

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791417

研究課題名（和文）変形性関節疾患における Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルの機能解析研究課題名（英文）Role of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling on cartilage matrix degradation

研究代表者

湯浅 崇仁 (YUASA Takahito)

順天堂大学 医学部 助教

研究者番号：80365668

研究成果の概要（和文）：*in vivo*での関節軟骨基質分解における Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルの機能を解析するために、生後軟骨特異的に $\beta$ -カテニンを過剰発現できる遺伝子改変マウスを作製し、四肢長管骨および脊椎椎体椎間板組織の発育過程における $\beta$ -カテニンの作用を検討した。

研究成果の概要（英文）：We created a new transgenic mouse model in which Wnt/ $\beta$ -catenin signaling can be activated in cartilage for specific periods of time. Our data provide evidence that Wnt/ $\beta$ -catenin signaling has important and distinct roles in growth plate and articular cartilage and that postnatal dysregulation of this signaling pathway causes diverse structural and functional changes in the two cartilaginous structures.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：整形外科

科研費の分科・細目：関節疾患

キーワード：軟骨基質分解 変形性関節症

## 1. 研究開始当初の背景

軟骨は細胞外基質に富んだ組織であり、この細胞外基質の合成および分解は絶妙なバランスで恒常的に維持されており、軟骨細胞の機能制御に重要な役割を担っている。このバランスが失われ、分解過剰方向へ傾くと、変形性関節症や関節リウマチに代表される関節軟骨の退行性変化を惹起することが知られている。このメカニズムには IL-1, TNF- $\alpha$ , matrix metalloproteinases (MMPs), aggrecanases (ADAMTSs), Retinoic acid (RA)などが関与していること

が明らかになっている。

最近、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルが軟骨細胞の脱分化誘導に関与していることが報告された。また Wnt シグナルの受容体である sFRP-3 の機能低下による Wnt シグナルの活性化が変形性股関節症に関与していること、変性関節軟骨で Wnt-7a, 7b の発現が上昇していることが報告された。われわれは Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルが家兔関節軟骨細胞のプロテオグリカンの蓄積を阻害し、軟骨基質分解酵素である MMP-3, 13, ADAMTS-4, 5 の発現を促進し、さらに軟骨細胞層からのプロ

テオグリカンの遊離も強力に促進することを報告した(Labo.Invest.88, 264-74,2008)。また、変形性関節症を自然発症するモルモットを用いて、関節軟骨における $\beta$ -カテニンの発現を免疫組織学的に検索し、変性関節軟骨で $\beta$ -カテニンの発現が上昇していることを確認した。これらの結果は Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルが 変形性関節症に代表される軟骨変性疾患に強く関与する可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究は *in vivo* での Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルの機能解析を行い、変形性関節症および変形性脊椎症発症マウスモデルを作成することを目的とする。また変形性関節症の関節軟骨基質分解に関与する炎症性サイトカインと Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルの相互作用を検討し、関節軟骨の変性機構を解明することである。

変形性関節症・変形性脊椎症発症モデルマウスの作成 軟骨特異的に発現し、生後も発現が持続する 11型コラーゲンプロモーターと、タモキシフェン投与により発現調節可能なエストロゲン受容体遺伝子を用いて、恒常活性型 $\beta$ -カテニンを軟骨細胞に過剰発現するマウスを作成する。生後3-6ヶ月からタモキシフェンを投与し、 $\beta$ -カテニンを過剰発現させた後の関節軟骨の形態変化および関節軟骨での基質分解酵素の発現を検討する。また椎間板にも11型コラーゲンが発現していることから、同時に椎間板変性における $\beta$ -カテニンの役割を解析する。

## 3. 研究の方法

### $\beta$ -カテニン過剰発現マウスの作成

軟骨特異的 $\beta$ -カテニントランスジェニックマウスの作成に必要なコンストラクトについては、すでに 11 型コラーゲンプロモーター (Col11) と、タモキシフェン投与により発現調節可能なエストロゲン受容体遺伝子 (ERTM) を組み合わせた DNA を発現ベクターに組み込み、軟骨細胞特異的にタモキシフェン投与で発現調節ができることを確認している。このコンストラクトを用いてトランスジェニックマウスを作成し、生後 3-4 週齢マウスの尻尾から採取した RNA サンプルを使って、Col11 と ERTM を認識するプライマーにより RT-PCR 法で標的遺伝子過剰発現マウスを選別する。さらにその中からエストロゲン受容体タンパクを認識する抗体を用いて標的タンパクを過剰発現するマウスを確認する。

まず、四肢の骨格形成が始まる胎生 12-13 日

以降からタモキシフェンを腹腔内投与し、*in vivo* で $\beta$ -カテニンが軟骨特異的に活性化され、軟骨形成が阻害されるかを病理組織学的に確認する。実験に必要なマウスを増やした後、3-6ヶ月齢のマウスにタモキシフェンを投与し、膝関節、股関節における関節症変化を micro CT, 軟 X 線撮影および病理組織学的に検索する。また、関節軟骨での MMPs, ADAMTSs など軟骨基質分解酵素および軟骨基質である 2,9,11 型コラーゲンの発現を *in situ hybridization* 法を用いて検討する。さらに、脊椎椎間板変性の経時的变化の過程を MRI および病理組織学的に検討し、椎間板組織における各種コラーゲン、軟骨基質分解酵素の発現を *in situ hybridization* 法を用いて検討する。

## 4. 研究成果

軟骨細胞特異的に $\beta$ -カテニンを過剰発現するマウスの作製

11型コラーゲンプロモーター (Col11) とタモキシフェン投与により発現調節可能なエストロゲン受容体遺伝子 (ERTM) を組み合わせた発現ベクターを用いて、軟骨特異的に $\beta$ -カテニンを発現させたトランスジェニックマウスを作製した。まず、生後2週齢のマウス尻尾からDNAを採取し、Col11プロモーターN末端およびERTMを認識するプライマーにより RT-PCR法で標的遺伝子をもつマウスを選別した。さらにエストロゲン受容体タンパクを認識する抗体を用いて、標的タンパクを過剰発現するマウスを確認し、3系統の遺伝子過剰発現マウスラインを樹立した。これらのマウスをさらに野生型マウスと交配し、P2マウスまで作製した。

過剰発現遺伝子の作用を確認するために、妊娠12-13日目のトランスジェニックマウスにタモキシフェンを腹腔内投与し、マウス胎児の骨格形成における作用を検討したところ、マウス胎児の長管骨は短縮し、内軟骨性骨化の遅延を認めた。またサフラニン-O染色では、関節軟骨細胞の変性を認めた。この結果から、トランスジェニックマウス胎児においても軟骨細胞特異的に $\beta$ -カテニンが作用していることが確認された。さらに、生後2-3週からタモキシフェン投与を開始したところ、投与後4週でトランスジェニックマウスは明らかな発育障害を認めた。軟X線学的解析では、長管骨の低形成と関節の変形を認めた。

生後2週からトランスジェニックマウス(Tg群)にタモキシフェンを7日間投与し、軟骨細胞特異的に $\beta$ -カテニンを過剰発現させたとこ

ろ、投与後5週で対照群に比べて四肢長管骨の成長障害を認めた。軟X線ではTg群の大腿骨・脛骨は対照群と比べ20-35%の短縮を認め、また肘関節・膝関節は著明な変形を認めた。病理組織学的解析ではTg群タモキシフェン投与後3週で成長板の形成障害を認めて、投与後5週では成長板が消失していた。さらにTunel染色では、Tg群成長軟骨板の肥大軟骨層にアポトーシスを強く認めた。関節軟骨においては、Tg群タモキシフェン投与後1日でサフラニンO染色に染色される軟骨基質の減少を認めたが、タモキシフェン投与後3週では関節軟骨表層の肥厚と関節軟骨層の増生を認めた。Tg群関節軟骨層では対照群に比べてBrdUにラベルされる細胞が多くみられており、同部位での細胞増殖が亢進していることが示唆された。

脊椎椎体・椎間板においては、 $\beta$ -カテニンは椎体終板および椎間板線維輪に強く発現していたが、髄核には発現していなかった。Tg群にタモキシフェン投与すると、四肢長管骨と同様に椎体の短縮を認めた。病理組織学的には椎体終盤の著明な短縮を認めた。一方、髄核は膨張しサフラニンOで染色される基質が減少していた。

また、生後2-3ヶ月のTgマウスにタモキシフェンを投与し、関節軟骨を病理組織学的に解析しているが、対照群と比べて明らかな変化は認めなかった。

以上の結果から Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナルは成長板軟骨細胞と関節軟骨細胞においてそれぞれに重要な役割を果たしており、生後このシグナルに以上が生じると種々の形態的および機能的変化をきたすことが明らかとなった。

#### 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4件)

1. Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, Iwamoto M, and Enomoto-Iwamoto M. Transient Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Induces Abnormal Growth Plate Closure and Articular Cartilage Thickening in Postnatal Mice. *Am J Pathology*. 175(5): 1993-2003, 2009. 査読有

2. Yasuhara R, Yuasa T, Williams JA, Byers SW, Shah S, Maurizio Pacifici M, Iwamoto M, and Enomoto-Iwamoto M. Wnt/ $\beta$ -catenin and Retinoic Acid Receptor Signaling Pathways Interact to Regulate Chondrocyte Function and Matrix Turnover. *J Biol Chem* 285(1): 317-27, 2010. 査読有

3. Kondo N, Yuasa T, Shimono K, Tung W, Okabe T, Yasuhara R, Pacifici M, Zhang Y, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Intervertebral Disc Development Is Regulated by Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling. *Spine (Phila Pa 1976)* 36(8):E513-8, 2011. 査読有

4. Yasuhara R, Ohta Y, Yuasa T, Kondo N, Hoang T, Addya S, Fortina P, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Roles of  $\beta$ -catenin signaling in phenotypic expression and proliferation of articular cartilage superficial zone cells. *Lab Invest*. 91(12):1739-52, 2011. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Yuasa T, Kondo N, Yasuhara R, Shimono K, Mackem S, Pacifici M, Iwamoto M, and Enomoto-Iwamoto M. Transient Activation of Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Induces Abnormal Regression of Growth Plate and Stimulates thickening of Articular Cartilage. (July 2009) Wnt meeting, Washington DC (USA)
2. Yasuhara R, Yuasa T, Hargett A, Iwamoto M, Pacifici M and Enomoto-Iwamoto M. Wnt/ $\beta$ -catenin

Signaling Regulates Progenitor  
Maintenance and Function of Superficial  
Cell Layer in Articular Cartilage. (Sep.  
2009) American Society for Bone and  
Mineral Research. Sep11-15 Denver  
(USA).

3. Yasuhara R, Kondo N, Yuasa T, Iwamoto  
M, Pacifici M, Enomoto-Iwamoto M.  
Proliferation and differentiation in  
articular cartilage superficial layer cells  
are regulated by Beta-catenin signaling.  
(Mar. 2010) 56<sup>th</sup> Annual Meeting of  
Orthopaedic Research Society. New  
Orleans, LA (USA).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯浅 崇仁 (Yuasa Takahito)  
順天堂大学 医学部 助教  
研究者番号 : 80365668