

令和 5 年 5 月 6 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09899

研究課題名(和文) スフィンゴ糖脂質による骨芽細胞の増殖・分化制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of proliferation and differentiation in osteoblasts by glycosphingolipids

研究代表者

浜村 和紀 (HAMAMURA, Kazunori)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：00422767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞ではスフィンゴ糖脂質GD1aやGb4(グロボシド)は発現しており、それらの糖脂質が欠損したマウス由来の骨芽細胞では、増殖が抑制されることを明らかにした。また、グルコシルセラミド合成酵素阻害によるスフィンゴ糖脂質の生合成の抑制により、骨芽細胞の増殖が抑制されることも明らかにした。そのスフィンゴ糖脂質による骨芽細胞増殖の分子メカニズムとして、angiopoietin-like 6 (Angpt16) が関与していることを明らかにした。さらに、GD1aが欠損したマウスでは、骨形成の抑制されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スフィンゴ糖脂質が骨芽細胞に発現しているという報告はあったが、それらの糖脂質が、骨芽細胞の増殖に及ぼす影響、さらには、そのメカニズムについてはほとんど明らかになっていなかった。本研究において、骨芽細胞に発現するスフィンゴ糖脂質がその増殖を制御していることを細胞および個体レベルで明らかにし、そのメカニズムも解明した点で学術的に意義がある。また、本研究により、今後、スフィンゴ糖脂質を標的とすることにより、骨形成促進を促すような治療法の開発の一助となる可能性がある点でも社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)： We demonstrated glycosphingolipids GD1a and Gb4 (globoside) were expressed in osteoblasts, and the proliferation was suppressed in the osteoblasts derived from their glycolipids-deficient mice. Suppression of biosynthesis of glycosphingolipids by inhibition of glucosylceramide synthase resulted in the attenuation of the osteoblast's proliferation. As the molecular mechanisms, angiopoietin-like 6 (Angpt16) is involved in the osteoblast's proliferation by the glycosphingolipids. Furthermore, we demonstrated the bone formation was suppressed in the mice lacking GD1a.

研究分野：薬理学

キーワード：スフィンゴ糖脂質 骨芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞膜上に存在するスフィンゴ糖脂質が、癌、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されてきた。私たちは、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、癌の悪性形質を正負に制御することを示してきた。

しかし、骨代謝にスフィンゴ糖脂質が関与しているのかについては、ほとんど検討されていなかった。そこで、私たちは、骨芽細胞におけるスフィンゴ糖脂質の発現プロファイルを検討し、以前から発現の報告があったモノシアリルスフィンゴ糖脂質 GD1a の他に、新たにグロボ系スフィンゴ糖脂質 Gb4 が発現していることを明らかにした。この Gb4 が欠損した 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、骨量が低下することが明らかになり、この骨量低下は、骨形成の低下によるものであることを示した。つまり、骨代謝機構の調節において、スフィンゴ糖脂質が関与していることが明らかになってきた。

スフィンゴ糖脂質が骨芽細胞に発現し、骨形成を促進させることが明らかになってきたが、骨芽細胞増殖促進による骨芽細胞数の増加によるものなのか、それとも、未熟な骨芽細胞から成熟な骨芽細胞への分化促進によるものなのかは不明である。また、スフィンゴ糖脂質がどのようなメカニズムで、骨芽細胞増殖・分化を制御しているのかについても明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、スフィンゴ糖脂質が骨芽細胞の増殖、分化のどちらに関与しているのか、また、その分子メカニズムを明らかにし、スフィンゴ糖脂質による新規骨再生治療への応用に向けた基礎的基盤を構築することである。

3. 研究の方法

(1) フローサイトメトリーによる骨芽細胞におけるスフィンゴ糖脂質の発現

抗スフィンゴ糖脂質抗体 (GM3、GM2、GM1、GD1a、GD3、GD2、GD1b、GT1b、Gb4) を用いて、骨芽細胞におけるスフィンゴ糖脂質の発現を測定した。

(2) グルコシルセラミド合成酵素 (GCS) 阻害剤を添加した骨芽細胞株 (MC3T3-E1) の RNA を用いたマイクロアレイ解析

3種類の GCS 阻害剤 (Miglustat、D-PDMP、D-PPMP) を添加した MC3T3-E1 細胞および無添加群 (コントロール) の細胞より RNA を分離し、マイクロアレイ解析を実施した。

(3) 糖転移酵素遺伝子ノックアウトマウス由来の骨芽細胞の増殖の測定

GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスおよび Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスより分離された骨髄細胞を骨芽細胞へ分化誘導し、BrdU assay により骨芽細胞の増殖能を測定した。

(4) GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスにおける骨表現型の解析

microCT による大腿骨の骨量測定

大腿骨海綿骨表面における骨芽細胞の計数 (HE 染色)

大腿骨海綿骨表面における破骨細胞の計数 (TRAP 染色)

カルセイン二重標識を用いた骨形成能の評価

4. 研究成果

(1) グルコシルセラミド合成酵素 (GCS) 阻害による骨芽細胞増殖抑制とそのメカニズム

スフィンゴ糖脂質 GD1a や Gb4 (グロボシド) は、未熟な骨芽細胞では発現し、成熟な骨芽細胞では、その発現が低下することが判明した。このことは、これらの糖脂質が、未熟な骨芽細胞の増殖に関与し、成熟な骨芽細胞へ分化する過程で、これらの糖脂質の発現が低下することで、増殖が抑制され、その結果、分化の方向に進むことを示す可能性がある。そこで、このことを明らかにするため、これらの糖脂質の合成に必須である GCS を阻害し、骨芽細胞の増殖能への影響を検討した。未熟なマウス骨芽細胞株である MC3T3-E1 細胞に、GCS 阻害剤 (Miglustat、D-PDMP、D-PPMP) を添加した結果、GD1a および Gb4 の発現の低下が認められた。また、これらの糖脂質の発現が低下した細胞では、増殖能の抑制が認められた。そこで、GCS の発現により制御を受ける遺伝子を同定するため、MC3T3-E1 細胞を用いて、無添加群 (コントロール) Miglustat 添加群、D-PDMP 添加群、および D-PPMP 添加群の 4 群に分け、マイクロアレイによる網羅的解析を実施した。その結果、無添加群に対して、3種類の阻害剤すべてで、発現が低下する遺伝子として、9個 (Fndc1、Acta2、Igfbp5、Cox6a2、Cth、Mymk、Angpt16、Mab2112、Igsf10) (図1) 発現が上昇する遺伝子として、10個 (Mtg2、Nr4a1、Mapre2、Ahcy11、Exoc6b、Traf6、Anxa3、Egr1、Egr2、Egr3) 検出された¹⁾。

マイクロアレイによる網羅的解析の結果、3種類の GCS 阻害剤すべてで、発現が低下する9個の中で、Fndc1、Igfbp5、Cox6a2、Cth、Angpt16 は、qPCR によっても同様に発現の低下が認められた。また、Fndc1、Cox6a、Cth、Angpt16 の発現は、成熟な骨芽細胞への分化誘導に伴い低下し

た。この発現パターンは、GCS 遺伝子 Ugcg、GD1a、Gb4 の発現パターンと類似していた。そこで、これら 4 つの遺伝子をそれぞれ siRNA でノックダウンして、骨芽細胞増殖への関与を検討した。

その結果、Angpt16 をノックダウンした時のみ、骨芽細胞の増殖が抑制された¹⁾。以上の結果より、GCS が Angpt16 を介して骨芽細胞の増殖を制御している可能性が示唆された。

(2) GM2/GD2 合成酵素遺伝子あるいは Gb3 合成酵素遺伝子欠損による骨芽細胞増殖への影響

GD1a が欠損している GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスおよび、Gb4 が欠損している Gb3 合成酵素遺伝子ノックアウトマウスより分離された骨髄細胞を骨芽細胞へ分化誘導して、BrdU assay による骨芽細胞の増殖能を検討した。その結果、野生型マウス由来の骨芽細胞と比較して、それらのノックアウトマウス由来の骨芽細胞では、その増殖能が抑制されることが明らかになった。以上の結果より、GCS 阻害を用いた GD1a や Gb4 の発現抑制による骨芽細胞増殖抑制と同様に、それらの糖脂質がノックアウトされた骨芽細胞でも増殖が抑制されることが示された。

(3) GM2/GD2 合成酵素遺伝子による骨形成への影響とスフィンゴ糖脂質の発現パターンの変化

GM2/GD2 合成酵素遺伝子ノックアウト (GM2/GD2S KO) マウスより分離された骨髄細胞を骨芽細胞へ分化誘導した結果、その細胞の増殖能は、野生型マウス由来の細胞より低下することが示されたので、GM2/GD2S KO マウスにおける骨代謝への影響を検討した。まず、microCT を用いて、骨量を解析した結果、野生型マウスと GM2/GD2S KO マウスの間で、有意な差は認められなかった。次に、骨形成能を評価するために、大腿骨海綿骨における組織学的解析を行った。その結果、大腿骨海綿骨における骨芽細胞数が、野生型マウスと比較して、GM2/GD2S KO マウスで有意に減少していた(図 2)²⁾。また、カルセイン

二重標識を用いた解析により、GM2/GD2S KO マウスで骨形成能の低下が認められた(図 3)²⁾。一方、野生型マウスと GM2/GD2S KO マウスの間で、骨吸収能に有意な差は認められなかった。

次に、GM2/GD2S KO による骨芽細胞におけるスフィンゴ糖脂質の発現パターンの変化を検討した。その結果、野生型マウス由来の骨芽細胞では、GM3 および GD1a の発現が認められた(図 4A)。一方、GM2/GD2S KO マウス由来の骨芽細胞では、GD1a の発現の消失および GM3 の発現の上昇が認め

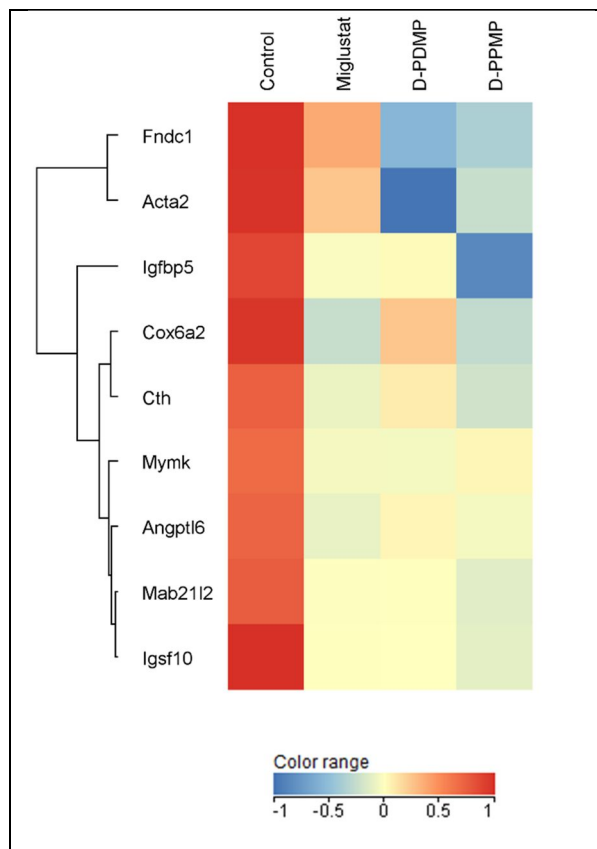


図 1 . 3 種類の GCS 阻害剤すべてで、発現が低下する遺伝子 (マイクロアレイデータを用いたヒートマップ解析)

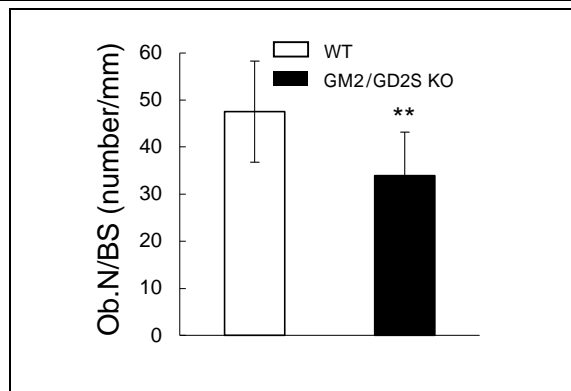


図 2 . 大腿骨海綿骨表面における骨芽細胞数

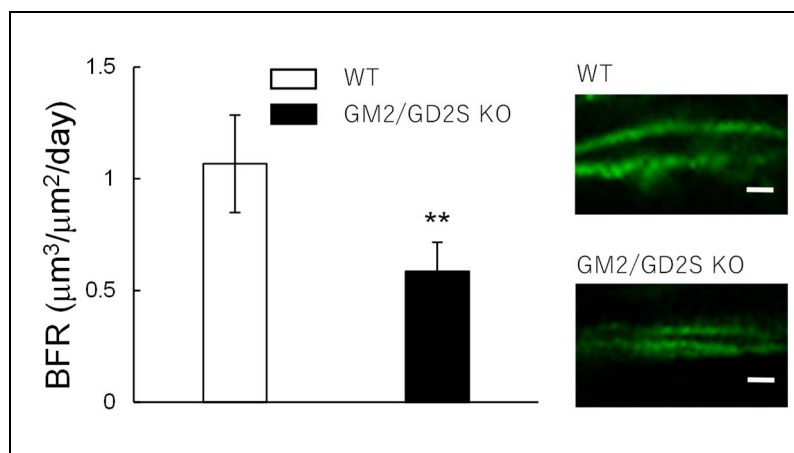


図 3 . カルセインを用いた二重標識による骨形成の評価
BFR: 骨形成速度、WT: 野生型マウス、GM2/GD2S KO: GM2/GD2S KO マウス

られた(図4B)²⁾。本研究において、GM2/GD2Sが欠損した骨芽細胞では増殖が抑制され、その結果、骨形成の低下が認められた。しかし、この骨芽細胞の増殖の抑制がGD1aの消失によるものなのか、また、GM3の発現上昇によるものか不明であり、今後検討が必要である。

以上の結果より、スフィンゴ糖脂質の発現の変化が、骨芽細胞の増殖に影響を与えることが明らかになり、スフィンゴ糖脂質を標的とすることで、骨形成を促進させることができる可能性が示唆された。

本研究成果として、骨芽細胞に発現するスフィンゴ糖脂質がAngpt16を介して、その細胞の増殖を制御していることを明らかにした原著論文と、骨芽細胞に発現しているGM2/GD2合成酵素が、骨形成を制御していることを明らかにした原著論文を国際雑誌に発表した。

引用文献

- 1) Mishima Y., Hamamura K., et al.: Contribution of glucosylceramide synthase to the proliferation of mouse osteoblasts. *In Vivo* 35, 3111-3123, 2021.
- 2) Sasaki E., Hamamura K. et al.: Attenuation of bone formation through a decrease in osteoblasts in mutant mice lacking the GM2/GD2 synthase gene. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 9044, 2022.

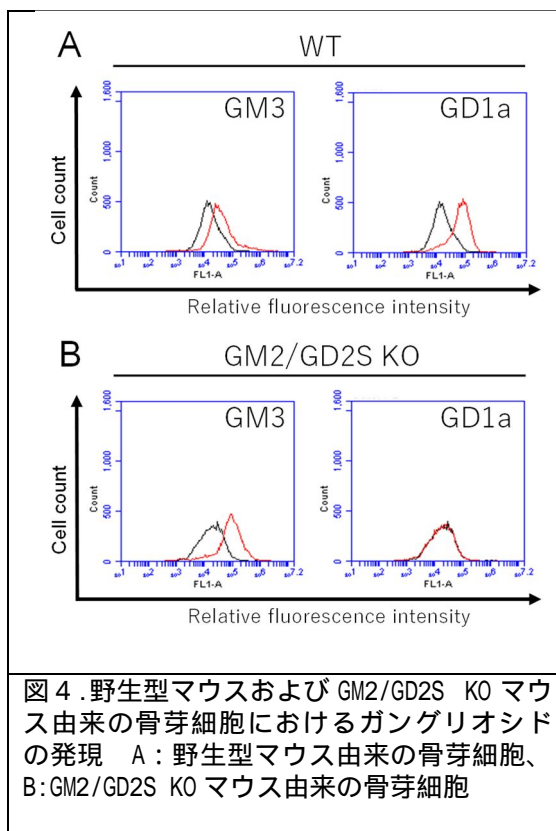


図4. 野生型マウスおよびGM2/GD2S KO マウス由来の骨芽細胞におけるガングリオシドの発現 A: 野生型マウス由来の骨芽細胞、B: GM2/GD2S KO マウス由来の骨芽細胞

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sasaki Eri, Hamamura Kazunori, Mishima Yoshitaka, Furukawa Koichi, Nagao Mayu, Kato Hanami, Hamajima Kosuke, Sato Takuma, Miyazawa Ken, Goto Shigemi, Togari Akifumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Attenuation of Bone Formation through a Decrease in Osteoblasts in Mutant Mice Lacking the GM2/GD2 Synthase Gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9044 ~ 9044
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23169044	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 Furukawa Koichi, Ohmi Yuhsuke, Hamamura Kazunori, Kondo Yuji, Ohkawa Yuki, Kaneko Kei, Hashimoto Noboru, Yesmin Farhana, Bhuiyan Robiul H., Tajima Orié, Furukawa Keiko	4. 巻 39
2. 論文標題 Signaling domains of cancer-associated glycolipids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconjugate Journal	6. 最初と最後の頁 145 ~ 155
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10719-022-10051-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yesmin Farhana, Bhuiyan Robiul H., Ohmi Yuhsuke, Yamamoto Satoko, Kaneko Kei, Ohkawa Yuki, Zhang Pu, Hamamura Kazunori, Cheung Nai-Kong V., Kotani Norihiro, Honke Koichi, Okajima Tetsuya, Kambe Mariko, Tajima Orié, Furukawa Keiko, Furukawa Koichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Ganglioside GD2 Enhances the Malignant Phenotypes of Melanoma Cells by Cooperating with Integrins	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 423 ~ 423
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010423	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 MISHIMA YOSHITAKA, HAMAMURA KAZUNORI, KATO HANAMI, FURUKAWA KOICHI, TASHIMA YUKO, OKAJIMA TETSUYA, KONDO HISATAKA, SATO TAKUMA, MIYAZAWA KEN, GOTO SHIGEMI, TOGARI AKIFUMI	4. 巻 35
2. 論文標題 Contribution of Glucosylceramide Synthase to the Proliferation of Mouse Osteoblasts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 3111 ~ 3123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12606	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 Muramatsu Ryujiro, Sato Takuma, Hamamura Kazunori, Miyazawa Ken, Takeguchi Atsushi, Tabuchi Masako, Togari Akifumi, Goto Shigemi	4. 巻 147
2. 論文標題 Guanabenz inhibits alveolar bone resorption in a rat model of periodontitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 294 ~ 304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2021.08.003	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 Kimura Fumika, Miyazawa Ken, Hamamura Kazunori, Tabuchi Masako, Sato Takuma, Asano Yuichiro, Kako Shunsuke, Aoki Yuki, Sugita Yoshihiko, Maeda Hatsuhiko, Togari Akifumi, Goto Shigemi	4. 巻 284
2. 論文標題 Suppression of alveolar bone resorption by salubrinal in a mouse model of periodontal disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 119938 ~ 119938
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lfs.2021.119938	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 HOTTA HIROSHI, HAMAMURA KAZUNORI, SHIBUYA HIDENOBU, OHMI YUHSUKE, FURUKAWA KEIKO, FURUKAWA KOICHI	4. 巻 41
2. 論文標題 Lewis y Expressed in Oral Squamous Cell Carcinoma Attenuates Malignant Properties via Down-regulation of EGF Signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1821 ~ 1830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14948	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐々木恵理、三島好貴、加藤花観、佐藤琢麻、宮澤健、後藤滋巳、濱村和紀
2. 発表標題 GM2/GD2合成酵素遺伝子欠損による骨形成の抑制
3. 学会等名 第58回日本口腔組織培養学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木恵理、瀧村和紀、三島好貴、加藤花観、佐藤琢麻、宮澤健、後藤滋巳
2. 発表標題 GM2/GD2合成酵素遺伝子欠損による骨代謝への影響
3. 学会等名 第81回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤花観、佐藤琢麻、宮澤健、後藤滋巳、瀧村和紀
2. 発表標題 グロボシド (Gb4) は骨芽細胞の増殖に関与する
3. 学会等名 第42回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長尾麻由、佐々木恵理、三島好貴、佐藤琢麻、宮澤健、後藤滋巳、瀧村和紀
2. 発表標題 ガングリオシドの発現パターンは骨芽細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第42回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木恵理、三島好貴、佐藤琢麻、宮澤健、後藤滋巳、瀧村和紀
2. 発表標題 GM2/GD2合成酵素遺伝子欠損マウスでは骨形成が低下する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島好貴、瀧村和紀
2. 発表標題 グルコシルセラミド合成酵素がAngpt16を介してマウス骨芽細胞の増殖を調節する
3. 学会等名 第30回硬組織再生生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島好貴、瀧村和紀
2. 発表標題 グルコシルセラミド合成酵素はマウス骨芽細胞増殖促進に関与する
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀧村和紀
2. 発表標題 肝代謝に関わる薬物相互作用のメカニズム
3. 学会等名 第31回日本有病者歯科医療学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三島 好貴、浜村 和紀、加藤 花観、佐藤 琢麻、宮澤 健、戸苅 彰史、後藤 滋巳
2. 発表標題 スフィンゴ糖脂質はマウス骨芽細胞増殖を促進する
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村松 隆二郎、佐藤 琢麻、竹口 敦士、宮澤 健、浜村 和紀、戸苅 彰史、後藤 滋巳
2. 発表標題 実験的歯周病モデルラットに対するGuanabenzの効果
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村 文香、宮澤 健、田淵 雅子、浅野 雄一郎、加古 駿輔、青木 勇樹、浜村 和紀、佐藤 琢麻、戸苅 彰史、前田 初彦、後藤 滋巳
2. 発表標題 歯周病モデルマウスに対するeIF2 脱リン酸化阻害剤 (salubrinal) の効果
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三島 好貴、浜村 和紀、加藤 花観、佐藤 琢麻、宮澤 健、後藤 滋巳、戸苅 彰史
2. 発表標題 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関与
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会 (併催 第41回日本歯科薬物療法学会学術大会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浜村 和紀、三島 好貴、宮澤 健、後藤 滋巳、戸苅 彰史
2. 発表標題 グロバ系列スフィンゴ糖脂質による骨代謝制御
3. 学会等名 第40回日本歯科薬物療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜村 和紀、三島 好貴、宮澤 健、後藤 滋巳、戸苅 彰史
2. 発表標題 グロバ系スフィンゴ糖脂質による骨形成の制御
3. 学会等名 第74回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020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)	

	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
研究協力者	三島 好貴 (MISHIMA Yoshitaka)		
研究協力者	佐々木 恵理 (SASAKI Eri)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------