

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 佐々木 恵理
論文題目  ガングリオシド GM2/GD2 合成酵素遺伝子欠損マウスに おける骨芽細胞の減少による骨形成の減弱	

## I. 緒言

シアル酸を含むスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドは、臓器や組織の発生と維持、および疾患の病因において重要な役割を果たすと考えられている。歯科矯正学分野では、歯の移動時において、様々な要因により歯槽骨代謝が制御されていることが解明されてきたが、矯正力に関わる歯槽骨代謝への影響とガングリオシドとの関連性については不明である。

体の恒常性維持にガングリオシド GM2/GD2 合成酵素が果たす役割が GM2/GD2 合成酵素遺伝子欠損 (GM2/GD2S KO) マウスの解析により解明されている。本研究では、3 次元マイクロコンピュータ断層撮影 (3D- $\mu$ CT) を用いて、野生型 (WT) および GD1a が欠損している GM2/GD2S KO マウスの大腿骨海綿骨量を解析することにより、GD1a を含むガングリオシドの骨代謝への関与を検討した。また、ヘマトキシリンとエオシン (HE) および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) を用いて骨の組織形態学的計測を行い、それぞれ骨形成と骨吸収を評価した。さらに、カルセイン二重標識による骨形成の評価も行った。

## II. 実験材料および方法

### 1. マウス

WT マウスと GM2/GD2S KO マウスを交配して生まれたヘテロ同士を交配させ、その子孫の遺伝子型をスクリーニングし、実験に用いた。

### 2. 細胞培養

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞およびマウス前破骨細胞株 RAW264.7 細胞を、ウシ胎児血清および抗生物質を含む  $\alpha$ -Minimum Essential Medium で培養した。

### 3. 初代骨芽細胞への分化誘導

WT および GM2/GD2S KO マウス由来の骨髄細胞をウシ胎児血清、アスコルビン酸、デキサメタゾン、 $\beta$ -グリセロリン酸および抗生物質を含む  $\alpha$ -Minimum Essential Medium で培養し、骨芽細胞へ分化誘導した。

### 4. 初代前破骨細胞の培養

WT および GM2/GD2S KO マウス由来の骨髄細胞をマクロファージコロニー刺激因子存在下で 3 日間培養し、その細胞を前破骨細胞として実験に用いた。

### 5. 成熟骨芽細胞への分化誘導

コンフルエント状態の MC3T3-E1 細胞を、アスコルビン酸と  $\beta$ -グリセロリン酸存在下で培養し、成熟骨芽細胞へ分化誘導した。

### 6. 破骨細胞への分化誘導

RAW264.7 細胞を receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand で処理し、破骨細胞へ分化誘導した。

### 7. フローサイトメトリー

ガングリオシド抗体である抗 GM3 mAb、抗 GM2 mAb、抗 GM1 mAb、抗 GD1a mAb、抗 GD3 mAb、抗 GD2 mAb、抗 GD1b mAb、および抗 GT1b mAb を用いて、細胞表面における、ガングリオシドの発現を解析した。一次抗体で 60 分間反応させた後、FITC 標識抗マウス IgG または IgM 抗体を二次抗体として添加し、45 分間反応させた。コントロールとして二次抗体のみを添加したものをを用いた。

### 8. 糖脂質の抽出

糖脂質は、クロロホルム/メタノールで抽出した。

9. TLC

抽出した糖脂質の酸性画分をシリカゲルプレートにのせ、クロロホルム/メタノール/0.2% CaCl<sub>2</sub>の溶媒で分離した。分離されたバンドをレゾルシノールスプレーによって検出した。

10. qPCR

内部標準として *Gapdh* を用いて、*B4galnt1* (GM2/GD2 合成酵素遺伝子) の mRNA レベルを測定した。

11. siRNA による *B4galnt1* のノックダウン

Lipofectamine RNAiMAX を用いて、MC3T3-E1 細胞に *B4galnt1* に特異的な siRNA を導入し、*B4galnt1* をノックダウンした。

12. 3D- $\mu$ CT 解析

3次元マイクロコンピュータ断層撮影法で撮影し、大腿骨海面骨の骨量パラメーターを解析した。

13. カルセイン二重標識による骨形成速度の計測

カルセイン二重標識を用いて、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、および骨形成速度 (BFR) を評価した。

14. 骨の組織形態学的計測

大腿骨試料を通法に従って固定、脱灰、パラフィン包埋し、厚さ 5 $\mu$ m の切片を作製し、HE および TRAP 染色した。HE 染色スライドを用いて、骨表面に対する骨芽細胞数 (Ob. N/BS) および骨表面に対する骨芽細胞面 (Ob. S/BS) を評価し、TRAP 染色スライドを用いて、骨表面に対する破骨細胞数 (Oc. N/BS) および骨表面に対する破骨細胞面 (Oc. S/BS) を評価した。

15. 統計分析

得られた結果は、平均値 $\pm$ 標準偏差値 (S. D.) で示す。統計的な有意差の検定は、スチューデントの t 検定を用いて行い、\*および\*\*は、それぞれ p<0.05 および p<0.01 を示す。

III. 結果

1. 骨芽細胞におけるガングリオシドの発現

マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞では、GM3 および GD1a の発現が認められた。成熟骨芽細胞への分化誘導後、GM3 および GD1a の発現レベルは低下した。また、GD1a は TLC 解析でも検出された。

2. RANKL 添加有無による前破骨細胞株 RAW264.7 細胞におけるガングリオシドの発現

RAW264.7 細胞では、GM3、GM1、GD1a、GD3、GD2、および GD1b の発現が認められた。RAW264.7 細胞の破骨細胞への分化誘導後、これらのガングリオシドの発現レベルは低下した。また、GD1a は TLC 解析でも検出された。

3. GM2/GD2 合成酵素のノックアウトまたはノックダウンによる骨芽細胞のガングリオシド組成の変化

WT マウス由来の骨芽細胞では GD1a の発現が認められた。一方、GM2/GD2S KO マウス由来の骨芽細胞では GD1a の発現は認められなかった。また、GM2/GD2S KO マウス由来の骨芽細胞における GM3 の発現レベルは、WT マウス由来の骨芽細胞よりも高かった。MC3T3-E1 細胞において、*B4galnt1*

に対する siRNA を用いてノックダウンさせると、*B4galnt1* は約 90%減少した。また、GD1a は、GM2/GD2 合成酵素のノックダウンによってほとんど発現が認められなかった。一方、GM3 の発現レベルは、GM2/GD2 合成酵素遺伝子のノックダウンによって上昇した。

#### 4. GM2/GD2 合成酵素のノックアウトによる前破骨細胞のガングリオシド組成の変化

WT マウス由来の前破骨細胞では、主に GM3、GD1a、および GD3 の発現が認められた。また、GD1a は、GM2/GD2 合成酵素のノックアウトによって発現が認められなかった。GM2/GD2S KO マウス由来の骨芽細胞と同様に、GM2/GD2S KO マウス由来の前破骨細胞でも GM3 の発現上昇が認められた。

#### 5. WT マウスと GM2/GD2S KO マウスにおける大腿骨海綿骨量

WT マウスと GM2/GD2S KO マウスの間では、大腿骨海綿骨の骨量パラメーターおよび体重に有意な差は認められなかった。

#### 6. GM2/GD2 合成酵素欠損による骨形成の低下

骨形成のパラメーターである MS/BS、MAR および BFR は、WT マウスよりも GM2/GD2S KO マウスで有意に減少した。

#### 7. GM2/GD2 合成酵素の欠損による大腿骨海綿骨の骨芽細胞数の減少

骨芽細胞数のパラメーターである Ob. N/BS および Ob. S/BS は、WT マウスよりも GM2/GD2S KO マウスで有意に減少した。

#### 8. WT マウスと GM2/GD2S KO マウスにおける大腿骨海綿骨の破骨細胞数

破骨細胞数のパラメーターである Oc. N/BS および Oc. S/BS は、WT マウスよりも GM2/GD2S KO マウスでわずかに低下したが、有意な差は認められなかった。

### IV. 考察

骨量は WT マウスと GM2/GD2S KO マウスの間で有意な差は認められなかったが、骨の組織学的解析、カルセイン二重標識を用いた解析により、GM2/GD2S KO マウスでは WT マウスよりも骨形成能が有意に低下していることが示された。

骨芽細胞では、主に GM3 と GD1a が発現していた。また、GM2/GD2 合成酵素のノックアウトまたはノックダウンによる GD1a の発現の消失または低下が、GM3 の発現を上昇させた。以前の研究では、ヒト間葉系幹細胞に GD1a を添加すると骨芽細胞への分化が促進され、一方、GM3 を添加すると、骨芽細胞への分化が抑制されることが報告されている。以上のことより、GM2/GD2S KO マウスにおける骨芽細胞数の減少は、GD1a の消失や GM3 の増加などのガングリオシド組成の変化によって引き起こされる可能性が考えられた。

ガングリオシドは、細胞膜上にあるマイクロドメイン (GEM)/ラフトに多く存在し、GEM/ラフトを介した細胞のシグナル伝達を制御することにより細胞増殖を促進または抑制することが報告されている。これらの報告と本研究における実験結果により、GD1a および GM3 は、GEM/ラフトの細胞増殖を調節する成長因子受容体と相互作用し、骨芽細胞の増殖を促進または抑制させる可能性が考えられた。

### V. まとめ

WT マウスと GM2/GD2S KO マウスの間で骨量には有意な差は認められなかったが、骨の組織形態学的解析、カルセイン二重標識を用いた解析により、GM2/GD2S KO マウスでは WT マウスよりも骨芽細胞数が減少し、骨形成能が有意に低下していることを見出した。本研究により、骨芽細胞

(学位論文の内容を要約したもの)

No. .... 4 .....

愛知学院大学

におけるガングリオシドの発現パターンの変化が、骨形成に影響を及ぼすことが明らかになり、将来、ガングリオシドが骨粗鬆症の治療や予防に臨床応用できる可能性があると考えている。