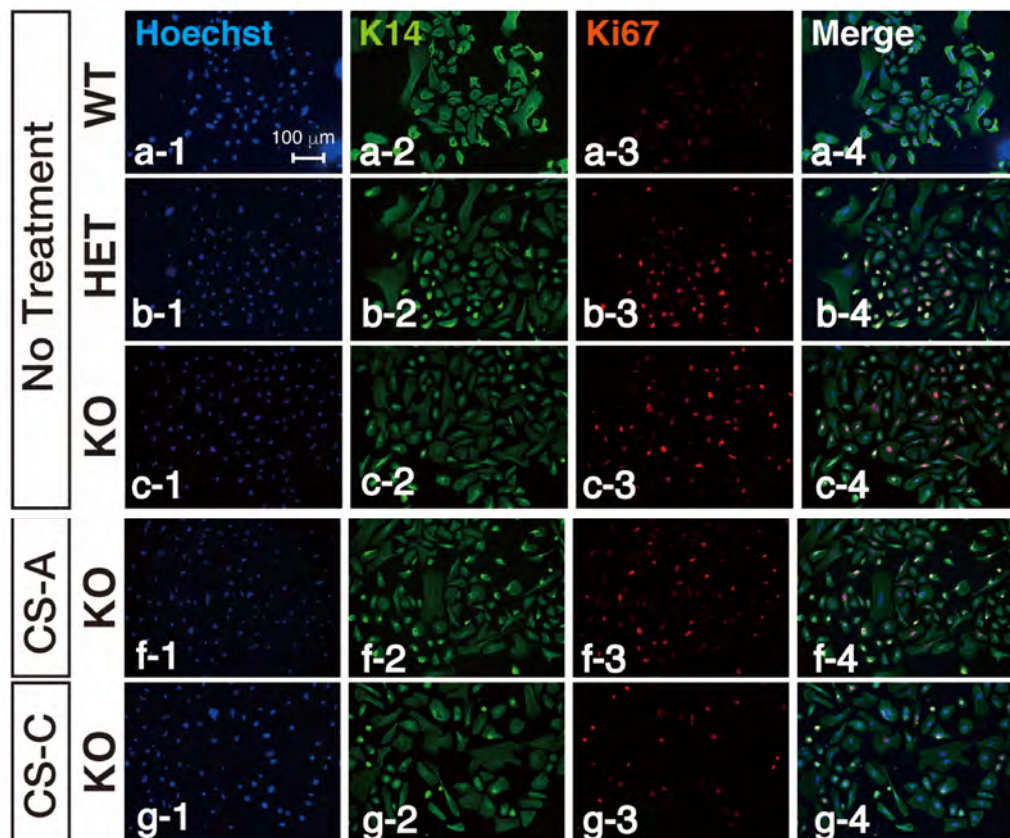
PD153035: EGFR特異的阻害剤

6 硫酸化CSの発現レベルの低下は  
EGFR経路を介して  
表皮幹細胞の増殖を亢進させている



# 6 硫酸化CSの添加により亢進した増殖は低下するか？

Kitazawa, K., *et al.* (2021) *Commun. Biol.* 4, 114



CS-A: 4位が硫酸化された構造の含量が高い CS

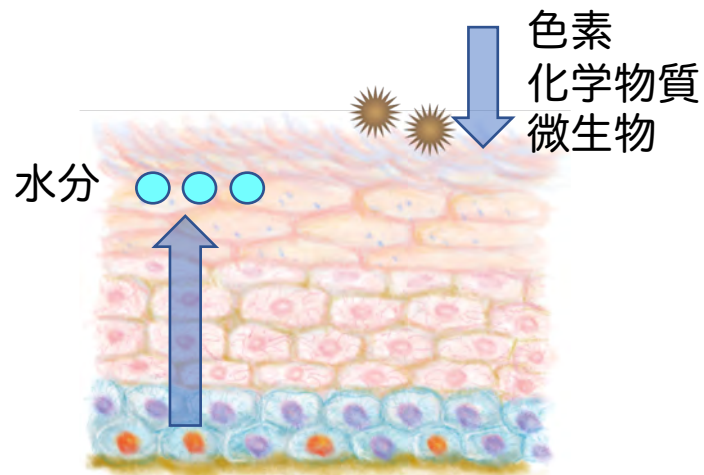
CS-C: 6位が硫酸化された構造の含量が高い CS

# 6 硫酸化CS欠損の厚くなった表皮の機能は？

Kitazawa, K., *et al.* (2021) *Commun. Biol.* 4, 114

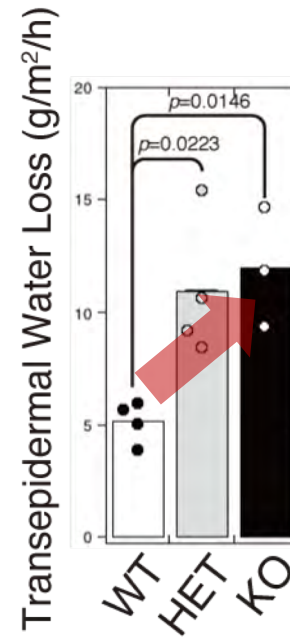
## 皮膚バリア機能

Inside-out Outside-in



水分蒸散量(TEWL)

トルイジンブルーを用いた皮膚透過性



# 6 硫酸化CSの発現低下による 皮膚バリア機能低下に関連する皮膚疾患

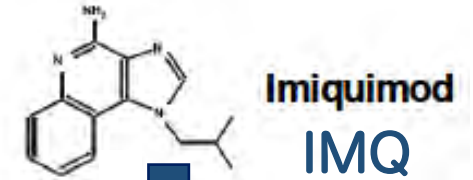
Journal of Dermatological Science 76 (2014) 139-142

## Expression quantitative trait loci (eQTL) analysis

*FAM20B* 遺伝子の発現低下が乾癬の危険因子として報告された

Koike, T., *et al.* (2009) Biochem. J. 421, 157-162

*FAM20B* 遺伝子の発現低下により6硫酸化CSが減少する



Toll-like receptor 7  
樹状細胞  
単球



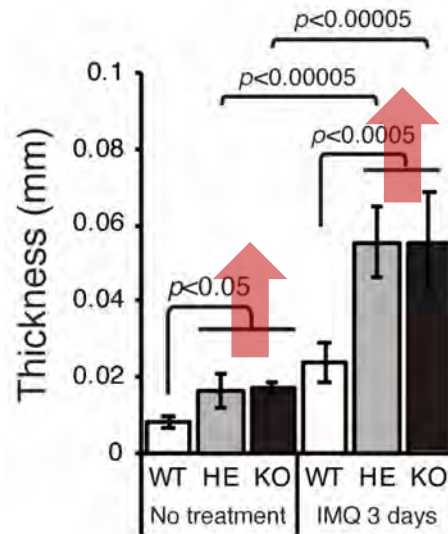
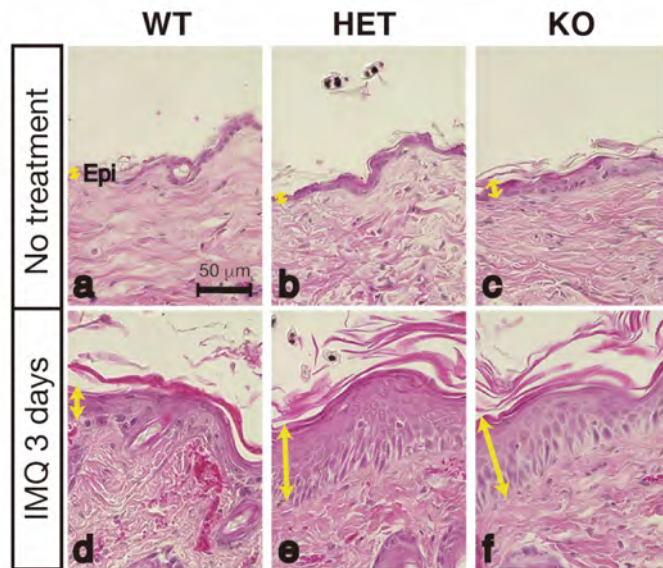
IFN- $\alpha$   
IL-12, IL-27  
TNF- $\alpha$  など



免疫系の賦活化



乾癬に類似した病態

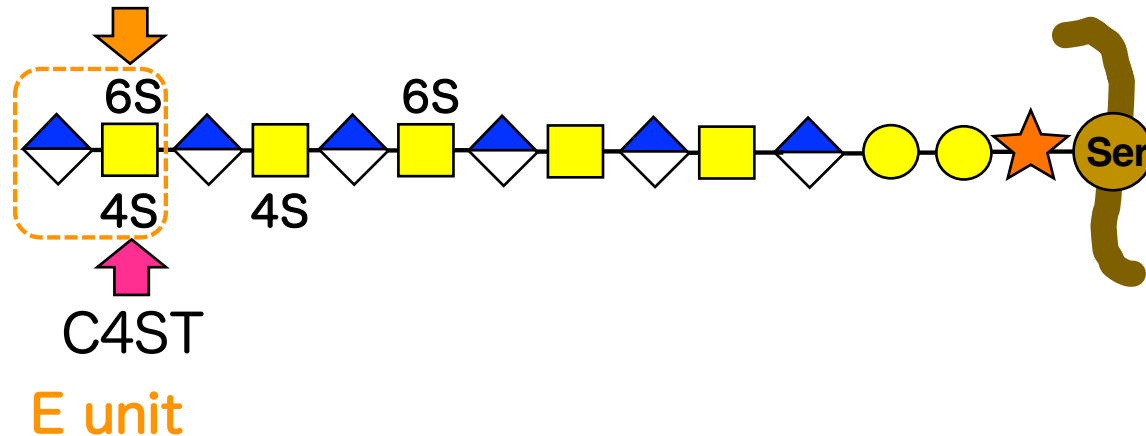


6 硫酸化CSの発現  
レベルの低下は  
皮膚バリア機能の  
低下を招き  
乾癬を発症しやす  
い弱い皮膚の原因  
になる



# E unitの合成異常

GalNAc4S-6ST



GalNAc4S-6STノックアウトマウス

マスト細胞におけるプロテアーゼ活性の減弱

[Ohtake-Niimi, S., et al. \(2010\) JBC 285, 20793-20805](#)

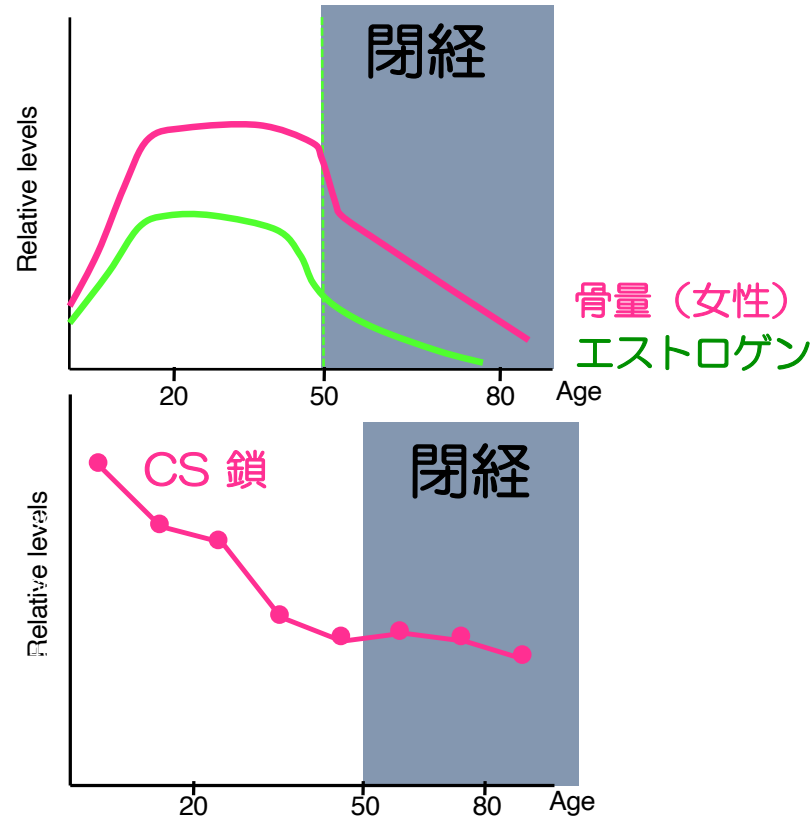
➡ 骨芽細胞の分化不全による骨密度の顕著な低下

[Koike, T. et al. \(2015\) Sci. Rep. 5, 8994](#)

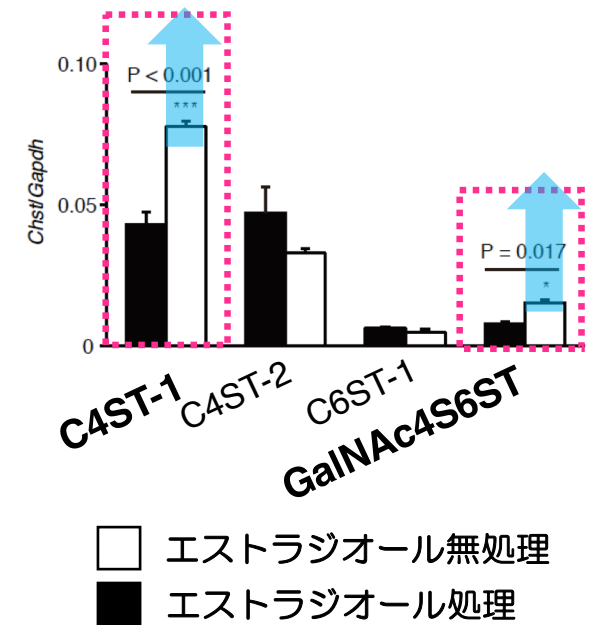
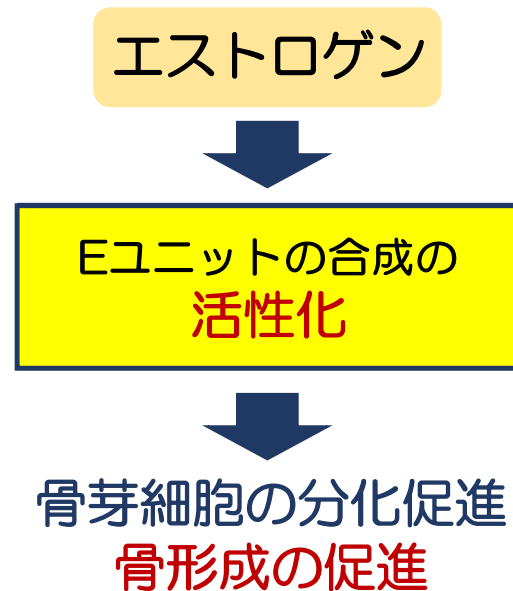
# E unit の合成はエストロゲンによる調節を受ける

Koike, T. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5, 8994

MC3T3-E1細胞  
(骨芽細胞のモデル細胞株)



Mathews MB & Glagov S,  
*J Clin Invest* 45: 1103-1111 (1966)



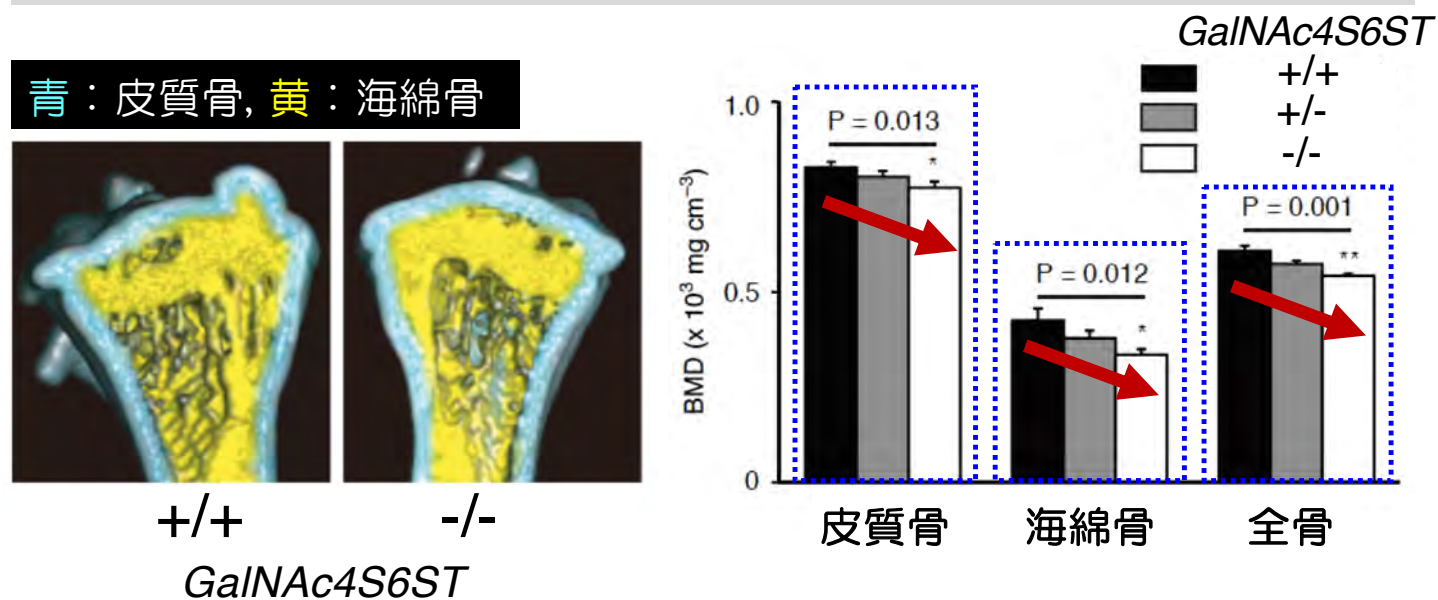
卵巣摘出により閉経状態を再現したマウスでは  
E unit 合成酵素の発現は有意に低下

# E unit の発現レベルが骨密度に与える影響

Koike, T. *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5, 8994

## *GalNAc4S6ST* 欠損マウスの解析

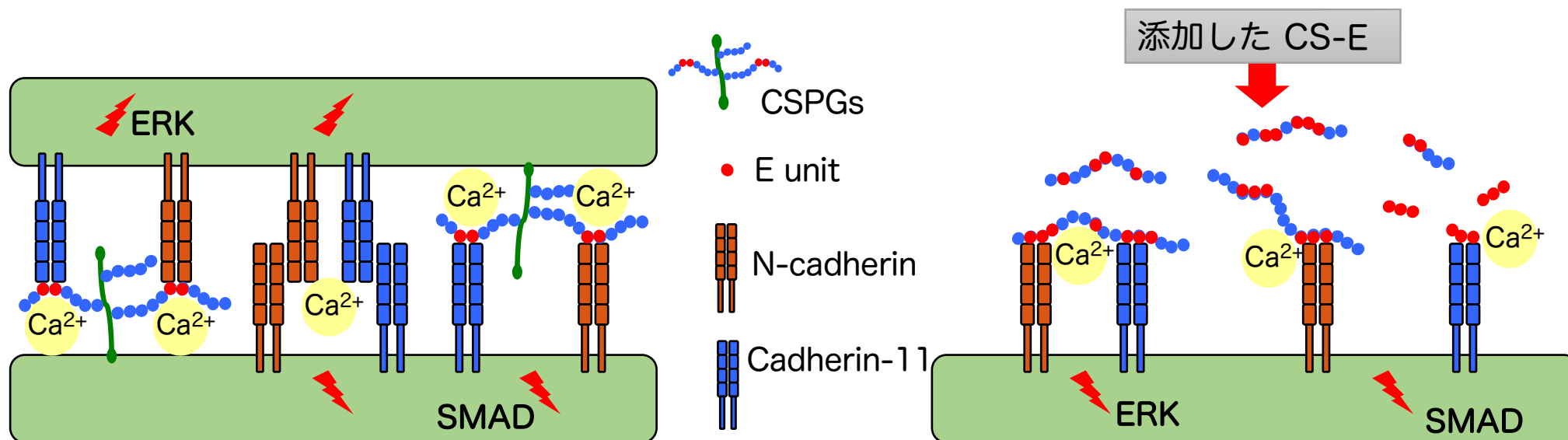
$\mu$ CT 解析 (16週齢, 脛骨)



*GalNAc4S6ST* 遺伝子の発現レベルに相関して骨密度は有意に低下した

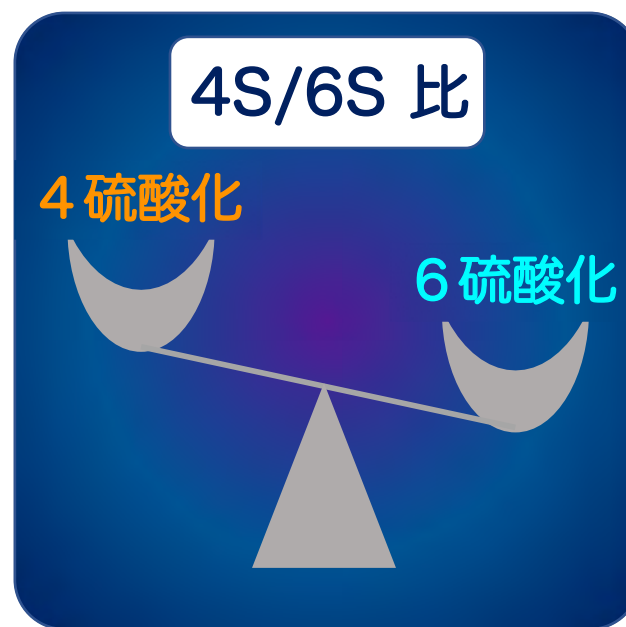
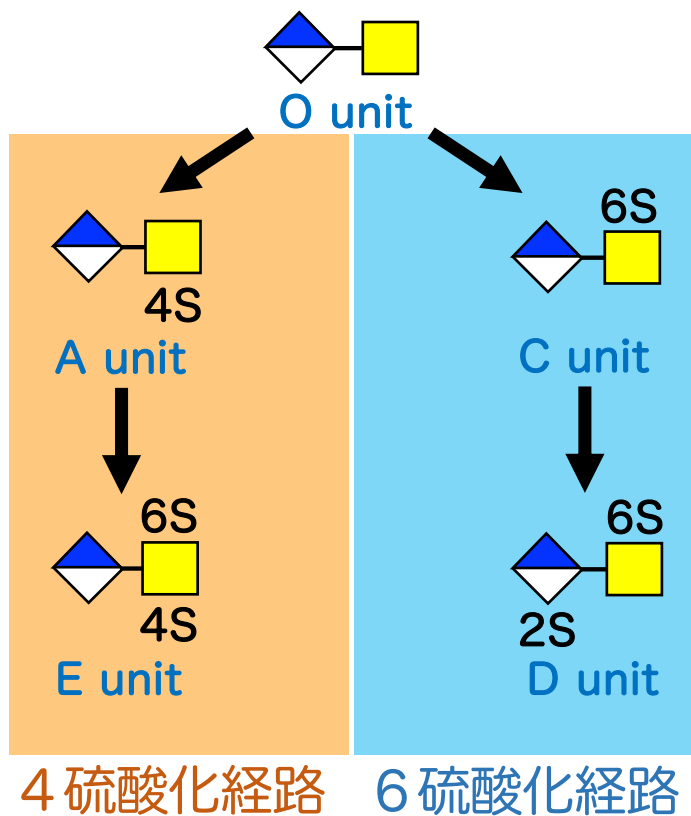
# E unit が骨密度を制御する仕組み

Koike, T. *et al.* (2012) BBRC 420, 523-529



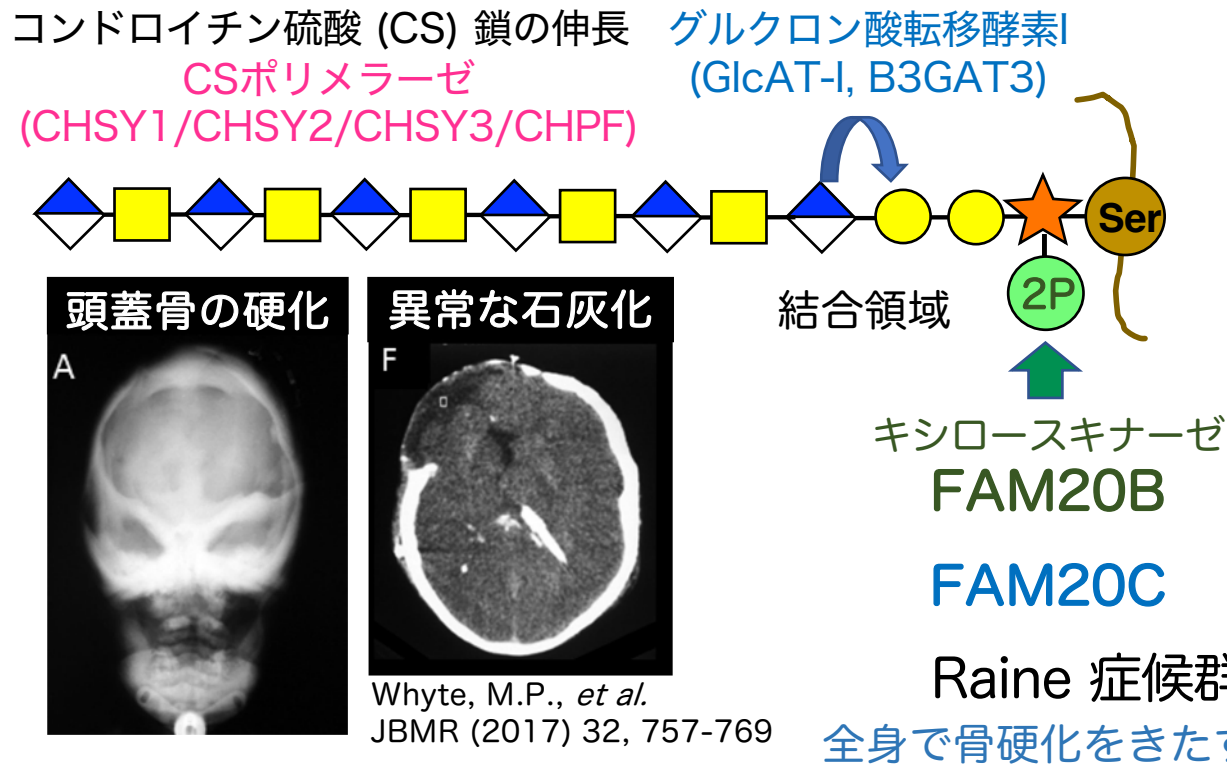
Eユニットはカドヘリンに結合することで ERK や SMADを活性化し骨芽細胞の分化を促進する

# 4S/6S比のバランス異常により引き起こされる疾患



4S/6S比は何によって制御されているのか？

# 4S/6S比のバランスを制御する機構

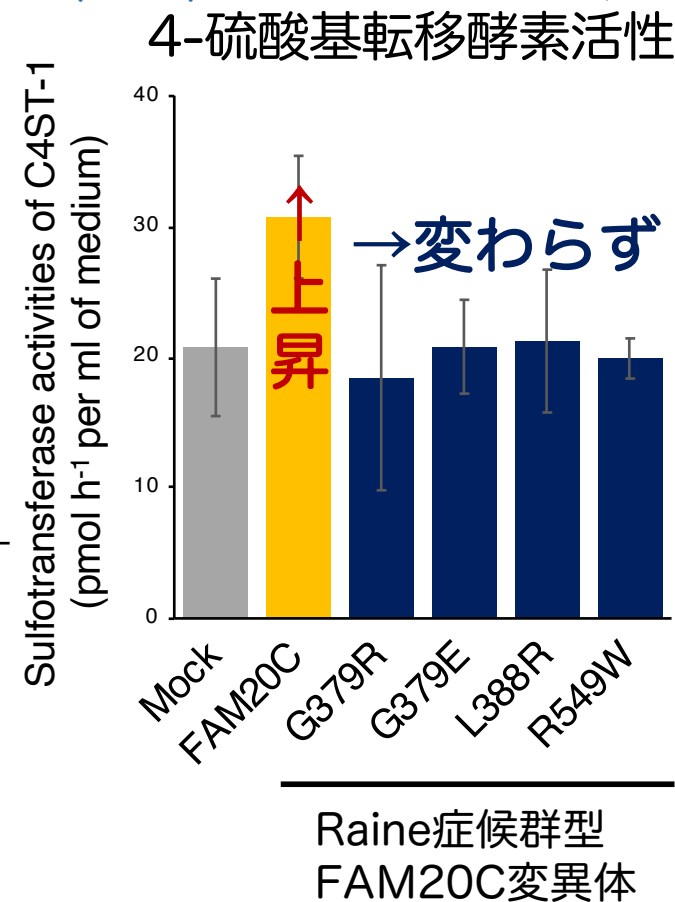
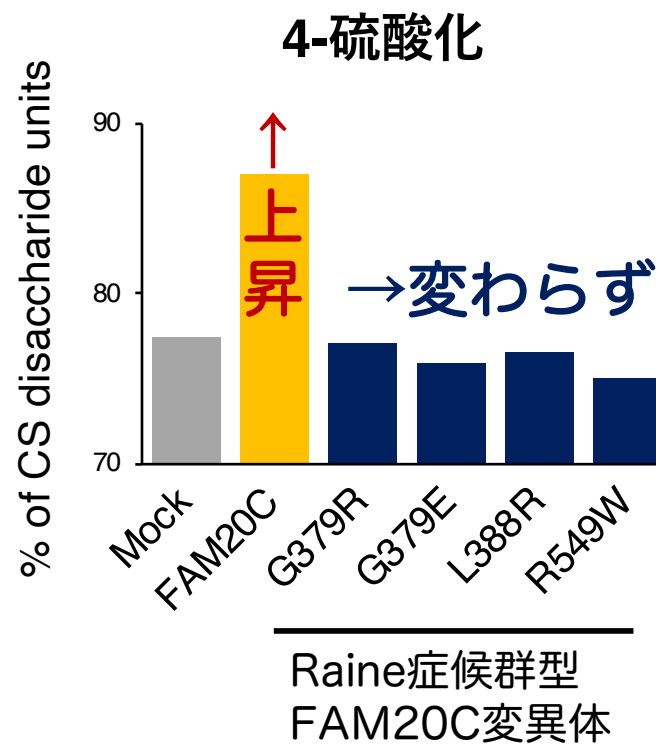
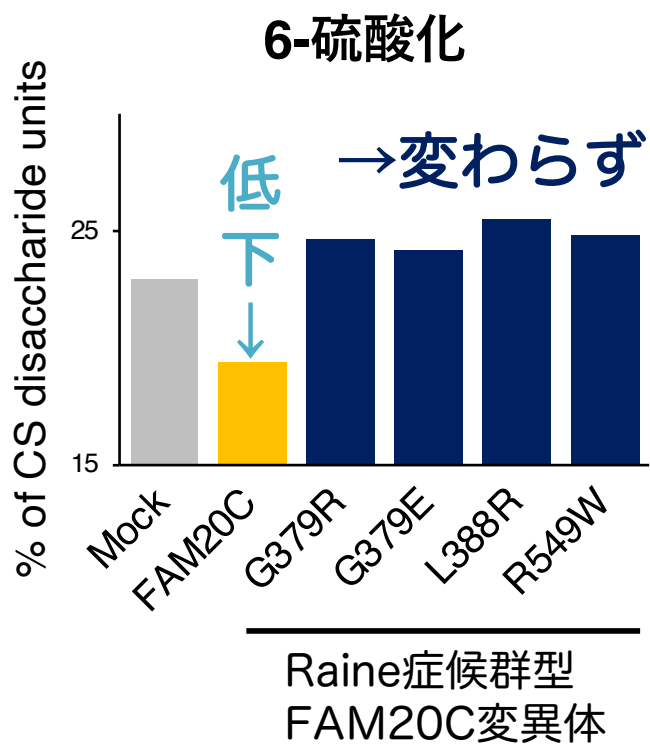


この病気の原因を調べていくうちに、  
FAM20Cは4S/6S比を調節する一つの制御因子であることがわかってきた



# Raine症候群型FAM20C変異体が硫酸化に与える影響

Koike, T. *et al.* (2022) *Nature Commun.* 13, 7952

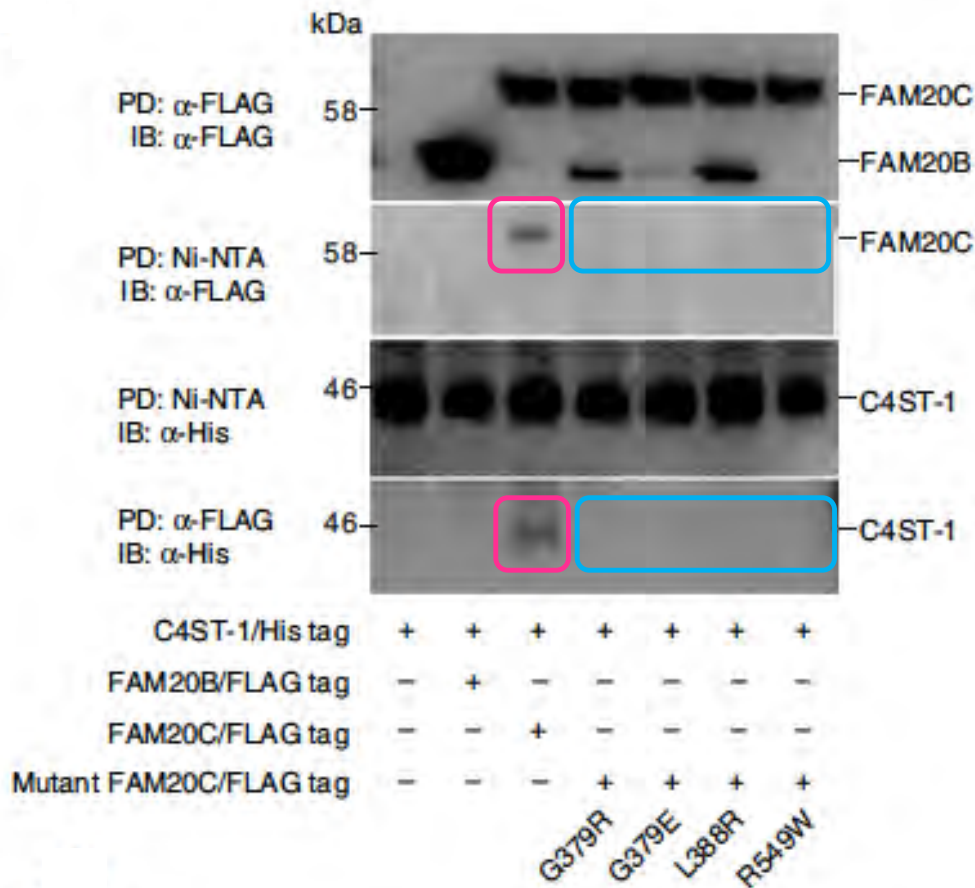


# FAM20CとC4ST-1の相互作用

Koike, T. *et al.* (2022) Nature Commun. 13, 7952

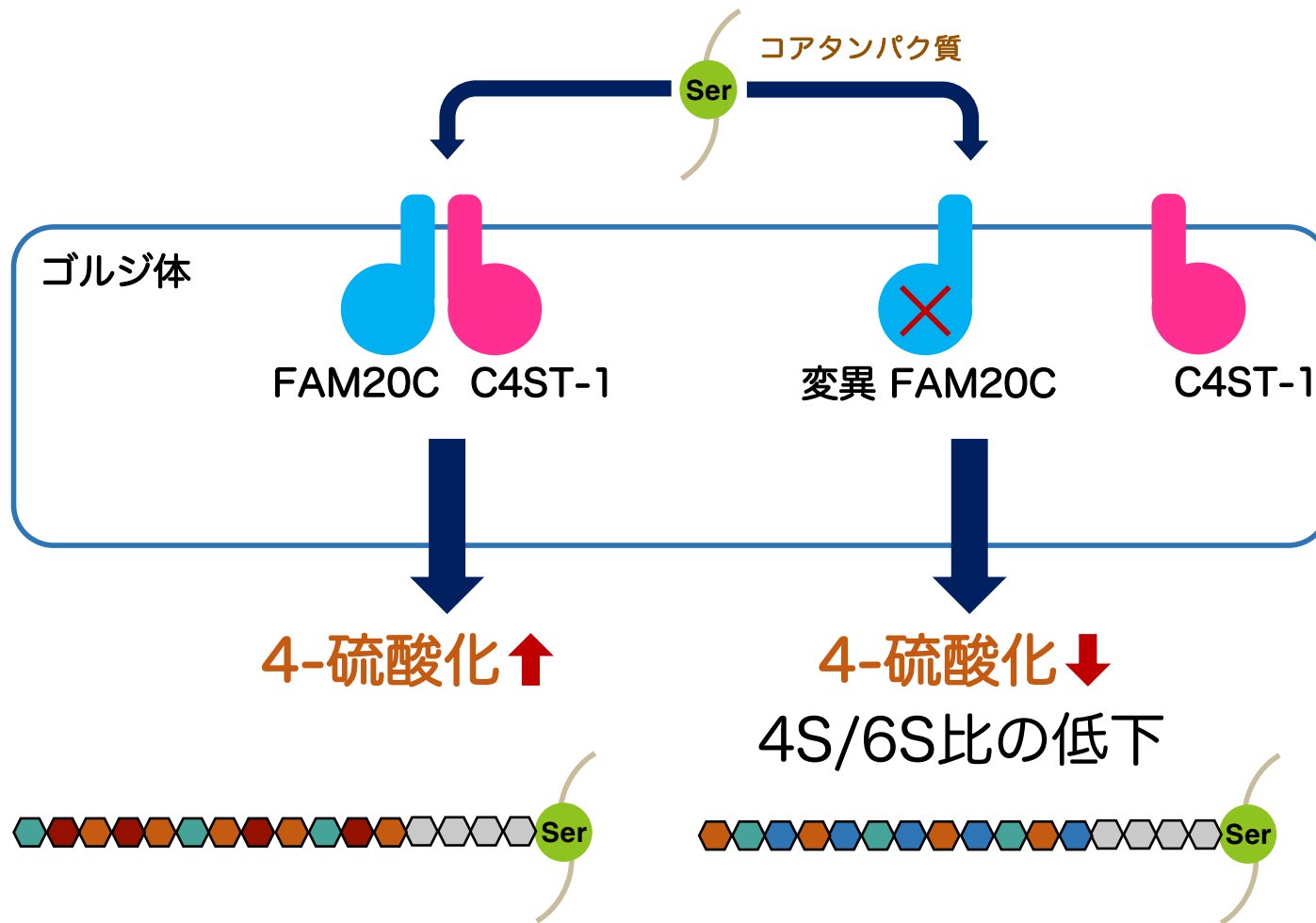
野生型FAM20CはC4ST-1と相互作用した

Raine症候群型FAM20CはC4ST-1と相互作用しない



Raine症候群型  
FAM20C変異体

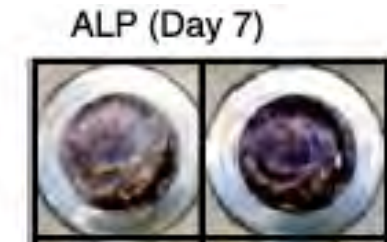
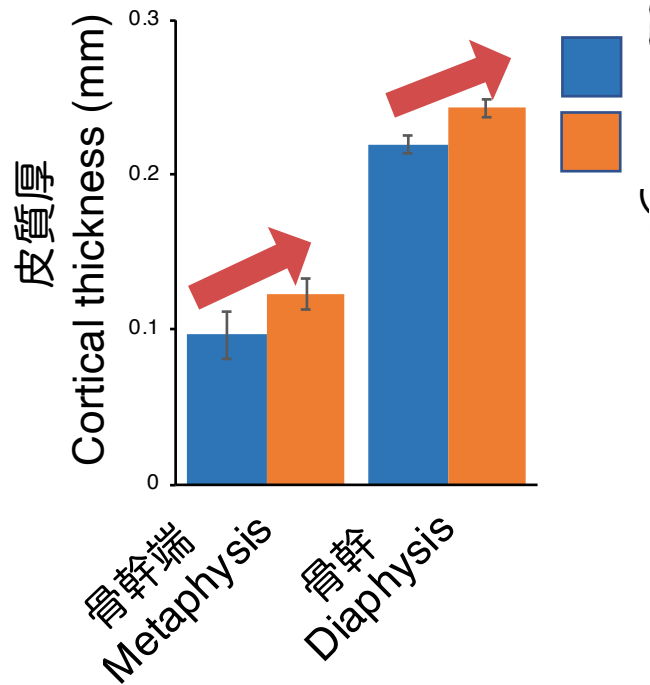
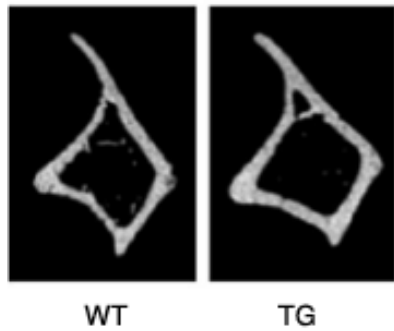
# FAM20Cによる4S/6S比の制御とその変異による4S/6S比の低下



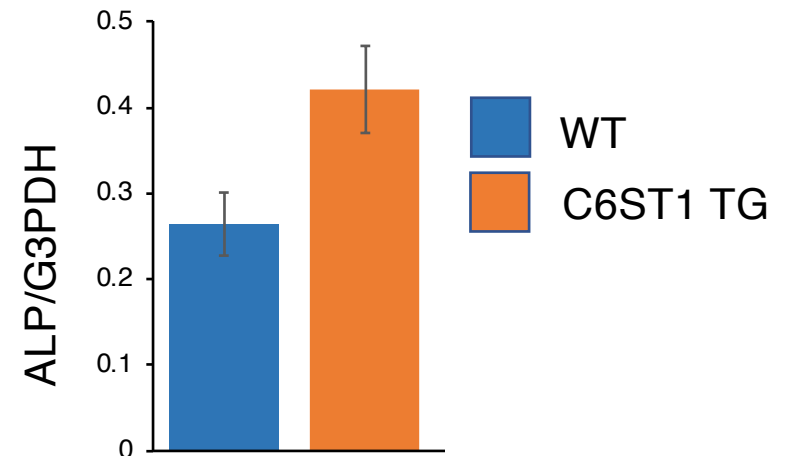
# CSの4S/6S比の低下によりRaine症候群の骨硬化を再現できるか？

C6ST-1の過剰発現により4S/6S比を低下させる

アルカリフォスファターゼ  
(骨分化マーカー)



WT C6ST1 TG



CSの4S/6S比の低下によりRaine症候群の骨硬化が再現された

Koike, T. *et al.* (2022) *Nature Commun.* 13, 7952

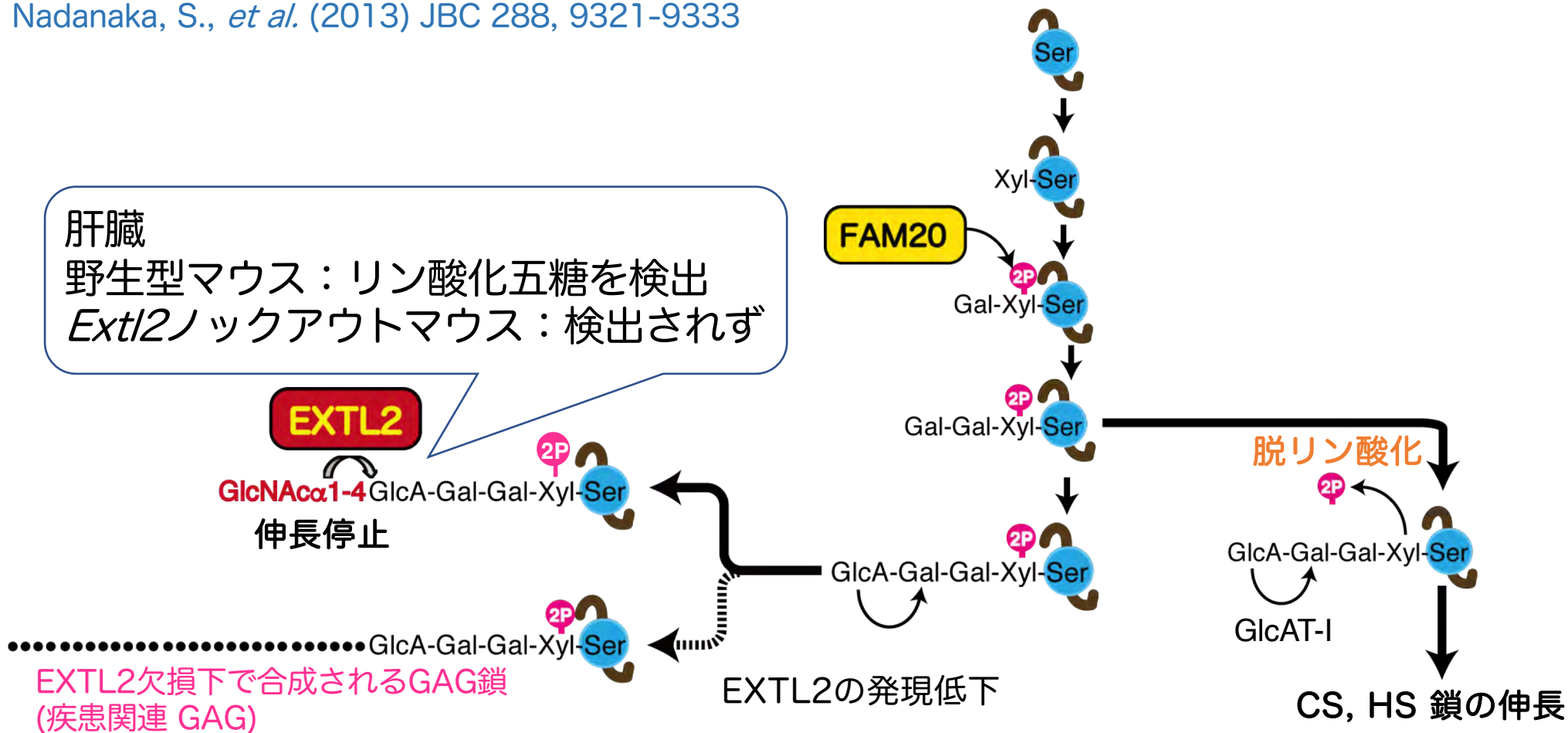
## 2. 炎症性GAGが合成される仕組みとこれに関連する疾患

Nadanaka, S., *et al.* (2013) JBC 288, 9321-9333

肝臓

野生型マウス：リン酸化五糖を検出

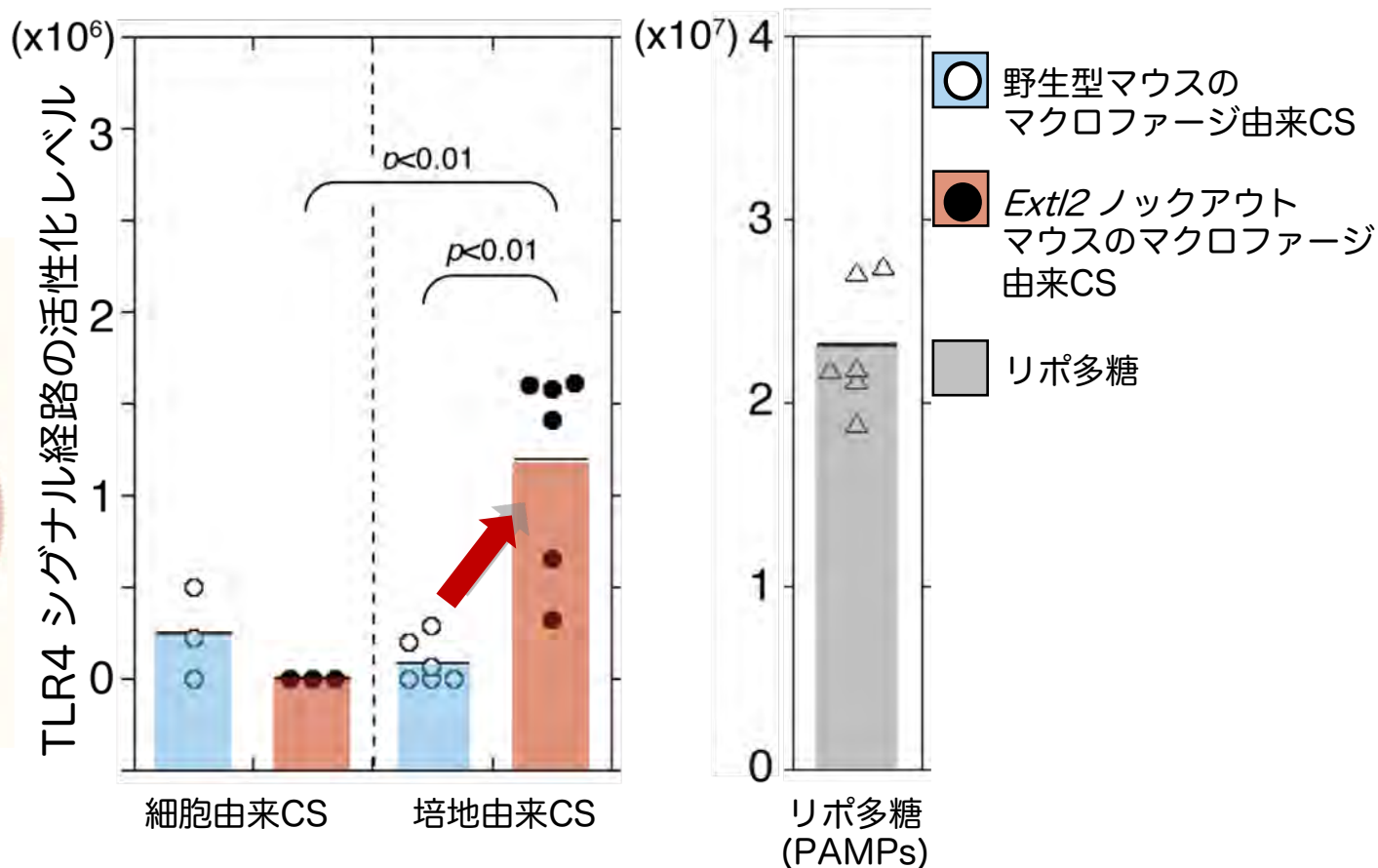
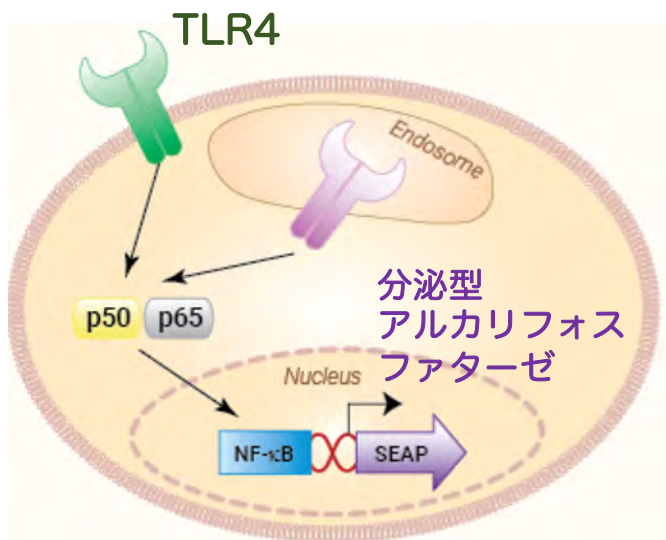
*Extl2*ノックアウトマウス：検出されず



# EXTL2欠損下で合成されるGAGは自然免疫を活性化させる



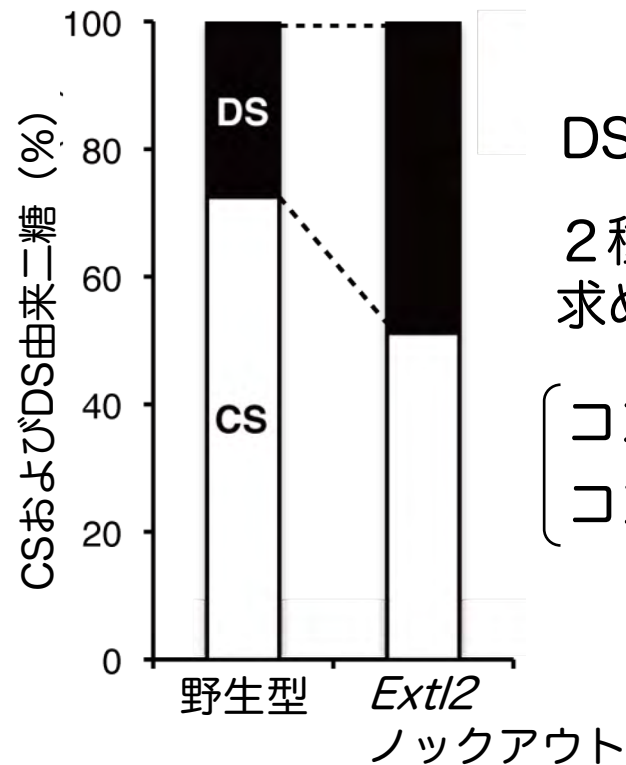
HEK-Blue™ TLR4 cells



Nadanaka, S., *et al.* (2020) *FASEB J.* 34, 8385-8401

# EXTL2欠損下で合成されるCS

Nadanaka, S., *et al.* (2020) FASEB J. 34, 8385-8401



DS: デルマタン硫酸 (コンドロイチン硫酸B)

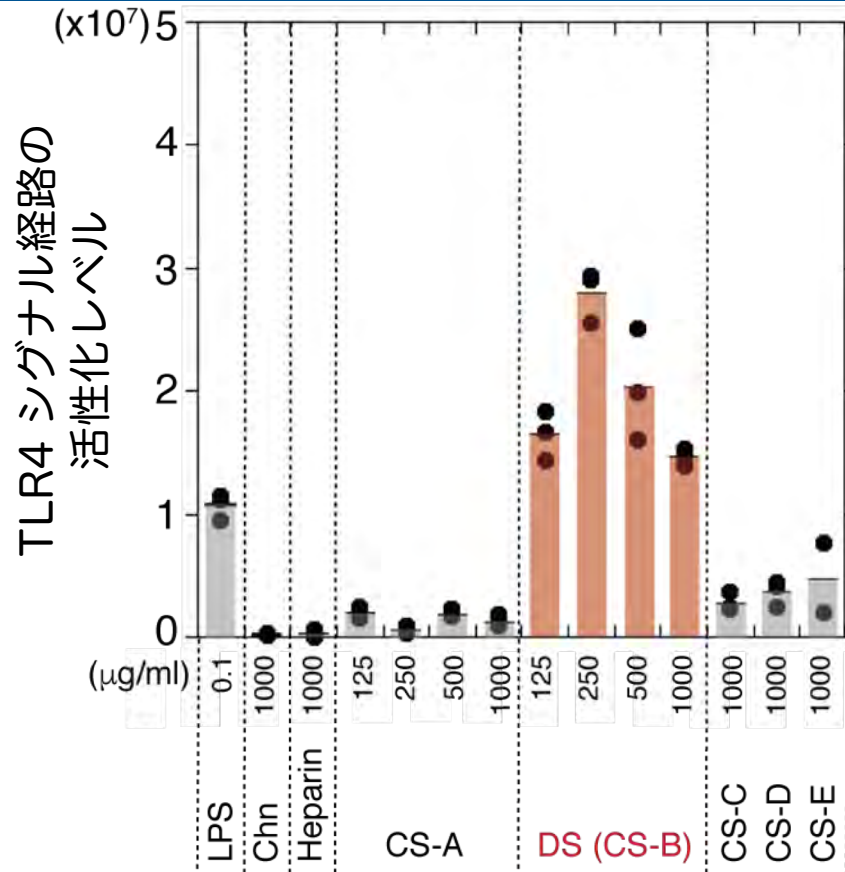
2種類のコンドロイチナーゼを使ってCSとDSの割合を求めた

〔  
コンドロイチナーゼABC : CSとDSを分解し二糖にする  
コンドロイチナーゼAC : CSのみを分解し二糖にする  
〕

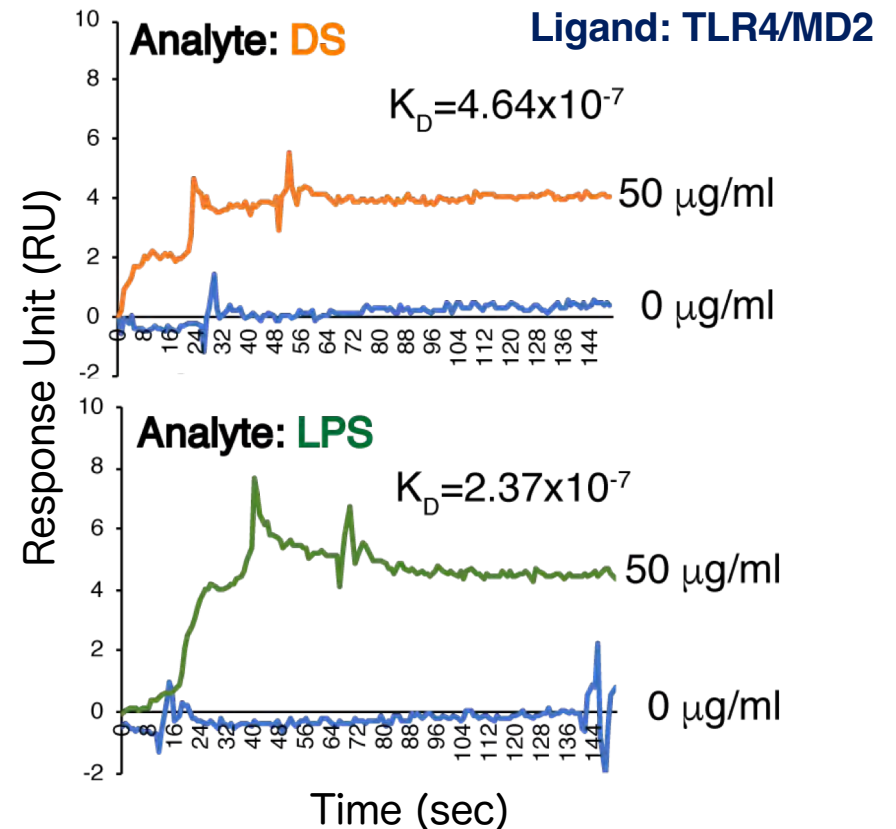
*Ext12*ノックアウトマウスで合成される炎症性CSはDSである可能性が示唆された

# DSはTLR4シグナル経路を活性化するか

Nadanaka, S., *et al.* (2020) FASEB J. 34, 8385-8401



DSはTLR4/MD2と相互作用し、TLR4経路を活性化する  
すなわち、DSは内因性の傷害関連分子パターン(DAMPs)としてはたらいっている可能性がある





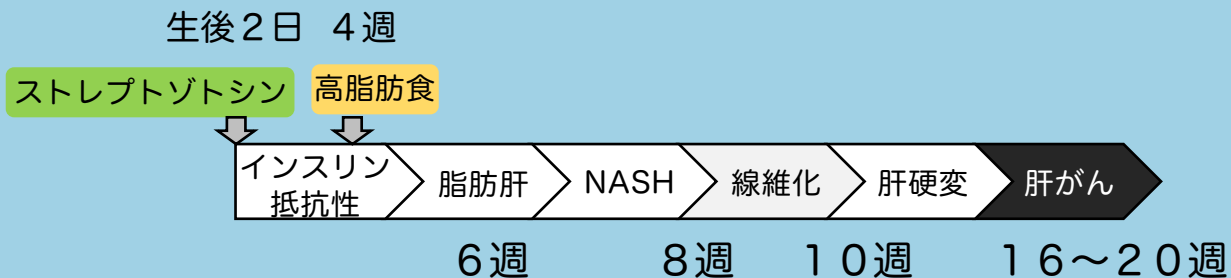
## EXTL2欠損下で合成される炎症性CSが *in vivo* でどのような影響を及ぼすか

- ▶ *Extl2*ノックアウトマウスは、定常状態では炎症性疾患を発症しているわけではない
- ▶ EXTL2は、がん抑制遺伝子 EXTファミリーに属する
- ▶ 肝臓においてEXTL2によるCSの合成が制御されることを実験的に証明していた



炎症を基盤として肝臓がんが発生する病態モデルを用いて  
*Extl2*ノックアウトマウスの解析を行う

### 非アルコール性肝炎(NASH)-肝細胞がんモデル

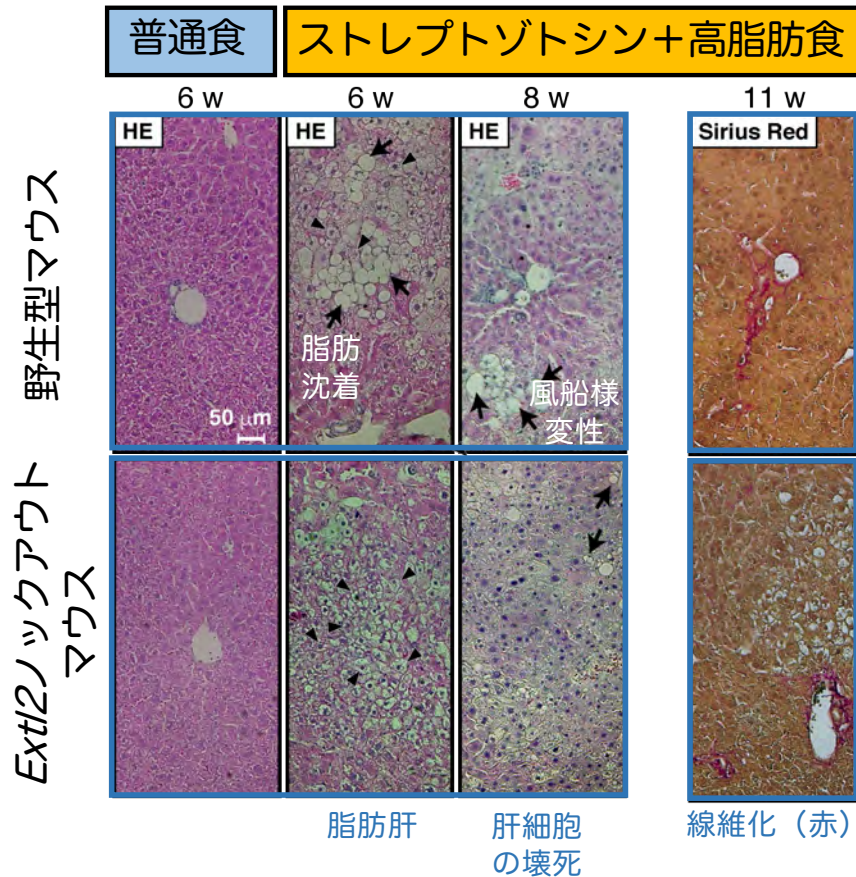


Fujii, M., *et al.* (2013)  
*Med Mol Morphol* 46(3) 141

# EXTL2欠損下で合成される炎症性CSが 炎症を基盤とする肝細胞がんの発生に与える影響

Nadanaka, S., *et al.* (2020) FASEB J. 34, 8385-8401

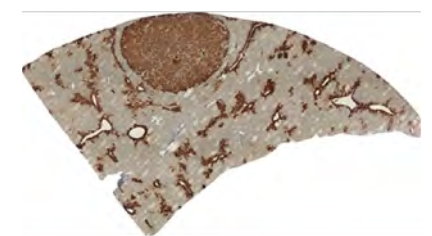
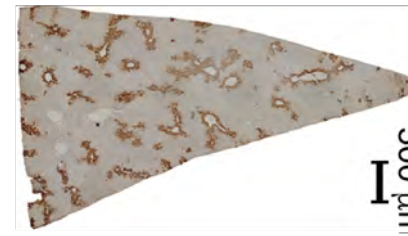
グルタミン合成酵素 (GS) : 肝細胞がんマーカー



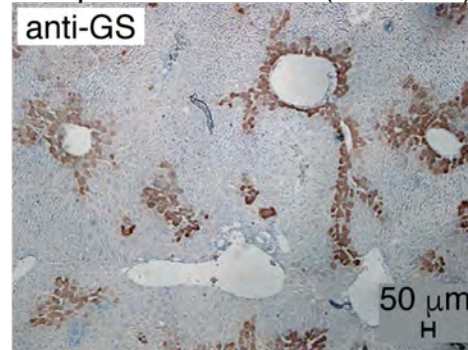
8週齢

野生型マウス

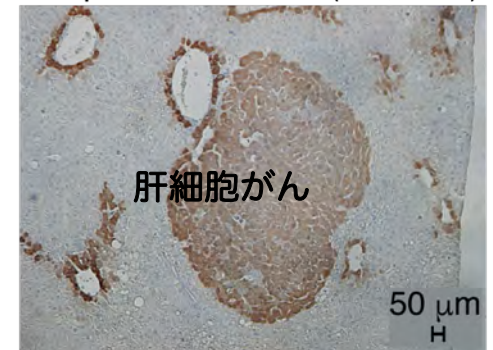
*Extl2*ノックアウトマウス



GS-positive nodules (0/10; 0%)



GS-positive nodules (7/9; 78%)



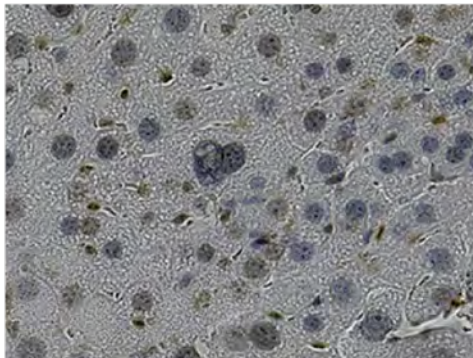
*Extl2*ノックアウトマウスでは炎症性DSの増加により肝細胞がんの発生が促進している

# EXTL2欠損下で合成される炎症性CSが炎症を基盤とする肝細胞がんの発生に与える影響

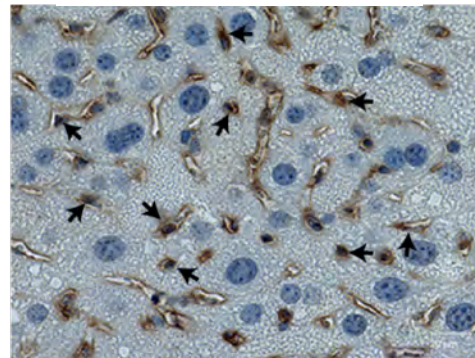
ストレプトゾトシン+高脂肪食 (8週)

肝組織における CS の発現

野生型マウス

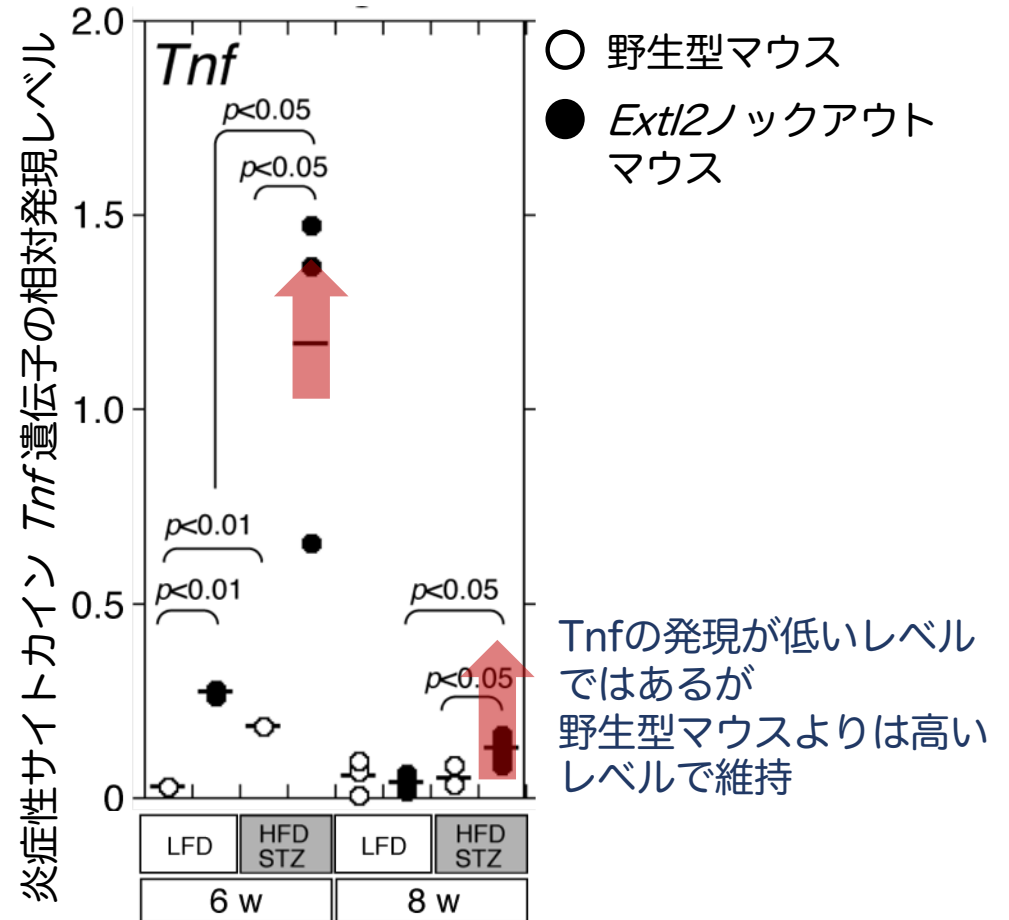


*Extl2*ノックアウトマウス



矢印：肝マクロファージ (クッパー細胞)

*Extl2*ノックアウトマウスでは肝マクロファージ (クッパー細胞) がCS/DSを発現している



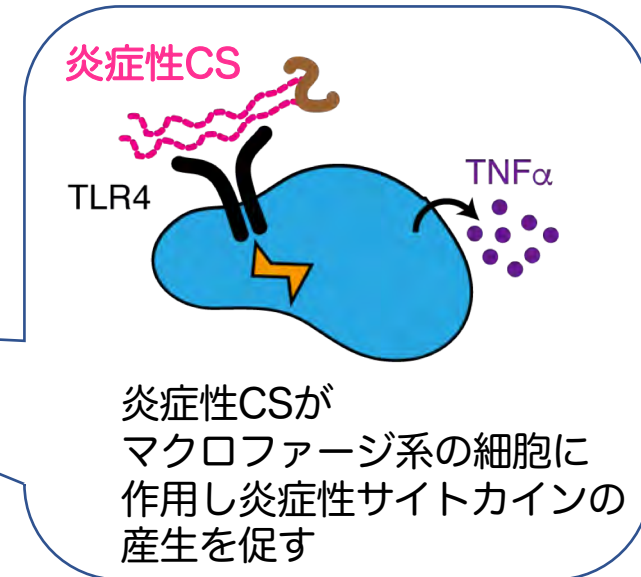
EXTL2欠損下で合成される炎症性CSがマクロファージ系細胞に作用し  
炎症性サイトカインの産生を促し慢性炎症状態をつくりだす

## 慢性炎症

急性炎症とは異なり、  
炎症性サイトカインの発現が低  
いレベルで持続する  
火は小さいが、消えずに  
くすぶった状態が続く



肝細胞がんを発生させる土壌となる



# まとめ

GAGの機能異常は  
様々な病気に関連

認知症  
乾癬  
骨粗鬆症  
Raine症候群  
慢性炎症・肝細胞がん

応用

体内あるいは細胞のあらゆる部位で  
**積極的に**はたらくGAG

PNNの構造→神経可塑性  
EGFRを介する増殖シグナル→表皮幹細胞の増殖  
カドヘリンを介する分化シグナル→骨芽細胞の分化  
TLR4シグナル→炎症性サイトカインの産生



## 謝 辞

神戸薬科大学

灘中 里美

三上 雅久

小池 敏康

北澤 和之

東京農工大学

宮田 真路

藤田医科大学

内藤 裕子

鳥取大学

田村 純一

名古屋大学

門松 健治

九州大学

山田 純

神野 尚三

愛知医科大学

羽瀧 脩躬

University of Cambridge

Sujeong Yang

James W. Fawcett

科研費  
KAKENHI

私立大学戦略的  
研究基盤形成支援事業

