

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11019

研究課題名(和文) スクレロスチンによる内軟骨性骨化の制御と骨・軟骨修復への応用

研究課題名(英文) Regulation of endochondral ossification by sclerostin

研究代表者

熊谷 研 (Kumagai, Ken)

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：10468176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：スクレロスチンが軟骨分化へ及ぼす影響についてin vitroにて調査した。軟骨分化誘導下にスクレロスチンを加えると、早期の軟骨分化を促進する一方、後期の軟骨分化を抑制した。これらの反応は、Wnt/ β -cateninシグナルの抑制を介するものであった。また、スクレロスチンの発現を抑制した状況下では、早期の軟骨分化が抑制され、最終分化の石灰化が促進された。以上の結果より、スクレロスチンは軟骨細胞の早期分化には促進因子である一方、後期分化では抑制因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、スクレロスチンは骨形成抑制のみならず、軟骨分化にも重要な役割を果たしている可能性が示された。このメカニズムは軟骨変性や修復および軟骨内骨化を介する骨折治癒などとも関連することが考えられ、今後の研究や臨床応用につながると考えられる。また、骨粗鬆症治療薬として抗スクレロスチン抗体が臨床現場で普及しているが、適応拡大へ発展するための一助となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the effects of sclerostin on chondrogenic differentiation. Addition of sclerostin promoted chondrogenic differentiation in the early stage, but inhibited in the later stage through inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Deletion of sclerostin inhibited early chondrogenic differentiation, and promoted terminal calcification. These results suggested that sclerostin is upregulated in the early stage of chondrogenic differentiation, but it is not required in endochondral ossification.

研究分野：整形外科

キーワード：スクレロスチン 内軟骨性骨化

1. 研究開始当初の背景

軟骨分化の制御は骨・関節疾患に重要な役割をはたしている。骨折では膜性骨化と内軟骨性骨化の2つの骨化過程が共存しながら治癒過程が進んでいくが、軟骨細胞が骨組織へ置換される必要がある。つまりは、内軟骨性骨化の進行が骨癒合の促進に関与すると考えられる。一方、正常の関節軟骨は静止軟骨細胞で占められるが、変性が進むと異常分化により肥大化し、軟骨内骨化の進行による骨棘形成がみられるようになる。したがって、この過程を抑制することが、変形性関節症の進行予防につながると考えられる。軟骨分化の制御には様々な因子が関与するが、その中でも古典的 **Wnt** シグナルは重要な役割を果たすと考えられている。

スクレロステチンは主に骨細胞より産生され、**Wnt** シグナルを阻害して骨形成を抑制することが知られている(図1)。機械的負荷により、骨細胞でのスクレロステチン発現は減少し、一方、負荷のない状態では発現が増加することが報告されている。最近の報告では、関節軟骨におけるスクレロステチン発現の増減と変形性関節症との関連性が示唆されている。したがって、スクレロステチンは骨形成のみならず軟骨分化にも重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられ、スクレロステチンに関連した軟骨修復あるいは軟骨内骨化を利用した骨修復に応用することを目的として研究を行う意義があると考えられた。

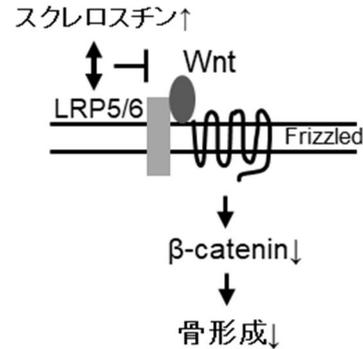


図1 スクレロステチンによる **Wnt** シグナル抑制と骨形成の関係

2. 研究の目的

本研究の目的は、スクレロステチンによる **Wnt** シグナルの制御が軟骨分化の方向性を決定する因子と成り得るかどうか調査することである。スクレロステチンは早期の軟骨分化を促進し、一方、後期の軟骨分化を抑制するという仮説をたて、これを検証する。本研究は軟骨分化制御による骨形成促進を第1のテーマとしている。スクレロステチン抑制により軟骨内骨化の後期分化(肥大軟骨～石灰化)が促進されることが予想され、軟骨分化を骨修復に応用するための新しい治療戦略になると考えられる。一方、それとは逆に軟骨分化を制御して軟骨修復に応用することを第2のテーマとしている。スクレロステチンによる **Wnt** シグナル抑制が軟骨細胞維持に作用すると予想され、軟骨欠損に対する修復や変形性関節症の進行抑制のための治療戦略に成り得ると考える。また、本研究により、骨粗鬆症治療薬として現在臨床で使用されている薬剤の適応拡大につながる可能性がある。

3. 研究の方法

未分化細胞から軟骨細胞への分化および肥大化・石灰化までの *in vitro* 軟骨多段階分化モデルにおいて、各過程に対するスクレロステチンの影響を調査する。

(1)軟骨細胞培養

マウス **embryonal carcinoma** 由来 **ATDC5** 細胞を 6×10^4 個/cm² の細胞数でプレートに播種し、以下の条件で培養を行う。(Shukunami et al. *J Bone Miner Res.* 1997)

開始～培養 20 日目: **DMEM:F12(1:1) + 5%FBS + ITS + ascorbate** (37℃, 5%CO₂ 気層下)

培養 20 日目以降: **αMEM + 5% FBS + ITS + ascorbate** (37℃, 3%CO₂ 気層下)

(2)スクレロステチン添加による軟骨分化への影響

上記軟骨細胞培養においてスクレロステチン **20ng/ml** を開始時から添加し、軟骨分化を評価する。また、培養 20 日目以降(増殖軟骨細胞へ分化した後)からスクレロステチンを添加し、最終分化(石灰化)への影響について評価する。

(3)スクレロステチンの発現抑制と軟骨分化への影響

siRNA によりスクレロステチンの遺伝子発現を抑制する。培養 2 週目と 5 週目で軟骨分化への影響を評価する。また、培養 8 週まで観察し、軟骨最終分化(石灰化)への影響を評価する。

(4)軟骨分化および **Wnt** シグナルの評価

上記実験に対し、以下の解析により評価を行う。

アルシアンブルー染色にて軟骨分化、アリザリンレッド染色にて石灰化を評価する。

培養液中の **GAG** 濃度をアルシアンブルー染色法にて測定する。

リアルタイム **RT-PCR** 法により、軟骨分化関連マーカーとして **Col2a1**, **Col10a1**, **Sox9**, **Runx2**, 軟骨変性マーカーとして **MMP-3**, **MMP13**, **ADAMTS5**, および **Wnt** シグナル関連マーカーとして **Wnt3a**, **Wnt5a**, **LRP5**, **LRP6**, **Axin1**, **Axin2**, **CTNNB1** などの発現を半定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) 軟骨細胞におけるスクレロスチンの発現

マウスの関節軟骨細胞においてスクレロスチンの発現が確認された(図 2a)。ATDC5 細胞を軟骨分化誘導するとアルシアンブルーの染色が確認され(図 2b)、それに伴い **SOST** 遺伝子の発現が増加した(図 2c)。Col2a1 の発現(図 2d)が減少するタイミングで **SOST** の発現も減少し、一方で **Col10a1** の発現(図 2e)が増加した。以上より、**SOST** の発現は軟骨分化に伴い増加するが、軟骨分化の後期においては減少することが確認された。

(2) スクレロスチン添加による早期軟骨細胞分化への影響

ATDC5 細胞の軟骨分化誘導において、スクレロスチンを添加すると、非添加の対照群と比較して **GAG** 濃度は有意に増加した ($P < 0.05$) (図 3a)。また、スクレロスチンを添加した場合、軟骨分化早期のマーカーである **Sox9** および **Col2a1** の発現は有意に増加した ($P < 0.05$) が、後期分化のマーカーである **Col10a** は有意に減少した ($P < 0.05$) (図 3b)。Wnt/ β -catenin シグナルに関連する **Wnt3a**, **Wnt5a**, **LRP5**, **LRP6**, **Axin2**, β -catenin の発現は、スクレロスチン添加により有意に抑制された ($P < 0.05$) (図 3c)。以上の結果から、スクレロスチンは Wnt/ β -catenin シグナルを抑制し、早期軟骨分化を促進することが示唆された。

(3) スクレロスチン添加による後期軟骨細胞分化への影響

ATDC5 細胞の軟骨分化誘導において、スクレロスチンを培養 3 週以降で添加すると、最終分化である石灰化が有意に抑制された ($P < 0.05$)

(図 4a, b)。また、スクレロスチン添加により、**Sox9** および **Col2a1** の発現は有意に増加した ($P < 0.05$) (図 4c)、**Runx2**, **Col10a** の発現は有意に減少した ($P < 0.05$) (図 4d)。さらに、軟骨変性のマーカーである **MMP-3**, **MMP13**, **ADAMTS5** の発現は有意に減少した ($P < 0.05$) (図 4e)。以上の結果から、スクレロスチンは後期軟骨分化を抑制することが示唆された。

(4) スクレロスチン抑制による軟骨細胞分化への影響

ATDC5 細胞の軟骨分化誘導において、スクレロスチン遺伝子(**SOST**)をノックダウンすると、培養 2 週後の **SOST** の発現は減少した ($P < 0.05$)、**Sox9** および **Col2a1** の発現も減少した ($P < 0.05$) (図 5a)。さらにスクレロスチン遺伝子をノックダウンして培養 5 週後では、**Col10a1**, **Runx2**, **MMP-3**, **MMP-13** の発現は有意に増加した ($P < 0.05$) (図 5b)。また、軟骨最終分化の石灰化については、同時期の対照群と比較して、スクレロスチン遺伝子をノックダウンした群のほうが有意に促進された ($P < 0.05$) (図 5c, d)。以上の結果から、スクレロスチンは軟骨細胞の早期分化には促進因子である一方、後期分化では抑制因子であることが示唆された。

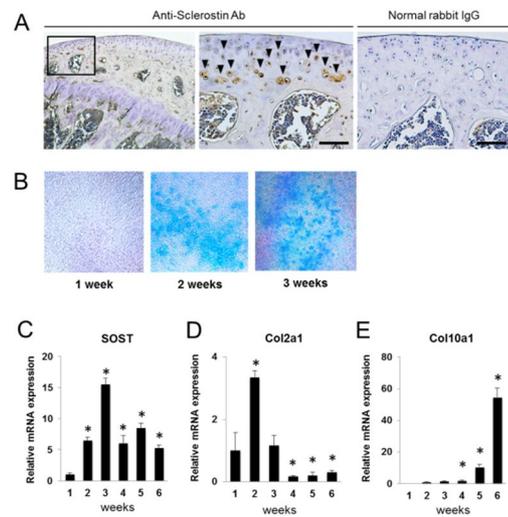


図 2 軟骨分化とスクレロスチンの発現

N=4, * $P < 0.05$ vs control

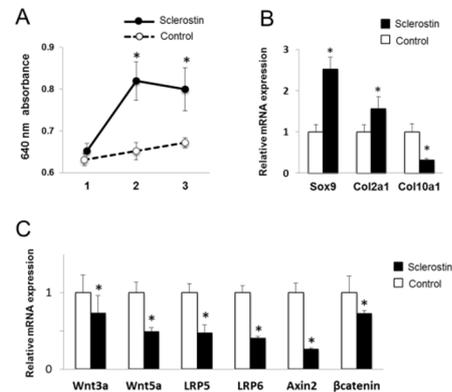


図 3 スクレロスチンによる早期軟骨分化の促進

N=4, * $P < 0.05$ vs control

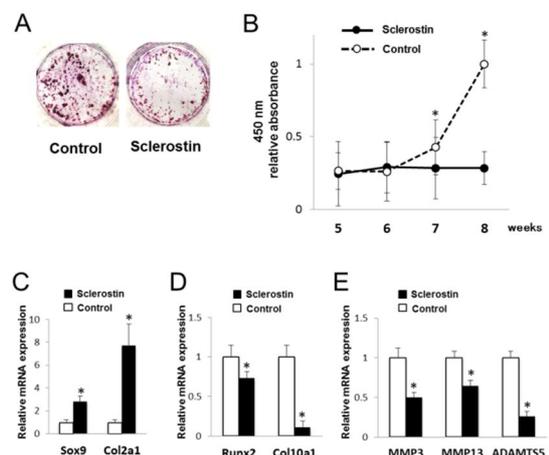


図 4 スクレロスチンによる後期軟骨分化の抑制

N=4, * $P < 0.05$ vs control

(5)まとめ

本研究により、スクレロチンは軟骨分化の早期には必要とされ、後期では不要となる可能性が考えられ、これは増殖軟骨細胞の維持に作用することを示唆する。スクレロチンは骨形成抑制のみならず、軟骨分化にも重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられ、今後は軟骨変性や軟骨修復との関連についても調査を行う必要がある。

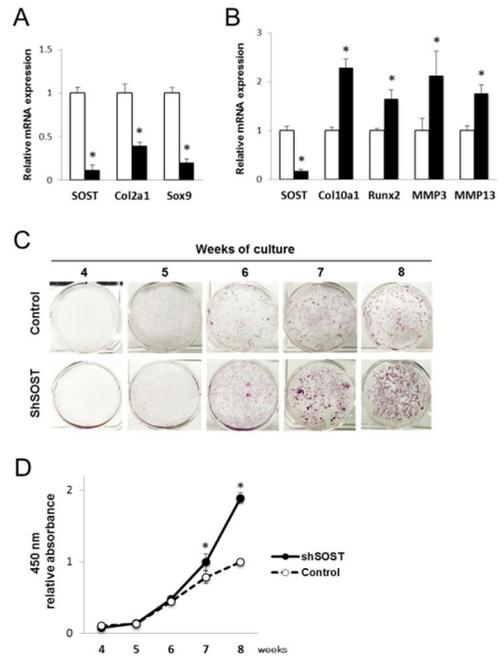


図 5 SOST ノックダウンによる軟骨分化の影響
N=4, *P<0.05 vs control

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Y, Kumagai K, Imai S, Miyatake K, Saito T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sclerostin is upregulated in the early stage of chondrogenic differentiation, but not required in endochondral ossification in vitro.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0201839. eCollection 2018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口泰輝, 熊谷研, 宮武和馬, 今井宗典, 田辺博宣, 齋藤知行
2. 発表標題 スクレロスチンがWntシグナルと軟骨分化に及ぼす影響
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 熊谷 研, 山口泰輝, 宮武和馬, 今井宗典, 齋藤知行
2. 発表標題 低出力超音波パルス(LIPUS)による内軟骨性骨化の促進とスクレロスチン発現に及ぼす影響
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yamaguchi Y, Kumagai K, Tanabe H, Imai S, Miyatake K, Saito T.
2. 発表標題 Sclerostin is upregulated in early stage of chondrogenic differentiation, but not required in endochondral ossification
3. 学会等名 ORS 2017 Annual Meeting
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Miyatake K, Kumagai K, Imai S, Inaba Y.
2. 発表標題 Sclerostin inhibits IL-1 induced late stage chondrogenic differentiation thorough Wnt/ -catenin signaling pathway
3. 学会等名 ORS 2020 Annual Meeting
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
研究分担者	齋藤 知行 (Saito Tomoyuki) (30170517)	横浜市立大学・医学研究科・教授 (22701)	