

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 803 号	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	

矯正治療では、歯の移動時に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、骨芽細胞増殖への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、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞における糖脂質 GD1a および Gb4 の発現と細胞増殖への影響を検討した。

はじめに、成熟な骨芽細胞への誘導時における *Ugcg*、GD1a および Gb4 の発現変化をフローサイトメトリーを用いて検討している。次に、MC3T3-E1 細胞に GCS 阻害剤を添加し GD1a および Gb4 の抑制効果とそれによる細胞増殖の抑制効果を検討し、MC3T3-E1 細胞において GCS 阻害剤により影響を受ける遺伝子を、ゲノムワイド mRNA 発現解析により予測し、それらの遺伝子の発現量を qPCR で確認している。その後、siRNA によるノックダウン実験を行い、以下の結果を得た。

1. 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 の発現量は増加した。また、分化誘導前より *Ugcg*、GD1a および Gb4 の発現レベルは減少し、細胞増殖能は低下した。

2. MC3T3-E1 細胞に miglustat を 50 μM を添加し 4 日間培養すると、GD1a および Gb4 の発現量が有意に低下した。D-PDMP を 5-20 μM で添加し 2 日および 4 日間培養した結果、GD1a および Gb4 の発現が有意に低下した。D-PPMP を添加し 2 日間の培養では、0.5-5.0 μM で GD1a が、1.0-5.0 μM で Gb4 が有意に低下し、添加後 4 日間培養では、0.1-5.0 μM で GD1a が、0.5-5.0 μM で Gb4 が有意に低下した。

3. 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、細胞死亡率には影響を与えなかった。

4. ゲノムワイド mRNA 発現解析により、すべての阻害剤により発現量が増加、抑制された遺伝子が予測された。9 つの遺伝子が GCS 阻害剤により抑制され、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. 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。*Fndc1*、*Igfbp5*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angpt16* の mRNA 発現量は、すべての阻害剤によって抑制され、*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. 骨芽細胞の増殖での遺伝子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り細胞増殖が抑制された。

これらの結果から、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とにより、GD1a と

Gb4 が骨芽細胞の増殖に関与することを示唆している。マイクロアレイ解析により、発現が抑制されると予測された遺伝子のうち、*Fndc1*、*Igfbp5*、*Cox6a2*、*Cth*、*Angpt16* は qPCR によっても抑制されることが確認された。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。これらの骨芽細胞増殖への関与を検討するために 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することを示している。よって、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したと報告した。

本研究では、*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することが示唆した。