

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：33602
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21390551
 研究課題名（和文）矯正治療への応用を目指した Wnt5a による歯槽骨—骨代謝回転制御機構の解明
 研究課題名（英文）Analysis of roles of Wnt5a in alveolar bone remodeling, and their application for orthodontic tooth movement.
 研究代表者
 小林 泰浩（KOBAYASHI YASUHIRO）
 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
 研究者番号：20264252

研究成果の概要（和文）：
 骨芽細胞から分泌される Wnt5a は、破骨細胞前駆細胞の Ror2 受容体に作用し、RANK の発現を上昇させる。これにより、Wnt5a は RANKL による破骨細胞形成を亢進することを明らかにした。また、骨芽細胞分化において、自ら分泌される Wnt5a は、脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進する。すなわち歯槽骨リモデリングにおいて、Wnt5a は、破骨細胞と骨芽細胞の分化を調節する。

研究成果の概要（英文）：
 Wnt5a secreted from osteoblasts binds to Ror2 receptors in osteoclast precursors. Ror2-mediated signals promote RANK expression in osteoclast precursors, thereby enhancing RANKL-induced osteoclastogenesis. In addition, Wnt5a enhances osteoblastic differentiation and inhibits adipogenesis. Together, Wnt5a regulates osteoclastogenesis and osteogenesis in alveolar bone remodeling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：歯学
 科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学
 キーワード：歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

成長期に比べ、成人では歯の移動が遅いことが知られる。これは、加齢に伴い、骨吸収と骨形成のサイクルすなわち骨代謝回転が低下するためと考えられている。しかし、加齢により歯槽骨の骨代謝回転が低下する分子

基盤は明らかでない。
 Wnt は、胎生期の器官形成など組織改造が盛んな時期に主に働くサイトカインである。
 Wnt のシグナルには、古典経路と非古典経路がある。近年、Wnt が成長後の骨改造にも重要な役割を持つことが示された。Wnt 古典経

路は、骨芽細胞の分化と破骨細胞分化抑制因子であるオステオプロテジェリン (OPG) の発現を誘導する。一方、Wnt5a は脂肪細胞への分化を抑制し、骨芽細胞への分化を促進する。国内外において、Wnt5a が骨代謝回転を制御するとの報告はない。

2. 研究の目的

矯正力によって惹起される歯槽骨のリモデリングの結果、歯の移動は達成される。歯槽骨の骨代謝回転は、歯の移動速度を左右する大きな一因である。我々は、骨代謝における Wnt の役割を解析する過程で、(1) Wnt5a が破骨細胞分化を著明に促進すること、(2) Wnt5a 遺伝子ヘテロ欠損マウスは、骨吸収および骨形成ともに減少する低骨代謝回転を示すことを見出した。すなわち、Wnt5a が骨代謝回転を調節する可能性を示唆する。本申請課題は、遺伝子改変マウスを用いて、Wnt5a が歯槽骨の骨代謝回転を調節する分子機構を明らかにし、歯科矯正治療への応用法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 歯槽骨代謝回転における Wnt5a の役割の解明

マイクロ CT を用いて、Wnt5a^{+/-} mice および骨芽細胞特異的 Wnt5a コンディショナルノックアウトマウス (Wnt5a^{Δ0b/Δ0b}) の大腿骨の骨量を計測した。さらに、これらの大腿骨を骨形態計測に供した。Wnt5a^{Δ0b/Δ0b} マウスは、骨芽細胞で Cre が発現する Osterix-Cre マウスと Wnt5a-floxed マウスの交配により作出した。

(2) 矯正力による歯槽骨リモデリングにおける Wnt5a-Ror2 シグナルの役割の解析

骨芽細胞の分化における Wnt5a および Ror2 の役割を明らかにするため、Wnt5a^{-/-}マウスおよび Ror2^{-/-}マウスの頭蓋冠より単離した骨

芽細胞を石灰化培地で培養した。

破骨細胞分化における Ror2 受容体の役割を明らかにするため、破骨細胞前駆細胞特異的 Ror2 コンディショナルノックアウトマウス (Ror2^{Δ0cp/Δ0cp}) を作出した。Ror2^{Δ0cp/Δ0cp} は、RANK-Cre マウスと Ror2-floxed マウスを交配し、作出した。Ror2^{Δ0cp/Δ0cp} の大腿骨をマイクロ CT 解析および骨形態計測に供した。Ror2^{Δ0cp/Δ0cp} から得た脛骨における破骨細胞マーカー遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。次に、EGFP (緑色蛍光) レポーターマウスと RANK-Cre マウスを交配し、RANK 発現細胞において、EGFP が発現するマウス (RANK-EGFP マウス) を作出した。このマウスの骨髄細胞を培養し、破骨細胞前駆細胞の分化過程を解析した。

(3) Wnt5a シグナル特異的阻害剤の開発と歯槽骨-骨代謝回転の調節

Ror2 受容体のシステインリッチドメイン (CRD) に Wnt が結合することが知られる。Wnt5a の活性を抑制するために、Ror2 の細胞外領域と GST の融合タンパク質 (GST-sRor2) を作製した。GST プルダウン法により、各種 Wnt と GST-s Ror2 の結合を解析した。また、RANKL 誘導による破骨細胞分化培養に、Wnt5a あるいは Wnt5a と GST-sRor2 を添加し、Wnt5a による破骨細胞分化亢進作用に対する GST-sRor2 の効果を検討した。また、Ror2 の CRD の合成ペプチドを作製し、破骨細胞分化に対する合成ペプチドの効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 歯槽骨代謝回転における Wnt5a の役割の解明

マイクロ CT の所見より、Wnt5a^{+/-} mice は低骨量を呈した。また、Wnt5a^{Δ0b/Δ0b} マウスもまた低骨量を示した。骨形態計測による解析では、Wnt5a^{+/-} マウスおよび Wnt5a^{Δ0b/Δ0b} マウス

ともに、骨形成パラメーターと骨芽細胞数の減少が認められた。つまり、これらの変異マウスでは、骨芽細胞の分化不全のため、骨形成が減少するものと考えられた。さらに、これらの変異マウスでは、破骨細胞の著しい減少が認められた (図1)。この結果は、骨芽細胞から分泌される Wnt5a は破骨細胞形成に重要であることを示唆した。

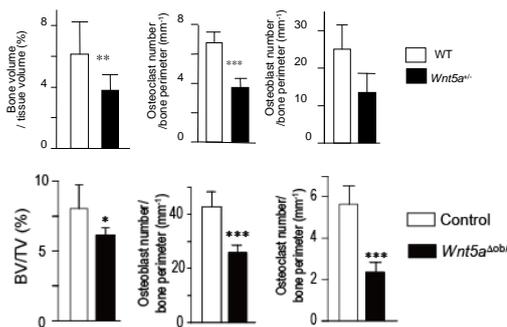


図1 Wnt5a^{-/-} (上段)およびWnt5a^{ΔOb/Δob}マウス(下段)のマイクロCTおよび骨形態計測所見

(2) 矯正力による歯槽骨リモデリングにおける Wnt5a-Ror2 シグナルの役割の解析

野生型の骨芽細胞に比べて、Wnt5a^{-/-}マウス由来の骨芽細胞は、石灰化結節の形成が著しく低下した。一方、Ror2^{-/-}マウス由来の骨芽細胞の石灰化結節の形成能は野生型の形成能と同様であった。また、Wnt5a^{-/-}マウス由来の骨芽細胞の培養では、脂肪細胞の出現が認められた (図2)。つまり、Wnt5a は Ror2 受容体を介さず骨芽細胞の分化を促進することが示唆された。

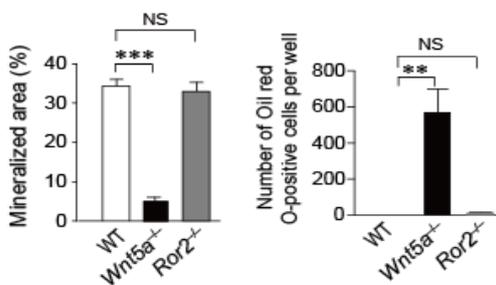


図2 Wnt5a^{-/-} およびRor2^{-/-}マウス由来骨芽細胞の石灰化能

マイクロ CT 解析の結果、Ror2^{Δ0cp/Δ0cp} は高骨量を呈した。また、骨形態計測の結果、骨梁あたりの骨芽細胞数に変化が認められないものの、破骨細胞数の著しい減少を呈した (図3)。つまり、Ror2^{Δ0cp/Δ0cp} は、破骨細胞分化不全による骨量増加を呈することが明らかになった。

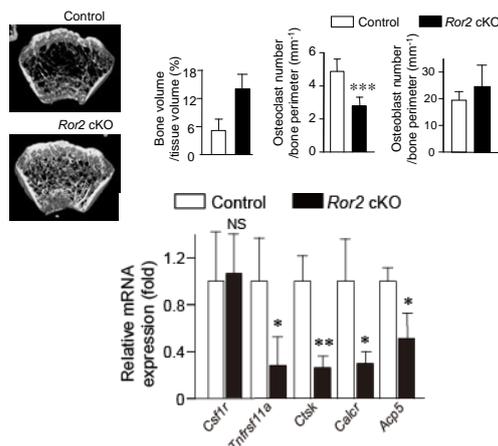


図3 Ror2 cKOマウスの表現形

Ror2^{Δ0cp/Δ0cp} の骨組織では、カルシトニン受容体などの破骨細胞マーカー遺伝子の発現低下に加え、RANK の発現が著しく低下することが明らかになった (図3)。

RANK-EGFP マウスの骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養したところ、培養 2 日目に RANK 陽性細胞の出現を認めた。この培養系にリコンビナント Wnt5a を添加すると、著しい RANK 陽性細胞の出現が認められた (図4)。つまり、Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞前駆細胞の RANK 発現を誘導することが示唆された。

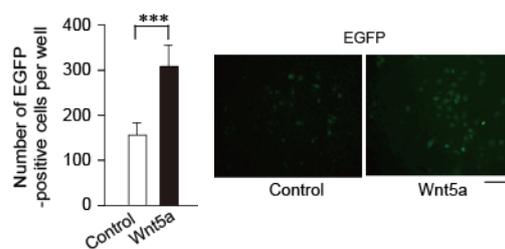


図4 RANK発現に対するWnt5aの効果

(3) Wnt5a シグナル特異的阻害剤の開発と 歯槽骨—骨代謝回転の調節

Wnt5a を含む 12 種類の Wnt への GST- s Ror2 の結合を検討したところ、GST- s Ror2 は Wnt5a と非常に強く結合した (図 5 A)。

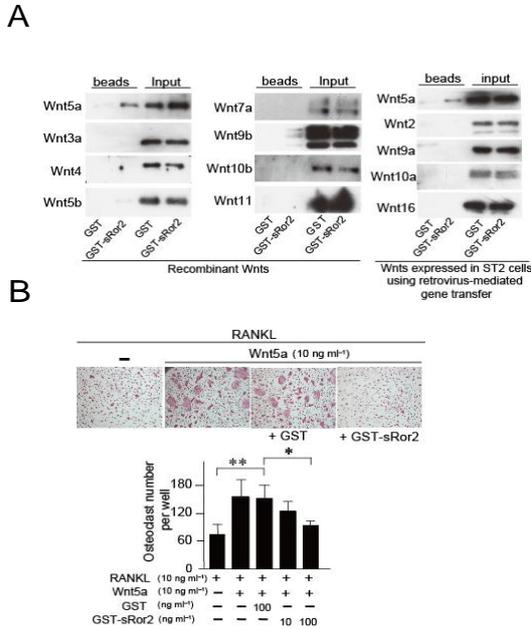


図5 GST-sRor2はWnt5aに結合し、
Wnt5aの作用を阻害する

また、Wnt5a は RANKL による破骨細胞分化を亢進した。この培養系に GST- s Ror2 を添加したところ、Wnt5a による破骨細胞分化促進作用は抑制された (図 5 B)。骨芽細胞と骨髄細胞を活性型ビタミン D3 存在下で培養すると、破骨細胞が形成される。この共存培養系において、骨芽細胞から分泌される Wnt5a が破骨細胞分化を亢進することを明らかにしている。そこで、この共存培養系に GST-sRor2 あるいは Ror2 の CRD の合成ペプチドを添加した。GST- s Ror2 あるいは合成ペプチドの添加により、破骨細胞形成は抑制された。すなわち、GST- s Ror2 および合成ペプチドは、Wnt5a の阻害剤として作用することが示唆された。

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 16 件)

- ① Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N. c-Fos plays an essential role in the up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. **J. Cell Sci.** 査読有、2012 Mar 27. [Epub ahead of print]
- ② Shimizu M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Nakamura H, Kawahara I, Narita N, Usui Y, Aoki K, Hara K, Haniu H, Ogiwara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Kawakubo M, Dohi Y, Taruta S, Kim YA, Endo M, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N, Saito N. Carbon Nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. **Adv Mater.**、査読有、24, 2176-2185, 2012、[DOI: 10.1002/adma.201103832](https://doi.org/10.1002/adma.201103832)
- ③ 小林泰浩. Wnt による骨代謝制御機構 **The Bone**、査読無、26, 151-159, 2012
- ④ Maeda K¹, Kobayashi Y^{1,*}, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N^{*}. Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat. Med.**、査読有、18, 405-412, 2012、[DOI: 10.1038/nm.2653](https://doi.org/10.1038/nm.2653)
- ⑤ Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y,

- Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, Takahashi F, Saito H, Yasuda H, Udagawa N, Suda T, Takahashi N. Daily administration of eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. **J. Bone Miner. Res.**、査読有、27, 461-473, 2012、
[DOI:10.1002/jbmr.555](https://doi.org/10.1002/jbmr.555)
- ⑥ Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N. Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. **J. Immunol.**、査読有、188, 1772-1781, 2012、
[DOI: 10.4049/jimmunol.1101174](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101174)
- ⑦ Nakayama T, Mizoguchi T, Uehara S, Yamashita T, Kawahara I, Kobayashi Y, Moriyama Y, Kurihara S, Sahara N, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N. Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices--a simple method for identifying polarized osteoclasts. **Bone**、査読有、49, 1331-1339, 2011、
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.09.045>
- ⑧ Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, Arai A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N. Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. **J. Bone Miner. Res.**、査読有、26, 2978-2990, 2011、
[DOI: 10.1002/jbmr.490](https://doi.org/10.1002/jbmr.490)
- ⑨ Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Koide M, Yamaguchi K, Oida H, Arai Y, Sahara N, Nakamura H, Ozawa H Prostaglandin E(2) receptor EP(4)-selective agonist (ONO-4819) increases bone formation by modulating mesenchymal cell differentiation. **Eur. J. Pharmacol.**、査読有、650, 396-402, 2011、
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.10.021>
- ⑩ Hiraga T, Ito S, Nakamura H. Side population in MDA-MB-231 human breast cancer cells exhibits cancer stem cell-like properties without higher bone-metastatic potential. **Oncol. Rep.**、査読有、25, 289-296, 2011、
[DOI: 10.3892/or.00001073](https://doi.org/10.3892/or.00001073)
- ⑪ Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. **Front. Biosci.**、査読有、16, 21-30, 2011、
<http://dx.doi.org/10.2741/3673>
- ⑫ Lee JW, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Udagawa N, Takahashi N, Im NK, Seo HJ, Jeon WB, Yonezawa T, Cha BY, Woo JT. Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. **Biochem. Pharmacol.**、査読有、80, 352-361, 2010、
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.04.014>
- ⑬ Nakanishi M, Hata K, Nagayama T, Sakurai T, Nishisho T, Wakabayashi H,

Hiraga T, Ebisu S, Yoneda T. Acid activation of Trpv1 leads to an up-regulation of calcitonin gene-related peptide expression in dorsal root ganglion neurons via the CaMK-CREB cascade: a potential mechanism of inflammatory pain. **Mol. Biol. Cell.**、査読有、21, 2568-2577, 2010、

DOI: [10.1091/mbc.E10-01-0049](https://doi.org/10.1091/mbc.E10-01-0049)

- ⑭ Hiraga T, Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H. Administration of the bisphosphonate zoledronic acid during tooth development inhibits tooth eruption and formation and induces dental abnormalities in rats. **Calcif. Tissue Int.**、査読有、86, 502-510, 2010、
DOI: [10.1007/s00223-010-9366-z](https://doi.org/10.1007/s00223-010-9366-z)
- ⑮ Nakamura H, Yukita A, Ninomiya T, Hosoya A, Hiraga T, Ozawa H. Localization of Thy-1-positive cells in the perichondrium during endochondral ossification. **J. Histochem. Cytochem.**、査読有、58, 455-462, 2010、
DOI: [10.1007/s00418-012-0928-1](https://doi.org/10.1007/s00418-012-0928-1)
- ⑯ Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N. Action of RANKL and OPG for osteoclastogenesis. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**、査読有、19, 61-72, 2009

[学会発表] (計7件)

- ① 小林泰造 : Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞分化制御機構. 第10回口腔医学フロンティア学術集会 (大阪)、2012年3月3日
- ② Kobayashi Y et al.: Ror2-mediated noncanonical Wnt signaling enhances RANKL-induced osteoclast formation

in physiological and pathological conditions. 3rd International conference on osteoimmunology (Santorini, Greece), 2010年6月25日

- ③ 小林泰造, 前田和洋、上原俊介、高田伊知郎、加藤茂明、丸毛啓史、宇田川信之、高橋直之 : Wnt5a は RANK の発現を亢進し、破骨細胞分化を促進する、第28回日本骨代謝学会学術大会 (東京) 2010年7月21日
- ④ 山下照仁、上原俊介、小林泰造、宇田川信之、高橋直之 : 漢方牛蒡子由来のアルクチゲニンは破骨細胞の機能と分化を抑制する. 第28回日本骨代謝学会学術大会 (東京) 2010年7月21日
- ⑤ 小林泰造、溝口利英、上原俊介、高橋直之、宇田川信之 : Wnt シグナルによる破骨細胞分化調節機構の解析. 第71回松本歯科大学学会例会 (塩尻)、2010年11月13日
- ⑥ Kobayashi Y; Ror2-mediated noncanonical Wnt signaling stimulates physiological and pathological osteoclastogenesis in a cell autonomous manner. 第6回 Bone Biology Forum (裾野)、2009年8月22日
- ⑦ 小林泰造 : 炎症性骨疾患における Wnt の役割、第27回日本骨代謝学会(大阪)、ミニシンポジウム Osteoimmunology 11 2009年7月25日

[図書] (計1件)

- ① Udagawa N, Yamashita T, Kobayashi Y, Takahashi N. Identification of osteoclasts in culture. Nicole I zur Nieden (ed.) Springer Science, **Methods Mol. Biol.** 690, 273-284, 2011

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 泰浩 (KOBAYASHI YASUHIRO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号：20264252

(2) 研究分担者

高橋 直之 (TAKAHASHI NAOYUKI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：90119222

平賀 徹 (HIRAGA TOHRU)
松本歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：70322170

山下 照仁 (YAMASHITA TERUHITO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90302893

溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号：90329475

(3) 連携研究者 なし