

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09682

研究課題名(和文)変形性関節症の発症予防を目指したWISP遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)The functional analysis of WISP1 gene aimed at the prevention of osteoarthritis

研究代表者

前田 あずさ (Maeda, Azusa)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70754662

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)：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WISP1 遺伝子に着目し、変形性関節症(OA)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に行った。WISP1遺伝子欠損マウスで作製したOAモデルマウスでは、野生型と比較し変形性関節症の進行が抑制されていることが明らかとなり、その背景として、WISP1欠損マウスで作製したOAモデルマウスの関節組織では軟骨基質分解酵素の遺伝子発現が抑制されており、WISP1が軟骨組織の細胞外基質分解酵素の分泌を促進することで変形性関節症の発症・進行に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでに変形性関節症の原因遺伝子のひとつであると推測されてきたWISP1遺伝子が、膝関節において軟骨組織分解酵素の分泌を促進することで、変形性関節症の発症と進行に関与している可能性が示された。変形性関節症は、現在国民が要支援となる最大の原因となっており、その病態の解明は急務であるが、この研究成果を更に発展させることができれば、変形性関節症の治療法ならびに予防法の確立につながる事が期待される。

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 found that severity of OA mouse models in the Wisp1 deficient (Wisp1-KO) mouse was milder compared to wild type mouse. We also found that expression level of genes related to the extracellular matrix degrading proteases in the Wisp1-KO-OA knee joint tissue was lower compared to wildtype, it is suggesting that WISP1 is involved in pathogenic mechanism and progress of OA by promoting the secretion of ECM-degrading proteases.

研究分野：歯学・補綴歯学系

キーワード：変形性関節症 WISP1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は平成 19 年に超高齢社会に突入し、現在も高齢化率は上昇し続けている。団塊の世代が後期高齢者を迎える平成 37 年、即ち 2025 年問題を目前に控えた今、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。国民が要支援となる原因の第 1 位は関節疾患であるが、その関節疾患の大部分を占める変形性関節症 (Osteoarthritis: OA) 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ものの、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である。

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。そこで申請者らは、硬組織における WISP1 遺伝子の役割を *in vivo* にて明らかにするため、WISP1 遺伝子欠損 (*Wisp1*-KO) マウスを作製し、骨の表現型を解析した。その結果、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 (図 1)。ここで興味深いことに、*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 2)、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。そして、申請者らは *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 (図 3)。

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

(1) OA を発症したヒト膝関節軟骨において WISP1 の遺伝子ならびにタンパク質が高発現していることが報告されているが、高発現している WISP1 が OA の発症と病態の進展にどのように関わっているのかを解明するため、以下 3 種類の OA モデルマウスを作製した。加齢モデル: 3、6、12 ヶ月齢の野生型ならびに WISP1 遺伝子欠損マウス (*Wisp1*-KO) から膝関節を回収し、加齢に伴う膝関節軟骨への経時的変化を観察した。機械的負荷モデル: 12 週齢マウスの内側半月板の脛骨半月板靭帯 (MMTL) を外科的に切断することで膝関節軟骨への機械的負荷を増強させる内側半月板不安定性モデルを作製し、8 週間後に膝関節組織を回収した。炎症誘発モデル: 12 週齢マウス膝関節の関節腔にコラゲナーゼを投与して炎症を惹起し、6 週間後に膝関節組織を回収した。

(2) *Wisp1*-KO マウスでの OA 重症化抑制に関わる因子を調べるため、3 ヶ月齢の野生型ならびに *Wisp1*-KO マウスを用いて炎症誘発 OA モデルを作製し、7 日後に回収した滑膜組織から RNA を抽出、リアルタイム RT-PCR 法にて軟骨基質破壊に関連する遺伝子の発現レベルを測定した。

(3) WISP1 遺伝子の有無による軟骨基質分解酵素の mRNA 発現量の違いが、実際に軟骨組織の破壊に関係しているかどうかを確認する目的で、野生型と *Wisp1*-KO マウスを用いて炎症誘発 OA モデルマウスを作製し、6 週間後に回収した膝関節で作製した組織切片にて、タンパク質分解酵素で切断されたアグリカンの局在を確認することができるネオエピトープ抗体を用いた免疫組織化学を行った。

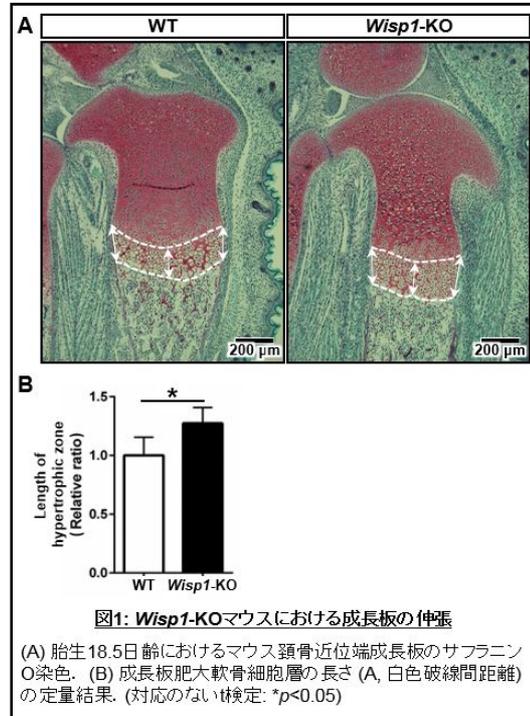
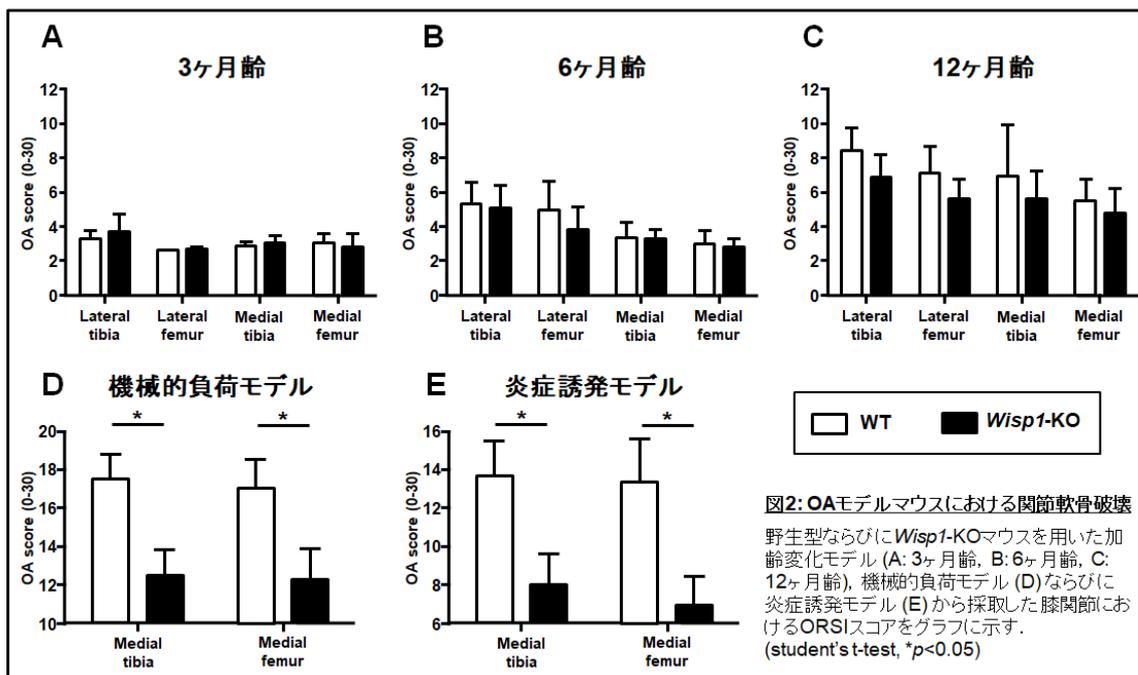


図1: *Wisp1*-KOマウスにおける成長板の伸張

(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ニン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: \* $p < 0.05$ )

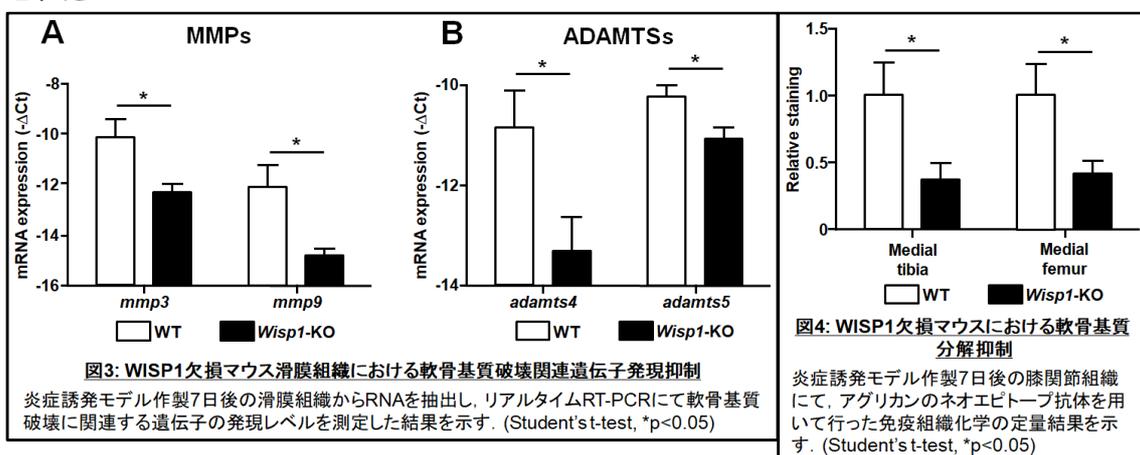
#### 4. 研究成果

(1) 加齢モデルマウスでは、3ヶ月と比較して6ヶ月、12か月のマウス膝関節において OARSI スコアが高い値を示しており、加齢に伴い膝関節症が誘発されていることが確認されたが、野生型と *Wisp1*-KO マウスとの比較ではいずれの月齢においても OARSI スコアに有意差は認められなかった (図 2-A-C) . 3ヶ月齢マウスの機械的負荷 OA モデル (図 2-D) ならびに炎症誘発 OA モデル (図 2-E) においても OARSI スコアが上昇しており、関節軟骨の破壊が認められたが、*WISP1* 欠損マウスでは野生型と比較して軟骨破壊が有意に抑制されていた。このことから、*WISP1* は変形性関節症の発症・重症化発生に関与している可能性が考えられた。



(2) 炎症誘発 OA モデル作製 7日後の滑膜組織では、細胞外基質の分解に関わる *mmp3*, *mmp9* (図 3-A), *adamts4*, *adamts5* (図 3-B) の遺伝子発現量が *Wisp1*-KO マウスで低下しており、*WISP1* が MMP や ADAMTS といった細胞外基質分解酵素の分泌を促進することで、OA を悪化させている可能性が示唆された。

(3) *Wisp1*-KO マウスで作製した炎症誘発 OA モデルマウスの膝関節軟骨組織では、野生型と比較してアグリカンのネオエピトープ抗体を用いた免疫組織化学の発色が低下しており (図 4), *Wisp1*-KO マウスの膝関節軟骨組織ではアグリカンのタンパク質分解性が低下していることが確認された。このことより、*WISP1* は膝関節において軟骨基質分解酵素の分泌を促進することで OA を悪化させている可能性について、遺伝子レベルのみならずタンパク質レベルにおいても確認された。



本研究において、*Wisp1*-KO マウスで作製した OA モデルマウスでは野生型と比較して変形性関節症の進行が抑制されていることが示された。その背景として、*Wisp1*-KO マウスでは軟骨基質分解酵素の遺伝子発現が抑制されており、*WISP1* が軟骨組織の細胞外基質分解酵素の分泌を促進することで、OA の発症・進行に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	窪木 拓男  (Kuboki Takuo)  (00225195)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	
研究分担者	大野 充昭  (Ono Mitsuaki)  (60613156)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授   (15301)	
研究分担者	ハラ エミリオ・サトシ  (Hara Emilio Satoshi)  (40779443)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・研究准教授   (15301)	
研究分担者	吉岡 裕也  (Yuya Yoshioka)  (20782014)	岡山大学・大学病院・医員   (15301)	削除：2019年4月11日

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