HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	GM3合成酵素KOマウスにおける変形性関節症に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	笹沢, 史生
Description	配架番号：2091
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11219号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55477
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Fumio_Sasazawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　笹　沢　史　生

学 位 論 文 題 名

GM3 合成酵素 KO マウスにおける変形性関節症に関する研究
（Studies on Osteoarthritis with GM3 Synthase KO Mice)

【背景と目的】

変形性関節症 (Osteoarthritis；以下 OA)は，関節の変性・破壊により疼痛や機能障害を来す疾患であり，本邦で 2500 万人，全世界では 2 億人以上が罹患していると言われている．今日まで，OA に関与する遺伝子の解析や蛋白質関連の様々な研究がされてきたが，その細胞・分子メカニズムに関する詳細は未だ十分に解明されておらず，疾患の進行を抑制し，その自然経過を変えうる真の意味で有効な治療法は確立されていない．したがって，OA の病態に関する理解を深め，より効果的な治療につなげるためには，これまでにない新しい標的分子を用いた，軟骨変性メカニズムの解析が必要である．

そこで我々は近年注目されている糖鎖生物学に着目し，軟骨特異的にほぼすべての GSLs を欠損したマウス OA モデルで OA が進行することを示し，OA の病態においてスフィンゴ糖脂質 (Glycosphingolipids；以下 GSLs)が重要な役割を果たすことを証明した．さらに GSLs の中でも機能的重要性の高い分子，もしくは分子群を限局していく必要があると考え，我々はガングリオシドに着目した．ガングリオシドは GSLs を構成する分子群のひとつであり，シアル酸残基を有する GSLs の総称である．我々がガングリオシドに注目したのは，シアル酸という極性分子を有するため GSLs の中でもシグナル伝達において中心的な役割を果たすと考えられており，また，過去に OA との関連を示唆する報告も見られるからである．

以上より我々は OA の病態において GSLs の中でもガングリオシドが重要な機能的役割を果たしているという仮説を立て，これを検証すべく諸実験を実施した．具体的には，ガングリオシドの合成起点である GM3 合成酵素の KO マウス (*GM3S*$^{-/-}$)を用い，ガングリオシド欠損状態で加齢，メカニカルストレス，化学的な炎症の誘発などによって OA を誘発した際の関節軟骨及び軟骨細胞の変化を遺伝子変異のない野生型マウスと比較，検証した．

本研究において，GSLs の中でもガングリオシドが OA の病態において中心的な役割を果たしていることが明らかになり，その合成起点である GM3 合成酵素は OA の病態解明及び治療法の開発における標的分子となりうることを示したのでここに報告する．

【材料と方法】

KO マウス：*GM3S*$^{-/-}$はガングリオシドの合成起点である GM3 合成酵素が全身性に KO されており実質的にガングリオシド欠損状態である [18]．**コントロール動物：**野生型 C57BL/6 (WT)．**加齢による OA モデル：**両 genotype のマウスを 15 か月齢まで飼育．**Instability-induced OA モデル：**マウスの右膝関節を内側半月板の部分切除と内装側副靱帯の切離で不安定化させる．上記 *in vivo* OA モデルの膝関節は **Mankin score** で定量的に評価．***ex vivo* OA モデル：**4 週齢マウス由来の大腿骨

頭軟骨をインターロイキン 1α（IL-1α）とともに培養．培養液中に漏出するプロテオグリカンの物質量を定量．培養液中の matrix metalloproteinase-13 (MMP-13)と一酸化窒素 (NO)を測定し，骨頭軟骨は HE，サフラニン O (Saf O)による形態の評価と TUNEL 染色，MMP-13 免疫染色を施行．**マトリックス分解酵素遺伝子の発現量測定：**MMP-13，ADAMTS-5 の培養軟骨細胞中の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR で経時的に測定．**GM3 合成酵素過剰発現系の構築，解析：**WT 由来軟骨細胞で GM3 合成酵素を過剰発現させ MMP-13，ADAMTS-5 の発現量を測定．**IL1α刺激下の軟骨細胞中の GSLs profiling：**質量分析により GSLs の各サブグループの物質量の変化を定量.

【結果】

in vivo* OA モデル：**加齢，Instability-induced モデルともに WT に比べて *GM3S*$^{-/-}$で有意に OA が進行した．ex vivo* OA モデル：**プロテオグリカンの漏出量は *GM3S*$^{-/-}$で有意に高かった．Saf O 染色で *GM3S*$^{-/-}$の変性がより強く，TUNEL 染色，MMP-13 免疫染色でも *GM3S*$^{-/-}$での染色性が強かった．培養液中の MMP-13 濃度，NO 濃度ともに *GM3S*$^{-/-}$が有意に高い数値を示した．**マトリックス分解酵素遺伝子の発現量測定：**MMP-13，ADAMTS-5 ともに IL-1α での刺激開始後 12 時間で発現量はピークに達し，ピーク時には両酵素とも *GM3S*$^{-/-}$が有意に高い発言量を示した．**GM3 合成酵素過剰発現系の構築，解析：**GM3 合成酵素の過剰発現により MMP-13，ADAMTS-5 の発現が有意に抑制された．**IL-1α刺激下の軟骨細胞中の GSLs profiling：**IL-1α 刺激により主にガングリオシドが経時的に物質量を増加させ，24 時間後，48 時間後には他のサブグループに比べて有意に高い物質量を示した.

【考察】

今回行った *in vivo*，*ex vivo* 等の OA 誘発モデルすべてでガングリオシドの欠損が OA を進行させた．しかし興味深いことに加齢による OA モデルにおいては若齢では WT マウスとの変化が見られなかった．この結果はガングリオシド欠損がホメオスタシスの維持や細胞外マトリックスの脆弱性といった軟骨細胞の活動に関係しており，加齢性の変化の影響を増強している可能性があることを示している．そしてこの結果は我々が先行して行ったグルコシルセラミド合成酵素(Ugcg)の KO で作製した全 GSLs 欠損が OA の進行を助長した結果と一致している．OA の病態主に軟骨細胞アポトーシスとマトリックス分解酵素の産生増加にあると言われているが，本研究の *ex vivo* の結果は NO と TUNEL 染色性の増加が軟骨細胞アポトーシスの亢進を，MMP-13 濃度や MMP-13，ADAMTS-5 遺伝子の発現増加がマトリックス分解酵素の産生増加を示しており，滑膜や軟骨下骨の影響のない軟骨組織そのものに OA を助長する病態が存在することが明らかになった．また GM3 合成酵素の過剰発現により MMP-13，ADAMTS-5 の発現が有意に抑制されたことから，ガングリオシドが IL-1α の刺激に対し，軟骨保護的な作用を持つことが示唆された．質量分析の結果からはガングリオシドが GSLs 中の主要なサブグループであることが判明した．この結果は我々の先行研究である全 GSLs 欠損の phenotype と本研究でのガングリオシド欠損の phenotype が近似していることを裏付けていると考えられる.今後は OA 治療薬の開発を目指して，ガングリオシドの中のさらに OA 病態に特異的に作用する分子 (群)を特定すべく解析を進めていく必要がある.

【結論】

- マウスにおける OA 誘発モデルにおいてガングリオシド欠損は軟骨細胞アポトーシスやマトリックス分解酵素の発現の亢進により，OA を進行させた.
- ガングリオシドには軟骨保護的な作用がある可能性が示唆された.
- ガングリオシドは OA の病態解明，治療法開発の標的分子となる可能性が示された.