

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390348

研究課題名（和文） 骨および軟骨形成過程における非古典的 Wnt シグナルネットワークの統合的理解

研究課題名（英文） Understanding of non-canonical Wnt signaling network in bone and cartilage formation

研究代表者

西村 理行（ NISHIMURA RIKO ）

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：60294112

研究成果の概要（和文）：Wnt5a を始めとする非古典的 Wnt シグナルの骨および軟骨形成過程における役割を検討した。その結果、Wnt5a ノックアウトマウスでは、骨格形成が著しく阻害されており、特に内軟骨性骨形成の初期において強い抑制を認めた。Wnt5a の標的遺伝子を探索した結果、ホメオボックス型転写因子が Wnt5a シグナルに関与している可能性が示唆された。この分子の *in vivo* での機能を検索したところ、内軟骨性骨形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：To understand the role of non-canonical Wnt including Wnt5a, we investigated the phenotype of Wnt5a null mice. The Wnt5a null mice showed severe impairment of skeletal development, especially in cartilage formation. We have attempted to identify the target of Wnt5a, and found that homeobox gene would be involved in Wnt5a-regulated endochondral ossification.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2012 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：Wnt、骨芽細胞、軟骨細胞、転写因子

1. 研究開始当初の背景

Wnt ファミリーは、個体の初期発生、形態形成、幹細胞の自己増殖ならびに癌化に関わる分泌性糖タンパク質である。近年、Wnt ファミリーが、骨および軟骨形成に深く関与していることが明らかにされている。Wnt の共役レセプターLrp5 および Lrp6 は、古典的 Wnt シグナルを伝達し、その遺伝子異常は、ヒトやマウスにおいて、骨粗鬆症などの骨および

軟骨疾患を誘発する(Cell 107:303)。さらに、Lrp5/6 の下流で機能する β -カテニンおよび転写因子 LEF が、骨芽細胞ならびに軟骨細胞の分化過程において重要な役割を果たしていることも示されている。このように、骨および軟骨形成に対する古典的 Wnt シグナルの重要性が確立されつつある。

一方、Wnt5a などの特定の Wnt 分子は、チロシンキナーゼ Ror2 を介して非古典的 Wnt

シグナルを活性化する(J Cell Biol 175:555)。興味あることに、Wnt5a および Ror2 のノックアウトマウスが、重篤な骨および軟骨形成不全を示すことが報告されている。したがって、非古典的 Wnt シグナルの役割解明は、骨および軟骨形成の制御メカニズムに対する理解を深め、骨・軟骨疾患の新規治療法の開発に貢献すると期待される。しかしながら、非古典的 Wnt シグナルに関しては、G タンパク質や Ca^{2+} シグナルの活性化が示唆されているものの、PCP 経路を介した細胞の運動能や細胞骨格への役割が示されている程度で、その役割は明確でない。

さらに Wnt5a や Ror2 により活性化される非古典的 Wnt シグナルがどのようなメカニズムで骨および軟骨の形成を制御しているかは、全く不明である。研究代表者ら (*Mol Cell Biol* 18:2411) を始め多くの研究者は、Wnt3a が古典的 Wnt シグナルを活性化し、間葉系幹細胞から骨芽細胞や軟骨細胞への初期分化を誘導することを報告している。

研究代表者らは、Wnt5a の過剰発現が、骨芽細胞および軟骨細胞の石灰化を促し、後期分化を著明に促進することを見出した。これらの研究結果は、骨および軟骨形成においては、古典的 Wnt シグナルと非古典的 Wnt シグナルの役割は、大きく異なっていることを物語っている。

2. 研究の目的

(1) Wnt5a の骨および軟骨における役割検討

Wnt5a の骨ならびに軟骨組織における機能的役割を *in vivo* において検索する。

(2) Wnt5a の標的分子の同定

Wnt5a の骨あるいは軟骨組織における分子作用メカニズムを明らかにするために、Wnt5a の標的遺伝子の同定を実施する。

(3) Wnt5a の標的分子の機能解析

Wnt5a の標的分子の骨および軟骨組織での機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Wnt5a の骨および軟骨における役割検討

Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスの四肢を病理組織学的に解析した。

(2) Wnt5a の標的分子の同定

胎生 12.5 日齢のマウスより、肢芽細胞を採取し、Wnt5a、BMP2、Runx2 あるいはインディアンヘッジホッグの各アデノウイルスを感染させ、各細胞群より total RNA を採取し、マイクロアレイ解析を実施して、Wnt5a の標的遺伝子の同定を試みた。

(3) Zfhx4 遺伝子ノックアウトマウスの作

製と解析

① Zfhx4 は、10kb を超える大きな cDNA からなるため、過剰発現系などのアプローチによる検討は、非常に困難であると予想されたので、遺伝子ノックアウトマウスを作製した。Zfhx4 は、比較的遍在性に発現しているため、Zfhx4 遺伝子ノックアウトマウスが、早期の胎生致死で、骨および軟骨組織の解析ができないことも考慮して、Cre-loxP システムを用いた flox マウスを作製することとした。

② ターゲティングベクターにより相同組換えを行った ES 細胞を用いて Zfhx4 flox キメラマウスを作製後、C57/BL マウスと交配し、Germ transmission を PCR ならびにサザンブロット解析によって確認し、Zfhx4 flox ヘテロマウスを樹立した。

③ Zfhx4 flox ヘテロマウスを CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し、Zfhx4 欠損ヘテロマウスを作製した。このヘテロマウス同士を交配し、Zfhx4 ノックアウトマウスを作出した。

④ Zfhx4 flox ヘテロマウス同士を交配し、Zfhx4 flox ホモマウスを作製した。また Zfhx4 flox ヘテロマウスと Prx-Cre トランスジェニックマウスを交配し、Zfhx4 flox/+;Prx1-Cre トランスジェニックマウスを作成後、このマウスと Zfhx4 flox ホモマウスを交配し、Zfhx4 コンディショナルノックアウトマウスを作出した。

⑤ Zfhx4 ノックアウトマウスあるいは Zfhx4 コンディショナルノックアウトマウスを胎生 14.5~16.5 日齢で、病理組織学的ならびにアリザリンレッド-アルシアンブルーの二重染色による骨格標本にて解析した。

4. 研究成果

(1) Wnt5a の骨および軟骨における役割検討



Wnt5a 遺伝子ノックアウトマウスは、既報のとおり、非常に重篤な Dwarf であり、その

四肢を病理組織学的解析すると、軟骨組織は観察されるものの、増殖軟骨で分化が停止しており、軟骨の肥大化、骨化ならびに骨形成作用は、全く認められなかった(上図)。さらに、軟骨組織の大きさも野生型マウスと比較して非常に小さかった。したがって Wnt5a は、内軟骨性骨化の非常に初期に必須的役割を果たしていると考えられた。

(2) Wnt5a の標的分子の同定

マイクロアレイ解析の結果、BMP2、Runx2、あるいはインディアンヘッジホッグを過剰発現した肢芽細胞では、遺伝子発現パターンに相関関係を認めた。しかしながら、Wnt5a を作用させたマウス肢芽細胞の遺伝子発現パターンは、BMP2、Runx2、あるいはインディアンヘッジホッグを過剰発現した肢芽細胞のものとは大きく異なることが明らかとなった。

マイクロアレイ解析の結果に基づいて、RT-qPCR にて、Wnt5a の標的候補遺伝子を探したところ、転写因子 Zfhx4 が Wnt5a シグナルに関与している可能性が示唆された。

(3) Zfhx4 の in vivo での役割

Zfhx4 ノックアウトマウスおよびコンディショナルノックアウトマウスは、同腹の野生型あるいはコントロールマウスと比較して、骨格形成が遅延しており、中等度の Dwarf 様症状を呈していた。

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 11 件)

① Masuda K, Ripley B, Nishimura R, Mino T, Takeuchi O, Kiyonari H, Shioi G, Kishimoto T, Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 査読有、(2013)、印刷中

② Nishimura R, Hata K, Ono K, Takashima R, Yoshida M, Yoneda T, Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *J Oral Bioscience*. 査読有、(2013)、印刷中。

③ Hisada K, Hata K, Ichida F, Matsubara T, Orimo H, Nakano T, Yatani H, Nishimura R, Yoneda T, Retinoic acid regulates commitment of undifferentiated mesenchymal stem cells into osteoblasts and adipocytes. *J Bone Miner Metab*. 査読有、31 巻、(2013)、53-63

④ Nishimura R, Wakabayashi M, Hata K, Matsubara T, Honma S, Wakisaka S, Kiyonari H, Shioi G, Yamaguchi A, Tsumaki N, Akiyama H, Yoneda T, Osterix Regulates Calcification and Degradation of Chondrogenic Matrices Through Matrix

Metalloproteinase (MMP13) Expression in Association with Transcription Factor Runx2 During Endochondral Ossification. *J Biol Chem*. 査読有、287 巻、(2012)、33179-33190

⑤ Nishimura R, Hata K, Mastubara T, Wakabayashi M, Yoneda T, Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signaling and transcription factors. *J Biochem*. 査読有、151 巻、(2012)、247-254

⑥ Nishimura R, Hata K, Ono K, Amano K, Takigawa Y, Wakabayashi M, Takashima R, Yoneda T, Regulation of endochondral ossification by transcription factors. *Frontiers in Biosci-Landmar*. 査読有、17 巻、(2012)、2657-2666

⑦ 西村 理行、波多 賢二、高島 利加子、吉田 倫子、内軟骨性骨形成過程における転写因子の役割と機能制御、*Clinical Calcium*. 査読無、(2012)、22 巻、643-652

⑧ Amano K, Hata K, Muramatsu S, Wakabayashi M, Takigawa Y, Ono K, Nakanishi M, Takashima R, Kogo M, Matsuda A, Nishimura R, Yoneda T, Arid5a cooperates with Sox9 to stimulate chondrocyte-specific transcription. *Mol Biol Cell*. 査読有、22 巻、(2011)、1300-1311

⑨ Murakami T, Hino S, Nishimura R, Yoneda T, Wanaka A, Imaizumi K, Distinct mechanisms are responsible for osteopenia and growth retardation in OASIS-deficient mice. *Bone*. 査読有、48 巻、(2011)、514-523

⑩ 西村 理行、骨芽細胞の分化制御機構、*Clinical Calcium*. 査読無、21 巻、(2011)、103-112

⑪ Takigawa Y, Hata K, Muramatsu S, Amano K, Ono K, Wakabayashi M, Matsuda A, Takada K, Nishimura R, Yoneda T, A transcription factor Znf219 regulates chondrocyte differentiation by assembling transcription factory with Sox9. *J Cell Sci*. 査読有、123 巻、(2010)、3780-3788

[学会発表] (計 16 件)

① 波多 賢二、高島 利加子、Whitson RH、西村 理行、米田 俊之、転写因子 Arid5b は Sox9 標的遺伝子プロモーター領域のヒストン脱メチル化を介して軟骨細胞分化を促進する。軟骨代謝学会シンポジウム、第 26 回日本軟骨代謝学会、2013. 3. 1.、千里ライフサイエンスセンター

② 西村 理行、骨格制御過程における転写因子の機能的役割、第 24 回骨代謝セミナー特別講演(招待講演)、2012. 12. 21.、フォーシーズンズホテル椿山荘

③ Masuda K, Barry R, Nishimura R, Takeuchi O, Takashi M, Daron S, Kishimoto T. Arid5a is an IL-6 mRNA stability protein. Chlorpromazine mediates its inhibitory effect on IL-6 production in macrophages through inhibition of Arid5a expression、第 41 回免疫学会学術集会シンポジウム、2012. 12. 7. 神戸国際会議場

④ 西村 理行、骨形成過程における転写因子の制御メカニズム、第 28 回長崎骨粗鬆症研究会 (招待講演)、2012. 10. 31.、長崎県医師会館

⑤ Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T.、The Transcription Factor FoxC1 Regulates Chondrogenesis Together with Gli2 through Induction of PTHrP、ASBMR Annual Meeting, 2012. 10. 12.、Minneapolis Convention Center

⑥ 波多 賢二、西村 理行、転写因子 Arid5b は Sox9 標的遺伝子プロモーター領域のヒストン脱メチル化を介して軟骨細胞分化を制御する、歯科基礎医学会、2012. 9. 16.、奥羽大学

⑦ Yoshida M, Hata K, Takashima R, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T.、The transcription factor FoxC1 regulates chondrogenesis together with Gli2 through induction of PTHrP、Australian & New Zealand Bone & Mineral Society 22nd Annual Scientific Meeting in conjunction with 1st Asia-Pacific Bone and Mineral Research Meeting、2012. 9. 4、Pan Pacific Hotel Perth Western Australia.

⑧ 波多 賢二、高島 利加子、西村 理行、米田 俊之、軟骨細胞分化のエピゲノム、第 30 回日本骨代謝学会 (招待講演)、2012. 7. 19. 京王プラザホテル

⑨ 吉田 倫子、波多 賢二、高島 利加子、井関 祥子、山本 照子、西村 理行、米田 俊之。転写因子 FoxC1 は PTHrP の発現を介して内軟骨性骨形成を制御する、第 30 回日本骨代謝学会、2012. 7. 20 京王プラザホテル

⑩ 西村 理行、骨格形成過程における転写因子ネットワークの制御機構、第 66 回口腔科学会教育研修会 (招待講演)、2012. 5. 16.、リーガロイヤルホテル広島

⑪ 西村 理行、骨格形成過程における転写因子の制御機構とその役割、第 20 回 Club for Cartilage and Bone カンファレンス 特別講演 (招待講演)、2012. 1. 26、天王寺都ホテル

⑫ 西村 理行、骨格形成過程における転写制御ネットワークシステムの分子機構、第 53 回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム (招待講演)、2011. 9. 30、長良川国際会議場

⑬ Takashima R, Hata K, Wakabayashi M, Nakanishi M, Ono K, Amano K, Whitson R, Maeda Y, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor Arid5B is a novel partner of Sox9 in endochondral bone formation. ASBMR 2011 Annual Meeting, 2011. 9. 18.、San Diego Convention Center

⑭ Takashima R, Hata K, Wakabayashi M, Nakanishi M, Ono K, Amano K, Whitson R, Maeda Y, Nishimura R, Yoneda T. The transcription factor Arid5b modulates endochondral bone formation in cooperation with Sox9、Joint 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting & ANZBMS Annual Meeting, 2011. 9. 5.、Australia, Gold Coast Convention center

⑮ 高島 理加子、波多 賢二、若林 真、小野 孝一郎、天野 克比古、中西 雅子、前田 芳信、西村 理行、米田 俊之、Arid5b は Sox9 の転写機能を促進することにより軟骨細胞分化を制御する、第 29 回日本骨代謝学会、2011. 7. 29、大阪国際会議場

⑯ Nishimura R、Regulation of bone development by Sox9 and Osterix、7th Bone Biology Forum (招待講演)、2010. 8. 21、富士研修センター

〔図書〕 (計 1 件)

① 西村 理行. 日本臨牀社 (2010) 血液・尿化学検査 日本臨牀増刊号 オステオポニン、オステオネクチン. 233-235

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西村 理行 (Nishimura Riko)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：60294112

(2) 連携研究者

波多 賢二 (Kenji Hata)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：80444496