

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791524

研究課題名(和文) Wntシグナル制御による骨肉腫細胞増殖抑制薬の可能性検証

研究課題名(英文) Feasibility analysis of osteosarcoma suppression by modulating bone formative Wnt signalings

研究代表者

三浦 将吾 (Miura, Shogo)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90529182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：増殖が盛んな骨肉腫細胞を骨芽細胞様に分化させ、増殖を抑制させる創薬を想定し、骨芽細胞分化(骨形成)シグナルの解明を試みた。Wntによる β -catenin経路の活性化が骨形成を促進する報告があるが、数多あるWnt分子と下流活性化シグナルの関連は不明な点が多い。そこで、Wnt関連分子を網羅的に、既知の4種の下流シグナル経路の活性化度および骨形成活性化度の対比することを試みた。その結果、骨形成活性化度は、既知シグナル経路以外あるいは既知のシグナル活性化モード以外の機構により制御されることを見出した。現在も解析継続中であるが、新たな骨形成シグナル制御様式の発見による骨関連疾患治療標的の同定が期待される。

研究成果の概要(英文)：Assuming the therapy which suppresses proliferating osteosarcoma cells by converting from proliferative state to osteoblastic differentiate state, we have tried to elucidate the signalings which regulate osteoblastic differentiation. Previous studies have shown that beta-catenin signaling induced by Wnt molecules are critical, however, the relationship between numerous number of Wnt family molecules and their activating signalings is largely unclear. Thereby, for Wnt family molecules, the confrontation between the effects on an osteoblastic activity and an extent of the activity of 4 signalings known to function downstream was performed comprehensively. As a result, it has been elucidated that the extent of osteoblastic differentiation cannot be explained only by known signalings or known modes of signaling activation. Although the detailed analysis of this unknown regulations has still been ongoing, it is worthy of analysis with anticipating the discovery of new therapeutic targets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：シグナル伝達 発生・分化 骨芽細胞 骨肉腫 薬理学

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は、腫瘍性の脆弱な骨を過剰形成し、正常な骨組織をも障害する肉腫であり、最も頻度が高い悪性骨腫瘍である。75%の症例は20歳以下の若年者に発症し、特に思春期に多い。高齢者で見られる場合は、基礎疾患として骨 Paget 病や骨梗塞、放射線照射の既往歴などがあることが多い。非転移型骨肉腫の場合は、化学療法の発展に伴い、生存率の大幅な改善が見られたものの、転移型悪性骨肉腫の場合は30年来治療成績が向上せず5年生存率20%未満の非常に重篤な疾患である。悪性の場合、増殖が盛んであり、進行もきわめて早く、外科的手術と抗がん剤による化学療法の併用が行われるものの、転移のリスクが極めて高い。これまで、骨肉腫細胞の自己増殖に関する分子機構に関する理解は不十分であったが、近年、骨芽細胞分化において重要な役割を担う Wnt シグナル経路が、骨肉腫細胞においては不活性化されていることが示唆された(Cai Y. *et al.* 2010 J Pathol)。また、骨肉腫細胞では、転写因子 Sox2 が骨肉腫細胞の自己増殖を正に制御し、逆に Wnt シグナル経路の活性化に伴い、骨肉腫細胞内 Sox2 発現量の低下、骨芽細胞様細胞への分化、更に自己増殖能の低下することが示唆された(Basu-Roy U. *et al.* 2011 Oncogene)。一部異なる結果を示す報告もあるものの、多くの知見より、骨肉腫細胞を増殖能が低い骨芽細胞様細胞へと分化誘導することで、骨肉腫細胞の自己増殖抑制や脆弱な骨の過剰形成を抑制できることが期待され、本研究では、その分化誘導を惹起する新規低分子薬剤の探索を目的とする。

骨肉腫細胞から骨芽細胞様細胞への分化分子機構のみならず、正常骨芽細胞の分化成熟分子機構は、不明な点が多い。これまでに、正常骨芽細胞の分化成熟に Wnt/ β -catenin シグナル経路が重要な役割を果たすことが示唆されている。このシグナル経路は19種類のリガンド分子群 Wnt と10種類の受容体分子群 Frizzled (Fz) および2種類の共受容体 LDL receptor related protein (LRP)5/6 による相互作用の特定の組合せにより惹起されることが示唆されているが、生理的に機能する組合せは不明確である。さらに、共受容体 LRP5/6 が関与しない様式により non-canonical 経路と総称される複数の経路が活性化し、この経路の骨形成への重要性も示唆されているが、どの Wnt/Fz の組合せによる効果であるかを含め、詳細は不明な点が多い。そこで、この膨大な組合せに伴うシグナル伝達すべての中から、正常骨芽細胞において生理的に骨形成を促進する Wnt/Fz の組合せおよび下流シグナル経路を同定、および、増殖型骨肉腫細胞において骨芽細胞様細胞への分化を促進する Wnt/Fz および下流シグナル経路を同定する。これらの解析結果の比較により、正常骨芽細胞による骨代謝に影響

を与えずに、骨肉腫細胞に特異的または優先的に分化誘導する Wnt/Fz の組合せを同定でき、正常骨芽細胞の過剰な活性化に伴う副作用を回避した治療標的になり得ると大いに期待できる。細胞種間での Wnt/Fz の発現プロフィールの多様性、および、骨芽細胞における Wnt/Fz の発現分子種が極めて広範に渡っている(Wnt は19種類中10種類、Fz は10種類中9種類)ことは(未発表データ)、本申請研究を着想する上での重要な知見となっている。すなわち、骨芽細胞と骨肉腫細胞は、いずれも間質系細胞より骨芽細胞方向に分化した系統であるため、骨肉腫細胞においても Wnt/Fz の広範な分子種の発現が期待されるが、細胞系統が異なるので発現プロフィールが異なると想定される。これらのことから、正常骨芽細胞が分化成熟に関与する経路ではない、骨肉腫細胞にお骨芽細胞様細胞への分化を促進する Wnt/Fz および下流シグナル経路を活性化し、骨肉腫の増殖抑制能を有する低分子化合物が悪性骨肉腫治療に大きく貢献する治療薬となりえることが想定された。

2. 研究の目的

上記背景を基に本申請研究では、正常骨芽細胞の分化成熟に関与する Wnt/Fz の同定、骨肉腫細胞の骨芽細胞様細胞への分化に関与する Wnt/Fz およびその下流で機能するシグナル経路の同定を行い、骨肉腫特異的な経路の活性化が当初の目的であった。実際に検討を進める過程において、Wnt 分子群による骨形成促進を制御するシグナル経路が既知の経路のみでは説明できない可能性を見出したため、骨芽細胞あるいは骨肉腫細胞という細胞種特異的な分子制御機構の探索を解明する基盤情報として、骨形成を促進する Wnt/Fzd シグナルの全体像解明、すなわち、Wnt シグナル経路がどの分子によりどのように制御された結果、骨形成が促進されるかの解明を目的とした。

3. 研究の方法

① 細胞培養

MC3T3-E1 細胞は理研細胞バンクより購入し、10% fetal bovine serum (FBS, BioWest) および Penicillin-Streptomycin (PCSM, Invitrogen) を添加した α MEM 培地 (SIGMA) にて培養した。293A 細胞は Invitrogen より購入し、10% FBS、PCSM および Nonessential amino acids (NEAA, Invitrogen) を添加した DMEM 培地 (ナカライテスク) にて培養した。293FT 細胞は Invitrogen より購入し、10% FBS、PCSM および G-418 (ナカライテスク) を添加した DMEM 培地にて培養した。

② マウス初代培養骨芽細胞の単離および培養

マウス初代培養骨芽細胞(POB)は過去の報告を参考にし、以下の要領で単離した(--)。1-4日齢の雄のC57/BL6マウスより頭蓋骨を単離し、破碎した小片をコラーゲンゲル(cell matrix type-1A, 新田ゼラチン)中にて3-4日間培養した。培養ゲル中で増殖した細胞をコラゲナーゼ(Collagenase S-I, 新田ゼラチン)処理した後に回収し、新しいシャーレに撒き、 α MEM培地中で定着した細胞をPOBとして用いた。

③ 骨形成アッセイ

MC3T3-E1細胞を、骨化培地(DMEM、10% FBS、10nM Dexamethasone、5 mM β -glycerophosphate)にて培養し、3日間毎に培地交換をした。経時的に細胞より、RNAを抽出し、骨形成関連遺伝子 mRNA 発現量変化の経時変化を観察した。また、培養21日目には、von kossa 染色を行い、カルシウムの沈着の有無を確認した。

④ ベクターの構築

MC3T3-E1細胞およびPOB由来のcDNAを鋳型としたPCR法にてマウスWnt2(mWnt2)、mWnt3a、mWnt4、mWnt5a、mWnt5b、mWnt6、mWnt7b、mWnt9a、mWnt9b、mWnt10a、mWnt10b、mWnt11、mWnt16、mFzd1、mFzd2、mFzd3、mFzd4、mFzd5、mFzd6、mFzd7、mFzd8、mFzd9、mLRP5、mLRP6、mDkk1、mRor1およびmRor2を増幅し、クローニングを行った。上記クローニングした遺伝子はGatewayテクノロジー(Invitrogen)にてpAd/CMV/V5-DESTに、FzdはオーバーラップPCR法でC末端に3×flag-tagを付加した後、GatewayテクノロジーにてpAd/CMV/V5-DESTにサブクローニングした。また、mLRP5、mLRP6はC末端にEGFP-tagを付加した発現ベクターを構築した後(LRP5-GFPおよびLRP6-GFP)、GatewayテクノロジーにてpAd/CMV/V5-DESTにサブクローニングした。

⑤ ベクターの細胞への導入

構築した発現ベクターおよびウイルスベクターは、Lipofectamine™2000(Invitrogen)を用いて推奨プロトコールに従い各細胞に一過性導入した。

⑥ アデノウイルスの作製

ViraPower™ Adenoviral Expression System(Invitrogen)の推奨プロトコールに従い、構築したアデノウイルスベクターを293A細胞に一過性導入し、アデノウイルスを作製した。得られたアデノウイルスはAdenoPACK20(Sartorius stedim)を用いて精製・濃縮を行った。アデノウイルスの力価は、アデノウイルスベクターのCMVプロモーター部を定量リアルタイムPCRにて定量し、力価既知のウイルスのそれと比較して算出した。

⑦ 各転写因子レポーター配列のレンチウイルスの作製

TCF、NFAT、AP-1、CREのレポーター配列の3'末端にluc2CP(Promega)を付加し、Gatewayテクノロジーにて、pLenti 6.3(Invitrogen)のCMVプロモーターを除去したベクター(pLenti 6.3- Δ CMV)にサブクローニングした。各レポーター配列のレンチウイルスは、ViraPower Lentiviral Expression Systems(Invitrogen)の推奨プロトコールに従って産生した。

⑧ 各転写因子レポーター配列の安定導入細胞の構築

作製したレンチウイルスをMC3T3-E1細胞に感染させ、blastcidin含有培養培地にて5-6日培養し、定着していた細胞をレポーター配列安定導入細胞として用いた。樹立した安定発現細胞は10% FBS、blastcidinおよびPCSMを添加した α MEM培地にて培養した。

⑨ 定量的リアルタイムPCR

mRNAの定量は、ReverTra Ace®(TOYOBO)を用いた逆転写反応およびSYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal(Invitrogen)によるリアルタイムPCR反応をCHROMO4(BioRad)にて検討し、添付のソフトウェアを用いて解析した。各々のmRNA量は β -actin量により規格化した。

⑩ ルシフェラーゼアッセイ

各レポーターの安定発現MC3T3-E1細胞を撒き(384 well-plateに 3×10^3 cells/well、または96 well-plateに 1×10^4 cells/well)、24時間後に各種アデノウイルスを合計90 MOIで感染させた。さらに42時間後にFBS不含有 α -MEM培地に交換し、30時間後にONE-Glo™ Luciferase Assay System(Promega)を用いてルシフェラーゼレポーター発現量を評価した。無刺激状態を1として規格化した際の活性化倍率として規格化した。

⑪ ALP酵素活性の測定

アデノウイルス感染5日後、またはsiRNA導入72時間後に、ALP assay kit(TAKARA)のプロトコールに従い、比色法にてp-Nitrophenyl phosphateの分解を定量し、ALP酵素活性の指標とした。

4. 研究成果

1) in vitro 骨形成条件の検討

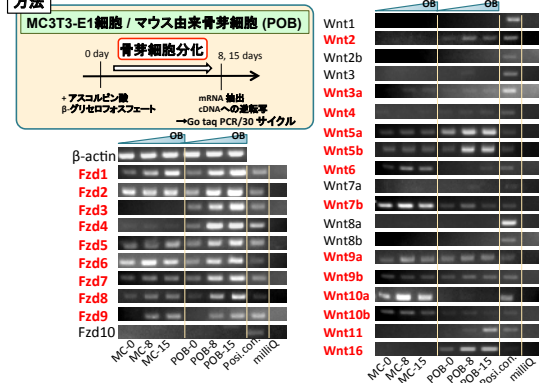
骨形成をin vitroで評価できる系の構築を試みた。骨形成実験において用いられる代表的な細胞である骨芽細胞系細胞株MC3T3-E1細胞を用いて、in vitro骨形成実験を行った。骨形成培地に交換後、2日毎の経時的なmRNA発現量を測定した。初期、中期、後

期の骨形成マーカーとして、Alkaline phosphatase、osteopontin、osteocalcin の発現量を評価した結果、培養 2~4 日目に初期マーカー、培養 6~8 日目に中期マーカー、培養 18~22 日目に後期マーカーの顕著な上昇が見出された。また培養 21 日目の細胞を、von kossa 染色した結果、別途用意し同時期に染色した培養 2 日目の細胞に比較して、顕著な茶褐色染色が観察され、カルシウム沈着が確認された。以上のことから、MC3T3-E1 を用いて、in vitro 骨形成を評価することが妥当だと考えられた。なお、Wnt/Fzd シグナルは、中期および後期の骨形成は、初期の骨形成シグナル活性化時に起こる遺伝子発現変動により生じることが、過去の報告より示唆されるため、初期において骨形成活性化を担う分子メカニズム・シグナルの解明が重要であると考え、下記 3) 以降の解析では、培養開始 2~4 日程度の骨形成初期過程に焦点を絞った。

2) 骨芽細胞系細胞に発現する Wnt/Fzd 関連分子

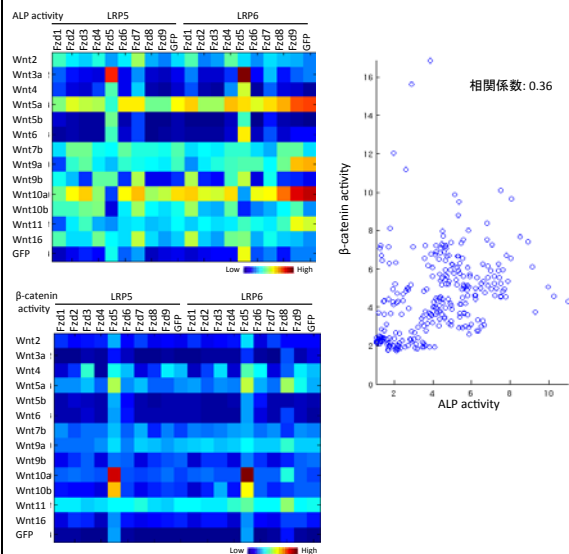
MC3T3-E1 及び初代培養骨芽細胞 (POB) に発現する Wnt/Fzd 分子のうち、骨芽細胞分化に関わる分子は、明確に同定されていない。その一方で、多くの Wnt ファミリー分子の骨形成への関与を示唆する報告がなされている。そこで、まず、骨芽細胞系細胞に発現する Wnt 関連分子の同定を試みた。培養後 0、8、16 日に回収した MC3T3-E1 細胞または POB 由来 cDNA を鋳型とした PCR 法により発現が微弱であっても認められる分子を探索した結果、Wnt 分子 (リガンド) は、Wnt2、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16 の発現が認められ、Fzd 分子 (受容体) は、Fzd1~9 の発現が認められた。微弱な発現であっても、下流のシグナル活性化能が大きい場合、生理的な骨形成への寄与が無視できない場合も考えられるため、これら発現が見出された分子全ての組み合わせについて、下流のシグナル経路の活性化を評価することとした。

骨芽細胞系細胞における Wnt/Fzd の発現プロファイル



3) Wnt/Fzd シグナル (古典的経路) の網羅解析

これまでの多くの報告から、骨形成は、Wnt/Fzd シグナル経路のうち、 β -catenin 経路 (古典的経路) が主要な役割を担うと考えられた。LRP5/6 β -catenin 経路の活性化を担う共受容体で有り、その骨形成への寄与は多くの過去の解析で示されているが、骨形成活性化の強度を支配する要因であるかどうか不明である。そこで、まず、上述 2) で発現が認められた分子群について、全ての Wnt/Fzd の組み合わせおよび共受容体 LRP5/6 を過剰発現させた際の骨形成活性化度と β -catenin シグナル経路活性化度の相関を検討した。骨形成活性化度は、ALP 活性測定により評価し、 β -catenin シグナル経路活性化度はルシフェラーゼアッセイにより評価した。その結果、以下のヒートマップ様なプロファイルが得られた。ALP 活性と β -catenin シグナル強度の相関は、下記散布図の通りであり、弱い正の相関傾向が認められるものの (相関係数 0.36)、 β -catenin 経路活性化が極めて低い Wnt3a-Fzd5 の組み合わせで ALP 活性は極めて高値なるなど、 β -catenin 経路による寄与のみでは、骨形成シグナルが説明できないことが明らかとなった。

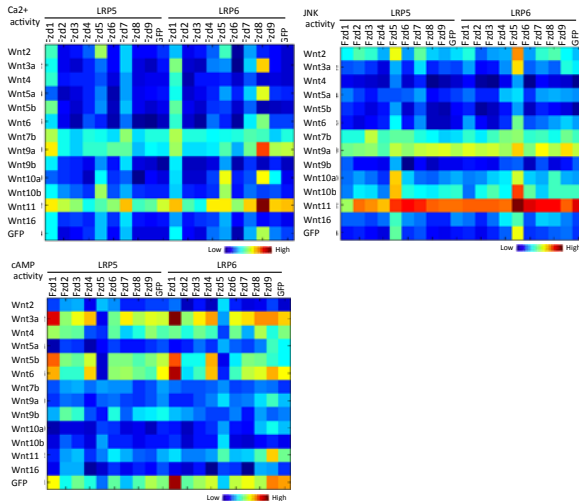


4) Wnt/Fzd シグナル (非古典的経路) の網羅解析

そこで、Wnt シグナルの β -catenin 以外のシグナル経路として、非古典的経路である Ca²⁺ 経路、JNK 経路、cAMP 経路に着目して、これらを考慮することで、骨形成が十分に説明可能か検討することとした。上述 3) と同様の検討を行ったところ、LRP5/6 導入下では、Ca²⁺ 経路、JNK 経路の活性化の絶対値は低いものであったが (data not shown)、cAMP 経路は強い活性化を示す Wnt/Fzd の組み合わせが存在した。そこで、骨形成が、各シグナルのクロストークで説明できるという仮説のもと、ALP 活性の対数値を、各シグナル経路の対数線対数和により予測することを試みた。その結果、

$$\ln(\text{ALP}) = 1.23 + 0.0195 * \ln(\beta\text{-cat.}) + 0.458 * \ln(\text{Ca}^{2+}) + 0.578 * \ln(\text{JNK}) - 1.23 * \ln(\text{cAMP})$$

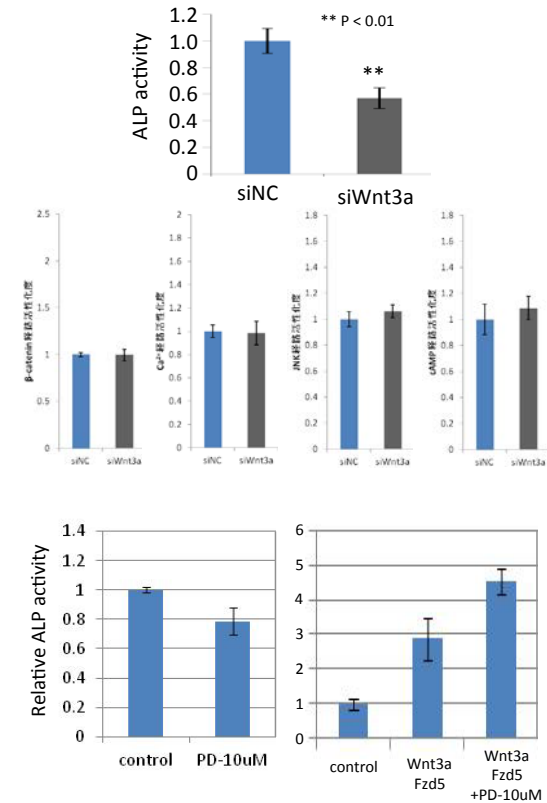
と近似した際に、pearson 相関係数 0.75 まで上昇した。LRP5/6 の過剰発現状態で、ALP 高値に誘導した状態における骨形成の上昇幅を規定する因子として、非古典的経路の寄与を無視できないことが強く示唆された。一方で、近似式において各経路の寄与とは独立した効果を反映する項に対応する定数項の寄与が無視できない程度であることが明らかとなり (data not shown)、Wnt/Fzd シグナルには未知のシグナル経路が存在し、骨形成に寄与する可能性が想定された。



5) Wnt3a により活性化されるシグナル経路の検討

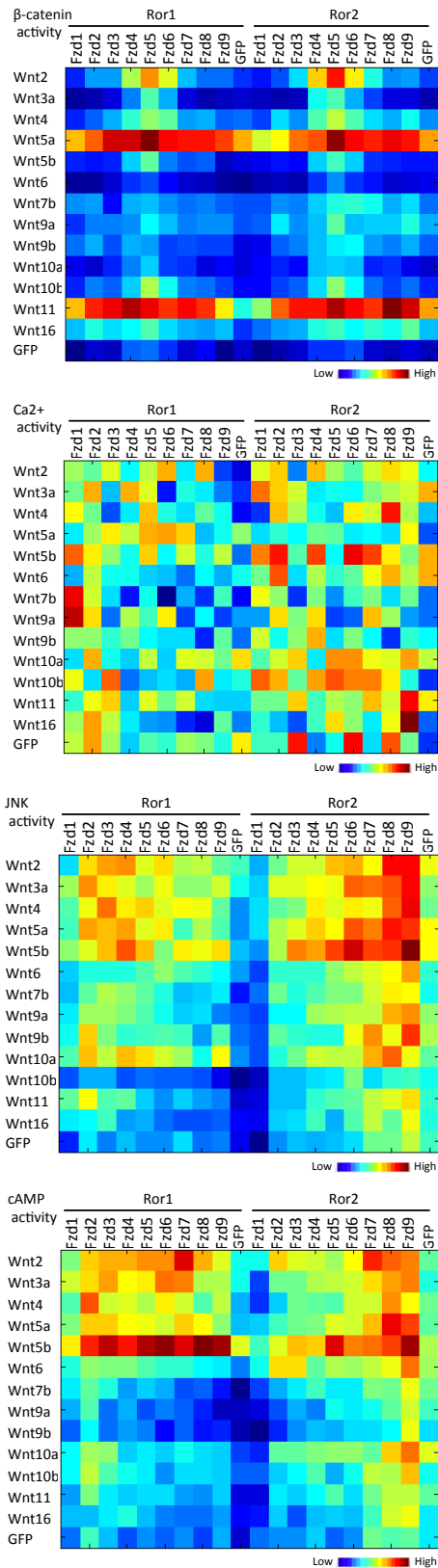
上記の検討において、示唆された未知経路に関して更に検討を加えるため、 β -catenin 経路の活性化が弱いにも関わらず、Wnt3a/Fzd5 の組み合わせが強い ALP 活性化を示したことから、Wnt3a に注目した。まず、MC3T3-1 に発現する内因性の Wnt3a の影響を評価することとした。その結果、ALP 活性の有意な活性低下は認められたものの、下流既知 4 シグナル経路は、いずれも活性の変動が認められず、Wnt3a による骨形成促進作用には、未知シグナル経路の関与が示唆された (下図)。Wnt3a は β -catenin 以外の経路を介して EGFR を活性化すること、EGFR 下流において、ERK が活性化すること、ERK 下流において骨芽細胞の分化が促進すること、がこれまでに報告されていることを考慮し、Wnt3a が ERK 経路を介して骨形成を促進するか検討した。まず、基底状態の MC3T3-E1 細胞に対し、ERK の活性制御分子である MEK に対する阻害剤 PD98059 を処理し、その後の ALP 活性を評価した。その結果、若干の活性低下が認められた。次いで、Wnt3a/Fzd5 の過剰発現による ALP 活性の上昇を PD98059 で阻害できるか検討した。その結果、予想に反し ALP 活性は上昇傾向となった。このことから、少なくとも、Wnt3a/Fzd5 下流において、ERK 経路が中心的な骨形成促進経路ではないと考えられた。引き続き、未知経

路の同定を多角的な方法論で試みている。



6) 非古典的経路における Ror の関与の検討
未知経路による制御に関して、下流のシグナル経路のみならず、上流の活性化シグナル制御因子に関する検討を加えることとした。複数ある Wnt/Fzd シグナル下流経路は、何らかの因子によって、活性化経路を制御するシステムがあることが想定される。実際に、LRP5/6 の発現量に応じて、 β -catenin 経路のシグナル強度が判定量的に制御されることを過去の検討において見出しており、そのほかの経路についても同様の機構が想定される。そこで、非古典的経路に関して、同様の制御モードを探索することによって、未知経路同定・制御メカニズムの解明にアプローチできると考えた。これまでの報告から、非古典経路、特に JNK 経路の活性化に Ror2 が関与すること、および、Ror2 の機能欠損に伴い骨代謝疾患となることから、Ror2 が下流シグナルを制御する因子であると考えられた。そこで、骨芽細胞系細胞において発現が認められる Ror のファミリー分子 Ror1 および Ror2 着目し、Fzd/Wnt の各組み合わせに加えて、Ror1 あるいは Ror2 を今日導入した際の既存 4 経路の活性化を評価した。その結果、予備検討段階ではあるが、下図の様なヒートマップが得られた。興味深いことに、Ror2 過剰発現下において、Wnt3a/Fzd5 の組み合わせによる Ca^{2+} 経路活性化が顕著に抑制された。一方で、Ror2 の過剰発現下で全ての Ca^{2+} 経路が活性低下を起こすわけではなく、Ror2 依存性の有無で Ca^{2+} 経路を分類できる可能性も想定された。これらの結果から、全ての経

路に関して Ror の関与による活性化シグナルへの影響を考慮することで、更に詳細な骨形成メカニズムの理解につながる可能性が示唆された。



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0件)
現在追加データを取得中で有り、平成 26 年度中を目処に、学術誌に発表予定である。

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 将吾 (MIURA SHOGO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90529182

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし