

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25年3月31日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23890122

研究課題名（和文） 変形性関節症ならびに軟骨分化における WISP-1 遺伝子の機能解析

研究課題名（英文） The functional analysis of WISP-1 gene in osteoarthritis and chondrogenic differentiation.

研究代表者

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60613156

研究成果の概要（和文）：本研究は、変形性関節症の原因遺伝子のひとつと推測されている WISP-1 遺伝子に着目し、変形性関節症及び軟骨分化への関与を解明することを目的としている。今回我々は、WISP-1 遺伝子欠損マウスの膝関節において、変形性関節症様組織像を呈することを明らかにした。さらに、*in vitro*において、WISP-1 遺伝子を過剰発現させることにより、軟骨細胞の分化が促進されることを明らかにした。今回の研究結果から、WISP-1 遺伝子が軟骨分化、形成に影響し、変形性関節症の発症に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the relationship between WISP-1 gene and osteoarthritis (OA). First, we analyzed the knee joint histologically, and OA like condition was observed in WISP-1 KO mice. Moreover, overexpression of WISP-1 enhanced the chondrogenic differentiation in human bone marrow stromal cells. These data show that WISP-1 could be involved in the onset of OA by regulating the chondrogenic differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：軟骨

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：軟骨分化, WISP-1

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) は介護保険の要支援原因疾患の第一位で、医療費の高騰や労働力の低下など、世界的な社会問題となっている。本疾患の病態は関節軟骨の退行性変化であることが明らかであるが、そ

の発症原因は未だ解明されておらず、臨床的・医療経済学的に重要な課題とされている。

このような中、Uranoらは、骨・軟骨代謝に関与することが明らかにされてきた遺伝子を中心に、ヒト遺伝子上で脊柱変形に関与する一塩基置換遺伝子多型 (SNP) を探索し、

Wntシグナルにおいて受容体として働くLRP5やWntシグナル応答遺伝子であるWnt Induced Secreted Protein (WISP)-1が脊柱変形と有意な相関があることを報告した。また、Hurvitzらは、WISP遺伝子の変異体が関節リウマチを引き起こすことを報告しており、WISP-1遺伝子と変形性関節症との強い因果関係が推測されている。

一方、我々は、プロテオグリカンのひとつである Biglycan (Bgn) や Fibromodulin (Fmod) が骨・軟骨基質合成に深く関与し、これらの遺伝子ノックアウト (KO) マウスが膝関節や顎関節においてOA様症状を呈することを報告した。また、Desnoyersらは、BgnがWISP-1に直接結合することで、WISP-1の機能を制御していることを報告している。これらの事実は、WISP-1遺伝子が主要細胞外マトリックスであるプロテオグリカンと相互作用することで、骨・軟骨の発生や恒常性を維持する細胞外マトリックスのターンオーバーを制御している可能性を強く示唆している。そこで我々は、骨におけるWISP-1遺伝子の役割を明らかにするため、WISP-1過剰発現 (Tg) マウスおよびWISP-1欠損 (KO) マウスを作製し、骨における表現型解析を行った。その結果、WISP-1は、強力に骨形成を誘導することで知られているBone Morphogenetic Protein (BMP)-2の骨形成機能を正に制御することで、Tgマウスでは骨密度の増加、KOマウスでは骨密度の減少といった表現型を示すことを明らかにした。さらに興味深いことに、WISP-1 KOマウスの大腿骨長は、野生型 (WT) マウスと比べ、明らかに短縮されていた。この原因は、WISP-1遺伝子の欠損により長管骨の長軸方向の発生に関わっている静止・増殖・肥大軟骨細胞層からなる成長軟骨板に何らかの機能障害が生じたためではないかと推測される。

以上のことから、WISP-1 遺伝子が骨組織だけでなく軟骨組織の発生や恒常性の維持を制御し、ひいては OA の発症に関与している

ことは容易に想像される。

2. 研究の目的

変形性関節症の原因遺伝子のひとつと推測されている WISP-1 遺伝子に着目し、変形性関節症及び軟骨分化への関わりを、組織学的・分子細胞生物学的に解明する。

3. 研究の方法

(1) WISP-1 遺伝子とOAの発症・進展との関係の解明

① WISP-1 遺伝子 KO マウス (アメリカ国立衛生研究所の Dr. Young より供与) を用い、WISP-1 遺伝子が OA の発生やその進展にどのように関与しているかを組織学的に検討した。

② WISP-1 遺伝子 KO マウスの軟骨組織における軟骨特異的マーカーの発現量を評価するため、WT および KO マウス下顎骨の関節突起より軟骨組織を採取した。通法に従い RNA を精製し、軟骨細胞分化マーカーの一つである *Sox9*, Aggrecan (*Acan*), Type II collagen (*Col2*) の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて検討した。

③ 大腿骨軟骨組織より軟骨細胞を分離培養し、培養 3, 7 日後に RNA を回収した。そして、*Sox9*, *Acan*, *Col2* の遺伝子発現量を定量性 RT-PCR 法にて検討した。

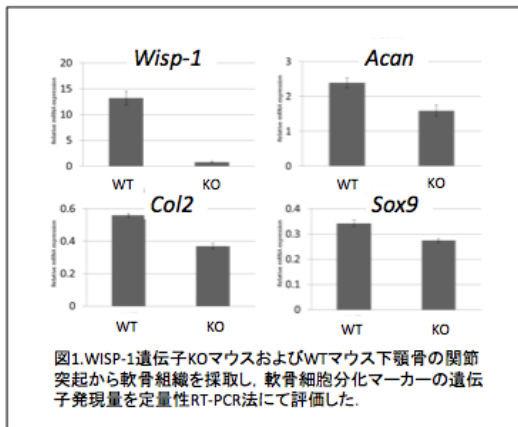
(2) 軟骨細胞分化におけるWISP-1 遺伝子の機能解析

WISP-1 遺伝子が軟骨細胞分化に与える影響を検討するため、ヒト骨髄由来間葉系間質細胞 (human bone marrow stromal cells: hBMSCs) に WISP-1 遺伝子を強制発現させ、WISP-1 遺伝子が軟骨細胞分化や基質合成に与える影響を検討した。すなわち、アデノウイルスベクターを用い、WISP-1 遺伝子を導入したのち、軟骨細胞分化誘導培地にて 3 週間ペレット培養した。その後、サフラニン O 染色及びトルイジンブルー染色を行い、組織学的に評価した。

4. 研究成果

(1) WISP-1遺伝子とOAの発症・進展との関係の解明

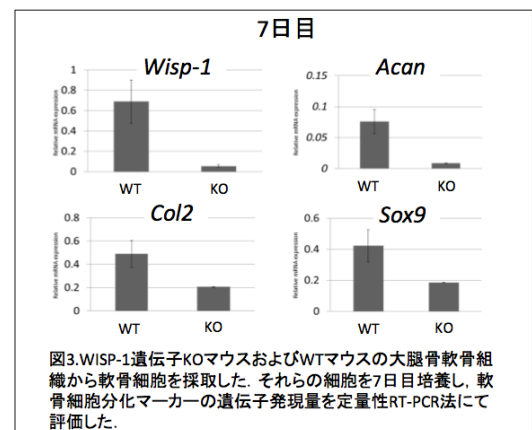
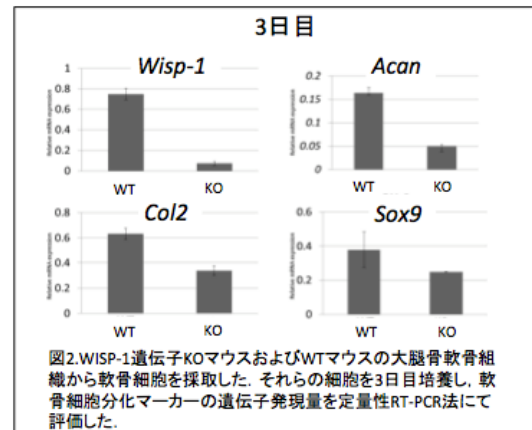
- ① 膝関節部の軟骨組織を組織学的に検討した結果、WISP-1 KO マウス群において、変形性関節症様の組織像が観察された。
- ② 次に、WISP-1 KO マウス顎関節部から軟骨組織を採取し、従来の方からRNAを精製し、軟骨細胞分化マーカーである *Sox9*, *Acan*, *Col2* の遺伝子発現量を定量性RT-PCR法にて評価した。その結果、WISP-1 KO マウス群においてWTマウス群と比べ、*Sox9*, *Acan*, *Col2* の遺伝子発現量は低かった(図1)。



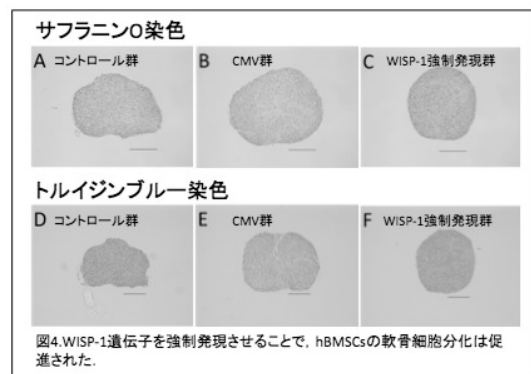
- ③ 次に、WISP-1遺伝子KOマウスおよびWTマウスの軟骨細胞における軟骨細胞分化マーカーの発現量を比較検討するため、大腿骨軟骨組織より軟骨細胞を分離培養した。培養3, 7日目にRNAを回収し、定量性RT-PCR法にて評価した結果、培養期間を通して、WISP-1遺伝子KOマウス由来軟骨細胞は、WT由来のものとは比べ、*Sox9*, *Acan*, *Col2* の遺伝子発現量は低かった(図2, 3)。

(2) 軟骨細胞分化におけるWISP-1遺伝子の機能解析

アデノウイルスベクターを用いてWISP-1遺伝子を強制発現させたhBMSCsを軟骨細胞分化誘導培地にて培養し、培養3週後に組織を回収し、サフラニンO染色、及び、トルイジンブルー染色を行い、組織学的に評価した。その結果、対照群であるCMV群と比較し、WISP-1遺伝子強制発現群では軟骨細胞分化が促進された(図4)。



以上の結果より、WISP-1遺伝子がOAの発症及び、軟骨細胞分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。現在、WISP-1遺伝子が軟骨細胞分化に与える影響をsiRNAを用いた *in vitro* ノックダウンモデルを用い検討している。また、WISP-1の軟骨細胞分化促進メカニズムを明らかにするため、軟骨細胞分化



において重要な働きを担っているTGF- β 3との関連性を検討している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び \square 連携研究者には下線)

[学会発表] (計6件)

- ① 服部高子, 大野充昭. CCN3/NOVの軟骨特異的過剰発現は軟骨分化の最終段階に影響を及ぼすことにより骨形成不全をきたす. 第85回日本生化学会, 福岡. 2012. 12. 16.
- ② 正木明日香, 大野充昭. 皮膚創傷治癒過程におけるCCN4/WISP-1遺伝子の役割. 第10回日本再生歯科医学会総会, 神戸. 2012. 9. 2.
- ③ Maeda A. Ono M. et al. WISP-1/CCN4: Potential Regulation of Mineralized Tissue through Modulation of Wnt Signaling. 第30回日本骨代謝学会学術集会, 東京. 2012. 7. 20.
- ④ Maeda A. Ono M. et al. WISP-1/CCN4: Potential Regulation of Mineralized Tissue through Modulation of Wnt Signaling. National Institute of Dental and Craniofacial Research 6th Annual Fellows Retreat. Chamberland, USA. 2012. 4. 19.
- ⑤ Maeda A. Ono M. et al. Determining the function of WISP-1/CCN4 in mineralized tissue. American Society for Bone and Mineral Research 2011 Annual Meeting. San Diego, USA. 2011. 9. 18.
- ⑥ Maeda A. Ono M. et al. Determining the function of WISP-1/CCN4 in mineralized tissue. National Institute of Dental and Craniofacial Research 5th Annual Fellows Retreat. Chamberland, USA. 2011. 4. 14.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60613156

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし