

平成 22 年 5 月 19 日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20791616
研究課題名(和文) Wnt シグナル伝達経路をターゲットとした歯槽骨再生薬の開発に関する研究
研究課題名(英文) The development of drug for alveolar bone regeneration targeting the Wnt signaling pathway
研究代表者
松崎 英津子 (MATSUZAKI ETSUKO)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20432924

研究成果の概要(和文)：Dkk1 は、Wnt シグナルの阻害分子であり、骨形成を阻害する方向へ導く。つまり、このタンパク質を阻害すると骨形成が促進される。抗 Dkk1 抗体を用いた研究では、溶解性骨病変が特徴の多発性骨髄腫に対して有効であり、またマウス実験モデルでは、リウマチにも有効であることが示されてきている。我々は、抗 Dkk1 抗体が、骨芽細胞に対して分化促進作用、石灰化促進作用を呈し、Wnt3a と同様の効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dkk1 is an inhibitor of Wnt signaling and inhibits bone formation. Recent studies show that anti-Dkk1 antibody is useful for the osteolytic disease including multiple myeloma and rheumatoid arthritis. We found that anti-Dkk1 antibody induced osteoblast differentiation and calcification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯周治療学・歯周外科学

キーワード：骨芽細胞、Wnt シグナル、骨、再生医学

1. 研究開始当初の背景

骨再生や関節リウマチ等、骨に関連する疾患はわが国でも罹患率が高く、骨の再生および骨吸収の抑制が治療の大きな目標である。しかしながら、現時点では骨芽細胞の分化メカニズムをはじめとして、未だ解明されていない部分が多い。

近年、Wnt シグナル伝達経路が、骨芽細胞分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなってきており、Wnt のレセプタ

ー(LRP5/6)の機能亢進変異による骨密度の増加や、骨芽細胞前駆細胞である C2C12、C3H10T1/2、ST2 細胞における数種の Wnt タンパク質(Wnt1、Wnt2、Wnt3a)によるアルカリフォスファターゼ(ALP)活性(骨芽細胞分化の代表的マーカー)の上昇が報告されている。

これまでに我々が行った研究で、このシグナル伝達経路の主要分子である GSK-3 β が活性化されると β -カテニンの発現が減

少し、シグナルが抑制され、その結果、TCF/LEF 転写活性の低下がおこり、ALP の発現が減少することを見いだした。したがって、このシグナル伝達経路の活性化薬の開発は、骨の再生に対して大いに有用であると考えられる。

Dkk1 は、このシグナルの阻害分子であり、骨に関しては、骨形成を阻害する方向へ導く。つまり、このタンパク質を阻害すると、骨形成が促進される。このタンパク質は骨に特異的に作用することが特徴で、Wnt の共働レセプターLRP5/6 のリガンドとして機能する。

抗 Dkk1 抗体を用いた研究では、溶解性骨病変が特徴の多発性骨髄腫に対して有効であり、またマウスにおける実験モデルでは、リウマチにも有効であることが示されてきている。

そこで、骨芽細胞の分化を調節する Wnt シグナルという重要なシグナル伝達経路をターゲットにした歯槽骨再生薬の開発に関する研究を、骨芽細胞に多く発現する Dkk1 というタンパク質に着目して計画した。

2. 研究の目的

歯槽骨の再生は、歯周病治療および歯周病研究のうえで大きな目標のひとつである。しかしながら、現時点では骨芽細胞の分化メカニズムをはじめとして、未だ解明されていない部分が多い。

よってこの研究で、骨芽細胞の分化を調節する Wnt シグナルという重要なシグナル伝達経路をターゲットにした歯槽骨再生薬の開発に関する研究を行い、骨再生という大きな目標に前進することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

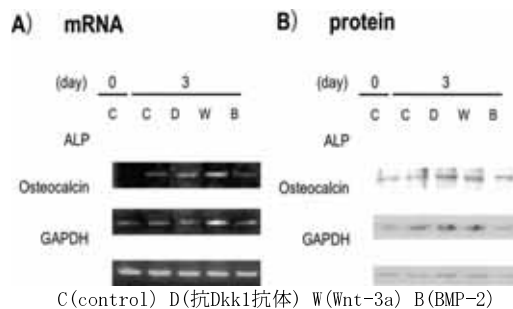
- (1) 抗 Dkk1 抗体を用いて、*in vitro* における骨芽細胞分化に対する影響を検討する。
- (2) Dkk1 の antisense もしくは siRNA を骨芽細胞様細胞に導入し、*in vitro* での細胞数および骨芽細胞分化マーカー発現に対する影響を検討する。
- (3) 抗 Dkk1 抗体の全身投与を行い、骨再生に関してその影響を検討する。
- (4) 抗 Dkk1 抗体の局所投与を行い、骨再生に関してその影響を検討する。

4. 研究成果

(1) はじめに、抗 Dkk1 抗体を用いて、Wnt シグナルを増強させたときの骨芽細胞への影響について検討した。細胞はMC3T3-E1細胞（マウス頭蓋冠由来骨芽細胞）およびSaOS-2（ヒト骨肉腫由来骨芽細胞様細胞株）を用いた。RT-PCR法によるmRNA発現、ウエスタンブロット法によるタンパク質の発現を検討した。そ

の結果、抗 Dkk1 抗体を添加したものでは、骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ、およびオステオカルシンの発現が、mRNA・タンパク質ともに増加していた。

図1 抗 Dkk1抗体が骨芽細胞に及ぼす影響



さらに、Dkk1 の siRNA を骨芽細胞様細胞に導入したところ、上記と同様に、種々の骨芽細胞分化マーカーの発現が増加していた。

また、von Kossa法を用いて、抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞の石灰化に対する影響を検討した。抗 Dkk1 抗体は、石灰化を促進させることが明らかとなった。この作用は、Wnt-3aを添加したものと同程度であった（図2）。

図2 石灰化に対する影響



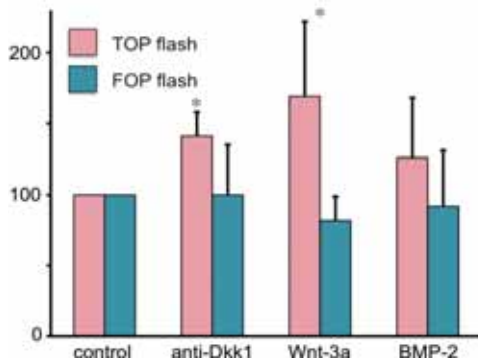
(2) 当初歯槽骨欠損モデル（歯周炎を便宜的に起こしたもの）を作製する予定であったが、その前に大腿骨に人工的に骨欠損を作製した状態で、抗 Dkk1 抗体を投与することとした。コントロール群と比較して、肉眼的に骨量の増加が認められた。

(3) 抗 Dkk1 抗体の影響を検討するため、ラッ

ト脛骨に人工的に骨欠損を作成し、抗 Dkk1 抗体の局所投与を行った。経時的な骨量の変化を軟 X 線にて確認した。当初、歯槽骨に骨欠損を作成する予定であったが、X 線装置、撮影の状況により、ラット脛骨に投与した。その結果、コントロール群と比較して、抗 Dkk1 抗体添加群では、早期に骨量の増加傾向が認められた。

また、追加として、*in vitro* において、抗 Dkk1 抗体の Wnt シグナル伝達経路への影響を詳細に検討するため、Wnt シグナル伝達経路の転写因子である TCF レポーターベクター (TOPflash) を、マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、抗 Dkk1 抗体を添加した細胞では、レポーター活性がコントロールと比較して、有意に増加した (図3)。

図3 TCF転写活性

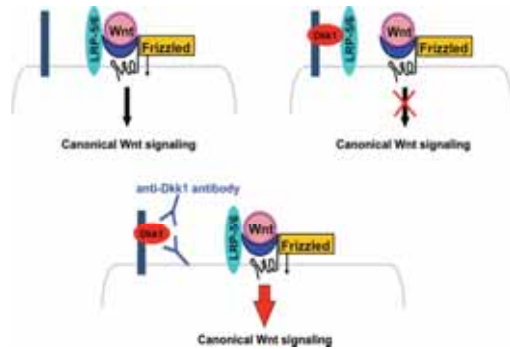


さらに、ALP プロモーター領域の TCF 結合部位を含むレポーターベクター (代表者が以前作成したもの) を用いて、同様にルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、抗 Dkk1 抗体を添加した細胞で、レポーター活性が有意に増加した。抗 Dkk1 抗体は、TCF 結合部位を介して ALP の遺伝子発現を増加させることが示唆された。

以上の結果から、抗 Dkk1 抗体は、Wntシグナル伝達経路を介して (図4)、骨芽細胞分化を促進し、骨再生に有用である可能性が示唆された。

現在までに、多発性骨髄腫や関節リウマチに対して、抗 Dkk1 抗体が有用であることが示されているが、骨芽細胞に対する影響について詳細に検討したものは少ない。また、Dkk1 自体が骨に比較的多く発現するタンパク質であり、副作用が少ないことが予想される。したがって、この Wnt シグナルをターゲットにした創薬は、骨再生に対して、有用であると考えられる。

図4 WntシグナルとDkk1



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)

[学会発表] (計5件)

- ①. 松崎 英津子、他、骨再生を目指した Wnt シグナル伝達経路活性化薬の可能性、第30回日本臨床薬理学会年會シンポジウム、平成21年12月3日、神奈川県横浜市 パシフィコ横浜
- ②. 小林 茉莉、松崎 英津子、他、The effect of anti-Dkk1 antibody on the Wnt/beta-catenin signaling pathway、The 11th Joint-Scientific Meeting between Japanese Society of Conservative Dentistry and Korean Academy of Conservative Dentistry、平成21年11月13日、Ramada Plaza, Jeju, Korea
- ③. 小林 茉莉、松崎 英津子、他、抗 Dkk1 抗体が Wnt/ β -カテニンシグナルを介して骨芽細胞分化におよぼす影響、第52回秋季日本歯周病学会学術大会、平成21年10月11日、宮崎県宮崎市 宮崎観光ホテル
- ④. 松崎 英津子、他、Wnt signaling and osteoblast differentiation、The 4th International Symposium for Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration、平成21年2月6日、九州大学、百年講堂
- ⑤. 松崎 英津子、他、Wnt signaling and osteoblast differentiation、The 10th Joint-Scientific Meeting between Japanese Society of Conservative Dentistry and Korean

Academy of Conservative Dentistry、
平成20年11月28日、COEX conventional
center, Seoul, Korea

〔図書〕(計1件)

松崎 英津子、他、三原医学社、骨再生を
目指した Wnt シグナル伝達経路活性化薬の
可能性、2010年、臨床薬理 Vol. 41, No.2、
25S

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 英津子 (MATSUZAKI ETSUKO)
九州大学・大学病院歯周病科・助教
研究者番号：20432924

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：