

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2013～2016

課題番号：25293423

研究課題名（和文）Wnt5aを基盤にした歯槽骨一骨代謝回転制御法の開発

研究課題名（英文）Development of alveolar bone turnover control method based on Wnt5a

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・教授

研究者番号：20264252

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,900,000円

研究成果の概要（和文）：歯科矯正治療の治療期間を短くするため、サイトカインであるWnt5aによる骨代謝回転制御機構を解析し、歯槽骨代謝回転制御法を開発することを試みた。遺伝子改変マウスを用い、骨吸収と骨形成におけるWnt5aの役割を解析した。その結果、Wnt5aはWnt共受容体であるLrp5/6の発現を亢進し、Wnt古典経路による骨芽細胞分化を促進した。さらに、Wnt5aはWnt16による破骨細胞分化抑制作用を解除した。破骨細胞はsclerostinの発現を抑制する因子を分泌し、骨形成を促進した。以上より、Wnt5aが歯槽骨一骨代謝回転を促進する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：In order to shorten the treatment period of orthodontic treatment, we tried to elucidate the bone turnover control mechanism by Wnt5a, a cytokine, and to develop a method for controlling alveolar bone turnover based on it. Using genetically modified mice, we analyzed the role of Wnt5a in bone resorption and formation. Wnt5a enhanced the expression of Wnt co-receptor Lrp5/6 and promoted osteoblast differentiation by β -catenin-dependent Wnt signaling pathway. Furthermore, Wnt5a suppressed the inhibitory action of Wnt16 in osteoclast differentiation. Osteoclast-derived factors suppressed the expression of sclerostin and promoted bone formation. Thus, these studies suggested that Wnt5a promotes bone turnover in alveolar bone tissues.

研究分野：歯科矯正学，生化学

キーワード：Wnt5a 破骨細胞 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

歯槽骨の骨代謝回転は、歯科矯正治療期間を決める一因である。成人など骨代謝回転の低い人では治療期間は長くなることが知られている。これは、加齢に伴い骨代謝回転が低下するためと考えられる。しかし、加齢に伴い骨代謝回転が低下する分子基盤やそれに基づいた骨代謝回転の調節法は未だ確立されていない。Wntは、発生過程など組織リモデリングが盛んな時に働くサイトカインである。近年、骨リモデリングにおけるWntの役割が明らかになりつつある。Wntは β -カテニンを介する Wnt/ β -カテニン経路と介さない非古典経路を活性化する(図1)。Wnt/ β -カテニン経路は、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(J Cell Biol 157:303-314, 2002, Dev Cell 8:751-764, 2005)。一方、Wnt5aは非古典経路を活性化し脂肪細胞への分化を抑制することにより、骨芽細胞への分化を促進する(Nat Cell Biol 9:1273-1285, 2007)。しかし、国内外において、骨代謝回転の制御におけるWnt5aの役割を明らかにした報告やWnt5aのシグナルを利用し骨代謝回転を制御する方法は確立されていない。

2. 研究の目的

加齢に伴い骨代謝回転が低下する分子基盤は十分に解明されていない。我々は、骨芽細胞から分泌されるWnt5aが破骨細胞の分化を促進し、一方で、骨芽細胞の分化も促進することを明らかにしている。つまり、Wnt5aは骨吸収と骨形成の両者を促進する分子であることを意味する。また、加齢に伴い骨組織におけるWnt5aの発現が低下することを明らかにしている。しかし、Wnt5aが骨代謝回転を維持する分子基盤は明らかではない。そこで本申請課題ではWnt5aがどのような分子を介して、骨代謝回転を制御するかを明らかにし、Wnt5aによる骨代謝回転制御機構の分子基盤を確立する。さらに、この分子基盤に基づい

た歯槽骨 骨代謝回転制御法を開発する。

3. 研究の方法

- (1) 破骨細胞特異的Wnt5a コンディショナルノックアウト(cKO)マウスの骨代謝回転: 破骨細胞の分化過程におけるWnt リガンドの発現を解析した結果、破骨細胞は19種類あるWnt リガンドの中でWnt5aを顕著に発現することを我々は見出している。Wnt5aが骨形成にも関与することを考え合わせると、この所見は破骨細胞から分泌されるWnt5aが骨吸収のみならず骨芽細胞の分化や機能を調節する可能性を示唆している。この可能性を明らかにするため、破骨細胞特異的Wnt5a cKO マウスの骨組織を解析する。
- (2) 破骨細胞特異的Wnt5a cKO マウスの解析: 破骨細胞特異的にCreが発現するカテプシンK-Cre マウス(Cell, 130; 811-823, 2007)とWnt5a-floxed マウスを交配し、破骨細胞特異的Wnt5a cKO マウスを作出する。マイクロCTを用いて8週齢の破骨細胞特異的Wnt5a cKO マウスの大腿骨の骨量を計測する。また骨形態計測を行い、骨吸収と骨形成の状態を解析する。
- (3) 骨芽細胞マーカー遺伝子の発現解析: 破骨細胞特異的Wnt5a cKO マウスの脛骨よりRNAを抽出し、リアルタイムPCRを用いて骨芽細胞マーカー遺伝子発現を解析する。骨芽細胞マーカー遺伝子として、I型コラーゲン、Runx2, Osterix, Bone sialoproteinの発現を定量する。
- (4) Wnt/ β -カテニン経路の標的遺伝子の発現: Wnt 古典経路の標的遺伝子として、Axin2、細胞増殖を制御するCyclin DおよびEが知られている。これらの発現を上記方法に従い解析する。
- (5) Wnt/ β -カテニン経路共受容体の発現解析: Low density lipoprotein receptor-related protein (Lrp)5/Lrp6

は -カテニン経路を活性化する共受容体である。リアルタイムPCR を用いて、破骨細胞特異的Wnt5a cK0 マウスの脛骨におけるこれらの受容体の発現を解析する。

- (6) 骨芽細胞前駆細胞の解析：骨芽細胞前駆細胞は、colony forming unit fibroblasts (CFU-F)より分化する。そこで、破骨細胞特異的Wnt5a cK0 マウス骨髄間質細胞中のCFU-F 数を定量する。
- (7) 骨芽細胞の細胞増殖の解析：破骨細胞特異的Wnt5a cK0 マウスにBrdU を投与し、増殖細胞をラベルする。増殖している骨芽細胞を組織学的に検出する。
- (8) Wnt5a による骨形成機構の解析：我々は、Wnt5a 遺伝子欠損マウス (Wnt5aK0)由来の骨芽細胞においてWnt 共受容体Lrp5 およびLrp6 の発現が著しく低下することを見出している。この結果は、Wnt5a がLrp5 およびLrp6 の発現を介してWnt 古典経路を活性化する結果、骨芽細胞分化を促進することを示唆する。
- (9) Sclerostin発現抑制因子の解析：

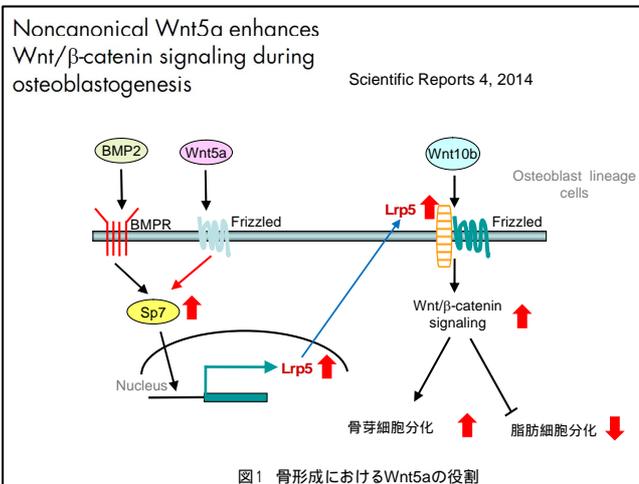
Sclerostin は骨細胞から分泌され、Wnt とLrp5 あるいはLrp6 との結合を阻害し、骨形成を阻害する。我々は、OPG 遺伝子欠損マウス (OPG-K0) は骨吸収と骨形成が共に高い骨代謝回転を示すことを報告した (Endocrinology 144: 5441-5449, 2003)。骨組織における Sclerostin 発現を免疫組織学的に解析したところ、OPG-K0 マウスでは Sclerostin の発現が著しく低下していることを見出している。この所見は、骨吸収に伴い骨基質より遊離される因子あるいは破骨細胞自身から分泌される因子によりSclerostin の発現が抑制されていることを示唆する。OPG-K0 および野生型マウスに抗RANKL 抗体を投与した際のSclerostin の発現解析:抗RANKL 抗体

を投与すると破骨細胞の分化が抑制され、破骨細胞が観察されなくなる。このときのSclerostin の発現と骨形成を解析する。さらに、OPG-K0 および野生型マウスにビスホスフォネートを投与した際のSclerostin の発現解析:ビスホスフォネートは骨吸収活性を著しく抑制するが、破骨細胞の分化は抑制しない。Sclerostin の発現と骨形成を解析する。

4 . 研究成果

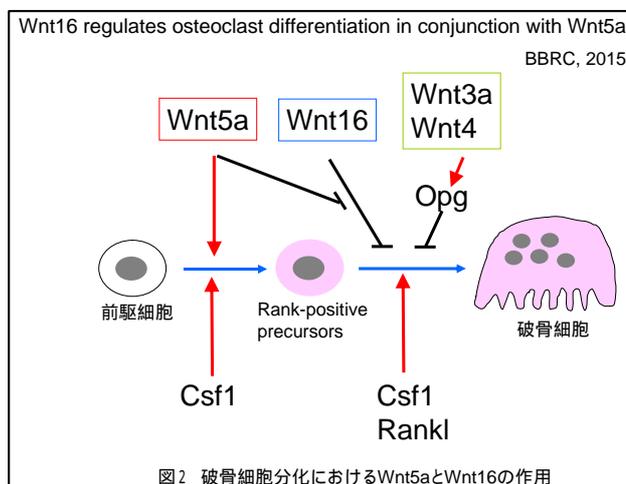
上記の研究計画を遂行し以下の新たな知見を得た。

(1) Wnt5a はLrp5/6 の発現を亢進し、Wnt



古典経路による骨芽細胞分化を促進する (図1)。

(2) Wnt5a は Wnt16 による破骨細胞分化抑制作用を解除する (図2)。



- (3) ダイナミン阻害剤 dynasore はアクチンリングを破壊し、骨吸収を抑制する。
- (4) Arctigenin は NFATc1 シグナルを抑制し、破骨細胞分化を抑制する。
- (5) 破骨細胞の分化において、エネルギー代謝と共役した DNA のメチル化が必要である。
- (6) 破骨細胞は sclerostin の発現を抑制する因子を分泌し、骨形成を促進する。OPG-KO マウスは破骨細胞分化が亢進するため、骨吸収が亢進する。OPG - KO マウスに抗 RANKL 抗体を投与し、破骨細胞形成を抑制すると、骨吸収マーカーが低下した(図3、左)。抗 RANKL 抗体を投与した際の骨組織における Sost の発現をリアルタイム PCR 法で解析したところ、Sost の発現が増加した(図3、右)。これらの結果は、破骨細胞が Sost の発現を抑制する因子を分泌することを示唆した。

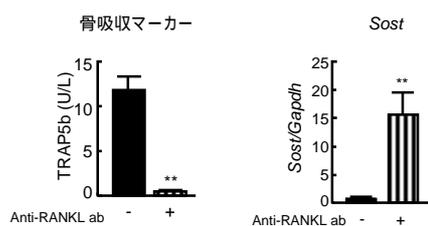


図3 OPG欠損マウスに抗RANKL抗体を投与した際の骨吸収マーカー(左)とSostの発現(右)

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, すべて査読あり](計 10 件)

Thirukonda GJ, Uehara S, Nakayama T, Yamashita T, Nakamura Y, Mizoguchi T, Takahashi N, Yagami K, Udagawa N, Kobayashi Y. The dynamin inhibitor dynasore inhibits bone resorption by rapidly disrupting actin rings of osteoclasts. *J Bone Miner Metab.* 34: 395-405, 2016. doi: 10.1007/s00774-015-0683-1

Kobayashi Y, Uehara S, Udagawa N, Takahashi N. Regulation of bone metabolism by Wnt signals. *J Biochem.* 159: 387-392, 2016. doi: 10.1093/jb/mvv124.

Weivoda MM, Ruan M, Hachfeld CM, Pederson L, Howe A, Davey RA, Zajac JD, Kobayashi Y, Williams BO, Westendorf JJ, Khosla S, Oursler MJ. Wnt Signaling Inhibits Osteoclast Differentiation by Activating Canonical and Noncanonical cAMP/PKA Pathways. *J Bone Miner Res.* 31:65-75, 2016. doi: 10.1002/jbmr.2599.

Kanemoto S, Kobayashi Y, Yamashita T, Miyamoto T, Cui M, Asada R, Cui X, Hino K, Kaneko M, Takai T, Matsuhisa K, Takahashi N, Imaizumi K. Luman is involved in osteoclastogenesis through the regulation of DC-STAMP expression, stability and localization. *J Cell Sci.* 128: 4353-4365, 2015. doi: 10.1242/jcs.176057.

Kobayashi Y, Uehara S, Koide M, Takahashi N. The regulation of osteoclast differentiation by Wnt signals. *Bonekey Rep.* 4: 713, 2015. doi: 10.1038/bonekey.2015.82.

Kobayashi Y, Thirukonda GJ, Nakamura Y, Koide M, Yamashita T, Uehara S, Kato H, Udagawa N, Takahashi N. Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun.* 463:1278-1283, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.102.

Nishikawa K, Iwamoto Y, Kobayashi Y, Katsuoka F, Kawaguchi S, Tsujita

T, Nakamura T, Kato S, Yamamoto M, Takayanagi H, Ishii M. DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. Nat Med. 21: 281-287, 2015. doi: 10.1038/nm.3774.

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. doi: 10.1038/srep04493.

Watanabe C, Morita M, Hayata T, Nakamoto T, Kikuguchi C, Li X, Kobayashi Y, Takahashi N, Notomi T, Moriyama K, Yamamoto T, Ezura Y, Noda M. Stability of mRNA influences osteoporotic bone mass via CNOT3. Proc Natl Acad Sci U S A. 111: 2692-2697, 2014. doi:10.1073/pnas.1316932111.

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. doi:10.1371/journal.pone.0085878.

〔学会発表〕(計 3件)

小林泰浩：Wnt 非古典経路による破骨細胞の分化・機能制御，愛媛大学大学院医学研究科大学院セミナー、愛媛大学（東温市）2015年（招待講演）

小林泰浩：Wnt シグナルによる骨吸収制御機構、第13回 RCGM フロンティアシンポジウム、埼玉医科大学（入間市）2015年（招待講演）

小林泰浩：Regulation of osteoclast differentiation and function by Wnt signals. 第57回歯科基礎医学会学術大会日韓合同シンポジウム、朱鷺メッセ（新潟市）2015年（招待講演）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・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・特任教授
研究者番号：90119222

平賀 徹 (HIRAGA Toru)
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・准教授

研究者番号：90302893

(3)連携研究者
無し