

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791624

研究課題名 (和文) 歯周病における歯槽骨破壊における Wnt5a の役割の解析

研究課題名 (英文) Analysis of Wnt5a for alveolar bone resorption by periodontal disease.

研究代表者

石原章弘 (ISHIHARA AKIHIRO)

松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：90460419

研究成果の概要 (和文)：

本研究より、Wnt5a は受容体 Ror2 を介して破骨細胞の分化と成熟破骨細胞による骨吸収機能を調節することが明らかとなった。また、骨芽細胞だけでなく破骨細胞が発現する Wnt5a が骨吸収活性に作用する可能性が示唆された。作製した GST-sRor2 は、Wnt5a のデコイ受容体として機能し、RANKL が誘導する破骨細胞形成と吸収窩形成を抑制することが明らかとなった。以上の結果より、Wnt5a は炎症性骨吸収を伴う歯周疾患に対する治療の標的になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

This study demonstrated that Wnt5a enhances RANK ligand-induced osteoclast differentiation and resorption pit formation through the receptor Ror2 in osteoclast precursors and mature osteoclast, respectively. RT-PCR analysis showed that Wnt5a mRNA was strongly expressed in both osteoblasts and osteoclasts. RANK ligand-stimulated osteoclast formation and pit formation were enhanced by the treatment with Wnt5a. This enhancement effect of Wnt5a on osteoclast formation was dose-dependently suppressed by sRor2. sRor2 also inhibited the pit-forming activity of osteoclasts in a dose-dependent manner. These results suggest that GST-sRor2 acts as a decoy receptor of Wnt5a. Wnt5a represents a novel therapeutic target for periodontal disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：破骨細胞,Wnt,非古典経路

1. 研究開始当初の背景

Wnt のシグナル経路は β -カテニンを介する古典経路とこれを介さない非古典経路の2つがある。Wnt 古典経路が、骨芽細胞の分化を誘導することが示されている。また、 β -カテニン経路が、OPG の発現を誘導し、骨吸収を負に調節することが示されている。しかし、骨代謝における非古典経路の役割は不明であった。最近、非古典経路を活性化する Wnt5a が、前駆細胞に作用し、RANKL による破骨細胞への分化を促進することを、我々は発見している。乳ガン細胞の近傍に局在するマクロファージ (M Φ) は、Wnt5a を高発現すること、Wnt5a はマクロファージにおける TNF- α および MMP7 の産生を亢進することが示された。これらの所見は、歯周病において、歯周組織に浸潤したマクロファージが Wnt5a の産生を介して、TNF- α や MMP7 の産生を誘導している可能性を示唆している。マクロファージが、リポ多糖 (LPS) を Toll like receptor4 を介して認識すると、TNF- α や IL-1 を産生することが知られている。以上の所見は、Wnt5a が惹起する Wnt 非古典経路が、歯周病による骨破壊を増悪させる可能性を示唆する。そこで、マクロファージによる炎症性サイトカインの産生に Wnt5a がどのように作用するのか、破骨細胞による骨吸収活性に対し Wnt5a がどのように関与するのか、その役割を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

歯周病菌は、TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を誘導し、組織破壊と骨吸収を引き起こす。一方、サイトカインの一つである Wnt5a が破骨細胞の分化を調節する可能性が示唆されている。本研究では、破骨細胞の骨吸収活性における Wnt5a の役割を解析することを目的にした。

3. 研究の方法

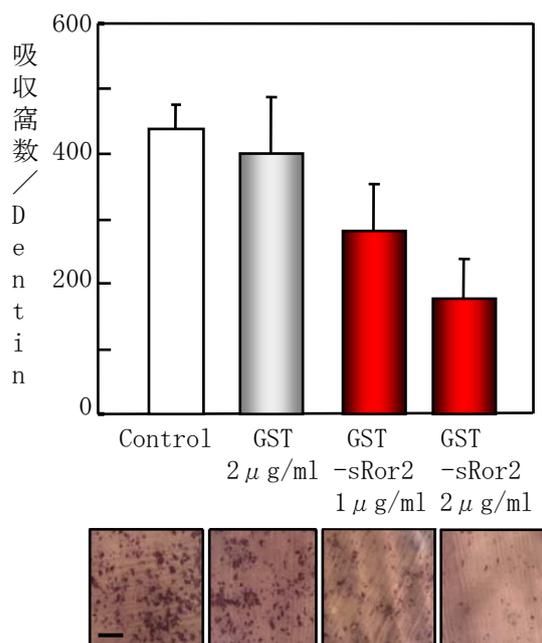
- (1) 破骨細胞、破骨前駆細胞における Ror2 発現と、骨芽細胞、破骨細胞および破骨前駆細胞における Wnt5a 発現を RT-PCR 法で解析した。
- (2) コラーゲンゲル上でマウス骨髄細胞と骨芽細胞を共存培養し、活性型ビタミン D₃ の添加により破骨細胞を形成した。次

に、破骨細胞を象牙切片上で培養し、骨吸収活性を観察した。この培養系に作製した Wnt5a のデコイ受容体である GST-soluble Ror2 (GST-sRor2) または対象として GST を添加した。

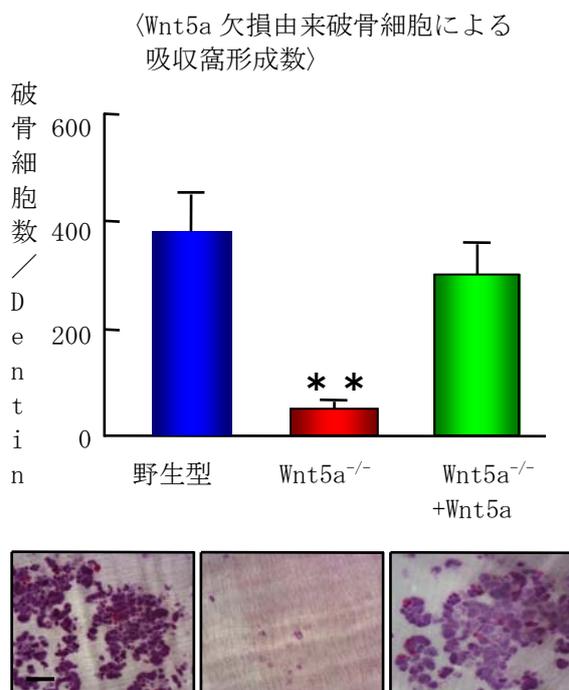
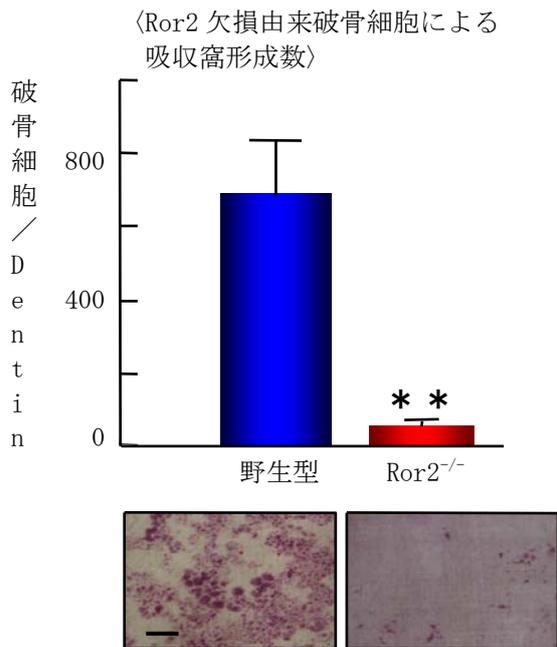
- (3) Ror2 欠損マウスおよび Wnt5a 欠損マウスの胎生 15.5 日齢の肝臓を用い、肝マクロファージを調整し、象牙切片上に播種した。M-CSF と RANKL の添加により破骨細胞に分化させ、骨吸収活性を検討した。骨吸収活性の評価は、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP 染色) による破骨細胞数の定量、ローダミン結合フロイジンによるアクチンリングの観察、HE 染色による骨吸収窩数の定量を行った。

4. 研究成果

- (1) Ror2 の発現は、破骨細胞、破骨前駆細胞で認められ、Wnt5a 発現は骨芽細胞と破骨細胞で高発現していた。
- (2) 骨芽細胞と破骨細胞の共存培養を象牙切片上で行い、吸収窩を形成させた。ここに、GST-sRor2 を添加すると、吸収窩形成は濃度依存的に抑制された。GST 添加では、吸収窩形成は抑制されなかった。この結果から、Wnt5a は破骨細胞による骨吸収を増強することが示唆された。



(3) Ror2 欠損マウス由来 MΦ および Wnt5a 欠損マウス由来 MΦ は、M-CSF と RANKL の添加により野生型マウス由来 MΦ と同様に破骨細胞に分化した。しかし、Wnt5a 欠損由来および Ror2 欠損由来破骨細胞によるアクチンリング形成および吸収窩形成は、野生型由来破骨細胞に比べ著明に低下した。また Wnt5a 欠損マウス由来破骨細胞に Wnt5a を添加すると骨吸収活性が回復した。



以上の結果より Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞の骨吸収活性をポジティブに調節することが明らかになった。Wnt5a が Ror2 を介して破骨細胞の明帯の形成を調節し、骨吸収活性を制御する可能性が示唆された。また GST-sRor2 は破骨細胞の分化のみならず、骨吸収機能を阻害することから、GST-sRor2 は骨吸収性疾患の治療に応用でき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)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Narita N, Kobayashi Y, Nakamura H, Maeda K, Ishihara A, Mizoguchi T, Usui Y, Aoki K, Simizu M, Kato H, Ozawa H, Udagawa N, Endo M, Takahashi N, Saito N.; Multiwalled carbon nanotubes specifically inhibit osteoclast differentiation and function. Nano Lett:9(4):1406-13, 2009(査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① Ishihara A, Kobayashi Y, Maeda K, Uehara S, Yoshinari N, Kato S, Minami Y, Udagawa N, Takahashi N: Roles of Wnt5a-Ror2 signaling in Osteoclast function: Network for International Education and Research in Advanced Dental Sciences, 10 February, 2010 Niigata

② 石原章弘: 破骨細胞の骨吸収活性における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割について: (先端歯学スクール 2009) 2009 年 8 月 28 日 兵庫

③ 前田和洋, 小林泰浩, 石原章弘, 宇田川信之, 高田伊知郎, 加藤茂明, 丸毛啓史, 高橋直之: Wnt5a は生理的および病的破骨細胞形成に必要である: (第 26 回日本骨代謝学会プログラム抄録集:p.228) 日本骨代謝学会 (第 26 回) 2008 年 10 月 31 日

④ Maeda K, Kobayashi Y, Ishihara A, Udagawa N, Takada I, Kato S, Nishita M, Minami Y, Marumo K, Takahashi N: Wnt5a secreted by osteoblasts regulates osteoclast differentiation: 2nd International Conference on Osteoimmunology, 9 June, 2008

[その他]

ホームページ等

http://www.mdu.ac.jp/laboratory/research_contents/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 章弘 (ISHIHARA AKIHIRO)

松本歯科大学・歯学部・助手

研究者番号：90460419

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：