

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06493

研究課題名(和文) Wnt5aを介した歯周組織再生における脂質メディエーターの役割と分子機序の解明

研究課題名(英文) Role of lipid mediator on periodontal tissue regeneration through Wnt5a expression.

研究代表者

東 陽子(橋本)(Higashi (Hashimoto), Yoko)

九州大学・大学病院・医員

研究者番号：90755042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は生理活性を持つ脂質メディエーターで、我々はこれまでに骨芽細胞の分化促進作用メカニズムについて報告してきた。本研究では、S1Pによる間葉系幹細胞の骨芽細胞分化促進作用メカニズムについて検討した。特に、骨形成を制御するWntシグナル伝達経路の関与について、 $\beta$ -カテニン依存性と非依存性経路に着目し検討を行った。

その結果、S1Pによる $\beta$ -カテニン非依存性経路のリガンドWnt5a分泌増加は、LRP5/6発現増加を引き起こし、結果的に $\beta$ -カテニン依存性経路を活性化して骨芽細胞分化が促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Sphingosine-1-phosphate (S1P) is known as the signaling sphingolipid and the bioactive lipid mediator that also plays crucial roles in osteogenic differentiation. In the present study, we investigated the involvement of Wnt signaling on S1P-induced osteogenic differentiation of MSC. We particularly paid attention to  $\beta$ -catenin-dependent and  $\beta$ -independent Wnt signaling pathways because both signaling pathways regulate bone formation.

We found that S1P up-regulated Wnt5a expression, leading to the induction of LRP5/6 expression, resulting in the increase of  $\beta$ -catenin-dependent Wnt signaling, and thereby promoting MSC differentiation into osteoblast.

研究分野：歯周病学

キーワード：間葉系幹細胞分化 スフィンゴシン-1-リン酸 Wntシグナル伝達経路

### 1. 研究開始当初の背景

我が国における歯周病罹患率は高く、今後、歯周病治療や歯周組織再生療法の需要はますます高まると予想される。

間葉系幹細胞 (MSC) は、特異的な転写因子の働きにより、骨芽細胞、脂肪細胞、線維芽細胞などへの多分化能を有するが、歯根膜組織中には、線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞など多くの細胞成分が含まれることから、歯根膜幹細胞の分化能は歯周組織の恒常性の維持または再生に寄与すると考えられる。

脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、細胞膜上の S1P 受容体を介して様々な細胞応答を引き起こす。S1P の硬組織に対する作用として、破骨細胞分化抑制作用、骨芽細胞分化促進作用が知られており、我々はこれまでに、骨芽細胞において、S1P による骨芽細胞分化促進メカニズムならびに MSC の脂肪細胞分化抑制メカニズムについて報告してきた。一方、MSC において、S1P が骨芽細胞分化誘導時の骨芽細胞分化マーカー発現を増加し、石灰化を促進することを現象論として見出した。しかしながら、この MSC の骨芽細胞分化促進作用における S1P の作用点や詳細な分子基盤は明らかとなっていない。

骨組織の形成を制御している Wnt シグナル伝達経路には、 $\beta$ -カテニンの核移行を伴う  $\beta$ -カテニン依存性経路と  $\beta$ -カテニン非依存性経路が存在する。MSC の骨芽細胞分化においては、近年  $\beta$ -カテニン非依存性経路のリガンドである Wnt5a が、 $\beta$ -カテニン依存性経路の活性化に重要な LRP (low density lipoprotein receptor-related protein) 5/6 受容体発現を増加させることで、間接的に  $\beta$ -カテニン依存性経路を活性化して骨芽細胞分化を促進することが明らかになった。

そこで、S1P が Wnt5a を介して MSC の骨芽細胞分化を促進するという仮説を立て、検討することとした。

### 2. 研究の目的

本研究では、S1P による MSC の骨芽細胞分化促進作用における Wnt シグナル伝達経路の関与と、そのメカニズム解明を行い、MSC 分化機構についての新たな知見を得ること、また、新規の歯周組織再生治療戦略への発展に繋がる有益な情報を得ることを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) マウス間葉系幹細胞株 C3H10T1/2 細胞を用いて、S1P が  $\beta$ -カテニン依存性経路の活性化に重要な LRP5/6 発現に及ぼす影響について解析する。

(2) Wnt5a 中和抗体を用いて、S1P が LRP5/6 発現に及ぼす影響に、Wnt5a の発現が関与するかどうかについて検討を行う。また、S1P が Wnt5a を介して骨芽細胞分化

に及ぼす影響について、骨芽細胞分化マーカー遺伝子解析にて検討する。

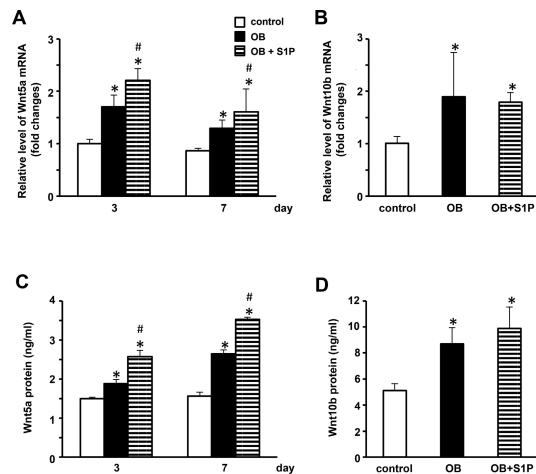
(3) S1P による MSC の骨芽細胞分化促進作用に、 $\beta$ -カテニン依存性経路が関与するかどうかについて、 $\beta$ -カテニン依存性経路を阻害する Dkk1 タンパク質の中和抗体を用いて検討を行う。

### 4. 研究成果

(1) はじめに、C3H10T1/2 細胞を用いて、S1P が  $\beta$ -カテニン非依存性経路の Wnt5a、 $\beta$ -カテニン依存性経路の Wnt10b 発現に及ぼす影響を検討した。骨芽細胞分化誘導によって増加した Wnt5a の遺伝子発現、タンパク質の分泌は S1P の添加によって更に増加したが、S1P は Wnt10b の遺伝子発現、タンパク質分泌には影響を及ぼさなかった (図 1)。

次に S1P が LRP5/6 の発現に及ぼす影響について検討したところ、骨芽細胞分化誘導によって、両遺伝子の発現は増加したが、S1P の添加により更に増加することが示された (図 2)。

図 1 S1P が Wnts の遺伝子発現およびタンパク質発現に及ぼす影響

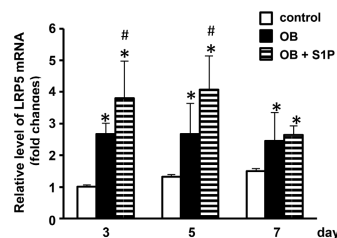


\*  $p < 0.05$  vs. control (骨芽細胞分化誘導なし)

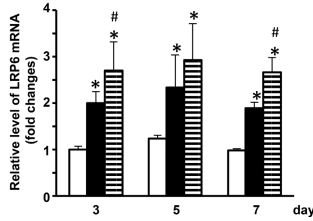
#  $p < 0.05$  vs. 骨芽細胞分化誘導

図 2 S1P が LRP5/6 遺伝子発現に及ぼす影響

#### A LRP5 遺伝子発現



## B LRP6 遺伝子発現



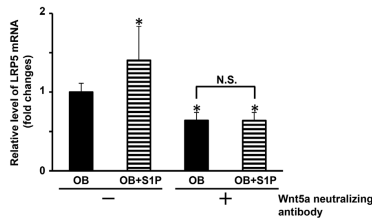
\*  $p < 0.05$  vs. control (骨芽細胞分化誘導なし)

#  $p < 0.05$  vs. 骨芽細胞分化誘導

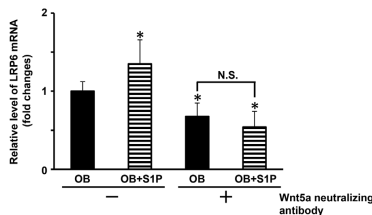
(2) Wnt5a 中和抗体を用いて、S1P による  $\beta$ -カテニン非依存性経路の Wnt5a 発現増加作用が、 $\beta$ -カテニン依存性経路の LRP5/6 発現に与えるか検討した。Wnt5a 中和抗体を添加し、内在性の Wnt5a を阻害すると、骨芽細胞分化誘導時の LRP5/6 遺伝子発現は減少し、S1P の添加による LRP5/6 発現増加は認められなかった (図 3)。

図 3 S1P が Wnt5a を介して LRP5/6 遺伝子発現に及ぼす影響

## A LRP5 遺伝子発現



## B LRP6 遺伝子発現



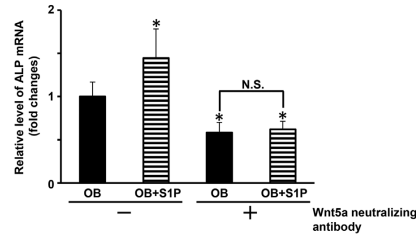
\*  $p < 0.05$  vs. 骨芽細胞分化誘導

(Wnt5a 中和抗体なし)

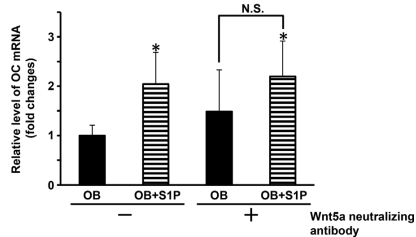
さらに、骨芽細胞分化誘導時の alkaline phosphatase (ALP) 遺伝子発現は減少し、S1P による発現増加も認められなかったが、一方で、osteocalcin (OC) 遺伝子発現については、Wnt5a 中和抗体の影響は認められず、S1P による発現増加も認められなかった (図 4)。

図 4 S1P が Wnt5a を介して骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現に及ぼす影響

## A ALP 遺伝子発現



## B OC 遺伝子発現



\*  $p < 0.05$  vs. 骨芽細胞分化誘導

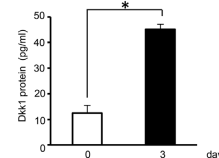
(Wnt5a 中和抗体なし)

(3) 当初、人工的に歯周炎を惹起させた *in vivo* 動物実験モデルを用いて、S1P が歯周組織再生に及ぼす影響についての解析を行う予定であったが、その前に S1P による間葉系幹細胞の骨芽細胞分化促進作用に、 $\beta$  カテニン依存性経路が関与するかどうかについて、多方面から検討しておく必要があると考えられたため、 $\beta$ -カテニン依存性経路を阻害する Dkk1 タンパク質の中和抗体を用いて、S1P による骨芽細胞分化促進作用への影響についての検討を行うこととした。

$\beta$ -カテニン依存性経路を阻害する Dkk1 タンパク質の分泌について、マウス骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて ELISA 法にて解析したところ、Dkk1 タンパク質の分泌が認められた。また、Dkk1 中和抗体を用いて内在性の Dkk1 を阻害すると、 $\beta$ -カテニン依存性経路が活性化した (図 5)。

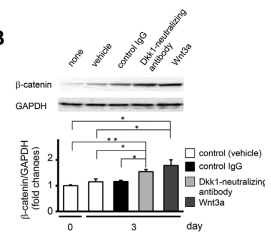
図 5 骨芽細胞における Dkk1 タンパク質の分泌および Dkk1 中和抗体による  $\beta$ -カテニン依存性経路の活性化

## A



\*  $p < 0.05$  vs. day 0

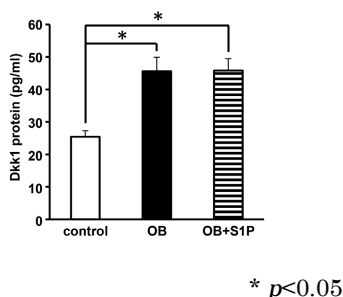
## B



\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

また、C3H10T1/2 細胞に骨芽細胞分化誘導を行うと、Dkk1 タンパク質の分泌は増加したが、S1P の添加は影響を及ぼさなかった(図6)

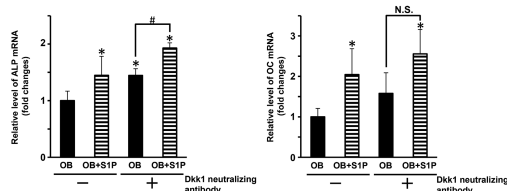
図6 MSC における Dkk1 タンパク質の分泌



さらに、Dkk1 の中和抗体を用いて内在性のβ-カテニン依存性経路を活性化させ、S1P の影響を検討した。

Dkk1 中和抗体は、S1P の LRP5/6 遺伝子発現増加作用に影響を及ぼさなかった。一方、Dkk1 中和抗体存在下では、S1P による ALP 遺伝子発現の相乗的な増加と、OC 遺伝子発現の増加傾向が認められた(図7)。

図7 内在性のβ-カテニン依存性経路の活性化が S1P の骨芽細胞分化促進作用に及ぼす影響



\* p < 0.05 vs. 骨芽細胞分化誘導 (Dkk1 中和抗体なし)

# p < 0.05 vs. 骨芽細胞分化誘導 (Dkk1 中和抗体あり)

すなわち、S1P の LRP5/6 発現増加を介した骨芽細胞分化促進作用には、内在性のβ-カテニン依存性経路は関与しないことが示唆された。

以上の結果から、MSC の骨芽細胞分化において、S1P の Wnt5a 分泌促進作用により、LRP5/6 発現が増加することによって、結果的にβ-カテニン依存性経路が活性化され、骨芽細胞分化が促進することが示唆された。本研究成果は、歯周組織における支持歯槽骨の再生誘導剤としての S1P の可能性を示すものと考えられる。

## 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 2 件)

(1) Hashimoto Y, Kobayashi M, Matsuzaki E, Higashi K, Fumi Takahashi-Yanaga, Takano A, Hirata M, Nishimura F. Sphingosine-1-phosphate-enhanced Wnt5a promotes osteogenic differentiation in C3H10T1/2 cells.

**Cell Biol Int**, 2016; 40(10):1129-36.

(2) Higashi K, Matsuzaki E, Hashimoto Y, Fumi Takahashi-Yanaga, Takano A, Anan A, Hirata M, Nishimura F. Sphingosine-1-phosphate/S1PR2-mediated signaling triggers Smad1/5/8 phosphorylation and thereby induces Runx2 expression in osteoblasts.

**Bone**, 2016; Dec:93:1-11.

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 橋本陽子、松崎英津子、東克匡、高野愛子、西村英紀：未分化間葉系幹細胞の脂肪細胞分化抑制に關するスフィンゴシン-1-リン酸受容体の探索

第 58 回春季日本歯周病学会学術大会、千葉市、幕張メッセ国際会議場、2015.5.15-5.16.

(2) Yoko Hashimoto, Etsuko Matsuzaki, Katsumasa Higashi, Aiko Takano, Fusanori Nishimura :

The involvement of Wnt5a in sphingosine-1-phosphate-modulated mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast.

The 58<sup>th</sup> Autumn Meeting of The Japanese Society of Periodontology、浜松市、アクティ浜松、2015.9.12-9.13.

(3) Yoko Hashimoto, Etsuko Matsuzaki, Katsumasa Higashi, Aiko Takano, Fusanori Nishimura :

The involvement of Wnt5a in sphingosine-1-phosphate-modulated mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast.

The 63<sup>rd</sup> Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research、福岡市、福岡国際会議、2015.10.30-10.31.

(4) Etsuko Matsuzaki, Yoko Hashimoto, Katsumasa Higashi, Fusanori Nishimura, Hisashi Anan : Sphingosine-1-phosphate induces Wnt5a expression and thereby promotes mesenchymal stem cell differentiation into osteoblast. International Association for Dental Research (IADR), Pulp Biology Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016、名古屋市、名古屋市工業研究所、2016.6.26-6.28.

(5) 松崎英津子、橋本陽子、東克匡、高野愛子、西村英紀、阿南壽、第 23 回歯科医学会総会：スフィンゴシン-1-リン酸による骨芽細胞分化促進メカニズム、福岡市、福岡サンパレス、2016.10.21-10.23.

6 . 研究組織

- (1) 研究代表者 東陽子 (橋本)  
( Higashi Yoko ( Hashimoto ))  
九州大学・大学病院・医員  
研究者番号：15H06493