

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

三島 好貴

論文題目

マウス骨芽細胞の増殖における
グルコシルセラミド合成酵素の寄与

I. 緒言

スフィンゴ糖脂質は脂肪酸とスフィンゴシンを含むセラミドと糖鎖から構成され、生命の恒常性の維持や様々な病因に関与していることが知られている。矯正治療では、歯の移動時の歯槽骨において破骨細胞と骨芽細胞による歯槽骨代謝が生じており、様々な研究が報告されている。

UDP-グルコースセラミドグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (*Ugcg*) によりコードされるグルコシルセラミド合成酵素 (GCS) は、セラミドにグルコースを付加し、グルコシルセラミドを合成する。本研究では、骨芽細胞の増殖におけるスフィンゴ糖脂質の関与を明らかにするため、3種類の GCS 阻害剤 (miglustat、D-PDMP、D-PPMP) を用いて、MC3T3-E1 細胞における GD1a と Gb4 の発現および、細胞増殖への影響を検討した。また、mRNA の発現プロファイルを4つのグループに分けて評価した結果、いくつかの遺伝子が MC3T3-E1 細胞の増殖に関与している可能性が示唆された。そこで、予測された遺伝子が骨芽細胞の増殖に関与しているのかをそれぞれの分子に対する siRNA でノックダウンして検討した。その結果、GCS が新規の増殖制御分子を介して、骨芽細胞の増殖を制御することが示された。

II. 実験材料および方法

1. 細胞培養

MC3T3-E1 細胞を、10 %ウシ胎仔血清と抗生物質を含む α -Minimum Essential Medium で培養した。

2. 抗体

抗 GD1a モノクローナル抗体 (mAb) D266 は古川博士の研究室で以前作製されたものである。抗 Gb4 mAb HIR034 は、東京都日本赤十字社血液センターより提供されたものである。FITC 標識抗マウス IgM 抗体は Affymetrix eBioscience、FITC 標識抗ヒト IgM 抗体は BioLegend から購入した。

3. 成熟骨芽細胞への誘導

コンフルエント状態の MC3T3-E1 細胞を、アスコルビン酸と β -グリセロリン酸で処理した。培養液の交換は 1 日おきに行った。定量的リアルタイム PCR (qPCR) は 7、14、21 日目の培養後に、フローサイトメトリーは 14 日目の培養後に実施した。

4. フローサイトメトリー

細胞膜に発現する GD1a および Gb4 は、抗 GD1a 抗体と抗 Gb4 抗体を用いて解析した。一次抗体で 1 時間反応させた後、FITC で標識した抗マウス IgM または抗ヒト IgM 抗体を用いて氷上で 45 分間反応させた。二次抗体のみを添加したものをコントロールとした。

5. qPCR

オステオカルシン、*Ugcg*、*Fndc1*、*Acta2*、*Igfbp5*、*Cox6a2*、*Cth*、*Mymk*、*Angpt16*、*Mab2112*、*Igsf10*、*Mtg2*、*Nr4a1*、*Mapre2*、*Ahcy11*、*Exoc6b*、*Traf6*、*Anxa3*、*Egr1*、*Egr2*、*Egr3* の mRNA 発現レベルを測定し、*Gapdh* を内部標準に用いた。

6. GCS 阻害剤での処理による細胞増殖および細胞死の測定

miglustat (5、10、20、50 μ M) を 4 日間、D-PDMP (5、10、20 μ M) または D-PPMP (0.1、0.5、1.0、5.0 μ M) を 3 日間添加した後、細胞を播種し、2 日間培養した。その後、生細胞と死細胞を計数した。

7. マイクロアレイ解析

MC3T3-E1 細胞の RNA を用いてマイクロアレイ解析による網羅的発現解析を行った。それぞれの阻害剤を添加してから 4 日後、細胞を播種し、24 時間培養した後、マイクロアレイ解析のために回収した。

8. siRNA を用いた *Angpt16*、*Cox6a2*、*Cth*、*Fndc1* のノックダウン

MC3T3-E1 細胞を、*Angpt16*、*Cox6a2*、*Cth*、*Fndc1* に対する特異的な siRNA で処理した。また、siRNA の導入から 48 時間後に細胞を播種し、2 日または 3 日間培養し、その後、生細胞と死細胞を計数した。

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た。2 つのサンプル間の比較では、Student's *t*-test を用いて統計学的有意性を評価し、複数のサンプルでは、一元配置分散分析 (ANOVA) と Dunnett *post-hoc* test 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. 成熟な骨芽細胞への誘導時における、*Ugcg*、*GD1a* および *Gb4* の発現の変化

MC3T3-E1 細胞では、GD1a と Gb4 の発現が認められた。成熟した骨芽細胞への分化誘導に伴い、オステオカルシンの mRNA の発現量は増加し、*Ugcg* の発現量は減少した。また、成熟な骨芽細胞への分化誘導に伴い、GD1a と Gb4 の発現量も減少し、成熟した骨芽細胞の増殖能は、分化誘導前の細胞よりも低下した。

2. GCS 阻害剤による MC3T3-E1 細胞の GD1a および Gb4 の抑制効果

MC3T3-E1 細胞に miglustat を 50 μM で 4 日間添加すると、GD1a および Gb4 の発現量が有意に低下した。D-PDMP を 5-20 μM の濃度で 2 日および 4 日間添加した結果、GD1a および Gb4 の発現が有意に低下した。2 日間 D-PPMP を 0.5-5.0 μM の濃度で GD1a が、1.0-5.0 μM の濃度で Gb4 が有意に低下した。また、D-PPMP の 4 日間添加では、0.1-5.0 μM の濃度で GD1a が、0.5-5.0 μM の濃度で Gb4 が有意に低下した。

3. GCS 阻害剤による MC3T3-E1 細胞の増殖の抑制

GCS 阻害剤の添加で細胞増殖は有意に抑制された。一方、GCS 阻害剤は、細胞の死亡率には影響を与えなかった。

4. MC3T3-E1 細胞において GCS 阻害剤により影響を受ける遺伝子の予測

ゲノムワイド mRNA 発現解析により、3 種類の阻害剤すべてで発現量が増加または抑制された遺伝子が予測され、9 つの遺伝子が、GCS 阻害剤で抑制されることが予測され、10 個の遺伝子が GCS 阻害剤で増加することが予測された。

5. MC3T3-E1 細胞において GCS 阻害剤により発現量が抑制または増加された遺伝子

マイクロアレイで予測された遺伝子の発現量を qPCR で確認した。抑制されると予測された 9 つの遺伝子のうち、*Fndc1*、*Igfbp5*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angpt16* の mRNA 発現量は、3 種類すべての阻害剤によって抑制された。*Fndc1*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angpt16* の mRNA の発現量は、骨芽細胞の分化誘導に伴い抑制された。

6. *Angpt16* のノックダウンによる MC3T3-E1 細胞の増殖の抑制

骨芽細胞の増殖における *Angpt16*、*Cox6a2*、*Cth*、*Fndc1* の関与を検討するために、siRNA によるノックダウン実験を行った。その結果、*Angpt16* のノックダウンによって細胞の増殖が有意に抑制された。

IV. 考察

GD1a と Gb4 は骨芽細胞に発現しており、GD1a は、MSCs の骨芽細胞への分化に関与することが報告されている。また、Gb4 を欠損させたマウスでは、骨形成が抑制され、骨芽細胞に発現する Gb4 は、増殖や分化を制御している可能性がある。

本研究では、GCS 阻害剤を添加した結果、GD1a と Gb4 共に発現が抑制され、MC3T3-E1 細胞の増殖が抑制された。これらの結果により、GD1a と Gb4 が骨芽細胞の増殖に関与していることが示唆された。MC3T3-E1 細胞は、*Ugcg*、GD1a、Gb4 が発現しており、成熟した骨芽細胞ではそれらの発現量が減少していた。さらに、成熟した骨芽細胞に分化すると、細胞の増殖が抑制され

た。これらの結果をまとめると、GD1a と Gb4 は骨芽細胞の増殖を促進する可能性が示唆された。マイクロアレイ解析により、抑制されると予測された9つの予測遺伝子のうち、*Fndc1*、*Igfbp5*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angpt16*は qPCRによっても同様に抑制されることが確認された。さらに、これら5つの遺伝子のうち、*Fndc1*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angpt16*の発現量は、成熟な骨芽細胞への誘導により抑制された。これらの遺伝子の骨芽細胞増殖への関与を検討するために、それぞれに対する siRNA を用いてノックダウンをした結果、*Angpt16*が骨芽細胞の増殖促進に関与していることが示された。これらの結果より、GCS は *Angpt16* を介して骨芽細胞の増殖を制御することが明らかになった。*Angpt16*は、血管新生やエネルギー代謝に関与することが知られているが、骨芽細胞での *Angpt16* の発現や骨芽細胞の増殖における役割については報告されていない。本研究で、GD1a および Gb4 の生成に必須である GCS が、*Angpt16* を介してマウス骨芽細胞の増殖を制御することを初めて明らかにした。今後、これらの結果が骨代謝制御機構の解明から効率的な歯の移動を行いうる一助になる可能性があることが示唆された。

V. まとめ

*Angpt16*が骨芽細胞の増殖に関わる遺伝子であることが明らかとなり、GCS が *Angpt16* を介して骨芽細胞の増殖を調節していることが示された。未成熟な骨芽細胞には GCS が存在し、GCS が上昇すると、GD1a と Gb4 の発現は上昇する。それらの糖脂質が *Angpt16* を介して細胞増殖を増加させ、一方、

(論文内容の要旨)

No. 7

愛知学院大学

骨芽細胞が成熟すると GCS は低下し、それに伴い GD1a と Gb4 の発現が低下する。その結果、*Angpt16* も低下し、細胞増殖が低下するのではないかと考えられた。以上より、GCS が *Angpt16* を介して骨芽細胞の増殖を調節されることが示唆された。