

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390469
 研究課題名（和文） Wnt/LRPシグナルを介した骨芽細胞と破骨細胞の分化・機能制御の分子機構
 研究課題名（英文） Molecular mechanisms on differentiation or function of osteoblasts and osteoclasts by the Wnt/LRP signaling pathway
 研究代表者
 田村 正人 (MASATO TAMURA)
 北海道大学・大学院歯学研究科・教授
 研究者番号：30236757

研究成果の概要（和文）：

骨形成と骨吸収の調節のしくみに関して、骨芽細胞と破骨細胞の分化と機能に Wnt シグナルと骨誘導因子(BMP)シグナルの2つのシグナル伝達経路のクロストークが重要な役割を果たしていることを明らかにした。骨吸収阻害活性を有するオステオプロテグリンがこれらの2つのシグナルの標的分子であり、その調節の機構として、それぞれのシグナル伝達経路のシグナル分子間の相互作用を介していることを見出した。また、ある種の miRNA が骨芽細胞分化に関与し BMP はそのプロセッシングを調節した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we demonstrated that two cellular signaling pathways of Wnt and bone morphogenetic protein (BMP) control both differentiation and function of osteoblasts and osteoclasts during processes of bone formation and resorption. These Wnt and BMP signaling regulates osteoprotegerin (OPG), also known as osteoclastogenesis inhibitory factor, which can inhibit the production of osteoclasts. The regulation of OPG expression is mediated through two transcription pathways such as Wnt and BMP that involve the OPG promoter. We also demonstrated that osteoblastic differentiation mediated by certain miRNA expression and BMP-2 down-regulates miR-206 expression at the post-transcriptional level and that BMP-2 could regulate miRNA biogenesis by a novel mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：骨形成, 骨吸収, Wnt シグナル, 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

これまでに、研究代表者らは、骨芽細胞分

化における Wnt シグナルと BMP-2 シグナルのクロストークを見出した。しかしながら、

骨芽細胞分化に必須の転写因子である β -catenin の役割の重要性は解明されたにもかかわらず、LRP5 の変異によってなぜ骨形成が変化するのか、骨組織特異的な Wnt-LRP 系シグナル分子が存在するか、骨芽細胞の分化と破骨細胞分化の制御のシステムの全貌は明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、骨芽細胞分化と破骨細胞分化のクロストークを介する分子としての Wnt/LRP シグナルおよび β -catenin の機能を解明することを目的とする。さらに、 β -catenin のユビキチン・プロテオソーム系における分解制御ならびに miRNA による翻訳制御の機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Wnt/LRP シグナリングの骨芽細胞の OPG 及び RANKL 産生に及ぼす分子機構の解明

マウス OPG 遺伝子プロモーターをクローニングし、 β -catenin による転写活性化領域を解析した。BMP-2 が OPG ならびに RANKL 産生に及ぼす影響を及ぼすか調べた。クロマチン免疫沈降法や EMSA 法を用いて転写調節因子複合体を調べた。また、tRNaseZ utilizing ノックダウン法を用いて、Wnt/LRP シグナルに応答する OPG ならびに RANKL タンパク質にどのような影響を与えるかを ELISA 法、Western Blot 法を用いて測定した。

(2) Wnt シグナリング活性化薬剤の開発

Wnt シグナルを増強する sgRNA を数種類化学合成し、C2C12 細胞等の培養系に導入した。アルカリフォスファターゼ活性染色、von Kossa 染色やリアルタイム RT-PCR を用いて Runx2, osterix, typeI collagen, osteocalcin, アルカリフォスファターゼ, BSP, MEPE, MMP-13 などの mRNA の発現量を測定し、骨芽細胞分化に対する評価を行った。

(3) Wnt, LRP ならびに種々のシグナル分子の組換えタンパク質の作製

発現プラスミドを培養細胞に導入して、培地中に分泌された組換えタンパク質を回収、精製を行った。

(4) Wnt の Non canonical なシグナル経路と骨芽細胞分化の関連性の検討

Wnt5a 発現プラスミドを導入した C2C12 細胞および MC3T3-E1 細胞における Runx2, osterix, typeI collagen, osteocalcin, アルカリフ

ォスファターゼ, BSP, MEPE, MMP-13 などの mRNA の発現量をリアルタイム PCR や RT-PCR 法で測定し、骨芽細胞分化に対する評価を行った。

(5) Wnt シグナリングの in vivo における骨形成・骨吸収活性の検討

Wnt シグナリングの in vivo における骨形成・骨吸収の程度を測定し評価した。

(6) miRNA による Wnt/LRP シグナリングの応答分子の修飾の分子機構の解明

Wnt シグナルに応答し発現量の変化する miRNA を miRNA 発現アレイにより検討した。発現量に変化が見られた miRNA に関してリアルタイム PCR を用いて定量的に調べた。また、これら miRNA をノックダウンさせて、Wnt/LRP シグナルに応答する OPG ならびに RANKL や Runx2, osterix, typeI collagen, osteocalcin, アルカリフォスファターゼなどの mRNA の発現にどのような影響を与えるかを RT-PCR 法などを用いて測定した。

(7) Wnt シグナリングにおける骨芽細胞特異的シグナル分子の同定

シグナル分子が会合し相互作用するタンパク質のスクリーニングを行い、その cDNA 分子のクローニングを試みた。得られた cDNA については、その分子会合が及ぼすシグナル機構を修飾し、骨形成に関わるいかなる遺伝子発現を制御するのか、その分子機構を調べた。

(8) ユビキチン化と骨芽細胞分化の関連性の検討

β -catenin 分子の数か所のユビキチン化に関与する候補部位を変異させた数種類のコンストラクトを作製し、骨芽細胞分化に対する影響を調べた。C3H10T1/2 細胞、C2C12 細胞に Z-Leu-Leu-Leu-CHO など種々のプロテオソーム阻害剤を加え培養し、それらの影響を調べた。また、Tcf-4 などの SUMO 化による制御を受けるターゲット因子とその制御機構と骨芽細胞分化との関連性を検討した。

4. 研究成果

(1) マウス OPG 遺伝子プロモーター領域 1.5kb をクローニングし、ルシフェラーゼレポーターコンストラクト OPG1478-luc を作製した。OPG1478-luc の転写活性は、活性化型 β -catenin もしくは Wnt3a によって 10 倍以上上昇した。この β -catenin による転写活性化領域を同定するために、4つの欠失レポーター

コンストラクトを作製した。活性型 β -catenin による反応性を有する領域に存在する *Lef/Tcf1* 認識部位をコンピューター解析したところ、4つの候補部位が見出された。そこでこれらの4つの部位の変異レポーターコンストラクトを作製した。これらのコンストラクトを用いた解析から *site2* と *site4* が、活性型 β -catenin の応答に関与することが明らかになった。クロマチン免疫沈降法や EMSA 法を用いた解析から、この2つの部位における転写調節因子複合体に β -catenin および *Tcf1* の存在が明らかになった。

(2) C2C12 細胞では OPG の産生は Wnt/ β -catenin (図1) 及び BMP-2 によって増大した。破骨細胞分化を抑制し、この作用を PTH や活性型ビタミン D が修飾することが考えられた。一方、RANKL の発現は Wnt/ β -catenin 及び BMP-2 いずれによっても抑制された (図2)。

図1 OPGの産生

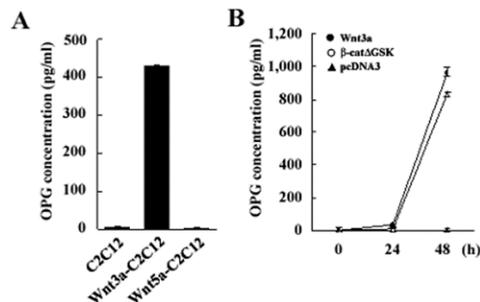
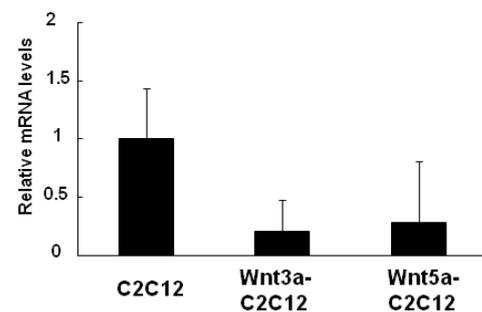


図2 RANKLの産生



(3) C2C12細胞におけるIP-Western法を用いた解析から β -catenin と BMP-2 シグナルの *Smad1* が細胞内において複合体を形成すること、クロマチン IP 法を用いた解析から β -catenin と *Smad1* が OPG 遺伝子プロモーターの *site 2* 及び *site 4* に結合することを見出した。Site 2 および *site 4* は、研究代表者によって同定された OPG 遺伝子プロモーターの古典的 Wnt シグナル応

答領域である。以上の結果から、これらの分子の複合体によって骨芽細胞の OPG 遺伝子発現を制御していることが明らかになった。

(4) Wnt の Non canonical なシグナル経路と骨芽細胞分化の関連性の検討したところ、Wnt5a-C2C12 細胞では、ある miRNA の発現量が減少していることが明らかとなった。Non canonical な Wnt シグナル経路が骨芽細胞分化と関連している可能性が示唆された。

(5) 作製した Wnt シグナル分子組換えタンパク質及び Wnt シグナルを活性化させる sgGSKL について、生体内での骨形成促進効果を調べるため、雄 4 週齢 Jcl:ICR マウスを用い評価を行った。0.5-5 nmol の種々の濃度の 2'-O-methyl sgGSKL RNA もしくは pRNA Tin-H1.2/Neo-sgGSKL の連続投与によって骨の厚さの増大が観察された。このことから Wnt シグナルがマウス個体においても骨形成誘導活性を有する可能性が示唆された。

(6) 骨芽細胞分化における種々の miRNA の変動についてリアルタイム PCR 法を用いて調べた。C2C12 細胞において BMP-2 によって miR-206 の発現が著しく低下すること、この低下には miR-206 のプロセシングの抑制を介することが明らかになった。他方、Wnt シグナルによる miR-206 の発現低下には、異なる機構の存在が示唆され、miRNA によって Wnt シグナリングの応答分子を修飾しうる可能性が考えられた。

(7) Wnt シグナルの有無における miRNA の発現変化について miRNA アレイを用いて調べた。C2C12 細胞で Wnt3a の発現によって発現量が増大する miRNA と減少する miRNA をそれぞれ数種類ずつ同定した。さらにリアルタイム PCR 法を用いてそれらの変動量を詳細に調べた。Wnt3a の発現によって増加した miRNA は、MC3T3-E1 細胞においても発現が高い miRNA であった。これらの miRNA をノックダウンさせたところ、RANKL や *Runx2* の mRNA の発現が減少した。これらより、これらの miRNA の発現は骨芽細胞分化と何らかの関連性があることが考えられた。

(8) 骨髄ストローマ細胞のケモカインの発現量を ELISA 法によって測定したところ Wnt シグナルによって調節されていることを見出した。

(9) GSK-3 β を抑制させ Wnt シグナリングを活性化させる sgGSKL について、2'-Bridged

Nucleic Acid (LNA: Locked Nucleic Acid)をいくつかの塩基に挿入した種々の 2'-O-メチル化 RNA を化学合成によって作製した。これらの sgRNA を、C2C12 細胞、CH310T1/2 細胞等にトランスフェクションして、リアルタイム RT-PCR 法などにより、骨芽細胞の分化の指標となる mRNA 発現などに及ぼす影響を調べた。LNA 塩基によるノックダウン活性を調べたところ、ある部位への LNA 塩基の挿入はノックダウン効果を増大させた。

(10) β -catenin 分子の数か所のユビキチン化に関与する候補部位を変異させた数種類のコンストラクトを作製し、骨芽細胞分化に対する影響を調べたところ、ALP 活性が増大した。また、種々のプロテオソーム阻害剤を用いて骨芽細胞や破骨細胞の分化に与える影響を調べたところ、骨芽細胞の分化を促進し破骨細胞の形成や機能を抑制することが明らかになった。

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 12 件) すべて査読あり

1. Tamura M, Nemoto E, Sato MM, Nakashima A, Shimauchi H.: Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. *Front Biosci*. E2: 1405-1413, 2010.
2. Ohkubo N, Ishisaki A, Iizuka T, Tamura M, Kitagawa Y.: Vascular cell-like potential of undifferentiated ligament fibroblasts to construct vascular cell-specific marker-positive blood vessel structures in a PI3K-activation-dependent manner. *J Vasc Res*, 47(5): 369-383, 2010.
3. Sato MM, Nashimoto M, Katagiri T, Yawaka Y, Tamura M.: Bone morphogenetic protein -2 down-regulates miR-206 expression by blocking its maturation process. *Biochem Biophys Res Commun*. 383(1):125-9, 2009. <http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/38314>
4. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H.: Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone*, 44(5):805-12, 2009.
5. Wada Y, Mizuno M, Tamura M.: Enamel matrix derivative neutralized the effect of lipopolysaccharide on osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand expression of osteoblasts. *Arch Oral Biol*. 54(4):306-12, 2009.
6. Shirai K, Ishisaki A, Kaku T, Tamura M, Furuichi Y.: Multipotency of clonal cells derived from swine periodontal ligament and differential regulation by fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein. *J. Periodontal. Res.*, 44(2):238-247, 2009.
7. Elbarbary RA, Takaku H, Tamura M, Nashimoto M.: Inhibition of vascular endothelial growth factor expression by TRUE gene silencing. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(4):924-7, 2009.
8. Sato MM, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M.: Bone morphogenetic protein-2 enhances Wnt/ β -catenin signaling-induced osteoprotegerin expression. *Genes Cells*, 14(2): 141-153, 2009. <http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/38890>
9. Fujisawa R, Mizuno M, Tamura M.: Effect of dentin phosphoprotein on phosphate-induced apoptosis of odontoblast-like cells. *Cells Tissues Organs*, 189(1-4): 60-64, 2009.
10. Wada Y, Mizuno M, Yamamoto E, Nambu S, Tamura M.: The suppressive effect of enamel matrix derivative on osteocalcin gene expression of osteoblast is neutralized by an antibody against TGF- β . *J. Periodont.* 79(2): 341-347, 2008.
11. Ibi M, Ishisaki A, Yamamoto M, Wada S, Kozakai T, Nakashima A, Iida J, Takao S, Izumi Y, Yokoyama A, Tamura M.: Establishment of cell lines that exhibit pluripotency from miniature swine periodontal ligaments. *Arch. Oral Biol*. 52(10): 1002-1008, 2007.
12. Nakashima A, Takaku H, Shibata HS, Negishi Y, Takagi M, Tamura M, Nashimoto M.: Gene-silencing by the tRNA maturase tRNase ZL under the direction of small

guide RNA. *Gene Therapy*, 14: 75-85, 2007.
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/20042>

〔学会発表〕（計 12 件）

1. 高橋昌幸、阿部真由美、中島愛子、野崎忠輔、リアド・エルバリバリ、渡部紀宏、西田浩志、佐野峻子、高久洋暁、成田美和子、高橋益廣、田村正人、梨本正之：ヒトBcl-2 mRNAを標的とする裸のRNA heptamer によるアポトーシスの誘導。第11回日本RNA学会年会（第11回RNAミーティング），2009年7月29日，新潟。
2. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H.: Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai. January 14, 2009, Sendai, Japan.
3. Sato M, Yawaka Y, Tamura M.: Regulation of miR-206 expression by bone morphogenetic protein-2 through post-transcriptional microRNA maturation in myoblastic C2C12 cells. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science in Sendai, January 14, 2009, Sendai, Japan.
4. 佐藤真理，八若保孝，田村正人. : BMP-2とWntシグナルによるmiR-206発現調節と細胞分化制御。第31回日本分子生物学会、第81回日本生化学会大会合同大会（BMB2008）2008年12月9日，神戸。
5. Sato M, Nashimoto M, Kanayama D, Yawaka Y, Tamura M.: Noncanonical Wnt signaling is involved mir-206 expression in osteoblastic differentiation. 30th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research September 14, 2008 Montreal, Quebec, Canada.
6. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman M, Shimauchi H.: Wnt/beta-catenin inhibits cementoblast differentiation in vitro. 86th General Session & Exhibition of the

IADR Toronto, Canada, July 2-5, 2008.

7. 佐藤真理，田村正人，八若保孝：Wnt/ β -cateninシグナルによって誘導される遺伝子のosteoprotegerin発現調節機構の解析。第46回日本小児歯科学会大会，2008年6月12日，大宮。
8. 佐藤真理，八若保孝，田村正人：Wnt/ β -cateninとBMP-2シグナルによるosteoprotegerin遺伝子の発現調節。日本分子生物学会第8回春季シンポジウム，2008年5月26日，札幌。
9. Sato M, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M.: Identification of a novel Wnt/ β -catenin response element in the osteoprotegerin gene promoter and its regulation with bone morphogenetic protein-2 signaling. The 28th Sapporo Cancer Seminar, Sapporo, Jun. 26, 2008.
10. 佐藤真理，八若保孝，田村正人：Wnt/ β -cateninシグナルによって誘導されるosteoprotegerin遺伝子の発現調節機構の解析。第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会合同大会（BMB2007）2007年12月19日，横浜。
11. Sato M, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, and Tamura M.: Identification of a novel Wnt/ β -catenin response element in the osteoprotegerin gene promoter and its regulation with bone morphogenetic protein-2 signaling. 29th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research September 16, 2007. Honolulu, HI, USA.
12. 佐藤真理，田村正人：Wnt/ β -cateninとBMP-2シグナルによるOPG遺伝子の発現調節機構の解析。第25回日本骨代謝学会学術大会，2007年7月19日，大阪。

〔図書〕（計 3 件）

1. Sato M, Yawaka Y, Tamura M.: Regulation of microRNA expression by bone morphogenetic protein-2. *Interface Oral Health Science* 2009, p158-160. T. Sasano, O. Suzuki (Eds.) Springer, 2010. ISBN: 978-4-431-99643-9.
2. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S,

- Tsuchiya M, Tamura M, Somerman M, Shimauchi H.: Wnt/beta-catenin inhibits cementoblast differentiation. Interface Oral Health Science 2009, p113-115. T. Sasano, O. Suzuki (Eds.), Springer, 2010. ISBN: 978-4-431-99643-9.
3. Sato M, Nakashima A, Nashimoto M, Yawaka Y, Tamura M.: Regulation of osteoprotegerin and RANKL gene expression by Wnt/ β -catenin and bone morphogenetic protein-2 in C2C12 cells. Interface Oral Health Science 2007, p173-178. M. Watanabe, O. Okuno (Eds.), 2008, Springer. ISBN: 978-4-431-76689-6

[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

<http://www.den.hokudai.ac.jp/seika/SeikaPub.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田村 正人 (TAMURA MASATO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30236757

(2)研究分担者

梨本 正之 (NASHIMOTO MASAYUKI)
新潟薬科大学・応用生物学部・教授
研究者番号：30228069

根本 英二(NEMOTO EIJI)
東北大学・大学院歯学研究科・講師
研究者番号：40292221
平成 2 1 年度

石崎 明(ISHISAKI AKIRA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：20356439
平成 1 9, 2 0 年度

(3)連携研究者

該当なし