HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	関節軟骨修復における糖脂質の機能解析［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	松岡, 正剛
Description	配架番号：2233
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12129号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61937
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masatake_Matsuoka_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　松岡　正剛

学 位 論 文 題 名

関節軟骨修復における糖脂質の機能解析

(The analysis of the glycosphingolipids functions in the articular cartilage repair)

【背景と目的】

糖鎖構造の違いが、様々な生命現象を制御していることが明らかとなってきているが、軟骨代謝との関わりはほとんど明らかになっていない。我々は糖鎖の中でも、特にスフィンゴ糖脂質と軟骨代謝との関連に注目し研究を進めてきた。Ceramide はスフィンゴ糖脂質の合成経路の起点となる脂質であるが、Ceramide から Glucosylceramide を合成するのに必要な Glucosylceramide 合成酵素 (Ugcg)を全身性にノックアウトすると胎生致死であることがすでに明らかになっている。そこで我々は Ugcg を選択的にノックアウトしたマウスを作成しその表現型を調査したところ、変形性膝関節症への進行が加速することを明らかにした。更に解析を行い、野生型マウスの軟骨細胞のプロファイリングを行なったところ、ガングリオシドと呼ばれる糖脂質のサブグループ群が他のサブグループ群と比較して最も豊富に存在する分子群であることが明らかとなり、全ガングリオシドを欠損するマウスで変形性関節症が加速することを明らかにした。これらの先行研究から糖脂質の中でも特にガングリオシドは軟骨代謝に深く関与しており、軟骨修復過程においても重要な役割を担う可能性が示唆される。そこで我々は、軟骨修復過程において糖脂質が重要な役割を担っているのではないかという仮説を立てた。この研究を行うに当たり全ガングリオシドを欠損する GM3 合成酵素欠損マウスのバックグラウンドである C57Bl/6 マウスにおける軟骨修復過程に関して予備実験を行うこととした。C57Bl/6 マウスはノックアウトマウスのバックグラウンドとして世界で最も広く用いられているが、8 週齢の成熟した個体においては軟骨修復が確認できないことが明らかになっているため、骨軟骨修復過程の解析には適していないことが知られている。しかし、骨軟骨修復の分子生物学的プロセスを解析するためにはノックアウトマウスは非常に有用なツールであるため、C57Bl/6 マウスにおける骨軟骨修復モデルの確立がまず必要であると考えた。そこで修復能力が低い組織における修復過程を観察するための一般的なアプローチとして、より再生能力の高い幼弱な個体を対象として骨軟骨修復モデルの確立を試みた。本研究の目的は、① 軟骨修復能が低い C57Bl/6 マウスにおいても軟骨修復が確認できる軟骨全層欠損モデルを確立すること、② 骨軟骨修復モデルの確立後に全ガングリオシドを欠損する GM3 合成酵素欠損マウスを用いて関節軟骨修復におけるガングリオシドの機能解析を行うことである。

【対象と方法】

①C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルについて

3、4 週齢および 8 週齢の C57Bl/6 マウスを用いた。27G 針で軟骨全層欠損用のデバイスを作製し、マウスの大腿骨顆部に軟骨全層欠損を作成した。このモデルの妥当性・再現性を検討するために軟骨全層欠損を作製したマウスを手術終了直後に安楽死させ、組織切片を作製した。軟骨の厚み、軟骨損傷の深さ、幅、面積を計測し、さらに軟骨の厚みと軟骨損傷の深さの比 (%depth)

も算出した。また、術後 8 週で組織切片を作成し HE 染色、Safranin O 染色を行った。軟骨修復の評価として、Wakitani らの Joint surface repair score を用いた。
②軟骨修復過程における糖脂質の機能解析について
我々が確立した C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルを用いた。まず 4 週齢の C57Bl/6 マウスにおける関節軟骨修復過程において経時的に全ガングリオシドの合成の起点となる GM3 の発現パターンを調査した。さらに全ガングリオシドを欠損する GM3 合成酵素ノックアウトマウスを用いて関節軟骨修復を調査した。さらに間葉系幹細胞をマウスより回収し軟骨分化培養を行った。

【結果】

①C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルについて
Day0 における軟骨の厚み、軟骨損傷の深さ、幅、面積は 3、4 週齢で有意に大きくなっていたが、軟骨の厚み/軟骨損傷の深さ（%depth）において有意差はなかった。また、%depth の変動係数は 3 群とも 10%以下であり軟骨損傷の再現性は高かった。8 週齢における軟骨修復はほとんど見られなかった一方、3、4 週齢においては、十分な軟骨修復を認めた。
②軟骨修復過程における糖脂質の機能解析について
4 週齢の野生型マウスにおける GM3 の発現パターンを免疫染色で解析したところ術後 6 週において一過性に修復組織周囲に発現しており、関節軟骨修復後期において重要な役割を担っていることが明らかとなった。GM3 合成酵素ノックアウトマウスについて術後 8 週で検討したところ、GM3 合成酵素ノックアウトマウスにおいてより良好な軟骨修復を示し、免疫染色では 10 型コラーゲンの染色性が抑制されていた。軟骨分化誘導実験においては、野生型マウス、GM3 合成酵素欠損マウスいずれも軟骨への分化は確認できたが、野生型マウスにおいて分化後期に見られた 10 型コラーゲンの発現、つまり軟骨の肥大化は、GM3 合成酵素欠損マウスにおいて抑制されておりこれは Indian-hedgehog シグナルを介していた。

【結論】

今回我々は幼若な個体を用いることによって、C57Bl/6 マウスにおける軟骨全層欠損モデルの確立に成功した。我々が独自に開発したモデルを用いて野生型マウスにおける GM3 の発現パターンを経時的に解析したところ関節軟骨修復後期に一過性に発現していた。さらに GM3 合成酵素欠損マウスで検討を行ったところ、野生型と比べ GM3 合成酵素欠損マウスの軟骨修復は促進される傾向を示した。また免疫染色において、修復組周囲の 10 型コラーゲンの染色性がノックアウトマウスで低下していた。加えて、それぞれの間葉系幹細胞を in vitro において軟骨分化誘導を行ったところ、GM3 合成酵素欠損マウスでは分化後期における軟骨肥大化が抑制されておりこれは Indian-hedgehog シグナルを介していることが解析により明らかになった。本研究結果は、関節軟骨修復過程にガングリオシドが深く関与していることを示した。ガングリオシド軟骨の発生や分化には必須ではないが、関節軟骨修復過程においては修復後期の軟骨細胞肥大化に特に重要な役割を担っていることが明らかとなった。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、ガングリオシドの発現を調整することは関節軟骨修復を促進する新しい治療戦略となりうるものと期待される。