

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670852

研究課題名(和文)骨系統疾患治療薬の開発に向けたsFRP1およびb-cateninの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of sFRP1 and b-catenin for development of therapeutic agents on skeletal dysplasia

研究代表者

古賀 陽子 (Kawase-koga, Yoko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10392408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨系統疾患治療薬の開発に向けsFRP1およびb-cateninの機能解析をマウスを用いて行った。その結果、sFRP1およびb-cateninが脳室下帯(VZ)に特に発現しており、sFRP1がb-cateninと神経幹細胞を制御していることが示唆された。さらに、in vivoにおける機能獲得、機能喪失における検討においてsFRP1は神経細胞の遊走能に關与することが示唆された。

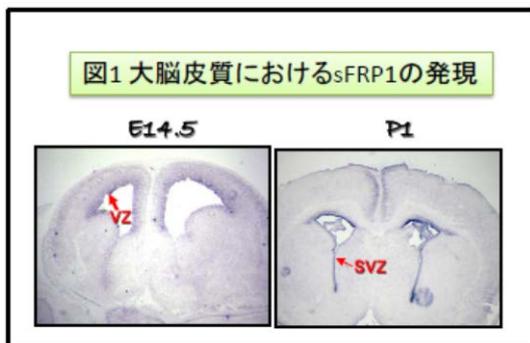
研究成果の概要(英文)：We studied the functional analysis of sFRP1 and b-catenin in mice brain for development of therapeutic agents on skeletal dysplasia. In the results, sFRP1 and b-catenin were highly expression in the VZ of embryonic and postnatal cortices suggesting that sFRP1 may regulate b-catenin and neural stem cell development. Moreover, sFRP1 may promote neuronal migration by stimulating neurite growth.

研究分野：口腔外科

キーワード：sFRP1 b-catenin

1. 研究開始当初の背景

日常診療において、骨形成不全症、先天性脊椎骨端異形成症、軟骨無形成症などの骨系統疾患患者に遭遇し、根治的治療法が未だ無いためにその治療に難渋する。いくつかの疾患に対しては、対症療法により症状を緩和できるが完治ができないためにその根本的治療法の開発に期待が大きい。Ducy らは、食欲を調節する神経ペプチド(交感神経系)が骨形成や骨吸収を制御していることを報告し(*Cell*, 100:197-207, 2000)、中枢神経系が骨代謝調節機構に関与しているという骨代謝機構のパラダイムシフトをもたらした。その後、Sato らはレプチン同様に食欲を抑制する働きがある脳内物質ニューロメジン U が骨密度の増減もコントロールしていることをノックアウトマウスの研究で明らかにし、骨と中枢神経系の関連を裏付けた(*Nat Med*.13:1234-1240, 2007)。そこで、研究代表者は中枢神経系でも万能な細胞である神経幹細胞に着目し、神経幹細胞を制御する因子、Wnt/b-catenin シグナル伝達経路とその拮抗タンパク質である sFRP1 が骨系統疾患の新たな治療薬となり得ると考え、本研究の着想に至った。研究代表者はこれまでの研究で、神経幹細胞が豊富に存在するマウス大脳皮質の胎生 14.5 日目の脳室下帯 (VZ) と出生後 1 日目の側脳室下帯(SVZ)に sFRP1 が発現していることを in situ ハイブリダイゼーション法で確認している(図 1)。



2. 研究の目的

中枢神経系の胚発生の段階で重要な役割を果たす Wnt/b-catenin シグナル伝達経路とその拮抗タンパク質である sFRP1 との関連を明らかにするとともに、骨における b-catenin と sFRP1 の作用機序の解明を行うことを目的とした。

I. マウス大脳皮質の発生段階における sFRP1 および b-catenin の発現パターンの解析

II. in vitro における神経幹細胞の増殖・分化に対する sFRP1 および b-catenin の制御機構の解析

III. 大脳皮質および骨における sFRP1 および b-catenin の in vivo での機能解析

1. sFRP1 および b-catenin の gain of function(機能獲得)の検討
2. sFRP1 および b-catenin の loss of function(機能喪失)の検討

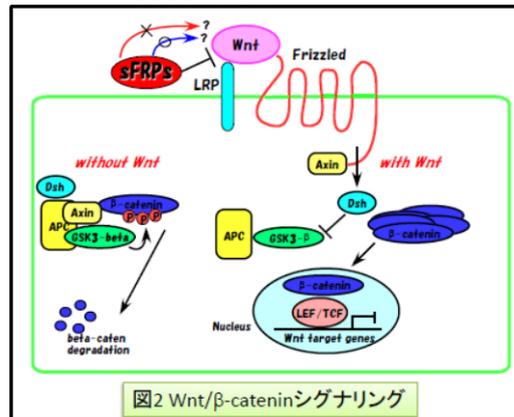
3. 研究の方法

I. マウス大脳皮質の発生段階における sFRP1 および b-catenin の発現パターンの解析

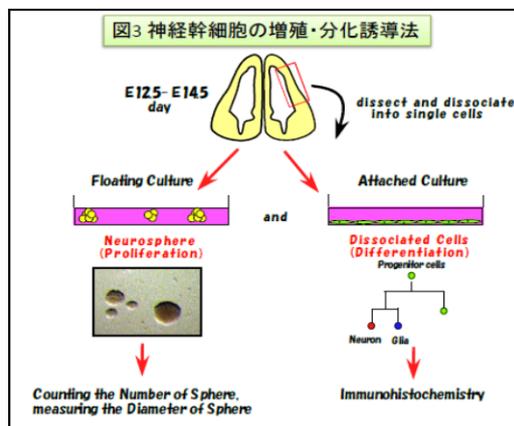
sFRP1 および b-catenin が大脳皮質のどの部分に発現が強く、その発現パターンをステージが進むにつれてどう変化していくのかを観察し、正常の発生過程におけるそれぞれの発現パターンを確認した。解析方法は、胎生期 11.5 日(E11.5)、E14.5、出生後 1 日(P1)、P5 のマウス大脳の組織切片を作製し、それぞれの発生ステージにおける sFRP1 および b-catenin の発現の解析を RNA プローブを用いて in situ ハイブリダイゼーション法で行った。

II. in vitro における神経幹細胞の増殖・分化に対する sFRP1 および b-catenin の制御機構の解析

図 2 に示すように b-catenin は Wnt シグナルの下流に位置し、LEF1 と核内で複合体を形成し、転写因子として働く。Wnt シグナルが働いていない場合は Axin を含む細胞内タンパク質複合体はリン酸化を介して b-catenin を分解する。



これまでの報告では、神経幹細胞に Wnt3a が関与し b-catenin が幹細胞の増殖維持に働くという説(Nat Med. 10:55-63, 2004)や神経分化に働くという説(FASEB J. 19:252-254, 2005)があり未だ明らかでない。そこで、E12.5 日のマウス大脳皮質を分離し、神経幹細胞を形成させる増殖系(ニューロスフェア法)と接着培養させる分化系の 2 種類



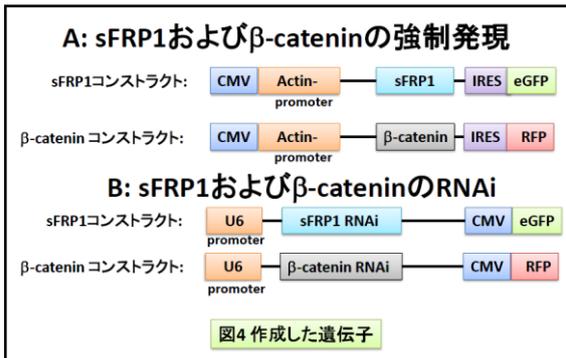
の条件を用いた(図 3)。

神経幹細胞および神経分化における sFRP1 および b-catenin の発現レベルを検討した。神経幹細胞マーカーには Nestin、Pax6、神経系分化マーカーには Tuj1、GFAP を用いた。

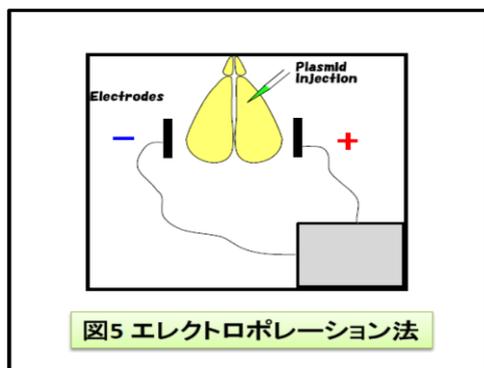
### III. 大脳皮質および骨における sFRP1 および b-catenin の in vivo での機能解析

#### 1. sFRP1 および b-catenin の gain of function (機能獲得) の検討

① 遺伝子導入：マウス大脳皮質の神経上皮の発生段階における sFRP1 および b-catenin を強制発現させた際の骨の変化を in vivo で検討した。sFRP1 および b-catenin の遺伝子発現にはそれぞれ GFP および RFP を用いてコンストラクトを作製した(図 4A)。



それらのプラスミドを妊娠 12.5 日目のマウスの胎仔脳にエレクトロポレーション法 (図 5) を用いて遺伝子導入を行った。



② 大脳皮質の解析：E15.5 日目および E17.5 日目の sFRP1 および b-catenin の発現を確認した。

③ 骨組織の解析：E18.5、P2 および P10 の長官骨および椎体について、まず X 線撮影を行い、全体の骨密度を測定した。長管骨についてはその長軸方向に近位から遠位まで 20 分割して各分画における骨密度を測定することによって、骨幹端部・骨幹部における海綿骨・皮質骨それぞれについての比較検討を行った。組織学的解析としては、骨芽細胞、破骨細胞に特異的な組織染色法 (ALP 染色、TRAP 染色等)、更にはカルセイン二重標識、

Villanueva-Goldner 染色を用いた骨組織形態計測を行い、骨代謝動態の定量化を試みた。同時に、組織学的検討においては、骨芽細胞の分化マーカーを用いて各々免疫組織染色、in situ ハイブリダイゼーションの手法を用いて、骨芽細胞の分化の程度の検討を行い、sFRP1 および b-catenin の骨代謝への影響を in vivo で調べた。

#### 2. sFRP1 および b-catenin の loss of function (機能喪失) の検討

① 遺伝子導入：sFRP1 および b-catenin の遺伝子抑制には RNAi コンストラクトを用いる (図 4B)。遺伝子導入は、前述の III-1-①と同様に行った。

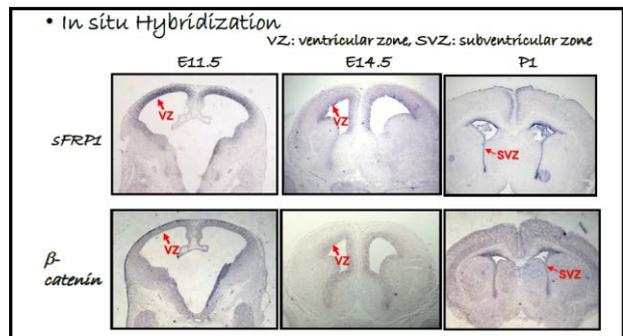
② 大脳皮質の解析：前述の III-1-②と同様に E15.5 日目および E17.5 日目のマウスを用いて行った。

③ 骨組織の解析：前述の III-1-③と同様に、E18.5、P2 および P10 のマウスを用いて sFRP1 および b-catenin の骨代謝への影響を in vivo で調べた。

## 4. 研究成果

### I. マウス大脳皮質の発生段階における sFRP1 および b-catenin の発現パターンの解析

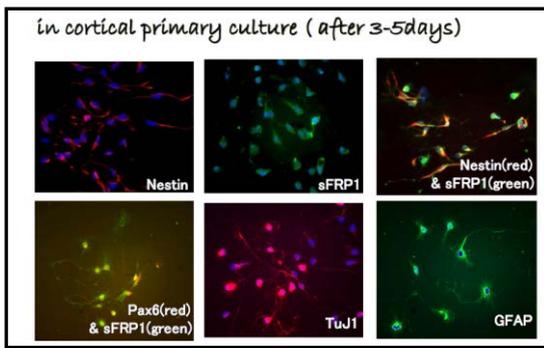
sFRP1 は、E11.5、E14.5、P1 の脳室下帯 (VZ) に発現し、特に P1 の側脳室下帯 (SVZ) に発現していることが確認できた。また、b-catenin



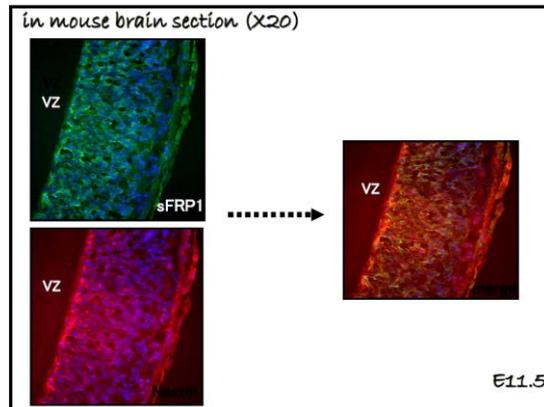
も同様に E11.5~P1 の VZ に発現し、その発現パターンは発生過程で減少していた。これらの結果より、sFRP1 が b-catenin を制御していることが示唆された。

### II. in vitro における神経幹細胞の増殖・分化に対する sFRP1 および b-catenin の制御機構の解析

ニューロスフェア法を用いて E12.5 の大脳皮質から神経幹細胞 (ニューロスフェア) の取得に成功した。また、分化条件下において sFRP1 陽性細胞が神経幹細胞マーカーである Nestin および Pax6 を発現し、さらに神経系分化マーカーである Tuj1 および GFAP を発現することが確認できた。



さらに、sFRP1 と Nestin 陽性細胞が VZ に発現していることが明らかとなった。

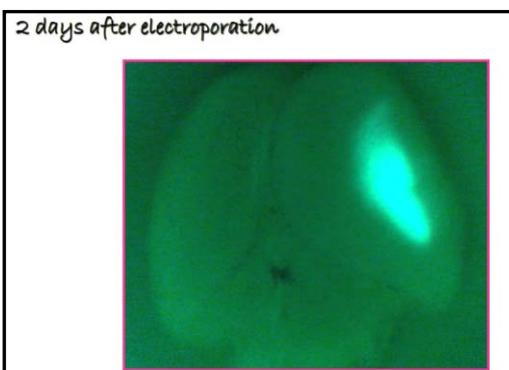


これらの結果より、sFRP1 が神経細胞を制御していることが示唆された。しかし、B-catenine に制御については明らかな結果が得られなかった。

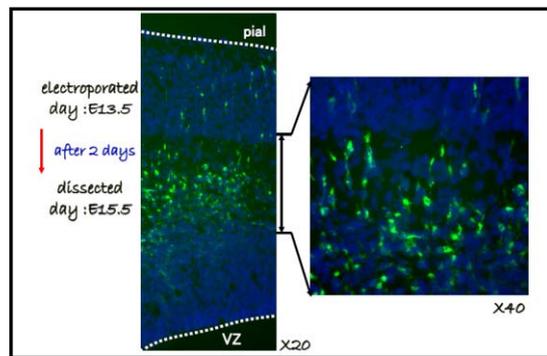
### III. 大脳皮質および骨における sFRP1 および b-catenin の in vivo での機能解析

#### 1. sFRP1 および b-catenin の gain of function (機能獲得) の検討

① 遺伝子導入：前述の方法で述べたように sFRP1 および b-catenin のコンストラクトの作製を行い、それらのプラスミドを妊娠 12.5 日目のマウスの胎仔脳にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入を行い、その発現を確認できた。



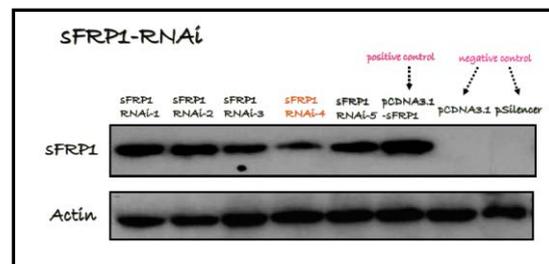
② 大脳皮質の解析：E15.5 日目、E17.5 日目に解析を行い、GFP 陽性細胞 (sFRP1 陽性細胞) がコントロール群と比較して VZ から pial に向かいより migration していることが確認できた。



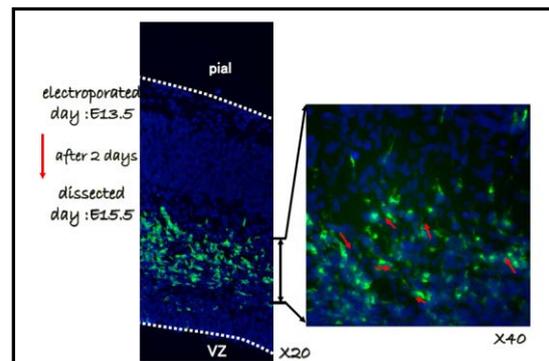
③ 骨組織の解析：骨組織における検討は試みるも十分な解析が行えなかった。

#### 2. sFRP1 および b-catenin の loss of function (機能喪失) の検討

① 遺伝子導入：前述の III-1 と同様に行った。コンストラクトは、最も knockdown していたプラスミドを用いた。



② 大脳皮質の解析：E15.5 日目、E17.5 日目に解析を行い、GFP 陽性細胞 (sFRP1 陽性細胞) がコントロール群と比較して VZ から pial の方向に反するかのよう極性を欠いた GFP 陽性細胞 (sFRP1 陽性細胞) が確認できた。



③ 骨組織の解析：III-1 と同様に骨組織における検討は試みるも十分な解析が行えなかった。

#### <引用文献>

1. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell*. 2000 Jan 21;100(2):197-207

2. Sato S, Hanada R, Kimura A, Abe T, Matsumoto T, Iwasaki M, Inose H, Ida T, Mieda M, Takeuchi Y, Fukumoto S, Fujita T, Kato S, Kangawa K, Kojima M, Shinomiya K, Takeda S. Central control of bone remodeling by neuromedin U. *Nat Med.* 2007 Oct;13(10):1234-40.

#### 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)

[学会発表] (計 4 件)

① Yoko Kawase-Koga, Yoshiyuki Mori, Yuki Kanno, Yasuyuki Fujii, Takafumi Susami, Kazuto Hoshi, and Tsuyoshi Takato, Clinical study of the complications at proximal segment with intraoral vertical ramus osteotomy(IVRO); related to the osteotomy line?, AAOMS 96<sup>th</sup> Annual Meeting, 2014,9,8-2014,9,13, Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, U.S.A.

② 古賀陽子、森良之、菅野勇樹、末永英之、安部貴大、西條英人、井口隆人、岡安麻里、大久保和美、須佐美隆史、高戸毅、下顎枝垂直骨切り術 (IVRO) における近位骨片に関する偶発症の検討第 24 回日本顎変形症学会総会・学術大会、2014,6,10-2014,6,11、アクロス福岡、福岡

③ 古賀陽子、森良之、菅野勇樹、末永英之、安部貴大、瀬戸一郎、西條英人、星和人、須佐美隆史、高戸毅過去 5 年間の下顎枝垂直骨切り術(IVRO)症例における近位骨片の偏位に関する臨床的検討、第 58 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2013,10,11-2013,10,13, 福岡国際会議場、福岡

④ 古賀陽子、須佐美隆史、菅野勇樹、井口隆人、岡安麻里、高橋直子、大久保和美、安部貴大、瀬戸一郎、西條英人、森良之、高戸毅 25mm を超える上下顎不調和と下顎非対称を呈した片側性唇顎口蓋裂の 1 例、第 23 回日本顎変形症学会総会・学術大会、2013,6,22-2013,6,23, 大阪国際会議場、大阪

[図書] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

古賀 陽子 (KAWASE-KOGA, Yoko)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：10392408

##### (2) 研究分担者

岡安 麻里 (OKAYASU, Mari)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：10610941

倉林 くみ子 (KURABAYASHI, Kumiko)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：40586757

菅野 勇樹 (KANNO, Yuki)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80451813

稲木 涼子 (INAKI, Ryoko)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90632456