

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861181

研究課題名(和文) 骨芽細胞および骨肉腫における、非古典経路のWnt5aの役割の解明

研究課題名(英文) The role of Wnt5a in osteoblast and osteosarcoma

研究代表者

岡本 正則 (OKAMOTO, Masanori)

信州大学・医学部附属病院・助教(診療)

研究者番号：50596781

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Wntは、カテニンを介する古典経路と、それを介さない非古典経路によって骨形成を調節する。非古典経路のリガンドであるWnt5aは様々な細胞において古典経路に対して抑制的に働く。しかし骨芽細胞分化においては、古典経路と非古典経路は互いに協調しあう。本研究の結果少なくとも骨芽細胞分化においてWnt5aは、古典経路の共受容体であるLrp5/6の発現を調節することで古典経路を促進し、骨形成に対しても促進的に働くことが明らかになった。また骨芽細胞系の悪性腫瘍である骨肉腫においても、Wnt5aは同様の作用を持つことが明らかになった。さらにWnt5aが骨肉腫の増殖能や遊走能を制御していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnt ligands regulate bone formation through beta-catenin-dependent canonical and beta-catenin-independent noncanonical Wnt signaling pathways. The two signaling pathways cooperate with each other during osteoblastogenesis, although noncanonical Wnt5a antagonizes the canonical Wnt pathway in various types of cells. This study revealed that Wnt5a-induced noncanonical signals enhance the canonical Wnt pathway through up-regulation of Lrp5/6 to achieve proper bone formation. We also found that Wnt5a up-regulate Lrp5/6 expression in the human osteosarcoma cell (malignant bone tumor). Furthermore, this study suggested that Wnt5a regulate cell proliferation and migration of osteosarcoma.

研究分野：整形外科学

キーワード：Wntシグナル Wnt5a Lrp5/6 骨芽細胞分化 骨形成 骨肉腫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ① Wnt は分子量約 4 万の分泌性糖蛋白質で、哺乳類では 19 種類が同定されている。Wnt は初期の発生や器官形成、細胞増殖や分化などを制御する。Wnt 経路には、 $\beta$ カテニンを介する古典経路とそれを介さない非古典経路とが存在する。Wnt3a などの古典的 Wnt が受容体 Frizzled と共受容体 Low-density lipoprotein receptor-related protein (Lrp) 5/6 の複合体に結合すると、 $\beta$ カテニンが細胞内に蓄積する。その後核内に移行した  $\beta$ カテニンは、転写因子 T cell factor (Tcf)/lymphoid enhancer factor (Lef) とともに、標的遺伝子の発現を促進する。また、Wnt5a などの非古典的 Wnt は様々な臓器、細胞において、Wnt3a と受容体との結合に競合的に作用し、古典経路を抑制する。また Wnt5a は TCF/LEF の転写活性を阻害し、古典経路を抑制する。

② 骨芽細胞分化においては、古典経路により Runx2 の発現が促進され骨芽細胞分化が促進し、脂肪細胞分化を抑制する。一方、非古典経路を活性化する Wnt5a は、脂肪細胞への分化を促進する Ppar  $\gamma$  の機能を抑制することで、脂肪細胞分化を抑制し、その結果骨芽細胞分化を促進する。これらの結果は両経路が協調し、骨芽細胞の分化を調節することを示唆する。しかし、両経路がどのように協調して骨芽細胞分化を調節するかは明らかでなかった。

(2) 非古典的 Wnt である Wnt5a は、古典経路と同様に胃癌、大腸癌や前立腺癌などにおいて癌化、癌の浸潤・転移において重要な役割を示すことが報告されている。また Wnt5a は悪性骨腫瘍である骨肉腫においても高発現し、浸潤能を制御していることが報告されている。つまり、骨芽細胞分化と同様に、同じ骨芽細胞系の悪性腫瘍である骨肉腫の成立においても古典経路と非古典経路は協調的に働く可能性が示唆される。しかし、骨肉腫における古典経路と非古典経路の相互作用に関する報告は皆無であった。

## 2. 研究の目的

(1) 骨形成における Wnt 経路の古典経路と非古典経路との相互作用を解明する。

(2) 非古典的 Wnt である Wnt5a の骨肉腫の成立および転移における作用と分子メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

(1) ① Wnt5a による古典経路への作用  
ST2 細胞を培養し、Wnt3a で刺激すると、古典経路の活性を示す Tcf/Lef 転写活性が上昇する。この培養系に Wnt5a を添加した際の、古典経路の活性を確認する。

② 野生型マウスの頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞 (WT-POB) を石灰化培地で培養し、Wnt

リガンドと受容体の発現を解析する。

③ 上記の培養系に古典経路特異的な阻害因子を添加し、Lrp5/6 の発現を確認する。また非古典的 Wnt である Wnt5a を、shRNA を用いて knockdown し、Lrp5/6 の発現を確認する。

④ Wnt5a による Lrp5/6 の発現誘導を確認するため、Wnt5a 欠損マウス由来の骨芽細胞様細胞 (Wnt5aK0-POB) を解析する。また Wnt5a 欠損マウスの骨組織を評価し、 $\beta$ カテニンの発現を確認する。

## ⑤ 外因性 Wnt5a の作用の検討

外因性 Wnt5a の存在下で Wnt5aK0-POB を培養し、Lrp5/6 の発現や古典経路の活性、石灰化能を確認する。

## ⑥ Lrp5 の発現上昇の効果の検討

Lrp5 の発現上昇の効果を検討するため、Wnt5aK0-POB にアデノウイルスを用いて Lrp5 を過剰発現させ、古典経路活性や石灰化能、脂肪細胞への分化を確認する。

⑦ Wnt5a による Lrp5/6 の発現誘導のメカニズムを探るためプロモーター解析を行い、キーとなる因子を探索する。

(2) ① 骨肉腫における Wnt5a の作用を解析するため、複数種類のヒト骨肉腫細胞株を培養し、Wnt5a を shRNA で knockdown した際の Lrp5/6 の発現を確認する。

② 骨肉腫細胞株の増殖能や遊走能に対する Wnt5a の作用を調べるため、Wnt5a を shRNA で knockdown し scratch assay を行う。

③ 骨肉腫細胞株の増殖能や遊走能に対する Lrp5 の作用を調べるため、Lrp5 を shRNA で knockdown し scratch assay を行う。

④ 信州大学医学部附属病院にて治療を行った骨肉腫症例のうち凍結検体が保存されていた症例は 25 例だった。その手術治療の際に切除された臨床検体を解析し、Wnt5a と Lrp5 の発現を確認する。

## 4. 研究成果

(1) ① ST2 細胞を Wnt3a で刺激すると、古典経路活性を示す Tcf/Lef 転写活性が上昇するが、Wnt5a による刺激では変化がみられなかった。しかし Wnt3a 単独刺激と比べ、ST2 細胞を Wnt5a で前処理した後に Wnt3a で刺激すると、Tcf/Lef 転写活性、細胞内  $\beta$ カテニンの蛋白量はさらに上昇した。この結果から、Wnt5a が古典経路を促進する可能性が示唆された。

② WT-POB を石灰化培地で培養し、骨芽細胞へと分化させていくと、その分化に伴い継続的に *Wnt5a* や *Wnt10b* の発現が上昇し、同時に共受容体である *Lrp5/6* の発現も上昇した。このことは *Wnt* シグナルそのものが *Lrp5/6* の発現を制御する可能性を示唆した。(図 1)

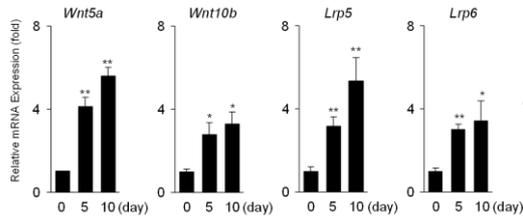


図 1. *Wnt* ligand 及び共受容体の発現

③ 古典経路特異的な阻害分子である *Dkk1* は *Lrp5/6* の発現を抑制しなかった。(図 2) また、shRNA を用い *Wnt5a* を knockdown すると、*Lrp5/6* の発現が低下した。これらの結果は、古典的 *Wnt* ではなく非古典的 *Wnt* である *Wnt5a* が、*Lrp5/6* の発現を誘導することを示唆した。(図 3)

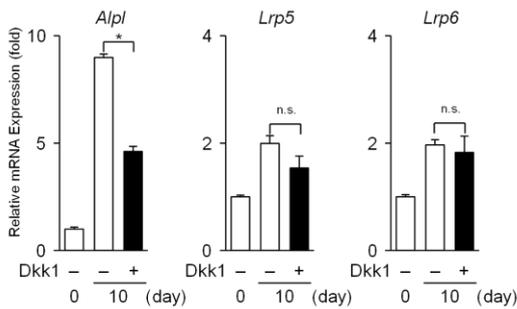


図 2. 古典経路阻害剤の作用

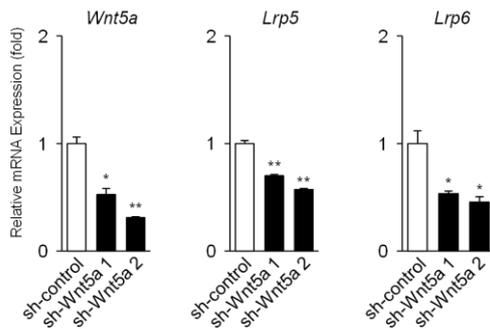


図 3. *Wnt5a* knockdown の作用

④ WT-POB に比べ、*Wnt5a*KO-POB では、*Lrp5/6* の発現が有意に低く、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化能も低下した。(図 4.) また、転写因子 *Sp7* (*osterix*) の発現が低く、古典経路の標的遺伝子である *Axin2* の発現、*Tcf/Lef* 転写活性、細胞内の  $\beta$  カテニンレベルも低下した。そして *Wnt5a* 欠損マウスの骨組織における、 $\beta$  カテニンの発現量も低下した。(図 5)

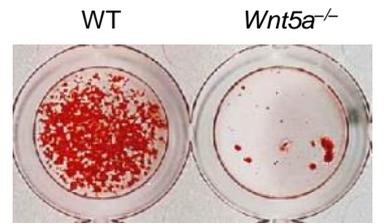


図 4. 石灰化能の比較

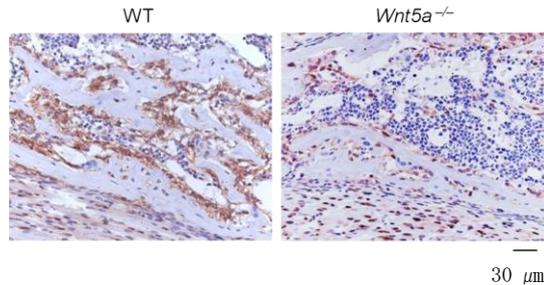


図 5. 骨組織における  $\beta$  カテニン

⑤ *Wnt5a* 存在下で *Wnt5a*KO-POB を培養すると、低下した *Lrp5/6* の発現が増加し、*Tcf/Lef* 転写活性および石灰化能が回復した。

⑥ *Wnt5a*KO-POB に *Lrp5* を過剰発現すると、低下した *Tcf/Lef* 転写活性および石灰化能が回復した。(図 6) また、*Wnt5a*KO-POB では脂肪細胞への分化が促進するが、*Wnt5a*KO-POB に *Lrp5* を過剰発現させると、その脂肪細胞への分化は抑制された。

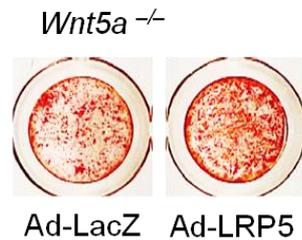


図 6. 石灰化能の比較

⑦ プロモーター解析の結果、*Lrp5/6* に共通する領域として *Sp1* 結合サイトに着目した。

(図 7) *Sp1* 結合サイトには、*Sp7* も結合することが報告されており、*Wnt5a*KO-POB では *Sp7* の発現は有意に低下する。このことは *Sp7* が *Lrp5/6* の発現を誘導することを示唆した。外因性 *Wnt5a* 単独では *Sp7* の発現を誘導しなかったが、*Wnt5a* と *BMP2* の存在下では、*Sp7* の発現が上昇した。そして *Sp7* を過剰発現すると、*Lrp5* の発現が上昇した。



図 7. プロモーター解析

⑧ 以上の結果より、骨芽細胞分化において Wnt5a は、BMP2 と協調的に Sp7 の発現を調節し、Lrp5/6 の発現を促進した。そしてその結果、内因性 Wnt ligand による古典経路を活性化し、骨芽細胞分化を促進することが示唆された。(図 8)

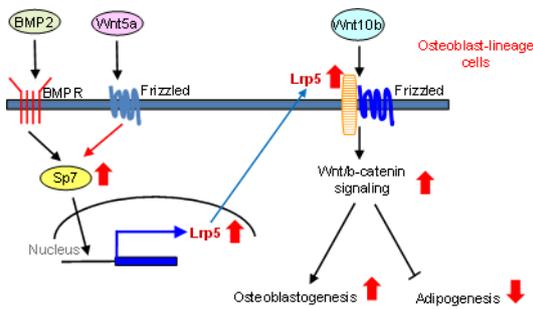


図 8. シェーマ

(2)① ヒト骨肉腫細胞株 HOS において Wnt5a を knockdown すると、Lrp5/6 の発現が低下した。このことから、骨芽細胞だけではなく、骨肉腫においても Wnt5a が Lrp5/6 の発現を調節している可能性が示唆された。(図 9)

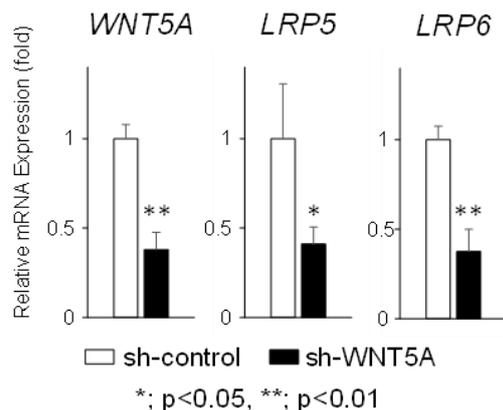


図 9. WNT5A knockdown の作用

② ヒト骨肉腫細胞株 HOS において Wnt5a を knockdown し scratch assay を行うと、control と比較してその増殖能と遊走能が低下した。これにより Wnt5a が骨肉腫の増殖能と遊走能を制御している可能性が示唆された。

③ ヒト骨肉腫細胞株 HOS において Lrp5 を knockdown し scratch assay を行うと、control と比較してその増殖能と遊走能が低下した。これにより Lrp5 が骨肉腫の増殖能と遊走能を制御している可能性が示唆された。

④ 25 例の骨肉腫臨床検体をリアルタイム PCR で解析すると、WNT5A と LRP5/6 の発現が検出された。WNT5A の発現量と LRP5 の発現量 ( $r=0.858$ ,  $p=0.000$ )、WNT5A の発現量と LRP6 の発現量 ( $r=0.882$ ,  $p=0.000$ ) とには、それぞれ有意な相関を認めた。

⑤ 以上より骨肉腫においても Wnt5a は LRP5/6 の発現を調節し、骨肉腫の増殖能と遊走能を制御す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)

[学会発表] (計 6 件)

① 岡本正則, 吉田和薫, 青木 薫, 鬼頭宗久, 田中厚誌, 鈴木周一郎, 高沢 彰, 福澤拓馬, 薄井雄企, 羽二生久夫, 小林伸輔, 田中学, 吉村康夫, 小林泰浩, 加藤博之, 齋藤直人: 非古典経路の WNT5A は骨肉腫において LRP5/6 の発現を調節する, 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2016. 10. 13-14, 福岡

② Masanori Okamoto, Kazushige Yoshida, Kaoru Aoki, Munehisa Kito, Atsushi Tanaka, Shuichiro Suzuki, Akira Takazawa, Yasuo Yoshimura, Hiroyuki Kato: Noncanonical WNT5A regulates the expression of LRP5/6 in osteosarcoma, Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016. 2. 16-20, Maui, Hawaii, USA

③ 岡本正則, 上原俊介, 前田和洋, 山下照仁, 薄井雄企, 羽二生久夫, 青木薫, 高梨誠司, 小林伸輔, 野村博紀, 田中学, 加藤博之, 齋藤直人, 高橋直之, 小林泰浩: Wnt5a は Sp7 を介して LRP5/6 の発現を上昇させ、骨芽細胞分化を促進する, 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014. 10. 9-10, 鹿児島

④ 岡本正則, 宇田川信之, 上原俊介, 前田和洋, 山下照仁, 中道裕子, 薄井雄企, 羽二生久夫, 青木薫, 高梨誠司, 小林伸輔, 野村博紀, 田中学, 加藤博之, 齋藤直人, 南康弘, 高橋直之, 小林泰浩: Wnt5a は LRP5/6 の発現を介して古典経路を調節し、骨芽細胞分化を促進する, 第 32 回日本骨代謝学会学術集会, 2014. 7. 24-26, 大阪

⑤ Masanori Okamoto, Nobuyuki Udagawa, Teruhito Yamashita, Shunsuke Uehara, Hiroyuki Kato, Naoto Saito, Naoyuki Takahashi, Yasuhiro Kobayashi: Wnt5a up-regulates the expression of Lrp5/6 during osteoblastogenesis, 5th International Conference on Osteoimmunology, 2014. 6. 15-20, Kos, Greece

- ⑥ 岡本正則, 宇田川信之, 上原俊介, 山下照仁, 前田和洋, 中道裕子, 薄井雄企, 羽二生久夫, 青木薫, 高梨誠司, 小林伸輔, 野村博紀, 田中学, 加藤博之: Wnt5a による骨芽細胞分化調節機構, 第 13 回松本ボーンフォーラム, 2014. 5. 19, 松本

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 正則 (OKAMOTO, Masanori)  
信州大学・医学部附属病院・助教(診療)  
研究者番号: 50596781