

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390346

研究課題名(和文) Wntシグナルを介した骨と造血幹細胞制御の組織間ネットワークの分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of networking system between bone and hematopoietic cells via Wnt signaling pathway

研究代表者

田村 正人(TAMURA, Masato)

北海道大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30236757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円、(間接経費) 4,350,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞において古典的Wntシグナルは、造血幹細胞の遊走を促進するCXCL12の産生を負に調節していた。この作用により破骨細胞分化も抑制された。骨細胞から造血幹細胞へのシグナル伝達分子として、古典的Wntシグナルを抑制する分子であるsclerostinを同定した。骨芽細胞においてNeuropeptide Yの受容体の発現がBMPによって調節されるとともに、オートクラインに制御されていた。本研究から、骨細胞・骨芽細胞とWntシグナルを介して、造血系と全身の異種組織間とに機能的なクロストークの存在が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Canonical Wnt signaling molecule such as Wnt3a down-regulated CXCL12 expression in murine ST-2 cells. The culture supernatant from Wnt3a-ST2 cells also reduced migratory activity of bone marrow-derived cells and hematopoietic cell in a migration assay. Sclerostin which inhibits canonical Wnt signaling is identified as a signaling molecule from osteocytes to hematopoietic cell. The expression of neuropeptide Y Y1 receptor mRNA was induced by BMP2. These results raise the possibility that NPY acts in osteoblasts and osteocytes via an autocrine mechanism. From this study, functional crosstalk of regulation between bone and the other tissue.

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：骨芽細胞 Wntシグナル 骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は、体を支持することやカルシウムなどの無機物質を貯蔵するとともに造血組織の場を提供する。ヒト成体ではこの造血を担う造血幹細胞は主に骨髄に存在し、他の幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を有する細胞と考えられ、生涯の間枯渇しない。これらの特性と機能を維持するためには、適切な環境を備えた場(ニッチ)の存在が示唆されていた。2003年遺伝子改変マウスの解析から、骨芽細胞数と造血幹細胞数が相関することや、造血幹細胞が骨端部の骨梁表面のN-cadherin陽性の紡錘型をした骨芽細胞(SNO細胞)と接着して存在していることなどがNature誌に相次いで報告され、骨芽細胞がニッチとして機能していることが示された。また、既に臨床ではgranulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)を健常人に投与することにより、造血幹細胞が末梢血中に大量に動員されることを利用した末梢造血幹細胞移植が広く普及し、造血幹細胞の動員と骨髄へのホーミング・生着に関する研究も進展してきた。

2001年のWarmanらのCell誌における発表以来、Wntシグナルと骨形成に関する論文は既に200報以上報告された。研究代表者は、Wntシグナルの骨芽細胞分化における役割とBMP-2シグナルのクロストークを見出し報告し、Wnt/ β -cateninの標的遺伝子として破骨細胞分化を調節するosteoprotegerin(OPG)を同定しその発現調節機構の詳細を報告した。一方、2003年造血幹細胞の自己複製にはWntシグナルが不可欠であることがin vivoおよびin vitroで示されて以降、造血幹細胞の恒常性維持に極めて重要であることが報告されてきた。しかし、生体内でWntシグナルを介した骨形成と造血系の両者を連携するシステムや、骨が造血幹細胞のニッチや遊走を制御する機構は明らかにはなっていない。

2. 研究の目的

本研究は、骨芽細胞・骨細胞と造血幹細胞の異種組織間における機能的クロストークとこれを介する分子としてのWntシグナル分子とsclerostin (Sost 遺伝子産物)の役割を明らかにすることを目的とした。本研究によって、骨芽細胞・骨細胞による造血幹細胞と造血機能の制御の本質的なメカニズムや細胞遊走とニッチから造血制御に至るまでの骨と造血系の組織間クロストークとその真の役割を明らかにし、これらの機構を応用した効果的な骨形成誘導法の開発の基盤となる分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) WntならびにSostの組換えタンパク質の作製
種々のWnt及びSostのcDNAをベクターに

挿入し、タンパク質の精製を行った。精製タンパク質はSDS-PAGE後、タグを用いたWestern Blotにて確認を行った。

(2) Wntシグナルの骨と造血系への相互作用の解析

マウス骨髄から採取した骨芽細胞、未分化間葉系細胞やKusa-O、ST-2細胞の培養系に1で作製したWnt組換えタンパク質を加え、細胞からRNAを抽出し、造血幹細胞の種々の活性に影響を与える因子や造血幹細胞の遊走を促進するCXCL12、CCL17、CCL22等のケモカインやFrizzleds、5種のDkk、2種のKremenなどのWntの受容体や細胞内シグナル伝達分子の発現のmRNA発現量をリアルタイムPCR法により測定した。抗体を用いたウエスタンブロットを行い、タンパク質の量を検討した。TRUE gene silencing法を用いたノックダウンや低分子Wntシグナル阻害剤を行い、mRNAやタンパク質の発現とWntシグナルの機能について解析を行った。

(3) 骨細胞から造血幹細胞へのシグナル伝達分子の同定

骨細胞であるMLO-YO細胞を培養し、培養上清中のWntシグナルの活性をpTOP-FLASHやOPGプロモーターコンストラクトを用いて調べた。また、BMP応答領域-luciferaseレポーターを用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。造血幹細胞をフローサイトメトリーにより採取し、MLO-YO細胞の培養上清を加え、これらの細胞からtotal RNAもしくは総タンパク質を回収し、マイクロアレイもしくはリアルタイムPCR法などを用いて遺伝子発現を、ウエスタンブロットを用いてタンパク質の発現量の変動を調べた。また、MLO-YO細胞の培養上清によって発現が誘導されるcDNAの同定を行い、このcDNAをFLAGタグのベクターに挿入し、細胞にトランスフェクトした。細胞抽出物をタグ抗体で免疫沈降し、ウエスタンブロットを行った。骨細胞が骨芽細胞や造血幹細胞を含む骨髄内の細胞に及ぼす影響については、種々の細胞マーカー抗体を用いた細胞濃縮法を用いて造血幹細胞を濃縮し細胞分画を得て、骨細胞もしくは骨芽細胞が産生する因子によって、造血幹細胞の分化機能がどのように変化しうるかを検討した。また、骨細胞が産生する分子によって、これらの細胞のコロニー形成能が変化しうるかを調べ、造血幹細胞から血液細胞への分化に及ぼす影響を検討した。骨細胞の培養上清を、造血幹細胞を含む培養系に添加して培養した。さらに、Wntシグナル関連分子に関して同様の検討を行った。

(4) 骨細胞なしトランスジェニックマウスを用いた骨と造血系と全身臓器の相互作用の解析

骨細胞特異的にジフテリア毒受容体を発

現させたトランスジェニックマウスは、この毒素を投与することで骨細胞を死滅させることができる。このマウスを用いて骨細胞が骨芽細胞や造血幹細胞を含む骨髄内に及ぼす影響について検討した。末梢血をフローサイトメトリーにて解析し、種々のマーカー抗体を用いて、造血幹細胞のみならず T 細胞、B 細胞などの動態を解析した。また、コロニー形成能を調べ、造血幹細胞から血液細胞への分化に及ぼす影響を検討した。造血幹細胞の種々の活性に影響を与える因子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。また、抗体を用いウエスタンブロットを行い、タンパク質の量を検討した。さらに、全身臓器への影響を調べた。

(5) 骨細胞が産生する神経ペプチドの作用機構の解析

C2C12 細胞培養系を用いて BMP2 の添加または Smad をトランスフェクトして培養し、Neuropeptide Y1R (Y1R) mRNA の発現量を RT-PCR およびリアルタイム PCR で調べた。Y1R 遺伝子プロモーターをクローニングし、種々のルシフェラーゼコンストラクトを構築し、C2C12 細胞に導入し、Y1R 遺伝子プロモーターの BMP2 応答に関わる領域を解析した。さらに Y1R siRNA を MC3T3-E1 細胞に導入し Y1R の発現をノックダウンさせ、骨芽細胞分化に関わる Runx2 やアルカリフォスファターゼなどの発現について検討した。

4. 研究成果

Wnt3a 及び Wnt5a 発現プラスミドをトランスフェクトさせた L cell を培養し、培養上清中の Wnt3a 及び Wnt5a タンパク質を得、ウエスタンブロット法にて確認を行った。Wnt シグナルの骨と造血系への相互作用の解析について、Kusa-O, ST-2 細胞の培養系に Wnt タンパク質を加え、細胞から RNA を抽出し、造血幹細胞の遊走を促進する CXCL12, CCL17, CCL22 等のケモカインの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。造血幹細胞を支持する骨髄ストローマ細胞である ST-2 細胞の培養系で Wnt3a を作用させるとケモカインの一種である CXCL12 の発現および産生が著しく減少することを見出した (図 1)。TRUE gene silencing 法を用いた GSK-3 β の発現ノックダウン及び低分子 Wnt インヒビター IWR-1 を用いて、古典的 Wnt シグナルのノックダウンを行うと、CXCL12 の発現低下は抑制され、古典的 Wnt シグナルの細胞内シグナル伝達を介してケモカインの産生を調節しているが明らかになった。さらに Wnt シグナルの機能について、より詳細なメカニズムを解析したところ、古典的 Wnt シグナルの活性化により造血幹細胞から破骨細胞の分化が著しく抑制された。CXCL12 は破骨細胞の遊走を活性化し、破骨細胞形成に促進的に作用することが最近報告されている。これらより、古典的 Wnt シグナルが、

OPG, RANKL の調節のみならずケモカインの産生をも調節するという新たな機構の存在が考えられた。また、この結果は造血環境において古典的 Wnt シグナルが CXCL12 産生の制御を介して血液細胞の分化を調節していることを意味するものと考えられた。また、種々の Wnt 及び Sost の cDNA を発現ベクターに挿入し、これらのタンパク質を精製し、Western blot を用いて確認した。

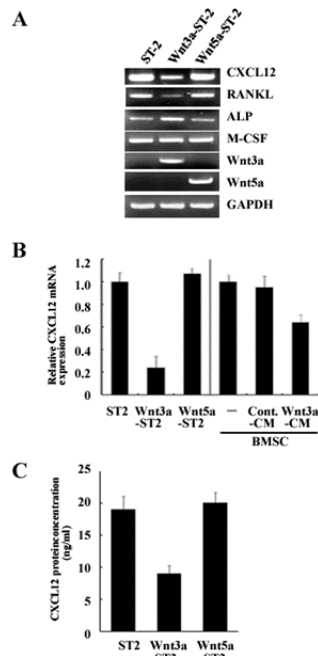


Fig. 1

図 1

マウス骨髄から採取した未分化間葉系細胞および ST-2 細胞の培養系に、Wnt3a もしくは Wnt5a 組換えタンパク質を加え、細胞から RNA を抽出した。造血幹細胞の種々の活性に影響を与える TGF- β , Cripto (TDGF-1), PDGF などの mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により測定した。Wnt3a により未分化間葉系細胞での Cripto の発現が有意に増加した。また、ウエスタンブロットから Wnt3a と BMP-2 の添加により MMP-13 のタンパク量が増加した。GSK-3 β sgRNA を用いたノックダウンや低分子 Wnt シグナル阻害剤である IWR-1 を加え Cripto mRNA 発現を検討したところ、著しく発現が低下した。Cripto は ST-2 細胞において TGF の作用を抑制した。

骨細胞である MLO-YO 細胞の培養上清を添加して培養し、これらの細胞から RNA もしくは総タンパク質を回収し、マイクロアレイもしくはリアルタイム PCR 法を用いて遺伝子発現を検討した。また、ウエスタンブロットを用いてタンパク質の発現量の変動を調べた。造血幹細胞の分化機能に影響を及ぼす因子、造血幹細胞から血液細胞への分化に及ぼす因子および Wnt シグナル関連分子などいくつかの因子の発現が変動した。BMP 応答領域-luciferase レポーターや Wnt 応答領

域-luciferase レポーターの転写活性も変化した。また、培養上清の添加により、エリスロポイエチン mRNA の発現は増大した。これらの結果は、骨芽細胞・骨細胞と造血幹細胞の異種組織間における機能的クロストークの存在を示唆するものと考えられた。

造血幹細胞および骨芽細胞をフローサイトメトリーにより採取し、これらの細胞から total RNA を回収し、RT-PCR 法により Frizzleds, 5 種の Dkk, 2 種の Kremen などの Wnt の受容体の発現を調べたところ、骨芽細胞とは異なる発現パターンが観察され、Wnt シグナル分子による骨と造血系の組織間クロストークには、組織特異的な調節機構の存在が推測された。

骨細胞特異的にジフテリア毒受容体を発現させたトランスジェニックマウスは、この毒素を投与することで骨細胞を死滅させることができる。このマウスを用いて骨細胞が及ぼす影響について検討した。B リンパ球や T リンパ球が著しく減少し、胸腺が萎縮した。また全身の脂肪組織の脂肪が減少し体重が減少した。またこのマウスの視床下部を破壊すると脂肪肝が発症した。骨細胞は免疫機能や脂肪組織・肝臓などの機能を制御していることが示された。これらの結果から、骨細胞と全身の異種組織間との機能的クロストークの存在を示唆するものと考えられた。

Neuropeptide Y (NPY) は 36 アミノ酸残基よりなるペプチドで中枢神経系に広く存在し、食欲、エネルギー消費などに関与する。NPY の G タンパク質共役型受容体の一つである Y1 receptor (Y1R) の骨芽細胞特異的遺伝子欠失マウスでは骨量の増大が報告されている。C2C12 細胞に BMP2 を加え培養すると Y1R mRNA 発現が誘導された(図 2)。Smad の導入によっても Y1R mRNA の発現が誘導された。マウス Y1R 遺伝子プロモーターの解析および ChIP assay から Y1R 遺伝子の - 373 bp より下流に Smad 結合領域の存在が認められた。Y1R siRNA を MC3T3-E1 細胞に導入し Y1R の発現をノックダウンすると Runx2, osterix, アルカリフォスファターゼやオステオカルシンの mRNA 発現が増加し、NPY-Y1R システムは autocrine に作用して分化を負に制御している可能性が示唆され、骨細胞から神経ペプチドを介した全身の異種組織間との制御機構が存在することが明らかになった(図 3)。

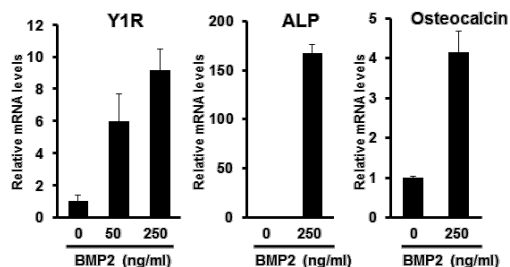


図 2

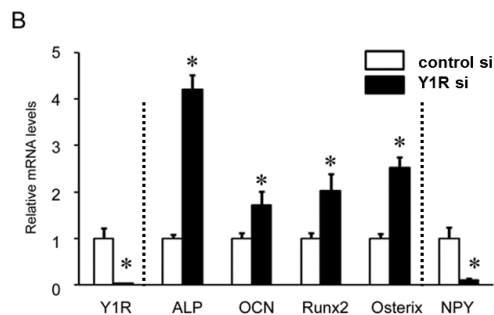


図 3

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 10 件)

1. Takahashi M, Elbarbary RA, Nakashima A, Abe M, Watanabe N, Narita M, Takahashi M, Tamura M, Yoshida T, Nashimoto M. A naked RNA heptamer targeting the human Bcl-2 mRNA induces apoptosis of HL-60 leukemia cells. *Cancer Lett.* 328(2):362-368, 2013. 査読有
doi:10.1016/j.canlet.2012.10.016
2. Kurebayashi N, Sato M, Fujisawa T, Fukushima K, Tamura M. Regulation of neuropeptide Y Y1 receptor expression by bone morphogenetic protein 2 in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 439(4):506-510, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.014
3. Tamura M, Uyama M, Sugiyama Y, Sato M. Canonical Wnt signaling activates miR-34 expression during osteoblastic differentiation. *Mol Med Rep.* 8(6):1807-1811, 2013. 査読有
doi: 10.3892/mmr.2013.1713
4. Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K, Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. *Cell Metab.* 18(5):749-758, 2013. 査読有
doi: 10.1016/j.cmet.2013.09.014.
5. Fujisawa R, Tamura M. Acidic bone matrix proteins and their roles in calcification. *Front Biosci.* 17:1891-1903, 2012. 査読有
doi:10.2741/4026
6. Nemoto E, Ebe Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H. Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated

- osteoblastogenesis Biochem Biophys Res Commun. 422(4):627-632, 2012. 査読有
doi:10.1016/j.bbrc.2012.05.039
7. Tamura M, Sato MM, Nashimoto M. Regulation of CXCL12 expression by canonical Wnt signaling in bone marrow stromal cells. Int J Biochem Cell Biol 43(5):760-767, 2011. 査読有
doi:10.1016/j.biocel.2011.01.021
 8. Sano T, Takahashi Y, Takaku H, Tamura M, Nashimoto M. Expanding the utility of heptamer-type sgRNA for TRUE gene silencing. Biochem Biophys Res Commun. 416(3-4):427-432, 2011. 査読有
doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.091
 9. 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. 査読有
doi:10.2741/201
 10. 佐藤真理, 田村正人, 体性幹細胞の老化と若返り, 北海道歯学雑誌, 31, 124-126, 2010. 査読無
<http://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/handle/2115/45821>

[学会発表](計6件)

1. 紅林奈央子, 佐藤真理, 藤澤俊明, 福島和昭, 田村正人, Neuropeptide YY1 受容体の BMP2 による発現誘導と骨芽細胞における機能, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸国際会議場, 兵庫県神戸市.
2. Tamura M, Uyama M, Kawanami M, Sato M. Canonical Wnt signaling activates miR-34 expression during osteoblastic differentiation. 2nd Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and the Japanese Society for Bone and Mineral Research. May 28-June 1, 2013, Kobe Convention Center, Kobe, Japan.
3. Uyama M, Kawanami M, Tamura M. Actions of small molecular inhibitors on anabolic effects of intermittent PTH treatment. 2012 Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research. October 16 - 20, 2012, Minneapolis Convention Center,

Minneapolis, MN, USA.

4. 田村正人, 佐藤真理. 古典的 Wnt シグナルは骨髄ストローマ細胞の CXCL12 発現を調節する, 第 29 回日本骨代謝学会学術大会, 2011 年 7 月 28 日-30 日, 大阪国際会議場, 大阪市.
5. Tamura M, Sato M. Canonical Wnt signaling regulates CXCL12 expression of stromal osteoblasts. 32th Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research 2010. October 15 -19, 2010, Metro Toronto Convention Centre, Toronto, ON, Canada.
6. Fujisawa R, Mizuno M and Tamura M. An Anionic Dendrimer as a Model for Acidic Matrix Proteins of Bone and Tooth. General Session & Exhibition of the IADR, July 14-17, 2010, Barcelona International Convention Center, Barcelona, Spain.

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

<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・准教授
研究者番号: 40292221

佐藤真理 (SATO Mari)
北海道大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 40546488
平成 25 年度

(3) 連携研究者
該当なし