

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11657

研究課題名(和文)糖脂質糖鎖による骨代謝制御機構

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of bone metabolism by carbohydrate chain of glycolipids

研究代表者

浜村 和紀 (HAMAMURA, Kazunori)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：00422767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞ではグロボ系糖脂質Gb4が発現し、破骨細胞(破骨細胞前駆細胞を含め)では、a系列やb系列ガングリオシドが発現していることを明らかにした。また、これらの糖脂質が欠損したマウスを用いて、糖脂質が骨代謝に関与していることを示した。例えば、骨芽細胞に発現しているグロボ系糖脂質は、骨形成に重要な役割を果たしていることを示した。また、b系列ガングリオシドの欠損が破骨細胞数を減少させることで骨吸収を減弱させ、加齢に伴う骨量の減少を抑制することが示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖脂質が、骨芽細胞や破骨細胞の増殖/分化に関与するという細胞レベルでの報告は散見されたが、個体レベルで糖脂質が骨代謝に関与することについての報告はなかった。本研究では、糖脂質が骨代謝に関与することを糖転移酵素ノックアウトマウスを用いて、個体レベルで明らかにしたことは学術的に意義がある。また、本研究により、糖脂質の発現制御やGb4などの糖脂質の骨への添加によるアプローチが、新規骨再生治療へ有効である可能性が示唆された点でも意義がある。

研究成果の概要(英文)： We demonstrated that globo-series glycolipid Gb4 was expressed in osteoblasts, and a-series and b-series gangliosides were expressed in osteoclasts (including pre-osteoclasts). We also clarified that involvement of glycolipids in bone metabolism using these glycolipids-knockout mice. For instance, we showed that globo-series glycolipid plays important roles in bone formation. We also showed that deletion of b-gangliosides attenuates bone resorption based on a decrease in osteoclast number, and suppresses bone loss that emerges with aging.

研究分野：医歯薬学

キーワード：骨芽細胞 破骨細胞 糖脂質 骨代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、糖鎖合成酵素遺伝子のクローニングの進展により、糖脂質や糖タンパク質などの複合糖質が、癌、筋肉疾患、糖尿病、感染や炎症など様々な疾患に関与することが明らかになってきた。申請者は、今まで、糖脂質糖鎖の違いが種々のタンパク質の局在に影響を及ぼし、結果的に細胞増殖能、浸潤能、移動能といった癌細胞の悪性度を制御していることを示してきた。

骨は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランス(骨代謝)により制御されていて、その制御メカニズムの解明が進んでいる。しかし、糖鎖とりわけ糖脂質が骨代謝にどのような役割を果たしているのかについては、ほとんど検討されていない。

様々な細胞において、糖脂質の脂質ラフトの内外への局在変化が、種々のタンパク質の局在に影響を及ぼし、シグナル伝達を調節していることが明らかになっていることより、骨芽細胞や破骨細胞においても、糖脂質の脂質ラフトの内外への局在の変化が、それらの細胞の増殖や分化シグナルに影響を及ぼしていることが想定される。

2. 研究の目的

本研究において、骨芽細胞や破骨細胞の増殖、分化に関与する糖脂質糖鎖を同定し、そのメカニズムを明らかにする。さらに、糖脂質糖鎖による神経系や多臓器への調節による骨代謝制御メカニズムを解明する。本研究による糖脂質糖鎖による骨代謝制御メカニズムの解明により、骨粗鬆症などの骨疾患に対する糖鎖を標的とした創薬の開発が期待できる。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーによる骨芽細胞および破骨細胞(破骨細胞前駆細胞を含む)における糖脂質の発現解析

骨芽細胞(マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1)および破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ(マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 およびマウス骨髄より採取された初代培養マクロファージ)における糖脂質(GA2、GA1、GM2、GM1、GD1a、GD3、GD2、GT1b、Gb3、Gb4、Gb5)の発現プロファイルフローサイトメトリーを用いて解析した。また、RANKLによって、マクロファージを破骨細胞へ分化誘導し、MC3T3-E1細胞を ascorbic acid および β -glycerophosphate によって、成熟骨芽細胞へ分化誘導した。

(2) 糖転移酵素ノックアウトマウスを用いて骨表現解析と遺伝子解析

骨芽細胞や破骨細胞(破骨細胞前駆細胞を含む)に発現している糖脂質が、骨代謝に関しているのかを明らかにするため、15週齢雄の Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウス(Gb4 が欠損しているマウス)および15週齢と40週齢の GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウス(b系列ガングリオシドが欠損しているマウス)を用いて、骨表現型および遺伝子レベルでの解析を行った。解析項目は以下のとおりである。

マイクロCTによる大腿骨の骨量測定

カルセインを用いた二重標識による骨形成能の評価

大腿骨海綿骨表面における骨芽細胞の計数(HE染色)

大腿骨海面骨表面における破骨細胞の計数(TRAP染色)

リアルタイムPCRによる骨組織における骨芽細胞分化関連遺伝子(Runx2、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン)および破骨細胞分化関連遺伝子(Nfatc1、Trap)の発現レベルの解析

4. 研究成果

(1) 骨芽細胞および破骨細胞(破骨細胞前駆細胞を含む)における糖脂質の発現プロファイル

骨芽細胞(マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1細胞)では、a系列ガングリオシド(モノシアルリル糖脂質)GM1、GD1aおよびグロボ系糖脂質 Gb4 の発現が認められた。また、MC3T3-E1細胞を成熟な骨芽細胞への分化誘導させた結果、GM1 および GD1a の発現の低下が認められた。一方、破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ(マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 およびマウス骨髄細胞由来のマクロファージ)では、骨芽細胞にも発現していた GM1、GD1a の他に b 系列ガングリオシド(ジシアルリル糖脂質)GD3、GD2、GD1b、GT1b の発現も認められた。しかし、これらの発現は RANKL 添加による破骨細胞への分化誘導後には、減弱もしくは消失した。

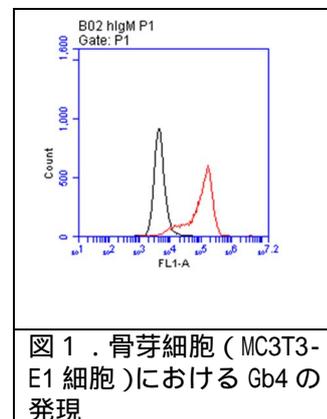


図1. 骨芽細胞(MC3T3-E1細胞)におけるGb4の発現

(2) 骨芽細胞で発現するグロボ系糖脂質 Gb4 の骨代謝への関与

骨芽細胞で発現が認められた Gb4 が骨代謝を制御しているのかを明らかにするため、Gb4 を含めたグロボ系糖脂質が欠損している Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いて以下の実験を行った。

Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスにおける骨表現型をマイクロCTを用いて解析した(図2A)。その結果、Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、

大腿骨における骨量 (BV/TV)、骨梁数 (Tb.N) の減少および骨梁間隙 (Tb.Sp) の増大が認められた。

骨形成能を評価するため、大腿骨におけるカルセインを用いた二重標識を行った (図 2 B)。その結果、Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは、野生型マウスと比較して、骨石灰化面 (MS/BS)、骨石灰化速度 (MAR)、および骨形成速度 (BFR) の有意な低下が認められた。

大腿骨の海綿骨における骨芽細胞数を HE 染色を用いて計数した。その結果、Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは、野生型マウスより、骨芽細胞数の減少が認められた。

骨組織から抽出した mRNA を用いて、骨芽細胞分化関連遺伝子 (Runx2、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン) の発現レベルを検討した結果、これらのすべての mRNA の発現は、Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスで有意に低下した (図 2 C)。

骨吸収能を評価するため、大腿骨海綿骨における破骨細胞数を TRAP 染色を用いて計数した。その結果、Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスとの間では、差は認められなかった。

骨組織から抽出した mRNA を用いて、破骨細胞分化関連遺伝子 (Nfatc1、Trap) の発現レベルを検討した結果、Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスと野生型マウスとの間では、差は認められなかった。

(3) 破骨細胞前駆細胞であるマクロファージで発現する b 系列ガングリオシドの骨代謝への関与

破骨細胞前駆細胞で発現が認められた b 系列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ため、b 系列ガングリオシドが欠損している GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスを用いて、以下の実験を行った。

GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスにおける骨表現型をマイクロ CT を用いて解析した。その結果、15 週齢の野生型マウスと GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの間では、骨量に有意な差が認められなかったが、40 週齢の GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスでは、加齢に伴う骨量の減少が野生型マウスと比較して、有意に抑制された (図 3 A)。

15 週齢および 40 週齢マウス大腿骨の海綿骨における骨芽細胞数を HE 染色を用いて計数した。その結果、野生型マウスと GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの間では、骨芽細胞数に差は認められなかった。

骨吸収能を評価するため、大腿

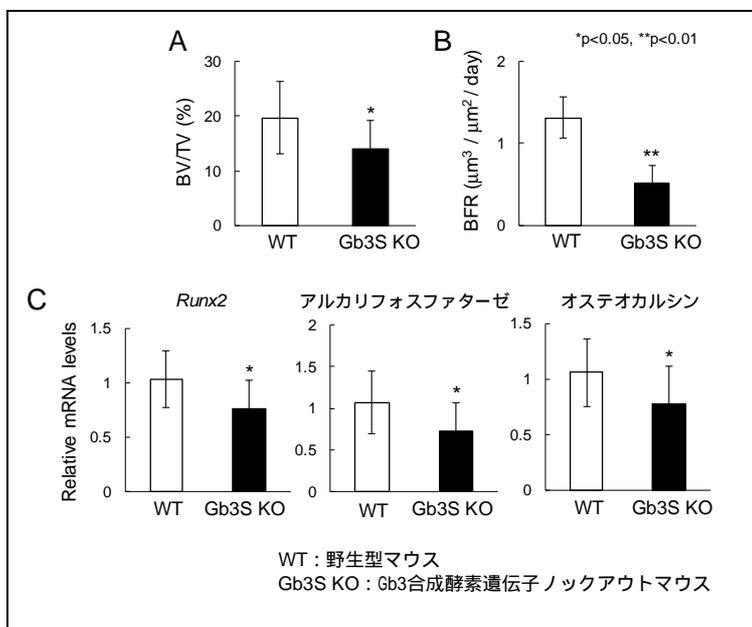


図 2 . Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウス (Gb3 欠損マウス) では骨形成が抑制される。

A : マイクロ CT による大腿骨の骨量解析

B : カルセインを用いた二重標識による骨形成の評価

C : 骨組織における骨芽細胞分化関連遺伝子の発現レベル

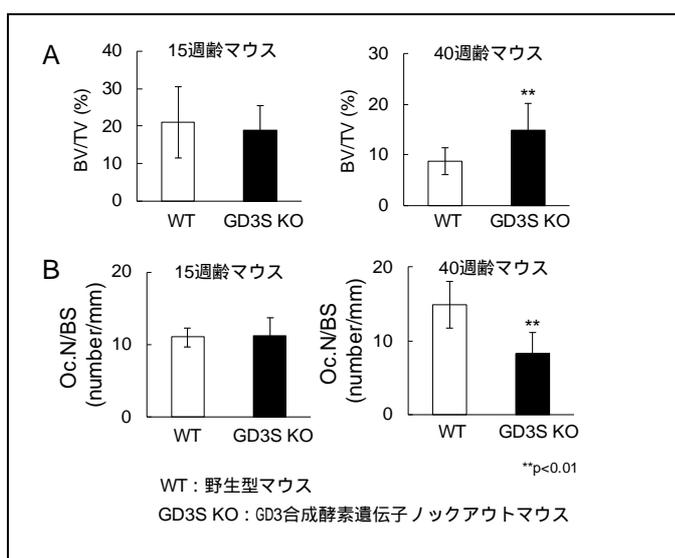


図 3 . GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウス (b 系列ガングリオシド欠損マウス) では加齢に伴う骨吸収が抑制される。

A : マイクロ CT による大腿骨の骨量解析

B : 大腿骨海綿骨における破骨細胞数

骨海綿骨における破骨細胞数を TRAP 染色を用いて計数した。その結果、15 週齢の野生型マウスと GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスの間では、破骨細胞数に差は認められなかったが、40 週齢では、GD3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスにおける破骨細胞数が野生型マウスと比較して、減少していた (図 3 B)。

以上の結果より、グロボ系糖脂質や b 系列ガングリオシドが、骨芽細胞や破骨細胞 (破骨細胞前駆細胞を含む) に発現していることが明らかになった。グロボ系糖脂質は、骨芽細胞に発現し、骨形成に重要な役割を果たしていることが示された。また、b 系列ガングリオシドの欠損が破骨細胞数を減少させることで骨吸収を減弱させ、加齢に伴う骨量の減少を抑制することが示された。このことにより、糖脂質の発現制御や Gb4 などの糖脂質の骨への添加によるアプローチが、新規骨再生治療へ有効である可能性が示唆された。

本研究成果として、b 系列ガングリオシドの欠損が破骨細胞数を減少させ、加齢に伴う骨量の減少を抑制することを明らかにした原著論文と、グロボ系糖脂質の欠損が骨芽細胞数を減少させ、骨形成を抑制することを明らかにした原著論文の 2 件を国際雑誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Hamamura Kazunori, Hamajima Kosuke, Yo Shoyoku, Mishima Yoshitaka, Furukawa Koichi, Uchikawa Makoto, Kondo Yuji, Mori Hironori, Kondo Hisataka, Tanaka Kenjiro, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Togari Akifumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Deletion of Gb3 Synthase in Mice Resulted in the Attenuation of Bone Formation via Decrease in Osteoblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4619 ~ 4619
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20184619	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yo Shoyoku, Hamamura Kazunori, Mishima Yoshitaka, Hamajima Kosuke, Mori Hironori, Furukawa Koichi, Kondo Hisataka, Tanaka Kenjiro, Sato Takuma, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Togari Akifumi	4. 巻 20
2. 論文標題 Deficiency of GD3 Synthase in Mice Resulting in the Attenuation of Bone Loss with Aging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2825 ~ 2825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20112825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hamajima Kosuke, Hamamura Kazunori, Chen Andy, Yokota Hiroki, Mori Hironori, Yo Shoyoku, Kondo Hisataka, Tanaka Kenjiro, Ishizuka Kyoko, Kodama Daisuke, Hirai Takao, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Togari Akifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppression of osteoclastogenesis via 2-adrenergic receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 407 ~ 416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2018.1075	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 浜村和紀、浜島康祐、三島好貴、古川鋼一、宮澤健、後藤滋巳、戸苅彰史
2. 発表標題 Globo-series glycosphingolipids deficiency in mice resulted in the attenuation of bone formation through decrease of osteoblasts
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楊承諭、浜村和紀、三島好貴、佐藤琢麻、宮澤健、戸苅彰史、後藤滋巳
2. 発表標題 GD3合成酵素欠損マウスでは、破骨細胞数の減少によって骨吸収が軽減する
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楊承諭、浜村和紀、三島好貴、佐藤琢麻、宮澤健、戸苅彰史、後藤滋巳
2. 発表標題 b系列ガングリオシドは加齢に伴う骨量の減少に関与する
3. 学会等名 第61回近畿東海矯正歯科学会学術大会・総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 楊承諭、浜村和紀、三島好貴、佐藤琢麻、宮澤健、戸苅彰史、後藤滋巳
2. 発表標題 ガングリオシドGD3合成酵素欠損マウスでは、加齢に伴う骨量の減少が抑制される
3. 学会等名 第94回愛知学院大学歯学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜村和紀、楊承諭、古川鋼一、宮澤健、後藤滋巳、戸苅彰史
2. 発表標題 b-series gangliosides deficiency in mice resulted in the prevention of age-related bone loss
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森寛典、浜村和紀、三島好貴、宮澤健、後藤滋巳、戸苅彰史
2. 発表標題 歯髄組織の培養上清は骨芽細胞の分化を抑制する
3. 学会等名 第39回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浜島康祐、浜村和紀、森寛典、楊承諭、宮澤健、戸苅彰史、後藤滋巳
2. 発表標題 2アドレナリン受容体シグナルが破骨細胞分化を制御する
3. 学会等名 第77回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazunori Hamamura, Nancy Tanjung, Andy Chen, Hiroki Yokota, Akifumi Togari
2. 発表標題 Inhibition of de-phosphorylation of eIF2 suppresses osteoclastogenesis via upregulation of Zfyve21 and Ddit4
3. 学会等名 18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浜村和紀、古川鋼一、戸苅彰史
2. 発表標題 糖鎖と癌
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森寛典、浜村和紀、楊承諭、浜島康祐、宮澤健、本田雅規、後藤滋巳、戸苅彰史
2. 発表標題 歯髄は破骨細胞前駆細胞の接着能低下を介して破骨細胞形成を抑制する
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 浜島 康祐、浜村 和紀、Andy Chen、横田 博樹、森 寛典、楊 承諭、宮澤 健、後藤 滋巳、戸苅 彰史
2. 発表標題 2アドレナリン受容体を介した破骨細胞分化抑制
3. 学会等名 第38回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森 寛典、浜村 和紀、楊 承諭、浜島 康祐、戸苅 彰史、後藤 滋巳
2. 発表標題 ラット歯髄組織由来の培養上清は破骨細胞形成を抑制する
3. 学会等名 第76回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森 寛典、浜村 和紀、楊 承諭、浜島 康祐、石塚 恭子、大谷 憲司、本田 雅規、後藤 滋巳、戸苅 彰史
2. 発表標題 ラット歯髄組織由来の培養上清はマクロファージの増殖抑制により破骨細胞数を減少させる
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	戸苅 彰史 (TOGARU Akifumi) (80126325)	愛知学院大学・歯学部・教授 (33902)	
研究分担者	近藤 久貴 (KONDO Hisataka) (40469002)	愛知学院大学・歯学部・講師 (33902)	