

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06797

研究課題名(和文) GDF5を標的とした変形性関節症モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Development of mouse models of osteoarthritis targeting the Gdf5 gene

研究代表者

古市 達哉 (Furuichi, Tatsuya)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30392103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Gdf5遺伝子にミスセンス変異(W408R)を持つM451マウスの肘関節では、早発性に変形性関節症(OA)様の病変が生じることが報告されているが、M451マウスのOAモデル動物としての詳細な評価は実施されてこなかった。我々は、W408R変異をC57BL/6またはSTR/ortマウスに導入したコンジェニック系統を作製した。C57BL/6コンジェニックでは、再現よく肘関節にOA様の病変が確認できた。STR/ortコンジェニックにおけるOA様病変は、STR/ortよりも強い傾向にあった。これらのコンジェニック系統は、新規のOAモデル動物の開発のために有用であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The GDF5 gene is reported to be associated with osteoarthritis (OA) in mice and humans. M451 mouse strain, which possesses the missense mutation (W408R) in Gdf5, develops an early-onset osteoarthritis (OA) of the elbow joint. However, detailed evaluation of M451 strain as OA model animals has not been carried out. We generated congenic mouse strains in which W408R mutation was introduced into the genetic background C57BL/6 or STR/ort. We confirmed the duplicability of an early-onset OA in the C57BL/6 congenic strain. Articular cartilage lesion in the STR/ort congenic strain seemed more severe than that in STR/ort. These two congenic strains are useful to develop novel OA model animals.

研究分野：実験動物学

キーワード：変形性関節症 モデル動物 GDF5 コンジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (Osteoarthritis : OA) は変性、摩耗により関節軟骨が消失し、関節に痛みや腫れが生じる疾患である。厚生労働省の調査では、自覚症状のある OA 患者は全国で約 1,000 万人いると推定されており、OA は最も頻度の高い関節疾患でありながら、基礎研究や創薬研究では関節リウマチや骨粗鬆症などと比べて、大きく遅れている。その一因として、多くの研究者が利用できる適切なモデル動物の不足が挙げられる。

GDF5 (Growth differentiation factor 5) はヒトとマウスの両方で OA の発症との関連が報告されている。我々は ENU ミュータジェネシスの手法によって、*Gdf5* にミスセンス変異である W408R (408 番目のトリプトファンからアルギニンに変換) を持つマウス (M451 マウス) を同定し、W408R 変異のホモ接合マウスは早発性に OA 様の病態を示すことを報告した (Hum Mol Genet, 2007)。しかし、M451 マウスの関節における病変評価は、非近交系の遺伝背景で 8 週齢時の 1 ポイントでしか実施されておらず、OA モデル動物としての詳細な評価は実施されてこなかった。

一方、STR/ort マウスは自然発症 OA モデル動物であり、複数の OA の遺伝要因を持つことが示されているが、これらは未同定のままである。また STR/ort は OA の発症時期、病態についての個体差が大きいと報告されており、これらの欠点の改善が望まれている。

2. 研究の目的

(1) M451 マウスに同定された *Gdf5* の W408R 変異を C57BL/6 (B6) の遺伝背景に導入したコンジェニック (B6-W408R) マウスを作製し、関節病変を詳細に解析し、W408R 変異マウスの OA モデル動物としての有用性を明らかにする。軟骨細胞における GDF5 シグナルに対する W408R 変異の影響、GDF5 シグナル異常による OA 発症のメカニズムを明らかにする。

(2) W408R 変異を STR/ort の遺伝背景に導入したコンジェニック (STR/ort-W408R) マウスを作製し、病変の再現性に優れた OA モデル動物を作製する。

3. 研究の方法

(1) W408R ヘテロ接合マウスを用い、B6 マウスとの戻し交配を 10 世代行うことによって、B6 の遺伝背景に W408R 変異を導入したコンジェニック (B6-W408R) マウスを作製した。10 週齢の B6、B6-W408R (n=8) を安楽死させた後、前肢および後肢を摘出し、脱灰を行った。肘および膝関節のパラフィン切片を作製し、HE 染色、サフラニン O 染色をおこない、関節における OA 病態を評価した。

GDF5 の野生型及び W408R 変異型タンパク質を大腸菌の発現系で作製した。これらのタンパク質を前駆軟骨細胞株である ATDC5 に添加し、Smad、p38 のリン酸化に対する W408R 変異の影響をウエスタンブロット解析によって調べた。

(2) W408R ヘテロ接合マウスを用い、STR/ort マウスとの戻し交配を 10 世代行うことによって、STR/ort の遺伝背景に W408R 変異を導入したコンジェニック (STR/ort-W408R) マウスを作製した。10 週齢の STR/ort、STR/ort-W408R (n=3) を安楽死させた後、前肢および後肢を摘出し、脱灰を行った。肘および膝関節のパラフィン切片を作製し、HE 染色、サフラニン O 染色をおこない、関節における OA 病態を評価した。

4. 研究成果

(1) 10 週齢時の B6、及び B6-W408R (W408R のホモ接合体) の肘関節の病理解析の結果を図 1、表 1 に示す。B6-W408R に関節軟骨破壊、滑膜細胞増生といった OA 様の病変が確認され、この病変はオスよりもメスで強い傾向にあった。雌雄差・個体差はあるものの、B6 遺伝背景下で *Gdf5* の W408R ホモ接合変異は、OA 様の病変を再現よく引き起こすことが確認された。

GDF5 は主に Smad1/5/8 のリン酸化を介して細胞内シグナルを伝達する。また MAP キナーゼの 1 種である p38 のリン酸化を促進することも報告されている。GDF5 の野生型及び W408R 変異型タンパク質を前駆軟骨細胞株 ATDC5 に添加し、Smad、p38 のリン酸化にたいする影響をウエスタンブロット解析によって調べた (図 2)。ATDC5 を野生型 GDF5 で処理すると Smad1 および p38 のリン酸化は著明に亢進し、軟骨細胞分化マーカー遺伝子の発現は上昇した。これに対して W408R 変異体で処理した場合は Smad1 および p38 のリン

酸化は著しく抑制され、軟骨細胞マーカーの発現に変化はなかった。以上の結果から、W408R 変異体が Smad1/5/8 のリン酸化を阻害し、GDF5 のシグナル伝達を抑制していることが判明した。今後はマイクロアレイ解析によって、野生型と変異型 GDF5 処理細胞間で発現レベルの異なる遺伝子群を同定する。

(2) 10 週齢時の STR/ort、及び STR/ort-W408R の肘および膝関節について病理解析を行った。n=3 の予備的な結果であるが、STR/ort、STR/ort-W408R の両系統の肘および膝関節において、関節軟骨破壊、滑膜細胞増生といった OA 様の病態が確認され、STR/ort-W408R における病態の方が、STR/ort よりも強い傾向になった。今後は n 数を増やし、両系統における病変の違いを明らかにする。

Gdf5 の W408R 変異を B6 と STR/ort の遺伝背景に導入したコンジェニック系統を作製した。これらの系統は新しい OA モデル動物の開発に有用であると考えられる。

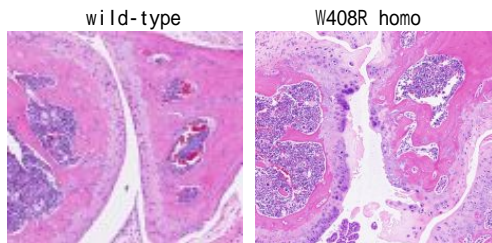


図1 10週齢時の肘関節組織切片のHE染色像

表 1 肘関節の病理解析結果

性別	病理変化	wild-type				W408R homo			
		-	+/-	+	++	-	+/-	+	++
オス	関節軟骨破壊	8				1	2	3	2
	滑膜細胞増生	8				3	5		
	関節腔拡張	8				5	3		
メス	関節軟骨破壊	8				3	2	3	
	滑膜細胞増生	8				8			
	関節腔拡張	8				4	3	1	

- : No remarkable change, +/- : minimum, + : moderate, ++ : Marked
数字はマウスの匹数を示す。

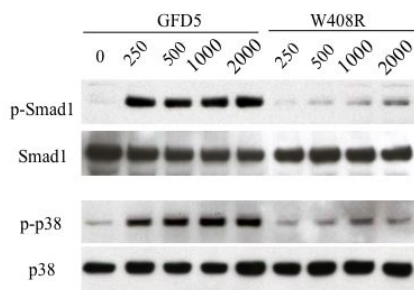


図2 ウェスタンブロット解析によるリン酸化Smad1、リン酸化p38の検出

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

(1) Sasaki S, Tsukamoto M, Saito M, Hojyo S, Fukada T, Takami M, and Furuichi T[#]. Disruption of the mouse *Slc39a14* gene encoding zinc transporter ZIP14 is associated with decreased bone mass, likely caused by enhanced bone resorption. FEBS Open Bio 8, 655–663 (2018) [#]corresponding author, 査読あり

(2) Ichimura S, Sasaki S, Murata T, Fukumura R, Gondo Y, Ikegawa S, and Furuichi T[#]. An ENU-induced p.C225S missense mutation in the mouse *Tgfb1* gene does not cause Camurati-Engelmann disease-like skeletal phenotypes. Exp Amin 66, 137-144 (2017) [#] corresponding author, 査読あり

(3) Moriishi T, Fukuyama R, Miyazaki T, Furuichi T, Ito M, and Komori T. Overexpression of BCLXL in osteoblasts inhibits osteoblast apoptosis and increases bone volume and strength with a normal bone structure. J Bone Miner Res 31, 1366-1380 (2016), 査読あり

(4) Kimura M, Ichimura S, Sasaki K, Masuya H, Suzuki T, Wakana S, Ikegawa S, and Furuichi T[#]. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis contributes to a skeletal dysplasia resembling platyspondylic lethal skeletal dysplasia, Torrance type, in a novel *Col2a1* mutant mouse line. Biochem Biophys Res Commun 468, 86-91 (2015) [#] corresponding author, 査読あり

[学会発表](計5件)

(1) 古市達哉. 遺伝子改変動物を用いて骨格形成メカニズムに迫る. 第27回東北動物実験研究会 (2016年12月9日、秋田)

- (2) 塚本愛美、佐藤有里子、福村龍太郎、権藤洋一、古市達哉。「四肢異常を伴う小眼球症」の新規モデルマウスの樹立と原因遺伝子の同定。第 159 回日本獣医学会 (2016 年 9 月 6 日～8 日、藤沢)
- (3) 木村允、市村鋭、榎谷啓志、鈴木智広、若菜茂晴、古市達哉。新規 *Col2a1* 変異マウスを用いたトーランス型扁平椎異形成症の病態機序の検討。(2016 年 5 月 18 日～20 日、川崎)
- (4) 木村允、市村鋭、榎谷啓志、鈴木智広、若菜茂晴、古市達哉。モデルマウスを用いたトーランス型扁平椎異形成症の病態機序の検討。第 158 回日本獣医学会 (2015 年 9 月 9 日～12 日、十和田)
- (5) 古市達哉、佐々木俊、北條慎太郎、深田俊幸。破骨細胞機能における亜鉛トランスポーター ZIP14 の役割。第 62 回日本実験動物学会 (2015 年 5 月 28 日～30 日、京都)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古市 達哉 (FURUICHI Tatsuya)

岩手大学農学部・教授

研究者番号：30392103