



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	関節軟骨修復における糖脂質の機能解析 [全文の要約]
Author(s)	松岡, 正剛
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2233 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/61938
Type	doctoral thesis
File Information	Masatake_Matsuoka_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

松岡 正剛

Masatake Matsuoka

学 位 論 文 (要約)

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

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

松岡 正剛

Masatake Matsuoka

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		16 頁
考察		26 頁
総括および結論		29 頁
謝辞		30 頁
引用文献		31 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. Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Fumio Sasazawa, Daisuke Momma, Rikiya Baba, Kazutoshi Hontani, Norimasa Iwasaki

An Articular Cartilage Repair Model in Common C57Bl/6 Mice.

Tissue Engineering Part C Methods (Volume 21, Issue 8, Pages 767- 772, August 2015)

本研究の一部は以下の論文に投稿中である。

1. Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Fumio Sasazawa, Daisuke Momma, Rikiya Baba, Kazutoshi Hontani, Zenta Joutoku, Shinji Matsubara, Kentaro Homan, Norimasa Iwasaki

Depletion of Gangliosides Accelerates Articular Cartilage Repair through Indian Hedgehog Pathway

Cell Research (under review)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、岩崎倫政

汎用性の高い C57Bl/6 マウスにおける軟骨修復モデルの確立

第 27 回日本軟骨代謝学会

2014 年 2 月 28－29 日、京都、口演

2. Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Fumio Sasazawa, Daisuke Momma, Norimasa Iwasaki

An articular cartilage repair model in common C57Bl/6 mice

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2014

March 15-18, 2014/New Orleans, USA, poster

3. 松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、岩崎倫政

汎用性の高いC57Bl/6 マウスにおける軟骨修復モデルの確立

第29回日本整形外科基礎学術集会

2014年10月9-10日、鹿児島、ポスター

4. 松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、岩崎倫政

ガングリオシド欠損は軟骨の肥大化を抑制することにより関節軟骨修復を促進する

第28回日本軟骨代謝学会

2015年3月16-17日、東京、口演

5. Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Fumio Sasazawa, Daisuke Momma, Rikiya Baba, Kazutoshi Baba, Norimasa Iwasaki

Depletion of the gangliosides accelerated the articular cartilage repair in mice

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2015

March 28-31, 2015/ Las Vegas, USA, poster

6. Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Fumio Sasazawa, Daisuke Momma, Rikiya Baba, Kazutoshi Baba, Norimasa Iwasaki

Depletion of the gangliosides accelerated the articular cartilage repair in mice

12th International cartilage repair society World congress 2015

May 8-11, 2015/Chicago, USA, poster

7. 松岡正剛、小野寺智洋、笹沢史生、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、岩崎倫政

ガングリオシド欠損は軟骨の肥大化を抑制することにより関節軟骨修復を促進する

第 30 回日本整形外科基礎学術集会

2015 年 10 月 22-23 日、富山、口演

本研究の一部は以下の学会に発表予定である。

8. Masatake Matsuoka, Tomohiro Onodera, Fumio Sasazawa, Daisuke Momma, Rikiya Baba, Kazutoshi Baba, Zenta Joutoku, Shinji Matsubara, Kentaro Homan, Norimasa Iwasaki

Depletion of the gangliosides accelerated the articular cartilage repair in mice through Indian hedgehog pathway

Orthopaedic Research Society Annual Meeting 2016

March 5-8, 2016/ Florida, USA, podium

(The New Investigator Recognition Award Finalist)

緒 言

関節軟骨損傷は、修復能に乏しいため将来的には軟骨変性、変形性関節症（OA）へと進行し、患者の QOL を大きく損なうことが知られている¹。近年、軟骨の修復能力を増幅することにより軟骨修復を目指す試みが行われており、骨軟骨修復機構が注目を集めている²。

糖鎖は DNA、RNA、タンパク質に続く第 4 のセントラルドグマとして注目を集め、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た^{3,4}、軟骨代謝との関わりはほとんど明らかになっていない。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^{5,6}。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⁷⁻¹⁰。変形性膝関節症の関節軟骨では GSLs の組成が大きく変化すると報告されているが^{11,12}、この報告以降、軟骨代謝との関連はわからないままであった。そこで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。

セラミド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、セラミドからグルコシルセラミドを合成するのに必要なグルコシルセラミド合成酵素 (Ugcg) を全身性に欠損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¹³。そこで我々は II 型コラーゲン上の Ugcg を選択的にノックアウトしたマウスを作出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報告した¹⁴。さらに解析を進め軟骨細胞のプロフィリングを行ったところ、ガングリオシドと呼ばれるシアル酸残基を有する糖脂質のサブグループ群が他のグループと比較し軟骨に最も豊富に存在する分子群であることを明らかにし (Fig.1)、ガングリオシドを全身性に欠損させたマウスにおいて変形性膝関節症への進行が加速することを見出した¹⁵。

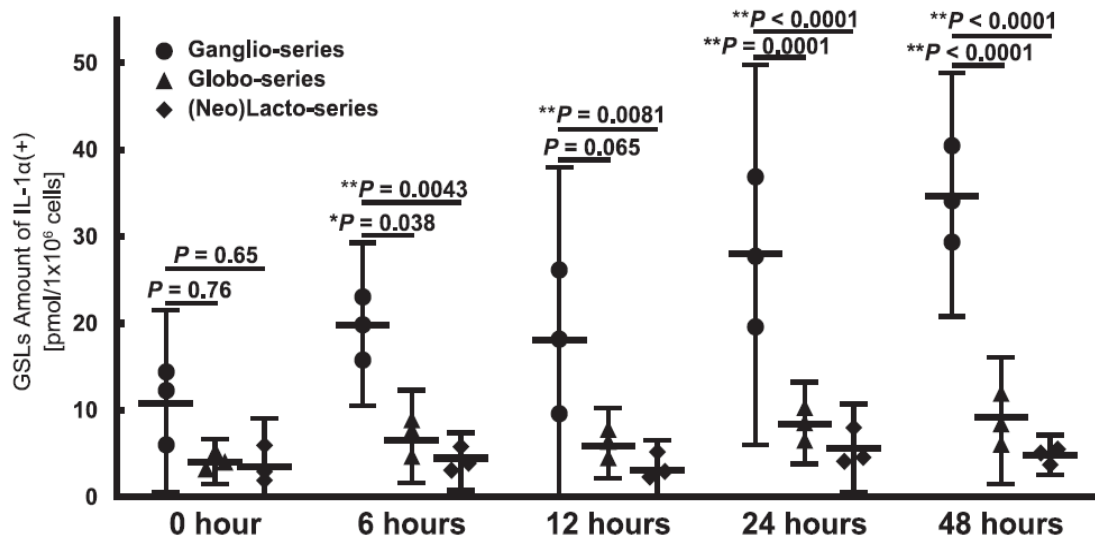


Figure 1 野生型マウスより回収した軟骨細胞に IL-1 負荷をかけたプロファイリング結果

野生型マウスより回収した軟骨細胞に対し炎症性の刺激である IL-1 負荷をかけ糖脂質のサブグループ群の挙動を質量解析で検討した。いずれのタイムコースにおいてもガングリオシドが他のサブグループ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った (Sasazawa et al. Osteoarthritis Cartilage 2014 より)

これらの我々の先行研究から糖脂質の中でも特にガングリオシドが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という仮説を立てた。本仮説を検証するために、まず C57BL/6 マウスにおける軟骨修復過程において全ガングリオシド合成の起点となる糖脂質 GM3 の発現パターンを解析することを試みた。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^{16,17}。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。

更に、我々が確立した C57BL/6 マウスの骨軟骨修復モデルを用いて GM3 の関節軟骨修復過程における解析をおこなったところ、GM3 は関節軟骨修復過程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ため、ガングリオシド欠損マウス、具体的には、ガングリオシドの合成起点である GM3 合成酵素のノックアウトマウス (GM3^{-/-} mice)を用いて関節軟骨修復における機能解析を進めた。GM3 合成酵素 (GM3S) 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. 2)、GM3^{-/-} mice 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。

本研究において、ガングリオシドが関節軟骨修復過程において重要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 合成酵素は関節軟骨修復を促進する上で、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明らかにしたのでここに報告する。

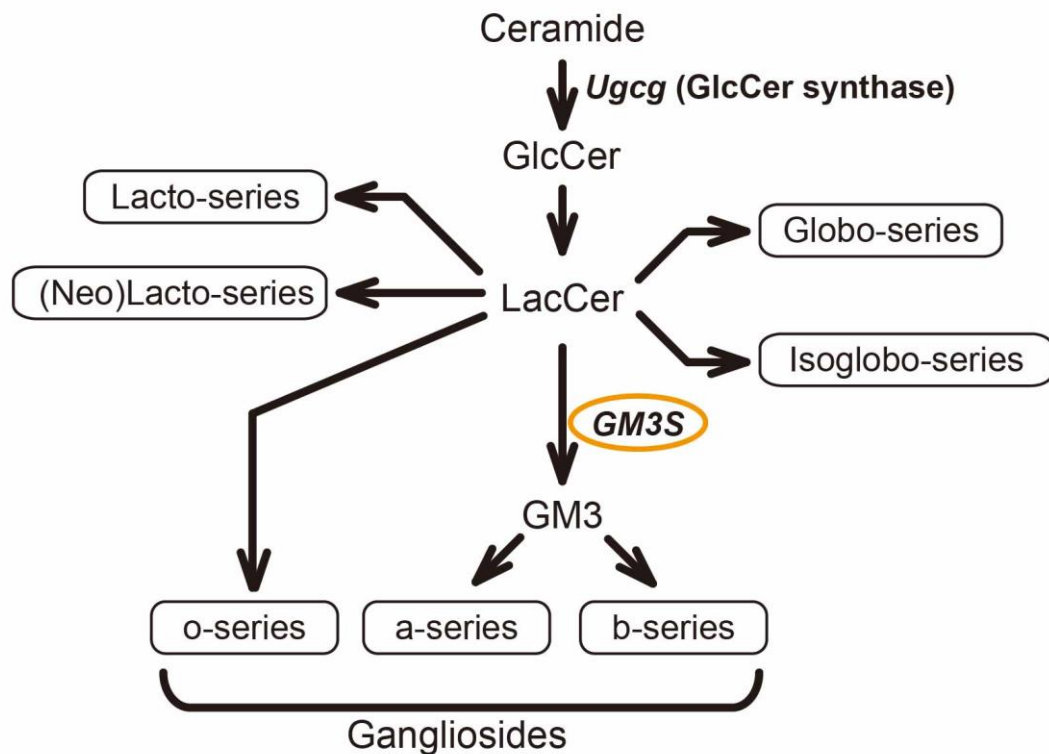


Figure 2 スフィンゴ糖脂質 (GSLs) とガングリオシド (gangliosides) の生合成経路

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 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.

cDNA	complementary DNA
CV	coefficient of variation
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSLs	Glycosphingolipids
GM3 ^{-/-} mice	GM3 synthase knockout mice
HE	hematoxylin eosin
Ihh	Indian-hedgehog
IL-1 α	interleukin-1alpha
mRNA	messenger RNA
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pH	power of hydrogen
QOL	quality of life
Runx2	Runt-related transcription factor 2
Runx3	Runt-related transcription factor 3
Saf-O	Safranin-O
SEM	standard error of the mean
TGF	Transforming growth factor
WT	wild type

実験方法

予備実験① ～C57BL/6 マウスにおける関節軟骨修復モデルの条件検討

先行研究では 8 週齢の C57BL/6 マウスに対し 26-G 針でマウス大腿骨顆部に軟骨全層欠損を作製し、関節軟骨修復が得られないことが報告されていた^{16,17}。まず、関節軟骨修復能が低いとされる C57BL/6 マウスにおいても関節軟骨修復が得られる条件を検討した。27-G 針に対し 21-G 針で外筒を作製し先端が約 300 μm だけ先端が出るように長さを調整したオリジナルデバイスを作製した。3、4、6、8 週齢でそれぞれ $n = 3$ で予備実験を行い、関節軟骨修復結果を検討した。

C57BL/6 マウスにおける関節軟骨修復モデルの確立

マウスに全身麻酔下に 1cm 程度の皮膚切開で外科的手技によりマウス大腿骨顆部を明らかにし、上記オリジナルデバイスで長軸方向に軟骨全層欠損を作製した。処置後、生理食塩水で洗浄し関節包を丁寧に縫合し大腿膝蓋関節を修復し終了した。手術後は麻酔から覚めるまで、保温に努めた。手術したマウスは手術後 1 時間以内に通常の運動に復帰することを確認した。

結果で後述するように予備実験において 3、4 週齢で良好な関節軟骨修復、6、8 週齢では先行研究と同様に関節軟骨修復は得られない傾向を示したので、本実験として 3、4、8 週齢で $n = 10$ とし検討を行った。また関節軟骨損傷の再現性も評価するために手術終了直後に $n = 10$ で各群検体を回収し関節軟骨損傷の関節軟骨の厚み、幅、深さ、面積、軟骨の厚みを計測し、軟骨の厚み/軟骨損傷の深さ (% depth) を算出した (Fig. 3)。

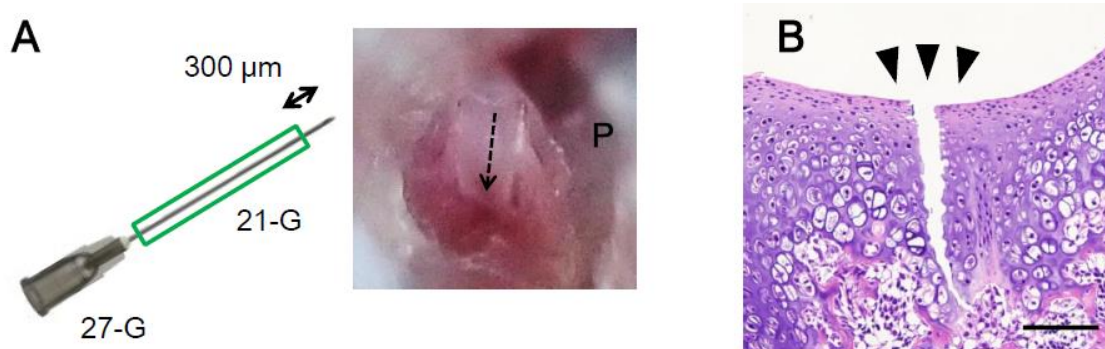


Figure 3 関節軟骨損傷に用いたオリジナルデバイスと関節軟骨損傷により代表的組織切片

A : 我々が作製したオリジナルデバイス。27-G 針に 21-G に外筒で作製し先端が 300 μ m だけ刃先がでるよう調整した。外科的処置によりマウス大腿骨顆部を明らかにし、破線矢印で示すように関節軟骨全層欠損を作製した。B : 関節軟骨損傷直後に回収した組織切片。(▼) が関節軟骨損傷部位を示す。Scale bar: 100 μ m

組織切片の作製

関節軟骨修復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。10%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。組織切片は大腿骨軸に対し垂直な平面で大腿骨遠位より 100 μ m の間隔で 3 枚作製し、スコアリングに用いた。

関節軟骨修復に対する組織学的評価

関節軟骨修復の組織学的評価を行うために、上記の方法で作製した切片に対し先行研究と同様のスコアリングで評価を行った¹⁹。

- **Cell morphology:** Hyaline cartilage 4, Mostly hyaline cartilage 3, Mostly fibrocartilage 2, Mostly non-cartilage 1, Non-cartilage only 0
- **Matrix staining:** Normal 3, Slightly reduced 2, Markedly reduced 1, No staining 0
- **Surface regularity:** Smooth 100-75% 3, Moderate 75-50% 2, Irregular 50-25 %, Severe irregularity 0
- **Thickness of cartilage:** > 2/3 depth 2, 1/3 to 2/3 depth 1, < 1/3 depth 0
- **Integration with naive cartilage:** Both edges integrated 2, One edge integrated 1, Neither edge integrated 0

免疫染色による検討

免疫染色は、ペルオキターゼ内因性処理および N-Histofine MOUSESTAIN KIT (Nichirei, Tokyo, Japan) で処理後、II 型コラーゲン、X 型コラーゲンに対する抗体は (Daiichi Fine Chemical, Toyama, Japan) 4°C overnight した。PBS 洗浄後、二次抗体として BIOTINYLATED Anti-goat-IgG (VECTOR 社) で反応させ DAB で発色した。

糖脂質 GM3 の正常関節軟骨修復過程における発現解析

結果で後述するように本実験において軟骨修復能が低いとされる C57BL/6 マウスの 4 週齢で良好な修復が得られることが明らかとなったので、4 週齢における関節軟骨修復過程における GM3 の発現パターンを免疫染色にて解析した。GM3 の免疫染色には術後 4、6、8 週のマウス膝関節を回収し凍結切片を作製した²⁰。作製した切片は一次抗体として抗 GM3 モノクローナル抗体(M2570, 1: 100 dilutions; コスモバイオ, 東京)を用い、二次抗体として Alexa 594 抗 IgM 抗体 (1: 1000 dilution; Life Technologies) を用いた。

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

結果で後述するように全ガングリオシド合成に起点となる GM3 が関節軟骨修復過程において一過性発現し、関節軟骨修復過程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ので、全ガングリオシドを欠損する GM3^{-/-} mice を用いて解析を進めることとした。本マウスは共同研究者の山下らが C57BL/6 マウスをバックグラウンドとして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. 4)¹⁸。山下 (麻生大学) 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 GM3^{-/-} mice のもととなった C57BL/6 (WT mice) 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. 4)。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。



Figure 4) 4 か月齢の WT マウス (左)と GM3^{-/-}マウス (右)。成長、発育には差が見られない。

関節軟骨修復過程におけるガングリオシド欠損の影響の評価

ガングリオシド欠損による関節軟骨修復過程の影響を調査するために、前述した GM3^{-/-} mice を用いて WT mice と関節軟骨修復過程を比較検討した。術後 8 週で関節軟骨修復の組織学的評価をスコアリングし免疫染色による検討を行った (n = 9)。

予備実験② 間葉系幹細胞の単離、培養

マウス間葉系幹細胞の回収は他の動物種と比較して困難であることが知られている。現在、マウス間葉系幹細胞の回収方法として骨髓から回収する方法と、四肢骨より回収する方法の 2 つが主に行われている。まず、*in vitro* における実験を開始する前に、これらのプロトコルを検討した。

骨髓から回収する方法として、8 週齢のマウスを用いた。安楽死後に 70%エタノールで洗浄し、軟部組織を可及的に除去し大腿骨と脛骨を回収した。両骨端をハサミで切除し、27-G の針を挿入し DMEM を 3 回フラッシュして骨髓を回収した。回収した骨髓は 70 μ m のフィルターメッシュで組織片を除去し、培養した。培養 8 時間後、培地交換を行い、以後 8 時間毎に培養 72 時間後まで培地交換を行った。以後 3 日毎に培地交換を行いコンフルエントに達した後に、室温の 0.25% トリプシン/EDTA (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)に 2 分間静置し浮遊してきた細胞のみを回収し継代した²¹。

マウス四肢骨より回収する方法として、生後 14 日齢のマウス四肢骨より間葉系幹細胞を回収した。具体的には安楽死させた後に、70%エタノールでマウスを洗浄し、マウス四肢骨を回収し組織片を可能な限り除去した。次に、四肢骨の両骨端をハサミで切断し髓腔内に 27-G の針を挿入し DMEM で 3 回フラッシュして骨髓を除去した。骨髓を完全に除去した後に、四肢骨を 1-3 mm 大に細かくした。採取した骨片を collagenase (Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) にて 37°C で 1 時間処理した後に、骨片を DMEM で 3 回洗浄し T-25 のフラスコに播種した。培養 5 日後に骨片を除去し、室温の 0.25% トリプシン/EDTA で 3 分間静置した後に、浮遊してきた細胞のみを回収し継代した²²。

軟骨細胞の単離, 培養

生後 5 日齢のマウスの膝関節軟骨から、軟骨細胞を単離した²³。採取した軟骨片を 0.25 % トリプシン (Wako) 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) にて 37°C で 4 時間処理し、軟骨細胞を単離した。

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 µg の Total RNA から逆転写にて cDNA を合成した。Thermal Cycler Dice Real Time System II (タカラ、大津、日本) を使用し、SYBR Premix Ex Taq II (タカラ) 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²⁴。

Table 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

Gene	Sequence	
<i>Type II collagen</i>	Forward	AGGATGGCTGCACCAAACAC
	Reverse	TGTCCATGGGTGCGATGTC
<i>Type X collagen</i>	Forward	AGCCCCAAGACACAATACTTCATC
	Reverse	TTTCCCCTTTCCGCCCATTACACAC
<i>Aggrecan</i>	Forward	CCCTCACCCCAAGAATCAAG
	Reverse	GGATAGTTGGGGAGCGACAC
<i>Runx2</i>	Forward	GATGGGACTGTGGTTACCG
	Reverse	GGTGAAACTCTTGCCCTCGTC
<i>Runx3</i>	Forward	CAGGTTCAACGACCTTCGATT
	Reverse	GTGGTAGGTAGCCACTTGGG
<i>Inh</i>	Forward	CTCTTGCCTACAAGCAGTTCA
	Reverse	CCGTGTTCTCCTCGTCCTT
<i>GM3 synthase</i>	Forward	ATGCCAAGTGAGTTCACCTCT
	Reverse	ACTCCAAATGCAACCAACGTG
<i>GAPDH</i>	Forward	ACTTTGTCAAGCTCATTCC
	Reverse	TGCAGCGAACTTTATTGATG

細胞増殖能試験

ガングリオシド欠損による *in vitro* での細胞増殖能の影響を調査するために以下の実験を行った。マウスより間葉系幹細胞、初代軟骨細胞を回収し 96 well プレートに播種した。培養開始 24 時間後に Cell Counting Kit-8 kit (同人化学研究所、熊本、日本)を用いて 450 nm で吸光度を測定し定量化した (n = 6)。

細胞遊走能試験

ガングリオシド欠損による *in vitro* での細胞遊走能の影響を調査するために wound healing assay を行った²⁵。マウスより間葉系幹細胞、初代軟骨細胞を回収し 6-well プレートに播種した。培養を継続し sub-confluent に達した後に、ピペットチップでプレート中央に直線的にスクラッチを行った (n = 6)。スクラッチ直後に PBS で洗浄し浮遊細胞を除去した。スクラッチ直後に cell-free の面積を測定し、6 時間後に同様に cell-free の面積を測定した。スクラッチ直後の cell-free 面積から 6 時間後の cell-free 面積を減じた値を遊走率と定義し比較検討した。

間葉系幹細胞からの軟骨分化誘導実験

1×10^6 個の間葉系幹細胞を遠沈管に培養し 300 g 6 分で遠心しペレットカルチャーシステムで培養を行った²¹。分化条件はダルベッコ改変イーグル培地 (ライフテクノロジーズ) に 10^{-7} M のデキサメタゾン (シグマ)、1 %の ITS (シグマ)、50 μ M のアスコルビン酸 (和光)、20 ng/ml の TGF- β 3 (ライフテクノロジーズ) に 1%の抗生剤を添加したものをを用いた。分化培地は 3 日毎に交換し、培養 7、14、21、28 日後にペレットを回収し Real-time PCR での解析に用いた。また、28 日間培養後のペレットは免疫染色により検討した。

初代軟骨細胞に対する GM3 合成酵素過剰発現系の検討

上記の方法で回収した初代軟骨細胞に対し GM3 合成酵素過剰発現状態での挙動を検討した。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。24-well プレートに初代軟骨細胞を播種、培養し sub-confluent に達した後に、上記 GM3 合成酵素発現ベクターとコントロールベクターを導入した。48 時間後に細胞を回収し Real-time PCR での軟骨関連遺伝子の解析に用いた。

統計分析

全てのデータは平均値±標準誤差 (SEM)をもって表記した。全てのデータは Bartlett の方法で等分散性を確認し、連続変数は分散分析 (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 unpaired t test を用いた。判定は P 値<0.05 で有意差ありとした。全ての統計解析は統計解析ソフト JMP Pro 11.0 (SAS Institute, Cary, NC)を用いて行った。

実験結果

予備実験①の結果 ～ C57BL/6 マウス 3、4 週齢では良好な関節軟骨修復が得られた

Eltawil らや Fitzgerald らによる先行研究では、C57BL/6 マウス 8 週齢では関節軟骨修復が得られないことが報告されていたが、まず 8 週齢での関節軟骨修復の評価を行った。関節軟骨損傷手技については、マウス膝関節直上より皮膚切開を加え、皮下に膝関節を明らかにした。傍膝蓋内側アプローチ（膝蓋腱の内側から膝蓋骨内側に切開を加え、膝蓋骨を外側にリリースする手技）で関節切開し、大腿骨顆部を明らかにした。ここまでは問題なかったが、片手で外科用ピンセットを把持し、もう片方の手でオリジナルデバイスにより関節軟骨損傷を作製しようとする、特に関節軟骨が硬い 8 週齢では大腿骨を把持する力がある程度必要であり、ピンセットに応力が集中し大腿骨顆部骨折が頻発した。対策を検討し、当初小さいマウス膝関節にアプローチするためにピンセットを先が細い鋭なものを使用していたが、これが応力の集中の原因となっていると考え、ピンセットを大きく幅が広いものに変更したところこの問題は改善された。

大腿骨顆部骨折の問題が改善した後に、関節軟骨損傷を作製し術後 8 週で検討したところ今度は、関節軟骨損傷を作製した箇所以外にも膝関節面全体に著明な変形性関節症への進行を認めた。この原因として術後回収した検体をまずマクロで詳細に確認したところ、マウス膝蓋骨が外側に脱臼したままになっているものが多数あることがわかった。これは傍内側膝蓋アプローチにて膝蓋骨を脱臼させ、術後に元の位置に戻す操作を行うが、この際、関節包に縫合などの処置を行っていない影響が考えられた。マウスの関節包は非常に小さいためその修復は非常に困難のように考えられたが、マウス関節包内側にセッシを鈍的に挿入し、鈍的に膝蓋骨を翻転することで関節包修復部位を予め明確にすることで修復位置を小さくわかりやすくするように工夫した。さらに縫合処置の際においても大腿膝蓋関節を正確に修復するために、5-0 の吸収糸をかけ軽く一重だけ結紮した後に膝関節を曲げ伸ばしするようにした。これにより膝蓋骨が大腿骨に対し正しい位置に存在しなければ、この膝の屈伸運動で適切な位置に戻せるようになった。これらの操作により、変形性関節症への進行は完全に抑制できるようになったが、やはり 8 週齢では関節軟骨修復は得られず、対象とする個体を幼若化することを試みた。

予備実験として対象とする週齢は、手術可能な最も幼若化可能な週齢は親マウスからの離乳可能な3週齢と考えたが、今後ノックアウトマウスへの適応を視野にいった場合、遺伝子型判定などに対し、数日の余裕があった方が現実的な実験計画には有利であることを考え可能なら4週齢での外科手術が良いと考え4週齢も対象とした。さらに関節軟骨修復が得られないマウスとして8週齢も対象とし、より成熟した個体での検討も考え6週齢も対象とした。

以上の結果として術後8週で評価したところ、予備実験においても6、8週齢ではほぼ変わらず関節軟骨修復は得られない傾向であったが、3、4週齢ではスコアリングでもよりよい関節軟骨修復が得られる傾向を示した (Fig. 4)。これら予備実験より、3、4週齢では関節軟骨修復モデルとして使える可能性が見出されたので、本実験に移行した。

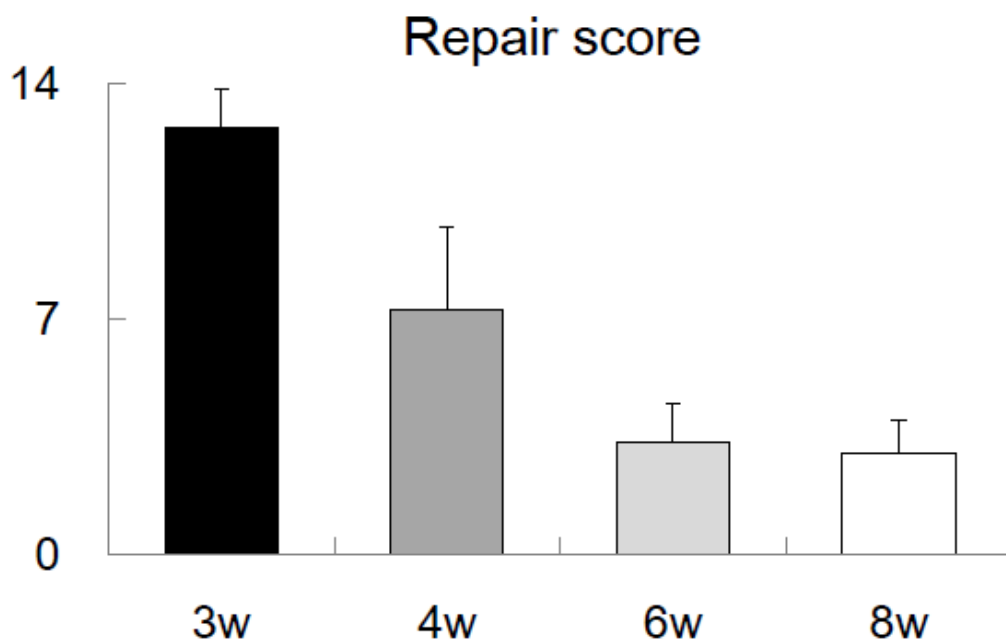


Figure 4 予備実験による C57BL/6 マウスの週齢による関節軟骨修復結果の検討

予備実験より 6、8 週齢では関節軟骨修復結果はかわらず、先行研究と同様に関節軟骨修復は得られなかった。一方、3、4 週齢では関節軟骨修復は促進されていた。

予備実験②の結果 ～骨髄間葉系幹細胞の回収方法としてはマウス四肢骨からの回収が効率的である

In vivo で行うマウス軟骨全層欠損モデルは骨髄からの間葉系幹細胞の動員を促すモデルであるので、in vitro に用いる間葉系幹細胞は骨髄から回収したものが望ましいと当初考えていた。しかしながら骨髄から間葉系幹細胞を回収するプロトコールでは、骨髄からの細胞は回収できる passage 0 の状態では細胞は順調に増殖していくものの、継代後に細胞の viability が突如として低下してしまい細胞を増殖させていくことができなくなった。原因として①継代の際の細胞の取り扱い方法が未熟なため、間葉系幹細胞に対し不必要なダメージを与えている可能性、②継代の際にトリプシン/EDTA の温度を室温とすることで線維芽細胞などの間葉系幹細胞以外の細胞を分離する方法を用いていたが²⁶、トリプシンの温度、暴露時間が間葉系幹細胞に影響を与えている可能性、③継代後の細胞密度が薄くなっており細胞が適切に増殖する前に脱分化している可能性、などを検討した。

①については当研究室で保有していた他の種の骨髄間葉系幹細胞を用いて、一般的な細胞取り扱い手技が問題ないことを確認し、これらでは細胞の継代、増殖は問題ないことをまず確認した。②については、トリプシンの温度については室温で用いることで、骨髄間葉系幹細胞とその他の線維芽細胞などを効率的に分離できることが報告されていたが、室温という温度設定が曖昧であったのでトリプシンの温度を 4、10、20、37℃と条件を振り同様に継代を行ったがいずれにおいてもやはり継代後の細胞増殖能は著しく衰え、コンフルエントには達しなかった。同様にトリプシンの暴露時間についても検討を行った。先行研究では暴露時間は 2 分とされていたが、30 秒、1、2、3、5 分と条件を振り検討を行なったが、いずれの暴露時間においてもやはり継代後の細胞増殖能は著しく衰え、コンフルエントには達しなかった。③については通常骨髄間葉系幹細胞の継代については 1:3 split が望ましいことが知られている。我々は継代の際に回収できた細胞数をカウントし 1:2、1:3、1:4 split で継代条件も検討したが、これまでの検討結果と同様に継代後の細胞増殖能は著しく衰え、コンフルエントには達しなかった。

これまでの検討により骨髄間葉系幹細胞の回収方法として骨髄からの回収は困難を極めることから、四肢骨より回収するプロトコールに移行した。この方法では良好に間葉系幹細胞を回収でき、継代も passage 10 まで形質を保持したまま可能であり細胞増殖も容易であった。この段階で四肢骨より回収した間葉系幹細胞の妥当性について文献検索による検討を行なったところ、四肢骨から回収した間葉系幹細胞は多分化能を有し、骨髄から回収した間葉系幹細胞とほぼ同等の挙動を示すことが報告されていた。さらに四肢骨から回収した間葉系幹細胞は骨髄から回収した間葉系幹細胞と比較して増殖能に富んでおり、継代により多数の細胞数が期待できる一方、骨髄から回収した細胞は増殖能に乏しく効果的におこなっても継代によりそれほどの細胞数が期待できないことがわかった (Fig. 5)。この点は我々の予備実験の結果を裏付けるものと考えた。

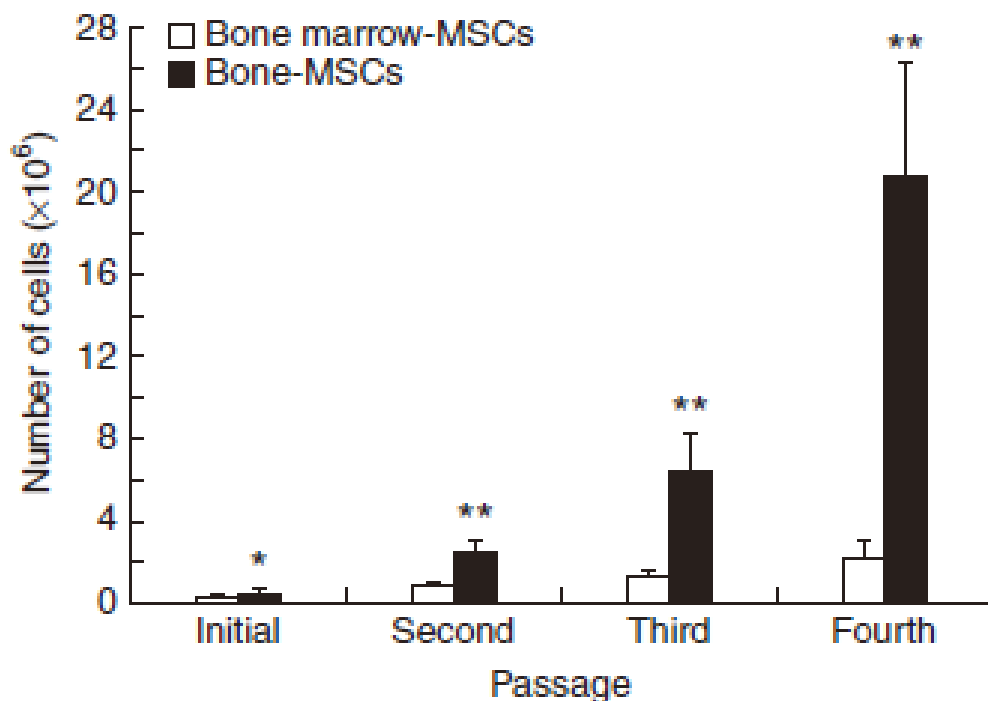


Figure 5 骨髄から回収したプロトコールと四肢骨から回収したプロトコールの間葉系幹細胞の継代による回収が期待できる細胞数の違い。骨髄から回収するプロトコールでは継代を繰り返しても細胞数の増加がそれほど見込めないのに対し、四肢骨から回収するプロトコールでは継代に従い、多数の細胞数が見込めることが報告されている (Zhu H et al. Nature protocol 2010 より)

さらに本実験に移行する前に、四肢骨から回収した間葉系幹細胞が分化能を適切に有するかを検討するために軟骨分化誘導実験を行い、軟骨分化マーカーとして一般的に用いられているⅡ型コラーゲンを Real-time PCR で検討した。passage 3、4 においても時系列に従ってⅡ型コラーゲンの発現は増加しており軟骨分化誘導は継代数に関わらず問題ないことを確認できた (Fig. 6)。これらの結果より本実験で用いる間葉系幹細胞はマウス四肢骨から回収するプロトコールで行うことを決定した。

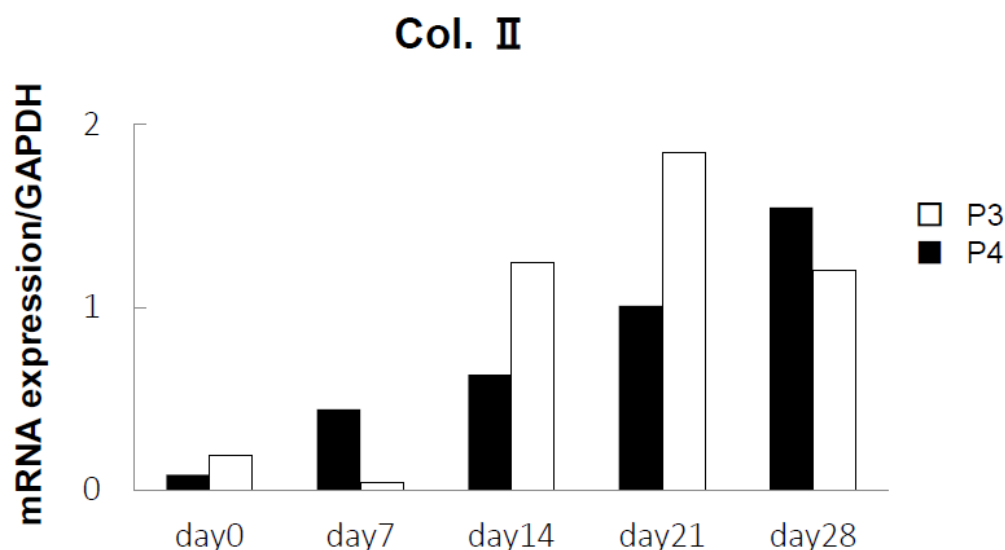


Figure 6 マウス四肢骨から回収した間葉系幹細胞を 3、4 継代しペレットカルチャーシステムによる三次元分化培養実験を行なった。28 日間分化培養を行い Real-time PCR で軟骨関連遺伝子であるⅡ型コラーゲンの発現を確認したところ経時的に発現が増加し、軟骨への分化誘導能を適切に有することが確認できた。

我々が考案したオリジナルデバイスを用いた関節軟骨損傷の再現性の検討

関節軟骨損傷モデルを確立する際に最も重要なのは関節軟骨損傷の再現性である。このことを検討するために関節軟骨損傷を行い、手術終了直後に検体を回収し検討を行った。関節軟骨の深さ、関節軟骨損傷の深さ、関節軟骨損傷の面積はいずれも 3、4 週齢において 8 週齢よりも有意に大きくなっており、関節軟骨損傷の幅は 3 群間で有意差はなかった。これら数値を標準化するために、軟骨の厚み/軟骨損傷の深さ (% depth) を算出しこれら値を比較検討したところ 3 群間でほぼ同様であった。また各項目の変動係数を算出したところ、関節軟骨の厚み、関節軟骨損傷の深さ、関節軟骨損傷の幅は 10%を超えていたが、標準化に用いた % depth の変動係数は 10%以下であった。具体的な数値を下記 Table. 2 に記す。また、関節軟骨損傷は全て軟骨下骨に達しており軟骨全層欠損モデルとしても妥当性も示された。

	関節軟骨の厚み (μm)	関節軟骨損傷の 深さ (μm)	関節軟骨損傷 の幅 (μm)	関節軟骨損傷の 面積 (μm^2)	%Depth (%)
3 週齢	258.05 $\pm$ 7.91 CV = 13.00%	327.03 $\pm$ 9.18 CV = 11.91%	20.29 $\pm$ 0.69 CV = 14.40%	6508.64 $\pm$ 425.37 CV = 27.73%	127.12 $\pm$ 1.85 CV = 6.17%
4 週齢	203.76 $\pm$ 8.66 CV = 18.04%	256.64 $\pm$ 9.27 CV = 15.33%	20.12 $\pm$ 0.48 CV = 10.07%	4601.50 $\pm$ 210.00 CV = 19.36%	126.86 $\pm$ 2.28 CV = 7.62%
8 週齢	92.07 $\pm$ 7.91 CV = 16.79%	110.91 $\pm$ 4.36 CV = 16.69%	18.05 $\pm$ 0.93 CV = 21.90%	2051.98 $\pm$ 170.54 CV = 35.26%	120.82 $\pm$ 2.12 CV = 7.45%

Table. 2 関節軟骨損傷直後の各パラメーター。CV: Coefficient of variation (変動係数)

3、4、8 週齢 C57BL/6 マウスにおける関節軟骨修復結果

術後 8 週で検体を回収し関節軟骨修復結果を組織学的に検討した (n = 10)。3、4 週齢では良好な修復を示したのに対し、8 週齢では先行研究と同様修復は不十分であった (Fig. 7)。

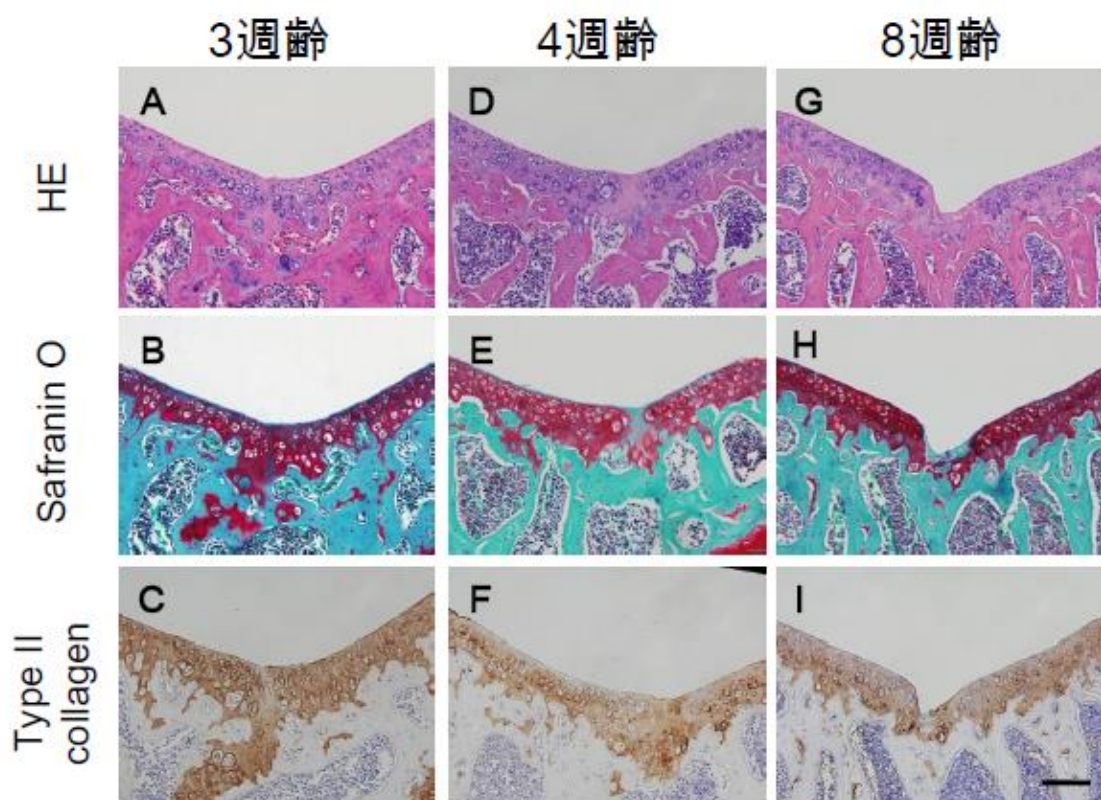


Figure 7 関節軟骨修復結果の代表切片。A-C: 3 週齢、D-F: 4 週齢、G-I: 8 週齢。3、4 週齢では良好な修復を示したのに対し 8 週齢では修復は得られなかった。 Scale bar: 100 μm 。

関節軟骨修復結果のスコアリング

前述したスコアリングに従って各週齢の関節軟骨修復結果を評価した。術後 8 週において 3、4 週齢では 8 週齢と比較して有意にスコアは高くなっていた (mean $\pm$ SEM; 3 週齢: 12.17 ± 0.59 versus 8 週齢: 3.77 ± 0.43 [$P < 0.0001$], 4 週齢: 8.03 ± 0.79 versus 8 週齢: 3.77 ± 0.43 [$P < 0.0001$]) (Fig. 8A)。スコアリングの変動係数も算出したところ 3 週齢で 10.69 %、4 週齢で 14.3 %、8 週齢で 7.86 %であった。スコアリングの各パラメーターに解析したところ 3、4 週齢では morphology で有意に優れていた。3 週齢では“hyaline cartilage repair”を示し(cell morphology: 3.50 ± 0.13)、4 週齢では“fibrocartilage repair”を示し(cell morphology: 2.40 ± 0.21)、8 週齢では“non-cartilage repair”を示した(cell morphology: 1.33 ± 0.01) (Fig. 8B)。

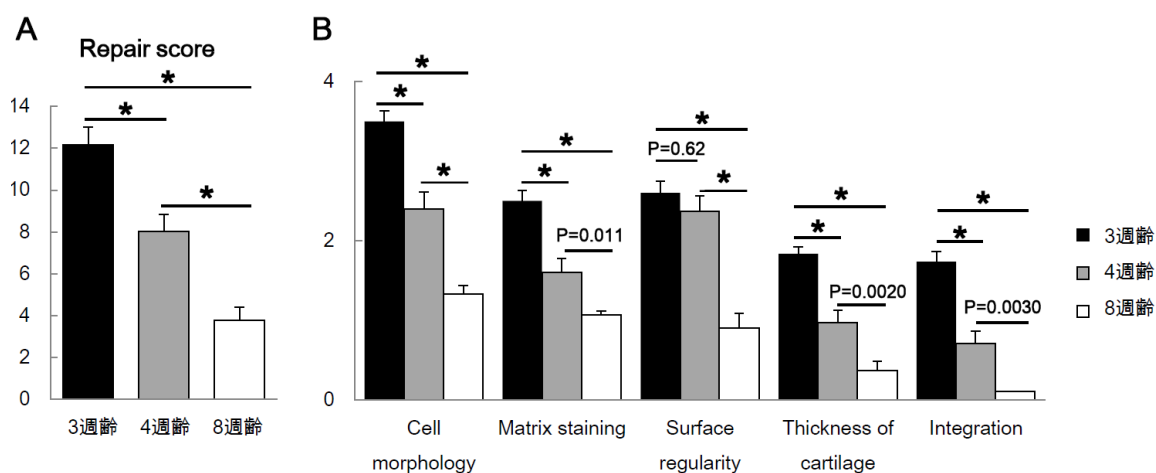


Figure 8 関節軟骨修復結果スコアリング。A) 3、4、8 週齢での関節軟骨修復結果。B) 各サブグループでの解析結果。*: $P < 0.0001$.

関節軟骨修復早期における週齢の違いによる関節軟骨修復の応答性の違い

週齢により関節軟骨修復の挙動が異なる理由を調査するために、関節軟骨修復早期の応答性を調査するために術後 2 週で検体を回収し検討を行った。術後 2 週時点で各週齢の関節軟骨損傷部は修復組織で充填されていたが、3 週齢では硝子軟骨様の組織で充填されていたが、4、8 週齢では線維様の組織で充填されていた (Fig. 9)。これらの結果より今回の関節軟骨修復モデルにおける修復結果の違いは、関節軟骨損傷早期の反応が違う可能性が考えられた。

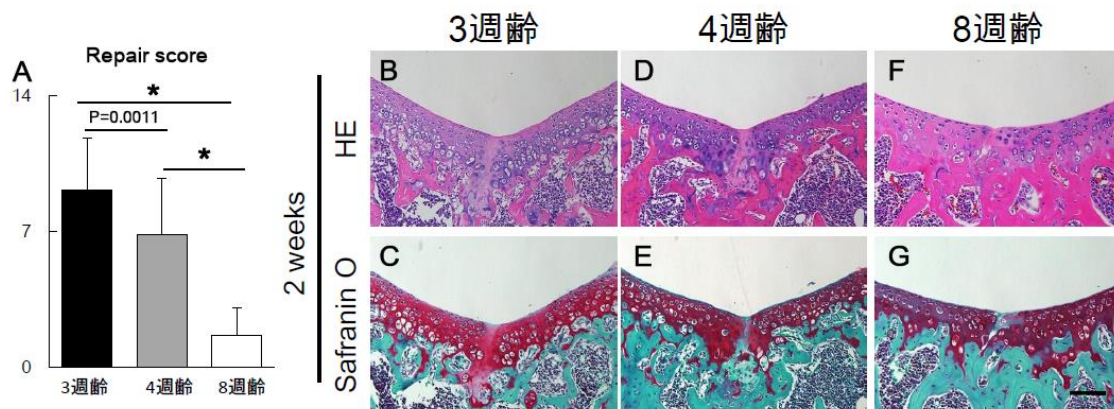


Figure 9 A)術後2週での関節軟骨修復結果。 B-G) 3、4、8週齢での術後2週での代表的組織切片を示す。 *: $P < 0.0001$.

関節軟骨修復過程における糖脂質 GM3 の発現パターン解析

これまでの結果により、我々が確立した C57BL/6 マウスにおける関節軟骨修復モデルは対象を幼若化することで良好な関節軟骨修復結果が得られることが明らかとなった。このことより 4 週齢の C57BL/6 マウスを用いてガングリオシドの合成経路の起点となる糖脂質 GM3 の免疫染色を行い、関節軟骨修復過程を経時的に評価した。GM3 は術後 4 週より関節軟骨修復組織周囲に発現し始め、術後 6 週でピークを示し、術後 8 週で減弱する傾向を示した。

GM3 合成酵素ノックアウトマウスを用いた WT との関節軟骨修復結果における比較検討

前述した通り GM3 は関節軟骨修復過程において修復後期に一過性発現を示すことが明らかとなり、関節軟骨修復過程において重要な役割を担っていることが示唆されたので、次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 (GM3^{-/-} mice) を用いて C57BL/6 マウス(WT)と関節軟骨修復結果を 4 週齢と 8 週齢でそれぞれ比較検討した (n=9)。術後 8 週において組織学的に GM3^{-/-} mice で良好な修復を示した。

増殖能試験と遊走能試験には WT mice と GM3^{-/-} mice で有意差はなかった

ガングリオシド欠損の *in vitro* での影響を調査するために前述した方法で、間葉系幹細胞と初代軟骨細胞を回収し評価を行った。増殖能試験において培養 24 時間後に吸光度を測定したところ WT mice と GM3^{-/-} mice の間葉系幹細胞、初代軟骨細胞において有意差はなかった。

同様に、遊走能試験として用いた Wound healing assay においても WT mice と GM3^{-/-} mice の間葉系幹細胞、初代軟骨細胞において遊走率に有意差はなかった。

関節軟骨修復結果の免疫染色による検討

4 週齢マウス、術後 8 週の組織切片を免疫染色により検討した。II 型コラーゲンは WT と GM3^{-/-} mice で染色性に差はなかったが、X 型コラーゲンにおいては GM3^{-/-} mice の関節軟骨修復組織周囲の染色性が WT と比較して低下していた。

軟骨分化誘導実験による検討

MSCs を前述した方法でマウスより回収し軟骨分化誘導実験を行った。培養 28 日後において免疫染色で検討したところ、WT と GM3^{-/-} mice の両群においてアルシアンブルー染色、II 型コラーゲンの染色性は十分であり、両群共に軟骨への分化は問題ないと考えられたが、X 型コラーゲンの染色性が GM3^{-/-} mice において低下していた。

また Real-time PCR で解析したところ、II 型コラーゲンの mRNA 発現は GM3^{-/-} mice において亢進していた。一方アグリカンの mRNA 発現は両群間で有意差はなかった。X 型コラーゲンの mRNA 発現は GM3^{-/-} mice において抑制されていた。これまでの研究により、*in vivo*、*in vitro* の両方において GM3^{-/-} mice における X 型コラーゲンの抑制、つまり軟骨の肥大化抑制が明らかとなったので、引き続き軟骨肥大化関連遺伝子の解析を行った。Runx2, 3 (Runx2, 3) mRNA の発現は GM3^{-/-} mice で抑制されておりその上流の調節因子である Indian hedgehog (Ihh) mRNA の発現も抑制されていた。

WT から回収した初代軟骨細胞に対する GM3 合成酵素 (GM3S) の一過性過剰発現の検討

これまでの検討で GM3^{-/-} mice では軟骨細胞の X 型コラーゲンの発現が低下、すなわち軟骨細胞の肥大化が抑制されることが明らかとなったので、今度は逆に WT の初代軟骨細胞に GM3S を一過性過剰発現させることによりその挙動を調査した。一過性過剰発現後 48 時間後 GM3S mRNA の発現はコントロールベクター群 (Mock) と比較して有意に上昇していた。X 型コラーゲン、Runx2、Ihh mRNA の発現も GM3S 導入群で Mock 群と比較して有意に発現上昇を認めた。Runx3 の発現も GM3S 導入群で発現上昇する傾向を示した。

考 察

関節軟骨損傷の動物モデルを確立する際に、最も重要なことは外科手技の再現性である²⁷⁻²⁹。我々も C57BL/6 マウスの関節軟骨修復モデルの確立を目指す上で、この点を念頭に置きながら実験を行った。オリジナルデバイスとして工夫したことは、先行研究では関節軟骨損傷の深さのメルクマールとして 26-G 先端より 200 μm の地点にビーズを溶接していたが、実際にマウスの関節軟骨損傷実験を行ってみると関節軟骨は特に 8 週齢で固く 2-3 回関節軟骨損傷をつけると刃先が曲がってしまい以後の実験に使用できないことがわかったため、先行研究通りのビーズの溶接ではデバイスの準備に手間がかかってしまうことが明らかであった。また、先行研究では 26-G 針で行った C57BL/6 マウス 8 週齢では関節軟骨修復が得られないことがわかっていたので、より損傷を小さくするために 27-G 針を採用した。しかし 27-G 単独で関節軟骨損傷を作製しようとする、27-G 自体が細いためしななってしまい、手技の再現性が得られないことが分かった。上記問題点を解決するために 21-G で外筒を作製し 27-G の刃先がおおよそ 300 μm だけ出るように調整した。このオリジナルデバイスにより刃先のメルクマールとしての機能と 27-G の細さを克服し、かつ容易に刃先交換を可能とした。

関節軟骨損傷の再現性を確認したところ、マウスの成長に従い関節軟骨損傷の深さ、幅、面積などは各世代間で測定値に差はあったものの、これらを標準化するために用いた %depth については各世代間ではほぼ同等の値を示した。また変動係数については関節軟骨損傷の深さ、幅、面積は 10% 以上であったものの、%depth では 10% 前後と高い再現性を示した。さらに、関節軟骨損傷手技以外にも外科手技の総合的な再現性についても評価するために、関節軟骨修復スコアについても変動係数を算出したところ、15% 程度と動物実験としては十分な再現性が保たれていると考えられた。

C57BL/6 マウスは関節軟骨修復能力が低いことがすでに先行研究により明らかとなっていたが^{16,17}、対象を幼若化することにより 3、4 週齢では十分な修復を示し関節軟骨修復モデルとして十分であることがわかったので、関節軟骨修復における糖脂質の機能解析に移行した。まず、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に起点となる GM3 の発現パターンを解析したところ、関節軟骨修復後期に一過性に修復組織周囲に発現しており、関節軟骨修復過程に重要な役割を担っていることが強く示唆された。関節軟骨修復過程に一過性発現が確認されている分子はわずかである。Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)はケモカインの一種であり関節軟骨修復過程の早期に発現し骨髄間葉系幹細胞を損傷部位に動員する機能を有することを我々が過去に報告している³⁰。また細胞外マトリックス糖蛋白ファミリーに属するテネイシン C は、関節軟骨修復過程早期に発現し軟骨分化を促進することが報告されている³¹。しかしながら、我々が渉猟しえる限り、関節軟骨修復過程後期に一過性発現が同定された分子はこれまでなく、GM3 が初めての分子である。

GM3 が関節軟骨修復過程後期に一過性発現を示したことから、ガングリオシドは細胞の遊走能や増殖能など損傷早期に重要なファクターよりも、軟骨分化、特に後期の肥大化のプロセスにおいて重要な役割を担っているのではないかと考えられた。実際、間葉系幹細胞と軟骨細胞の遊走能や増殖能を調査したがガングリオシド欠損の影響は検出できなかった。一方、*in vivo*、*vitro* の両方において軟骨細胞の肥大化が GM3^{-/-} mice において抑制されており、本仮説を支持する結果であった。軟骨再生において再生した軟骨細胞が肥大化することによりその形質を失い力学的性質が劣ってしまうことが問題となるが、ガングリオシドの発現を調整することでこの問題を克服できる可能性がある。

我々の先行研究において GM3^{-/-} mice では関節軟骨変性は加速し変形性膝関節症が増悪することがすでに明らかとなっており¹⁵、当初 GM3^{-/-} mice では関節軟骨修復は阻害されると考えていたが、驚くことに関節軟骨修復は促進された。過去の報告では関節軟骨の肥大化を抑制するような表現形を呈するノックアウトマウスでは関節軟骨変性は抑制される結果を示している³²⁻³⁴。一方、軟骨細胞肥大化はメカニカルストレスなどに対する一般的な防御機構としての働きも有し、軟骨細胞の肥大化抑制が変形性関節症の進行を予防するかにおいて結論は出ていない。GM3^{-/-} mice における変形性関節症の病態としては、メカニカルストレスに対する防御機構である軟骨肥大化の破綻が関節軟骨修復を上回ったと考えられるが変形性関節症との整合性については今後も検討が必要である。

Hedgehog ファミリーに属する Indian hedgehog は成長板の形成と軟骨の肥大化に必須の分子群であり Runx2 と Runx3 の発現を介し制御を行う³⁵。変形性関節症の病態との関連では Indian hedgehog を選択的にノックアウトしたマウスにおいて変形性関節症への進行が抑制されることが明らかとなっている³⁶。このことより Indian hedgehog シグナルを制御することは変形性関節症の病態を解決する上で、重要なアプローチとなりうるが全身性に Indian hedgehog を欠損させると胎生致死であることからこれまで積極的な遺伝子治療ターゲットとはならなかった³⁷。しかしながら GM3^{-/-} mice は発生、発育は WT と同様であることから、ガングリオシドを介して Indian hedgehog シグナルにアプローチすることは、全身性に影響を与えることなく関節軟骨を修復させる新しいアプローチとなりうると思われる。

本研究の限界として以下の点が挙げられる。関節軟骨損傷モデルについては、第一に本モデルで関節軟骨修復が得られるのは幼若化した個体であることが挙げられる。実際の臨床で関節軟骨損傷が問題になるのは関節軟骨修復能が低い成人である。しかしながら、修復能が低いとされる組織においては対象となる個体を幼若化させることは一般的なアプローチ方法であり³⁸⁻⁴¹、この方法で得られた知見を成人に還元させていくことを検討していくことが重要であると考えている。第二には、関節軟骨損傷の外科手技は実体顕微鏡下での手技を要し、習熟までに若干の時間を要することである。しかしながら、手技を一度習得すると今回我々が示したように高い再現性が得られることが期待できる。関節軟骨修復におけるガングリオシドの機能解析の研究については、過去に我々が GM3^{-/-} mice は膝関節炎が増悪しやすいことを報告していることが挙げられる⁴²。このような免疫不全状態は関節軟骨修復を加速する要因であることが先行研究により報告されている^{16,17}。本研究においてそのような要因があった可能性はあるものの、本実験マウスに膝関節炎の症状は確認できていないことから、GM3^{-/-} mice において関節軟骨修復が加速した要因として関節軟骨損傷周囲の軟骨細胞の肥大化が抑制されることにより良好な修復を示したものと考えている。

総括および結論

- 我々は、関節軟骨修復過程を分子生物学的に解析するためにノックアウトマウスのバックグラウンドとして一般的に使用されている C57BL/6 マウスでの関節軟骨修復モデルを確立した。8 週齢では先行研究同様に関節軟骨修復は得られなかったが、3、4 週齢では良好な修復が得られた。
- 我々が確立した関節軟骨修復モデルを用いて、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、経時的に検討したところ、関節軟骨修復後期に一過性に発現していた。
- ガングリオシドを欠損するマウスにおいてその表現形を調査したところ野生型と比較し関節軟骨修復が加速し、関節軟骨損傷周囲の軟骨細胞の肥大化が抑制されていた。
- *In vitro* での軟骨分化誘導実験において、ガングリオシド欠損により軟骨細胞の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た。また、野生型の初代軟骨細胞に GM3 合成酵素を過剰発現させてところ軟骨細胞の肥大化が亢進し、Indian hedgehog シグナルも亢進していた。

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。ガングリオシドは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。

謝辞

本論文は、筆者が北海道大学大学院医学研究科 医学専攻 機能再生医学講座 整形外科学分野博士課程在学中に行った研究をまとめたものです。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました整形外科学分野教授 岩崎倫政先生、名誉教授 三浪明男先生に心より感謝いたします。

本研究を行うにあたり、貴重な GM3 合成酵素ノックアウトマウスのご提供並びに実験に関するご助言を頂きました麻布大学獣医学部獣医学科生化学教室教授の山下匡先生に深い感謝の意を表します。

これまでの研究課程において数々のご指導を賜りました北海道大学医学部機能再生医学講座整形外科学分野講師の小野寺智洋先生をはじめ、整形外科学分野の諸先生方、研究にご助力頂きました皆様に心よりの感謝を申し上げます。

引用文献

1. Heir, S. *et al.* Focal cartilage defects in the knee impair quality of life as much as severe osteoarthritis: a comparison of knee injury and osteoarthritis outcome score in 4 patient categories scheduled for knee surgery. *Am. J. Sports Med.* **38**, 231-237 (2010).
2. Johnson, K. *et al.* A Stem Cell-Based Approach to Cartilage Repair. *Science* (2012).
3. Dwek, R.A. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem. Rev.* **96**, 683-720 (1996).
4. Dalziel, M., Crispin, M., Scanlan, C.N., Zitzmann, N. & Dwek, R.A. Emerging principles for the therapeutic exploitation of glycosylation. *Science* **343**, 1235681 (2014).
5. 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).
6. Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).
7. Hakomori, S. & Igarashi, Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J. Biochem.* **118**, 1091-1103 (1995).
8. Kolter, T., Proia, R.L. & Sandhoff, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 25859-25862 (2002).
9. Degroote, S., Wolthoorn, J. & van Meer, G. The cell biology of glycosphingolipids. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 375-387 (2004).
10. Lingwood, D. & Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* **327**, 46-50 (2010).
11. David, M.J. *et al.* Characterization of gangliosides from normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* **36**, 938-942 (1993).
12. David, M.J. *et al.* Gangliosides from normal and osteoarthritic joints. *J. Rheumatol. Suppl.* **43**, 133-135 (1995).
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. Seito, N. *et al.* Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice. *Arthritis Rheum.* (2012).
15. Sasazawa, F. *et al.* Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 313-322 (2014).
16. Fitzgerald, J. *et al.* Evidence for articular cartilage regeneration in MRL/MpJ mice.

- Osteoarthritis Cartilage* **16**, 1319-1326 (2008).
17. Eltawil, N.M., De Bari, C., Achan, P., Pitzalis, C. & Dell'accio, F. A novel in vivo murine model of cartilage regeneration. Age and strain-dependent outcome after joint surface injury. *Osteoarthritis Cartilage* **17**, 695-704 (2009).
 18. Yamashita, T. *et al.* Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 3445-3449 (2003).
 19. Wakitani, S. *et al.* Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J. Bone Joint Surg. Am.* **76**, 579-592 (1994).
 20. Li, J.W. *et al.* In vitro chondrogenesis of the goat bone marrow mesenchymal stem cells directed by chondrocytes in monolayer and 3-dimentional indirect co-culture system. *Chin. Med. J. (Engl)* **124**, 3080-3086 (2011).
 21. Soleimani, M. & Nadri, S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat. Protoc.* **4**, 102-106 (2009).
 22. Zhu, H. *et al.* A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat. Protoc.* **5**, 550-560 (2010).
 23. Gosset, M., Berenbaum, F., Thirion, S. & Jacques, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat. Protoc.* **3**, 1253-1260 (2008).
 24. Pei, M., Li, J.T., Shoukry, M. & Zhang, Y. A review of decellularized stem cell matrix: a novel cell expansion system for cartilage tissue engineering. *Eur. Cell Mater.* **22**, 333-343; discussion 343 (2011).
 25. Liang, C.C., Park, A.Y. & Guan, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat. Protoc.* **2**, 329-333 (2007).
 26. Nadri, S. *et al.* An efficient method for isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* **51**, 723-729 (2007).
 27. Buckwalter, J.A. Articular cartilage injuries. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 21-37 (2002).
 28. Ding, C. *et al.* Natural history of knee cartilage defects and factors affecting change. *Arch. Intern. Med.* **166**, 651-658 (2006).
 29. Wang, Y. *et al.* Factors affecting progression of knee cartilage defects in normal subjects over 2 years. *Rheumatology (Oxford)* **45**, 79-84 (2006).
 30. Sukegawa, A. *et al.* Repair of Rabbit Osteochondral Defects by an Acellular Technique with an Ultrapurified Alginate Gel Containing Stromal Cell-Derived Factor-1. *Tissue Eng. Part A* (2012).
 31. Okamura, N. *et al.* Deficiency of tenascin-C delays articular cartilage repair in mice. *Osteoarthritis Cartilage* **18**, 839-848 (2010).

32. Kamekura, S. *et al.* Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability. *Arthritis Rheum.* **54**, 2462-2470 (2006).
33. Saito, T. & Kawaguchi, H. HIF-2alpha as a possible therapeutic target of osteoarthritis. *Osteoarthritis cartilage* **18**, 1552-1556 (2010).
34. Yang, S. *et al.* Hypoxia-inducible factor-2alpha is a catabolic regulator of osteoarthritic cartilage destruction. *Nat. Med.* **16**, 687-693 (2010).
35. Yoshida, C.A. *et al.* Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.* **18**, 952-963 (2004).
36. Zhou, J., Wei, X. & Wei, L. Indian Hedgehog, a critical modulator in osteoarthritis, could be a potential therapeutic target for attenuating cartilage degeneration disease. *Connect Tissue Res.* **55**, 257-261 (2014).
37. St-Jacques, B., Hammerschmidt, M. & McMahon, A.P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.* **13**, 2072-2086 (1999).
38. Wei, X., Gao, J. & Messner, K. Maturation-dependent repair of untreated osteochondral defects in the rabbit knee joint. *J. Biomed. Mater. Res.* **34**, 63-72 (1997).
39. Wei, X. & Messner, K. Maturation-dependent durability of spontaneous cartilage repair in rabbit knee joint. *J. Biomed. Mater. Res.* **46**, 539-548 (1999).
40. Chaudhury, S. Mesenchymal stem cell applications to tendon healing. *Muscles Ligaments Tendons J* **2**, 222-229 (2012).
41. Kuo, C.K., Petersen, B.C. & Tuan, R.S. Spatiotemporal protein distribution of TGF-betas, their receptors, and extracellular matrix molecules during embryonic tendon development. *Dev. Dyn.* **237**, 1477-1489 (2008).
42. Tsukuda, Y. *et al.* Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis. *PLoS One* **7**, e40136 (2012).