

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22728

研究課題名(和文) Wntシグナル活性を指標としたプロテオゲノミクス探索解析による骨形成促進薬の開発

研究課題名(英文) Development of bone anabolic drugs via evaluation of Wnt activity

研究代表者

中道 裕子(Nakamichi, Yuko)

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授

研究者番号：20350829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル下流新規骨形成促進因子と抑制因子を見つけるため、Wnt活性の上昇と低下に応じて細胞死を誘導するシステムを確立し、TGF β ファミリー分子がWntシグナル促進に関与することを見出した。Wnt3a処理した骨髄間葉細胞をリン酸化タンパク質量分析に供すると、5つの培養replicateにおいて上昇するリン酸化ペプチドを得た。骨髄間葉細胞の骨芽細胞分化および脂肪細胞分化過程において、TGF β ファミリーのシグナルが大きく変動していた。WntレポーターAxin2-tomatoマウスを用いた骨折治癒モデルにおいて、Wnt応答性にTGF β ファミリー分子が治癒促進に貢献することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本は、現在高齢化社会にあり、骨粗鬆症患者急増が社会問題となっている。現在の骨粗鬆症治療薬は骨吸収抑制薬が主流であるが、骨吸収抑制薬は骨形成も低下させ、骨質低下が生じる問題点がある。一方、上市されている骨形成促進薬は、副甲状腺ホルモン製剤と細胞外Wnt阻害タンパクであるスクレロスタチンの中和抗体の2種類しかないが、どちらも安全性に懸念があり、長期に用いることは出来ない。骨粗鬆症治療は長期に渡るため、両者とは異なる作用機構の骨形成促進薬の開発が喫緊の課題である。本研究の成果は、既存の骨形成促進薬と異なる分子ターゲットを提案し、治療が難しい続発性骨粗鬆症の治療法確立に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To find novel downstream bone formation activators and inhibitors of Wnt signaling, we established a system to induce cell death in response to both elevated and decreased Wnt activities. Using this system, we found that a TGF β family molecule was involved in the promotion of bone formation downstream of Wnt signaling. Phospho-Mass spectrometry analysis revealed that this TGF β family molecule was phosphorylated in response to Wnt3a in five bone marrow stromal culture replicates. The expression of this TGF β family molecule was upregulated during osteoblast differentiation, and downregulated in accordance with adipocyte differentiation of bone marrow stromal cells. In a bone fracture healing model using Wnt reporter Axin2-tomato mice, we found that this TGF β family molecule contributes to bone fracture healing in Wnt responder cells.

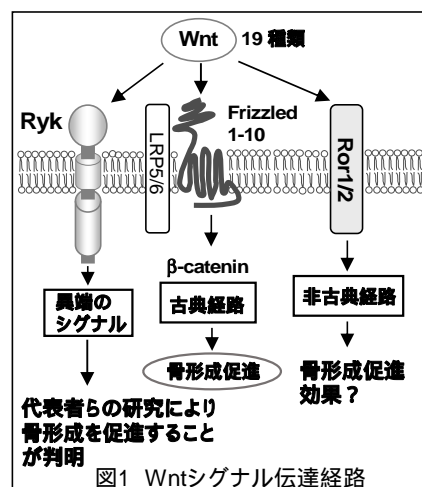
研究分野：分子生物学、口腔生化学

キーワード：Wnt 骨形成 リン酸化質量分析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上市中の骨形成促進薬が副甲状腺ホルモン(PTH)製剤テリパラチド1剤のみだったので、骨形成促進薬の開発が望まれ、代表者もまた開発のための基礎研究に努めてきた。代表者による活性型ビタミンD製剤の研究は、活性型ビタミンD製剤が骨吸収抑制薬であることを証明した(Nakamichi Y et al., J Bone Miner Res 2017)。代表者らは、古典・非古典経路双方に参与し異端 Wnt 受容体と呼ばれる Ryk に着目し、骨芽細胞特異的 Ryk KO マウスを作製し表現型を解析した(Kim et al., PNAS 2019)。その結果 Ryk シグナルは骨形成促進シグナルであることが判



明した(図1)。一方で Ryk リガンドや下流の分子については判然としていない。以上の経緯により Wnt シグナルに着目し、バイアスのかからない方法による本課題「Wnt シグナル活性を指標としたプロテオゲノミクス探索解析による骨形成促進薬の開発」の構想に至った。

2. 研究の目的

日本は高齢化社会を迎え、骨粗鬆症患者が急増しその対策が急務となっている。骨粗鬆症治療薬には、骨吸収抑制薬と骨形成促進薬があるが、前者が主流である。しかし骨吸収を抑制すると、骨形成が低下し、骨質低下が生じる問題点がある。一方、上市されている骨形成促進薬は、PTH製剤と細胞外 Wnt 阻害タンパクであるスクレロスチンの中和抗体の2種類しかないが、どちらも安全性に懸念があり、長期に用いることは出来ない。骨粗鬆症治療は長期に渡るため、両者とは異なる作用機構の骨形成促進薬の開発が喫緊の課題である。骨粗鬆症治療は長期に渡るため、テリパラチドとは異なる作用機構の骨形成促進薬の開発が喫緊の課題である。本研究は、「骨形成促進シグナルである Wnt シグナル活性を指標としたプロテオゲノミクス探索解析による骨形成促進薬の開発」が目的である。

3. 研究の方法

(1)活性型ビタミンDシグナルの過剰は、高カルシウム血症、骨吸収亢進と骨形成低下による骨量低下、体重減少および軟組織の石灰化をもたらす。このような複合的な症状を高ビタミンD症と呼ぶ。高用量の活性型ビタミンDを骨芽細胞特異的ビタミンD受容体欠損(Osx-VDR-cKO)マウスと対照マウスに投与し、骨形成促進作用を有するPTHとWntの阻害因子スクレロスチンの血清レベルの変化、血清カルシウム、リン値の変化、軟組織の石灰化および体重変化を調べた。高ビタミンD症におけるWntシグナルの重要性を証明した。

(2)骨芽細胞分化に参与する細胞内Wnt下流シグナルコンポーネントを同定する。そのために、リコンビナントWnt3aで刺激した骨髄間葉細胞株ST2を、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析(LC-MS/MS)によるリン酸化質量分析Phospho-MSに供した。

(3)ゲノムワイドのWnt下流骨形成制御因子同定のため、遺伝子機能喪失アプローチであるCRISPR-KOライブラリーとWnt活性の上昇に応じて細胞死を誘導するレポーターもしくはWnt活性の上昇に応じて細胞死を回避するレポーターをST2細胞に導入した。

(4)既に我々が骨形成を促進することを見出していたWnt非典型的な受容体Rykについて、免疫

機能について解析した。

(5) (2)および(3)の実験で同定された因子について、マウス脛骨骨折治癒過程において発現がどのように変化するか解析した。

4. 研究成果

(1)高用量(5 μg/kg 体重/day)の活性型ビタミンDを骨芽細胞特異的ビタミンD受容体欠損(Osx-VDR-cKO)マウスに投与しても、高ビタミンD症を呈さず、骨吸収、血清カルシウム値、リン値は正常であり、軟組織の石灰化および体重減少も認められなかった(発表雑誌論文 Mori et al., Endocrinology 2020)(学会発表 The 24th Vitamin D workshop, 2022)。また、リン利尿ホルモン線維芽細胞増殖因子23(FGF23)の上昇もOsx-VDR-cKOマウスでは抑えられていた(発表雑誌論文 Mori et al., Endocrinology 2020)。血清スクレロステインレベルは、活性型ビタミンD投与により著しく上昇したが、Osx-VDR-cKOマウスでは、上昇しなかった。リン利尿作用を有するホルモンであるPTHは活性型ビタミンD投与により分泌抑制されたが、Osx-VDR-cKOマウスでも同様に分泌抑制されていた(図2)

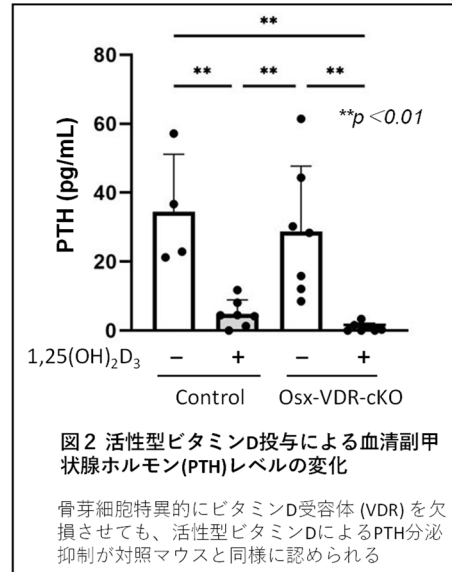


図2 活性型ビタミンD投与による血清副甲状腺ホルモン(PTH)レベルの変化
骨芽細胞特異的にビタミンD受容体(VDR)を欠損させても、活性型ビタミンDによるPTH分泌抑制が対照マウスと同様に認められる

Measurements	Control	Osx-VDR-cKO	発表
血清カルシウム(Ca)	↑	→	雑誌論文 Mori et al. 2022
血清カルシウム(P)	↑ or →	→	
骨吸収	↑	→	
体重変化	↓	→	
血清 FGF23	↑↑↑↑	→	学会発表 The 24 th vitamin D workshop
血清 PTH	↓	↓	
血清 Ca・P積	↑	→	
軟組織石灰化	+	-	

表1 高用量活性型ビタミンD投与による各種パラメーターの変化
骨芽細胞特異的VDR欠損は、活性型ビタミンDによる血清カルシウム上昇、リン上昇、骨吸収上昇、血清FGF23上昇、軟組織の石灰化を抑制した。しかし、PTHの分泌抑制には何も影響しなかった。

(表1)。この結果より、WntもPTHも骨アナボリック作用を有するものの、活性型ビタミンD過剰による骨代謝の異常にPTH分泌は寄与しないことが示唆され、改めてWntの重要性が示された。

(2) Tandem Mass Tagを用いた質量分析により5つのBiological replicate ST2培養細胞ロットにおいて共通にシグナル強度が上昇するTGFファミリー分子リン酸化ペプチドを得ることが出来た(図3)(米国セントルイスワシントン大学Major教授との共同研究)。

(3) Wnt活性の上昇に応じて赤色蛍光色素の発光とともにゼオシン耐性を獲得するシステムを構築した。すなわち、Wnt活性の上昇に伴いゼオシンによる細胞死を免れることが出来るシステムである。これをBAR(-catenin activated reporter)-RedZeoと命名した。Wnt活性の上昇に応じて緑色蛍光色素の発光とともにジフテリア毒素感受性を獲得するシステムも構築できた。このシステムにより、Wnt活性の上昇に伴いマウス細胞には無害なジフテリアトキシンによる細胞死を誘導することが出来る。これを、BAR-DTR-GFPと命名した。これらのシステムを用い、TGFファミリー分子群がWnt下流で骨形成を調節していることを示唆するデータを得た。

(4) すべての間葉系細胞でRykを欠損させたマウスでは、肺の炎症が誘導され肺においてマクロファージが増加したが、骨では炎症は認められず、マクロファージも増加しなかった(発表雑誌論文 Kim et al., PNAS 2022)。一方、このマウスと骨芽細胞特異的なRyk欠損マウスにおいて骨形成が低下し、骨量が低下していた(ドイツ・マックスプランク研究所 Stainier 博士との共同研究)。

(5)Wnt レポーターマウスである Axin2-tomato マウスを用いた骨折治癒モデルにおいて、(2)と(3)の実験で同定された TGFbata ファミリーの分子が Wnt 応答性の細胞において発現が上昇しており、治癒促進に貢献していることが示唆された(学会発表 第 39 回 日本骨代謝学会, 2021)。

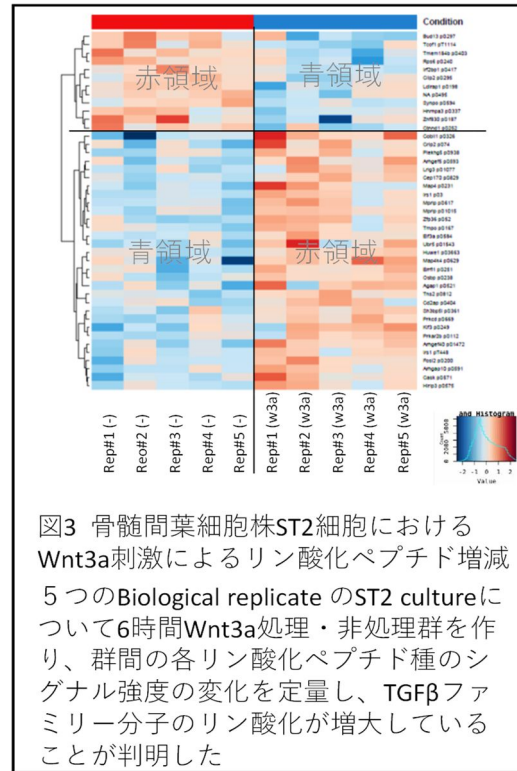


図3 骨髄間葉細胞株ST2細胞における Wnt3a刺激によるリン酸化ペプチド増減
5つのBiological replicateのST2 cultureについて6時間Wnt3a処理・非処理群を作り、群間の各リン酸化ペプチド種のシグナル強度の変化を定量し、TGFβファミリー分子のリン酸化が増大していることが判明した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Mizuno Takafumi, Hosoyama Tohru, Tomida Makiko, Yamamoto Yoko, Nakamichi Yuko, Kato Shigeaki, Kawai Takaishi Minako, Ishizuka Shinya, Nishita Yukiko, Tange Chikako, Shimokata Hiroshi, Imagama Shiro, Otsuka Rei	4. 巻 13
2. 論文標題 Influence of vitamin D on sarcopenia pathophysiology: A longitudinal study in humans and basic research in knockout mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle	6. 最初と最後の頁 2961 ~ 2973
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcsm.13102	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim Hyun-Taek, Panza Paolo, Kikhi Khrievono, Nakamichi Yuko, Atzberger Ann, Guenther Stefan, Ruppert Clemens, Guenther Andreas, Stainier Didier Y. R.	4. 巻 119
2. 論文標題 WNT/Ryk signaling functions as an antiinflammatory modulator in the lung mesenchyme	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2201707119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2201707119	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Udagawa Nobuyuki, Koide Masanori, Nakamura Midori, Nakamichi Yuko, Yamashita Teruhito, Uehara Shunsuke, Kobayashi Yasuhiro, Furuya Yuriko, Yasuda Hisataka, Fukuda Chie, Tsuda Eisuke	4. 巻 39
2. 論文標題 Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 19 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-020-01162-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono-Ohmachi A, Yamada S, Uno S, Tamai M, Soga K, Nakamura S, Udagawa N, Nakamichi Y, Koide M, Morita Y, Takano T, Itoh T, Kakuta S, Morimoto C, Matsuoka S, Iwakura Y, Tomura M, Kiyono H, Hachimura S, Nakajima-Adachi H	4. 巻 14
2. 論文標題 Effector memory CD4+T cells in mesenteric lymph nodes mediate bone loss in food-allergic enteropathy model mice, creating IL-4 dominance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mucosal Immunology	6. 最初と最後の頁 1335 ~ 1346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41385-021-00434-2	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 -

1. 著者名 Tsuruda Toshihiro, Yamashita Atsushi, Otsu Misa, Koide Masanori, Nakamichi Yuko, Sekita Hatakeyama Yoko, Hatakeyama Kinta, Funamoto Taro, Chosa Etsuo, Asada Yujiro, Udagawa Nobuyuki, Kato Johji, Kitamura Kazuo	4. 巻 11
2. 論文標題 Angiotensin II Induces Aortic Rupture and Dissection in Osteoprotegerin Deficient Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e025336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/JAHA.122.025336	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 -

1. 著者名 Nishida Daisuke, Arai Atsushi, Zhao Lijuan, Yang Mengyu, Nakamichi Yuko, Horibe Kanji, Hosoya Akihiro, Kobayashi Yasuhiro, Udagawa Nobuyuki, Mizoguchi Toshihide	4. 巻 11
2. 論文標題 RANKL/OPG ratio regulates odontoclastogenesis in damaged dental pulp	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4575
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84354-y	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 -

1. 著者名 Mori Tomoki, Horibe Kanji, Koide Masanori, Uehara Shunsuke, Yamamoto Yoko, Kato Shigeaki, Yasuda Hisataka, Takahashi Naoyuki, Udagawa Nobuyuki, Nakamichi Yuko	4. 巻 161
2. 論文標題 The Vitamin D Receptor in Osteoblast-Lineage Cells Is Essential for the Proresorptive Activity of 1,25(OH) ₂ D ₃ In Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 bqaa178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1210/endocr/bqaa178	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 -

1. 著者名 Takahashi Naoyuki, Nakamichi Yuko, Udagawa Nobuyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Vitamin D in The Regulation of Osteoclasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Bone Biology	6. 最初と最後の頁 290 ~ 302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-801238-3.62204-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuko Nakamichi, Tomoki Mori, Hisataka Yasuda, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa
2. 発表標題 The vitamin D receptor in osteoblastic cells is crucial for the proresorptive activity, hypercalcemia, and soft tissue calcification, induced by 1,25(OH) ₂ D ₃
3. 学会等名 Vitamin D Workshop (24th) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中道裕子
2. 発表標題 骨芽細胞・骨細胞のビタミンD受容体(VDR)は、in vivoにおいても活性型ビタミンDによる骨吸収促進作用に不可欠である
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会ウインタースクール
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇田川信之
2. 発表標題 ビタミンDの骨組織における役割とは？
3. 学会等名 第6回日本骨免疫学会ウインタースクール(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西田大輔, 荒井敦, 堀部寛治, 中道裕子, 細矢明宏, 中村浩彰, 小林泰浩, 宇田川信之, 溝口利英
2. 発表標題 RANKL/OPG比は損傷した歯髄における破歯細胞形成を調節する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 何治録, 溝口利英, 平賀徹, 村上康平, 中道裕子, 山下照仁, 小出雅則, 宇田川信之, 小林泰浩
2. 発表標題 マクロファージはLepR陽性細胞を活性化し骨再生を促進する
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中道裕子
2. 発表標題 骨ミネラル代謝におけるビタミンDとWntシグナルの作用機序の解明
3. 学会等名 第460回 東京歯科大学 大学院セミナー (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鶴田敏博, 小出雅則, 中道裕子, 中村美どり, 宇田川信之, 北村和雄
2. 発表標題 心血管保護因子としてのオステオプロテゲリン
3. 学会等名 第62回歯科基礎学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松下雅衣, 小出雅則, 芳澤享子, 堀部寛治, 小林泰浩, 山下照仁, 中道裕子, 上原俊介, 宇田川信之
2. 発表標題 BMP 誘導性の異所性骨における骨形成抑制因子スクレロスチン陽性細胞の経時的観察
3. 学会等名 第62回歯科基礎学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中道裕子
2. 発表標題 ビタミンDによる骨代謝共役-骨芽細胞のVDRを介した骨吸収抑制効果と促進効果
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中道裕子
2. 発表標題 骨ミネラル代謝におけるビタミンDとWntシグナルの作用機序の解明
3. 学会等名 第460回 東京歯科大学 大学院セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森 智紀, 堀部寛治, 小出雅則, 高橋直之, 宇田川信之, 中道裕子
2. 発表標題 活性型ビタミンD3のin vivo大量投与による骨吸収促進と血清Ca値上昇作用は、骨芽細胞のVDRを介する
3. 学会等名 第5回 日本骨免疫学会ウインタースクール
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

USACO 日本人論文詳細 https://www.usaco.co.jp/article/detail.html?itemid=1347&dispmid=610 日本骨代謝学会 1st Author http://www.jsbmr.jp/1st_author/431_nakamichi_mori.html

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	堀部 寛治 (Horibe Kanji) (70733509)	松本歯科大学・歯学部・助教 (33602)	
研究分担者	宇田川 信之 (Udagawa Nobuyuki) (70245801)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	
研究分担者	岩本 莉奈 (Iwamoto Rina) (20907216)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・助教 (33602)	
研究分担者	荒井 敦 (Arai Atsushi) (00532772)	松本歯科大学・歯学部・准教授 (33602)	

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		
米国	セントルイス・ワシントン大学		
ドイツ	マックスプランク研究所		