

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18009

研究課題名（和文）骨形成を司るWntシグナル制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanisms of Wnt signaling in bone formation

研究代表者

塚本 翔（Tsukamoto, Sho）

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：20707658

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Wntは骨形成を促進することが知られるが、これまでに19種類のWntが同定されており、どのWntが骨形成に重要であるか明らかとなっていない。我々は、骨量が増加するSmad4 cKOマウスでは、Wnt7bの発現が増加し、骨形成が亢進していることを見出した。本研究では、Wnt7b cKOマウスの解析から、成長期の幼若なWnt7b cKOマウスは、低身長症の表現型を示し、骨の長さが短く、海綿骨の骨量が少ないことが明らかとなった。本結果から、Wnt7bは、内軟骨性骨化による骨形成に重要な因子であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、Wnt7bが生理的な骨形成を亢進する重要な因子である可能性を見出した。実際に、Wnt7bは、骨形成を担う骨芽細胞の分化を促進したことから、Wnt7bを介したシグナルが骨粗鬆症等の骨疾患の新たな治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Wnt proteins stimulates bone formation. It is still unclear which Wnt ligands are important for bone formation, because the 19 different types of Wnt are identified in mammal. Recently, our group found that bone formation was enhanced in Smad4 conditional knockout mice through an increase in the expression of Wnt7b. We established tamoxifen-inducible Wnt7b conditional knockout (Wnt7b cKO). The juvenile Wnt7b cKO mice were small and showed dwarfism phenotypes. Bone analysis revealed that bone length in Wnt7b cKO mice was shorter than that of control mice. Histological sections of long bones revealed that the volume of trabecular bones were decreased in Wnt7b cKO mice compared to the control mice. These results suggest that Wnt7b is a critical inducer of bone formation during endochondral ossification.

研究分野：病態生理学

キーワード：骨形成 Wnt シグナル伝達 骨系統疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は、生涯に渡り骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収を繰り返し、骨の構造や機能が維持されている。よって、常に新しい骨が形成され、骨の質が維持される。しかし、閉経後の女性等では、骨形成と骨吸収のバランスが崩れ、骨粗鬆症を発症する。骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネート製剤は、骨吸収を阻害し骨量減少を抑制する。しかし、同時に骨形成も抑制するため、骨の強度が低下してしまうことが知られている。よって、生理的な骨形成を促進する骨形成因子は、骨粗鬆症の新たな治療標的になると考えられている。骨代謝疾患の研究から、骨組織における古典的 Wnt シグナルの活性化は、骨形成を強力に促進することが知られているが、哺乳類動物において、細胞内シグナルを活性化する Wnt は、19 種類が同定されており、どの Wnt が生理的骨形成に重要であるか詳細は明らかとなっていない。

2. 研究の目的

研究代表者は、骨量が増加する Smad4 cKO マウスの解析から、Wnt7b が骨形成促進因子である可能性を見出した (基盤研究 C、2017 年度～2019 年度、17K11026)。そこで、本研究では、Wnt7b の生理的な骨形成に対する役割について解明することを目的とした。胎生期から Wnt7b を KO したマウスは、致死性となることが報告されているため、出生後の任意のタイミングで Wnt7b を KO できる誘導型 Wnt7b cKO を樹立し、解析を行った。

3. 研究の方法

(1) Wnt7b floxed マウスと CAG-CreERT マウスを交配し、タモキシフェン誘導性に Wnt7b を KO できるマウスを樹立した。10 週令の Wnt7b^{f/f}; CAG-CreERT マウスにタモキシフェンを投与し、大腿骨及び、脛骨の皮質骨と海綿骨を組織学的に解析した。

(2) 成長期の骨形成における Wnt7b の影響を検討するために、10 日令の Wnt7b^{f/f}; CAG-CreERT マウスにタモキシフェンを投与し、骨組織をはじめとした表現型解析を行った。

(3) 野生型マウスの長管骨を採取、ホルマリン固定後、脱灰、パラフィン切片を作製し、市販の抗 Wnt7b 抗体を用いて、組織免疫染色を行った。また、凍結切片を用いた検討も合わせて実施した。

(4) タモキシフェン投与および非投与の Wnt7b cKO マウスの骨格筋に BMP 含有コラーゲンスポンジを移植し、異所性骨形成に対する影響をマイクロ CT 及び、組織学的に解析した。

(5) Wnt7b を安定的に発現する L 細胞を樹立し、培養上清から Wnt7b のコンディショニング培地 (CM) を調整した。野生型マウスの頭蓋冠から骨芽細胞と骨髄間質細胞を調整し、Wnt7b-CM 存在下で培養後、骨芽細胞分化マーカーの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法で検討した。

(6) HEK293 細胞に Wnt 受容体の Lrp5 や Frizzled を一過性に共発現させ、Wnt7b による古典的 Wnt シグナル経路の活性化を Wnt 特異的レポーターアッセイによって検討した。

4. 研究成果

(1) 成獣のコントロールと Wnt7b cKO マウスの骨組織を比較解析した結果、長管骨の海綿骨や皮質骨の骨量等、両者に顕著な変化は認められなかった。

(2) 若年のコントロールと Wnt7b cKO マウスの表現型解析を行った結果、Wnt7b cKO マウスは、コントロールのマウスに比較し、脛骨や大腿骨の骨長が短く、低身長を示した。さらに、Wnt7b cKO マウスは、海綿骨の骨量が著しく減少していた。

(3) 野生型マウスの脛骨組織切片を用いて、市販の抗 Wnt7b 抗体による免疫染色を行った結果、成長板軟骨中の軟骨細胞に陽性像が認められ、軟骨細胞が Wnt7b を発現している可能性が示唆された。

(4) 骨格筋に BMP を移植することで、内軟骨性骨化によって、異所性に骨組織が形成される。BMP を移植後、約 3 週間後に、骨格筋中の異所性骨をマイクロ CT で定量解析すると、Wnt7b cKO マウスでは、異所性骨の骨量が有意に減少していた。

(5) 野生型マウスから、調整した細胞を Wnt7b 存在化で培養し、骨形成の指標となるアルカリフォスファターゼ (TNAP) や Ⅰ型コラーゲン (Col1a1) の mRNA 発現を検討すると、コントロールの未処理の細胞に比較し、Wnt7b 処理した細胞は、骨芽細胞分化マーカーの発現が亢進していた。

(6) HEK293 細胞に Wnt7b を単独で発現させると、Wnt 特異的レポーターの活性は誘導されなかった。しかし、細胞に Lrp5 受容体とある種の Frizzled 受容体を共発現することで、Wnt7b によって、レポーター活性が誘導された。

以上の Wnt7b cKO マウスと *in vitro* の解析結果から、Wnt7b は、内軟骨性骨化を介した骨形成に重要な骨形成促進因子である可能性が示された。

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 Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M	4. 巻 9
2. 論文標題 Accumulated Knowledge of Activin Receptor-Like Kinase 2 (ALK2)/Activin A Receptor, Type 1 (ACVR1) as a Target for Human Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 736 ~ 736
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines9070736	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 2件）

1. 発表者名 Tsukamoto S, Kuratani M, Hamai R, Tsuchiya K, Suzuki O, Yamada T, Katagiri T
2. 発表標題 Establishment of an in vivo model of ectopic calcification in mouse skeletal muscle.
3. 学会等名 ASBMR 2021 Annual meeting（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚本翔、倉谷麻衣、鈴木 治、片桐岳信
2. 発表標題 マウス骨格筋における異所性石灰化モデルの確立と解析
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 塚本翔、倉谷麻衣、片桐岳信
2. 発表標題 びまん性特発性骨増殖症に関連するALK2 K400E変異体の機能解析
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Tsukamoto, Mai Kuratani, Takenobu Katagiri
2. 発表標題 Functional characterization of a unique mutant of ALK2, p.K400E, that is associated with a skeletal disorder, diffuse idiopathic skeletal hyperostosis
3. 学会等名 ASBMR(米国骨代謝学会)2020(国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

埼玉医科大学 ゲノム基礎医学 http://www.saitama-med.ac.jp/uinfo/biomedsci/index.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

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
---------	---------