

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成27年度研究進捗評価用〕

平成 25 年度採択分
平成 27 年 4 月 9 日現在

骨代謝を制御する Wnt シグナルネットワークの解明
Elucidation of Wnt signaling network controlling
bone metabolism



課題番号：25221310

高橋直之（TAKAHASHI NAOYUKI）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究の概要

骨吸収と骨形成は厳格に共役しているが、その分子機構は不明である。一方、Wnt シグナルは骨代謝調節に密接に関わる。本研究は、破骨細胞が分泌する未知因子は Wnt シグナルを活性化すること、すなわち Wnt シグナルが骨代謝共役の本体であることを示す。さらに Wnt シグナルネットワークを構築して、破骨細胞と骨芽細胞の機能を厳格に調節していることを示す。

研 究 分 野：機能系基礎歯科学、生化学、骨代謝学

キ ー ワ ー ド：骨代謝共役、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、Wnt シグナル、Sclerostin

1. 研究開始当初の背景

骨吸収と骨形成は厳格に共役しているが、分子機構は不明である。骨芽細胞における Wnt 古典経路は骨形成を促進する (Cell 16:513, 2001)。一方我々は、Wnt 非古典経路は破骨細胞の分化を促進することを見出した (Nature Med 18:405, 2012)。また我々は、破骨細胞は、①骨芽細胞の分化を誘導する Wnt を発現する可能性、②骨細胞が分泌する骨形成阻害因子 Sclerostin (Wnt 抑制因子) の産生を抑制する可能性を見出した。これらの知見は、Wnt シグナルは互いに連関して骨代謝を調節していることを示す。

2. 研究の目的

本研究では、骨代謝を調節する Wnt シグナルネットワークの全容解明を目指す。骨代謝共役の分子機構が明らかにされることが期待される。さらに Wnt シグナルを標的とした骨量を増やす治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) Ryk シグナルの解析

Ryk-floxed マウスと骨芽細胞特異的に Cre を発現する Osx-Cre Tg マウスを交配させ、骨芽細胞特異的 Ryk-欠損 (Ob-Ryk-cKO) マウスを作製し、その骨組織を解析した。

(2) Ror2 シグナルの解析

Ror2-floxed マウスとカテプシン K-Cre マウスと掛け合わせて、破骨細胞特異的 Ror2 欠損 (Oc-Ror2-cKO) マウスを作製した。その骨組織と破骨細胞を解析した。破骨細胞における Wnt5a-Ror2 シグナルを解析した。また、

リグナン誘導体である Arctigenin の破骨細胞分化と機能に対する作用を解析した。

(3) 破骨細胞が分泌する Wnt 解析

破骨細胞は分化に伴い Wnt5a を高発現することが認められた。そこで、Wnt5a の骨芽細胞に対する作用を解析した。破骨細胞特異的 Wnt5a 欠損 (Oc-Wnt5a-cKO) マウスを作製し骨組織を解析した。

(4) 破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子の解析

OPG-KO マウスと RANKL 強発現 (RANKL-Tg) マウスの Sclerostin の発現を解析した。また、これらのマウスに抗 RANKL 抗体を投与し、歯槽骨の骨吸収状態を評価した。破骨細胞培養上清を UMR106 細胞培養に添加して、Sclerostin の発現を解析した。

(5) OPG-欠損マウスと RANKL-Tg マウス解析

骨吸収が亢進している OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウスの歯槽骨を解析した。骨組織における OPG 発現細胞を調べた。また、OPG-KO マウスに骨吸収抑制薬である抗 RANKL 抗体を投与し、歯槽骨の骨吸収状態を評価した。

(6) Wnt シグナル分子を標的とした治療

UMR106 細胞培養を用いて破骨細胞の分泌する Sclerostin 抑制因子を解析した。W9 ペプチドの骨形成促進作用を解析した。

4. これまでの成果

(1) Ryk シグナルの解析

Ob-Ryk-cKO マウスは、骨形成が著しく低下しており、Ryk シグナルは骨芽細胞の機能に重要であることが示された。Ob-Ryk-cKO マウスの骨髄間葉細胞を解析したところ、骨芽細胞

への分化が障害されていた。

(2) Ror2 シグナルの解析

Oc-Ror2-cKO マウスの骨量は増加していた。Oc-Ror2-cKO マウスから調製した破骨細胞は骨吸収活性が低下していた。シグナル解析より、Disheveled-associated activator of morphogenesis 2 (Daam2)と Protein kinase N3 (PKN3)の関与が示された。Ror2-Daam2-RhoA-PKN3 経路が破骨細胞の骨吸収に重要であることを明らかにした(論文執筆中)。Arctigenin は破骨細胞の分化と機能を強力に抑制した(PLOS ONE 9: e85878, 2014)。最近、Arctigenin は PKN3 経路を阻害する可能性が示唆された。

(3) 破骨細胞が分泌する Wnt 解析

破骨細胞への分化に伴い Wnt5a の発現が上昇することを見出した。Oc-Wnt5a-cKO マウスを作製したところ、骨芽細胞による骨形成が減少していた。Wnt5a は骨芽細胞の Lrp5 の発現を促進することで、骨芽細胞の分化を促進することが示された(Sci Rep 4:44193, 2014)。関節炎の関節組織での Wnt 関連因子の発現を解析した。Wnt5a 阻害因子 Secreted Frizzled-related protein 5 (Sfrp5) の発現が顕著に減少することを見出した。

(4) 破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子の解析

OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウスの骨組織の Sclerostin の発現を解析した。ともに Sclerostin の発現は低下していた。OPG-KO マウスおよび RANKL-Tg マウスに抗 RANKL 抗体を投与したところ、骨吸収抑制とともに、Sclerostin 発現が増加した。骨肉腫細胞株 UMR106 細胞に、破骨細胞の培養上清を添加すると、Sclerostin 発現は抑制された。以上より破骨細胞は骨細胞の Sclerostin 発現を抑制する未知因子 (Factor X) を産生することが明らかとなった(論文執筆中)。

(5) OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウス解析

骨吸収が亢進した OPG-KO マウスの歯槽骨を解析した。OPG-KO マウスに著しい歯槽骨吸収像が認められた。歯槽骨の OPG 産生細胞を調べたところ、骨細胞は OPG を強く発現していた。OPG-KO マウスに抗 RANKL 抗体を投与したところ、歯槽骨吸収はほぼ完全に抑制された。以上より、骨細胞の産生する OPG が、歯槽骨の防御に重要な役割を演じていることが示された(Endocrinology 154: 773, 2013)。

(6) Wnt シグナル分子を標的とした治療

破骨細胞が Sclerostin 分泌を抑制する因子 (Factor X) を産生していることを明らかにした。Factor X の同定を行っている。新規骨形成薬を探索する過程で、TNF 受容体の構造を模倣した W9 ペプチドが骨形成を促進することを明らかにした(J Biol Chem 288:5562, 2013)。W9 ペプチドは RANKL シグナルを止めるとともに、骨形成を促進した。W9 ペプチドが骨形成促進薬になる可能性が示された。

5. 今後の計画

(1) Ryk シグナルの解明

Ryk に結合するリガンドを同定する。骨芽細胞における Ryk シグナルを解析する。

(2) Ror2 シグナルの解析

PKN3 が結合する分子の同定と PKN3 の下流シグナルを解析する。

(3) 破骨細胞が分泌する Wnt の解析

Oc-Wnt5a-cKO マウスの破骨細胞の Wnt シグナルを解析する。また、Sfrp5^{-/-}マウスおよび Sfrp5-Tg マウスを作製し、その骨組織を解析する。

(4) 破骨細胞が分泌する Sclerostin 抑制因子の解析

Sclerostin-EGFP マウスを作製する。そのマウスを用い、破骨細胞が分泌する未知因子 (Factor X) を同定する。Factor X の作用機構を解明する。

(5) OPG 欠損マウスと RANKL-Tg マウスの解析

OPG-KO マウスと RANKL-Tg マウスの骨量減少に関わる Wnt と Sclerostin 発現を解析する。

(6) Wnt シグナル分子を標的とした治療 Sclerostin 抑制因子 Factor X と W9 ペプチドの臨床応用を模索する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Takahashi N, Udagawa N, Suda T: Vitamin D endocrine system and osteoclasts Vitamin D and Bone, Bone Key, 3:495, 2014

Okamoto M, Udagawa N, Uehara S, Maeda K, Yamashita T, Nakamichi Y, Kato H, Saito N, Minami Y, Takahashi N, Kobayashi Y: Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ β -catenin signaling during osteoblastogenesis. Sci Rep 4:4493, 2014

Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, Li F, Kadota S, Esumi H, Kobayashi Y, Takahashi N: Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent NFATc1 pathways. PLOS ONE 9: e85878, 2014

Maeda K, Takahashi N, Kobayashi Y*: Roles of Wnt signals in bone resorption during physiological and pathological states. J Mol Med 91:15-23, 2013

高橋直之: 破骨細胞はどのようにして骨組織にのみ形成されるか 実験医学 23:1031-1037, 2014

ホームページ等

<http://www.mdu.ac.jp/about/index.html>