

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

楊 承諭

論文題目

ガングリオシド GD3 合成酵素遺伝子欠損マウスにおける  
加齢に伴う骨量減少の抑制

## I. 緒言

ガングリオシドは、脊椎動物の神経組織に多く発現し、神経系の調節に関与していると考えられてきた。近年、様々なガングリオシドを欠損させた遺伝子改変マウスを用いた研究により、ガングリオシドが神経組織や精子形成の健全性に不可欠であることが報告されている。シアル酸を2つもつb系列ガングリオシドは、感覚神経系の調節や損傷した舌下神経の再生、脂肪組織中のレプチン分泌において重要な役割を果たしていることが示されている。一方、これらのガングリオシドは腫瘍関連抗原としてのみならず、細胞増殖や浸潤などの癌悪性形質を増強させることが知られている。本研究では、シアル酸を1つもつa系列ガングリオシドのGM3にシアル酸を付加させることでb系列ガングリオシドのGD3を合成するGD3合成酵素に着目した。

ガングリオシドが骨髄間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells ; MSCs) や骨芽細胞に発現していることが報告されており、a系列ガングリオシドのGD1aがMSCsから骨芽細胞への分化に関与していることは示されている。しかし、これらの研究は培養細胞による実験のみであり、生体におけるガングリオシドと骨代謝の関係についての報告はない。そこで、生体においてガングリオシドが骨代謝制御に関与しているのかを明らかにすることを目的に、本研究を行った。

## II. 実験材料および方法

## 1. 動物

野生型 (WT) と GD3 合成酵素ノックアウト (GD3S KO) マウスを交配させて生まれたヘテロマウス同士を交配させ、遺伝子型を決定し、実験に用いた。

## 2. 細胞培養

MC3T3 E1 細胞、RAW264.7 細胞および長管骨 (大腿骨と脛骨) から採取したマウス骨髄細胞を、10%ウシ胎仔血清と抗生物質 (ペニシリン、ストレプトマイシン) を含む  $\alpha$ -Minimum Essential Medium で培養した。

## 3. 成熟骨芽細胞への誘導

コンフルエントに達した MC3T3 E1 細胞にアスコルビン酸と  $\beta$  グリセロリン酸を添加し、分化誘導を開始した。分化培地は、一日おきに交換した。分化誘導開始 0、7、14、21 日目の細胞を、フローサイトメトリーおよび定量的リアルタイム PCR の解析に用いた。

## 4. 破骨細胞への誘導

マウス骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) 存在下で 3 日間培養した後の接着細胞を、破骨細胞前駆細胞とし、M-CSF および RANKL 添加 24 時間後の破骨細胞前駆細胞を、フローサイトメトリーの解析に用いた。

## 5. フローサイトメトリー

細胞表面に存在するガングリオシドの発現レベルを解析した。細胞にそ

それぞれの抗 GD3 モノクローナル抗体 (mAb)、抗 GD2 mAb、抗 GD1b mAb、抗 GT1b mAb を加え 1 時間置いた後、FITC 標識抗マウス IgG または IgM を添加し、45 分間反応させた。二次抗体のみを加えたものを対照群とした。

#### 6. 定量的リアルタイム PCR

GD3合成酵素遺伝子 (*St8sial1*) の mRNA の発現レベルを評価した。その際、*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh)* を内在性コントロールとして用いた。*Gapdh* mRNA の発現量に対する目的遺伝子の mRNA の相対的発現量は、MC3T3 E1細胞における成熟骨芽細胞誘導前 (Day 0) および誘導後 (Day 7、14、21) / RAW264.7細胞、または、RAW264.7細胞のRANKL添加後 (Day 2、4) / RANKL添加前 (Day 0) の比率で評価した。

#### 7. 3次元マイクロコンピューター断層撮影 (3D- $\mu$ CT)

大腿骨末端を 3D- $\mu$ CT で撮影し、海綿骨の骨量パラメーターを解析した。

#### 8. 骨組織形態学的解析

大腿骨を通法に従って固定、脱灰、パラフィン包埋し、5  $\mu$ m の厚さの切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色および TRAP 染色を行った。

#### 9. 統計分析

得られた実験データは平均値と標準偏差値で示し、統計的な有意差の検定にはスチューデントの t 検定およびマンホイットニーの u 検定を用いた。

$p < 0.05$  を統計的有意差ありと判定した。

### III. 結果

## 1. 骨芽細胞、RAW264.7 細胞およびマウス骨髄細胞由来初代培養破骨細胞前駆細胞における b 系列ガングリオシドと *St8sial1* の発現

骨芽細胞における b 系列ガングリオシド (GD3、GD2、GD1b、GT1b) および *St8sial1* は、成熟骨芽細胞への誘導前 (Day 0) および誘導後 (Day 7) の MC3T3 E1 細胞では認められなかった。一方、RAW264.7 細胞および初代培養破骨細胞前駆細胞では、共に GD3、GD2、GD1b の発現が認められたが、GT1b の発現はどちらの細胞にも認められなかった。これらのガングリオシドの発現量は、初代培養破骨細胞前駆細胞における GD1b を除いて、RANKL 添加による破骨細胞分化誘導後に減少した。また、これらの結果と一致して、*St8sial1* の発現レベルは RANKL 添加によって抑制された。

## 2. GD3S KO マウスの大腿骨海綿骨骨量

15 週齢では、WT マウスと GD3S KO マウスの骨量パラメーターには有意な差が認められなかったが、40 週齢では、GD3S KO マウスは WT マウスと比較して、骨量が高くなった。また、骨梁幅においても有意な差は認められなかったが、GD3S KO マウスの方が高い傾向を示した。骨梁数および骨梁間隔については、有意な差は認められなかった。

## 3. GD3S KO マウスにおける骨形成パラメーター

骨面の長さあたりの骨芽細胞数および骨芽細胞表面の長さについては、15 および 40 週齢ともに WT マウスと GD3S KO マウスの間に有意な差は認められなかった。このことより、b 系列ガングリオシドが骨形成に影響しない

ことが示された。

#### 4. GD3S KO マウスにおける骨吸収パラメーター

15 週齢の WT マウスと GD3S KO マウスの骨面の長さあたりの破骨細胞数および破骨細胞表面の長さには、有意な差は認められなかった。しかし、40 週齢においては、WT マウスと比較して GD3S KO マウスでは、これらの骨吸収パラメーターが有意に減少した。

#### IV. 考察

本研究により、GD3 合成酵素の欠損が、加齢に伴う骨量減少を抑制することが示された。骨芽細胞では b 系列ガングリオシドの発現は認められなかったが、RAW264.7 細胞やマウス骨髄細胞由来マクロファージのような破骨細胞前駆細胞では、b 系列ガングリオシドの発現が認められた。さらに、3D- $\mu$ CT 解析において、WT マウスの骨量は加齢により 59%減少したのに対して、GD3S KO マウスでは加齢による骨量減少は 23%であった。この結果と、GD3S KO マウスで骨吸収パラメーターが低下したことより、GD3 合成酵素欠損が骨吸収を減弱し、加齢に伴う骨量減少を抑制することが示された。

GD3S KO マウスでは、血清レプチン濃度が減少しており、b 系列ガングリオシドがレプチン分泌を制御していることが報告されている。レプチンは脂肪組織量と体重の調節に必須な役割を果たし、レプチン分泌低下は肥満を引き起こす。また、レプチンが交感神経系を介して骨吸収を促進することも知られている。本研究において、40 週齢の GD3S KO マウスでは骨量だ

けでなく体重も WT マウスと比較して高値であった。さらに、40 週齢の GD3S KO マウスの骨吸収パラメーターは、WT マウスと比較して、低値であった。これらの結果より、GD3 合成酵素が欠損することで血清レプチン濃度が低下し、骨吸収の抑制に繋がった可能性が考えられる。GD3 合成酵素によって調節されるレプチン分泌が骨代謝に影響しているのかを明らかにするためには、WT マウスと GD3S KO マウスにおけるレプチンの血清濃度を比較すると共に、レプチンを投与した GD3S KO マウスの骨量において、WT マウスと同程度の加齢による骨吸収が起こるのかどうかを今後検討する必要がある。

a 系列ガングリオシドである GD1a が、上皮成長因子受容体の活性を介して、MSCs の骨芽細胞分化の調節に重要な役割を果たすことが報告されている。GM1 もまた、血小板由来成長因子  $\beta$  受容体のリン酸化抑制によって、臍幹細胞の骨芽細胞分化を促進する。さらに、血清除去下での培養では、Runx2 やオステカルシンのような骨芽細胞分化マーカーと同様に GM3 合成酵素遺伝子の発現が上昇する。以上のことより、a 系列ガングリオシドは骨芽細胞の分化誘導に関与していることが考えられる。また、GD3S KO マウスでは、b 系列ガングリオシドの欠損により、a 系列ガングリオシドの発現量が上昇することが知られている。しかし、b 系列ガングリオシドの発現が、骨芽細胞には認められないこと、および WT マウスと GD3S KO マウス間で骨形成のパラメーターには差が認められないことより、GD3 合成酵素欠損による a 系列ガングリオシドの発現上昇は引き起こされないと考えられる。

本研究において、骨代謝におけるガングリオシドの作用メカニズムは十分に明らかにされていないが、本研究は、生体レベルにおいてガングリオシド合成酵素が骨代謝に影響を及ぼすことを示す最初の報告である。

#### V. まとめ

15週齢では、WTマウスとGD3S KOマウスの骨量および骨吸収パラメーターに有意な差は認められなかったが、40週齢のGD3S KOマウスでは、WTマウスと比較して骨量が高く、骨吸収パラメーターの低下が認められた。以上の結果より、GD3合成酵素欠損が、破骨細胞数を減少させることで、加齢に伴う骨吸収を抑制することが明らかになり、この知見は、将来、加齢に伴って起こる骨粗鬆症の治療や予防に応用できる可能性を示している。