

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 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592047

研究課題名（和文）

破骨細胞分化と機能発現機構における内因性Wintシグナルの関与の解明

研究課題名（英文）

Investigation of the role of endogenous Wnt signaling in osteoclast differentiation and function

研究代表者

天野 滋 (AMANO SHIGERU)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：90167958

研究成果の概要（和文）：歯周病は、歯周病原性細菌によって引き起こされる歯槽骨破壊を伴う慢性炎症である。その歯槽骨吸収は、破骨細胞による骨吸収が骨芽細胞による骨形成を上回った結果である。本研究によって、細胞の増殖・分化、細胞の極性、形態形成の制御に関わっている Wnt シグナルが、破骨細胞の融合過程や骨吸収関連遺伝子発現の促進に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Periodontitis is a chronic inflammatory disease caused by infection of periodontopathic bacteria, which induces alveolar bone resorption. The alveolar bone resorption is characterized by an increased osteoclastic bone resorption that exceeds the bone formation by osteoblasts. This study clarified that Wnt signaling, which is a critical regulator controlling cell proliferation, movement, differentiation, polarity, and morphogenesis, plays a role in the enhancement both the fusion process during osteoclast differentiation and the expression of osteoclastic bone resorption-related genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
2013年度	0	0	0
2014年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：細胞分化、組織形成、発生、分化制御、骨代謝学、免疫、感染、炎症

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは細胞の増殖・分化、細胞の極性、形態形成を制御している。このシグナル伝達経路には、(1) β -カテニン/T-cell

factor (TCF) を介して Wnt 標的遺伝子発現を制御している Wnt/ β -カテニン経路< canonical 経路>、(2) 運動に関与しているとされる Wnt/ Ca^{2+} シグナル経路、(3) 細胞骨

格系の制御に関与している Wnt/PCP (planar cell polarity, 平面内細胞極性) 経路< Wnt/Ca²⁺シグナル経路と Wnt/PCP 経路を併せて non-canonical 経路>の3種類があると考えられている。Wnt は、分泌性の糖タンパク質で現在までにヒトやマウスで 19 種類報告されている。Wnt は、細胞膜上の 7 回膜貫通型受容体 frizzled (Fzd)、または共役受容体である 1 回膜貫通型低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 5/6 (LRP5/6) を介し、これらの 3 つの経路を作動させることが明らかとなってきた。しかし、19 種類ある Wnt と 10 種類ある Fzd との組み合わせが、いずれの経路を活性化させるか統一的な対応関係については明らかとなっていない。

LRP5 遺伝子欠損マウスの解析や骨粗鬆症-偽神経腫症候群 (OPPG) の解析から、骨量調整に LRP5 が関与していることが示され、その後骨代謝における Wnt シグナルの役割が徐々に解明されてきている。骨芽細胞において Runx2 は Wnt/ β -カテニンシグナルを促進することによって、破骨細胞分化抑制因子 Osteoprotegerin 遺伝子発現を促進させ、間接的に破骨細胞の分化を抑制することが報告されている。さらに Wnt に直接結合して阻害する Secreted Frizzled-related protein (sfrp) 1 は、RANKL に直接結合して、その活性を抑制することが報告されている。*P. gingivalis* 感染実験モデルマウスで促進される歯槽骨吸収が、sfrp 1 の中和抗体を投与したところ抑制されたという報告もある。このように現在までに、Wnt シグナルが破骨細胞の分化を間接的に調節している可能性が示されてきている。

しかしながら、成熟破骨細胞の核内で β -カテニンの存在が観察されているにもかかわらず、これまで破骨細胞分化・機能発現における内因性 Wnt シグナルの直接的役割に関してはほとんど明らかにされていない。

破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞と骨髄由来 M-CSF 依存性マクロファージを用いて、現在までに以下の実験結果を得ている。

- (1) 成熟破骨細胞における β -カテニンの局在が、核の周り核内で観察された。
- (2) 4B12 細胞で発現している Wnt シグナル分子を real-time RT-PCR で網羅的に検討し、以下の発現が検出された。

① 19 種類の Wnt のうち 4 種類の Wnt が

検出された。

② 10 種類の Fzd のうち 5 種類の Fzd が検出された。また、共役受容体である Lrp5 と Lrp6 が検出された。

③ 4 種類の Wnt シグナル拮抗因子 Dickkopf (Dkk) のうち 1 種類の Dkk が検出された。

④ Dkk の受容体である Kremen (Krm) は Krm1 と Krm2 の発現が検出された。

⑤ Wnt に直接結合して両経路を阻害する Sfrp の発現は検出されなかった。

(3) M-CSF と sRANKL 刺激 1 日目で、Wnt、Fzd、Lrp の発現に変化が認められなかったが、canonical 経路の抑制因子である Dkk と Krm の遺伝子発現が抑制された。

(4) M-CSF と sRANKL 刺激前では観察されなかった β -カテニンの核内での局在が、刺激後 2 日目で観察された。canonical 経路が作動してくることが推測された。

以上の学術的背景と予備実験から、Wnt/ β -カテニンシグナルが破骨細胞分化ならびに機能発現調節において重要な役割を演じている可能性が推測された。

2. 研究の目的

歯周病は、歯周病原性細菌によって引き起こされる歯槽骨破壊を伴う慢性炎症である。その歯槽骨破壊は、歯周病原性細菌の菌体成分を認識する Toll like receptor (TLR) からのシグナルが、骨芽細胞からの RANKL 発現や、マクロファージからの炎症性サイトカイン発現を誘導し、破骨細胞分化機能亢進を引き起こし歯槽骨破壊が促進されると考えられている。近年ヒトマクロファージにおいて TLR シグナルと Wnt シグナルがクロストークすることが報告され、歯槽骨破壊における Wnt シグナルの役割を検討することは意義あるものと考えられる。本研究は私共が確立した破骨細胞の分化と骨吸収能の特徴を再現できる破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞を用い、破骨細胞の分化・機能発現における内因性 Wnt シグナルの役割を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

- (1) 細胞: 樹立化破骨細胞前駆細胞 4B12 細胞
- (2) 試薬: mM-CSF (R&D)、sRANKL (R&D)、Wnt1、sFrp2(R&D)、sclerostin(R&D)、CHIR99021、LiCl、NaCl、anti-c-Fos antibody (SC)、anti-NFATc1 antibody (SC)、anti- β -catenin antibody (BD または SC)、TCF/LEF1 antibody sample kit (CS)、anti-PARP

antibody、FITC- conjugated anti-mouse IgG、DAPI

(3)破骨細胞形成： mM-CSF と sRANKL 存在下で培養し、TRAP 陽性多核細胞数または培養上清中の TRAP 活性を測定した。

(4)核内たんぱく質の Western blot 解析： Nuclear and Cytoplasmic Extraction reagents (Pierce) を用いて細胞質と核からタンパク質を抽出し、Western blot 法で解析した。核内タンパク質の内部コントロールとして DNA の修復や細胞の分化・増殖等に関わる分子量 116 kD の poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)を用いた。

(5)核内たんぱく質の免疫染色： 蛍光免疫染色後、共焦点顕微鏡で観察した。

(6) siRNA の遺伝子導入： Ctnnb1 #1 siRNA、Ctnnb1 #2 siRNA、siWnt6、siWnt2b、GFP siRNA (Invitrogen)を Amaxa 社遺伝子導入システム Nucleofector で導入し、破骨細胞形成と遺伝子発現に対する影響を検討した。

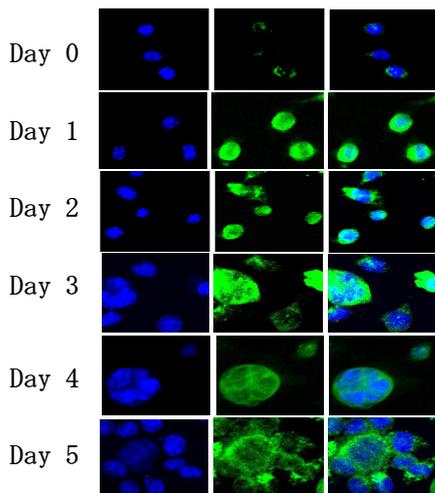
(7)核内におけるβ-catenin と TCF/LEF 転写因子との結合解析： Pierce Protein A/G Magnetic IP/Co-IP Kit を用いて解析した。

(8) DC-STAMP プロモーター内のβ-catenin、TCF 結合領域解析： Pierce Agarose Chip Kit を用いて解析した。

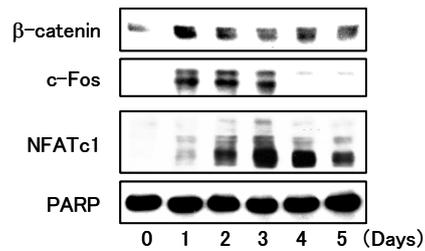
(9)破骨細胞骨吸収機能解析： 4B12 細胞を dentin slice 上に 5000 個播種し、まず M-CSF と sRANKL を含有する培地で 5 日間培養した。その後、同様の培地に交換、さらに Wnt1 を添加し 5 日間培養した。

4. 研究成果

(1) M-CSF と sRANKL 両刺激による β-catenin、c-Fos、NFATc1 の核内移行

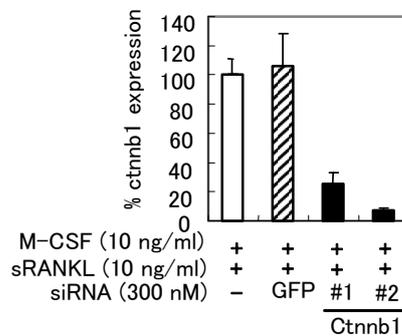


β-catenin は 1 日目から 5 日目まで核内に移行していることが、核染色した DAPI の青色と β-catenin の緑色を重ね合わせることによって、核内が水色になったことから判断された。

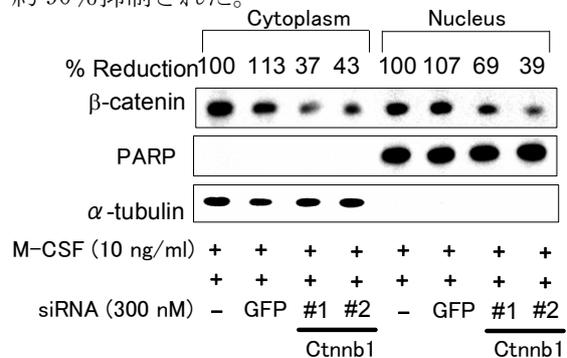


β-catenin の核内移行は 1 日目から認められ 5 日目まで持続した。 c-Fos の核内移行は 1 日目から認められ 3 日目まで持続した。 NFATc1 の核内移行は 2 日目から明らかに認められ 3 日目をピークにその後減少し 5 日目まで認められた。 破骨細胞分化過程で β-catenin が、核内に移行していることが明らかとなった。

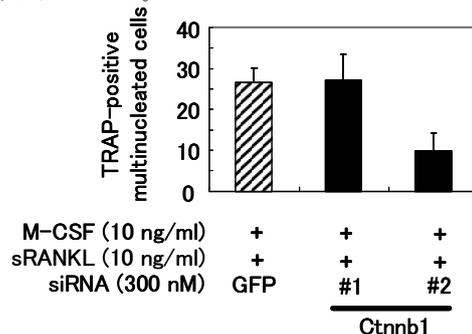
(2) siCtnnb1 導入が破骨細胞形成に及ぼす影響



ctnnb1 遺伝子発現は、 siCtnnb1#1 導入 3 日目で約 70%抑制され、 siCtnnb1#2 導入では約 90%抑制された。

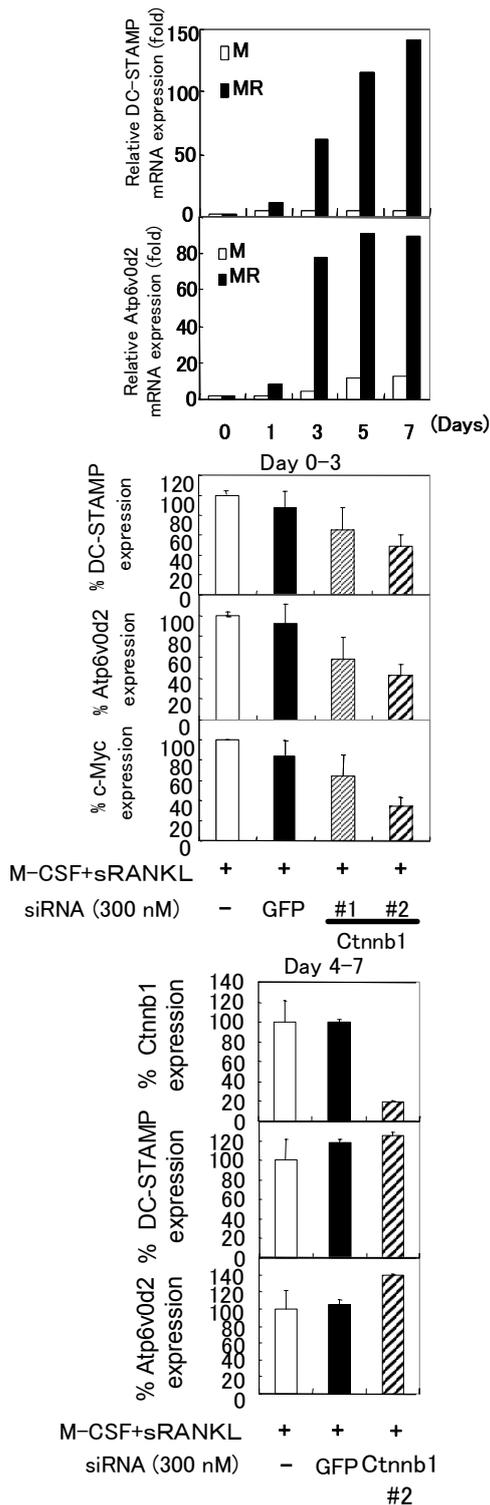


siCtnnb1 導入 5 日目の細胞内の β-catenin は、タンパク質レベルで抑制されていることが確認された。 さらに siCtnnb1#2 導入により核内に移行している β-catenin は、明らかに抑制されていた。



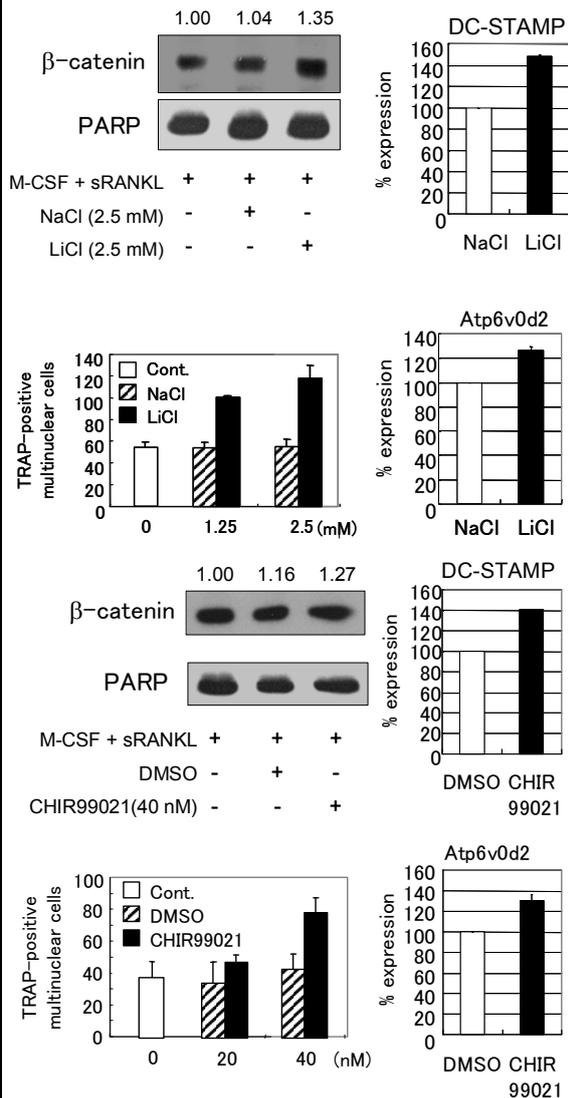
M-CSF と sRANKL 両刺激 7 日目の TRAP 陽性多核細胞数は、siCtnnb1#2 導入で明らかな抑制が認められた。しかし、siCtnnb1#1 導入では、その抑制が認められなかった。このことは、TRAP 陽性多核細胞形成を抑制するためには、90%以上のβ-catenin 遺伝子発現抑制が必要であり、核内に移行するβ-catenin 量を十分に抑制する必要があると考えられた。

(3) siCtnnb1 導入が多核化に關与する DC-STAMP と Atp6v0d2 の遺伝子発現に及ぼす影響



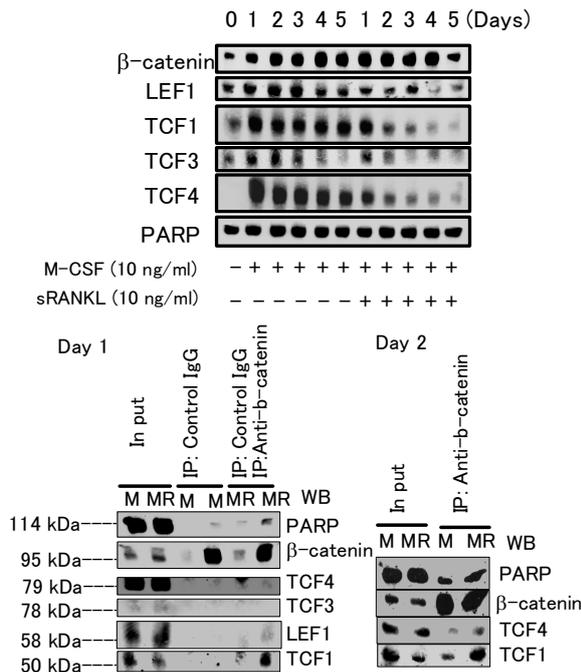
M-CSF と sRANKL 刺激 0 日目から 3 日間 siCtnnb1#2 導入した場合、DC-STAMP と Atp6v0d2 の遺伝子発現が抑制されたが、M-CSF と sRANKL 刺激 4 日目から 3 日間 siCtnnb1#2 導入した場合、その抑制は認められなかった。このことから、β-catenin は DC-STAMP と Atp6v0d2 の遺伝子発現を、M-CSF と sRANKL 刺激後の初期段階で正に制御している可能性が示唆された。

(4) GSK-3β 阻害剤 (LiCl または CHIR99021) の破骨細胞形成に及ぼす影響



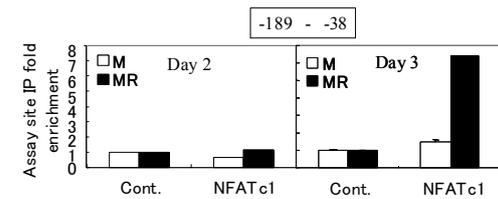
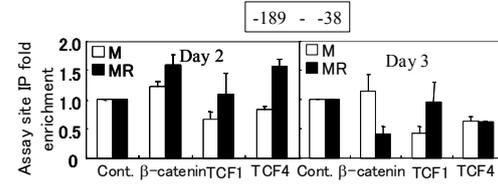
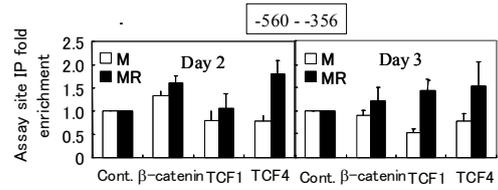
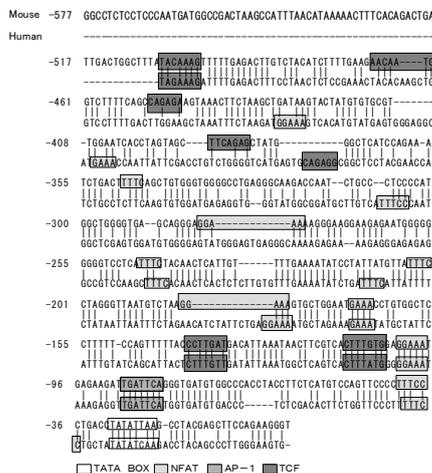
M-CSF と sRANKL 添加 2 日目から 2 日間、LiCl または CHIR99021 を添加することによって、TRAP 陽性多核細胞数は明らかに増加した。また、DC-STAMP と Atp6v0d2 の遺伝子発現も上昇した。このことから、破骨細胞分化段階初期の短期間細胞質内のβ-catenin の分解を阻止することが TRAP 陽性多核細胞形成を増加させることにつながることを示唆された。

(5) 核内におけるβ-catenin と転写因子 TCF/LEF との結合



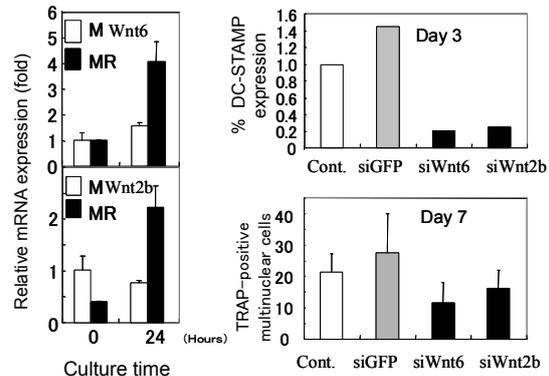
β-catenin は、核に移行し転写因子 TCF/LEF と複合体を形成し標的遺伝子の転写活性に影響することが知られている。4B12 細胞を M-CSF 単独刺激したところ、1 日目で核内の TCF1 と TCF4 が明らかに上昇し5日まで維持した。一方 M-CSF と sRANKL 両刺激したところ、1 日目で上昇した TCF1 と TCF4 は2日目から5日目まで徐々に減少した。核内での β-catenin と TCF/LEF との結合を Co-IP assay で検討したところ、M-CSF と sRANKL 両刺激 1 日目で TCF1 と TCF4 の結合が認められ、2 日目でその結合量は増加した。このことから、M-CSF と sRANKL 両刺激によって核内に移行した β-catenin は TCF1 と TCF4 と結合して DC-STAMP の転写活性を制御している可能性が考えられた。

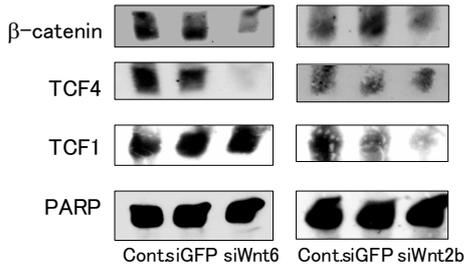
(6) DC-STAMP プロモーター領域への β-catenin, TCF1, TCF4 のリクルート



M-CSF と RANKL 刺激では c-Fos と NFATc1 が DC-STAMP のプロモーターにリクルートされることが現在明らかとなっている。そこで、4B12 細胞を用いた実験系においても同様な結果が得られるか調べたところ、3 日目で -189 から -38 領域に NFATc1 がリクルートされてくることが確かめられた。そこで、β-catenin, TCF1, TCF4 がこの領域と -560 から -356 領域にリクルートされてくるか調べた。-189 から -38 領域では、M-CSF と sRANKL 刺激 2 日目で β-catenin, TCF1, TCF4 がリクルートされてくることが確認されたが、NFATc1 がリクルートされてくる 3 日目では、この箇所に結合している β-catenin と TCF4 は減少していた。-560 から -356 の領域では M-CSF と sRANKL 刺激 2 日目で β-catenin と TCF4 が、3 日目で β-catenin, TCF1, TCF4 がリクルートされてきていた。このことから、β-catenin, TCF1, TCF4 は、DC-STAMP 発現の初期の段階でプロモーター領域への NFATc1 のリクルートを制御している可能性が考えられた。

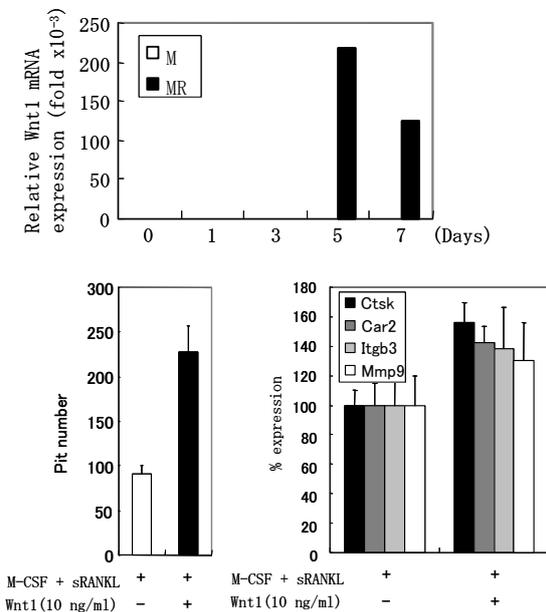
(7) 破骨細胞形成に及ぼす Wnt の影響





M-CSF と sRANKL 両刺激 1 日目に、Wnt6 と Wnt2b の発現上昇が認められた。siWnt6 または siWnt2b 導入により DC-STAMP の発現と TRAP 陽性多核細胞形成が抑制された。さらに、siWnt6 導入により核内に移行する β-catenin と TCF4 の量が減少した。siWnt2b 導入により核内に移行する TCF1 の量が減少した。このことから、M-CSF と sRANKL 両刺激によって破骨細胞前駆細胞から誘導産生されてくる Wnt6 と Wnt2b が、DC-STAMP 遺伝子の発現を調節している β-catenin、TCF4 そして TCF1 の核内移行を促進するオートクライン因子として作用し、破骨細胞の多核化を調節していることが示唆された。

(8) 破骨細胞骨吸収機能に及ぼす Wnt の影響



M-CSF と sRANKL 両刺激 5 日目に、Wnt1 の発現上昇が認められた。M-CSF と sRANKL 両刺激 5 日目以降の破骨細胞骨吸収機能に対する Wnt1 の影響を検討した。dentin slice 上に 4B12 細胞を 5000 個播種し、M-CSF と sRANKL を含有する培地で 5 日間培養後、同様の培地

に交換、さらに Wnt1 を添加し 5 日間培養し骨吸収窩の数を調べた。明らかに Wnt1 を添加した群の方が多かった。また、その時点の遺伝子発現を調べたところ、骨吸収機能に関与している Ctsk、Car2、Itgb3、Mmp9 の遺伝子の上昇が認められた。

以上の結果から、M-CSF と RANKL 刺激の初期段階に破骨細胞前駆細胞から誘導産生されてくる Wnt6 と Wnt2b による β-catenin/TCF4 と TCF1 依存性経路の活性化が、DC-STAMP 遺伝子プロモーター領域への NFATc1 のリクルート促進につながり、破骨細胞の多核化を調節していると考えられる。また、M-CSF と RANKL 刺激の後期段階では、Wnt1 が発現してきて骨吸収機能を制御している可能性が示唆された。

最近、遺伝子操作によって作製された β-catenin 欠損マウスでは破骨細胞前駆細胞増殖が阻止されること、β-catenin 恒常発現マウスは破骨細胞分化が阻止されること、β-catenin ヘテロ欠損マウスは破骨細胞分化が促進されること、さらにマクロファージ前駆細胞特異的 β-catenin 抑制マウスでは破骨細胞形成が促進されること、破骨細胞前駆細胞特異的完全 β-catenin 欠損マウスでは破骨細胞形成が阻害されることが報告された。今後、破骨細胞の骨吸収機能における Wnt 1 シグナルの役割についてさらに詳細に検討する必要があると考える。

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 2 件)

① 天野 滋、大森喜弘 : Wnt6/β-catenin シグナルは DC-STAMP の発現を上昇させることによって破骨細胞の融合を促進する、第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 16 日、奥羽大学記念講堂

② 天野 滋、関根圭輔、大森喜弘 : 破骨細胞分化における内因性 Wnt シグナルの役割、第 53 回歯科基礎医学会学術大会 2011 年 10 月 1 日、長良川国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 滋 (AMANO SHIGERU)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 90167958

(2) 研究分担者

関根圭輔 (SEKINE KEISUKE)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号 : 00323569