

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659661

研究課題名(和文)ノックアウトマウスを用いたスフィンゴ糖脂質による骨・軟骨代謝調節機構の解明

研究課題名(英文)Functional analysis of glycosphingolipids in osteochondral homeostasis using knockout mice

研究代表者

岩崎 倫政(Iwasaki, Norimasa)

北海道大学・医学(系)研究科(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) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞膜上のシグナル伝達において重要な役割を果たすスフィンゴ糖脂質(以下、GSLs)の骨、軟骨における機能的役割を明らかにした。4系統のGSLs合成酵素遺伝子ノックアウト(KO)マウスでは、明らかな発育障害を認めなかったが、加齢に伴い有意に軟骨変性が進行した。KOマウス由来の軟骨細胞はIL-1刺激に対しMMP-13の発現やアポトーシスが亢進した。KOマウスの骨折治癒過程では内軟骨性骨化の遷延化を認めた。これらの結果より、GSLsは骨・軟骨組織の形成・発育には影響を及ぼさないが、加齢や疾患を引き起こす外部からの刺激に対しては、細胞の保護的機能を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glycosphingolipids (GSLs) are ubiquitous membrane components that modulate transmembrane signaling and mediate cell-to-cell and cell-to-matrix interactions. The purpose of this study was to clarify the functional roles of GSLs in maintaining osteochondral homeostasis using different strains of GSLs synthase knockout (KO) mice. Although all strains of KO mice developed and grew normally, osteoarthritic changes were dramatically enhanced with aging. IL-1 stimulation of chondrocytes from KO mice significantly increased MMP-13 mRNA expression and apoptosis. In addition, KO mice delayed enchondral ossification during fracture repair process. These findings indicate that GSLs have a chondro-/osteoprotective role and prevent disease progression, although GSLs are not essential for osteochondral tissue development in young mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨・軟骨代謝学 スフィンゴ糖脂質 ガングリオシド 遺伝子改変マウス

1. 研究開始当初の背景

細胞膜に存在するスフィンゴ糖脂質(以下、GSLs)は糖鎖とセラミドより構成される機能的複合糖質であり、効率的にシグナル伝達を行うためのラフト(rafts)と呼ばれる微小領域を細胞膜上に形成することで増殖、分化、活性化等の細胞機能を調節している。運動器におけるGSLsの機能は不明であるが、GSLsのなかでも主要な分子であるガングリオシドの蓄積により著明な骨格異常が生じることから、ガングリオシドを中心としたGSLsが骨・軟骨組織の発達や機能・形態維持において重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。しかし、運動器細胞におけるGSLsの機能的役割は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1)骨、軟骨の形成や機能・形態維持におけるGSLsの機能解析、(2)マウス骨、軟骨病態モデルにおけるGSLsの機能的役割の解明、の2項目である。

3. 研究の方法

主要なGSLs関連合成酵素遺伝子ノックアウト(KO)マウスおよびその細胞を用いて骨、軟骨におけるGSLsの生理的機能や病態への関与を明らかにする。

(1)生体レベルにおけるGSLs機能の解明:系統の異なる主要なGSLs合成酵素KOマウスについて骨格成長、骨・軟骨の形態的・機能的異常の有無、および病態モデル(骨折治癒過程および変形性関節症の進行)を評価し、骨、軟骨におけるGSLsの役割を検討する。

(2)GSLsによる細胞機能制御メカニズムの解明:野生型マウスの骨芽細胞や軟骨細胞におけるGSLsの発現プロファイルを作製し、炎症性サイトカインなどの外的刺激でそれらがどのように変化するか調査する。次に、遺伝子改変マウスの細胞を用いて、外的刺激に対する細胞の反応性(分化や細胞増殖、MMP

産生、アポトーシスなど)を解析し、これらの刺激伝達において重要なGSLsの種類とその作用メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

4系統のGSLs関連合成酵素KOマウスでは明らかな発育・成長障害を認めなかったが、加齢に伴い有意な軟骨変性の進行が認められた。KOマウス由来の軟骨細胞はIL-1に対する反応性が上昇しており、これに伴いMMP-13の発現やアポトーシスが亢進した。長管骨の骨折モデルではKOマウスにおいて治癒過程での内軟骨性骨化の遷延化を認めた。これらの結果より、ガングリオシドをはじめとするGSLsは骨・軟骨組織の形成や発育には影響を及ぼさないことが明らかとなった。しかし、加齢や疾患を引き起こす外部からの刺激に対しては、細胞の保護的機能を有することが示唆された。

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)

[雑誌論文](計 3 件)

Sasazawa F, Onodera T, Yamashita T, Seito N, Tsukuda Y, Fujitani N, Shinohara Y, Iwasaki N, Depletion of gangliosides enhances cartilage degradation in mice, Osteoarthritis Cartilage 査読有, 22,2014,pp313-322

DOI: 10.1016/j.joca.2013.11.015

Tsukuda Y, Iwasaki N, Seito N, Kanayama M, Fujitani N, Shinohara Y, Kasahara K, Onodera T, Suzuki K, Asano T, Minami A, Yamashita T, Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis, PLoS One 査読有, 7,2012,e40136.

DOI:10.1371/journal.pone.0040136

Seito N, Yamashita T, Tsukuda Y, Matsui Y, Urita A, Onodera T, Mizutani T, Haga H, Fujitani N, Shinohara Y, Minami A, Iwasaki N, Interruption of glycosphingolipid synthesis enhances osteoarthritis development in mice, *Arthritis Rheum.* 査読有, 64, 2012, pp. 2579-2588, DOI:10.1002/art.34463

[学会発表](計 12 件)

60th ORS annual meeting(2014.3.15-18, New Orleans, LA, USA)

“Depletion of Gangliosides Enhances Cartilage Degradation through the Upregulation of Chondrocyte Apoptosis and Matrix Degrading Enzyme Expression”

Sasazawa F, Onodera T, Yamashita T, Fujitani N, Shinohara Y, Iwasaki N

60th ORS annual meeting(2014.3.15-18, New Orleans, LA, USA)

“Lack of GD3 Synthase Enhances Cartilage Degradation in Murine Osteoarthritis Models in Vitro”

Momma D, Onodera T, Matsuoka M, Sasazawa F, Iwasaki N

第 27 回日本軟骨代謝学会(2014.2.28-3.1, 京都)

スフィンゴ糖脂質の欠損は変形性関節症の進行を助長する

清藤直樹、山下匡、佃幸憲、松井雄一郎、瓜田淳、小野寺智洋、藤谷直樹、篠原康郎、三浪明男、岩崎倫政

第 27 回日本軟骨代謝学会(2014.2.28-3.1., 京都)

ガングリオシド欠損はマトリックス分解酵素発現の亢進を介して OA 進行を助長する

笹沢史生、小野寺智洋、山下匡、藤谷直

樹、篠原康郎、岩崎倫政

第 126 回北海道整形災害外科学会(2014.2.1-2, 札幌)

GD3 合成酵素の欠損は変形性関節症を助長する

門間太輔、小野寺智洋、笹沢史生、松岡正剛、岩崎倫政

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会(2013.10.17-18, 千葉)

ガングリオシド欠損は軟骨細胞アポトーシスや基質分解酵素発現亢進を介して変形性関節症を進行させる

笹沢史生、小野寺智洋、山下匡、岩崎倫政

2013 ORS Annual Meeting(2013.1.26-29, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, TX, USA)

“Delection of Gangliosides Enhances Cartilage Degradation in Murine of Osteoarthritis.”

Sasazawa F, Onodera T, Yamashita T, Fujitani N, Shinohara Y, Iwasaki N

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26-27, 名古屋)

ガングリオシド GM3 は関節リウマチの発症、進行において重要な役割を担う

佃幸憲、岩崎倫政、清藤直樹、金山剛士、藤谷直樹、篠原康郎、笠原靖彦、小野寺智洋、浅野毅、三浪明男、山下匡

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26-27, 名古屋)

スフィンゴ糖脂質の欠損は変形性関節症の進行を助長する

清藤直樹、山下匡、佃幸憲、松井雄一郎、瓜田淳、小野寺智洋、藤谷直樹、篠原康郎、三浪明男、岩崎倫政

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会(2012.10.26-27, 名古屋)

軟骨細胞におけるガングリオシドの欠損はマウス変形性関節症の進行を助長する

笹沢史生、岩崎倫政、山下匡、清藤直樹、小野寺智洋、佃幸憲、三浪明男
Gordon Research Conferences (2012.4.22-27, Ciocco Resort, Italy)
“Interruption of glycosphingolipid and ganglioside synthesis enhances osteoarthritis development in mice”
Sasazawa F, Iwasaki N, Yamashita T, Seito N, Onodera T, Minami A
Gordon Research Conferences (2012.4.22-27, Ciocco Resort, Italy)
“Ganglioside GM3 has an essential role in the pathogenesis and progression of rheumatoid arthritis”
Tsukuda Y, Iwasaki N, Seito N, Kanayama M, Fujitani N, Shinohara Y, Kasahara Y, Minami A, Yamashita T

小野寺 智洋 (ONODERA Tomohiro)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：70547174

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 倫政 (IWASAKI Norimasa)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30322803

(2) 研究分担者

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