

平成30年6月10日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20499

研究課題名(和文) 変形性関節症の発症と進展におけるWISP1遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) The functional analysis of WISP1 gene in the development and aggravation of osteoarthritis

研究代表者

前田 あずさ (Maeda, Azusa)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：70754662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、変形性関節症の原因遺伝子のひとつと推測されているWISP1 遺伝子に着目し、変形性関節症の発症ならびに病態への関わりを、組織学的・分子細胞生物学的に解明することを目的とした。今回我々は、WISP1はBMPが属するTGF-ファミリーを制御しているという観点から、軟骨細胞分化過程においてBMPネガティブ・フィードバック機構が働き、軟骨細胞の分化と共に発現が上昇するBMPアンタゴニストにより軟骨細胞分化が制御されることを明らかにした。このことは、WISP1が間接的にはあるものの、BMPネガティブ・フィードバック機構を介して軟骨細胞分化を制御している可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the relationship between WISP1 gene and osteoarthritis (OA). In this study, we focused on BMP2 which is regulated by WISP1 and showed that negative feedback mechanism in BMP signaling works during the process of chondrogenic differentiation and chondrogenic differentiation was controlled by BMP antagonist. This result suggests that WISP1 regulates chondrogenic differentiation through the negative feedback mechanism in BMP signaling while in an indirect way.

研究分野：歯学・補綴系歯学

キーワード：変形性関節症 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

平成26年に65歳以上の人口割合が26.0%を記録するなど高齢化率が上昇し続けている我が国では、医療費の高騰や要支援・要介護者の増加に伴った介護保険の財源圧迫が非常に大きな社会問題となっているが、国民が要支援となる原因の第1位である関節疾患、特にその大部分を占める変形性関節症(Osteoarthritis: OA)の発症原因は未だ解明されておらず、その発症メカニズムを明らかにすることは臨床的・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)の探索を行ない、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WNT1-induced Secreted Protein 1(WISP1)が脊柱変形と有意な相関があることを報告した。また、Geyerらは、OAを発症したヒト膝関節軟骨でWISP1の遺伝子ならびにタンパク質が高発現していることを報告しており、WISP1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、FrenchらはWISP1遺伝子が骨の発生や骨折治癒過程に高発現することを報告し、WISP1が骨形成過程に深く関与する事が示唆された。実際に我々はWISP1遺伝子欠損(*Wisp1*-KO)マウスを作製し、WISP1が欠損すると骨形成と骨吸収のバランスが崩れることにより骨量ならびに皮質骨厚の低下を引き起こすこと、WISP1による骨分化促進の分子メカニズムとして、古典的Wntシグナル経路の下流因子であるWISP1自身がフィードバック的にWntシグナル経路を調節してい

る可能性を報告した。また *Wisp1*-KO マウス大腿骨では野生型(WT)と比較して成長板の肥大軟骨細胞層が延長しており(図1)、軟骨組織においてもWISP1遺伝子が何らかの機能を有している可能性が示唆された。更に *in vitro* において、WISP1遺伝子が軟骨細胞の分化を正に制御していることを見出した。

以上のことから、WISP1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が想像される。しかしながら、OAの関節組織で高発現しているWISP1遺伝子がOAの発生にどのように関わり、その進展にどのような影響を与えているのかはいまだ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、変形性関節症の原因遺伝子のひとつと推測されているWISP1遺伝子に着目し、変形性関節症の発症ならびに病態への関わりを、組織学的・分子細胞生物学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

過去の報告よりWISP1はBMPが属するTGF-ファミリーを制御していること、OA患者の軟骨組織においてBMPとそのアンタゴニストの発現が亢進することが知られているため、軟骨細胞分化過程におけるWISP1とBMP-2のネガティブ・フィードバック機構との関連を検討する。

(1) 軟骨細胞分化過程における軟骨細胞分化関連因子ならびにBMPアンタゴニストの遺伝子発現を解析する。

(2) Sebalidらが作製したBMPアンタゴニストの機能阻害剤L51P(BMPアンタゴニストへの結合能は有するが型BMP受容体への結合能が低下したBMP変異体)を用い、軟骨細胞分化過程におけるBMPアンタゴニストの役割を解明する。

(3) L51Pを応用したレチノイン酸誘導性OAモデルにおいて、BMPアンタゴニストの役割を解明する。

4. 研究成果

(1) ヒト間葉系幹細胞(hBMSCs)を100ng/ml BMP-2含有軟骨細胞分化培地で4週間pellet培養後、経時的にRNAを回収し、軟骨細胞分化マーカー(*COL2A1*, *ACAN*, 次頁図2-A, B)ならびにBMPアンタゴニスト(*NOG*, *CHORD*, *GREM1*, 次頁図2-C, D, E)の遺伝子発現量を定量性RT-PCRにて解析したところ、いずれも遺伝子発現量は培養時間の経過と共に有意に上昇した。

(2) BMPアンタゴニストの機能阻害剤L51Pを用い、軟骨細胞分化過程におけるBMPアンタゴニスト阻害実験をhBMSCsのpellet培養法にて行った。hBMSCsをBMP-2(100ng/mL)ならびにL51P(500ng/mL)刺激下で3週間

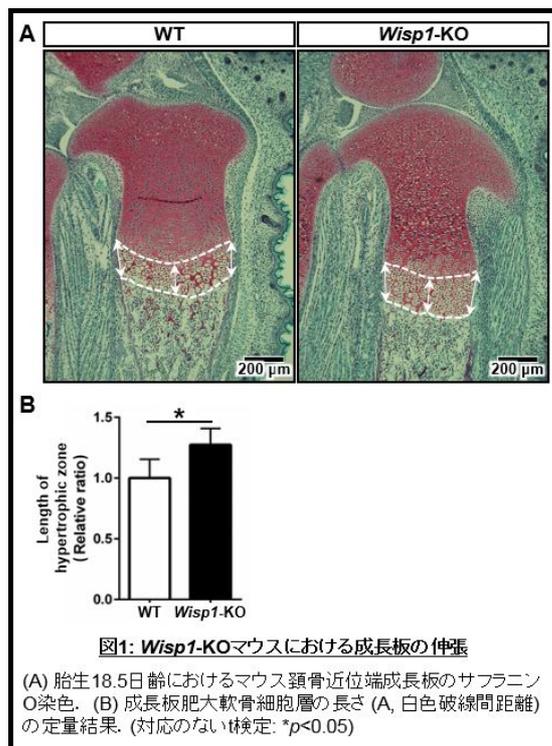
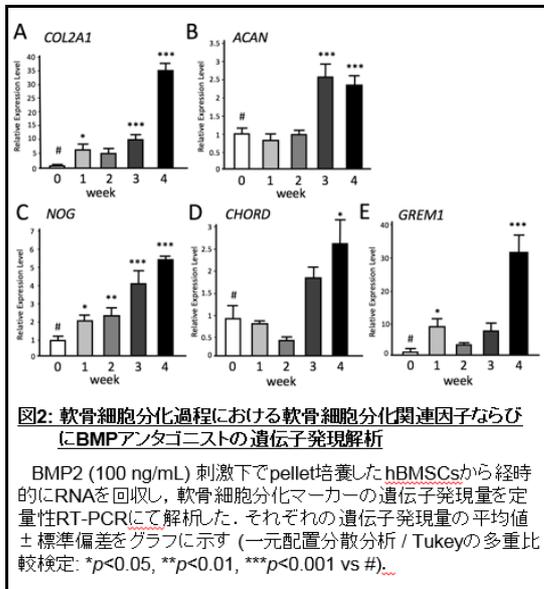
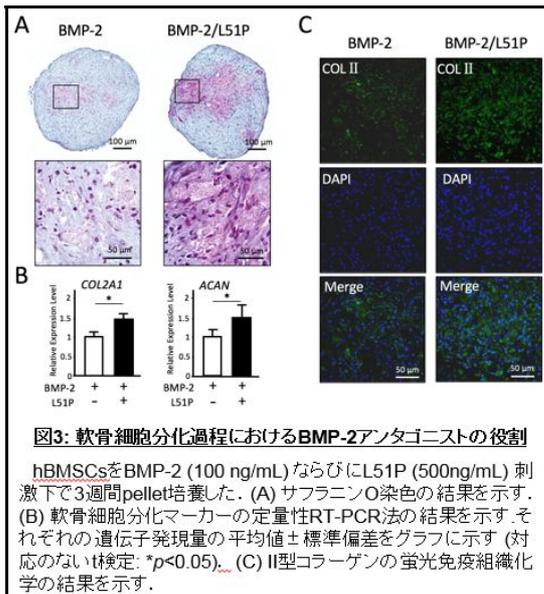


図1: *Wisp1*-KOマウスにおける成長板の伸張

(A) 胎生18.5日齢におけるマウス頸骨近位端成長板のサフランin O染色。(B) 成長板肥大軟骨細胞層の長さ(A, 白色破線間距離)の定量結果。(対応のないt検定: *p<0.05)



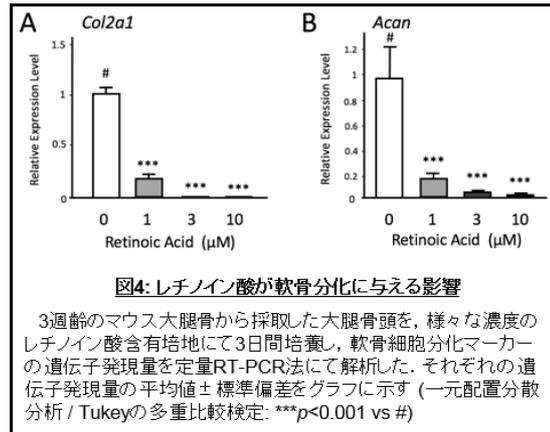
pellet 培養したところ、培養 3 週間後に BMP-2/L51P 共刺激群においてサフラニンOの染色性が増加し(図 3-A)、軟骨細胞分化マーカーである *COL2A1*, *ACAN* の遺伝子発現が有意に上昇した(図 3-B)。また、蛍光免疫組織化学染色の結果、COL のタンパク質の発現量も BMP-2/L51P 共刺激群において高発現していることが確認された(図 3-C)。以上より、L51Pを用いてBMPアンタゴニストの機能を阻害すると、軟骨細胞分化が促進されることが示唆された。



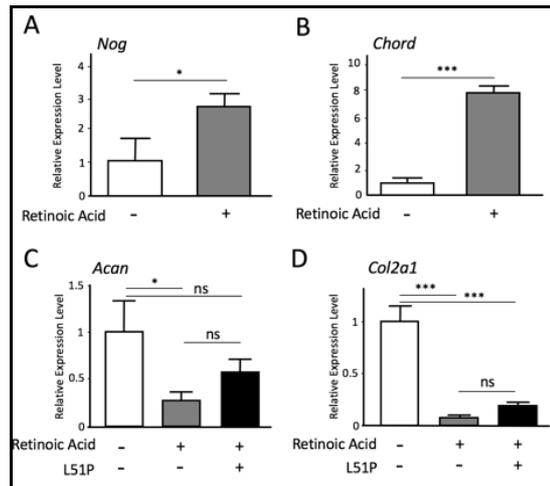
以上より、軟骨細胞分化過程においてもBMPネガティブ・フィードバック機構が働き、軟骨細胞の分化と共に発現が上昇するBMPアンタゴニストにより軟骨細胞分化が制御され、WISP1が間接的にはあるものの、BMPネガティブ・フィードバック機構を介してhBMSCsの軟骨細胞分化を制御している可能性が示唆された。

(3)更に軟骨細胞分化におけるBMPアンタゴニストの役割を解明するため、レチノイン酸

刺激によるOAモデル軟骨細胞を作製した。マウス大腿骨より採取した間葉系幹細胞(mBMSCs)をレチノイン酸含有培地(1, 3, 10 μ M)で3日間培養したところ、レチノイン酸濃度依存的に軟骨細胞分化マーカー(*Col2a1*, *Acan*)の遺伝子発現量は低下した(図4)。



このレチノイン酸誘導性OAモデル軟骨細胞では、レチノイン酸刺激によりBMPアンタゴニスト(*Nog*, *Chord*)の遺伝子発現量の上昇を認め(図5-A, B)、同時に軟骨細胞分化マーカーの遺伝子発現量は低下したが、BMPアンタゴニストの機能阻害剤L51Pを更に添加すると、レチノイン酸刺激により発現が低下した*Col2a1*や*Acan*は、統計学的有意差は認めなかったものの回復傾向を示した(図5-C, D)。これより軟骨の修復や維持にBMP-2と共に、BMPアンタゴニストが深く関与していることが示唆された。



3週齢マウス大腿骨から採取した大腿骨頭を、レチノイン酸(0.06 μ M)ならびにL51P(1000 ng/mL)含有培地にて3日間培養し、BMPアンタゴニストならびに軟骨分化マーカーの遺伝子発現量を定量性RT-PCRにて解析した。それぞれの遺伝子発現量の平均値±標準偏差をグラフに示す。(対応のないt検定: * $p<0.05$, *** $p<0.001$, 一元配置分散分析/Tukeyの多重比較検定: * $p<0.05$, *** $p<0.001$, ns: non significant)

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2件)

van den Bosch MH, Blom AB, Kram V, Maeda A, Sikka S, Gabet Y, Kilts TM, van den Berg WB, van Lent PL, van der Kraan PM, Young MF: WISP1/CCN4 aggravates cartilage degeneration in experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 査読有, 2017; 25(11):1900-1911.

Yoshioka Y, Ono M, Maeda A, Kilts TM, Hara ES, Khattab H, Ueda J, Aoyama E, Oohashi T, Takigawa M, Young MF, Kuboki T: CCN4/WISP-1 positively regulates chondrogenesis by controlling TGF- β 3 function. *Bone*, 査読有, 2015;83:162-170.

[学会発表](計4件)

van den Bosch M, Blom A, Maeda A, Kilts T, van den Berg W, van Lent P, Young MF, van der Kraan P: WISP1/CCN4 Aggravates Experimental Osteoarthritis and Is Associated with Disease Progression in Early Osteoarthritis Patients. 2016 ACR/ARHP Annual Meeting, 2016.11.15, Washington DC (USA)

Maeda A, Yoshioka Y, Ono M, Kilts T, van den Bosch M, Sikka S, Kram V, Blom A, Young M: WISP1/CCN4 and musculoskeletal function. American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2016, 2016.11.14, Saint Petersburg (USA)

大野充昭, 正木明日香, 前田あずさ, Hara ES, 小盛大志, 久保田聡, Young MF, 大橋俊孝, 窪木拓男: 皮膚創傷治癒過程における CCN4/WISP-1 の役割. 第48回日本結合組織学会学術大会, 2016年6月24日, (長崎)

van den Bosch M, Blom A, Maeda A, Kilts T, van den Berg W, van Lent P, Young M, van der Kraan P: WISP1 induces pathology in experimental osteoarthritis and predicts disease progression in early osteoarthritis patients. Annual European Congress of Rheumatology 2016 (EULAR 2016), 2016.6.9, London (UK)

[図書](計1件)

Maeda A, Young M, Ono M: Analysis of CCN4

Function in Osteogenic and Osteoclastic Cells Using Gain and Loss of Function Approaches. *CCN Proteins Methods and Protocols*. Takigawa M ed., Springer Science, 2017;1489:347-359.

[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
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田あずさ (Azusa Maeda)
岡山大学病院・医員
研究者番号: 70754662

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし