

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21659346

研究課題名（和文） 糖鎖生物学的アプローチによる骨吸収制御機構の解明

研究課題名（英文） Elucidating the bone resorption mechanism using a glycobiological approach

研究代表者

岩崎 倫政 (IWASAKI NORIMASA)

北海道大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：30322803

研究成果の概要（和文）：破骨細胞およびその前駆細胞に発現する N 型糖鎖およびスフィンゴ糖脂質の発現プロファイルを明らかにした。分化に伴って発現が増加する 6 種類の N 型シアリル糖鎖を同定したが、その生理的機能を明らかにすることはできなかった。代表的なスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドについては、過去に報告のある GM3 の発現はほとんどなく、GD1 が主体であった。ガングリオシド生合成酵素を欠損する 3 種類のマウスの細胞を解析した結果、GD1 ガングリオシドが破骨前駆細胞の増殖を負に制御することがわかった。

研究成果の概要（英文）：We established expression profiles of N-linked glycans and glycosphingolipids during osteoclastogenesis. Among glycosphingolipids expressed on osteoclasts and these precursor cells, we identified GD1/ganglioside as a negative regulator of proliferation of osteoclast precursor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	0	1,800,000
2010 年度	600,000	0	600,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	180,000	3,180,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨吸収・破骨細胞・糖鎖・ガングリオシド・脂質ラフト

## 1. 研究開始当初の背景

生体内における蛋白や脂質の大部分は何らかの“翻訳後修飾”を受けているが、このうち糖鎖修飾は、もっとも一般的な翻訳後修飾のひとつである。糖鎖は、蛋白や脂質分子の立体構造維持や機能発現、それ自身のリガンドとしての作用により、さまざまな生命現象に関与することがわかってきたが、骨代謝制御機構における機能についてはまだほ

とんどわかっていない。

これまでの研究によって、破骨細胞における高マンノース型糖鎖とマンノースレセプターの相互作用 (Morishima et al. J Endocrinol 2003) や細胞膜ガングリオシドの RANK signal 伝達調節 (Iwamoto et al. J Biol Chem 2001, Ha et al. J Biol Chem 2003)、そしてわれわれが明らかにしたシアリル糖鎖と細胞融合の関連 (Takahata

et al. Bone 2007) などがわずかに報告されているが、糖鎖の詳細な構造や作用メカニズムは未解明のままである。

これは、糖鎖の構造的多様性や複雑な生合成・分解経路、修飾分子の同定の困難さなどに起因すると考えられる。しかし、近年、生化学的な糖鎖解析技術が目覚ましい進歩を遂げるとともに、糖鎖修飾を制御する糖転移酵素遺伝子が多数発見、クローニングされたことにより、糖鎖生物学的研究は新たな局面を迎えている。このような最新の糖鎖機能解析技術を用いて、糖鎖を介した骨代謝制御機構が明らかになれば、あらたな病態解明や、診断技術、治療法の開発が期待できる。

## 2. 研究の目的

グライコミクスや糖転移酵素遺伝子組み換えなど最新の糖鎖生物学的研究手法を用いて、骨吸収を担う破骨細胞の分化、活性化機構に関する糖鎖や糖鎖修飾の意義を明らかにし、骨代謝性疾患や骨破壊性疾患の病態解明や診断、治療への礎とする。

## 3. 研究の方法

(1) 破骨細胞および前駆細胞に発現する糖鎖の網羅的解析: マウス骨髄由来マクロファージや RAW264.7 マウスマクロファージ細胞株から M-CSF, RANKL を用いて破骨細胞を誘導し、各分化段階の細胞を解析に用いた。

「Glycoblotting 法」をもとにしたハイスループットグライコム解析技術を用いて、上記細胞に含まれる N 型糖鎖の網羅的解析を行った。糖鎖の構造解析には MALDI-TOFMS と LC-ESI/SSI-TOFMS を用いた。また、スフィンゴ糖脂質の発現についても質量分析装置を用いて半定量的に評価した。

(2) 破骨細胞分化における脂質ラフトの機能解析: 糖脂質からなるラフトの機能に着目し、Methyl beta Cyclodextrin (MBCD) による脂質ラフト形成阻害による破骨細胞分化、活性化への影響を調査した。MBCD による脂質ラフトの破壊は GM1 と結合するコレラトキシンを用いた。

(3) ガングリオシド欠損マウスの骨表現型解析: 代表的なスフィンゴ糖脂質であるガングリオシドの破骨細胞分化、活性化における機能を調査するために、GM3 合成酵素, GD3 合成酵素, GalNacT 遺伝子を全身性に欠損する 3 種類のマウスについて骨表現形の解析とそれらの動物由来の破骨前駆細胞の増殖、分化能を調査した。

## 4. 研究成果

(1) 破骨細胞および前駆細胞に発現する糖鎖の網羅的解析: N 結合型糖鎖については、高マンノース型糖鎖と 14 種類のシアリル糖鎖の推定構造を決定した。

同定された高マンノース型糖鎖は、破骨細胞分化に関与することがすでに報告されていること、これまでの研究においてシアリル糖鎖が破骨細胞分化において重要な役割を果たしていることが示唆されていることから、シアリル糖鎖についてさらに詳細な検討を行った。RANKL 刺激により、シアリル糖鎖のうち 6 種類が増加、3 種類が新たに発現、1 種類が消失することがわかった。シアル酸転移酵素群のうち N 結合型糖鎖にシアル酸を付加する ST6Gal1, ST3Gal3, ST3GalIV 遺伝子発現が、RANKL 刺激により上昇する事実ともほぼ合致する現象と考えられ、消失した糖鎖は、なんらかのタンパクの分解消失などを反映するものと推測された。

新たに出現したシアリル糖鎖については、今後、骨吸収マーカーとして利用できる可能性がある。つぎにシアリル糖鎖が付加するタンパクを明らかにするためにシアリル糖鎖認識タンパク (レクチン) を用いてシアリル糖鎖付加タンパクの同定を試みた。細胞から可溶化させたタンパクをレクチン沈降にて回収し、2 次元電気泳動にて分離した。質量分析装置を用いて数種類のタンパクを同定したが、破骨細胞分化や機能に関連するものは同定できなかった。

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については、破骨細胞および前駆細胞において過去に報告のある GM3 の発現はほとんど観察されず、GD1 が主体と考えられた。

(2) ラフト形成阻害による破骨前駆細胞の増殖、分化、活性化への影響: 破骨細胞分化において、さまざまな受容体タンパクやアダプター分子が脂質ラフトへ集積することが報告されていることから、Methyl beta Cyclodextrin (MBCD) による脂質ラフト形成阻害の影響を調査したところ、破骨細胞への分化能に変化は生じなかったが、前駆細胞の増殖が亢進した。

このことから脂質ラフトは破骨前駆細胞の増殖を負に制御している可能性が示唆された。

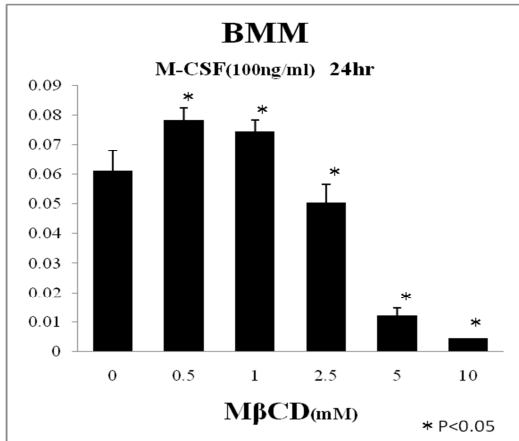


図 1. 脂質ラフト阻害による破骨前駆細胞の増殖性. 骨髄マクロファージ (BMM, 破骨前駆細胞) の増殖能を BrdU assay にて調査した. MβCD を 2.5mM 以上で投与すると増殖性が低下したが, これは細胞毒性による細胞死のためであった. 細胞の生存に影響を与えない 1mM までの濃度で投与した場合, 細胞の増殖性は有意に亢進した.

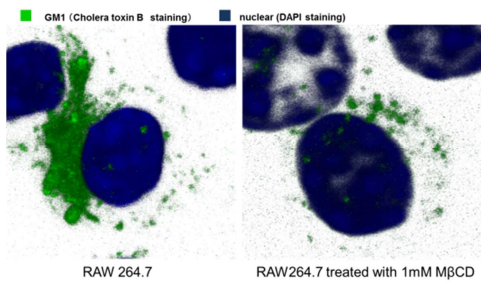


図 2. MβCD による脂質ラフトの阻害を GM1 を認識結合する Cholera toxin で可視化した.

(3) ガングリオシド欠損マウスを用いた骨表現型解析: GM3 合成酵素, GD3 合成酵素, GalNacT 遺伝子欠損マウスについては, 骨形態学的には明らかな変化はなかった. しかし, 骨髄マクロファージを用いた in vitro 培養細胞実験では, GM3 合成酵素遺伝子欠損マウスの細胞のみ破骨細胞分化が抑制された. 一方, 破骨前駆細胞の増殖能は, GM3 合成酵素遺伝子欠損マウスの細胞では亢進したのに対し, GD3 合成酵素, GalNacT 遺伝子欠損マウスの細胞では抑制された. GM3 合成酵素遺伝子欠損マウスでは破骨前駆細胞および破骨細胞で発現する GD1 が欠損していることから, GD1 分子が破骨前駆細胞の増殖を負に制御し, 増殖から分化へのスイッチさせる機構に参与する可能性が示唆された.

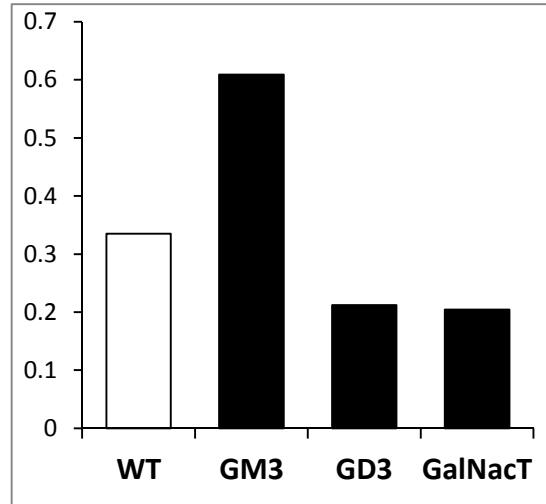


図 2. ガングリオシド発現パターンの変化により破骨前駆細胞の増殖性が変化する. ガングリオシド合成に関わる 4 種類の酵素遺伝子を欠損するマウスから採取した骨髄マクロファージ (破骨前駆細胞) を M-CSF 存在下に培養した際の細胞増殖能を WST-8 assay で評価した. GM3 ガングリオシド合成酵素を欠損した細胞では増殖性が亢進したのに対し, その下流の GD3 合成酵素, GalNacT を欠く細胞では, 増殖性が低下した.

#### 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)

[学会発表] (計 2 件)

- 小松幹, 高畑雅彦, 岩崎倫政. 免疫グロブリン様レクチン Siglec-15 は DAP12 を介した共刺激シグナルに関与し破骨細胞分化を制御する. 第 29 回日本骨代謝学会 (大阪市: 大阪国際会議場)
- Miki Komatsu, Masahiko Takahata, Norimasa Iwasaki. A Member of Sialic Acid-Binding Immunoglobulin-Like lectin 15 (Siglec-15) Associates with DAP12-mediated Costimulatory Signal in Osteoclastogenesis. The orthopaedic Research Society (ORS) annual meeting 2012. (米国: Moscone West Convention Center)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高畑 雅彦 (TAKAHATA MASAHIKO)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号：40374368  
(H21 代表者交代、H23 から分担者に追加)

岩崎 倫政 (IWASAKI NORIMASA)  
北海道大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号 30322803  
(H21～ 分担者→代表者)

### (2) 研究分担者

安倍 雄一郎 (ABE YUICHIROU)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：80547604  
(H22 分担者追加、H23 異動により削除)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：