

機関番号 : 33602

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21791818

研究課題名 (和文) 破骨細胞が分泌する Wnt による骨代謝制御機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of regulatory mechanism of bone metabolism by Wnts secreted from osteoclasts.

研究代表者

上原 俊介 (UEHARA SHUNSUKE)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号 : 90434480

研究成果の概要 (和文) : 骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により作りかえられる。この破骨細胞と骨芽細胞のカップリングにサイトカインの一種である Wnt が関与するという仮説に基づき研究を行った。培養細胞を用いた実験系で破骨細胞から分泌される Wnt による骨芽細胞機能の亢進を証明するという試みは失敗した。マウスの骨を用いた解析により、年齢の変化に伴い複数の Wnt 関連遺伝子が骨代謝調節に関与することを示唆する結果を得た。

研究成果の概要 (英文) : Bone is remodeled by osteoclastic bone resorption and osteoblastic bone formation. I hypothesized that some Wnts were involved in coupling between osteoblasts and osteoclasts. At first, I tried to demonstrate an Wnt secreted from osteoclasts stimulate bone formation activity of osteoblasts. But this trial was false. Second, I analyzed expression level of Wnt related genes in tibia from mice. I revealed that expression level of some Wnt related genes were changed age-dependently.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 :

科研費の分科・細目 : 歯学・機能系基礎歯科学

キーワード : 破骨細胞、骨芽細胞、Wnt、カップリング、細胞間情報伝達

1. 研究開始当初の背景

骨は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成により常に作りかえられている。この骨代謝のバランスは、ホルモンにより全身的に制御されるだけでなく骨組織局所における細胞間情報伝達によっても制御されていると考えられている。

Wnt は、発生段階における形態形成や体軸

決定に関与するサイトカインとして見いだされてきた。近年、Wnt シグナルが骨代謝制御にも関与することが次第に明らかにされてきている。これまでに骨芽細胞が Wnt を分泌すること、骨形成の促進に関与することが報告されている。しかし、破骨細胞が Wnt を分泌するか、その Wnt が骨代謝制御にどのように関わるか、は不明であった。

当研究室ではこれまでも骨代謝における Wnt の役割について研究しており、骨芽細胞が分泌する Wnt5a が破骨細胞の分化を促進し、また、機能を亢進させることを明らかにしている。骨組織における Wnt シグナル関連タンパク質の発現を調べる過程で、破骨細胞にも Wnt が発現していることを見いだした。Wnt は、現在までに 20 種類近く報告されている。RT-PCR 法により、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞へ分化するにしたがって発現が上昇する Wnt としては、Wnt2、2b、5a、9a、10a、11 の 6 種類であった。これらを骨芽細胞様の性質を持つ線維芽細胞系のライン化細胞である ST2 細胞に強制発現させた。骨芽細胞活性化の指標である alkaline phosphatase (ALP) 活性を誘導する作用のあるものは、Wnt2 と 10a であった。Wnt2 は骨芽細胞でも強く発現している。従って、我々は、破骨細胞が分泌し、骨芽細胞を活性化させる Wnt として Wnt10a を候補として考えていた。

2. 研究の目的

(1) 破骨細胞から実際に Wnt10a が分泌されるのか、また、骨芽細胞の ALP 活性の亢進に関わるのか、を明らかにするために、*in vitro* の実験系において簡便に解析する実験系を確立することを、第一の目的とした。

しかしながら、最初の年度において実験系の確立がうまく行かなかったため、別のアプローチを行うこととした。すなわち、骨代謝調節に関与する Wnt が Wnt10a 以外にも存在するかどうかをマウスを使って明らかにすることを考えた。Wnt が実際に骨代謝調節に関与しているのであれば骨代謝速度の変化に伴って、Wnt、Wnt 受容体及び Wnt 阻害タンパク質の遺伝子発現パターンも変化するはずである。そこで、(2) マウスの骨において、骨代謝速度の変化に伴って発現量が変化する Wnt 関連遺伝子を明らかにすること、を第二の目的とした。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* における、破骨細胞から分泌される Wnt による骨芽細胞機能亢進を証明するための実験系の確立

①破骨細胞と骨芽細胞様細胞との共存培養

骨芽細胞は、ある程度の ALP 活性を有しており、破骨細胞と共存培養した場合に ALP 活

性が亢進したかどうかを明確に判定することが困難であった。そこで、骨芽細胞様のライン化細胞であるが、通常の培養条件では ALP 活性を示さない ST2 細胞を用いることとした。

マウス脛骨より骨髄を採取し、16 時間培養後、浮遊細胞を回収した。回収した細胞を Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 存在下で 3 日間培養した後、M-CSF と Receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) 存在下で 3 日間培養し、多核の破骨細胞を誘導した。前半の 3 日間終了後、ST2 を添加し、後半の 3 日間培養を行う実験 (①-A) 及び後半の 3 日間終了後に ST2 を添加し、3 日間培養する実験 (①-B) を行った。いずれの場合も、M-CSF のみで培養する群をコントロールとした。

②ST2 細胞への破骨細胞の培養上清添加

①で用いたのと同様の実験系により破骨細胞を形成し、その培養上清を得た。遠心により、細胞成分を除いた上清を原液及び 2 倍希釈で ST2 細胞の培養に用いた。

③ST2 細胞への破骨細胞破砕物の添加

①で用いたのと同様の実験系により破骨細胞を形成し、セルスクレイパーでかきとり、超音波処理により細胞を破砕した。細胞破砕物を懸濁した培養液で ST2 を培養した。

(2) マウス骨代謝速度の変化と Wnt 関連遺伝子発現パターンの変化

実験の材料として、C57/B16J のオスを用いた。週齢は、1、4、8 及び 18 週齢 (1W, 4W, 8W, 18W) のものを用い、血液及び脛骨を採取した。血液を遠心分離し、血清を得た。

①マウスの骨代謝速度の測定

血清中の骨代謝マーカーである ALP (骨形成マーカー) と TRACP5b (骨吸収マーカー) を測定した。

②Wnt 関連遺伝子の発現パターンの変化

脛骨から通法に従い、mRNA を得、逆転写反応により cDNA を調製した。リアルタイム PCR 法により遺伝子発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) *In vitro* における、破骨細胞から分泌される Wnt による骨芽細胞機能亢進を証明するための実験系の確立

①破骨細胞と骨芽細胞様細胞との共存培養

実験①-A に関しては、ST2 を添加することによって M-CSF と RANKL が存在するにもかかわらず、多核の破骨細胞が形成されなかった。

また、ST2 細胞に ALP 活性は誘導されなかった。実験①-B に関して、多核の破骨細胞出現後に ST2 を添加したが、ALP 陽性の細胞は出現しなかった。ST2 を添加していない群において ALP 陽性の細胞が出現した。これは、骨髓中の間質系細胞が混入していたためと考えられる。興味深いことに、ST2 細胞添加群では、ALP 陽性細胞が全く見られず、ST2 が間質系細胞の ALP 活性を抑制するような作用を持っているのかもしれない。

いずれの実験においても、コントロールである、M-CSF のみで培養した細胞と ST2 の共存培養では ALP 活性は誘導されなかった。ポジティブコントロール実験として、Wnt の下流の分子を活性化する LiCl の添加を行ったところ、ST2 に ALP 活性が誘導された。

②ST2 細胞への破骨細胞の培養上清添加

①の結果より、破骨細胞と ST2 の共存培養では、骨髓由来の間質系細胞の混入があり、ALP 陽性の細胞が出て ST2 の ALP 活性であるとは断定できないと考えた。そこで、破骨細胞の培養上清を用いて ST2 を培養することを試みた。しかし、ST2 に ALP 活性は誘導されなかった。このことは、培養上清中には十分量の Wnt が分泌されていないことを示唆する。培養上清の濃縮を行うことにより、解決する可能性がある。

③ST2 細胞への破骨細胞破砕物の添加

②の結果より、培養上清中には、十分量の Wnt が分泌されていないことが考えられたので、破骨細胞を破砕し、その破砕物を培養液に混ぜることで、より、高い Wnt 濃度のできるのではないかと考えた。しかし、ST2 に ALP 活性を誘導することはできなかった。

①から③の結果より、破骨細胞から分泌される Wnt による骨芽細胞機能亢進を証明するための実験系の確立は失敗に終わった。一つの要因として、培養系においては、破骨細胞からの Wnt 分泌量が低い可能性が考えられる。生体内においては、何らかのメカニズムにより、破骨細胞の Wnt 産生能と分泌能が亢進しているのではないかと。

(2) マウス骨代謝速度の変化と Wnt 関連遺伝子発現パターンの変化

①マウスの骨代謝速度の測定

図 1 に結果を示す。骨形成マーカーとして血清 ALP 活性(上段)、骨吸収マーカーとして血清 TRACP5b 活性(下段)を測定した。

ALP 活性、TRACP5b 活性とも 1W で最も高く、週齢が経過するにしたがってほぼ同様のパターンで有意に低下した。

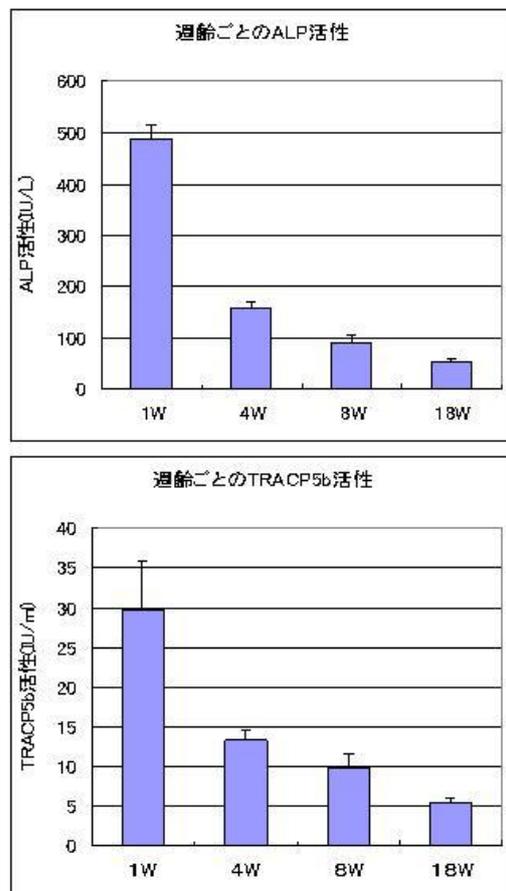


図1 週齢ごとのマウス血液中の骨代謝マーカー

②Wnt 関連遺伝子の発現パターンの変化

脛骨より調製した cDNA を用いてのリアルタイム PCR を行った。4W において、発現量が相対的に高かった Wnt は、Wnt4, Wnt5a, Wnt16 であり、Wnt10a の発現は、全ての週齢において低値であった。

Wnt 受容体の遺伝子発現も調べたところ、発現が高かったのは、Lrp5, Lrp6 と Ror2 であった。

Wnt シグナルを阻害する作用のあるタンパク質についても、その遺伝子発現を調べたところ、発現が高かったのは、Sost と Dkk1 であった。

このうち、Wnt5a と Ror2 に関しては、現在更なる解析を進めており、ここでは、データを示さない。

Wnt4(図 2 上段)、Wnt16(図 2 下段)、Lrp5(図 3 上段)、Lrp6(図 3 下段)、Sost(図 4 上段)、Dkk1(図 4 下段)の各週齢における遺伝

子発現量を示す。

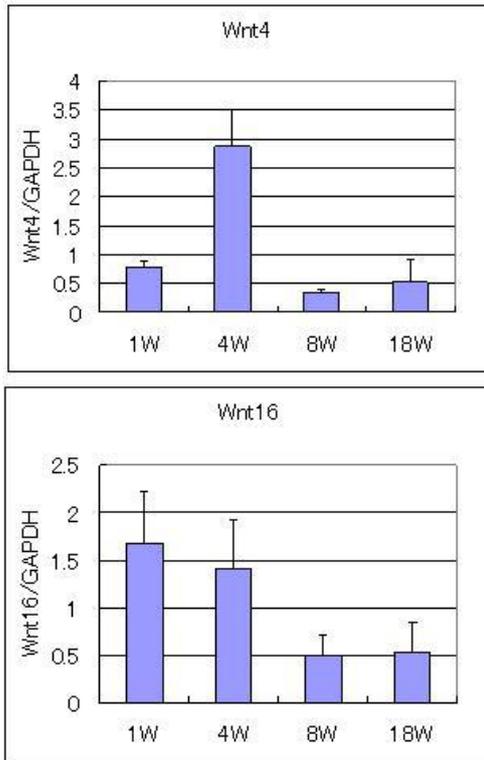


図2 週齢ごとのWnt4, Wnt16遺伝子の発現量

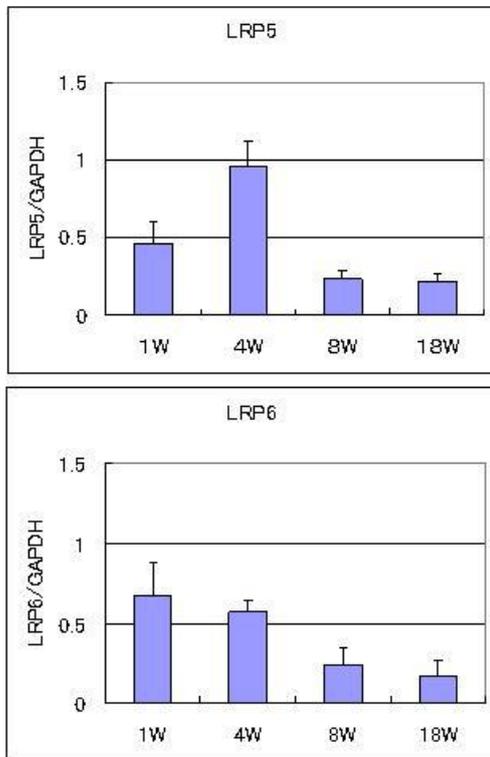


図3 週齢ごとのLrp5, Lrp6遺伝子の発現量

Wnt4, Lrp5, Sost, Dkk1の遺伝子発現パターンは、いずれも、1Wで低く、4Wで上昇し、

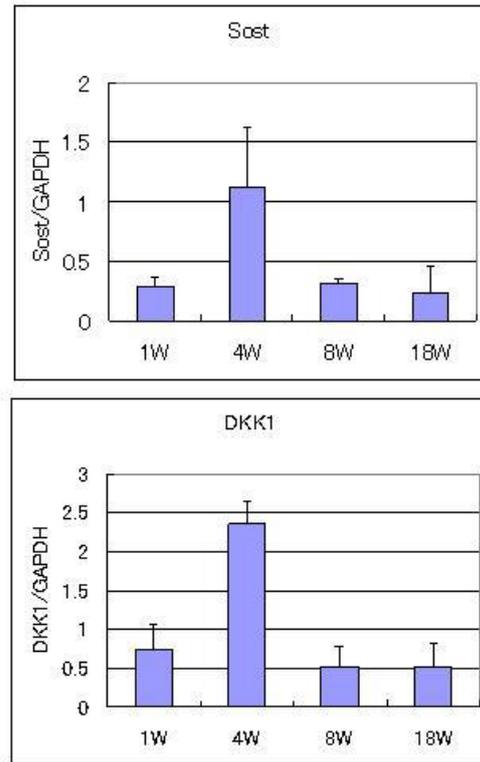


図4 週齢ごとのSost, Dkk1遺伝子の発現量

8Wで低下するというパターンであった。

また、Wnt16及びLrp6に関しては、1Wと4Wの発現量に大きな差が無く、8Wで低下するというパターンであった。

Wnt及びWnt受容体の遺伝子発現パターンは、4Wから8Wにかけての骨代謝速度の低下とはよく一致した。1Wから4Wにかけての骨代謝速度の低下については、Wntシグナル阻害タンパク質であるSost及びDkk1の発現が1Wから4Wにかけて上昇することが一つの原因ではないかと考えられる。

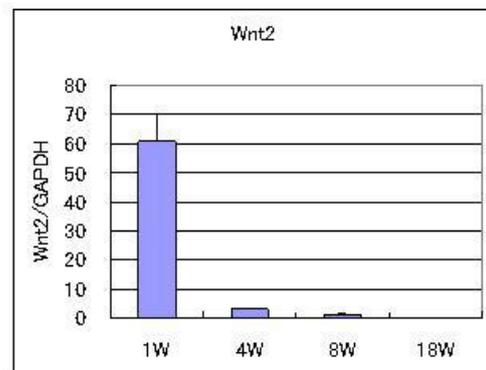


図5 週齢ごとのWnt2遺伝子の発現量

興味深いことに、Wnt2は、1Wでのみ非常に高発現しており（図5）、1Wにおける非常に

速い骨代謝速度の要因であるかもしれない。

以上の結果から、マウスの骨代謝調節には、複数の Wnt、Wnt 受容体及び Wnt 阻害タンパク質が関与している可能性が考えられる。

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 1 件)

Takahashi N., Maeda K., Ishihara A.,

Uehara S., Kobayashi Y.

Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals.

Front. Biosci. 16 (2011) 21-30 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) 小林 泰浩 他 Wnt5a は RANK の発現を亢進し、破骨細胞分化を促進する

第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 年 7 月 21 日 京王プラザホテル (東京)

(2) 山下 照仁 他 漢方牛蒡子由来のアルクチゲニンが破骨細胞の分化と機能を抑制する

第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 年 7 月 21 日 京王プラザホテル (東京)

(3) 中山 貴裕 他 簡便な破骨細胞の極性化解析法の確立

第 28 回日本骨代謝学会学術集会 2010 年 7 月 21 日 京王プラザホテル (東京)

(4) 山下 照仁 他 破骨細胞の分化と機能を抑制する天然化合物アルクチゲニンの作用機序の解明 第 70 回松本歯科大学学会例会 2010 年 7 月 10 日 松本歯科大学 (長野)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 俊介 (UEHARA SHUNSUKE)

松本歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90434480

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：