

令和元年5月29日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11710

研究課題名(和文) スフィンゴミエリン合成酵素を標的とした口腔癌のリンパ節転移阻害機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of lymph node metastasis inhibition mechanism of oral cancer targeting sphingomyelin synthetase

研究代表者

松本 剛一 (MATSUMOTO, Goichi)

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60199867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴミエリンは細胞膜の重要な構成成分で、脂質マイクロドメインと呼ばれるコレステロールに富む領域を形成する。SMSが骨芽細胞の石灰化領域や骨細胞に発現することから、骨におけるSMSの機能を解析する目的で骨芽細胞特異的SMS1ノックアウトマウスを作製してSMSの役割を解析した。SMS1KOマウスはコントロールマウスと比較して体が小さく成長障害が認められた。骨の組織形態解析を行ったところ骨密度が低下していた。そのメカニズムを解析したところ、骨芽細胞のSMS1をノックアウトすることで骨芽細胞の石灰化が抑制されることを確認した。SMS1は骨芽細胞の石灰化に重要な役割を果たしている知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフィンゴミエリンは細胞膜の重要な構成成分で、脂質マイクロドメインと呼ばれるコレステロールに富む領域を形成する。脂質マイクロドメインには増殖因子受容体や細胞内シグナル伝達分子などが局在し様々な細胞生理活性に関与している。SMの合成を触媒するスフィンゴミエリン合成酵素にはSMS1とSMS2があるが、その生理的な機能については十分に解明されていない。本研究においてSMS1が骨芽細胞の分化に重要な役割を担い、SMS1が欠損していると、ヒトにおける骨粗しょう症と同様の症状を示すことを明らかにした。これはSMS1を標的とした骨粗しょう症に対する新たな治療戦略を提案できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the phenotype of a conditional knockout mouse, which was generated by mating a Sp7 promoter-driven Cre-expressing mouse with an SMS1-floxed SMS2-deficient mouse (Sp7-Cre;SMS1f/f;SMS2-/- mouse). When we compared control mice, we found that although cartilage formation is normal, Sp7-Cre;SMS1f/f;SMS2-/- mice showed reduced trabecular and cortical bone mass, had lower bone mineral density, and had a slower mineral apposition rate. We have used a tamoxifen-inducible knockout system in vitro to show that SMS1 plays an important role in osteoblast differentiation and mineralization. We cultured osteoblasts derived from SMS1-CreERT2;SMS2-/- mice. We observed impaired differentiation of these cells in response to Smad1/5/8 and p38 that were induced by BMP2. SMS1 acts as an endogenous signaling component necessary for bone formation.

研究分野：口腔外科学

キーワード：スフィンゴミエリン合成酵素 スフィンゴミエリン 骨粗しょう症 骨芽細胞 BMP2

## 1. 研究開始当初の背景

スフィンゴミエリン(SM)は細胞膜の重要な構成成分で、脂質マイクロドメインと呼ばれるコレステロールに富む領域を形成する。細胞膜は均一な構造ではなく、それぞれの部位が機能性を有した独立した構造を有しており、細胞外からの様々な刺激に対して応答し、細胞内に正確にシグナル伝達を行う必要があると考えられている。脂質マイクロドメインは増殖因子受容体や細胞内シグナル伝達分子などが局在した脂質ラフトと呼ばれ、細胞増殖、分化、生死などの様々な細胞生理活性に関与している。このような機能を持つ脂質マイクロドメインの形成に関わる主要な脂質であるスフィンゴ脂質は、セラミド (Cer) にホスホコリンが結合した SM と糖鎖が結合した糖脂質である。Cer と SM はスフィンゴミエリン合成酵素(SMS)とスフィンゴミエリン分解酵素により平衡が保たれている。SM には SMS1 と SMS2 があり、SMS1 はゴルジ体に、SMS2 はゴルジ体と細胞膜に局在するが、その生理的な機能については十分に解明されていない。SMS は骨芽細胞の石灰化領域や骨細胞に発現することから、骨格形成における SMS の機能を解析する目的で SMS1 あるいは SMS2 ノックアウトマウスは作製されたが、SMS1 ノックアウトマウスは体格的に小柄で、生後半年以内にほとんどのマウスは死亡し、生存した雄マウスは不妊であった。一方、SMS2 ノックアウトマウスは骨格的な異常はみられず生存率も野生型と差異はなかった。これらのノックアウトマウスの表現型から、SMS2 は骨格形成への関与は低いと考えられたが、SMS1 は骨格形成に重要な役割を果たしている可能性があると考えられた。しかしながら SMS1 ノックアウトマウスは短命であることから十分な解析がなされていなかった。

## 2. 研究の目的

骨芽細胞特異的に SMS1 をノックアウトした SP7 (Osterix)-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウスを作製し、マウスの表現型の解析を行い、骨芽細胞における SMS1 の機能の解明を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスの作製

SMS1-flox マウスと SMS2<sup>-/-</sup>を交配して SMS1<sup>f/f</sup>;SMS2<sup>-/-</sup>マウスを作製した。次に SMS1<sup>f/f</sup>;SMS2<sup>-/-</sup>マウスに SP7-Cre トランスジェニックマウスを交配させることによって、骨芽細胞特異的 SMS1 欠損 (全身性 SMS2 欠損) マウス (SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウス) を作製した。コントロールは、C57BL/6 と SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウスを用いた。本研究における動物実験は、金沢医科大学動物実験委員会の承認のうえ実施された。

### (2) マウス骨格標本の作製

胎生 15.5 日目と新生児マウスを 100%エタノールに固定後、Alizarin Red S と Alcian blue 8GX の混合液に浸漬して骨および軟骨組織の染色を行った後、1% KOH 溶液に浸漬して軟部組織を溶解させて骨格標本を作製した。

### (3) $\mu$ CT 撮影

15 週齢のマウスを安楽死させた後、大腿骨を摘出し 100%エタノールに固定した後、大腿骨遠位端骨端部の  $\mu$  CT 撮影を行った。

### (4) 組織・形態学的解析

15 週齢のマウスを安楽死させた後、大腿骨を摘出し 4%パラホルムアルデヒド溶液に 24 時間浸漬した後、10% EDTA 溶液で脱灰した。大腿骨をパラフィンに包埋し 5  $\mu$  m の薄切切片を作製し、hematoxylin and eosin (H&E) 染色を行った。また非脱灰切片を作製し von Kossa 染色を行った。骨形成能の解析は、蛍光色素であるカルセ

イン溶液 (16 mg·kg<sup>-1</sup>) の腹腔内投与 (3 日間の投与間隔で 2 回) を行った。その後大腿骨を摘出して非脱灰標本を作製して蛍光顕微鏡にて観察した。

#### (4) 遺伝子発現解析

4 週齢のマウスを安楽死させた後、頭蓋骨を採取した。頭蓋骨から Total RNA を抽出し、cDNA を調整後、定量的 RT-PCR 法を用いて骨芽細胞分化に関連した骨基質タンパク質の遺伝子発現について解析を行った。

#### (5) 骨芽細胞の分離培養

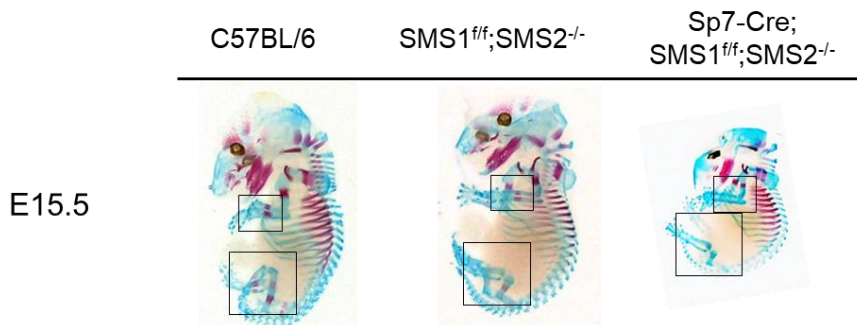
SMS1-CreER;SMS2<sup>-/-</sup>新生児マウスを安楽死させて頭蓋骨を採取した。採取した頭蓋骨を酵素処理して骨芽細胞を採取して骨芽細胞の培養を行った。SMS1-CreER;SMS2<sup>-/-</sup>から調整した骨芽細胞を 4-hydroxy tamoxifen (4-OHT) で処理することで、in vitro において SMS1 を不活化することが可能であることから、本研究では、この方法を用いて骨芽細胞の分化について解析を行った。

- ① 細胞増殖活性の測定
- ② アルカリフォスファターゼ活性
- ③ オステオカルシン産生
- ④ 石灰化能測定
- ⑤ BMP-2 刺激による P38 および smad1/5/8 のリン酸化測定

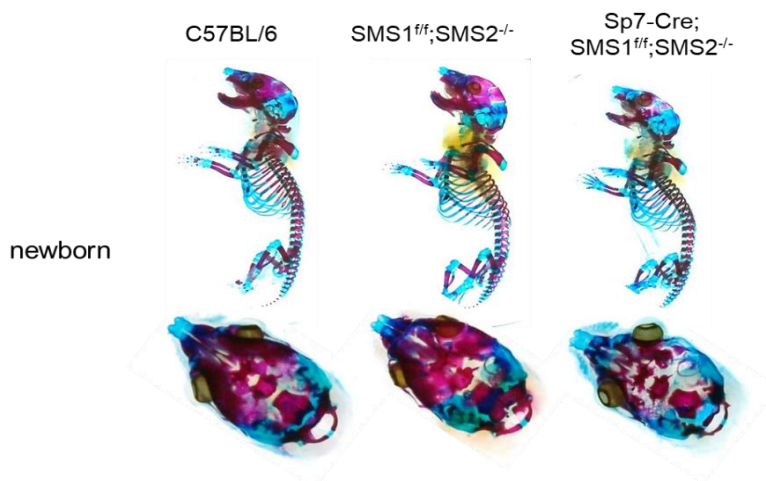
### 4. 研究成果

(1) SP7-Cre; SMS1<sup>fl/fl</sup>; SMS2<sup>-/-</sup>マウスは骨の石灰化遅延を認めた。

**胎生 15.5 週齢のマウス** SP7-Cre; SMS1<sup>fl/fl</sup>; SMS2<sup>-/-</sup>マウスはコントロールと比較して小柄で、頭蓋骨および四肢骨の石灰化が遅延していた (下図)。



**新生児マウス** 出生時には四肢骨の石灰化はコントロールと同様にみられるが、頭蓋骨の石灰化は十分ではなかった (下図)。



(2) SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウスは骨粗しょう症を発症した。

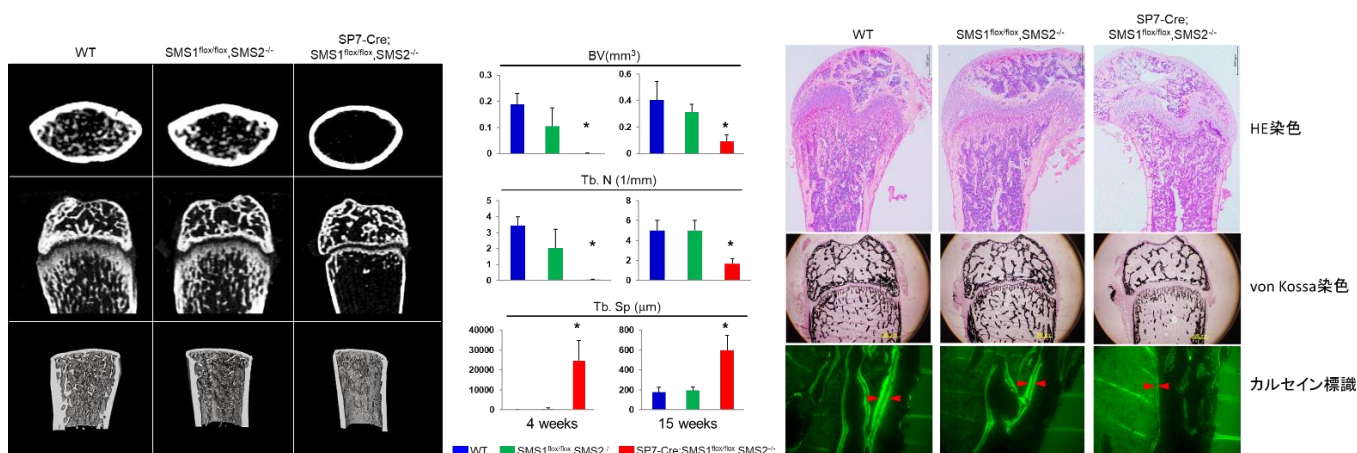
SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウス大腿骨の皮質骨は薄く、内部の海綿骨も粗造であった。

15 週齢マウス大腿骨の遠位端骨端部の  $\mu$  CT 写真を下図左に示した。

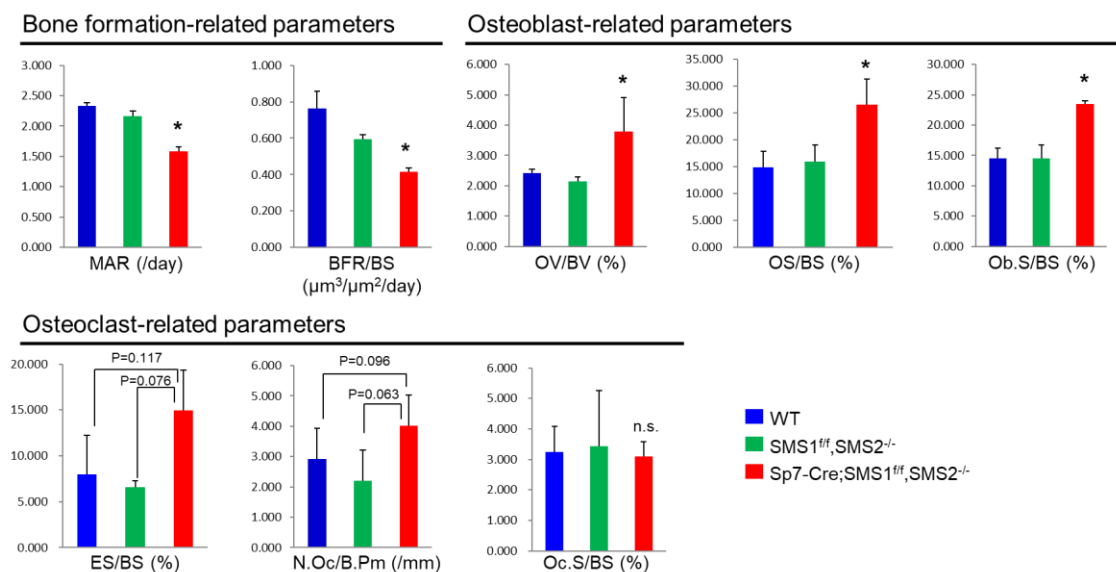
また  $\mu$  CT から海綿骨の状態を定量化したグラフを下図中央に示した。BV (骨量) および Tb.N (海綿骨数) は SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウスにおいては有意に低下し、Tb.Sp (海綿骨間隔) は有意に増加していた。次に HE 染色、von Kossa 染色およびカルセイン 2 重標識の結果を下図右に示した。

HE 染色および von Kossa 染色では海綿骨における石灰化した骨量の著しい減少が認められた。

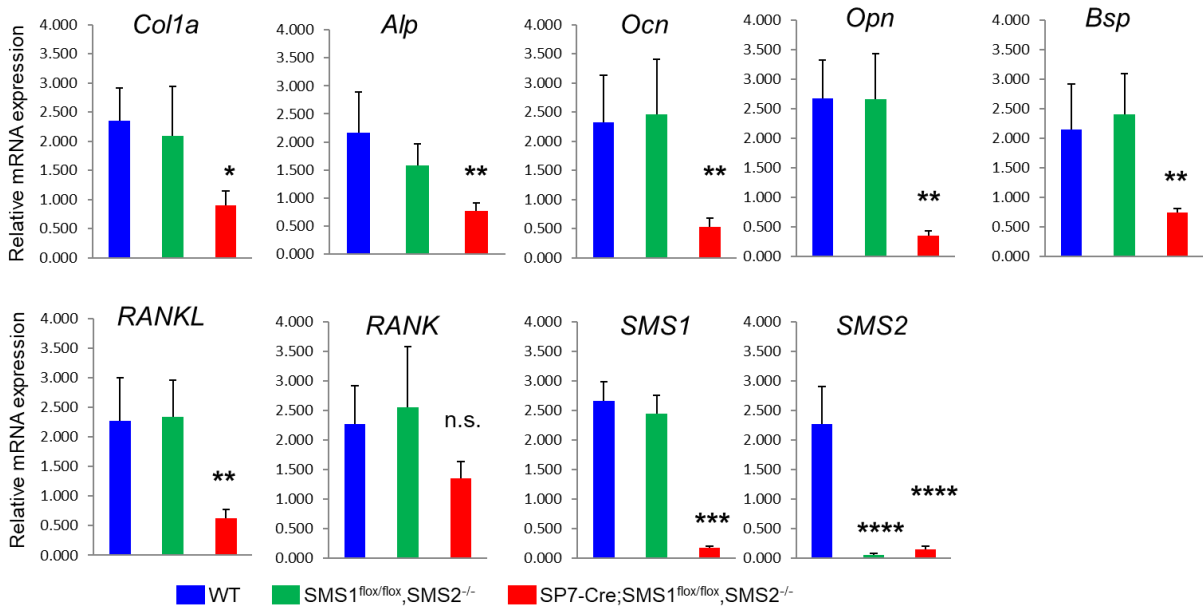
またカルセイン 2 重標識による骨形成能は、コントロールに比較して成長した海綿骨幅が著しく狭いことから、骨形成能の低下が示唆された。以上より、SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウスは骨形成能および石灰化能低下がみられ、骨粗しょう症と類似の所見が認められた。



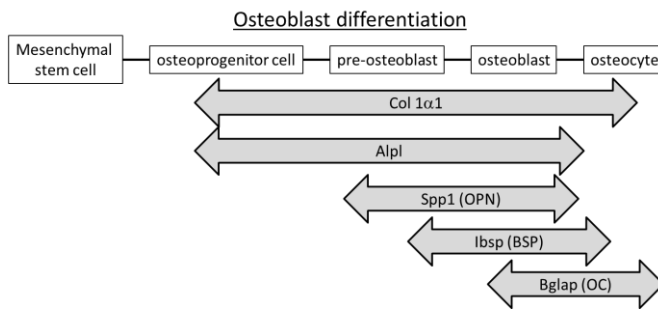
骨形態計測の結果を下図に示す。SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウスは、破骨細胞関連パラメーターにはコントロールと有意差な変化はみられないが、骨形成関連および骨芽細胞関連パラメーターに有意な変化を認めた。



(3) SP7-Cre; SMS1<sup>f1o/f1o</sup>, SMS2<sup>-/-</sup>マウス頭蓋骨は骨芽細胞分化に関連した遺伝子 (骨基質タンパク質遺伝子) の発現が著しく低下していた (下図)。

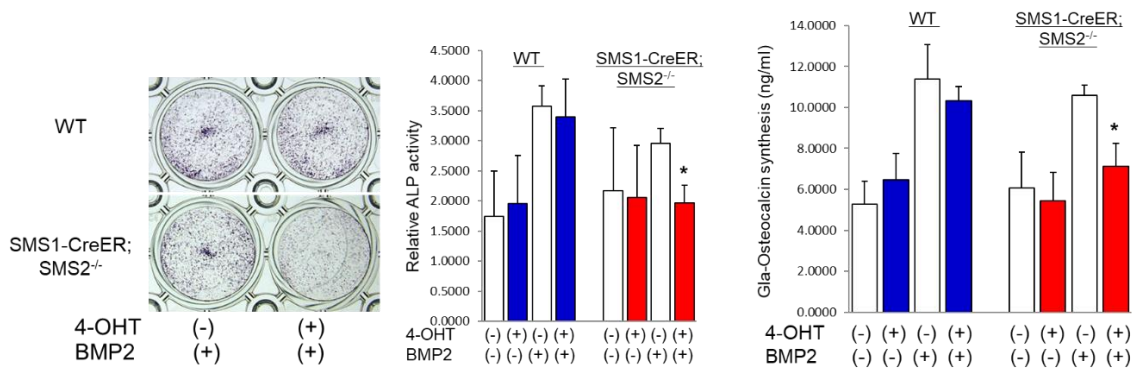


Col1a: 1型コラーゲン、Alp:アルカリフォスファターゼ、Ocn:オステオカルシン、Opn:オステオポンチン、Bsp:ボーンシアロプロテイン

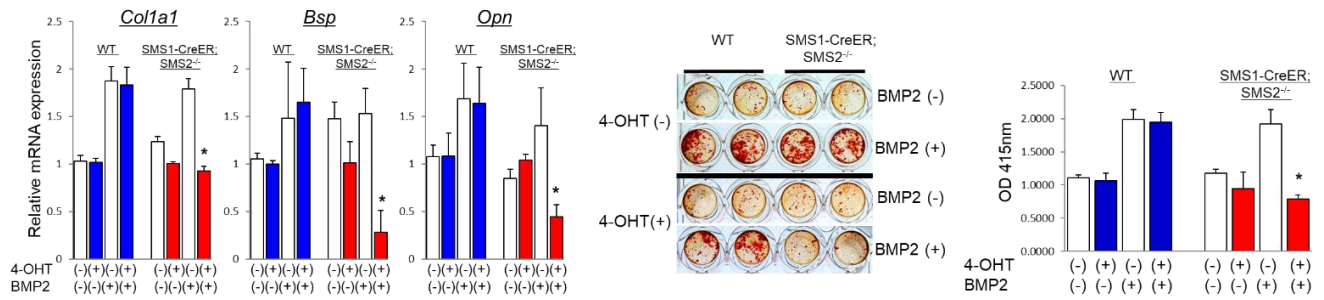


骨芽細胞分化における各種骨基質タンパク質の発現時期

(4) SMS1を欠損した骨芽細胞はBMP-2による分化(石灰化)誘導応答が著しく低下していた(下図)。

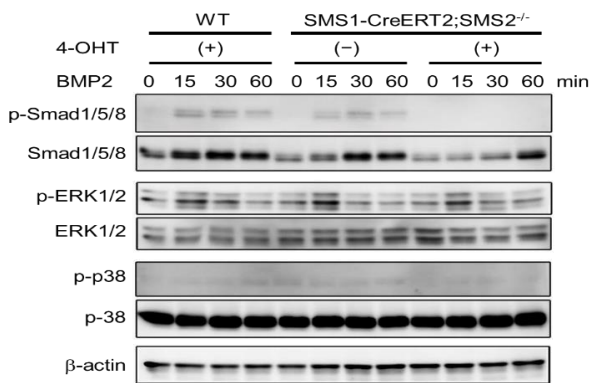


左: ALP染色 中: ALP活性 右: オステオカルシンの産生能



左：骨基質タンパク質の遺伝子発現、中：骨芽細胞の石灰化、右：石灰化の定量

(5) SMS1 欠損骨芽細胞は BMP-2 刺激による smad1/5/8 および P38 のリン酸化が抑制されていた (下図)。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Matsumoto G, Sugita Y, Kubo K, Yoshida W, Maeda H, Aizawa M, Shimodaira S, Kinoshita Y. Evaluation of gelatin-hybridized chelate-setting calcium phosphate cements in alveolar bone defects of canine mandible. *Biomed J Sci &Tech Res*. 10.26717/BJSTR.2018.03.000931, (2018) (査読有)
- (2) Tamura T, Yokoya S, Kamata Y, Kinoshita Y, Tabata Y, Matsumoto G. Periodontal regeneration using gelatin hydrogels incorporating basic fibroblast growth factor. *Biomed J Sci &Tech Res*. 10.26717/BJSTR.2018.04.001025, (2018) (査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- (1) 松本剛一、木下 勲彦. スフィンゴミエリン合成酵素による骨芽細胞の分化制御に関する研究. 第 71 回日本口腔科学会学術集会. 2017 年 (松山)