



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11219
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55478
Type	doctoral thesis
File Information	Fumio_Sasazawa.pdf



学 位 論 文

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)

2014 年 3 月

北 海 道 大 学

笹沢 史生
Sasazawa Fumio

目 次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
緒言		4 頁
略語表		7 頁
実験方法		8 頁
実験結果		18 頁
考察		33 頁
総括および結論		40 頁
引用文献		41 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Fumio Sasazawa, Tomohiro Onodera, Tadashi Yamashita, Naoki Seito, Yukinori Tsukuda, Naoki Fujitani, Yasuro Shinohara, Norimasa Iwasaki

Depletion of Gangliosides Enhances Cartilage Degradation in Mice

Osteoarthritis and Cartilage (Volume 22, Issue 2, Pages 313-322, February 2014)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. Fumio Sasazawa, Naoki Seito, Norimasa Iwasaki, Tadashi Yamashita, Yukinori Tsukuda, Tomohiro Onodera, Naoki Fujitani, Yasuro Shinohara, Akio Minami

Interruption of Glycosphingolipid and Ganglioside Synthesis Enhances Osteoarthritis Development in Mice

Gordon Research Conference on Glycolipid & Sphingolipid Biology 2012, Barga, Italy, April 22-27, 2012. (Poster session)

2. 笹沢 史生, 小野寺 智洋, 山下 匡, 岩崎 倫政

軟骨細胞におけるガングリオシドの欠損はマウス変形性関節症の進行を助長する

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会

平成 24 年 10 月 26, 27 日 (口演)

ウィル愛知 (名古屋市)

3. Fumio Sasazawa, Tomohiro Onodera, Tadashi Yamashita, Norimasa Iwasaki

Deletion of Gangliosides Enhances Cartilage Degradation in Murine Models of Osteoarthritis

ORS 2013 Annual Meeting, San Antonio, Texas, USA, January 26 – 29, 2013.
(Podium presentation, Osteoarthritis: Murine Models)

4. 笹沢 史生, 小野寺 智洋, 山下 匡, 岩崎 倫政

マウスにおけるガングリオシドの欠損は変形性関節症の進行を助長する

第 26 回日本軟骨代謝学会
平成 24 年 3 月 1, 2 日 (口演)
千里ライフサイエンスセンター (大阪市)

5. 笹沢 史生, 小野寺 智洋, 山下 匡, 岩崎 倫政

ガングリオシド GM3 合成酵素欠損は基質分解酵素や軟骨細胞アポトーシス亢進を介して変形性関節症を進行させる

第 125 回北海道整形災害外科学会
平成 25 年 6 月 15, 16 日 (口演)
北海道大学学術交流センター (札幌市)

6. Fumio Sasazawa, Tomohiro Onodera, Tadashi Yamashita, Norimasa Iwasaki

Deletion of Gangliosides Enhances Cartilage Degradation in Murine Models of Osteoarthritis

ICRS 2013 - the 11th World Congress of the International Cartilage Repair Society, Izmir, Turkey, September 15 – 18, 2013.
(Podium presentation, Basic Science / Animal Models)

7. 笹沢 史生, 小野寺 智洋, 山下 匡, 岩崎 倫政

ガングリオシド欠損は軟骨細胞アポトーシスや基質分解酵素発現亢進を介して変形性関節症を進行させる

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会

平成 25 年 10 月 17, 18 日 (ポスターセッションにおける発表)

幕張メッセ国際会議場及びコンベンションホール (千葉市)

8. Fumio Sasazawa, Tomohiro Onodera, Tadashi Yamashita, Norimasa Iwasaki

Interruption of Ganglioside Synthesis Enhances Osteoarthritis Development in Mice

CORS 2013 Venice - the 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Society, Venice, Italy, October 13 – 16, 2013.

(Podium presentation, Osteoarthritis II)

9. 笹沢 史生, 小野寺 智洋, 山下 匡, 篠原 康郎, 岩崎 倫政

ガングリオシド欠損はマトリックス分解酵素発現の亢進を介して OA 進行を助長する

第 27 回日本軟骨代謝学会

平成 24 年 2 月 28 日, 3 月 1 日 (口演)

京都市医師会館 (京都市)

10. Fumio Sasazawa, Tomohiro Onodera, Tadashi Yamashita, Naoki Fujitani, Yasuro Shinohara, Norimasa Iwasaki

Depletion of Gangliosides Enhances Cartilage Degradation through the Upregulation of Chondrocyte Apoptosis and Matrix Degrading Enzyme Expression

ORS 2014 Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, March 15 18, 2014.

(Poster presentation)

緒 言

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、進行すると日常生活動作の制限につながる。本邦で2500万人¹、全世界では2億人以上が罹患していると言われ^{2,3}、高齢者における有病率が非常に高く、健康寿命短縮の原因として懸念される。OA 関連の医療費負担の増大も著しく、先進諸国では大きな社会的問題となっている。OA の主要因として加齢、関節の不安定性や肥満による過度の力学的ストレスなどが挙げられる。老化により軟骨中のコラーゲンの弾性が低下すると、反復する力学的ストレスの負荷によりこの構造は破綻し、プロテオグリカンや水分が遊出する。その結果、軟骨の粘弾性は著しく低下し、ストレス負荷の継続により軟骨基質の変性・破壊が進行する。また、細胞・分子レベルでは、こういったストレス負荷により軟骨代謝に変化が生じ、interleukin-1 (IL-1) や tumor necrosing factor-alpha (TNF- α) などの炎症性サイトカインが誘導され、matrix metalloproteinase-13 (MMP-13), a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-4 や-5 (ADAMTS-4, ADAMTS-5) といった基質分解酵素の合成亢進による軟骨基質破壊や、nitric oxide (NO) 産生亢進による軟骨細胞アポトーシスが生じることにより、OA が進行すると言われている^{4,5}。

関節軟骨は、細胞成分が非常に疎な組織で、そのほとんどが基質成分からなり、唯一の細胞成分である軟骨細胞は約2 %程度しか存在しない。この軟骨細胞が基質を産生し、軟骨代謝を営んでいる。軟骨基質はⅡ型コラーゲンやプロテオグリカンからなり、その高い抱水能により軟骨の粘弾性を保っている。軟骨には血管・神経が存在せず、細胞自身の自己増殖能や修復能に乏しいため、ひとたび損傷や変性が発生するとその治癒は極めて困難である。

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いない。OA の治療戦略における新たな標的分子を開発するための研究が盛んに行われているが、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おらず、対症療法の域を出ていないのが現状である。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。

近年、糖鎖生物学的アプローチによる重要な生命現象 (老化・癌化等)の解析が行われている。スフィンゴ糖脂質 (Glycosphingolipids; 以下 GSLs)は脊椎動物の全身の臓器の細胞膜上に広く存在する分子であり、疎水性の脂質であるセラミドに、糖転移酵素により親水性の糖鎖が結合したもので、その糖鎖のタイプにより200~300種類のGSLsが存在すると言われている。GSLs の脂質成分であるセラミドは、細胞膜外葉に埋め込まれており、糖鎖部分は細胞外へ飛び出した形態をとっている^{6,7}。GSLs は細胞膜上でクラスターを形成し、膜を介するシグナル伝達の調節や、細胞-細胞間・細胞-細胞外マトリックス間相互作用の媒介など多様な役割を担っている⁸⁻¹¹。

これまでに我々は GSLs の合成起点であるグルコシルセラミド合成酵素 (*Ugcg* 遺伝子によってコードされる) を軟骨特異的にノックアウト (KO) したマウスを用いた研究で、ほぼすべての GSLs を欠損した関節軟骨は加齢やメカニカルストレスといった負荷の下では正常な状態を保つことができず、OA が進行することを示した¹²。このことにより OA の病態において GSLs が重要な役割を果たすことが証明されたが、*Ugcg* 遺伝子の全身性 KO マウスは胎生致死となることから^{13,14}、OA の治療薬としての応用については全身的な影響が大きすぎると考えられた。

そこで我々は GSLs の中でも機能的な重要性の高い分子、もしくは分子群を限定していく必要があると考え、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¹⁵、また、過去に OA との関連を示唆する報告も見られる^{16,17} 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。GM3 合成酵素は GSLs の合成経路においてグルコシルセラミド合成酵素の下流に位置する糖転移酵素であり (Fig.1), *GM3S*^{-/-} はガングリオシドの主要な構成要素である a-series 及び b-series を欠損するため、実質的にガングリオシド欠損状態である¹⁸。

なお、これらの実験を計画、実施していく中で、いくつかの予備実験、条件検討をおこなった。まずは *in vivo* の実験を始める前に *in vitro* の OA モデルで野生型 (WT: wild type) マウス由来軟骨細胞において本研究の標的遺伝子である GM3 合成酵素遺伝子 (*GM3S*: GM3 synthase) の発現に変化があることを確認した (予備実験(1))。次にガングリオシドの生合成経路において *GM3S* の周辺に位置するその他の糖転移酵素の遺伝子についてもその発現量を定量した (予備実験(2))。また、プロテオグリカン放出量の測定と、*in vivo* の instability-induced OA モデルの作製にあたり、至適な実験条件の検討をおこなった (予備実験(3), (4))。これらについても実験方法、実験結果のセクションで記述する。

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。

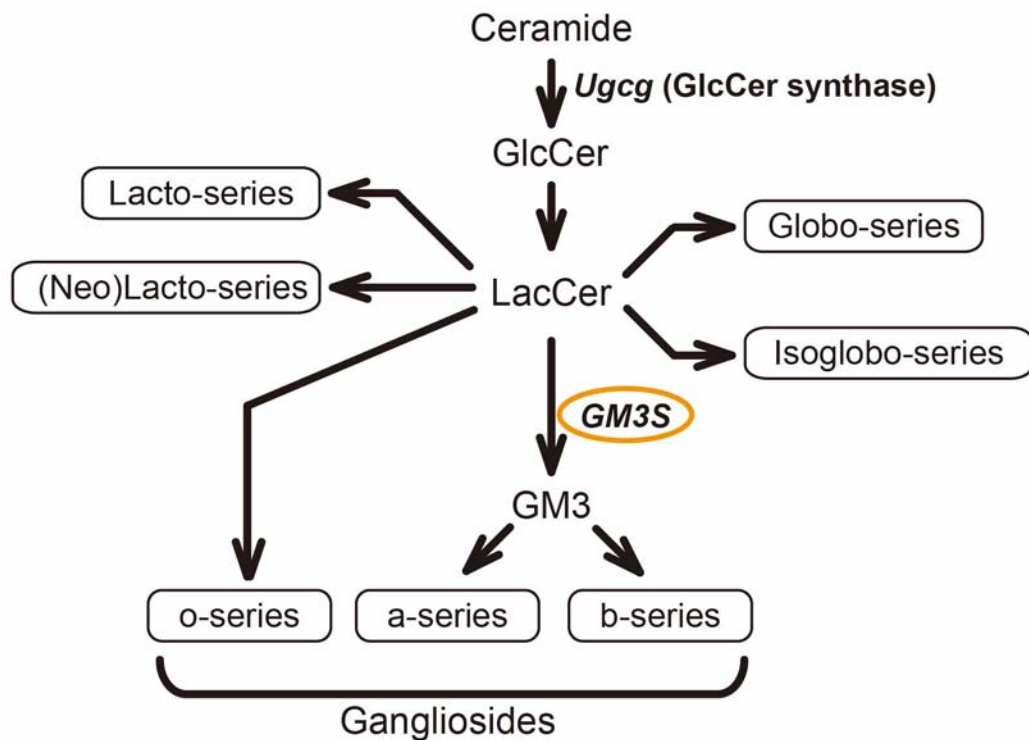


Figure 1 スフィンゴ糖脂質 (GSLs) とガングリオシド (gangliosides) の生合成経路

セラミドにグルコシルセラミド合成酵素(Ugcg) が作用してグルコースが付加されてグルコシルセラミド(GlcCer) が合成される。この反応を起点に合成される分子群をスフィンゴ糖脂質 (GSLs) と総称しており、その中のサブグループとして Lacto-series, Globo-series, (Neo)Lacto-series, Isoglobo-series, そしてガングリオシド (Ganglio-series) がある。ガングリオシドは主に GM3 合成酵素 (GM3S) によって合成される分子群であり、シアル酸残基を有する酸性糖脂質である。

略 語 表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである.

ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GM3S	GM3 synthase
GSLs	glycosphingolipids
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IL-1 α	interleukin-1alpha
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry
MMP-13	matrix metalloproteinase-13
MS	mass spectrometry
NO	nitric oxide
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
RA	rheumatoid arthritis
Saf-O	Safranin-O
SD	standard deviation
S1P	sphingosine 1-phosphate
TNF- α	tumor necrosing factor-alpha
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling
WT	wild type

実験方法

予備実験(1) ～ 野生型 (WT: wild type)マウス由来軟骨細胞における IL-1 α 刺激時の GM3 合成酵素の発現量変化

本研究を開始するにあたり、予備実験として、本研究の標的分子である GM3 合成酵素の発現量が、軟骨細胞に変性負荷がかかった際に変化することを確認しておくことにした。具体的には、野生型 C57BL/6 マウス関節軟骨から軟骨細胞を単離、前培養した後、炎症性サイトカインである IL-1 α を添加した無血清培地で 24 時間培養する。その後、軟骨細胞を回収し、total RNA を抽出、逆転写反応により cDNA として GM3 合成酵素の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。

軟骨細胞の単離、培養

生後 5 日齢のマウスの股関節・膝関節軟骨から、軟骨細胞を単離した。採取した軟骨片を 0.25% トリプシン (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) にて 37°C で 30 分間処理した後、DMEM (1% antibiotic solution + 10% FBS を含む) で 0.25% に調整した collagenase (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) にて 37°C で 4 時間処理し、軟骨細胞を単離した。単離した軟骨細胞は、24 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well 播種した。serum-free DMEM で 10 ng/ml mouse IL-1 α を添加して培養し、24 時間後に回収した。

Real-time polymerase chain reaction quantification (qPCR)

Total RNA を Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて採取し、1 μ g の Total RNA から逆転写にて cDNA を合成した。PCR DNA Engine Opticon 2 System (MJ Research, Hercules, CA) を使用し、2x SYBR Green Mastermix (DyNAmo™ HS SYBR Green qPCR Kit) を用いて DNA 合成の検出に用いた。本研究で使用したプライマーのシークエンスはすべて実験方法セクション末尾の Table 1 に示した。mRNA の発現量は全て GAPDH の発現量により標準化した。

予備実験(2) ～ 野生型マウス由来軟骨細胞における IL-1 α 刺激時のその他の糖転移酵素発現量の定量

予備実験(1)の結果を受け, GM3 合成酵素の発現量変化が, 当科の先行研究を踏まえた我々の予想とは逆の変化だったため, GM3 に関連するその他の糖転移酵素の発現量についても定量することとした.

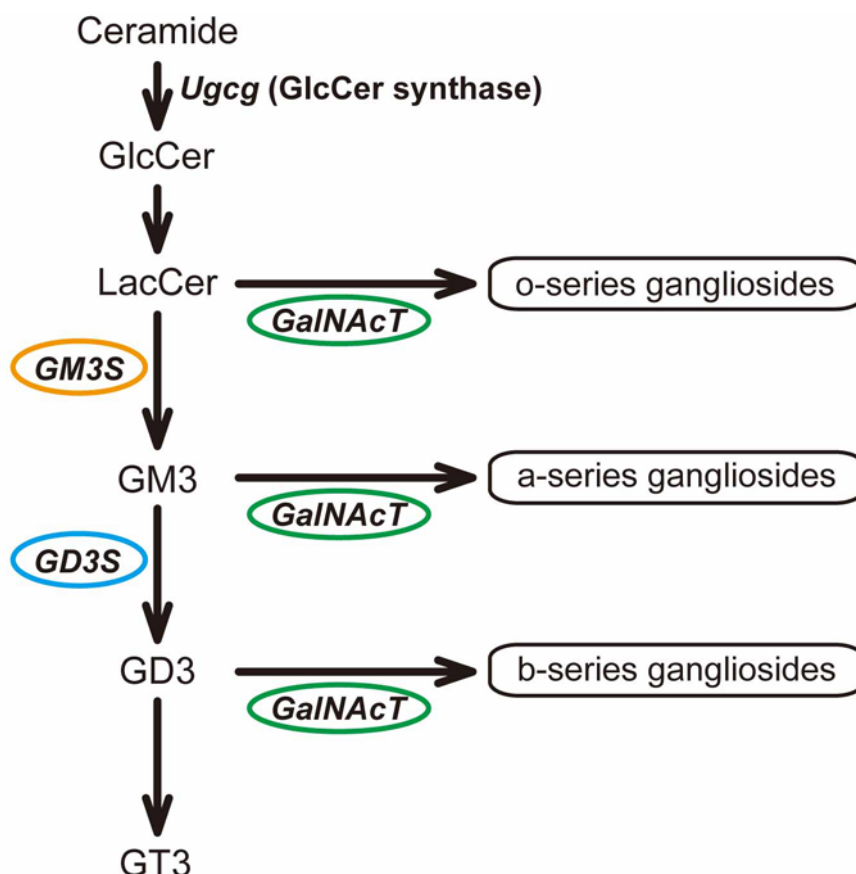


Figure 2 GM3 に関連する糖転移酵素

Fig.1 を糖転移酵素の情報を中心に改変した. LacCer, GM3, GD3 に GalNAc を付加する糖転移酵素は共通である.

Fig.2 に示すように, LacCer から GM3 合成酵素 (GM3S) によって GM3 が合成される以外に, GM3 にさらに糖鎖を付加して GD3 や GM2 (この図では a-series gangliosides に含まれる) を合成する GD3 合成酵素 (GD3S), GalNAc トランスフェラーゼ (GalNAcT) が存在する. これらの糖転移酵素についても発現量を定量することによって, IL-1 α 刺激に対して GSLs のどのサブグループの物質が増加するかの flow を予測することが可能と考えられた. 具体的な手法は予備実験(1)と共通であり, プライマーは Table 1 に示した GD3S と GalNAcT を用いた.

予備実験(3) ～ プロテオグリカン (PG) 放出量測定に要するマウス大腿骨頭数の検討

OA 研究のひとつの確立された手法として、マウス大腿骨頭軟骨を組織培養し、IL-1 α 刺激で変性させるというものがある^{5,19,20}。この手法を用いて WT と GM3 合成酵素ノックアウトマウス ($GM3S^{-/-}$) の IL-1 α に対する反応性の違いを検証する計画だが、KO マウスである $GM3S^{-/-}$ は WT ほど潤沢に入手できる状況ではないため、測定可能な必要最小量をあらかじめ WT で検討しておくことにした。

プロテオグリカン放出量は次式で表される。

$$\text{PG release [\%]} = \frac{\text{メディアウム中の PG 量}}{(\text{メディアウム中の PG 量}) + (\text{軟骨片中の PG 量})} \times 100$$

軟骨片中の PG は破碎後にプロテナーゼ K で溶解して測定するので測定は容易だが、メディアウム中の PG が低濃度となるのが最大の問題である。具体的には、1mL の DMEM 中に溶出した PG を dimethylmethylene blue (DMMB) に結合させ、656 nm で吸光度を測定し、標準曲線からプロテオグリカン量を算出するが、使用する骨頭数により溶出する PG も増加する。本検討では骨頭数を 2, 4, 6, 8, 10 として、OD₆₅₆ が吸光度計の信頼できる範囲である 0.1 以上に達するのは何骨頭からかを調べた。

GM3 合成酵素ノックアウトマウス ($GM3S^{-/-}$) 及び野生型マウスの手配

本研究でガングリオシドの欠損状態を模したモデルとして用いた GM3 合成酵素の KO マウス ($GM3S^{-/-}$) は共同研究者の山下らが C57BL/6 マウスをもとに遺伝子工学的技法を用いて作製し、本学動物実験施設で系統維持されているものである (Fig.4A)¹⁸。山下らはこのマウスが高血糖負荷に対して耐糖能異常を示すことを報告しているが、それ以外には明らかな外見上の異常、神経・行動学的な異常、代謝の異常等を認めず、成長、発育も野生型 C57BL/6 と同等であった。1 年以上生存し、生殖機能も正常である。比較対象とする野生型マウスは $GM3S^{-/-}$ のもととなった C57BL/6 を三協ラボサービス (浜松市) から購入し、搬入後 1 週間以上の順化期間を設けてから実験に使用した (Fig.4A)。なお本研究に用いた実験動物は北海道大学動物実験に関する規定および北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定に則っておこなった。

Instability-induced OA モデルの作製

Kamekura らの提唱する膝関節不安定化手技の中でも、前十字靱帯を切離せず、mild な OA を生じる medial method を用いて、8 週齢のマウスの膝関節を外科的処置にて不安定化させ、instability-induced OA モデルを作製した (Fig.3A)^{4,21}。全身麻酔下に、右膝の内側側副靱帯切離と内側半月板前方部分切除を行った (OA 側) (Fig.3B)。左膝は、靱帯や半月板の処置はせず関節包切開のみに留めた (sham 側)。術後 8 週で膝関節組織切片を作製し、OA の進行を評価した。

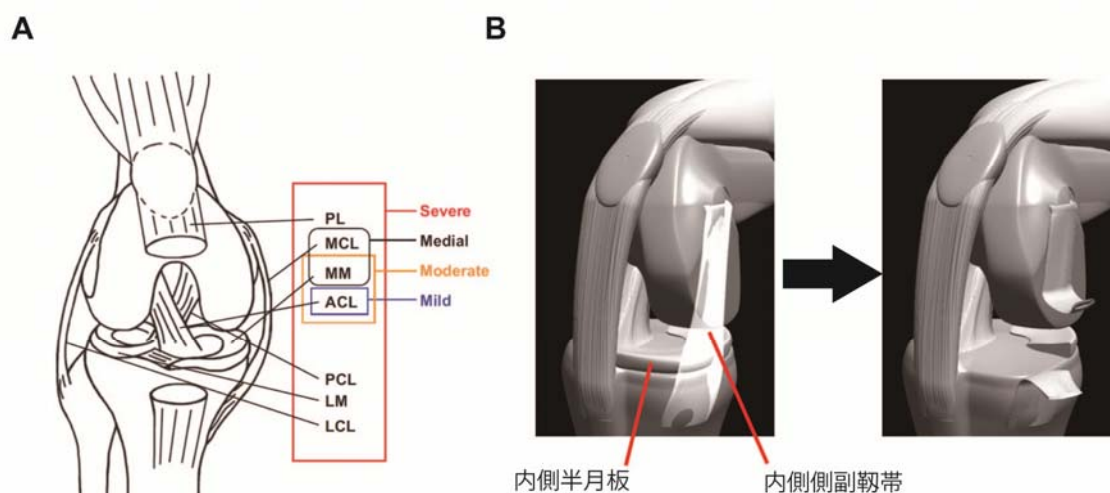


Figure 3 Instability-induced OA モデルの作製 A) Kamekura らは切離する靱帯、半月板の組み合わせにより惹起される OA の評価を行ったが、本研究では内側半月板 (MM: medial meniscus)と内側側副靱帯 (MCL: medial collateral ligament)を切離する medial method を用いた (文献4より抜粋)。 B) medial method の模式図。

予備実験(4) ～ Instability-induced OA モデルの至適術後週数の決定

結果のセクションに記載したが、instability-induced OA モデルの初回作製分は WT, *GM3S^{-/-}* ともに関節の損傷が強すぎたため、軟骨損傷の比較、評価が困難であった。この原因としてまず①手技的に習熟していない可能性があると考え、その対策として手術回数を重ねて技術を磨きつつ、②術後週数 8 週間が長すぎる可能性もあると考え、WT のマウスに instability-inducing surgery を施行し、術後 2, 4, 6, 8 週経過時点で 3 匹ずつ回収する time course study をおこなった。

加齢による OA モデル (Age-associated OA model)

加齢に伴って自然に生じてくる OA 進行の程度を評価するため、マウスを 15 か月齢まで飼育し観察した。これは、倉本和直らの『老化育成動物データ集 (http://www.proteome.jp/pjtdb/Kenkyu/Animal/normal_aging.html)』による、本研究で使用する C57BL/6 マウスの生存曲線 (Fig.4B)から、老齡かつ高率に生存が期待できる月齡と判断したためである。若齡として 4 か月齡, 老齡として 15 か月齡のマウス膝関節で組織学的評価をした。軟骨の変性の程度を下記の Mankin score²² で評価するとともに, Mankin score の評価項目のひとつとなっている軟骨細胞数について, 脛骨側関節軟骨の組織切片における全軟骨細胞をカウントし, 定量的な評価を行った⁵。

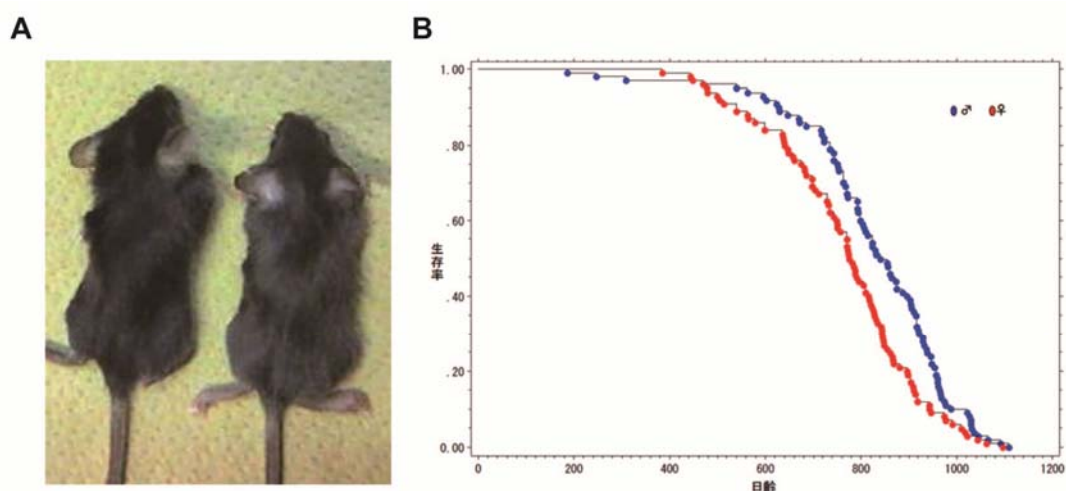


Figure 4 **A)** 4 か月齡の WT マウス (左) と *GM3S*⁺ マウス (右). 成長, 發育には差が見られない. **B)** C57BL/6 マウスの生存曲線 (倉本和直らの『老化育成動物データ集』より抜粋)

OA の組織学的評価 (Mankin score)

各 OA モデルにおける OA の重症度を評価するため, Mankin score²² にて組織学的所見をスコア化した。

<Mankin score>

- **Structure:** normal = 0, surface irregularities = 1, pannus and surface irregularities = 2, clefts to transitional zone = 3, clefts to radial zone = 4, clefts to calcified zone = 5, complete disorganization = 6.
- **Cells:** normal = 0, diffuse hypercellularity = 1, cloning = 2, hypocellularity = 3.
- **Safranin O staining:** normal = 0, slight reduction = 1, moderate reduction = 2, severe reduction = 3, no dye noted = 4.
- **Tidemark integrity:** intact = 0, crossed by blood vessels = 1.

関節の炎症所見, 滑膜増生, 骨破壊の評価

OA 病態の重要な要素として滑膜, 軟骨下骨といった軟骨外の構成組織の影響がある. 上記 Mankin score とは別に, Saouaf ら²³の用いたスコアリングシステムによって炎症, 滑膜の増生, 骨破壊についての評価を行った (原法には軟骨破壊の評価も含まれるが, 本研究では Mankin score で施行しているので省略した). 具体的にはこれらについて 0 (normal), 1 (mild), 2 (moderate), 3 (severe) の 4 段階で評価を行った.

軟骨片培養における IL-1 α 刺激による軟骨変性モデル

4 週齢のマウス大腿骨頭軟骨を採取し, 1% 抗生剤, 2 mM グルタミン酸, 10 mM HEPES, 50 μ g/ml アスコルビン酸, 10% fetal bovine serum (FBS)を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を培養液として, 37°C, 5% CO₂ で 48 時間前培養した. PBS で 3 回洗浄後, serum-free DMEM で 10 ng/ml マウス IL-1 α (Sigma, St. Louis, MO) を添加し 72 時間培養した^{19,21}. その後, 培養液および軟骨片を回収した.

組織切片の作製

Age-associated model, instability-induced model, 及び軟骨培養片における IL-1 α 刺激による軟骨変性モデルは下記の方法で組織切片作製, 各種染色をおこなった. 4%パラホルムアルデヒドでサンプルを固定, 10% EDTA (pH 7.5)で脱灰処理し, パラフィンに包埋. 5- μ m 厚のパラフィン切片をキシレンにより脱パラフィンし, アルコール処理, 水洗いした後, HE 染色, サフラニン-O (Saf-O)染色を施した. TUNEL 染色は, In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio, Otsu, Japan)を用いて施行し, DAB (Wako)で発色した. 免疫染色 (MMP-13)は, ペルオキターゼ内因性処理および chondroitinase ABC (0.25 U/ml)で処理後, MMP-13 は抗 MMP-13 ポリクローナル抗体 (Chemicon, Temecula, CA) (1:200 dilution) で 4°C overnight した. PBS 洗浄後, 二次抗体として BIOTINYLATED Anti-goat-IgG (VECTOR 社)で処理し, DAB で発色した.

IL-1 α 刺激による軟骨変性モデルにおける TUNEL 染色及び MMP-13 染色陽性細胞率の算出

各染色における陽性細胞の割合を計測するため、切片を光学顕微鏡で 400 倍に拡大し、少なくとも 3 視野を観察し、陽性細胞および陰性細胞をカウントした結果を平均した²⁴。

IL-1 α 刺激による軟骨変性モデルにおけるプロテオグリカン放出量の測定

軟骨片はプロテナーゼ K で処理し溶解させた。培養液と軟骨片溶解液の各々に dimethylmethylene blue (DMMB) を添加し、プロテオグリカンを吸着させ、656 nm で吸光度を測定し、標準曲線からプロテオグリカン量を算出した。全体に占めるメディウム中へのプロテオグリカンの放出量を測定し、次式を用いてパーセンテージで表した。

$$\text{PG release [\%]} = \frac{\text{メディウム中の PG 量}}{(\text{メディウム中の PG 量}) + (\text{軟骨片中の PG 量})} \times 100$$

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウス MMP-13 ELISA キット (Usnclife, Missouri, TX) を用いて、軟骨片培養液中の MMP-13 量を測定した。抗 MMP-13 抗体 (biotin-conjugated polyclonal antibody) をプレコートしたプレートに軟骨細胞培養液を分注し、avidin conjugated to Horseradish (HRP) を加え、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) 基質にて発色させた。450 nm で吸光度を測定し、標準曲線から MMP-13 量を算出した。

Nitric oxide (NO) の測定

Griess Reagent System (Promega, Madison, WI) を用いて、NO の分解産物であり不揮発性で安定した NO₂⁻ を測定することで、軟骨片培養液中に産生された NO を測定した。培養液 50 μ l に sulfanilamide 溶液を 50 μ l 加え、10 分間遮光してインキュベート。さらに N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) 溶液 50 μ l を加え 10 分間遮光してインキュベートした後、540 nm で吸光度を測定し、スタンダードカーブから NO₂⁻ 量を算出した。

軟骨細胞の単離, 培養 (経時的発現量測定)

軟骨細胞の単離と前培養は実験方法(1)の部分に記載した方法と同様. 経時的な発現量の測定のために培養後 0, 6, 12, 24, 48 時間後に回収した. これらは MMP-13, ADAMTS-5 の mRNA 量測定, GSLs 測定など, さらなる解析に用いた.

Real-time polymerase chain reaction quantification (qPCR)

定量的 RT-PCR の方法は予備実験(1)の下に記載した. 使用したプライマーのシーケンスは, 下記 Table 1 の通りである.

GM3S	forward	5'-ATGCCAAGTGAGTTCACCTCT-3'
	reverse	5'-ACTCCAAATGCAACCAACGTG-3'
GD3S	forward	5'-GCTACCCGTAGGAGCCAGT-3'
	reverse	5'-CAGCACCCCTTGACAAATCT-3'
GalNAcT	forward	5'-AGCAGACACAGTCCGCTTTCT-3'
	reverse	5'-CCTTGGGGTAGGGATGATGGT-3'
MMP-13-encoding gene	forward	5'-TTGGCCACTCCCTAGGTCTG-3'
	reverse	5'-GGTTGGGGTCTTCATCGC-3'
ADAMTS-5-encoding gene	forward	5'-GGAGCGAGGCCATTTACAAC-3'
	reverse	5'-CGTAGACAAGGTAGCCCACTTT-3'
GAPDH-encoding gene (a control housekeeping gene)	forward	5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTC-3'
	reverse	5'-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3'

Table 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

GM3 合成酵素過剰発現系の構築と IL-1 α 刺激への反応の検証

GM3 合成酵素の KO によるガングリオシド欠損が OA 発症に及ぼす影響を KO マウスで検証しているが、より多角的な検証を行うため、WT マウス由来軟骨細胞に一過性の GM3 合成酵素過剰発現状態を作り、IL-1 α 刺激に対してマトリックス分解酵素の発現がどのように変化するかを検討した。上記の方法で WT マウスの関節軟骨から単離した軟骨細胞に、Lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて、OriGene 社 (Rockville, MD)より購入した GM3 合成酵素発現ベクター (St3gal5 (NM_001035228) Mouse cDNA Clone (OriGene MC209401))を遺伝子導入した。コントロールとして mock vector (pCMV6-Entry (OriGene PS100001))を用いた。

具体的には、24-well の細胞培養プレートに、 6×10^4 cells/well ずつ単離軟骨細胞を播種し 24 時間前培養を行う。1 well あたり 500 ng のベクター (DNA), 1.25 μ l の Plus Reagent (Lipofectamine LTX に付属), 100 μ l の Opti-MEM I 液体培地 (Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA), そして 5 μ l の Lipofectamine LTX を加えた”DNA/Lipofectamine LTX complex”を調整する。前培養後に各 well に 100 μ l の DNA/Lipofectamine LTX complex を加える。

この遺伝子導入から 24 時間後に培地を交換し、上記と同様に IL-1 α を加えて 12 時間培養し、引き続き mRNA の抽出、定量的 RT-PCR を行って MMP-13 と ADAMTS-5 の発現量の定量を行った。

培養軟骨細胞中の GSLs の定量化

我々は、軟骨細胞ペレットから GSLs 由来糖鎖を抽出し、質量分析にて GSLs を定量化した。まず、培養軟骨細胞をセルスクレーパーで回収し、PBS で 3 回洗浄後に遠心し、ペレットにした。軟骨細胞ペレットに、GSLs 特異的な酵素 endoglycoceramidases II (EGCase II) (Takara Bio, Otsu, Japan) を加えて GSLs 由来糖鎖を抽出した。Glycoblotting 後、Ultraflex II TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany)にて、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)解析をした。

統計分析

すべてのデータは平均値±標準偏差 (SD)をもって表記した。すべてのデータは Bartlett の方法で等分散性を確認し、連続変数は二元配置分散分析 (two-way factorial analysis of valiance(ANOVA))とそれに続く Tukey-Kramer の多重比較検定で有意差の検定を行った。等分散性が認められないデータについては Wilcoxon のノンパラメトリック検定と Bonferroni 法による調整を行った。2 群間のデータの比較は Student's *t* test を用いた。判定は P 値<0.05 で有意差ありとした。すべての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 10.0 (SAS Institute, Cary, NC)を用いて行った。

実験結果

予備実験(1)の結果 ～ IL-1 α の刺激により GM3 合成酵素の発現量は減少した

Seito らによる当科の先行研究では、野生型マウス由来軟骨細胞に IL-1 α 刺激を加えると GM3 合成酵素より上流の糖転移酵素であるグルコシドセラミド合成酵素 (Ugcg) の発現量は増加した¹²。また、この結果と一致して、Ugcg で合成されるスフィンゴ糖脂質 (glycosphingolipids: GSLs) の総量も増加することが質量分析によって確認されている。ここでいう総 GSLs とは Fig.1 で示すところの GlcCer, LacCer, GM3 を含むガングリオシド, Lacto-series, Globo-series, (Neo)Lacto-series, Isoglobo-series を意味する。当初我々は Ugcg の下流に存在する GM3 合成酵素も発現量が増加するものと予想していたが、結果は Fig.5 に示すように、IL-1 α 刺激によって有意に減少した。

GM3 合成酵素の KO が OA の発症, 進行に関して、先行研究の Ugcg の KO 同様に、より増悪させる方向に作用するのか、それとも進行を抑制するのかは予見できないが、この結果をもって、GM3 合成酵素と OA の病態の間に何らかの関連性が示唆されると判断し、KO マウスを用いる *in vivo* OA model の作製と軟骨細胞を用いた *in vitro* の実験を開始することにした。

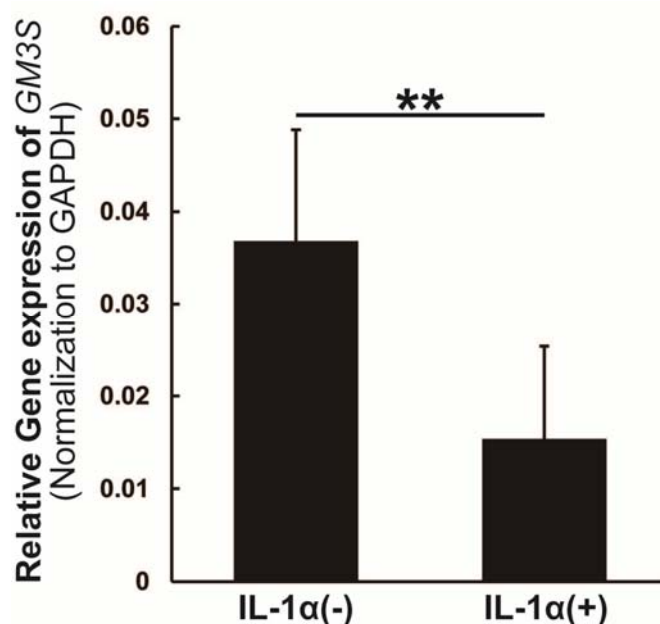


Figure 5 予備実験(1) WT マウス由来軟骨細胞を IL-1 α で刺激した際の GM3 合成酵素 (GM3S) の発現量 IL-1 α 刺激により有意に発現量が減少した。 (n=5, **= $P < 0.01$).

また、この結果と関連して、先に示した Fig.1 を糖転移酵素の情報を中心として Fig.2

として再掲するが、ガングリオシドに関与する糖転移酵素として GM3 合成酵素以外に GD3 合成酵素 (GD3S), GalNAc トランスフェラーゼ (GalNAcT) が存在する (Fig.2). Ugcg を KO した先行研究と予備実験(1)の結果から, 野生型マウス由来軟骨細胞を IL-1 α で刺激した際の発現量変化として Ugcg $\uparrow$, GM3S $\downarrow$ であり, その他の糖転移酵素の発現量の増減によって GSLs のどのサブグループの物質が増加するかの flow を予測することが可能と考えられた. そこで予備実験(2)として, 予備実験(1)で用いた cDNA での GD3S, GalNAcT の発現量を定量することとした.

予備実験(2)の結果 ～ IL-1 α の刺激により GD3S の発現量は減少し, GalNAcT の発現量は増加した

結果を Fig.6 に示す. これらの結果から, Fig.7 に示すような増減関係が得られた. この増減だけを反映するとすれば IL-1 α 刺激時には o-series gangliosides が誘導されることになるが, これらの変化が IL-1 α により直接的に生じたものなのか, 他の反応の結果の代償性変化なのかは現時点では不明である. しかし, GM3 合成酵素を含む糖転移酵素に変化が生じることは確認できた.

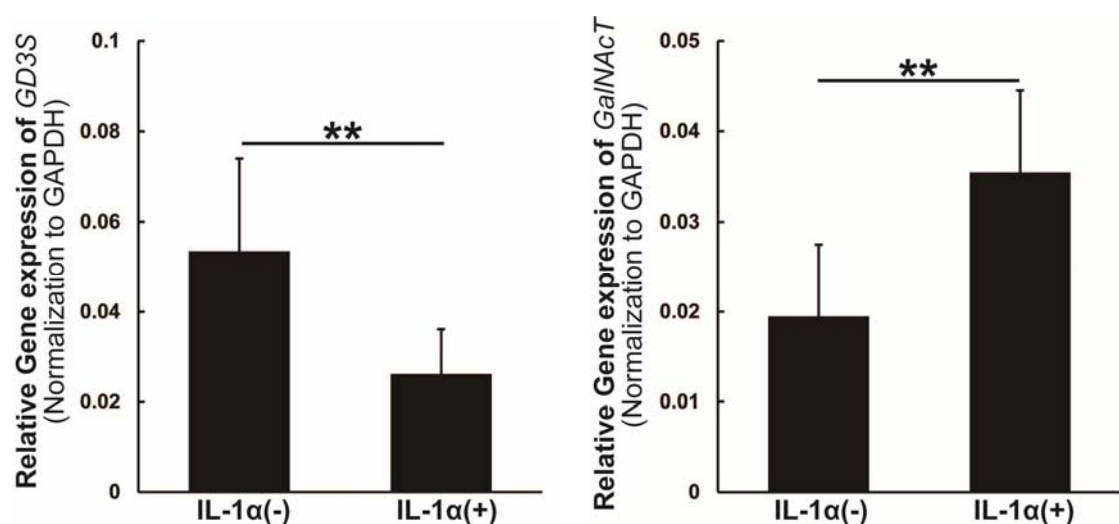


Figure 6 予備実験(2) WT マウス由来軟骨細胞を IL-1 α で刺激した際の GD3S, GalNAcT の発現量 IL-1 α 刺激により GD3S は有意に発現量が減少し, GalNAcT は有意に増加した. (n = 5, ** = $P < 0.01$).

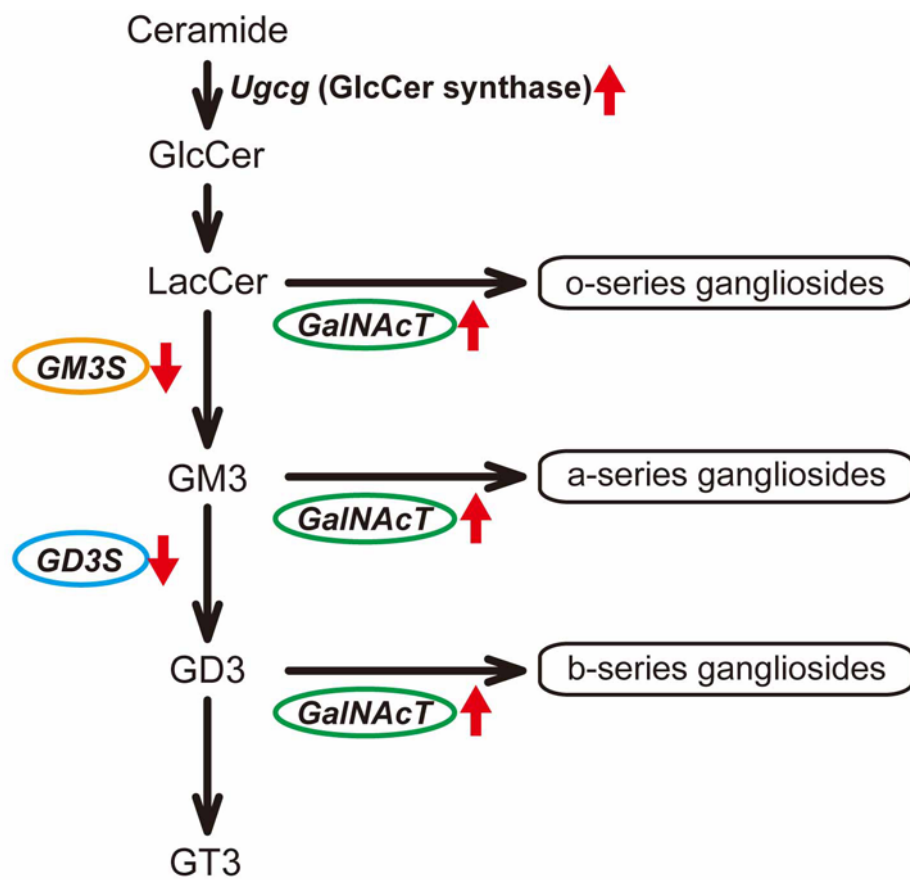


Figure 7 GM3に関係した糖転移酵素のIL-1 α 刺激による発現量変化 先行研究から *Ugcg* $\uparrow$ が判明しているが、その下流は *GM3S* $\downarrow$, *GD3S* $\downarrow$, *GalNAcT* $\uparrow$ であり、この増減だけから言えば o-series gangliosides が誘導されることになる。

予備実験(3)の結果 ～ PG 放出量の測定には8 骨頭以上が必要である

骨頭数と OD₆₅₆ の関係を Fig.8 に示す. この結果からは実データとして 10 骨頭で OD₆₅₆ が始めて 0.1 を超えたが, 回帰直線からは 8 骨頭で 0.1 を超える. 今回の検討からは必要最小量として 8 骨頭/well を用いることにする.

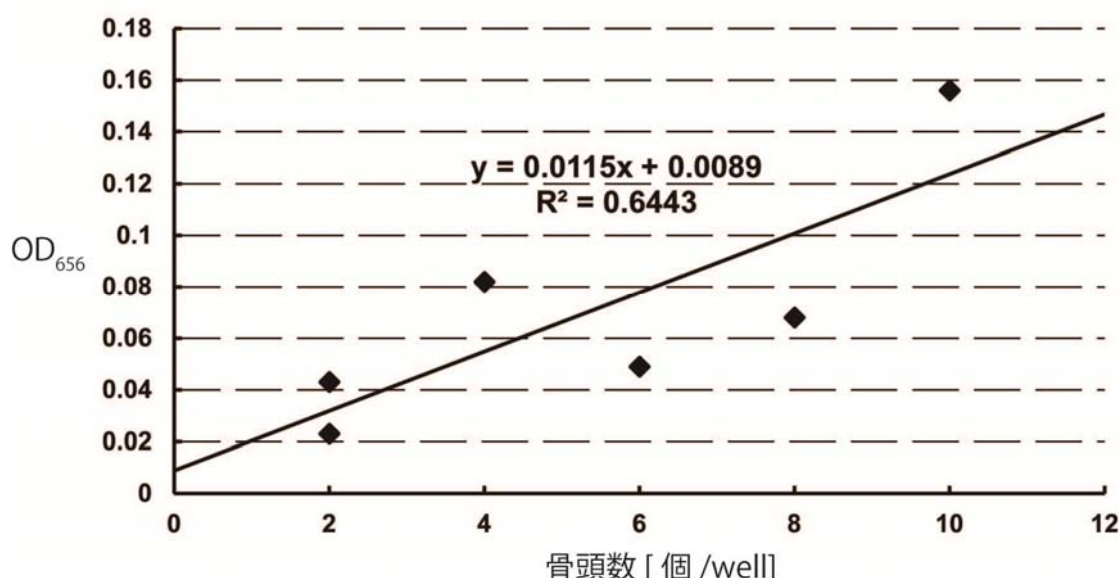


Figure 8 PG 放出量の測定に必要な大腿骨頭数の検討 回帰直線からは8 骨頭以上であれば OD₆₅₆ が 0.1 を超えると思われる.

Instability-induced OA モデル, 初回作製分の結果

WT, GM3S⁺ともに n=6 ずつを手術した初回作製分の instability-induced OA モデルの HE および Saf-O 染色の結果を Fig.9 に示す. まず形態上, 両 genotype ともに軟骨が過剰に削れてしまっていて軟骨下骨まで損傷が及んでおり, 差異が検出できないどころか, 軟骨損傷モデルとしての評価が困難な状態であった. また, PG を特異的に染色する Saf-O 染色に関しては, 形態上軟骨が残存していると思われる部位や, 成長軟骨が存在している骨端線の部分についても染色性が低く, 単に関節軟骨が失われているために染色されないというのが原因ではないと思われた.

形態上の問題について, 原因として,

①手技上の問題

初回手術であり, 目的の組織 (内側側副靱帯, 内側半月板前節) を切離するのに難渋したことや, それに伴ってこの手技で損傷してはならない前十字靱帯や関節軟骨そのものの損傷を引き起こした可能性がある.

②術後週数が8週間では長すぎる可能性

手術手技には個人差があることは避けられず，ふたつの genotype について同じ手技で処置をおこない，比較することが重要である．この点で自分の手技にとって，術後8週間経過させることは軟骨損傷の比較という点では損傷が進みすぎてしまうという可能性もある．

と考え，これに対して以下のような方針を立てた．

①について

手に入りやすい WT のマウスを用いて手技を重ね，習熟を目指す．手技が安定したところで両方の genotype のマウスを用い，標本を作成する．

②について

①同様に手技の習熟を目指しつつ，WT のマウスを用いて術後2，4，6，8週の time course をとり，軟骨損傷の比較に適した術後週数を検討する．これを予備実験(4)とする．

また，Saf-O 染色の染色性については検体の回収方法，組織の固定，脱灰，染色方法のプロトコールを見直し，原因を検索した．基本的にどの段階においてもプロトコールから外れている操作は見つからなかったが，検体作製，標本の確認を繰り返していく中で，ホルマリン固定の時間が不足しているのではないかと可能性が浮上したため，それまでの「4℃で6時間以上」から「室温で24時間」に変更した．

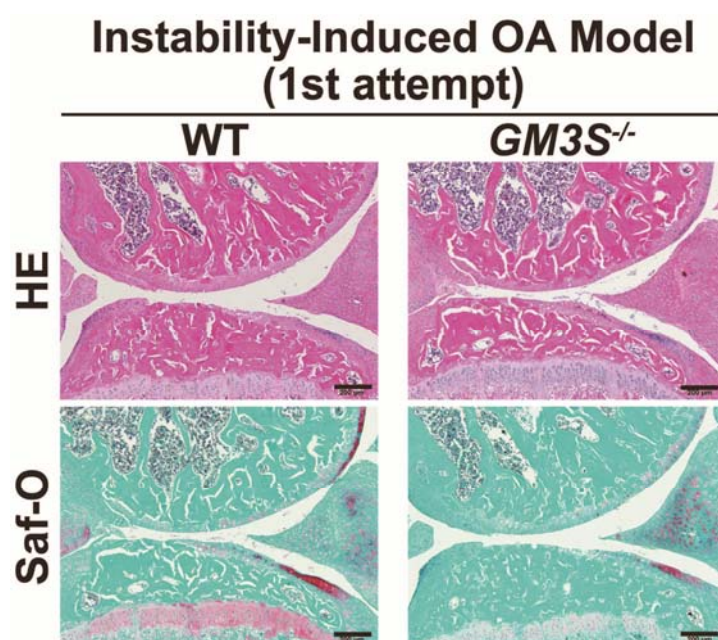


Figure 9 Instability-induced OA モデル初回作製分の結果 WT, $GM3S^{-/-}$ ともに関節軟骨が完全に失われ，軟骨下骨の深い部分まで損傷が及んでいる部位を認める．また，Saf-O 染色で本来染色されるべき成長軟骨の染色性が低い． bars: 200 μ m

予備実験(4)の結果 ～ 手技が安定すれば術後 8 週での屠殺は適切である

Instability-induced OA モデルの初回作製分の結果を受け、手技の習熟を目指すとともに、術後に回収するまでの週数を 2, 4, 6, 8 週として軟骨変性の進行を比較した。結果を Fig.10 に示す。Retrospective には手技の習熟が最大の要素であったと思われるが、この time course をおこなった時点でも術後週数により極端に変性が進行することはない。術後 8 週でも関節軟骨が残存しており、軟骨下骨まで達した損傷は見られず、軟骨変性の評価に耐えうる状態であると判断した。当科のこれまでの研究^{5,12}でも術後 8 週で回収、屠殺しており、今後の比較のためにも術後 8 週で統一することとした。

Saf-O 染色についても、固定条件を変更したところ染色状態が改善した。このことから、原因は固定時間の不足であったと判断した。

以上より、手技的にも、条件的にも整ったと判断し、あらためて WT, *GM3S*^{-/-} の両 genotype を用いて instability-induced OA モデルを作製していくこととした。

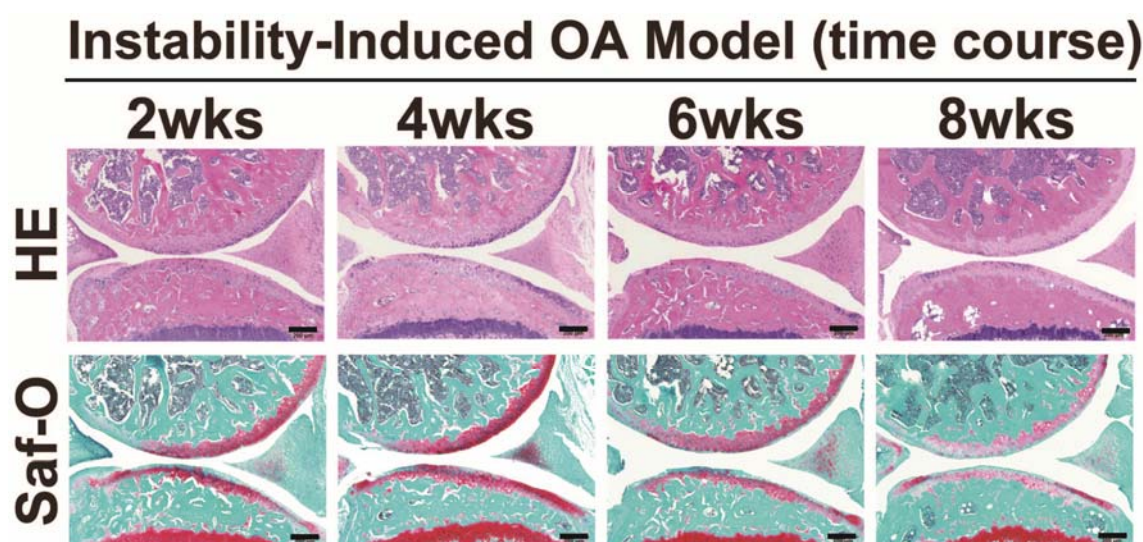


Figure 10 Instability-induced OA モデルの術後回収週数検討の結果 週数の増加による極端な変性の進行は見られず、8 週でも損傷は軟骨下骨に達してはいなかった。また、Saf-O 染色の染色性も改善している。

bars: 200μm

***GM3S*^{-/-}マウスは加齢に伴い WT マウスに比べて OA が有意に進行する**

加齢に伴って自然発症する OA 進行の程度を評価するため、マウスを 15 か月齢まで飼育し観察した。4 か月齢では、両群とも関節軟骨に明らかな OA 変化は生じなかった (Fig.11A)。15 か月齢になると、WT マウスにおいて、軟骨表層の変性、Saf-O の染色性の軽度低下など、ごく軽度ではあるが明らかな OA 変化が生じた (Fig.11A)。一方、*GM3S*^{-/-}マウスにおけるこれらの加齢に伴う OA 変化は、WT マウスよりもさらに強く現れた (Fig.11A)。これらの組織学的所見を Mankin スコアにより定量化したところ、*GM3S*^{-/-}マウスで有意に OA が進行した (WT: 4.17 ± 0.98 , *GM3S*^{-/-}: 6.17 ± 1.33 [$P = 0.023$]; $n = 6$) (Fig.11B)。OA の進行度のひとつの指標である軟骨細胞数について、脛骨側関節軟骨中の全軟骨細胞数を計測、比較したところ WT マウスに比べて *GM3S*^{-/-}マウスで有意な減少が見られた (WT: 551.83 ± 58.48 , *GM3S*^{-/-}: 472.0 ± 45.22 [$P = 0.026$]; $n = 6$) (Fig.11C)。

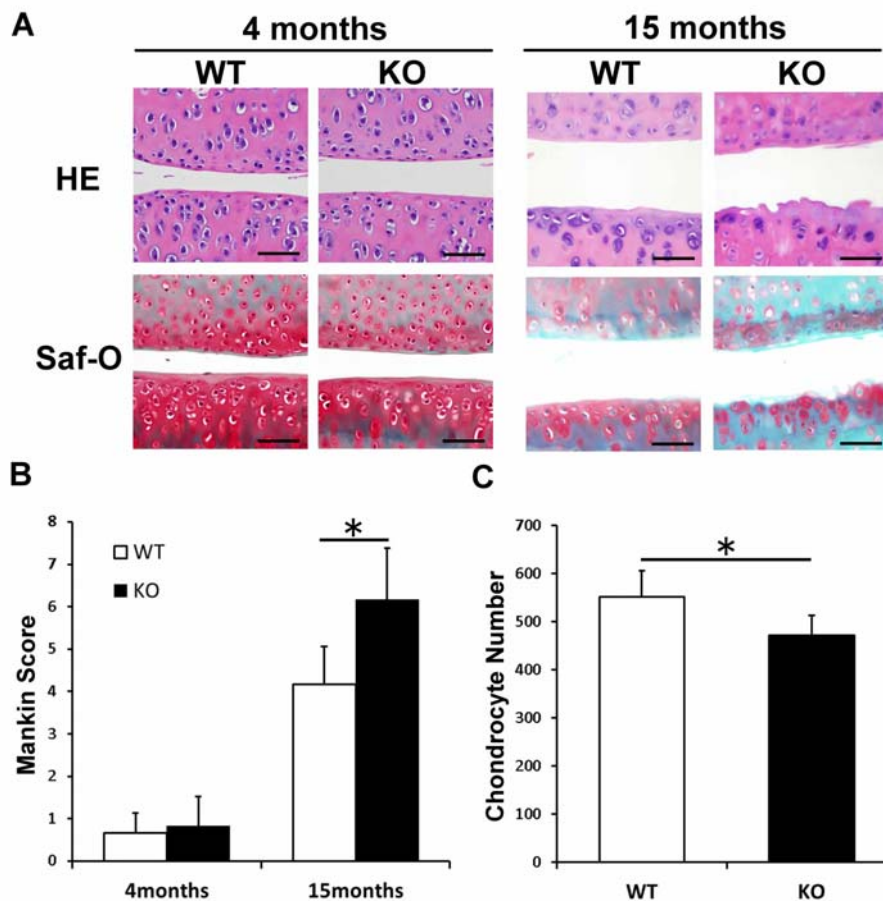


Figure 11 A) Age-associated OA model の組織学的所見。HE 染色 (上段), Saf-O 染色 (下段)。Scale bars = 50 μ m B) Mankin スコアによる OA 進行度の評価 ($n = 6$ mice per group, * = $P < 0.05$). C) 脛骨側関節軟骨中の軟骨細胞数の比較 ($n = 6$ mice per group, * = $P < 0.05$).

***GM3S*^{-/-}マウスは、関節の不安定化によるメカニカルストレスにより、WT マウスに比べて OA が有意に進行する**

我々は、メカニカルストレスに伴う OA におけるガングリオシドの影響を評価するため、instability-induced OA モデルを作製し、WT マウスと *GM3S*^{-/-}マウスの両群で比較した。Sham 側では、両群とも明らかな OA 変化は生じなかった。OA 側では、両群で、軟骨変性・Saf-O 染色性の低下といった OA 変化が生じたが、ガングリオシドが欠損するとより OA が重症化した (Fig.12A)。これらの組織学的所見を、Mankin スコアにより定量化したところ、*GM3S*^{-/-}マウスで有意に OA が進行した (WT: 7.50 ± 0.84 , *GM3S*^{-/-}: 9.50 ± 1.22 [$P = 0.013$]; $n = 6$) (Fig.12B)。

また、我々の過去の研究で *GM3S*^{-/-}マウスは関節リウマチ (RA: rheumatoid arthritis) を模したコラーゲン誘発性関節症モデルにおいて WT と比べ強い炎症所見を示したことから²⁵、今回もその研究と同じスコアリングシステムを用いて炎症や滑膜、軟骨下骨の評価を行った (Fig.12C-F)。しかし instability-induced OA モデルでは WT, *GM3S*^{-/-}マウスともに極軽度の炎症、滑膜増生、軟骨下骨の破壊を呈したのみで、両者の間に有意な差は認めなかった。

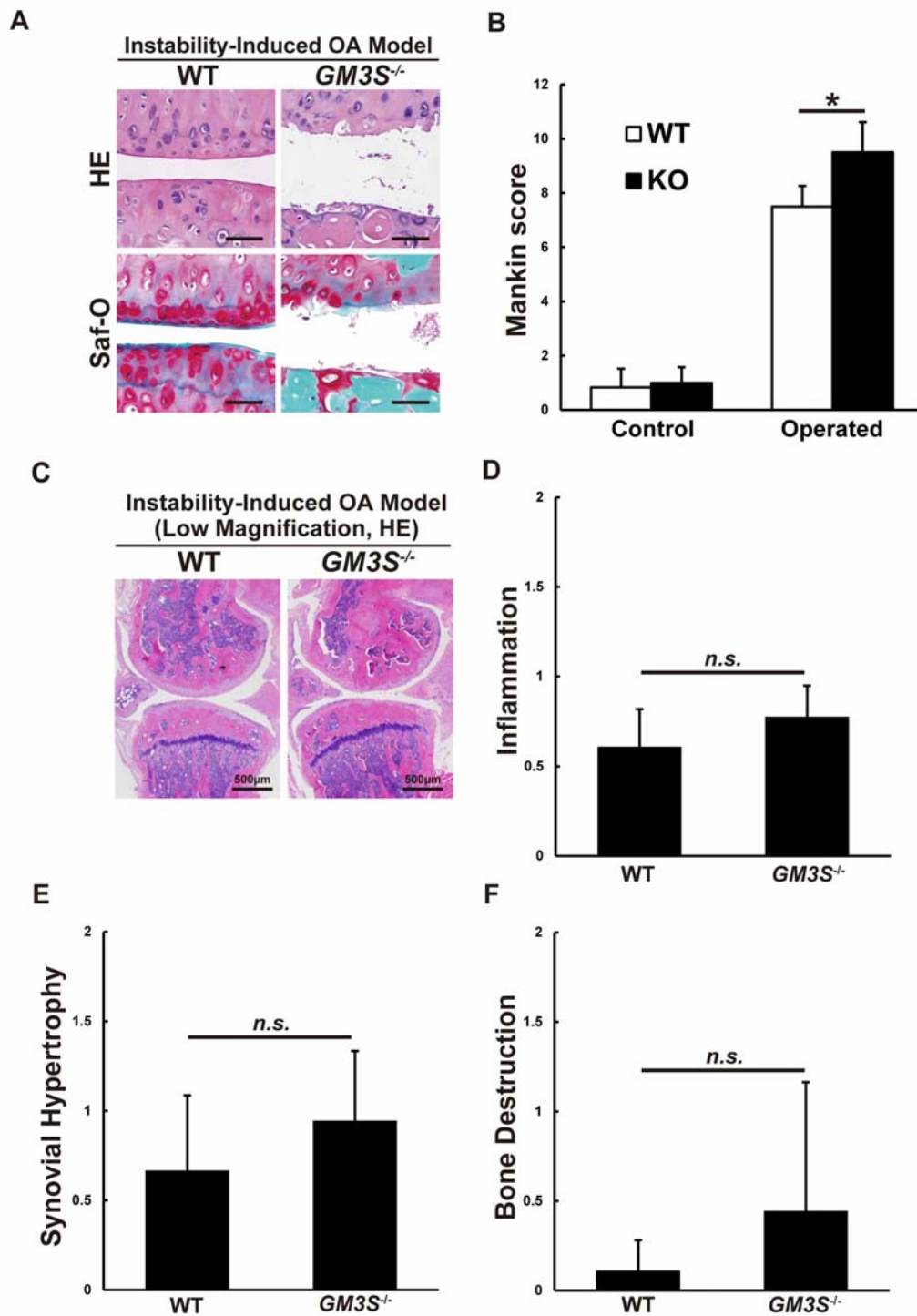


Figure 12 **A**) Instability-induced OA model の組織学的所見. HE 染色 (上段) および Saf-O 染色 (下段). Scale bars = 100 μ m **B**) Mankin スコアによる OA 進行度の評価 (n = 6 mice per group, * = $P < 0.05$) **C**) 弱拡大での全膝関節組織像. **D-F**) Saouaf らのスコアリングによる関節破壊の所見 **D**) 炎症所見 **E**) 滑膜増生所見 **F**) 骨破壊所見 (n.s.: not significant)

ガングリオシドを欠く軟骨細胞は、IL-1 α 刺激による軟骨変性が增強される

in vivo の2種類のモデルで確認された OA 変化について、そのメカニズムを検証するため、我々は *in vitro* の実験を行った。4週齢のマウス大腿骨頭軟骨を採取し、IL-1 α を添加した培養液で培養した。この培養大腿骨頭軟骨について組織学的な観察を行ったところ、Saf-O 染色での著明な染色性の低下、TUNEL 染色および MMP-13 免疫染色での陽性細胞の増加などの所見を認めた (Fig.13A)。

Saf-O の染色性の低下は、OA 関節におけるプロテオグリカンの減少を意味するが、dimethylmethylen blue assay を用いて、培養液中へのプロテオグリカンの放出量を測定し、WT マウスと *GM3S*^{-/-} マウス由来の軟骨における変性の程度を定量的に比較した。この結果、IL-1 α 刺激後のプロテオグリカンの放出量は WT マウス由来軟骨よりも *GM3S*^{-/-} マウス由来軟骨で有意に増加した (WT: 48.33% $\pm$ 2.00%, *GM3S*^{-/-} : 57.45% $\pm$ 5.08% [P = 0.0071]; n = 4) (Fig.13B)。

TUNEL 染色については陽性細胞数を計測することで定量的に評価した。アポトーシスに陥っている軟骨細胞は WT マウス由来軟骨に比べて *GM3S*^{-/-} マウス由来軟骨で有意に高率であった (WT: 14.10% $\pm$ 3.37%, *GM3S*^{-/-} : 27.38% $\pm$ 2.52% [P = 0.0008]; n = 3) (Fig.13C)。

MMP-13 については培養液中への MMP-13 放出量を ELISA 法を用いて定量した。この assay においても WT マウス由来軟骨に比べて *GM3S*^{-/-} マウス由来軟骨で有意に高い濃度の MMP-13 が検出された (WT: 344.04 $\pm$ 81.51 pg/ml, *GM3S*^{-/-} : 580.11 $\pm$ 64.87 pg/ml [P < 0.0001]; n = 5) (Fig.13D)。

また、アポトーシスとの関連で、培養液中の NO 濃度を Griess Reagent System を用いて定量したところ、やはり WT マウス由来軟骨に比べて *GM3S*^{-/-} マウス由来軟骨で有意に高い値が検出された (WT: 10.42 $\pm$ 0.49 μ M, *GM3S*^{-/-} : 12.88 $\pm$ 0.99 μ M [P < 0.01]; n = 5) (Fig.13E)。

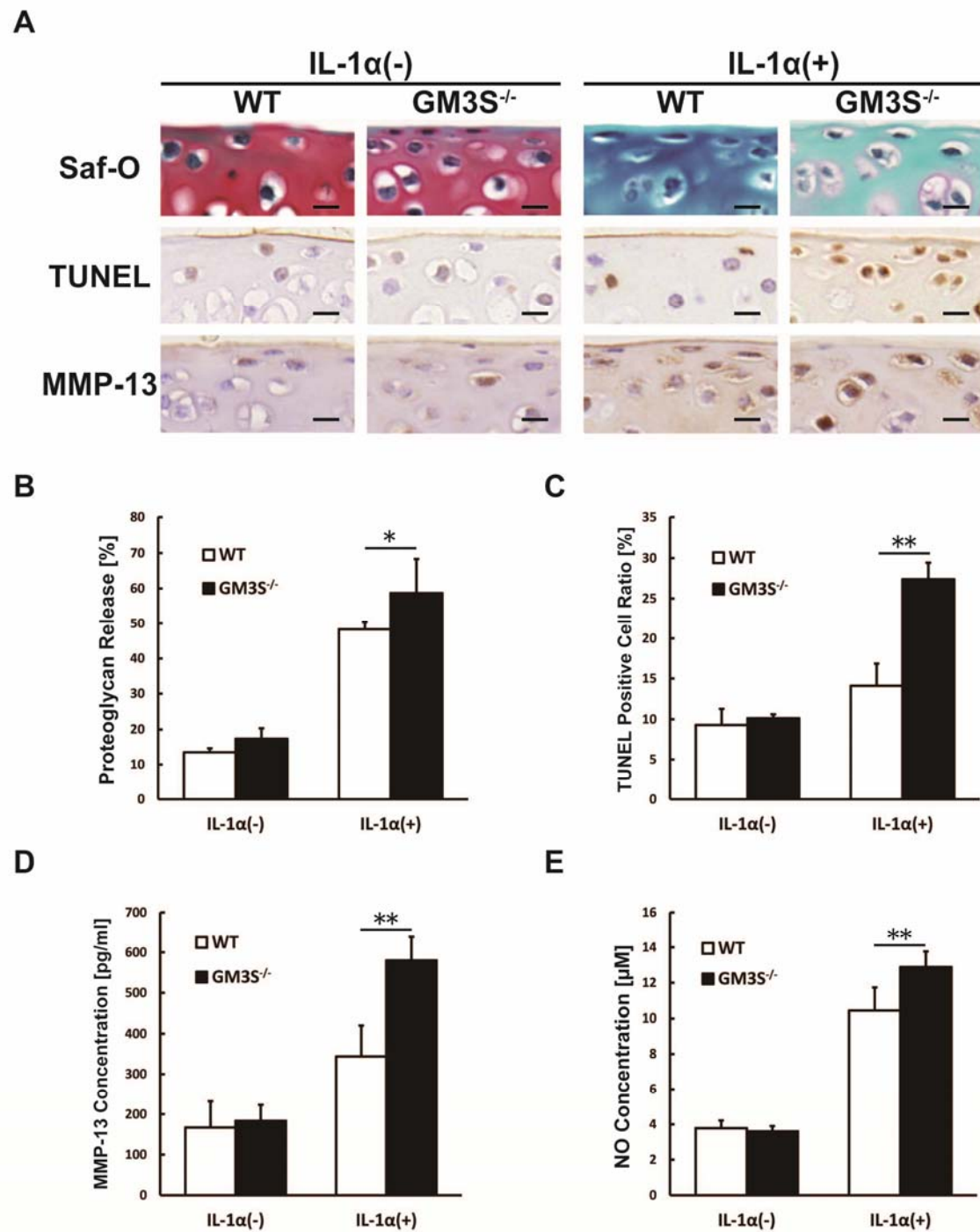


Figure 13 WT マウスおよび GM3S^{-/-} マウス由来大腿骨頭軟骨における IL-1 α 刺激による軟骨変性の比較.
A) IL-1 α 培養後の組織学的所見. 上から Saf-O 染色, TUNEL 染色, MMP-13 免疫染色 (Scale bars = 100 μ m)
B) 培養軟骨片からのプロテオグリカン放出量 (n = 4 per group, * = $P < 0.05$) **C)** TUNEL 陽性細胞率 (n = 3 per group, ** = $P < 0.01$) **D)** 培養液中への MMP-13 放出量 (n = 5 per group, ** = $P < 0.01$) **E)** 培養液中の NO 濃度 (n = 5 per group, ** = $P < 0.01$)

ガングリオシドを欠く軟骨細胞は、IL-1 α 刺激により MMP-13 や ADAMTS-5 といったマトリックス分解酵素の発現が亢進する

大腿骨頭培養の系で IL-1 α 刺激による MMP-13 の培養液中への放出量は GM3S^{-/-}マウス由来軟骨で有意に高いことが示されたが、細胞レベルでこれを裏付けるために遺伝子の発現量を定量した。IL-1 α で刺激した培養軟骨細胞から mRNA を抽出し、主要なマトリックス分解酵素である MMP-13 および ADAMTS-5 の発現量を定量的 RT-PCR で測定した。経時的な発現量の変化を観察するために IL-1 α 刺激開始後 6, 12, 24, 48 時間で検体を回収した。2つの酵素の経時的な発現量は同じような傾向を示し、ともに12時間の時点で発現量がピークに達し、以後漸減して48時間ではほぼ0となった。この12時間の時点で GM3S^{-/-}由来軟骨細胞における MMP-13, ADAMTS-5 の発現量は WT 由来に比べて有意に高かった (MMP-13; WT: 0.91 ± 0.13 , GM3S^{-/-}: 1.57 ± 0.064 [$P < 0.0001$]; ADAMTS-5; WT: 0.91 ± 0.13 , GM3S^{-/-}: 1.57 ± 0.064 [$P < 0.0001$]; $n = 3$) (Fig.14A, B).

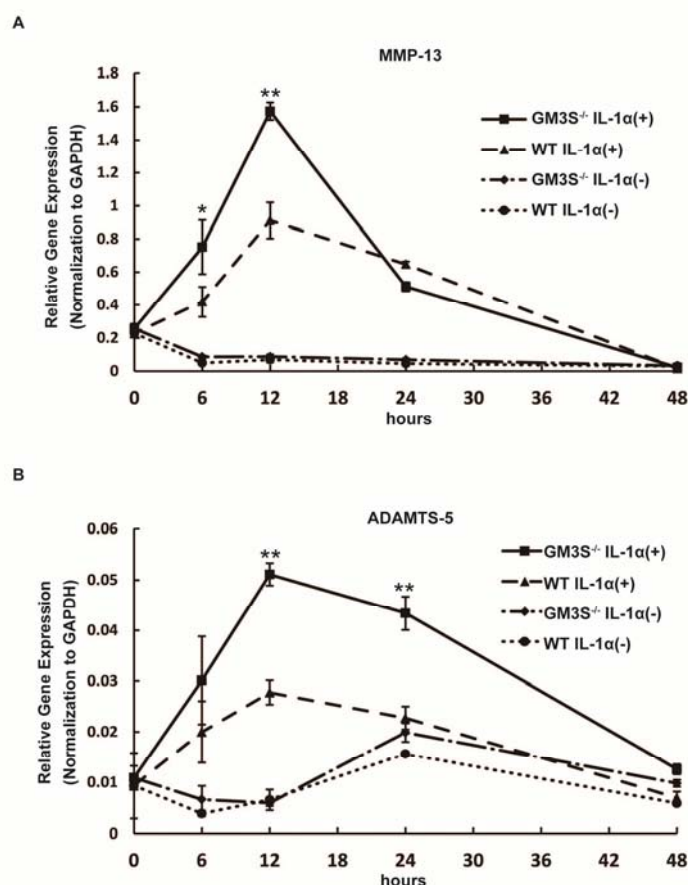


Figure 14 IL-1 α 刺激による軟骨細胞中のマトリックス分解酵素発現量の変化. **A)** 培養軟骨細胞における MMP-13 mRNA の発現 (real-time RT-PCR による解析, $n = 3$) **B)** 培養軟骨細胞における ADAMTS-5 mRNA の発現 (real-time RT-PCR による解析, $n = 3$)

GM3 合成酵素過剰発現は IL-1 α 刺激によるマトリックス分解酵素の発現を抑制する

KO マウスの使用で GM3 合成酵素の KO によるガングリオシド欠損が OA に及ぼす影響を検証しているが、より多角的な検証を行うために GM3 合成酵素の過剰発現系を構築した。実験方法に示した通りに WT マウス由来軟骨細胞に GM3 合成酵素遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入し、まずはこのベクターが計画通りに遺伝子導入され、GM3 合成酵素が過剰発現していることを定量的 RT-PCR で確認した。Fig.15A に示したように、発現ベクター導入細胞 (GM3S) ではコントロール (mock vector) に比べて約 70 倍の発現量を認めた (GM3S: 1.06 ± 0.36 , mock: 0.015 ± 0.0017 [$P = 0.038$] ($n = 3$)) (Fig.15A)。この結果から遺伝子導入および目的遺伝子の過剰発現は計画通りに達成できたと判断し、IL-1 α 刺激下での培養とその後の mRNA 抽出、定量的 RT-PCR によるマトリックス分解酵素の発現量測定を行った。結果を Fig.15B, 8C に示すが、まず両者とも IL-1 α を添加しない条件では発現量は低く、過剰発現の有無による差は見られなかった。IL-1 α 刺激下では、MMP-13 の発現量で $P < 0.0001$ (mock: 5.40 ± 0.41 , GM3S: 3.02 ± 0.40 ($n = 3$)) (Fig.15B), ADAMTS-5 で $P = 0.0003$ (mock: 0.051 ± 0.0062 , GM3S: 0.026 ± 0.0018 ($n = 3$)) (Fig.15C) の水準で有意差を認め、ともに GM3 合成酵素の過剰発現がマトリックス分解酵素の発現を抑制したことが示された。

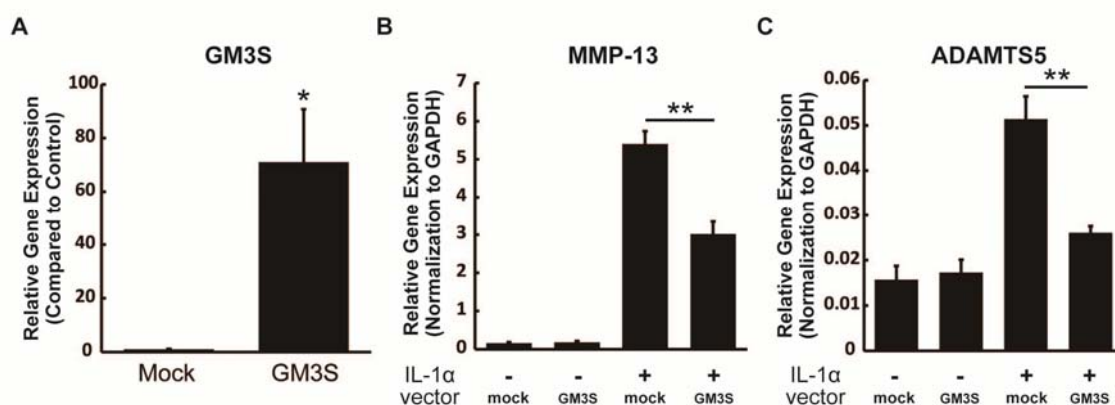


Figure 15 GM3 合成酵素過剰発現軟骨細胞における各種遺伝子の発現量 **A)** 遺伝子導入した GM3 合成酵素の発現量の比較。Mock: 目的遺伝子を含まない mock vector を導入したコントロール, GM3S: GM3 合成酵素遺伝子を組み込んだ発現ベクターを導入した軟骨細胞での GM3 合成酵素発現量。 **B)** MMP-13 の遺伝子発現量 **C)** ADAMTS-5 の遺伝子発現量 (A, B, C とも $n = 3$, * = $P < 0.01$, ** = $P < 0.05$)

IL-1 α 刺激によりガングリオシドはスフィンゴ糖脂質 (GSLs)の他のサブグループに比べて有意にその量が増加する

培養軟骨細胞中のスフィンゴ糖脂質の組成を調べるために、我々はペレット状にした培養軟骨細胞からスフィンゴ糖脂質を抽出し、質量分析によって各構成成分の経時的な物質量的変化を定量した。まず、WT マウスの関節軟骨から単離した軟骨細胞を 5×10^6 cells/plate で播種し IL-1 α を加えて 0, 6, 12, 24, 48 時間後に回収した。この軟骨細胞ペレットに endoglycoceramidases II (EGCase II) を作用させて GSLs のみを切断、抽出し、Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) で定量した。Fig.1 に示したように、GSLs の中には大きく 5 つの分子群があるが、この中の Lacto-series, Isoglobo-series は極めて少量しか観測されなかったため、残るガングリオシド (ganglio-series), Globo-series, (Neo)Lacto-series の経時的な変化量が得られた (Fig.16)。この結果によれば、ガングリオシドは他の 2 群と比べて IL-1 α 刺激前の段階で既に統計学的に有意ではないものの最も量が多い分子群であるが、IL-1 α 刺激開始後は経時的に物質量が増加し、48 時間後には GSLs の大半を占めるようになることが示された。このガングリオシドの量は他の 2 群に比べても統計学的に有意であり、また、IL-1 α 刺激前のガングリオシド量と比べても有意な増加をしていることが判明した (0hour: 10.90 ± 4.36 , 48hours: 34.66 ± 5.58 [$P < 0.01$] ($n = 3$)). 計測値を Table 2 に示す。

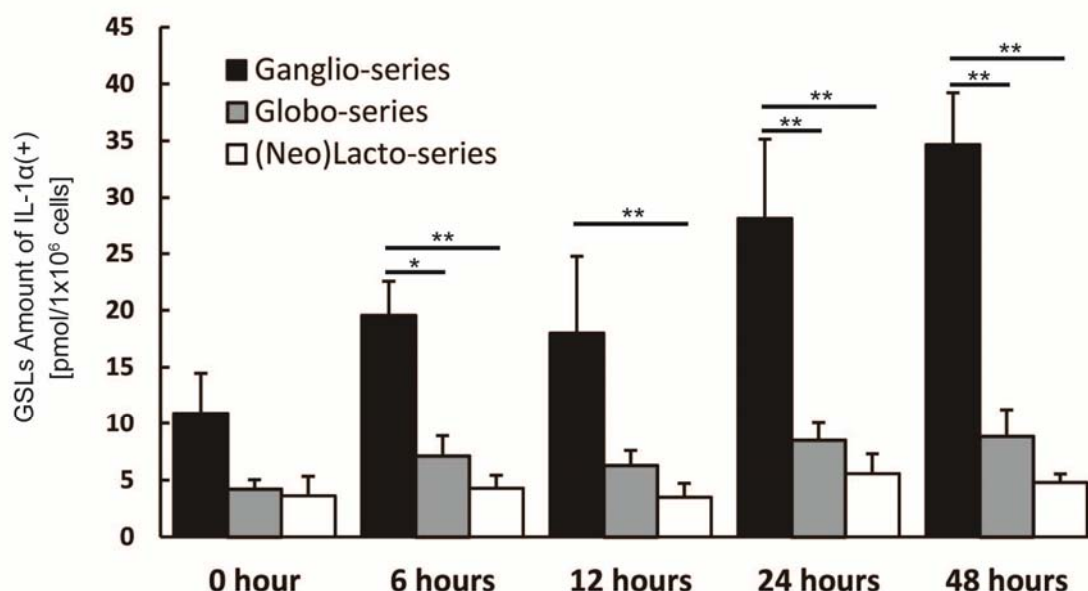


Figure 16 培養軟骨細胞中のスフィンゴ糖脂質 (GSLs)組成の経時的変化. IL-1 α 刺激開始から経時的にガングリオシドが突出して増加している ($n = 3$, * = $P < 0.01$, ** = $P < 0.05$).

Stimulation time (hours)	0	6	12	24	48
Gangliosides	10.9 ± 4.4	19.6 ± 3.6	17.9 ± 8.3	28.1 ± 8.7	34.7 ± 5.6
Globo-series	4.2 ± 1.0 (P = 0.76)	7.1 ± 2.2* (P = 0.038)	6.3 ± 1.6 (P = 0.065)	8.5 ± 1.9** (P = 0.0001)	8.8 ± 2.9** (P < 0.0001)
(Neo)Lacto-series	3.6 ± 2.1 (P = 0.65)	4.3 ± 1.4** (P = 0.0043)	3.4 ± 1.5** (P = 0.0081)	5.6 ± 2.1** (P < 0.0001)	4.7 ± 0.9** (P < 0.0001)

Table 2 培養軟骨細胞中のスフィンゴ糖脂質 (GSLs)組成の経時的変化. 物質量の単位は pmol / 1×10⁶ cells. P 値はガングリオシド (Ganglio-series)との物質量の差の検定結果を示す (n = 3, * = P < 0.01, ** = P < 0.05).

考 察

これまでの研究で、マウス関節症モデルにおいて GSLs は OA に対して抑制的に働くことが示されている¹²。また、GSLs の中でも GM3 とその誘導体を含むガングリオシドは関節症性疾患に関与していることが知られている^{16,17,25}。そこで我々はガングリオシドが OA の病態において重要な機能的役割を有するという仮説を立て、*in vivo* および *in vitro* の OA モデルを用いてこれを検証することとした。

WT マウスに比べ手配が困難な *GM3S*^{-/-} を使用するにあたり、ひとつの予備実験として変性軟骨細胞においてこの GM3 合成酵素遺伝子の発現量が変化していることを確認しておくことにした。具体的には WT マウス由来軟骨細胞を IL-1 α で変性させるモデルを用いたが、この系で標的遺伝子の発現量が増加にせよ、減少にせよ変化していることが確認できれば、それが IL-1 α によって直接的に誘発された反応なのか、もしくは代償性の反応の結果なのかは不明であっても OA とガングリオシドの関連性を示す根拠のひとつとなり、実験を進めていく根拠となるだろうと考えた。先行研究では同様の IL-1 α 刺激により GSLs 全体の合成基点である *Ugcg* の発現が亢進し、質量分析による定量でも全 GSLs 量の増加が確認されている。このデータから、GSLs のサブグループのひとつであるガングリオシドも IL-1 α の刺激により合成が亢進しその量を増やしているものと予測したが結果は逆であった。また、この結果を受けて *GD3S*, *GalNAcT* の発現量も同様に定量したが *GD3S* は減少、*GalNAcT* は増加という結果であった。この実験はこの研究に着手して最初の実験であり、*GM3S* と *GD3S* がともに発現量減少していた時点でテクニカルな問題による培養細胞の消耗、脆弱化を危惧した。一連の操作としてマウスの屠殺から始まり、関節軟骨の摘出、軟骨細胞の単離、前培養、IL-1 α 刺激下での培養、細胞回収、total RNA の回収、逆転写反応、RT-PCR に至るが、手技的に未熟であったことは否めず、培養液中に添加する IL-1 α の濃度を誤るなどした結果、糖転移酵素を含むすべての遺伝子の発現が落ちているのではないかと考えた。しかし *GalNAcT* の発現量は増加していたこと、housekeeping gene である GAPDH の C(t)値に変化が見られなかったことなどからこの可能性は低いと判断した。仮に *GM3S* ↓, *GD3S* ↓, *GalNAcT* ↑ が正しいとして、この発現量の通りに GSLs が合成されるとすると Fig.7 に示すように GSLs の新規合成は o-series gangliosides に誘導されることになる。この合成パターンは偶然にも *GM3S*^{-/-} におけるパターンと近似しており、*GM3S*^{-/-} が WT に比べて OA を強く発症するという結果が出るとすれば整合性がある。しかし、その場合にも、こういった合成パターンが OA 発症に関して原因なのか、結果なのかは判断できないため、さらなる解析が必要となるものと思われる。

我々は検証のために3つの異なる OA モデルを構築した。すなわち, *instability-induced*, *age-associated*, そして *IL-1 α -induced OA model* である。 *Instability-induced OA* モデルの作製に関しては実験方法のセクションで述べたが, 実際の作業は直径 1cm にも満たない 8 週齢マウスの膝関節を切開し, 幅数 mm の内側側副靱帯と, 長さ 1mm 程度の内側半月板前節を実体顕微鏡の鏡視下でおこなう *micro surgery* により切離するというものである。一般的な外科手術同様に手術手技は経験を重ねることによって習熟していくが, 当然のことながら初期は手技が安定しない。実験結果のセクションで示したように, *instability-induced OA* モデルの初回作製分は両 *genotype* ともに関節の損傷が過多であり, 軟骨損傷の評価に用いることはできなかった。手術数を重ね, 技術的な安定が得られた時期から, この初期の手技を振り返ると, 内側側副靱帯の切離は問題なかったものの, 内側半月板前節の切除に非常に難渋したケースが多く, 意図せず前十字靱帯を切断したり, 関節軟骨を手術手技によって損傷していたりしたものもあったように思える。また, こういった操作に時間がかかることでマウスの麻酔が浅くなって動き出し, 余計に操作がしにくくなるという悪循環も招いていた。数十例のケースを経た時期には半月板の切除もスムーズになり, その分麻酔の量も減じることができ, 深麻酔による術中死もほぼなくなった。理想的にはこのように十分な手技の習熟が得られてから実際に比較に供する検体を扱うのが望ましいと思われるが, 動物実験の規約に照らした際の「必要最小量」で済ませるためにどのような実験計画を立案すべきか, さらなる検討が必要と思われた。今回の経験を踏まえると, 手技が安定しない段階での検体は信頼性が低いと言わざるを得ず, 当初から技術的な習熟のために使用するマウス数を計画に盛り込むべきであった。

IL-1 α induced OA モデルは *in vitro* もしくは *ex vivo* の確立した OA モデルとして頻用されており^{19,26}, 当科でも過去の研究で利用している^{5,12}。軟骨変性を進行させるサイトカインとしてはこの他にも *TNF- α* 、*IL-6*、*IL-17* などが挙げられる。*IL-6* は作用が弱く, *IL-17* は関節リウマチ (RA) に関与することなどが知られているが²⁷⁻²⁹, *in vitro* の OA モデルとして検討すべきサイトカインである。本研究においてはこれまでの先行研究との比較や, 当科における実績などから *IL-1 α* の系を採用し, *time limit* や *man power* の問題から他のサイトカインについての検討まで及ばなかったが, 現在, 同じ大腿骨頭軟骨培養の実験系で *PG* 放出量やマトリックス分解酵素の発現量などを解析中である。

今回の我々の実験結果からは GM3 合成酵素の KO によるガングリオシド欠損が 3 種類の OA モデルすべてで OA を進行させることが判明した。興味深いことに、age-associated OA model においては若齢では WT マウスと変わらない phenotype を呈したが、加齢に伴ってより進行した OA を生じた。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¹²。

OA の病態において炎症はひとつの重要な要素であり^{30,31}、GSLs の中でもガングリオシドは炎症反応に関与していることが知られている。Ohmi ら³²や Lim ら³³がガングリオシドの抗炎症的な機能について報告する一方で、ガングリオシドの増加が炎症の活性化を引き起こすとする論文も散見されるなど、いまだに意見が分かれているところである³⁴⁻³⁶。一方で我々は同じ *GM3S*^{-/-}マウスを用いて関節リウマチ (RA) とガングリオシドの関係についても報告を行っており、この際には GM3 を含むガングリオシドの欠損が RA の関節炎を増強させるというデータを示した²⁵。この結果からは今回の OA 増悪の要因として炎症が最も疑われるが、*in vivo* で行った *instability-induced* OA model の組織像からは 2 つの genotype 間に炎症、骨棘形成、軟骨下骨の増生といった所見の差異は観察されず、両者ともに極軽度の炎症性細胞の浸潤が観察される程度であった。*GM3S*^{-/-}マウスで炎症反応の増強が観察されなかったことについて、2 つの原因が考えられる。第一に RA を模したコラーゲン誘発性関節症モデルに比べると今回用いた *instability-induced* OA model が惹起する炎症反応は非常に軽度であるため、その差を検出することができなかったという可能性。第二に *instability-induced* OA model が Th-17 細胞を刺激せず、コラーゲン誘発性関節症モデルで観察された IL-17 の産生、分泌がなされなかったという可能性である。RA と異なり、OA 患者の関節液中で IL-17 濃度の上昇が見られないことは広く受け入れられており³⁷、OA を模した *instability-induced* OA model でも同様だったと考えられる。これらの結果から、我々は本研究における OA モデルの病理が関節軟骨そのものに存在するのではないかと考えた。

OA の病態は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おり^{38,39}、今回の我々の実験結果は GM3 合成酵素の欠損により IL-1 α 刺激で誘発される軟骨細胞アポトーシスとマトリックス分解酵素の発現亢進が増強されることを示している。ガングリオシドとアポトーシスの関係については神経細胞を中心に過去にいくつかの報告があり、中でも a-series gangliosides の中の一分子である GM1

は神経細胞、心筋細胞、肝細胞などにおいてアポトーシスを抑制する効果があると報告されている^{40,44}。Cavallini らはラットの心筋線維芽細胞を用いた実験で、GM1 それ自体に抗アポトーシス活性があること、及び GM1 がスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P: sphingosine 1-phosphate) の合成を促進することでもアポトーシスを抑制していると述べている⁴¹。本研究で用いた *GM3S*^{-/-}マウスはこの GM1 を含む a-series gangliosides を欠損しているため、Cavallini らが言うところの GM1 や S1P によるアポトーシス抑制効果が WT に比べて弱かった可能性はあり⁴¹、今後のさらなる検討が必要である。また、S1P 合成とも関係するが、本研究で用いた *GM3S*^{-/-}マウス及び先行研究で用いたグルコシルセラミド合成酵素 KO マウスともにセラミドからの糖脂質合成経路を改変しており、惹起されるアポトーシスの誘引としてセラミドの蓄積はひとつの有力な仮説であったが、残念ながら実証することはできなかった。これに関しては現在、凍結切片でのスフィンゴ糖脂質の免疫染色により技術的にはクリアできる見込みが立ったため、セラミドに関しても免疫組織化学的な局在の解析、定量が可能になると思われる。

一方でマトリックス分解酵素の発現とガングリオシドの関連について述べた報告は渉猟し得た限りでは見つけることができなかった。今回は数あるマトリックス分解酵素の中でも OA の初期に働くアグリカナゼの中心分子である ADAMTS-5 と、後期に働くコラゲナーゼの中心分子である MMP-13 について解析したが、今後さらにその他の MMP family や ADAMTS family 等についても解析することが望ましいと思われる²⁷。上述のアポトーシスと異なり、分子機構に関しては未詳だが、*GM3S*^{-/-}マウスで MMP-13 や ADAMTS-5 の発現が亢進し OA が進行したことから、マトリックス分解酵素に関しても GM3 合成酵素を合成基点とするガングリオシドが抑制的な役割を果たすのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証するために、WT マウス由来の軟骨細胞に一過性の GM3 合成酵素過剰発現状態を作り、IL-1 α での刺激を行った。その結果、GM3 合成酵素の過剰発現は有意に MMP-13 と ADAMTS-5 の発現を抑制することが明らかとなり、このことから我々はガングリオシドが MMP-13 や ADAMTS-5 といったマトリックス分解酵素の発現を抑制することによって軟骨保護的な効果を発揮すると考えた。

GSLs は複雑で多様な分子集団である。そしてその GSLs を構成する各サブグループは様々な生命現象に関与していることが報告されている⁴⁵⁻⁴⁸。中でも GM3 合成酵素から作られるガングリオシドは過去のヒト関節軟骨を用いた研究でも OA との関与が報告されている^{16,17}。我々は仮説検証の第一段階としてまず GM3 合成酵素から作られるガングリオシド GM3 とその誘導体を欠損させるとどうなるか KO マウスを用いて検証した。この結果得られた OA に関する phenotype は全 GSLs を欠損させた我々の

先行研究で観察された phenotype に近似するものであった¹²。この結果は、GM3 とその誘導体であるガングリオシドが軟骨細胞において機能的に主要な GSLs のサブグループであることを示している。この点を GSLs の各サブグループの物質量を測定することで検証しようと考え、我々は IL-1 α 刺激下で培養した軟骨細胞中の GSLs 組成について質量分析での計測を行った。この分析でガングリオシド (Fig.1 で示す a-series と b-series) が量的にも主要な GSLs であることが明らかとなり、これらを総合すると OA の病態においてガングリオシドは GSLs の様々なサブグループの中で特に重要な機能的役割を果たしていることが示されたと言えることができる。

OA 研究における究極の目的は、OA の病態を明らかにし、そしてその病態に即した治療法～例えば関節リウマチの DMARDs (disease-modifying rheumatoid arthritis drug) にならうなら DMOADs (disease-modifying osteoarthritis drug) ～を開発することである⁴⁹。この究極の薬剤を臨床で使用するためには、より効果が大きく、そしてより副作用が少ないことが必要とされる。我々が先行研究で扱ったグルコシドセラミド合成酵素 (Ugcg) は、その遺伝子の軟骨特異的な KO マウスは OA の進行を示したものの、全身性 KO (null-KO) マウスが胎生致死であったことから理想的なターゲット分子と認めることはできなかった¹²⁻¹⁴ (Fig.17A, B)。なぜなら、この分子をターゲットとする OA 治療は全身的に重篤な影響を引き起こす可能性があるからである。今回の実験結果は、GM3 合成酵素の全身性 KO マウスが成長障害を来さずに OA の進行を示したことから (Fig.17C)、全身的な影響という観点からグルコシルセラミド合成酵素をターゲットとしたものよりも、より副作用が少なくかつ同様の治療効果を有する可能性を示唆するものである。

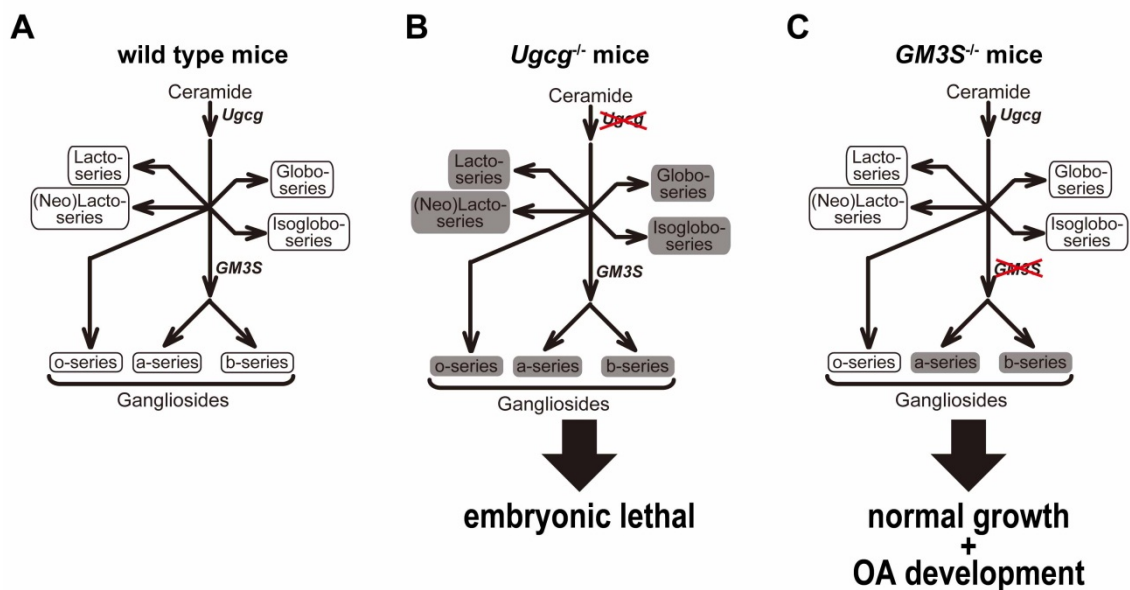


Figure 17 GSLs の合成経路における先行研究と本研究での KO された糖転移酵素の位置. **A)** 野生型 (WT)マウス. **B)** グルコシルセラミド合成酵素 KO マウス (*Ugcg*^{-/-}). 関節軟骨特異的な KO では OA の進行を観察したが, 全身性の KO (null-KO)では胎生致死 (embryonic lethal)であった. **C)** GM3 合成酵素 KO マウス (*GM3S*^{-/-}).

本研究にはいくつかの **limitation** が存在する. 第一に GM3 合成酵素を経ずに合成される o-series のガングリオシドが代償性に増加して OA の病態に影響を及ぼす可能性があることである. 最近の研究では, *GM3S*^{-/-}マウスの GSLs プロファイリングで o-series の産生が増加したとの報告も見られており⁵⁰, 今後 *GM3S*^{-/-}マウスにおけるさらなる GSLs の変化の解析が必要だと考えられる. 第二にガングリオシド欠損状態における OA 進行の詳細なメカニズムは完全には解明できていないということである. 確かに本研究でガングリオシドが軟骨細胞アポトーシスやマトリックス分解酵素を抑制する, いわゆる「軟骨細胞保護的」な効果を発揮したことが示唆されるが, 多様な分子種を包含するガングリオシドの中でどの分子が支配的に機能するのか, 具体的にどのように機能するのかについては未解明である. これらの **limitation** はあるものの, 本研究は GSLs の OA 病態における役割として, その一連の合成経路の中で, 先行研究で報告したグルコシルセラミド合成酵素よりも GM3 合成酵素の方がより重要であることを示すことができたと考えられる. 今後は GM3 合成酵素のさらに下流の糖転移酵素と OA との関連について解析を進めていく必要があると考えられる.

最後に, 本研究においてガングリオシド欠損が OA を進行させ, MMP-13 や ADAMTS-5 といったマトリックス分解酵素発現と軟骨細胞アポトーシスを増加させ

ることが明らかとなった．さらには GM3 合成酵素の過剰発現が MMP-13 と ADAMTS-5 の発現を抑制することも判明した．これらの結果はガングリオシドが OA の進行に抑制的に働く可能性があり，新規の OA 治療の標的分子となる可能性を示唆するものである．

総括および結論

- 我々は、軟骨におけるガングリオシドの機能および OA の病態への関与について検証するために、ガングリオシドの合成基点である GM3 合成酵素 KO マウス (*GM3S*^{-/-}マウス)を作製し、その表現型を解析した。
- *In vivo* において、ガングリオシドが欠損しても、マウスは正常に発育し、若齢では軟骨形成・分化には影響しなかったが、加齢やメカニカルストレスに伴い、MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスが増加し、OA がより重症化した。
- *In vitro* において、ガングリオシドが欠損すると、IL-1 α 刺激への反応性が増し、MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスが増加し、軟骨中のプロテオグリカンが多く失われ、軟骨変性がより増強された。
- 以上の結果から、ガングリオシドは軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、OA の進行を抑制する機能を有する可能性が示唆された。
- *In vitro* において、GM3 合成酵素の過剰発現は IL-1 α 刺激による MMP-13 および ADAMTS-5 の発現上昇を有意に抑制した。この結果はガングリオシドが軟骨細胞保護的に機能する可能性を示唆している。

本研究結果は、OA の進行にガングリオシドの機能が深く関与していることを示した。ガングリオシドは軟骨の発生や分化には必須ではないが、正常な軟骨代謝を維持する上で重要な機能を持ち、さらには MMP-13 の発現や軟骨細胞アポトーシスを制御することにより OA の進行を抑制する機能を有している可能性が示唆された。これらのメカニズムに関するさらなる詳細な研究が必要であるが、ガングリオシドは OA 治療戦略の新しい有用な標的分子となりうるものと期待される。

本研究をさらに発展させるためにガングリオシド合成経路のさらに下流の遺伝子について同様の評価を行い、ガングリオシドのなかでどの分子が最も重要であるか確認できれば、創薬開発にも繋がるものと考えられる。

引用文献

- 1 Yoshimura, N. *et al.* Prevalence of knee osteoarthritis, lumbar spondylosis, and osteoporosis in Japanese men and women: the research on osteoarthritis/osteoporosis against disability study. *J Bone Miner Metab* **27**, 620-628, doi:10.1007/s00774-009-0080-8 (2009).
- 2 Woolf, A. D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* **81**, 646-656 (2003).
- 3 Lin, A. C. *et al.* Modulating hedgehog signaling can attenuate the severity of osteoarthritis. *Nat Med* **15**, 1421-1425, doi:10.1038/nm.2055 (2009).
- 4 Clements, K. M. *et al.* Gene deletion of either interleukin-1beta, interleukin-1beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy. *Arthritis Rheum* **48**, 3452-3463 (2003).
- 5 Matsui, Y. *et al.* Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. *Arthritis Rheum* **60**, 2362-2371, doi:10.1002/art.24705 [doi] (2009).
- 6 Ichikawa, Y. *et al.* Anti-agalactosyl IgG antibodies and isotype profiles of rheumatoid factors in Sjogren's syndrome and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* **16**, 709-715 (1998).
- 7 Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).
- 8 Hakomori, S. & Igarashi, Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* **118**, 1091-1103 (1995).
- 9 Kolter, T., Proia, R. L. & Sandhoff, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 25859-25862, doi:10.1074/jbc.R200001200 (2002).
- 10 Degroote, S., Wolthoorn, J. & van Meer, G. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 375-387, doi:10.1016/j.semcdb.2004.03.007 (2004).
- 11 Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50, doi:10.1126/science.1174621 (2010).
- 12 Seito, N. *et al.* Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice. *Arthritis Rheum* **64**, 2579-2588, doi:10.1002/art.34463 [doi] (2012).

- 13 Yamashita, T. *et al.* A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9142-9147 (1999).
- 14 Yamashita, T., Wada, R. & Proia, R. L. Early developmental expression of the gene encoding glucosylceramide synthase, the enzyme controlling the first committed step of glycosphingolipid synthesis. *Biochim Biophys Acta* **1573**, 236-240 (2002).
- 15 Hakomori, S. Bifunctional role of glycosphingolipids. Modulators for transmembrane signaling and mediators for cellular interactions. *J Biol Chem* **265**, 18713-18716 (1990).
- 16 David, M. J. *et al.* Characterization of gangliosides from normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum* **36**, 938-942 (1993).
- 17 David, M. J. *et al.* Gangliosides from normal and osteoarthritic joints. *J Rheumatol Suppl* **43**, 133-135 (1995).
- 18 Yamashita, T. *et al.* Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3445-3449, doi:10.1073/pnas.0635898100 (2003).
- 19 Glasson, S. S. *et al.* Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434**, 644-648 (2005).
- 20 Stanton, H. *et al.* Investigating ADAMTS-mediated aggrecanolysis in mouse cartilage. *Nat Protoc* **6**, 388-404, doi:10.1038/nprot.2010.179 (2011).
- 21 Matsui, Y. *et al.* Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. *Arthritis Rheum* **60**, 2362-2371 (2009).
- 22 Mankin, H. J., Dorfman, H., Lippiello, L. & Zarins, A. Biochemical and metabolic abnormalities in articular cartilage from osteo-arthritic human hips. II. Correlation of morphology with biochemical and metabolic data. *J Bone Joint Surg Am* **53**, 523-537 (1971).
- 23 Saouaf, S. J. *et al.* Deacetylase inhibition increases regulatory T cell function and decreases incidence and severity of collagen-induced arthritis. *Exp Mol Pathol* **87**, 99-104, doi:10.1016/j.yexmp.2009.06.003 (2009).
- 24 Prasad, I. *et al.* Inhibition of p38 pathway leads to OA-like changes in a rat animal model. *Rheumatology (Oxford)* **51**, 813-823, doi:10.1093/rheumatology/ker360 (2012).
- 25 Tsukuda, Y. *et al.* Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis. *PLoS One* **7**, e40136, doi:10.1371/journal.pone.0040136 [doi] PONE-D-11-23312 [pii] (2012).
- 26 Little, C. B. *et al.* ADAMTS-1-knockout mice do not exhibit abnormalities in aggrecan turnover in vitro or in vivo. *Arthritis Rheum* **52**, 1461-1472, doi:10.1002/art.21022 (2005).
- 27 Hashimoto, M., Nakasa, T., Hikata, T. & Asahara, H. Molecular network of cartilage

- homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev* **28**, 464-481, doi:10.1002/med.20113 (2008).
- 28 Shahrara, S., Pickens, S. R., Dorfleutner, A. & Pope, R. M. IL-17 induces monocyte migration in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **182**, 3884-3891, doi:10.4049/jimmunol.0802246 (2009).
 - 29 Shahrara, S. *et al.* IL-17-mediated monocyte migration occurs partially through CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 induction. *J Immunol* **184**, 4479-4487, doi:10.4049/jimmunol.0901942 (2010).
 - 30 Scanzello, C. R. & Goldring, S. R. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. *Bone* **51**, 249-257, doi:10.1016/j.bone.2012.02.012 (2012).
 - 31 Sokolove, J. & Lopus, C. M. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. *Ther Adv Musculoskelet Dis* **5**, 77-94, doi:10.1177/1759720X12467868 (2013).
 - 32 Ohmi, Y. *et al.* Gangliosides are essential in the protection of inflammation and neurodegeneration via maintenance of lipid rafts: elucidation by a series of ganglioside-deficient mutant mice. *J Neurochem* **116**, 926-935, doi:10.1111/j.1471-4159.2010.07067.x (2011).
 - 33 Lim, S. T., Esfahani, K., Avdoshina, V. & Mocchetti, I. Exogenous gangliosides increase the release of brain-derived neurotrophic factor. *Neuropharmacology* **60**, 1160-1167, doi:10.1016/j.neuropharm.2010.10.012 (2011).
 - 34 Liang, S. *et al.* Ganglioside GD1a is an essential coreceptor for Toll-like receptor 2 signaling in response to the B subunit of type IIb enterotoxin. *J Biol Chem* **282**, 7532-7542, doi:10.1074/jbc.M611722200 (2007).
 - 35 Zhu, Y. *et al.* Lowering glycosphingolipid levels in CD4⁺ T cells attenuates T cell receptor signaling, cytokine production, and differentiation to the Th17 lineage. *J Biol Chem* **286**, 14787-14794, doi:10.1074/jbc.M111.218610 (2011).
 - 36 Nagafuku, M. *et al.* CD4 and CD8 T cells require different membrane gangliosides for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E336-342, doi:10.1073/pnas.1114965109 (2012).
 - 37 Ziolkowska, M. *et al.* High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism. *J Immunol* **164**, 2832-2838 (2000).
 - 38 Zamli, Z. & Sharif, M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *Int J Rheum Dis* **14**, 159-166, doi:10.1111/j.1756-185X.2011.01618.x (2011).

- 39 Troeberg, L. & Nagase, H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 133-145, doi:10.1016/j.bbapap.2011.06.020 (2012).
- 40 Ferrari, G., Anderson, B. L., Stephens, R. M., Kaplan, D. R. & Greene, L. A. Prevention of apoptotic neuronal death by GM1 ganglioside. Involvement of Trk neurotrophin receptors. *J Biol Chem* **270**, 3074-3080 (1995).
- 41 Cavallini, L., Venerando, R., Miotto, G. & Alexandre, A. Ganglioside GM1 protection from apoptosis of rat heart fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **370**, 156-162, doi:10.1006/abbi.1999.1378 (1999).
- 42 Fighera, M. R. *et al.* GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylenetetrazole. *Neurobiol Dis* **22**, 611-623, doi:10.1016/j.nbd.2006.01.002 (2006).
- 43 Gorria, M. *et al.* Protective effect of monosialoganglioside GM1 against chemically induced apoptosis through targeting of mitochondrial function and iron transport. *Biochem Pharmacol* **72**, 1343-1353, doi:10.1016/j.bcp.2006.07.014 (2006).
- 44 Sokolova, T. V., Zakharova, I. O., Furaev, V. V., Rychkova, M. P. & Avrova, N. F. Neuroprotective effect of ganglioside GM1 on the cytotoxic action of hydrogen peroxide and amyloid beta-peptide in PC12 cells. *Neurochem Res* **32**, 1302-1313, doi:10.1007/s11064-007-9304-2 (2007).
- 45 Hakomori, S. I. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 325-346, doi:10.1016/j.bbagen.2007.08.015 (2008).
- 46 Kuan, C. T. *et al.* Multiple phenotypic changes in mice after knockout of the B3gnt5 gene, encoding Lc3 synthase--a key enzyme in lacto-neolacto ganglioside synthesis. *BMC Dev Biol* **10**, 114, doi:10.1186/1471-213X-10-114 (2010).
- 47 Liang, Y. J. *et al.* Switching of the core structures of glycosphingolipids from globo- and lacto- to ganglio-series upon human embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 22564-22569, doi:10.1073/pnas.1007290108 (2010).
- 48 Ogasawara, N. *et al.* Accelerated biosynthesis of neolacto-series glycosphingolipids in differentiated mouse embryonal carcinoma F9 cells detected by using dodecyl N-acetylglucosaminide as a saccharide primer. *J Biochem* **149**, 321-330, doi:10.1093/jb/mvq142 (2011).
- 49 Hellio Le Graverand-Gastineau, M. P. OA clinical trials: current targets and trials for OA. Choosing molecular targets: what have we learned and where we are headed? *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 1393-1401, doi:10.1016/j.joca.2009.04.009 (2009).

- 50 Nagahori, N., Yamashita, T., Amano, M. & Nishimura, S. Effect of ganglioside GM3 synthase gene knockout on the glycoprotein N-glycan profile of mouse embryonic fibroblast. *Chembiochem* **14**, 73-82, doi:10.1002/cbic.201200641 (2013).