

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05444

研究課題名(和文) スフィンゴ糖脂質機能解析を基盤とした関節疾患の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathophysiology of joint disease based on analysis of glycosphingolipid function and development of novel treatment

研究代表者

岩崎 倫政 (Iwasaki, Norimasa)

北海道大学・医学研究院・教授

研究者番号：30322803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：変形性関節症(OA)発症に関わる軟骨細胞上スフィンゴ糖脂質(GSLs)の分子基盤の解明と治療への応用を目指した。本プロジェクトでは、各種のGSLs関連合成酵素遺伝子ノックアウトマウス(KOマウス)を用いてIL-1刺激に対する各GSLs分子のシグナル制御機能を解析し、GSLs生合成経路の上流から下流に存在する主要な各GSLs分子が、OA発症に関わることを明らかにした。また、上流に存在するGSLs分子をKOすると重度のOAが発症することが明らかとなった。更に、軟骨細胞に対するメカニカル刺激に対し、GSLs分子はCaチャンネルを介して細胞内への刺激伝達を制御する機能を有することを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本プロジェクトではスフィンゴ糖脂質の中でもガングリオシドを部分的に欠損させると軟骨の肥大化・骨化が抑制され、軟骨修復過程に影響を及ぼすことが示唆された。また、それらのガングリオシド分子群を補充することでOA進行を予防が可能であることも明らかとした。これらの研究成果より、OA発症および進行に関するGSLsの分子基盤の一部を解明し、疾患の制御および治療が可能となり得ることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the molecular mechanisms of glycosphingolipids (GSLs) on chondrocytes involved in the development of osteoarthritis (OA) and to apply them to clinical treatment. In this project, various GSLs-related synthetase gene knockout mice (KO mice) are used to analyze the signal control function of each GSLs molecule against to IL-1 stimulation, and each of the GSLs existing upstream to downstream of GSLs biosynthetic pathway has been shown to be involved in the onset of OA. Moreover, we have clarified that severe OA develops when KO of GSLs molecule located more upstream. In addition, we have demonstrated that GSLs molecules have the function of controlling the transduction of stimulation into cells via Ca channels in response to mechanical stimulation on chondrocytes.

研究分野：整形外科

キーワード：関節病学 糖脂質 変形性関節症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (以下、OA) 病変の首座である軟骨組織は治癒能力にきわめて乏しく、一度疾患が発症するとその進行を制御することは困難である。そこで近年では、OA に対する新規治療法開発の必要性が叫ばれてきた。

そこで申請者らは、脂質のなかでも親水基として糖鎖、疎水基としてセラミドを持つ機能性複合糖質であり、糖尿病の発症や神経修復に深く関与しているスフィンゴ糖脂質 (以下 GSLs) に着目し、関連合成酵素遺伝子欠損 (以下 KO) マウスを作出して軟骨代謝制御機構における GSLs の機能と関節疾患との関連を示してきた。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、OA に対する GSLs 機能を添加した新規関節注射剤を開発することである。申請期間内の最終到達目標は、本疾患病変の首座である軟骨組織の変性および修復・再生において重要な機能を担う GSLs 分子を同定し、その分子または関連酵素を導入した新規関節注射剤の有効性と安全性を、動物モデルを用いて評価することである。これに対する具体的な目的は、OA 発症に関わるシグナル伝達制御機構の解明、細胞分化および組織修復制御機構の解明、各研究項目の成果より軟骨代謝制御機構が証明された GSLs 分子またはその関連酵素の関節内投与治療の有効性と安全性の証明、である。

3. 研究の方法

GSLs 関連合成酵素遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた検討

各種の 4 週齢 GSLs 関連合成酵素遺伝子ノックアウト (KO) マウスの大腿骨より軟骨組織を採取し、ex vivo 培養系を用いて IL-1 刺激に関連する細胞内シグナルの変化と細胞活性・挙動を調査する。各分子の OA 発症に関わる IL-1 シグナル制御機能を明らかにする。また、GD3 合成酵素 KO マウス (GD3S^{-/-})、GalNAc 転移酵素 KO マウス (GalNAcT^{-/-}) に対して、加齢 OA 発症モデルを用いて検討を行う。

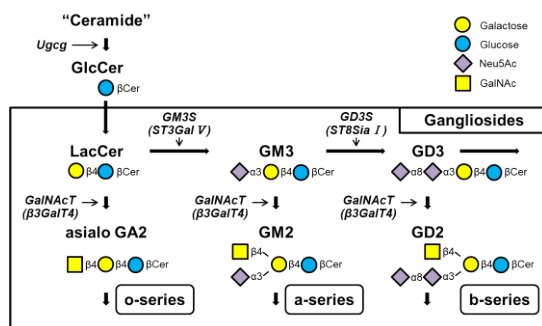


図 1 スフィンゴ糖脂質 (GSLs) 合成経路

生合成経路 (図 1) のより下流に存在する GSLs ガングリオシド分子の GD3、GalNAcT 合成酵素 KO マウス (GD3S^{-/-}、GalNAcT^{-/-}) を用いて実験を行う。最上流に存在する GlcCer 合成酵素 KO マウスは胎生致死であることは証明済みであり、GlcCer 分子をターゲットにした治療は行えない。その下流の GM3 合成酵素 KO マウスは正常に発育するが、加齢に伴い有意な OA 進行が認められている。下流に存在する GD3S^{-/-}、GalNAcT^{-/-} KO マウスにおいて、GM3KO マウスと同等の軟骨変性制御機能が認められるかどうかを検討し、もし同様の phenotype が得られた場合、全身への影響がより少ないと考えられるこれらの分子を治療ターゲットとする。

メカニカル刺激：上記と同様の各 GSLs 欠損マウスから軟骨細胞を単離する。申請者らが作成し所有している自動細胞メカニカル刺激装置を用いて、アガロースゲル内 3 次元培養下の軟骨細胞に剪断・圧縮負荷を加える。MMP-13、NO、メカノセンサー (アクチンフィラメント、インテグリン) の発現ならびに Ca シグナリングを評価し、メカニカル刺激への分子制御機能を解明する。

4. 研究成果

(1) GSLs 関連合成酵素遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた検討

・ IL-1 シグナル制御機能解析

GSLs 部分欠損マウス (GD3 KO マウス、GalNAcT KO マウス) では OA 発症に関与するサイトカインである IL-1 刺激により MMP-13、およびプロテオグリカン漏出量 (PG loss) が増大することが明らかとなった。(図 2)

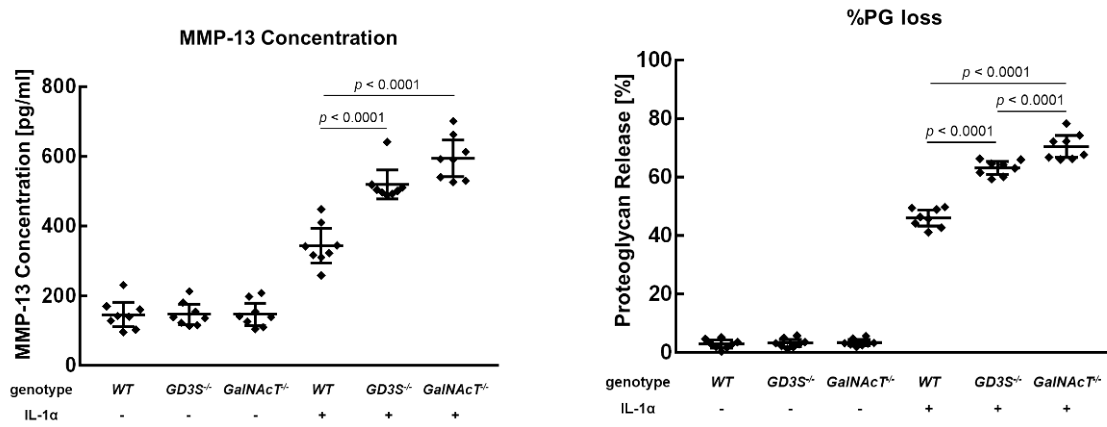


図2 IL-1 刺激による MMP-13 濃度 (左) プロテオグリカン漏出 (右)

また、生後 4 か月、12 カ月、15 カ月齢における加齢 OA 発症モデルにおいて、GSLs 部分欠損マウスでは、いずれも野生型マウスと比べて軟骨変性の増悪を認めた。また増悪の程度は、欠損する GSL s の種類の多い GalNAc 転移酵素 KO マウスが、種類の少ない GD3 合成酵素 KO マウスよりも強い変性変化を認めた。

(図 3)

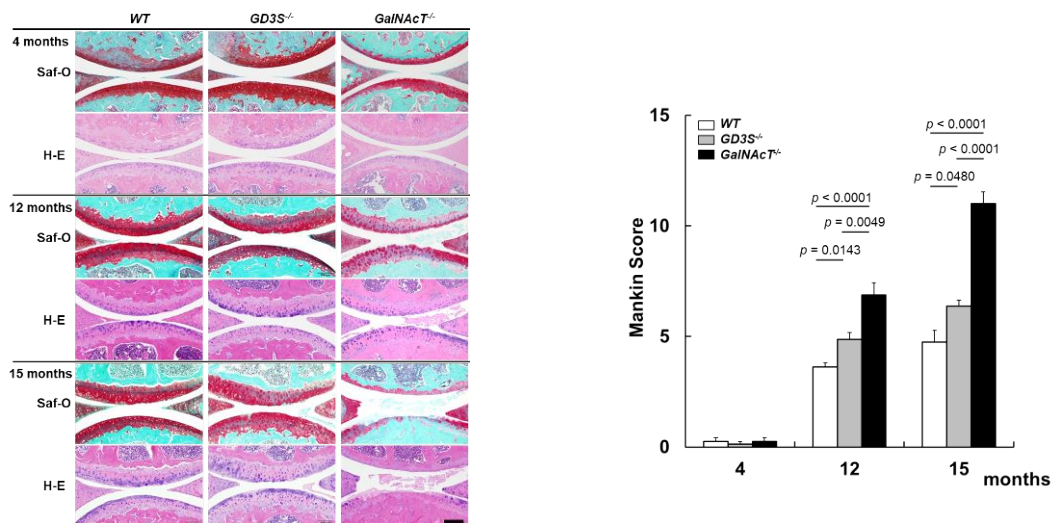


図3 加齢 OA 発症モデルにおける関節組織

また、IL-1 刺激モデルにおける MAPK signaling pathway 解析を行ったところ IL-1 刺激後 15 分において GSL s 部分欠損マウスでは野生型マウスと比べ、p-ERK, p-JNK, p-p38 の一過性の発現上昇の増強を認めた (図 4) 。

これらの結果から、GSL s 部分欠損マウスでは、IL-1 刺激に対して MAPK signaling pathway を介して軟骨変性を増悪させる可能性が考えられた。

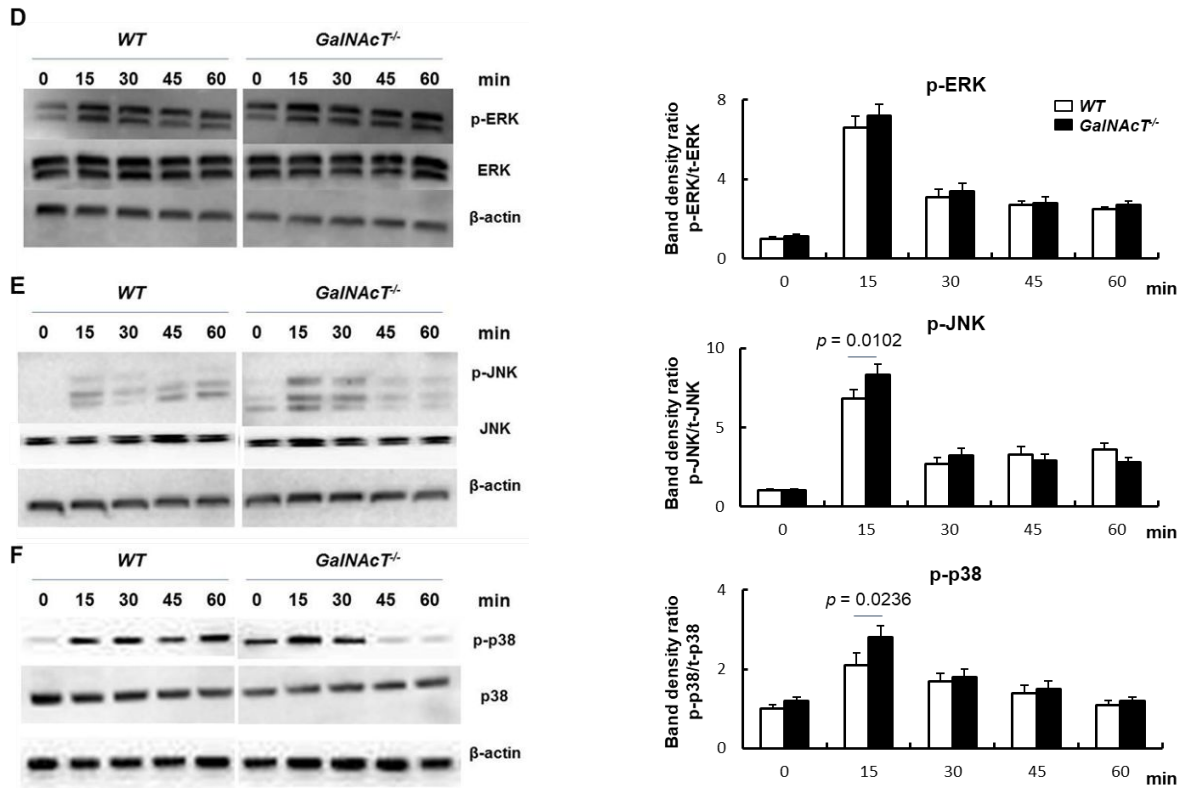


図4 IL-1 刺激による MAPK シグナルの発現の推移

(2) 軟骨代謝制御機構が証明された GSLs 分子の投与による治療効果の証明

軟骨細胞(野生型マウス、KO マウス由来)に IL-1 刺激を加えた *in vitro* 実験系に対する各 GSLs の補充効果を確認した。具体的には GalNAcT KO マウス由来細胞に対しては、o-シリーズ、a シリーズ、b シリーズと 3 種類の糖脂質上糖鎖を補充し、その効果を確認した(図 5a) また、GD3 KO マウス由来細胞に対しては、a シリーズ、b シリーズの補充を行った(図 5b)。結果として、各々の細胞において MMP-13 の発現抑制効果が認められ、統計学的有意に発現抑制効果が認められたのは全ての糖脂質上糖鎖を補充した群において見られた。

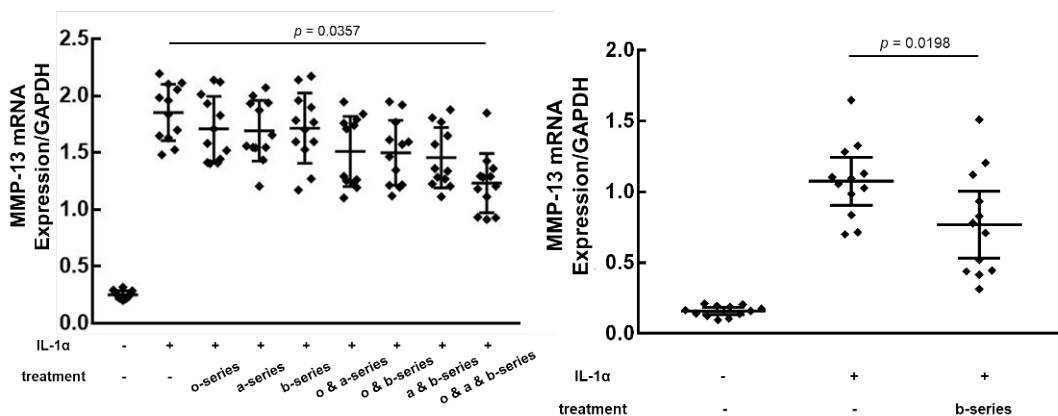


図 5a GalNAcT 欠損マウスおよび GD3 欠損マウスに対する糖脂質上糖鎖補充療法の効果

以上の結果から、本プロジェクトにおいて GSL 上糖鎖の補充療法が OA 治療を行える可能性を明らかにした。本プロジェクトは、国際的評価を得ている (Momma D, Onodera T, Iwasaki N et al., Osteoarthritis and Cartilage. 2019)。

(3) 力学ストレス応答に対して GSLs 欠損の与える影響の検討

三次元培養下において軟骨細胞に力学的ストレスを付加するモデルの作製。力学的ストレスに対する細胞の変形を評価するため、ストレス負荷時における細胞の変形を顕微鏡下に計測し、ストレス強度 (伸縮率 5%, 10%, 16%) 毎に細胞変形の評価を行い、実験条件を決定した。

力学的ストレス応答において、スフィンゴ糖脂質が果たす役割の解明。
 三次元培養下での力学的ストレス負荷モデルを用い、ほぼ全てのスフィンゴ糖脂質の欠損を引き起こす Ugcg ノックアウトマウス(以下 KO マウス)より採取した軟骨細胞に CTS 負荷を与え、mRNA 発現 (Collagen 1, 2, Aggrecan, ADAMTS-5, MMP-13, iNOS) の評価を行った (図 6)。

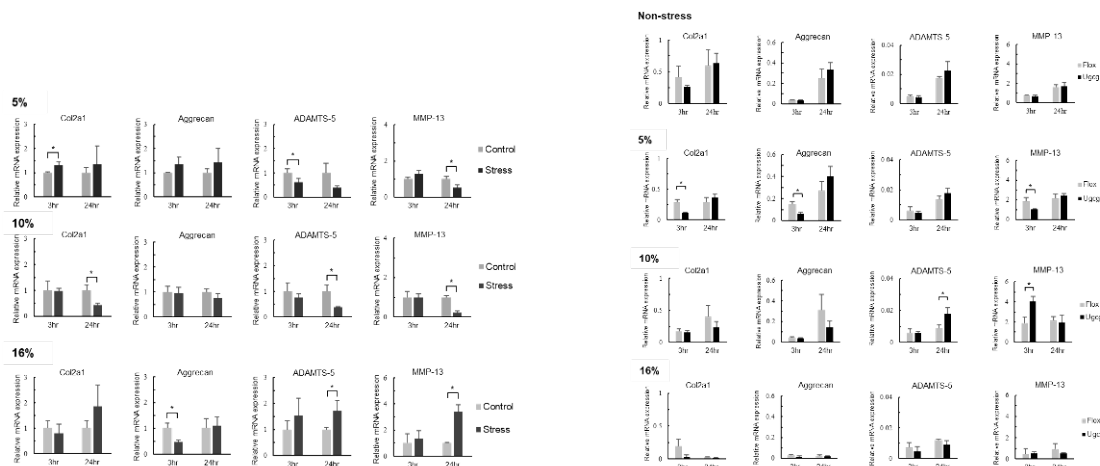


図 6 GSLs 欠損軟骨細胞における力学的ストレス応答

また、カルシウムチャネルの評価 (Fluo-4 染色を用いたタイムラプス顕微鏡観察) を行った (図 7)

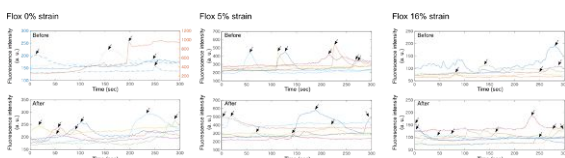


図 7 GSLs 欠損軟骨細胞における力学的ストレス刺激に対する Ca チャネルの評価
 以上より、本プロジェクトにおいて糖転移酵素欠損マウスの軟骨細胞における力学的ストレス応答の変化を明らかにした。現在、国際雑誌への投稿を行っており査読中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1.Coordinated existence of multiple gangliosides is required for cartilage metabolism. Momma D, Onodera T, Homan K, Matsubara S, Sasazawa F, Furukawa J, Matsuoka M, Yamashita T, Iwasaki N. Osteoarthritis Cartilage. 査読有, 2019 Feb;27(2):314-325. doi: 10.1016/j.joca.2018.11.003.

[学会発表](計 5 件)

松原新史、小野寺智洋、前田英次郎、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、上徳善太、宝満健太郎、大橋俊朗、岩崎倫政：軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析，第 32 回 日本整形外科学会基礎学術集会，沖縄コンベンションセンター(宜野湾市)，2017.10.26-27

松原新史、小野寺智洋、前田英次郎、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、上徳善太、宝満健太郎、大橋俊朗、岩崎倫政：軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析，第 133 回 北海道整形災害外科学会，北海道大学学術交流会館(札幌市)，2017.7.8-9

松原新史、小野寺智洋、前田英次郎、門間太輔、馬場力哉、本谷和俊、上徳善太、宝満健太郎、大橋俊朗、岩崎倫政：軟骨細胞の力学的ストレス応答におけるスフィンゴ糖脂質の機能解析：第 30 回軟骨代謝学会，京都みやこめっせ(京都市) 2017 年 3 月 3 日-4 日
 Matsubara S, Onodera T, Maeda E, Momma D, Matsuoka M, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Homan K, Ohashi T, Iwasaki N: Depletion of Glycosphingolipids Induces the Excessive Response of Chondrocytes under Mechanical Stress Condition. The 63th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA)2017.3.19-22

Matsubara S, Onodera T, Maeda E, Momma D, Matsuoka M, Baba R, Hontani K, Joutoku Z, Homan K, Ohashi T, Iwasaki N: The establishment of the novel mechanical stress model

in three dimensional culture. The 13th International Cartilage Repair Society World Congress, Hilton Sorrento Place (Sorrento, Italy) 2016.9.24-27

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：高畑 雅彦
ローマ字氏名：TAKAHATA, Masahiko
所属研究機関名：北海道大学
部局名：医学研究院
職名：准教授
研究者番号(8桁)：40374368

研究分担者氏名：小野寺 智洋
ローマ字氏名：ONODERA, Tomohiro
所属研究機関名：北海道大学
部局名：大学病院
職名：講師
研究者番号(8桁)：70547174

(2)研究分担者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。