



Title	変形性関節症および骨折治癒過程における糖脂質の機能解析
Author(s)	門間, 太輔
Description	配架番号 : 2237
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12133号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12133
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75033
Type	doctoral thesis
File Information	Daisuke_Momma.pdf



学 位 論 文

変形性関節症および骨折治癒過程における糖脂質の機能解析
(Studies on functional roles of glycosphingolipids in osteoarthritis and fracture healing
process)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

門間 太輔
Momma Daisuke

学 位 論 文

変形性関節症および骨折治癒過程における糖脂質の機能解析
(Studies on functional roles of glycosphingolipids in osteoarthritis and fracture healing
process)

2016 年 3 月

北 海 道 大 学

門間 太輔
Momma Daisuke

目 次

発表論文目録および学会発表目録		1 頁
緒言		5 頁
略語表		8 頁
実験方法		9 頁
実験結果		15 頁
考察		25 頁
謝辞		29 頁
総括および結論		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. Daisuke Momma, Tomohiro Onodera, Tadashi Yamashita, Fumio Sasazawa, Masatake Matsuoka, Shinji Matsubara, Norimasa Iwasaki

Coordinated functions of multiple Gangliosides are essential for cartilage metabolism

Journal of clinical investigation (Under submission)

本研究の一部は以下の学会に発表した.

1. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

GD3 合成酵素欠損は変形性関節症を助長する

第 126 回北海道整形災害外科学会

平成 26 年 2 月 1, 2 日 (口演)

北海道大学学術交流センター (札幌市)

2. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

GalNAc transferase および GD3 synthase の欠損は変形性関節症を助長する

第 27 回日本軟骨代謝学会

平成 26 年 2 月 28 日, 3 月 1 日 (口演)

京都府医師会館 (京都市)

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

Lack of GD3 synthase enhances cartilage degradation in murine osteoarthritis models in vitro

ORS 2014 Annual Meeting, New Orleans, Louisiana, USA, March 15 – 18, 2014.
(Poster session)

4. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

GalNAc 転移酵素の欠損は変形性関節症を助長させる

第 127 回北海道整形災害外科学会
平成 26 年 6 月 14, 15 日 (口演)
旭川大雪アリーナ (旭川市)

5. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

GD3 合成酵素欠損は軟骨細胞における IL-1 α 刺激に対し MAPK family のリン酸化を亢進することで変形性関節症を助長する

第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会
平成 26 年 6 月 19, 20 日 (ポスター)
北海道大学医学部学友会館フラテホール (札幌市)

6. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

GalNAc transferase および GD3 synthase の欠損は変形性関節症を助長する

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 26 年 10 月 9, 10 日 (シンポジウム)
城山観光ホテル (鹿児島市)

7. 門間 太輔, 高畑 雅彦, 亀田 裕亮, 清水 智弘, 濱野 博基, 岩崎 倫政

スフィンゴ糖脂質による内軟骨性骨化制御機構と骨折治癒

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会
平成 26 年 10 月 9, 10 日 (口演)
城山観光ホテル (鹿児島市)

8. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

GD3 合成酵素の欠損は MAPK signal を介して軟骨変性を助長する

第 128 回北海道整形災害外科学会
平成 27 年 1 月 31, 2 月 1 日 (口演)
北海道大学学術交流センター (札幌市)

9. 門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

ガングリオシドの機能解析

第 28 回日本軟骨代謝学会
平成 27 年 3 月 6, 7 日 (口演)
東京医科歯科大学 (東京都)

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

Depletion of GD3 synthase enhances osteoarthritis development in vivo

ORS 2015 Annual Meeting, Las Vegas, Nevada, USA, March 28 – 31, 2015.
(Poster session)

11. Daisuke Momma, Masahiko Takahata, Yusuke Kameda, Tomohiro Shimizu, Hiroki Hamano, Norimasa Iwasaki

Interruption of glycosphingolipid synthesis decelerates endochondral ossification in fracture healing

ORS 2015 Annual Meeting, Las Vegas, Nevada, USA, March 28 – 31, 2015.

(Poster session)

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

Lack of GalNAc transferase and GD3 synthase enhance cartilage degradation in murine osteoarthritis models

ICRS 2015 Annual Meeting, Chicago, USA, May 8 – 11, 2015.

(YSOS Star Papers oral presentation)

13.門間 太輔, 小野寺 智洋, 笹沢 史生, 松岡 正剛, 岩崎 倫政

ガングリオシドは協調的に作用し変形性関節症に関与する

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会

平成 27 年 10 月 22, 23 日 (ポスター)

富山市民会館 (富山市)

緒 言

糖鎖は生体内で合成された未成熟なタンパク質を修飾することで機能を有する成熟したタンパク質に変化させる。この糖鎖修飾により生み出される多様性は、細胞の認識やタンパク質の品質管理に重要である。糖鎖の一群であるスフィンゴ糖脂質 (Glycosphingolipids; 以下 GSLs) はセラミドから合成される一連の糖脂質であり、脊椎動物の細胞膜上に広く存在する。脂質ラフトを構成することで細胞内シグナル伝達に関与する重要な構成要素の一つである^{1,2}。変形性関節症 (Osteoarthritis; 以下 OA) の関節軟骨において糖脂質が減少することや、糖脂質の主成分であるセラミドが軟骨の変性やアポトーシスに関与していることが報告されており OA と糖脂質との間には密接な関わりがあることが知られている^{3,4}。当科では GSLs を軟骨特異的に欠損させることで OA が助長されることを報告し⁵、さらに GSLs のうちでも、シアル酸を有するガングリオシドが OA の発症に重要な役割を担うことを明らかにしてきた⁶。しかし、OA の発症に対して糖脂質が担う役割は未だ不明な点が多い。

一方、長管骨骨折の治癒過程は内軟骨性骨化の形態をとることより、軟骨代謝に深い関わりをもつ糖脂質が、骨折治癒過程にも重要な役割を担うことが推察される。しかし、骨折治癒過程における GSLs の機能に関しても未だ不明な点が多い。そこで今回、糖脂質の整形外科疾患における機能解析のため以下の2つの研究を行った。

<研究①：OAにおける糖脂質の機能解析>

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。本邦では2500万人⁷以上が罹患していると言われ、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、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、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漏出する。その結果、軟骨の粘弾性は低下し、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)などの炎症性サイトカインが誘導され、matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) 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^{3,4}。

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⁸⁻¹⁰。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。GSLs は脊椎動物の細胞膜上に広く存在する分子であり、その糖鎖のタイプにより200~300種類存在すると言われており、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^{11,12}。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 (*Col2-Ugcg*^{-/-}) を用いた研究でOAが進行することを示したが⁵, *Ugcg* 遺伝子の全身性 KO マウスは胎生致死となることから¹³OA 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ため, GSLs の中でも機能的重要性の高い分子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, o-, a-及び b-series に分類される (Fig.1). これまでに我々は a-および b-series が欠損される GM3 合成酵素の KO マウス (*GM3S*^{-/-})では通常の成長を遂げるにも関わらずOA が助長されることを報告し⁶, 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が, ガングリオシドのなかでどの分子が最も重要であるかは明らかにされていない.

以上より我々は OA の病態においてガングリオシドの合成経路の下流の分子の中に OA の病態や原因に関して主要な役割を担う糖脂質が存在すると仮説を立て, これを検証すべく諸実験を実施した. 具体的には, ほぼ全てのガングリオシドが欠損される GalNAc 転移酵素の KO マウス (*GalNAcT*^{-/-})および、一部のガングリオシドが欠損される GD3 合成酵素の KO マウス (*GD3S*^{-/-})を用い, ガングリオシド欠損状態で加齢, 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およ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.

<研究②：骨折治癒過程の内軟骨性骨化における糖脂質の機能解析>

骨折は整形外科において一般的な疾患であり, 骨の不安定性や遷延治癒, 偽関節を呈した場合に日常生活動作の制限につながり長期の治療を余儀なくされ社会的な損失が問題となっている. 骨折の治癒過程には軟骨を介さない膜性骨化と、軟骨を介する内軟骨性骨化があり, 後者は4つの段階に分けられ, それぞれの段階において様々な細胞・分子により緻密に制御されている. こういった制御機構が正常に作用しなかった場合、遷延治癒や偽関節になると考えられており, またこれらの制御機構を十分に理解することで骨折治癒を促進させることが試みられている.

今日まで, 骨折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. したがって, 骨折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解析が必要である.

そこで前述の GSLs に着目した. 前述の通り GSLs は軟骨代謝に関与しているものの, 軟骨特異的に GSLs を欠損させたところ通常の成長を示した. このことから通常の成長帯には GSLs は影響を及ぼさないことが示唆されるが, 長管骨の骨折治癒過程では異なる制御機構が作用し, 炎症性サイトカインや種々の成長因子の制御を受けることから, この過程で GSLs を欠損した場合どのような現象が起こるかは明らかではない.

以上より我々は軟骨細胞における GSLs の欠損は炎症性サイトカインや成長因子のシグナル伝達が正常に機能せず, 内軟骨性骨化を阻害すると仮説を立て, これを検証すべく諸実験を実施した. 具体的には, 軟骨特異的に GSLs が欠損する *Col2-Ugcg*^{-/-}を用い, 骨折治癒過程および成長因子の作用による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、糖脂質は 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、その合成経路の下流の分子は 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。また、骨折治癒過程の内軟骨性骨化においても糖脂質は重要な役割を果たしていることが明らかになり、骨折治癒の治療法開発における標的分子となり得ることを示したのでここに報告する。

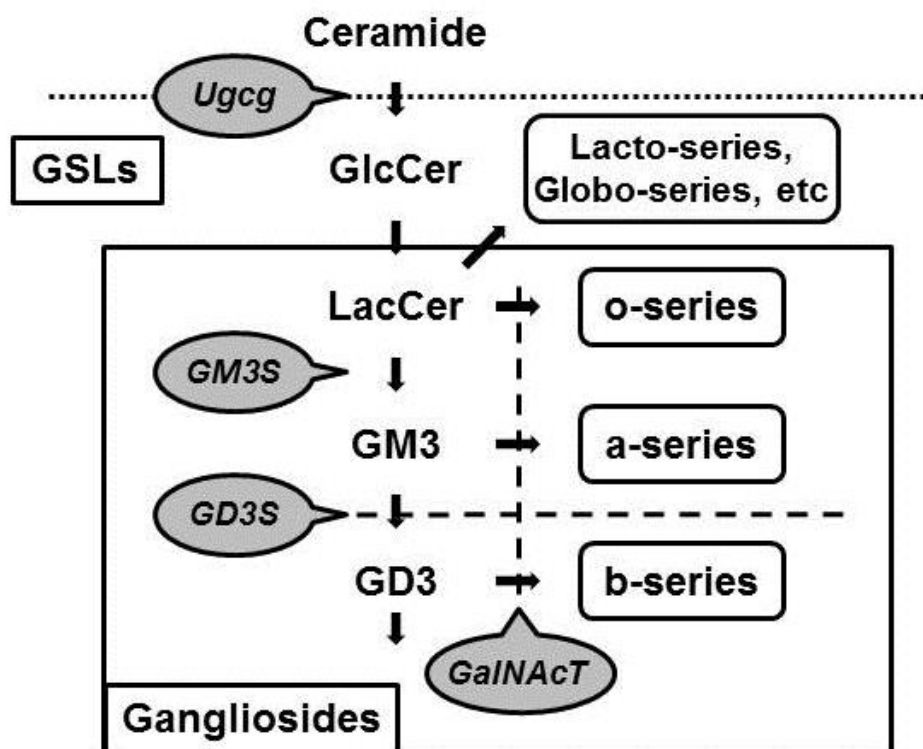


Figure 1 スフィンゴ糖脂質 (GSLs) とガングリオシド (gangliosides) の生合成経路

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。ガングリオシドはさらに o-, a-そして b-series に分類され、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.

DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBS	fetal bovine serum
GalNAcT	GalNAc transferase
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GD3S	GD3 synthase
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
NO	nitric oxide
OA	osteoarthritis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
Saf-O	Safranin-O
SD	standard deviation
S1P	sphingosine 1-phosphate
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling
WB	Western blotting
WT	wild type

実験方法

ノックアウトマウス及び野生型マウスの手配

本研究で糖脂質の欠損状態を模したモデルとして用いた軟骨特異的 *Ugcg* 欠損マウス (*Col2-Ugcg^{-/-}*) は先行研究者の清藤らが Jackson Labo から購入したマウスをもとに作製し、本学動物実験施設で系統維持されているものである⁵。また、GalNAc 転移酵素 KO マウス (*GalNAcT^{-/-}*) および GD3 合成酵素 KO マウス (*GD3S^{-/-}*) 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^{14,15}。比較対象とする野生型マウスは KO マウスのもととなった 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。

成長、発育における差異

GalNAcT^{-/-} および *GD3S^{-/-}* における外見上の異常や、成長、発育を評価するため、成長に伴う体重の変化と全身の骨形態の組織像を作成し、その差異に関し調査した。出生直後の骨格標本作製し出生時の差異に関し検討した^{16,17}。また、3 週齢から 12 週齢までの体重を測定し成長曲線を作成することと、4 週齢の膝関節成長板の組織像を作成することで発育に関し検討した。

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 ヶ月齢まで飼育し観察した。これは、先行研究における評価時期と同様とした。若齢として 4 ヶ月齢、老齢として 12, 15 ヶ月齢のマウス膝関節で組織学的評価をした¹⁸。軟骨の変性の程度を下記の Mankin score で評価した¹⁹⁻²¹。

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 score¹⁹ 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.

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^{18,22}。その後、培養液および軟骨片を回収した。

組織切片の作製

加齢モデルおよ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 dimethylmethylen blue (DMMB)を添加し、プロテオグリカンに吸着させ、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アウ

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^{18,22}.

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

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

マウス MMP-13 ELISA キット (Uscnlife, 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.

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・肋軟骨から、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, 12 時間および 24 時間後に回収した.

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, 軟骨片培養液中および軟骨細胞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.

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. IL-1 α に対する軟骨細胞の応答性を評価するため, MMP-13 および iNOS の mRNA 発現量を評価した. 本研究で使用したプライマーのシーケ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.

Immunoblot analysis (Western blotting:WB)

軟骨細胞の単離と前培養は前述した方法と同様. 経時的な MAPK family のリン酸化を評価するため IL-1 α を添加して培養し, 15, 30, 45, 60 分後に回収した. Cell lysate は PhosphoSafe Extraction Reagent (Novagen, Valencia, CA)を用いて採取し, 抗体抗原反応を用いて評価した²³. 本研究で使用した抗体および抗原は Cell Signaling Technology 社製品を用い, ERK1/2, phospho-ERK1/2, JNK, phospho-JNK, p38, phospho-p38 である. 各 MAPK のリン酸化は全て IL-1 α 刺激前の発現量により標準化した.

ガングリオシドによる IL-1 α 刺激に対する軟骨細胞の応答性変化

軟骨細胞の単離と前培養は前述した方法と同様. 外因性にガングリオシドを滴下することで IL-1 α による軟骨細胞の変性を減弱できるかを評価するため, *GalNAcT*^{-/-}軟骨細胞を用いて 10 ng/ml mouse IL-1 α を添加しさらに, o-, a-および b-series のガングリオシドを滴下し 24 時間後に回収した^{24,25}. 前述した方法と同様に qPCR を行い MMP-13 の遺伝子発現を評価した.

骨折モデルの作製

軟骨特異的 *Ugcg* 欠損マウス (*Col2-Ugcg*^{-/-}) と対照として *Ugcg*^{-loxp/loxp} マウスを用い Shimizu らの骨折モデル手技を改変して作成した. 全身麻酔下に 12 週齢のマウスの大腿骨を中央で Bone saw (SANSYO, Tokyo, Japan) を用い骨切りし, チタン製のワイヤー ($\phi = 0.47$ mm, TERUMO, Tokyo, Japan) で髓内釘固定し骨折モデルを作製した (Fig.2)

²⁶.

Week 2 Week 4 Week 6 Week 8

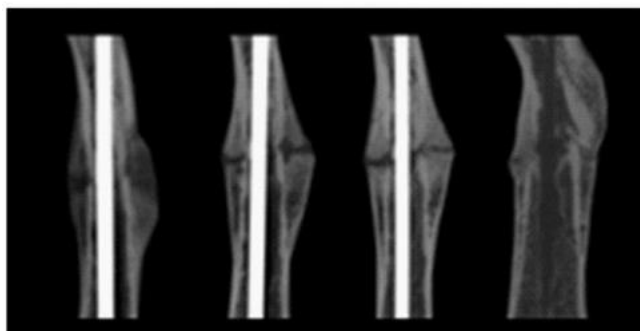


Figure 2 骨折モデルの作製 Shimizu らの rat を用いた大腿骨骨折モデル. 本研究ではこの方法を改変し開放骨折切りとした後に髓内釘固定し骨折モデルとした (文献 26 より抜粋).

マイクロ CT による骨癒合および仮骨量と骨質評価

骨折後, 7, 10, 14, 17, 21, 28 日において髓内釘を抜去し大腿骨を単離した後に, マイクロ CT (CT, R_mCT2; Rigaku, Tokyo, Japan) を用いて撮影した. 得られた CT 画像を 3 次元に再構築し TRI-BONE software (Ratoc System Engineering, Tokyo, Japan) を用いて仮骨量および骨質評価を Buxsein らの方法に準じて解析した²⁷. 関心領域は骨折部中心に近位, 遠位ともに 2 mm とし, 全骨量 (BV total) から元の骨量 (BV original) を除いたものを仮骨量 (BV callus) とした. ファントムを用いて標準化した後に骨質 (BMC callus) を算出し, 組織骨質 (mBMD callus) を $BMC\ callus / BV\ callus$ として算出して解析した²⁸.

組織切片の作製

マイクロ CT 撮影した大腿骨は次いで組織学的評価を行った. 骨折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- μm 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. 骨折部の軟骨領域を解析するため顕微鏡で観察しデジタル画像を作製し Adobe Photoshop 7.0 (Adobe Systems, San Jose, CA) で計測した. Matsui らの方法を用い, Adobe Photoshop selection tools で軟骨領域を計測し面積 (μm^2) を計測した⁴.

骨折修復部における組織 mRNA の検討

骨折修復部における修復組織の遺伝子発現を評価するため、～らの方法に準じて骨折部周囲の軟部組織を慎重に切除し、骨折部を同定した後に骨折部から近位，遠位ともに 2mm で、一辺 4mm の直方体形の組織を切除した。得られた組織を液体窒素で凍結した後に破砕機で破砕し，前述の通り mRNA を取り出した。

Real-time polymerase chain reaction quantification (qPCR)

定量的 RT-PCR の方法は前述した通りである。TGF β -3 に対する軟骨細胞の基質産生能を評価するため，Col2a1，Aggrecan および Col10a1 の mRNA 発現量を測定した，使用したプライマーのシーケンスは，下記 Table 1 に示す。

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 variance(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。

MMP-13-encoding gene	forward	5'-TTGGCCACTCCCTAGGTCTG-3'
	reverse	5'-GGTTGGGGTCTTCATCGC-3'
iNOS	forward	5'-GGAGCGAGGCCATTTACAAC-3'
	reverse	5'-CGTAGACAAGGTAGCCCACTTT-3'
Col IIa1	forward	5'-AGGATGGCTGCACCAAACAC-3'
	reverse	5'-TGTCCATGGGTGCGATGTC-3'
Col Xa1	forward	5'-GGCTTCAGGGAGTGCAATC-3'
	reverse	5'-CTCACATGGGAGCCACTAGG-3'
Aggrecan	forward	5'-CCCTCACCCCAAGAATCAAG-3'
	reverse	5'-GGATAGTTGGGGAGCGACAC-3'
GAPDH-encoding gene (a control housekeeping gene)	forward	5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTCC-3'
	reverse	5'-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3'

Table 1. 本研究で用いたプライマーの塩基配列

実験結果

成長、発育における差異は無い

GalNAcT^{-/-} および *GD3S^{-/-}* における外見上の異常や、成長、発育を評価するため、成長に伴う体重の変化と全身の骨形態の組織像を作成し、その差異に関し調査した。出生直後の骨格標本を作製し出生時の差異に関し検討したところ、骨格標本において区別することはできなかった (Fig.3A)。

また、3 週齢から 12 週齢までの体重を測定し成長曲線 (Fig.3B), および 4 週齢の膝関節成長板の組織像を示す (Fig.3C)。いずれもマウスの遺伝系を区別することはできなかった。

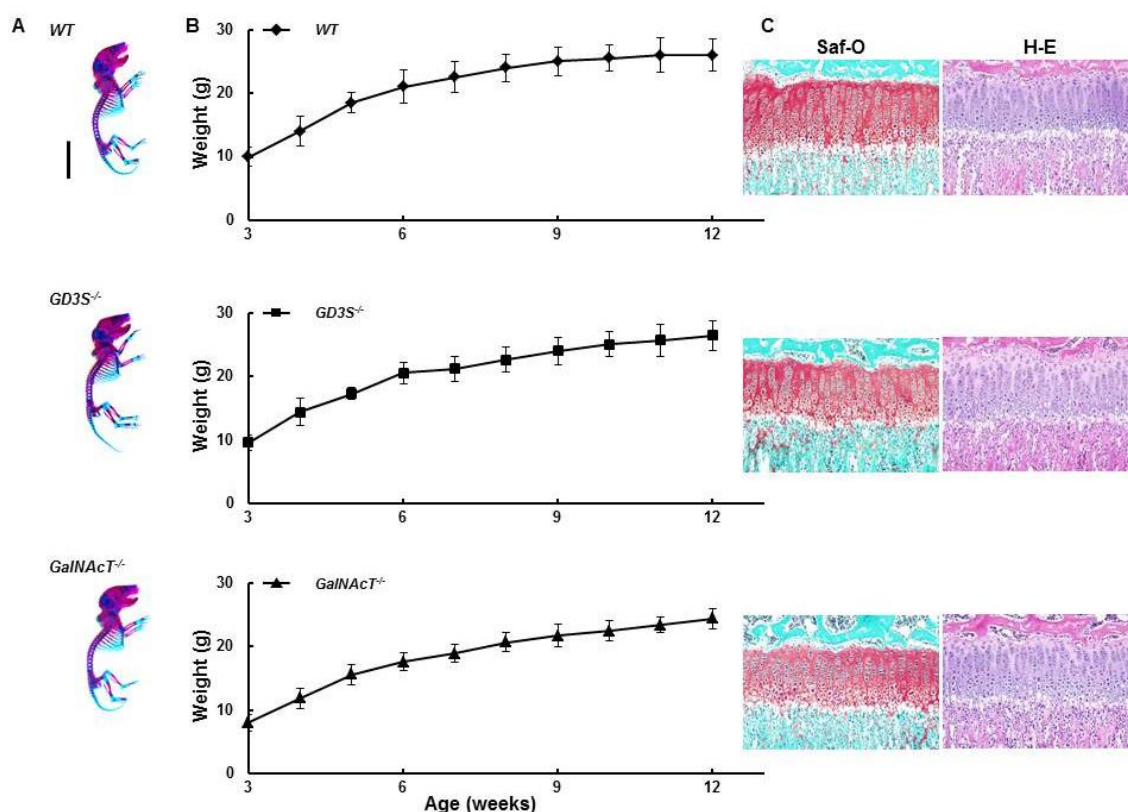


Figure 3 A) 出生時のマウス骨格標本. **B)** 3 週齢から 12 週齢までの体重を測定した成長曲線 (n = 10 mice per group). **C)** 4 週齢における脛骨近位骨の成長帯。

GalNAcT^{-/-} および *GD3S^{-/-}* 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 ヶ月齢では、両群とも関節軟骨に明らかな OA 変化は生じなかった (Fig.4A)。12 ヶ月齢になると、WT 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.4A). 一方, $GD3S^{-/-}$ におけるこれらの加齢に伴う OA 変化は, WT よりもさらに強く現れた (Fig.4A). $GalNAcT^{-/-}$ ではより OA 変化が顕著であり, 15 ヶ月になるとさらに関節症性変化が進行していた (Fig.4A). 組織学的所見を Mankin スコアにより定量化したところ, 12 ヶ月例において, $GD3S^{-/-}$ で有意に OA が進行した (WT: 4.17 ± 0.98 , $GD3S^{-/-}$: 5.13 ± 1.33 [$P < 0.05$]; $n = 10$) (Fig.4B). $GalNAcT^{-/-}$ ではさらに OA が顕著であり $GD3S^{-/-}$ でよりも有意に OA が進行した ($GD3S^{-/-}$: 5.13 ± 1.33 , $GalNAcT^{-/-}$: 7.11 ± 1.61 [$P < 0.05$]; $n = 10$) (Fig.4B). さらに 15 ヶ月例においてより顕著に変化が認められる結果であった (WT: 4.98 ± 1.28 , $GD3S^{-/-}$: 6.27 ± 1.17 [$P < 0.05$]; $n = 10$, $GD3S^{-/-}$: 6.27 ± 1.17 , $GalNAcT^{-/-}$: 11.83 ± 1.65 [$P < 0.01$]; $n = 10$) (Fig.4B)

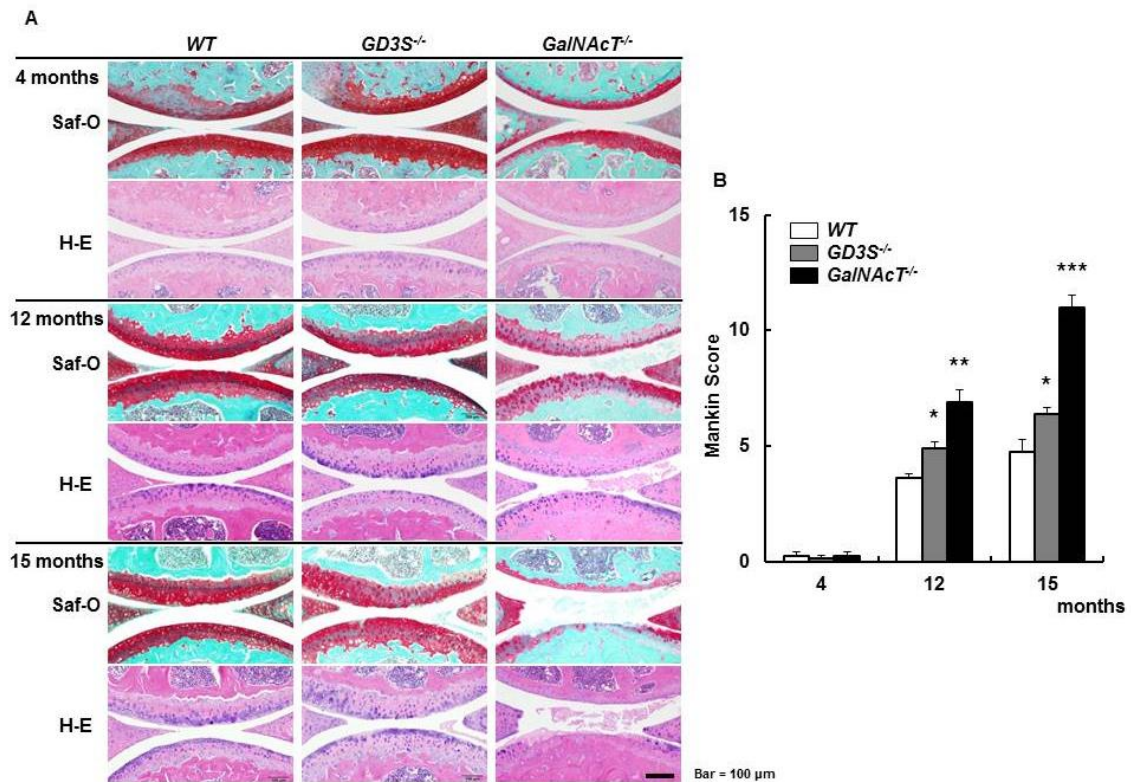


Figure 4 A) Age-associated OA model の組織学的所見. Saf-O 染色 (上段), HE 染色 (下段). Scale bars = 100 μ m **B)** Mankin スコアによる OA 進行度の評価 ($n = 10$ mice per group, * = $P < 0.05$ vs WT, ** = $P < 0.05$ vs $GD3S^{-/-}$, *** = $P < 0.01$ vs $GD3S^{-/-}$).

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増強される

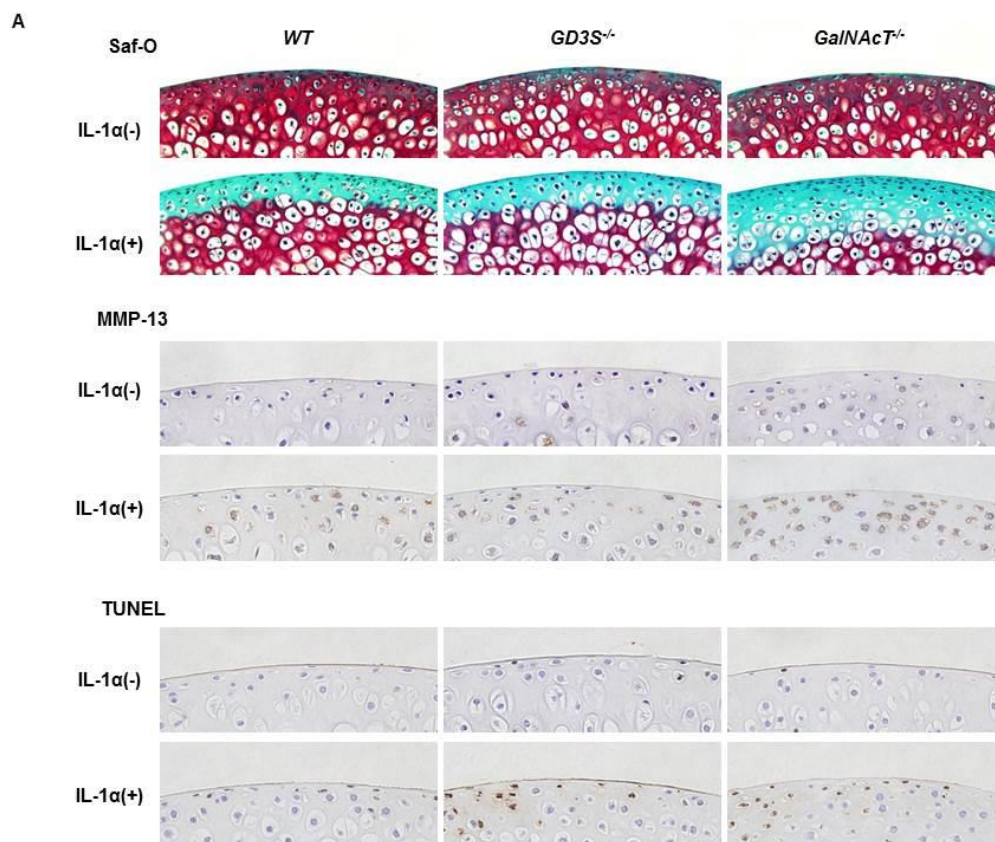
in vivo の加齢モデルで確認された OA 変化について, そのメカニズムを検証するため, 我々は *ex vivo* の実験を行った. 4 週齢のマウス大腿骨頭軟骨を採取し, IL-1 α を添加した培養液で培養した. この培養大腿骨頭軟骨について組織学的な観察を行った

ところ, Saf-O 染色での著明な染色性の低下, MMP-13 および TUNEL 免疫染色での陽性細胞の増加などの所見を認めた (Fig.5A).

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 由来軟骨よりも $GD3S^{-/-}$ および $GalNAcT^{-/-}$ 由来軟骨で有意に増加した (WT: $48.33\% \pm 2.00\%$, $GD3S^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$, $GalNAcT^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$ [$P = 0.05$]; $n = 5$) (Fig.5B).

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 由来軟骨よりも $GD3S^{-/-}$ および $GalNAcT^{-/-}$ 由来軟骨で有意に高い濃度の MMP-13 が検出された (WT: $48.33\% \pm 2.00\%$, $GD3S^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$, $GalNAcT^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$ [$P < 0.05$]; $n = 5$) (Fig.5B).

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 由来軟骨よりも $GD3S^{-/-}$ および $GalNAcT^{-/-}$ 由来軟骨で有意に高い値が検出された (WT: $48.33\% \pm 2.00\%$, $GD3S^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$, $GalNAcT^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$ [$P < 0.05$]; $n = 5$) (Fig.5B).



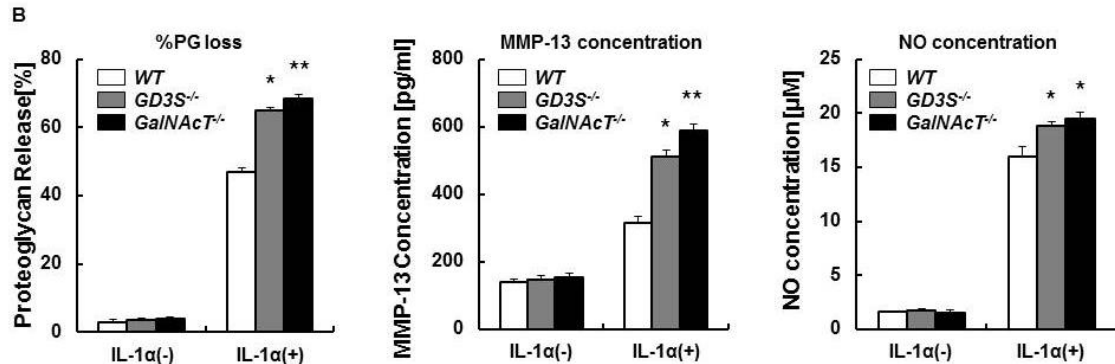
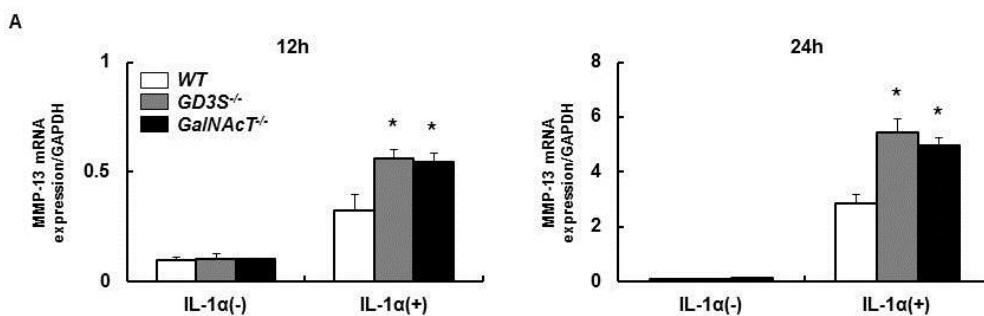


Figure 5 A) IL-1 α 培養後の組織学的所見. 上から Saf-O 染色, MMP-13 染色, TUNEL 免疫染色 (Scale bars = 100 μ m) **B)** 培養軟骨片からのプロテオグリカン放出量, 培養液中への MMP-13 放出量, 培養液中の NO 濃度 (n = 5 per group, * = $P < 0.05$ vs WT, ** = $P < 0.05$ vs GD3S^{-/-}).

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 iNOS の遺伝子発現が亢進する

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 KO 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, アポトーシス関連遺伝子である iNOS 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 12, 24 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, 12 時間の時点で KO マウス由来軟骨細胞における MMP-13 の発現量は WT 由来に比べて有意に高かったが, KO マウス間に有意差は無かった (WT: 48.33% $\pm$ 2.00%, GD3S^{-/-}: 57.45% $\pm$ 5.08%, GalNAcT^{-/-}: 57.45% $\pm$ 5.08% [$P < 0.05$]; n = 4) (Fig.6A, B). 24 時間の時点においても同様の結果であった(WT: 48.33% $\pm$ 2.00%, GD3S^{-/-}: 57.45% $\pm$ 5.08%, GalNAcT^{-/-}: 57.45% $\pm$ 5.08% [$P < 0.05$]; n = 4) (Fig.6A, B).



B

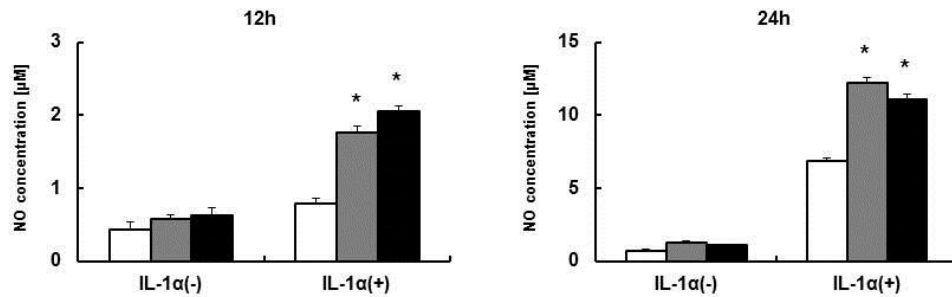
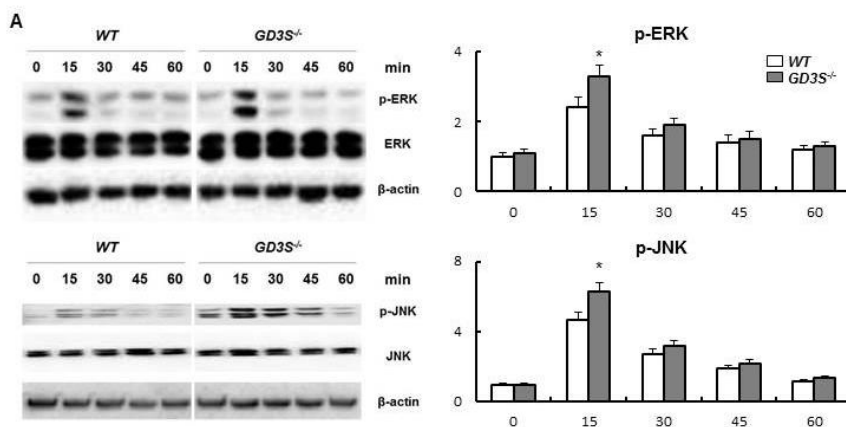


Figure 6 A) 培養軟骨細胞における MMP-13 mRNA の発現 (real-time RT-PCR による解析, $n = 4$) **B)** 培養軟骨細胞における iNOS mRNA の発現 (real-time RT-PCR による解析, $n = 4$ per group, $* = P < 0.05$ vs WT).

糖脂質は MAPK signal を介し MMP-13 の遺伝子発現を調整する

軟骨細胞培養の系で IL-1 α 刺激による MMP-13 の遺伝子発現が KO マウス由来軟骨で有意に高いことが示されたが、さらにその細胞内メカニズムを明らかにするため、MAPK signal のリン酸化を定量した。IL-1 α で刺激した培養軟骨細胞からタンパク質を抽出し、IL-1 α signal の主要な経路である MAPK family のリン酸化を WB 法にて測定した。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 15, 30, 45, 60 分で検体を回収した。MAPK family のリン酸化は同じような傾向を示し、15 分後の時点で $GD3S^{-/-}$ 由来軟骨細胞における ERK, JNK のリン酸化は WT 由来に比べて有意に亢進していた (WT: $48.33\% \pm 2.00\%$, $GD3S^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$ [$P < 0.05$]; $n = 4$) (Fig.7A). $GalNAcT^{-/-}$ においても同様の傾向を示し、JNK, p-38 のリン酸化は 15 分後において WT 由来に比べて有意に亢進していた (WT: $48.33\% \pm 2.00\%$, $GalNAcT^{-/-}$: $57.45\% \pm 5.08\%$ [$P < 0.05$]; $n = 4$) (Fig.7B).



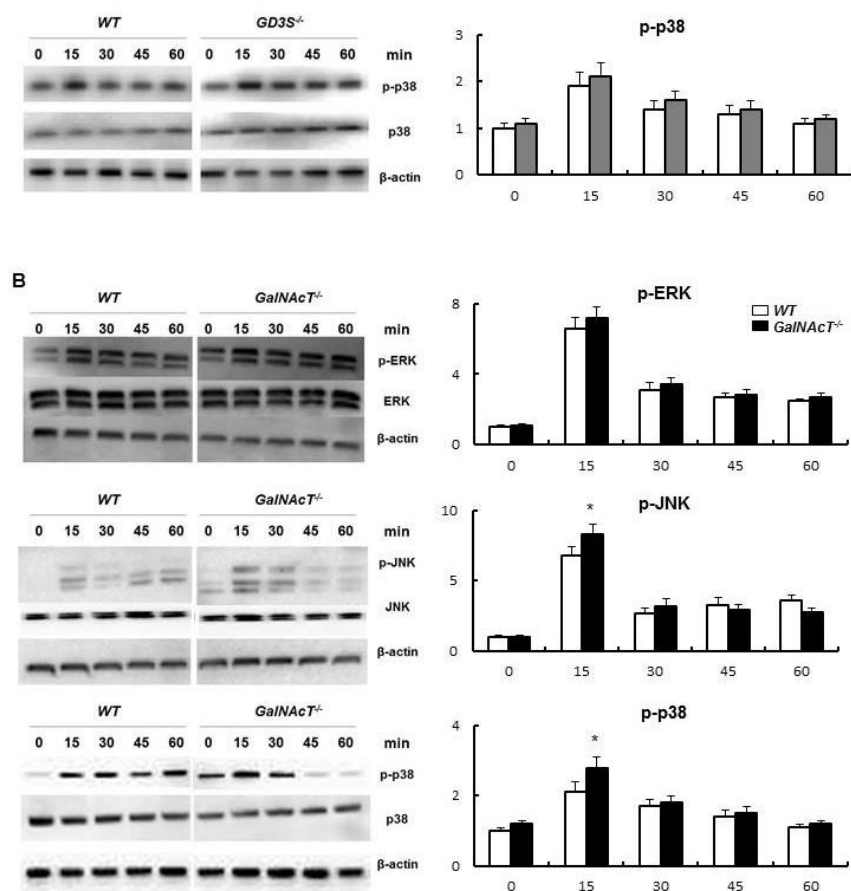


Figure 7 A) *GD3S*^{-/-}培養軟骨細胞における MAPK family のリン酸化 (WB による解析, n = 4) B) *GalNAcT*^{-/-}培養軟骨細胞における MAPK family のリン酸化 (WB による解析, n = 4 per group, * = *P* < 0.05 vs WT).

全てのガングリオシドを補充したときのみ MMP-13 の遺伝子発現が減少した

外因性にガングリオシドを滴下することで IL-1 α による軟骨細胞の変性を減弱できるかを評価するため, *GalNAcT*^{-/-}軟骨細胞を用いて 10 ng/ml mouse IL-1 α を添加しさらに, α -, a-および b-series のガングリオシドを滴下し 24 時間後に回収し, MMP-13 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR で測定した. 全てのガングリオシドを滴下したときのみ何も滴下しない場合と比較して MMP-13 の発現量が有意に減弱した(Fig.8).

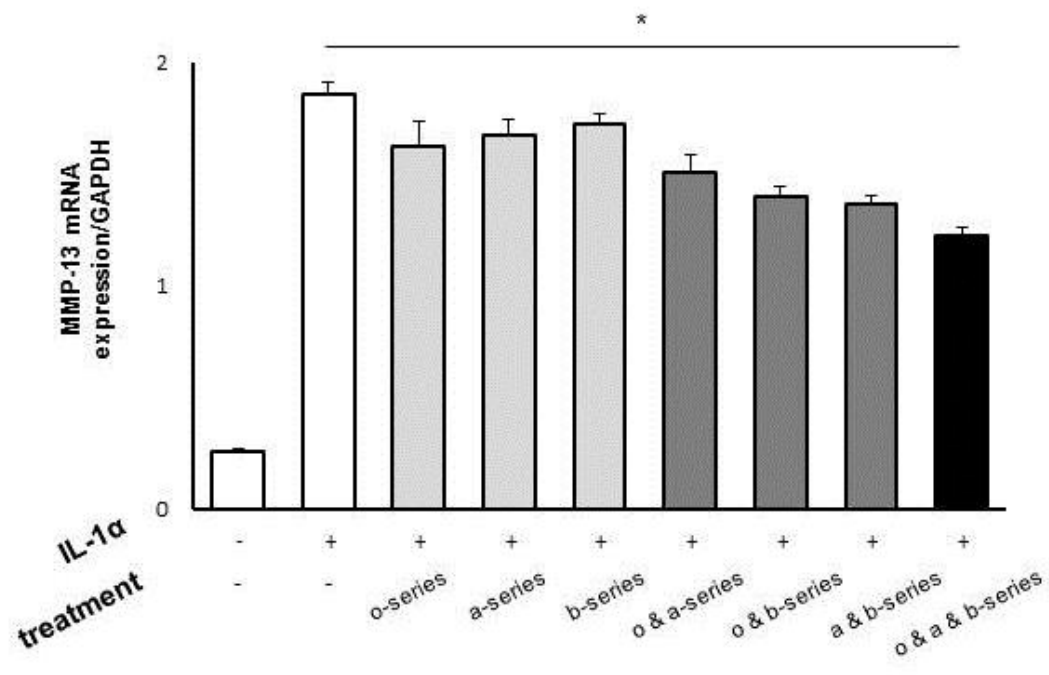


Figure 8 *GalNAcT*^{-/-}培養軟骨細胞における MMP-13 mRNA の発現 (real-time RT-PCR による解析, n = 4 per group, * = $P < 0.05$ vs no treatment).

軟骨特異的な *GSLs* の欠損は仮骨形成を減弱させた

全てのマウスにおいて骨癒合が得られ、偽関節率に有意差は無かった(Fig.9A). 骨折後, 7, 10, 14, 17, 21, 28 日においてマイクロ CT 撮影を行い, 仮骨量および骨質評価を行ったところ, *Col2-Ugcg*^{-/-}は骨折後 17 日および 21 日後において *Ugcg*^{loxp/loxp} と比較し有意に仮骨量が少ない結果であった (*Col2-Ugcg*^{-/-}: 4.4 ± 1.1 vs *Ugcg*^{loxp/loxp}: 8.2 ± 3.4 mm³ at 17days, 4.5 ± 1.3 vs 7.2 ± 2.4 mm³ at 21days [$P < 0.05$]; n = 10) (Fig.9B). 組織骨質も同様に *Col2-Ugcg*^{-/-}は骨折後 17 日および 21 日後において *Ugcg*^{loxp/loxp} と比較し有意に少ない結果であった (*Col2-Ugcg*^{-/-}: 2.0 ± 1.3 vs *Ugcg*^{loxp/loxp}: 4.2 ± 1.8 mgHA/mm³ at 17days, 2.1 ± 1.3 vs 4.3 ± 1.7 mgHA/mm³ at 21days [$P < 0.05$]; n = 10) (Fig.9C).

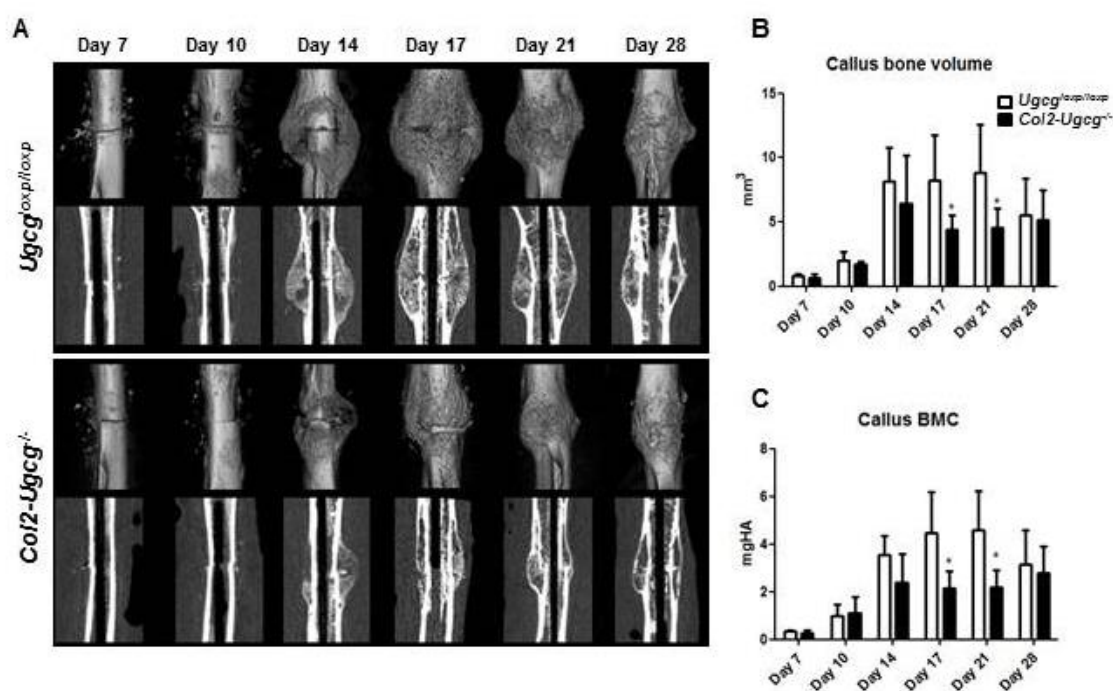


Figure 9 A) マイクロ CT による骨折治癒過程 **B)** 仮骨量の評価 (n = 10 mice per group, * = $P < 0.05$) **C)** 組織骨量の評価 (n = 10 mice per group, * = $P < 0.05$).

軟骨特異的な *GSLs* の欠損は骨折の治癒過程において軟骨の形成と吸収を遅らせた

次いで, 骨折後, 7, 10, 14, 17, 21, 28 日において組織学的な評価を行ったところ (Fig10A), *Col2-Ugcg*^{-/-}は骨折後 10 日後において *Ugcg*^{loxp/loxp} と比較し有意に軟骨領域が小さい結果であった (*Col2-Ugcg*^{-/-}: 1.4 ± 0.3 vs *Ugcg*^{loxp/loxp}: 4.7 ± 1.2 % [$P < 0.05$]; n = 10) (Fig.10B). 一方で骨折後 17 日, 21 日後においては *Col2-Ugcg*^{-/-}の軟骨領域は *Ugcg*^{loxp/loxp} と比較し有意に大きい結果であった (3.0 ± 0.8 vs 4.7 ± 1.2 % at 17 days, 2.4 ± 0.7 vs 0.8 ± 0.3 % at 21 days, [$P < 0.05$]; n = 10) (Fig.10B). さらに骨折修復組織における

Col2a1, Aggrecan, Col10a1 の遺伝子発現を評価したところ(Fig.10C-E), Col2-*Ugcg*^{-/-} は骨折後 10 日後において *Ugcg*^{loxp/loxp} と比較し有意に Col10a1 の遺伝子発現が少ない結果であった (1.8 ± 0.5 vs 1.3 ± 0.4 % [$P < 0.05$]; n = 6).

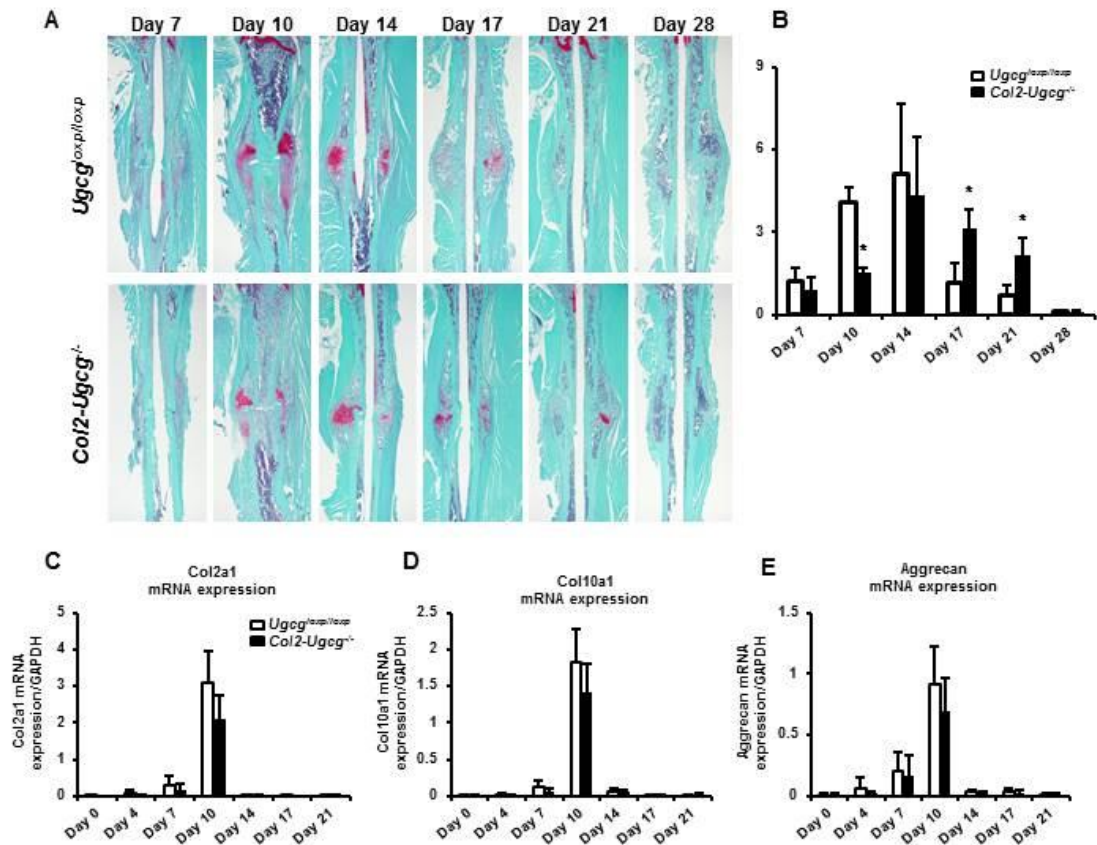


Figure 10 A) 組織学的に観察した骨折治癒過程 B) 軟骨領域の面積 (n = 10 mice per group, * = $P < 0.05$) C-E) 骨折修復組織の遺伝子発現 (n = 6 mice per group, * = $P < 0.05$).

GSLs の欠損は TGFβ-3 の刺激による軟骨の肥大化を抑制する

in vivo の骨折モデルで確認された骨癒合阻害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。骨折修復組織における基質産生能が変化していたことより、軟骨の基質産生能に関する成長因子として TGFβ family に着目した。そこで TGFβ1-3 で刺激した培養細胞から mRNA を抽出し、Col2a1, Aggrecan, Col10a1 の遺伝子発現を評価した(Fig11A-C)。Col2-*Ugcg*^{-/-} 由来軟骨細胞において TGFβ-3 刺激により *Ugcg*^{loxp/loxp} 由来軟骨細胞と比較し有意に基質産生が低下している結果であった。

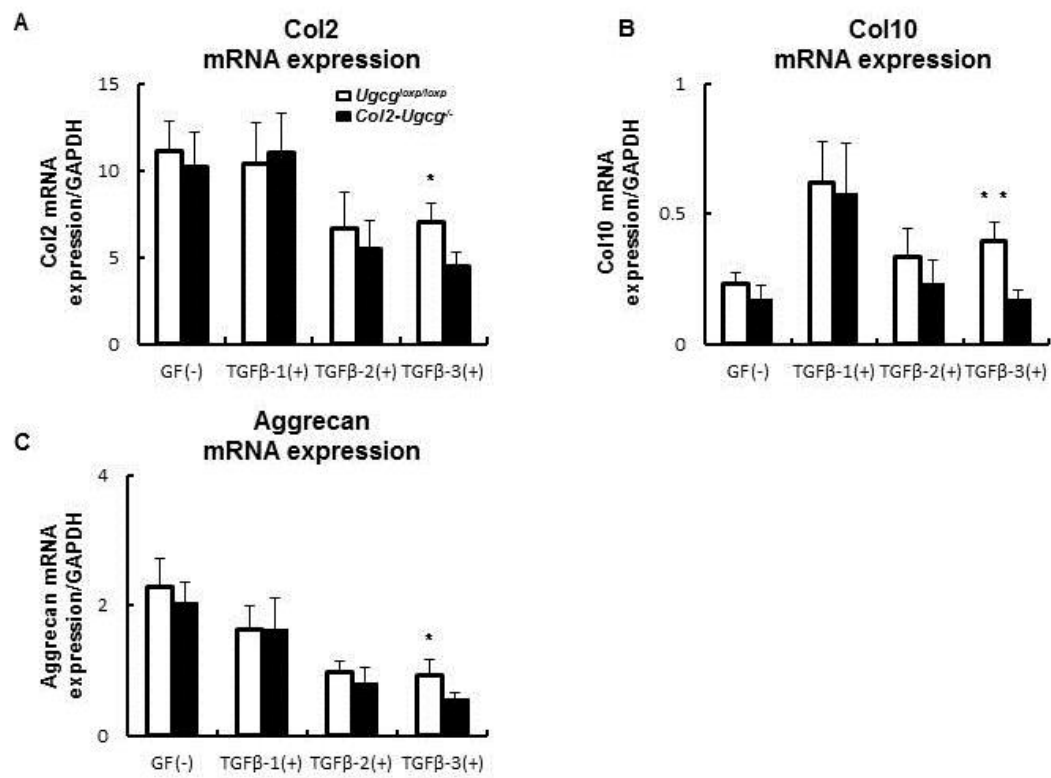


Figure 11 A) TGFβ family による基質産生能の評価, Col2a1 の遺伝子発現 B) Aggrecan の遺伝子発現 C) Col10a1 の遺伝子発現 (n = 4 mice per group, * = $P < 0.05$).

考 察

これまでの研究で、糖脂質は様々な生命現象に関与していることが示されており、特に整形外科領域においては、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⁵。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⁶。OA の発症に対して糖脂質が担う役割は未だ不明な点が多い。

一方、長管骨骨折の治癒過程は内軟骨性骨化の形態をとることより、軟骨代謝に深い関わりをもつ糖脂質が、骨折治癒過程にも重要な役割を担うことが推察される。しかし、骨折治癒過程における GSLs の機能に関しても未だ不明な点が多い。そこで今回、糖脂質の整形外科疾患における機能解析のため以下に示す2つの仮説を立て研究を行った。

仮説①OA の病態においてガングリオシドの合成経路の下流の分子の中に OA の病態や原因に関して主要な役割を担う糖脂質が存在する

仮説②軟骨細胞における GSLs の欠損は炎症性サイトカインや成長因子のシグナル伝達が正常に機能せず、内軟骨性骨化を阻害する

まず我々はガングリオシド生合成経路の下流のガングリオシドが 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のもと、*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。我々は検証のために2つの異なる OA モデルを構築した。すなわち、age-associated, そして IL-1 α -induced OA model である。

OA の特徴として、患者数は非常に多いものの生命を脅かすほどの重篤な疾患ではないことがあげられるため、OA の治療に際し副作用は絶対に避けなければならない。今回着目した糖脂質は、生合成経路の最上流で阻害した場合胎生致死であることが報告されている一方で、糖脂質の一群であるガングリオシドは全身性の影響が少ないものの加齢による OA が進行していることが報告されている。そこで、ガングリオシド生合成経路の下流に位置するガングリオシドに着目することで、さらに特異的な副作用の少ない治療ターゲットとなり得るのではないかと考えた。そのため本研究においては一部のガングリオシドが欠損する *GD3S*^{-/-} と、ほぼすべてのガングリオシドが欠損する *GalNAcT*^{-/-} における OA モデルを検討した。どちらの KO マウスにおいても通常の成長を示し、若年では表現型に有意差を認めなかったが、加齢により野生型マウスと比較して OA が進行している結果であった。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 GM3 合成酵素の KO で作製した OA の進行を助長し

た結果と一致しており⁶、ガングリオシド生合成経路の下流に位置するガングリオシドが軟骨代謝に深く関与していることを示している。

また、OA はその病態の特徴から加齢による影響が大きいですが、これまでに加齢モデルを中心に検証された研究は少ない^{29,30}。本研究は加齢においてガングリオシド生合成経路の下流に位置するガングリオシドが OA に関与することを明らかにしたことは実臨床に即した知見と考えられる。また、OA が軟骨の変性を来とし、その初期の現象として軟骨の細胞外マトリックスからプロテオグリカンが減少することが知られている^{31,32}。本研究における 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、当科でも過去の研究で利用している。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、*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。OA の病態において炎症はひとつの重要な要素であり、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³³や Lim ら³⁴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り³⁵⁻³⁷、今後の検討課題と考えられる。

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 GD3 合成酵素の欠損および GalNAc 転移酵素の欠損により 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 GD3S^{-/-}マウスはこの GM1 を含む a-series gangliosides は欠損せず、GD3 以下のガングリオシドの欠損であるため、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は WT に比べて変わらない可能性がある⁴¹。その状態であっても、OA が進行したことから、

GD3 そのもの、あるいは GD3 以下のガングリオシドが OA の病態の中心的な役割を担っている可能性が示唆される。

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⁴⁵。上述のアポトーシスと異なり、分子機構に関しては未詳であったため、今回は IL-1 α signal のうち MAPK family に着目した。本研究において GD3S^{-/-}, GalNAcT^{-/-} ともに IL-1 α 刺激に対し MAPK family のリン酸化が亢進する結果が得られた。このことからガングリオシドは IL-1 α signal に関し MAPK family を介して MMP-13 の遺伝子発現を調整し、軟骨の変性に関与していることが示唆された。しかしながら、本研究においては MAPK family のみの評価であり、IL-1 α signal の他の分子についても検討が必要であると考えられ、今後の検討課題と思われる。

本研究において GalNAcT^{-/-}は最も重篤な OA を呈し、GD3S^{-/-}と比較しても有意に OA が進行している結果で合った。このことから、ガングリオシドのうち o-あるいは a-series にも OA に関与する分子が存在することが示唆される。また糖脂質は複雑で多様な分子集団であり、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⁴⁶⁻⁴⁹。ことから、ガングリオシドは協調的にあるいは相加的に OA に関与している可能性が示唆される。本研究では、ほぼ全てのガングリオシドが欠損する GalNAcT^{-/-}の軟骨において IL-1 α 刺激に対し、o-, a-, b-series 全てのガングリオシドを外因性に補充した場合のみ、MMP-13 の遺伝子発現が減弱したが、このことはガングリオシドが協調的にあるいは相加的に作用している可能性を支持するものである。

本研究にはいくつかの limitation が存在する。第一にマウスを用いた小動物での研究であることがあげられ、より大型の動物においても OA を含む同様の変性疾患に関する研究が必要であると考えられる。また、ガングリオシドが協調的に作用する可能性を示したが、本研究においては *in vitro* の評価のみであったので、今後は *in vivo* におけるガングリオシドの協調的な作用に関する検討が必要と考えられた。

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 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。さらにはガングリオシドの補充が MMP-13 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。

一方で、生体内における軟骨がかかわる現象として、長管骨骨折の治癒過程のうち内軟骨性骨化があげられる。軟骨代謝に深い関わりをもつ糖脂質が、骨折治癒過程にも重要な役割を担うことが推察されるが、骨折治癒過程における GSLs の機能に関しては未だ不明な点が多い。そこで今回、軟骨細胞における GSLs の欠損は炎症性サイトカインや成長因子のシグナル伝達が正常に機能せず、内軟骨性骨化を阻害すると考えた。

まず我々は糖脂質が骨折治癒過程の内軟骨性骨化において重要な機能的役割を有するという仮説のもと、*in vivo* の骨折治癒モデルを用いてこれを検証することとした。

本研究においては軟骨特異的に GSLs が欠損する Col2-Ugcg^{-/-}を用い Ugcg^{loxp/loxp} を対照として骨折治癒過程を評価した。どちらのマウスにおいても骨折後 28 に程度で全例骨癒合を得られたが、軟骨特異的に GSLs が欠損するマウスにおいては仮骨量と仮骨の鋳型となる軟骨の形成が Ugcg^{loxp/loxp} と比較して有意に少ない結果が得られた。また、軟骨特異的に GSLs が欠損するマウスにおいては仮骨の鋳型となる軟骨が遷延して存在している結果を示し、骨折治癒過程が遷延していることが示唆された。本研究においては創傷治癒力の高いマウスを用いており骨癒合率に差異は無かったが、軟骨特異的に GSLs を欠損させて骨折治癒過程が遷延した場合、大動物において骨癒合率に変化が生じる可能性が示唆される。

また、骨折の治癒過程は種々の炎症性サイトカインや、成長因子による制御がなされている。骨折治癒過程において骨折部に誘導された軟骨細胞は肥大化の過程を経て一度アポトーシスし血管新生が来たしたのちに骨芽細胞による骨の形成に至る。本研究において、Col2-Ugcg^{-/-}では軟骨が骨折部に遷延して存在していたことから、骨折部における軟骨の増殖能や基質産生能に差異が生じていることが推測された。さらに、骨折部より得られた mRNA から Col2-Ugcg^{-/-}では軟骨の肥大化のマーカーである Col Xa1 の遺伝子発現が減少していたことから、軟骨の肥大化に関して着目し TGF β family による軟骨細胞の基質産生能を評価した。TGF β family は軟骨の肥大化を抑制する作用を有するが、本研究において TGF β family のうち TGF β -3 に対する Col2-Ugcg^{-/-}軟骨細胞の Col1-a1 の遺伝子発現が減弱する結果であった。このことは、TGF β -3 による肥大化抑制のシグナルが GSLs の欠損により増強している可能性が示唆される。我々の先行研究において清藤らは GSLs の欠損により IL-1 α 刺激による MMP-13 の遺伝子発現が増加することを報告しており、今回、ガングリオシドの欠損において MAPK family のシグナルが増強している結果を考慮すると、TGF β -3 のシグ

ナルが増強し、より軟骨の肥大化を抑制したことを支持するものと考えられる。一方で軟骨分化を促進させるシグナルに関しては本研究では検討されておらず、今後の研究課題であると考えられる。

本研究にはいくつかの **limitation** が存在する。第一に骨折モデルが妥当であったかに関しては検討されておらず、安定性の高いモデルやより不安定性が高いモデルなど、骨癒合の過程が異なる場合における検討が必要であると考えられる。また、本研究においては *in vitro* の TGF β family のみの評価であることがあげられるが、骨折治癒過程においてはその段階ごとに様々な分子メカニズムが機能していることから炎症性サイトカインや TGF β 以外の成長因子などに対する検討が必要と考えられた。

最後に、本研究において軟骨細胞における **GSLs** 欠損が骨折治癒の内軟骨性骨化を遷延させ、ColXa1 といった軟骨の肥大化を制御していることが明らかとなった。これらの結果は **GSLs** が骨折治癒の内軟骨性骨化に促進的に働く可能性があり、新規の骨折治療の標的分子となる可能性を示唆するものである。

謝辞

本研究においては北海道大学大学院医学研究科整形外科学分野 岩崎倫政教授、小野寺智洋先生、高畑雅彦先生をはじめ研究に携わっていただいた多くの方々に深謝いたします。

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、ガングリオシド生合成の下流に位置する GD3 合成酵素 KO マウス(*GD3S^{-/-}*マウス)および GalNAc 転移酵素 KO マウス(*GalNAcT^{-/-}*マウス)を作製し、その表現型を解析した。
- ・ *In vivo* において、ガングリオシド生合成経路の下流の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、加齢に伴い OA がより重症化した。
- ・ *In vitro* において、ガングリオシド生合成経路の下流の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、ガングリオシド生合成経路の下流の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、ガングリオシドを外因性に補充すると全てのガングリオシドを補充した場合にのみ IL-1 α 刺激による MMP-13 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は協調的に作用している可能性を示唆している。
- ・ 我々は、骨折治癒過程に GSLs の機能解明のため、軟骨特異的に GSLs が欠損する Col2-Ugcg^{-/-}を用い、その骨折治癒過程を解析した。
- ・ *In vivo* において、軟骨特異的に GSLs を欠損させた場合、骨折治癒過程の内軟骨性骨化で仮骨形成を抑制し、骨折治癒過程を遷延させた。
- ・ *In vitro* において、軟骨特異的に GSLs を欠損させた場合、TGF β -3 に対する軟骨の肥大化がさらに抑制された。

本研究結果は、OA の進行にガングリオシド生合成の下流の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、さらには協調的に作用することで 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、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。

また、骨折治癒過程において GSLs は内軟骨性骨化を促進させる可能性を示唆したことから、骨折治療の新しい分子ターゲットとなりうるものと期待される。

引用文献

- 1 Ichikawa, S. & Hirabayashi, Y. Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol* **8**, 198-202, doi:S0962-8924(98)01249-5 [pii] (1998).
- 2 Varki, A. Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct. *Glycobiology* **3**, 97-130 (1993).
- 3 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).
- 4 Matsui, Y. *et al.* Accelerated development of aging-associated and instability-induced osteoarthritis in osteopontin-deficient mice. *Arthritis Rheum* **60**, 2362-2371 (2009).
- 5 Seito, N. *et al.* Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice. *Arthritis Rheum* **64**, 2579-2588 (2012).
- 6 Sasazawa, F. *et al.* Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice. *Osteoarthritis Cartilage* **22**, 313-322 (2014).
- 7 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 (2009).
- 8 van der Kraan, P. M. Osteoarthritis year 2012 in review: biology. *Osteoarthritis Cartilage* **20**, 1447-1450 (2012).
- 9 Kannu, P., Bateman, J. F., Belluoccio, D., Fosang, A. J. & Savarirayan, R. Employing molecular genetics of chondrodysplasias to inform the study of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **60**, 325-334 (2009).
- 10 Qvist, P. *et al.* The disease modifying osteoarthritis drug (DMOAD): Is it in the horizon? *Pharmacol Res* **58**, 1-7 (2008).
- 11 Hakomori, S. & Igarashi, Y. Functional role of glycosphingolipids in cell recognition and signaling. *J Biochem* **118**, 1091-1103 (1995).
- 12 Kolter, T., Proia, R. L. & Sandhoff, K. Combinatorial ganglioside biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 25859-25862 (2002).
- 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 Liu, Y. *et al.* A genetic model of substrate deprivation therapy for a glycosphingolipid

- storage disorder. *J Clin Invest* **103**, 497-505 (1999).
- 15 Kawai, H. *et al.* Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures. *J Biol Chem* **276**, 6885-6888 (2001).
 - 16 Yamada, T. *et al.* Carminerin contributes to chondrocyte calcification during endochondral ossification. *Nat Med* **12**, 665-670 (2006).
 - 17 Nakamichi, Y. *et al.* Chondromodulin I is a bone remodeling factor. *Mol Cell Biol* **23**, 636-644 (2003).
 - 18 Stoop, R. *et al.* Type II collagen degradation in spontaneous osteoarthritis in C57Bl/6 and BALB/c mice. *Arthritis Rheum* **42**, 2381-2389 (1999).
 - 19 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).
 - 20 Mankin, H. J. Biochemical and metabolic abnormalities in osteoarthritic human cartilage. *Fed Proc* **32**, 1478-1480 (1973).
 - 21 Glasson, S. S. *et al.* Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* **434**, 644-648 (2005).
 - 22 Hashimoto, S. *et al.* Nitric oxide production and apoptosis in cells of the meniscus during experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **42**, 2123-2131 (1999).
 - 23 Kameda, Y. *et al.* Siglec-15 regulates osteoclast differentiation by modulating RANKL-induced phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Erk pathways in association with signaling Adaptor DAP12. *J Bone Miner Res* **28**, 2463-2475 (2013).
 - 24 Song, J., Gao, X. & Galan, J. E. Structure and function of the Salmonella Typhi chimaeric A(2)B(5) typhoid toxin. *Nature* **499**, 350-354 (2013).
 - 25 Ferrari, G., Batistatou, A. & Greene, L. A. Gangliosides rescue neuronal cells from death after trophic factor deprivation. *J Neurosci* **13**, 1879-1887 (1993).
 - 26 Shimizu, T. *et al.* Vitamin K-dependent carboxylation of osteocalcin affects the efficacy of teriparatide (PTH(1-34)) for skeletal repair. *Bone* **64**, 95-101 (2014).
 - 27 Bouxsein, M. L. *et al.* Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* **25**, 1468-1486 (2010).
 - 28 Malizos, K. N., Papachristos, A. A., Protopappas, V. C. & Fotiadis, D. I. Transosseous application of low-intensity ultrasound for the enhancement and monitoring of fracture healing process in a sheep osteotomy model. *Bone* **38**, 530-539 (2006).
 - 29 Boudierlique, T. *et al.* Targeted deletion of Atg5 in chondrocytes promotes age-related osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* (2015).

- 30 Loeser, R. F. *et al.* Microarray analysis reveals age-related differences in gene expression during the development of osteoarthritis in mice. *Arthritis Rheum* **64**, 705-717 (2012).
- 31 Mizutani, T., Kawabata, K., Koyama, Y., Takahashi, M. & Haga, H. Regulation of cellular contractile force in response to mechanical stretch by diphosphorylation of myosin regulatory light chain via RhoA signaling cascade. *Cell Motil Cytoskeleton* **66**, 389-397 (2009).
- 32 Chambers, M. G. *et al.* Matrix metalloproteinases and aggrecanases cleave aggrecan in different zones of normal cartilage but colocalize in the development of osteoarthritic lesions in STR/ort mice. *Arthritis Rheum* **44**, 1455-1465 (2001).
- 33 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 (2011).
- 34 Lim, S. T., Esfahani, K., Avdoshina, V. & Mocchetti, I. Exogenous gangliosides increase the release of brain-derived neurotrophic factor. *Neuropharmacology* **60**, 1160-1167 (2011).
- 35 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 (2007).
- 36 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 (2011).
- 37 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 (2012).
- 38 Zamli, Z. & Sharif, M. Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis? *Int J Rheum Dis* **14**, 159-166 (2011).
- 39 Troeberg, L. & Nagase, H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* **1824**, 133-145 (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 (1999).
- 42 Figuera, 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 (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 (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 (2007).
- 45 Hashimoto, M., Nakasa, T., Hikata, T. & Asahara, H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev* **28**, 464-481 (2008).
- 46 Hakomori, S. I. Structure and function of glycosphingolipids and sphingolipids: recollections and future trends. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 325-346 (2008).
- 47 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 (2010).
- 48 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 (2010).
- 49 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 (2011).