

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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

スフィンゴシンと脂肪酸から成るセラミドに糖鎖が結合したものを、スフィンゴ糖脂質と呼び、その中でも、シアル酸を含むものがガングリオシドである。付加される糖の種類やシアル酸の数により、多様なガングリオシドが存在し、これらは、種々の糖転移酵素によって合成される。本研究で注目した GD3 合成酵素は、ガングリオシド GM3 (ラクトシルセラミドにシアル酸が付加されている) を基質として、シアル酸を付加させて GD3 を合成する酵素である。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。GM2/GD2 (GM3 から合成されるものが GM2、GD3 から合成されるものが GD2) および GD3 合成酵素遺伝子の両方が欠損したマウスでは、脳と脊髄の神経に重度の変性が起こることが示されている。GM2/GD2 合成酵素遺伝子欠損マウスの解析の結果、ライディッヒ細胞がテストステロンを精細管および血管へ放出するためには、ガングリオシドが必要不可欠であることが報告されている。特に、シアル酸を2つもつ b 系列ガングリオシド (GD3、GD2、GD1b、GT1b、GQ1b) 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、悪性黒色腫や骨肉腫、小細胞性肺癌において、細胞増殖や浸潤などの悪性形質を増強させることが知られている。

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、シアル酸を1つもつ 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。

本研究では、フローサイトメトリーを用いて、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3 E1 およびマウス破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7、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 (GD3、GD2、GD1b、GT1b) の発現レベルを検討した。さらに、生体での b 系列ガングリオシドによる骨代謝への関与を検討するため、3次元マイクロコンピューター断層撮影 (3D- $\mu$ CT) を用いて、野生型 (WT) および GD3 合成酵素遺伝子ノックアウト (GD3S KO) マウスの大腿骨海綿骨骨量を計測した。また、酒石酸塩抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色およびヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を用いた骨組織形態計測を行った。

## II. 実験材料および方法

### 1. 動物

本研究で用いられた GD3S KO マウスは以前の報告に従い、古川博士の研究室にて作製された。簡潔に述べると、GD3 合成酵素遺伝子をノックアウトするためにターゲティングベクターが用いられた。ネオマイシン耐性遺伝子を GD3 合成酵素遺伝子のエクソン 1 の *Ba*II と *Acc*I サイトの間に挿入し、9.5kb の遺伝子断片がターゲティングベクターとして使用された。ジフテリア毒素 A 遺伝子は、非相同組み換えを除くために付与された。WT マウスと 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。マウスは 12 時間の

明暗周期で飼育し、水と食物は自由摂取とした。動物実験のプロトコールは、愛知学院大学動物実験委員会で承認された。(承認番号 AGUD312; 2015 年 10 月 29 日、名古屋、日本) 実験動物の管理ならびに研究方法については、アメリカ国立衛生研究所指針 (1966) に従った。

## 2. 細胞培養

マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3 E1 およびマウス破骨細胞前駆細胞 (単球/マクロファージ) 株 RAW264.7 を、理研バイオリソース研究センター (筑波、日本) と American Type Culture Collection (Mnassas, VA, USA) からそれぞれ購入した。MC3T3 E1 細胞および RAW264.7 細胞、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を含む  $\alpha$ -Minimum Essential Medium (100 U/mL ペニシリン、100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシン、和光純薬株式会社、大阪、日本) で培養した。培養は加湿インキュベーター内で 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて行った。培養細胞をトリパンブルーで染色し、生細胞および死細胞を血球計算盤にて計数した。

## 3. 抗体

抗GD3モノクローナル抗体 (mAb) R24は、スローン・ケタリング記念癌センターのOld L. J. 博士より供与されたものである。抗GD2 mAb 220-51、抗GD1b mAb 370、抗GT1b mAb 549は、以前、古川博士の研究室にて作製されたものである。FITC標識抗マウスIgGおよびIgMは、Affymetrix eBioscience (San Diego, VA, USA) から購入した。

## 4. 成熟骨芽細胞への誘導

MC3T3 E1 細胞を 60 mm dish に播種し、その細胞がコンフルエントに達した後、50  $\mu$ g/mL のアスコルビン酸 (和光純薬株式会社、大阪、日本) と 5 mM の  $\beta$  グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を添加し、分化誘導を開始した。培養液は、一日おきに交換した。分化誘導開始 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。

## 5. In vitro における破骨細胞への誘導

マウス骨髄細胞を 150 mm dish に播種し、10 ng/mL マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF、PeproTech 社、Rocky Hill, NJ, USA) 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て用いた。破骨細胞前駆細胞を、10 ng/mL M-CSF と 50 ng/mL receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL、PeproTech 社) 存在下で培養した。RANKL を添加して 24 時間後の細胞を、フローサイトメトリーの解析に用いた。

## 6. フローサイトメトリー

細胞表面に発現するガングリオシドについて、種々の抗ガングリオシド mAb を用いて Accuri™ C6 Flow Cytometry (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) にて解析した。本実験で使用した mAb は、抗 GD3 mAb (マウス IgG3, R24) (100 倍希釈)、抗 GD2 mAb (マウス IgG1, 220-51) (100 倍希釈)、抗 GD1b mAb (マウス IgM, 370) (100 倍希釈)、抗 GT1b mAb (マウス IgM, 549) (100 倍希釈) であった。細胞にそれぞれの抗体を加えて氷上で 1 時間置いた後、FITC 標識抗マウス

IgG (200 倍希釈) または FITC 標識抗マウス IgM (200 倍希釈) を添加し、氷上で 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。破骨細胞誘導前の RAW264.7 細胞 (Day 0) をポジティブコントロールとして用いた。

#### 7. 定量的リアルタイム PCR

トータル RNA の抽出には、RNeasy Plus mini kit (Qiagen, Germantown, MD, USA) を用いた。逆転写には High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用い、定量的リアルタイム PCR を、THUNDERBIRD SYBR qPCR mix kits を用いて TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System III (TOYOBO、大阪、日本) にて行った。1  $\mu$ g のトータル RNA を逆転写に用い、その時のサイクル条件は、25  $^{\circ}$ C で 10 分間、37  $^{\circ}$ C で 120 分間、85  $^{\circ}$ C で 5 分間であった。また、PCR のサイクル条件は、95  $^{\circ}$ C で 10 分間、初期変性を行った後、95  $^{\circ}$ C で 15 秒間の変性反応と 60  $^{\circ}$ C で 1 分間の伸長反応を 40 サイクルであった。PCR プライマーを用いて、GD3 合成酵素遺伝子 (*St8sial*) 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 の相対定量は、 $S_{MC\ Day\ 0,\ 7,\ 14,\ 21}/S_{RAW}$  または  $S_{RAW\ Day\ 2,\ 4}/S_{RAW\ Day\ 0}$  の比率で評価した。 $S_{MC\ Day\ 0,\ 7,\ 14,\ 21}$  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) の mRNA 量を示す。 $S_{RAW}$  は、RAW264.7 細胞における mRNA 量を示す。 $S_{RAW\ Day\ 0}$  と  $S_{RAW\ Day\ 2,\ 4}$  はそれぞれ、RAW264.7 細胞の RANKL 添加前 (Day 0) および RANKL 添加後 (Day 2、4) の mRNA 量を示す。

#### 8. 3次元マイクロコンピュータ断層撮影 (3D- $\mu$ CT 解析)

大腿骨末端を 3D- $\mu$ CT (CosmoScan R-mCT-GX-T1, RIGAKU、東京、日本) で撮影し、TRI/3D-BON ソフトウェア (Ratoc、東京、日本) で海綿骨のパラメーターを解析した。大腿骨末端の成長板から 0.5 mm を基準として、そこから厚さ 20  $\mu$ m の連続した 75 のセクションが撮影され、それらが解析された。

#### 9. TRAP 染色

TRAP 染色は以前の報告に従って行った。簡潔に述べると、スライド (大腿骨試料) を、naphthol AS-MX phosphate、Fast Red Violet LB Salt、塩化マンガン、酒石酸ナトリウムを含む酢酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M、pH 5.0) を 37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応させ、TRAP 染色を行った。

#### 10. 骨組織形態学的解析

大腿骨を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、10%のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で 3 週間脱灰した。次にパラフィン包埋し、5  $\mu$ m の厚さの切片を作製した。作製した切片は、ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色および TRAP 染色に用いられた。TRAP 染色後、以前の報告に従い、骨面の長さあたりの TRAP 陽性多核細胞数、および骨面の長さあたりの TRAP 陽性多核細胞表面の長さを計測した。骨芽細胞は HE 染色し、骨面の長さあたりの骨芽細胞数および骨面の長さあたりの骨芽細胞表面の長さを計測した。0.8  $\text{mm}^2$  (1.0 mm  $\times$  0.8 mm) の範囲で、大腿骨の成長板より 2.0 mm と 3.0 mm の間を計測した。

## 11. 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. 骨芽細胞における b 系列ガングリオシドと GD3 合成酵素遺伝子の発現

骨芽細胞における b 系列ガングリオシド (GD3、GD2、GD1b、GT1b) の発現レベルをフローサイトメトリーを用いて解析した。これらのガングリオシドの発現は、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。また、フローサイトメトリーの結果と一致して、GD3 合成酵素遺伝子 (*St8sia1*) の発現は、成熟骨芽細胞への誘導前 (Day 0) および誘導後 (Day 7、14、21) の MC3T3 E1 細胞では、認められなかった。

### 2. RANKL 添加の有無による 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 GD3 合成酵素遺伝子の発現

RAW264.7 細胞および初代培養破骨細胞前駆細胞ともに 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形成誘導後に減少した。また、これらの結果と一致して、*St8sia1* の発現レベルは RANKL 添加によって抑制された。

### 3. GD3 合成酵素遺伝子ノックアウト (GD3S KO) マウスの加齢による大腿骨海綿骨骨量の減少抑制

15 週齢では、WT マウスと GD3S KO マウスの大腿骨海綿骨骨量パラメーターには有意な差が認められなかった。しかし、40 週齢の GD3S KO マウスは WT マウスと比較して、骨量 (BV/TV) が高くなった。骨梁幅 (Tb. Th) においては 40 週齢の WT マウスと GD3S KO マウス間で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 ( $p = 0.0503$ )。骨梁数 (Tb. N) および骨梁間隔 (Tb. Sp) については、40 週齢の WT マウスと GD3S KO マウス間に有意な差は認められなかった。

### 4. WT マウスと GD3S KO マウスにおける大腿骨海綿骨の骨芽細胞数

骨形成パラメーターである骨面の長さあたりの骨芽細胞数 (Ob. N/BS) および骨面の長さあたりの骨芽細胞表面の長さ (Ob. S/BS) 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。

### 5. GD3 合成酵素欠損による骨吸収パラメーターの低下

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 (Oc. S/BS) (WT、 $11.0 \pm 1.3$  ; GD3S KO、 $11.2 \pm 2.5$ )、および骨面の長さあたりの破骨細胞表面の長さ (Oc. N/BS) (WT、 $17.1 \pm 3.8$  ; GD3S KO、 $16.8 \pm 2.4$ ) 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、Oc.S/BS (WT、 $14.9 \pm 3.5$  ; GD3S KO、 $8.3 \pm 2.8$ ) および Oc.N/BS (WT、 $16.1 \pm 5.5$  ; GD3S KO、 $10.0 \pm 2.9$ ) が、WT マウスと比較して GD3S KO マウスでは有意に減少した。

#### 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、GD3S KO マウスを用いた 3D- $\mu$ CT 解析および骨組織形態学的解析により、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。

3D- $\mu$ CT 解析において、40 週齢の WT マウスの BV/TV は加齢により 59%減少した (15 週齢では  $21.1 \pm 9.5$  ; 40 週齢では  $8.7 \pm 2.7$ )。一方、40 週齢の GD3S KO マウスの BV/TV は、加齢により 23%減少した (15 週齢では  $19.1 \pm 6.4$  ; 40 週齢では  $14.8 \pm 5.3$ )。この結果より、マウスにおける GD3 合成酵素遺伝子欠損が加齢による骨量減少を抑制したことが示された。

GD3S KO マウスで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欠損することで、レプチン分泌が抑制され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 マウスは骨量だけでなく体重も WT マウスに比べて高くなった。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、低い値を示した。これらの結果から、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ともに、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検討する必要がある。

ガングリオシドが MSCs や臍幹細胞から骨芽細胞への分化を調節していることについては、多く報告がある。例えば、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 (PDGFR- $\beta$ ) 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 GD3 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。