

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07409

研究課題名（和文）変形性関節症自然発症マウスモデルの解析

研究課題名（英文）Characterization of a mouse model spontaneously developing osteoarthritis

研究代表者

渡邊 研（Watanabe, Ken）

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 運動器疾患研究部・部長

研究者番号：10342966

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000 円

研究成果の概要（和文）：マウスの変形性関節症自然発症モデルの遺伝解析およびゲノム解析から、新たなトランスポーター遺伝子のミスセンス変異を同定し、その変異は、IL-1 β 依存的な細胞死に対して感受性を高めること、またその細胞死は今まで記述されてきたアポトーシスとは異なりフェロトーシスであることを阻害剤や遺伝子発現変化から明らかにした。このトランスポーター遺伝子が新しいフェロトーシス関連遺伝子であることとともに、さらにフェロトーシス阻害剤で外科的関節症モデルでの発症を抑制したことから、変形性関節症の発症にフェロトーシスが関与している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性関節症は有訴者だけでも国内に推定1千万人を超える国民病である。しかしながら、症状が進んだ場合、手術以外にエビデンスで支持される治療法がなく、承認された疾患修飾薬もない。その中で、新しいフェロトーシス関連遺伝子を同定し、診断や治療への基盤となりうる新たに発症病理に関する細胞死現象としてフェロトーシスの関与を見出した。フェロトーシスは鉄過剰やセレン欠乏で誘導され、ビタミンKで抑制される。これらはこれまで知られている変形性関節症の発症マテリアルと整合する。

研究成果の概要（英文）：Genetic and genomic analyses of a mouse model spontaneously developing osteoarthritis identified a missense mutation in a transporter gene that increases susceptibility to IL-1 β -dependent chondrocytic cell death, which is considered to be ferroptosis different from apoptosis, evidenced by inhibitor experiments and changes in gene expression. Thus, we identified that the transporter gene is a new ferroptosis-related gene, and the fact that the ferroptosis inhibitor suppressed the onset of the disease in a surgically induced arthropathy model indicates that ferroptosis may be involved in the pathogenesis of osteoarthritis.

研究分野：運動器疾患

キーワード：変形性関節症 モデルマウス Osteoarthritis Ferroptosis Genetics WGS

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症は国内推定罹患者（無症状を含む）が 3,000 万人を超える **common disease**（東京大学調査）であり、高齢者の日常生活動作を妨げ、要介護の主たる要因の一つである。これまでに分子遺伝学的手法を駆使し、ヒトゲノム解析やマウスモデルから、その発症機序として、**TGF β** 関連分子群や細胞外マトリックス分子群の関与ならびに軟骨内骨化過程の制御の異常などが推測されている。しかしながら、それらに基づく疾患修飾薬（**Disease-Modifying anti-Osteoarthritis drugs, DMOADs**）は未だ開発段階であり承認薬もない。これは変形性関節症が、複数の要因が絡み合う多因子疾患であること、また、他の **common diseases** 同様、その病因やリスクが異なり、それらによって層別化されうることに起因すると考えられる。

STR/ort マウスは、変形性関節症を発症する **NIH mouse database (MGI)** に登録されている唯一の突然変異（自然発症）マウス系統であり、80 年代以降、自然発症モデルとして学術・企業の研究・開発に用いられている。ヒト変形性膝関節症とは、肥満、関節中央部の変性、軟骨下骨の肥厚、変性部位におけるコンドロイチン硫酸 **C4S** 量の増加・**C6S** 量の減少など、その病態とよく類似したモデルである。ただ、ポリジェニックであることや発症が 7-8 ヶ月齢になるまで時間がかかることから、ヒト疾患との類似性はあるものの、より若齢で実験を行うことができる半月板部分切除や靱帯損傷などの外科的関節不安定化モデル、またはトレッドミルによる強制走行モデルなどの障害誘導性の動物モデルが開発されてきており利用されている。これらの障害誘導性モデルではヒトの変形性膝関節症罹患者数や加齢性疾患である病的背景は加味されていない。一方で **STR/ort** の遺伝素因も詳細に明らかにされていないことから、兄妹交配による繁殖を必要とし、対照とするマウス系統選択の妥当性の根拠も強くなかった。

これまでに **STR/ort** の関節軟骨変性についての遺伝素因について、関連座位のマッピング（**Watanabe et al. 2012**）を行い、さらに全エクソーム解析ならびに全ゲノム解析を行ったところ、同定した関連座位（4 番染色体セントロメア近傍）に存在するアミノ酸トランスポーター遺伝子のエクソン上に同族アミノ酸トランスポーター間および動物種間で保存されているアミノ酸残基に置換を生じる 1 塩基変異を同定した。これまでにゲノム解析が行われている 22 マウス系統のいずれにも同変異は認められず、**STR/ort** に特異的なものであった。最近になり、このアミノ酸トランスポーターは、細胞内グルタミン酸やアスパラギン酸との交換により細胞外シスチンを細胞内に取り込むことが報告された。このアミノ酸トランスポーターと同じファミリーで輸送アミノ酸種も同じである **Slc7a11** は細胞死の一種であるフェロトーシス誘導の中心分子として知られ、フェロトーシス誘導剤であるエラスチン（**erastin**）はこの **Slc7a11** を阻害してシスチンの取り込みを遮断することにより、フェロトーシスを誘発する。しかしながら **Slc7a11** のノックアウトマウスでは顕著なフェロトーシスの亢進は観察されず、シスチン取り込みやその機能を代償する分子の存在が示唆されている。

フェロトーシス（**Ferroptosis**）は、アポトーシスとは異なる制御性の細胞死であり、鉄依存的な細胞内のレドックス制御の破綻とそれによる過酸化脂質の異常蓄積を特徴とする。ネクローシスの一種とも考えられるが、最近注目されている細胞死の型であり、虚血再灌流障害や神経変性疾患などへの関与が知られている。また、アポトーシス関連因子 **Bcl2/Bax** 非依存性でありカスパーゼの活性化も関与しないとされている。これまでの生体組織での報告では、**TUNEL** 染色陽性になることから、過酸化脂質の蓄積とともにマーカーとされる。一方、2004 年に英国のグループから **STR/ort** の関節変性と相関する軟骨細胞の非アポトーシス性細胞死が報告されており、その関与の可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、**STR/ort** の解析を通して、新規トランスポーター遺伝子変異が変形性関節症の発症に関わる関節軟骨変性への関与を明らかにするとともに、マウスモデルを用いた変形性関節症の発症病理への新たな細胞死フェロトーシスの関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

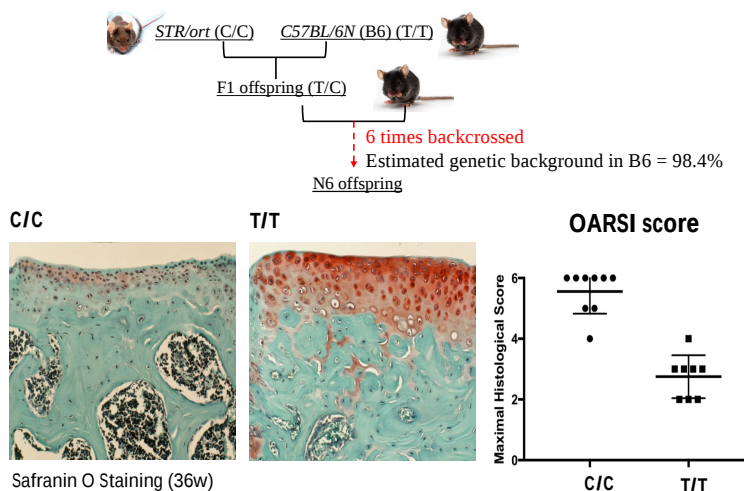
STR/ort は、変異を検出しながら、**C57BL/6N** に戻し交配し、**N6** 世代を得て表現型の解析を行った。表現型の評価は **OARS1 scoring** に準じて行った。

野生型マウスとして、**C57BL/6N** 雄マウスを日本エスエルシーより 7 週齢で購入し、馴化後 8 週齢にて苦痛を軽減するために麻酔下で手術を行った。軽度不安定化モデル（**destabilization of the medial meniscus, DMM**）及び中度不安定化モデル（**moderate, MOD**）の作出は **Kamekura et al. (2005)** に則って行った。動物実験は、国立研究開発法人国立長寿医療研究センターの動物実験指針等に則り、動物愛護上の配慮に留意し、動物実験倫理委員会の承認を得て行った。表現型の解析は組織固定後、**EDTA** により脱灰しパラフィン包埋ののち、**Safranin-O/methyl green** で染色した標本を作成して行った。**Chac1** の検出には、抗 **Chac1** 抗体（**Anti-CHAC1 Polyclonal Antibody**）を **Funakoshi** より入手し、**Vector** 社の **DAB Peroxidase**

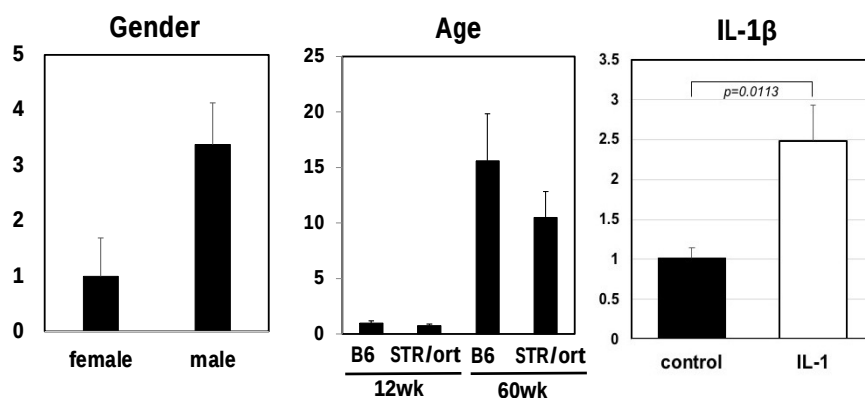
Substrate Kit, (ImmPACT)および **VECTASTAIN Elite ABC Rabbit IgG Kit** を用いて行った。
 マウス軟骨細胞株 **ATDC5** は、**pLVSIN-EF1a** ベクターに各コンストラクトを構築し、組換えレンチウイルスにより遺伝子導入し、**puromycin** により選別した。分化誘導後2週間の時点で **IL-1 β** 等の添加実験を行った。

4. 研究成果

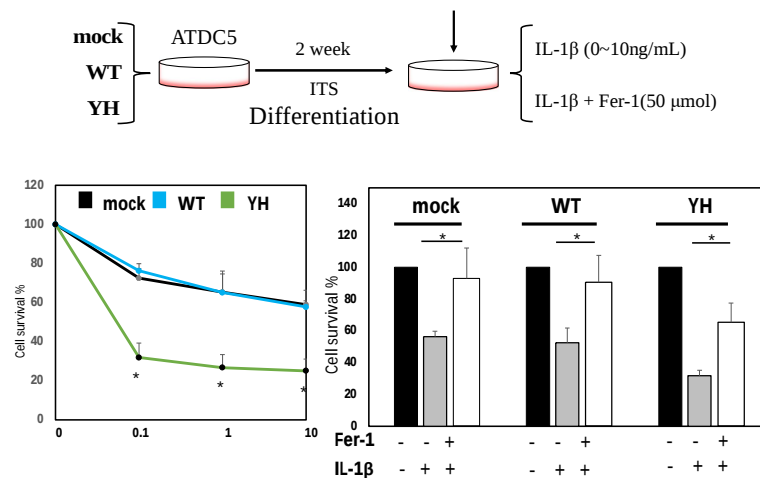
STR/ort の全ゲノムシーケンシングで、斑に関する遺伝子座ならびに毛色に関する遺伝子座に予想された多型が確認された。また、**STR/ort** の関節軟骨変性の表現型はポリジェニックであることから同定したミスセンス変異について、**C57BL/6N (B6N)**に戻し交配し、理論的に遺伝バックグラウンドが **B6N** が **98%超**となる第6世代 (**N6**) について表現型を検討したところ、**STR/ort** 型ホモ接合 (**C/C**) 遺伝子型では、顕著に軟骨変性が観察された。このことから、このミスセンス変異が軟骨変性に関わることが示唆された(下図)。



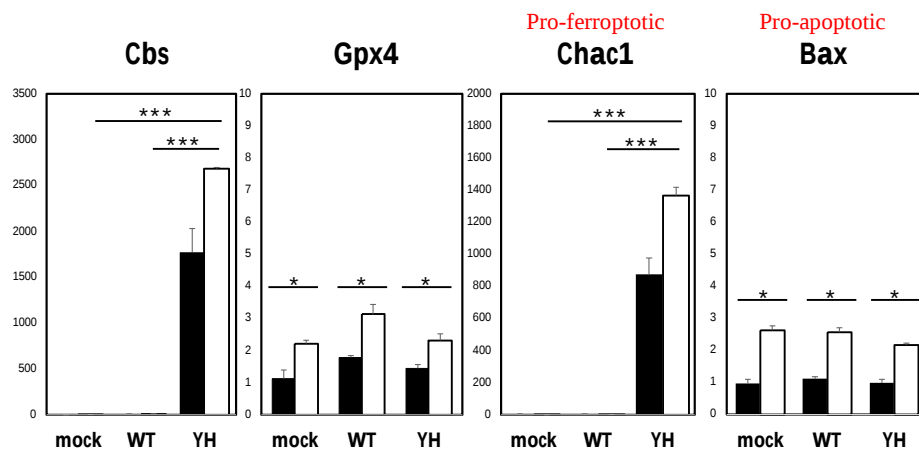
そこでこの遺伝子の発現について検討を行ったところ、**STR/ort** の表現型と同様に、オスマウスの関節軟骨ではメスの関節軟骨に比べ発現が有意に高かった。さらに、その発現は、**B6N**、**STR/ort** ともに加齢マウスで高値となり、これも **STR/ort** の遅発性の表現型と一致する。加齢との関係、また、このマウスの変形性関節症発症時に **IL-1 β** の発現亢進が知られていることから、軟骨細胞に **IL-1 β** を処理すると顕著に発現が亢進した(下図)。これらのことから、この遺伝子は発現挙動が表現型やこのマウスの知見と一致することから、この遺伝子変異が表現型に寄与しているものと考えられた。



これまでにマウス軟骨細胞では、**IL-1 β** によりアポトーシスが誘導されることが報告されている。一方、**STR/ort** では **IL-1 β** の発現上昇と軟骨細胞死の増加が報告されているが、典型的なアポトーシスではないとの知見が得られている。また、この遺伝子の機能と変異の影響を検討するため、軟骨細胞に野生型遺伝子 (**WT**)、変異型遺伝子 (**YH**) を導入し、**IL-1 β** 依存的な細胞死について観察を行った。ベクター (**mock**) もしくは野生型遺伝子を導入した細胞に比べ、変異型遺伝子を導入した細胞では有意に **IL-1 β** 依存的な細胞死が亢進していることが示された。この細胞死に対して、フェルトーシスに特異的な阻害剤である **Ferrostain-1 (Fer-1)** を添加すると細胞死は顕著に抑制された。このことから、変異は **IL-1 β** 誘導性のフェルトーシスに対して感受性が亢進していることが明らかとなった。

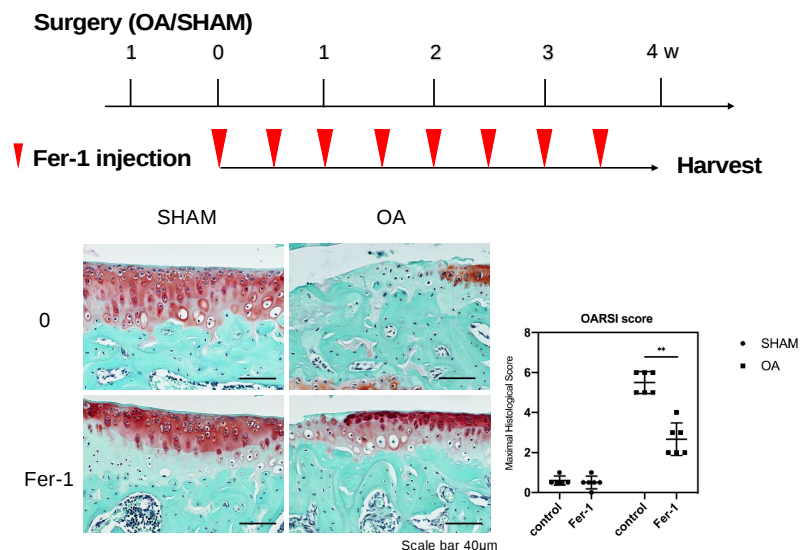


この実験系において遺伝子発現を検討したところ、フェロトーシス関連遺伝子である **Cbs** や **Chac1** は **IL-1β** 非処理群でも発現亢進しており、**IL-1β** 処理によりさらに発現が亢進した。一方、**proapoptotic** な遺伝子である **Bax** の発現は **IL-1β** 処理により上昇したが、細胞死に一致する変異型特異的な挙動は認められなかった（下図）。



このことから、軟骨細胞の **IL-1β** 依存的な細胞死にはフェロトーシスが関与しており、また、変異型の発現はすでに **IL-1β** 未処理の時点で脆弱性を示している可能性が考えられた。

これらの **in vitro** での細胞実験の結果から、外科的な関節不安定化による変形性関節症（**Post-traumatic osteoarthritis, PTOA**）モデルを用いて、フェロトーシス阻害剤の効果を検討した。



マウスに **MOD** モデルを適用し、関節腔内に **Ferrostatin-1** を週 2 回投与し、術後 4 週での表現系を検討したところ、対照群 (**Fer-1** 非投与群) は顕著に軟骨変性を示すが、**Fer-1** 投与軍では顕著にその変性が抑制されていた。このことから、前臨床で用いられる **PTOA** モデルにおいてもフェロトーシスが関与していることが示唆された。

これらのことから、**STR/ort** の遺伝ならびにゲノム解析から、軟骨変性に関わる遺伝子変異を同定し、またその遺伝子はこれまで知られていなかった新たなフェロトーシス制御分子をコードしていること、さらに軟骨細胞の **IL-1 β** 依存的細胞死にはフェロトーシスが関わることを見出し、マウスの **OA** モデルにおいてフェロトーシス阻害剤が軟骨変性を抑制することを明らかにした。

家族性鉄過剰症 (**hereditary hemochromatosis**) では関節症が好発することが知られており、その責任遺伝子である **HFE** は変形性関節症のゲノムワイド関連解析でも関連遺伝子座として同定されている。また、フェロトーシスの制御因子である **GPX4** はセレン酵素であり、セレン欠乏 (**Kashin-Beck disease**) でも関節の変形が特徴的な病変である。また、最近、ビタミン **K** がフェロトーシスを抑制することが報告されたが、ビタミン **K** 低値は変形性関節症の発症リスクとなりうること、また、ビタミン **K** に拮抗する **warfarin** 投与者では顕著に変形性関節症の人工関節手術に至るリスクが高いことが報告されている。これらのことから、変形性関節症の発症には新たな細胞死の形であるフェロトーシスの関与が示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 馬 凌云、重水大智、中村博幸、尾崎浩一、渡邊 研
2. 発表標題 変形性関節症自然発症マウスモデル STR/ortの軟骨変性に関わる遺伝子変異の同定とferroptosisの関与
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬 凌云、定梶嶺、中村博幸、渡辺 研
2. 発表標題 変形性関節症自然発症マウスSTR/ortの関節軟骨変性にはFerroptosisが関与する
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬 凌云、重水大智、秋山真太郎、尾崎浩一、渡辺 研
2. 発表標題 変形性関節症自然発症マウスのゲノム解析
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第64会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬 凌云、重水大智、秋山真太郎、定梶嶺、中村博幸、尾崎浩一、渡辺 研
2. 発表標題 変形性関節症を自然発症するSTR/ortマウスのゲノム解析による軟骨変性関連遺伝子の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Lingyun Ma, Daichi Shigemizu, Shintaro Akiyama, Rei Jokaji, Hiroyuki Nakamura, Kouichi Ozaki, Ken Watanabe
2. 発表標題 Identification of a gene mutation involved in cartilage degeneration in STR/ort, a mouse line developing spontaneous osteoarthritis.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2020 annual meeting (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------