

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 30 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390351

研究課題名（和文）Wnt シグナルによる破骨細胞ニッチ制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of osteoclast niche regulated by Wnt signals.

研究代表者

高橋 直之（TAKAHASHI NAOYUKI）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：90119222

研究成果の概要（和文）：破骨細胞ニッチの形成における Wnt シグナルの役割の解明を目指し、以下の実験を行なった。(1)破骨細胞ニッチの解析した。破骨細胞前駆細胞の性質を明らかにした。(2) QOP 特異的に Ror2 欠損を導入したマウスの骨組織の解析し、破骨細胞の分化を Wnt5a-Ror2 シグナルが促進することを明らかにした。(3)QOP における Wnt 古典経路と非古典経路の解析し、Wnt 古典経路よりも非古典経路が重要であることを証明した。(4)GeneChip を用いた QOP が特異的に発現するマーカーの同定を試みたが、新しいマーカーは見出せなかった。一方破骨細胞を解析し、破骨細胞は特異的に Wnt5a を発現することを明らかにした。(5) IL-34 が破骨細胞ニッチを校正するサイトカインであることを明らかにした。活性型ビタミン D は破骨細胞ニッチを抑制することを明らかにした。(6) 歯周病モデルとして OPG 欠損マウスを解析し、OPG 欠損マウスが歯周病モデルとなり得ることを証明した。(7) II 型ラーゲン誘導性リウマチモデル（CIA）を用いて、可溶性 Ror2 が骨吸収を効率よく抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：We examined the role of Wnt signaling for the formation of osteoclast niche, and the results as follows. (1) The osteoclast niche was analyzed and characteristics of osteoclast precursors (quiescent osteoclast precursors, QOP) were clarified. (2) The role of noncanonical Wnt signaling in osteoclastogenesis was examined. Noncanonical Wnt signals (Wnt5a-Ror2 signals) were shown to play important roles in osteoclastogenesis. (3) Wnt5a-Ror2 signals enhanced RANK expression in QOPs. Canonical Wnt signals did not appear to play a role in osteoclastogenesis. (4) GeneChip analysis was performed on QOPs to identify specific markers of QOPs. But we failed to isolate specific markers of QOPs. However, we found that osteoclasts specifically express Wnt5a.(5) IL-34 was identified as an important cytokine for generation of QOP in hematopoietic tissues. (6) Alveolar bone loss was examined in OPG-deficient (OPG^{-/-}) mice and RANKL-overexpressing transgenic mice. OPG^{-/-} mice were shown to be a useful model of periodontitis. (7) Administration of soluble form of Ror2 into collagen-induced arthritis mice effectively suppressed bone destruction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2012 年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞が発現する RANKL と M-CSF の刺激を受け、破骨細胞に分化する。我々は、*in vivo* における破骨細胞前駆細胞 QOP を同定した。また、RANKL 欠損マウスを用いて、骨芽細胞は破骨細胞ニッチを構築し、QOP を長期間保持することを証明した。一方、Wnt- β catenin シグナル(Wnt 古典経路)が骨形成を調節するという発見は、骨代謝研究の方向を大きく変えた(Cell 16:513, 2001)。さらに、Wnt 古典経路は骨吸収を抑制することが報告され(Dev Cell 8:751, 2005)、骨吸収を調節する Wnt シグナルが注目されている。

本研究は、次の結果より着想した。(1)骨芽細胞は破骨細胞ニッチを形成し QOP を長期間保持した。(2)骨芽細胞の産生する Wnt5a は、Ror2 を介して QOP の破骨細胞への分化を促進した。(3)可溶性 Ror2 は Wnt5a のデコイ受容体として作用した。可溶性 Ror2 をリウマチモデルマウスに投与すると、骨吸収は抑制された。(4)OPG 欠損マウスを用いた歯周病モデルマウスを作製した。(5)Wnt- β catenin シグナルは骨芽細胞の OPG 産生を促進し、破骨細胞形成を抑制した。以上より、Wnt シグナルは破骨細胞ニッチの重要な調節因子である可能性が示唆された。おこれらの結果を基に、本研究を企画した。

2. 研究の目的

破骨細胞の前駆細胞は、分裂した後に細胞周期が停止した前駆細胞 QOP (cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursor)へ分化する。QOP は骨吸収刺激を受け、破骨細胞に分化する。骨芽細胞は QOP を長期間保持するため、我々はこの保持機構を破骨細胞ニッチと名付けた(J Cell Biol 184:541, 2009)。更に我々は、骨芽細胞が産生する Wnt5a は、Frizzled の共受容体である Ror2 (Wnt 非古典経路)を介して、QOP から破骨細胞への分化を促進することを明らかにした(日本骨代謝学会抄録号 p143, 2009)。本研究では、(1) 破骨細胞ニッチを制御する Wnt シグナルを解明すること、および(2) 歯周病における Wnt シグナルを標的とした新しい治療法の確立を目指すことを目的とした。さらに、破骨細胞ニッチを制御する Wnt シグナルの解明を基に、OPG 欠損歯周病モデルマウスを用いて、それらの治療効果を解析することを目指す。一連の実験より、Wnt シグナルを制御する新しい歯周病治療法の確立が期待される。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞ニッチの解析

Wnt5a 欠損マウスは胎生致死である。そのため Wnt5a ヘテロ欠損マウスを解析した。Wnt5a ヘテロ欠損マウスの破骨細胞ニッチを *in vivo* で解析した。更に、Wnt5a 欠損骨芽細胞の骨形成能と QOP 形成・支持能を培養系で解析した。また Wnt3a と β catenin の変動を解析した。

(2) QOP 特異的 Ror2 欠損マウスの解析

QOP は RANK を強く発現する細胞として同定される。RANK-Cre マウスと Ror2 flox マウスを掛け合わせ、QOP 特異的 Ror2 欠損マウスを作製し、骨組織を解析した。

(3) Wnt シグナルの解析

破骨細胞前駆細胞 QOP に β catenin を強制的に発現させ、破骨細胞分化に対する Wnt- β catenin シグナルの作用を解析した。また、shRNA 法で QOP の β catenin を欠損させ破骨細胞への分化能を評価した。

(4) GeneChip を用いた遺伝子解析

QOP は c-Fms と RANK を発現した細胞であるが、他のマーカーは明らかではない。そこで、セルソーターで集めた QOP に特異的に発現する遺伝子を、GeneChip 法を用いて解析した。対照として、c-Fms 陽性細胞を用いた。

(5) IL-34 の役割解析

IL-34 は新たに発見されたサイトカインで M-CSF と同じ受容体に結合し、M-CSF と同様のシグナルを伝達する。M-CSF 欠損の op/op マウスを用いて、IL-34 の破骨細胞形成における役割を解析した。

(6) 歯周疾患の新しい治療法の確立

RANKL のデコイ受容体である OPG 欠損マウスと RANKL を高度に発現すると RANKL トランスジェニックマウスの骨組織を解析した。また、歯周病治療にテトラサイクリン系薬剤の効果を解析した。

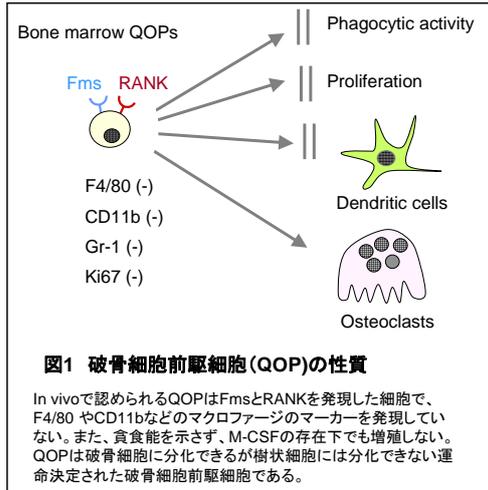
(7) リウマチモデル解析

II 型ラーゲン誘導性リウマチモデル (CIA) を用いて、Ror2 シグナルを遮断する可溶性 Ror2 の効果を解析した。また、滑膜細胞における炎症性サイトカインによる Wnt5a 発現誘導機構を解析した。

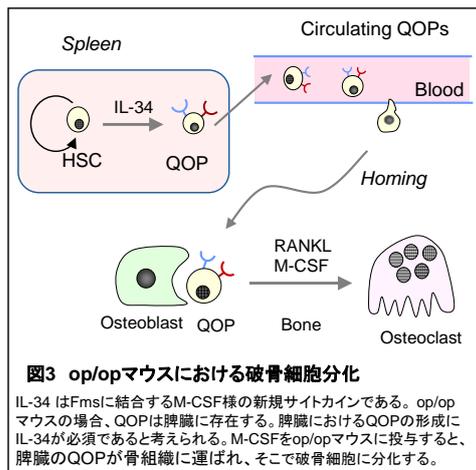
4. 研究成果

(1) 破骨細胞ニッチの解析

QOP の形質を詳細に解析し、QOP は運命決定した前駆細胞であることを明らかにした(発表論文⑥、⑫、図 1)。また、Wnt5a ヘテロ欠損マウスを解析したところ、Wnt5a ヘテロ欠損マウスは破骨細胞数の減少を伴い、骨吸収が抑制されていた(発表論文⑧)。また、Wnt5a は骨芽細胞が大量に産生することを見出した。Wnt5a 欠損骨芽細胞の QOP 形成・支持能を培養系で解析したところ、破骨細胞形成支持能は低かった(発表論文⑧)。



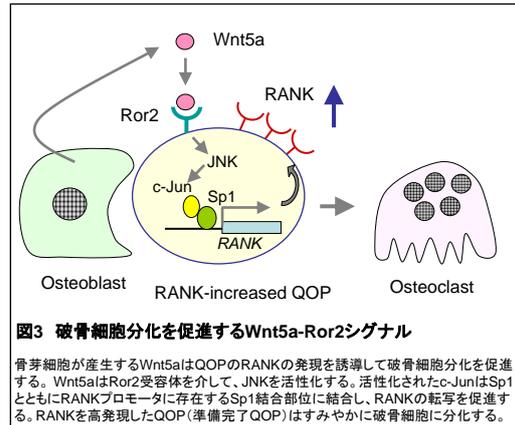
(2) QOP 特異的 Ror2 欠損マウスの解析：
RANK-Cre マウスと Ror2 flox マウスを掛け合わせ、QOP 特異的 Ror2 欠損マウスを作製し、骨組織を解析したところ、破骨細胞分化能が低下していた。Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞形成を促進することが判明した (研究成果⑧、図 2)。



(3) Wnt シグナルの解析：
破骨細胞前駆細胞 QOP に β catenin を強制的に発現させ、破骨細胞分化に対する Wnt- β catenin シグナルの作用を解析したが、 β catenin シグナルが破骨細胞の分化に重要である知見は得られなかった。一方、Wnt5a-Ror2 シグナルは JNK を介して RANK の発現を誘導することが判明した (研究成果⑧、図 2)

(4) GeneChip を用いた遺伝子解析
セルソーターで集めた QOP に特異的に発現する遺伝子を、GeneChip 法を用いて解析したが、QOP 特異的な遺伝子を単離することはできなかった。しかし、造血系細胞から QOP への分化に Fos が必須であることを明らかにした (研究成果⑫)。

(5) IL-34 の役割解析
op/op マウスの解析より、IL-34 は QOP を誘導するために必須なサイトカインであることが示された。また、op/op マウスの場合、脾臓が QOP の産生部位であることが証明された (研究成果⑦、図 3)。また、活性型ビタミン D が IL-34 の発現を誘導することが示された。一方、活性型ビタミン D の長期間の投与は QOP 数を低下させなかったが、骨芽細胞の RANKL の発現を抑制した (研究成果⑧)。



(6) 歯周疾患の新しい治療法の確立：RANKL トランスジェニックマウスに比較して、OPG 欠損マウスの歯槽骨吸収は著しく亢進していた (研究成果③)。歯周病治療にテトラサイクリン系薬剤が効果的であることが示された (研究成果⑩)。

(7) リウマチモデルの解析
II 型ラーゲン誘導性リウマチモデル (CIA) を用いて、可溶性 Ror2 が骨吸収を効率よく抑制することを見出した (研究成果⑧)。滑膜細胞における炎症性サイトカインによる Wnt5a 発現誘導機構は見出せなかった。

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 16 件)
(全て査読有)

① Kobayashi Y, Maeda K, Uehara S, Yamashita T, Takahashi N: Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by Wnt signaling. *Inflammation and Regeneration*, In press

② Takahashi N: Mechanism of inhibitory action of Eldecalcitol, an active vitamin D analog, on bone resorption in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* S0960-0760 (12) 00243-9., 2012. doi:pii: S0960-0760(12)00243-9.

- ③Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Nakamura M, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N: Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL- overexpressing transgenic male mice. *Endocrinology* 154:773-782, 2013. doi: 10.1210/en.2012-1928.
- ④Yamashita T, Takahashi N, Udagawa N: New roles of osteoblasts involved in osteoclast differentiation. *World J Osteoarthritis* 3:175-181, 2012. doi:10.5312/wjo.v3.i11.175.
- ⑤Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Sato M, Penninger JM, Yasuda H, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N: Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in CSF-1op/op mice. *Proc Natl Acad Sci UAS*, 109:10006-10011, 2012. doi: 10.1073/pnas.1207361109.
- ⑥Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N: c-Fos plays an essential role in the up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Science*, 125:2910-2917, 2012. doi: 10.1242/jcs.099986.
- ⑦Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T: Regulation of Osteoclast Function. *Mod Rheumatol*, 22:167-177, 2012. Suda T, Takahashi N, Takahashi N Bone Effects of vitamin D -Discrepancies between in vivo and in vitro studies -. *Arch Biochem Biophys*, 523:22-29, 2012. doi: 10.1007/s10165-011-0530-8.
- ⑧Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. *Nature Med* 18:405-412. 2012. doi: 10.1038/nm.2653.
- ⑨Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, Takahashi N, Saito H, Yasuda H, Udagawa N, Suda T, Takahashi N: Daily administration of Eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. *J Bone Mineral Res*, 27:461-473, 2012. doi: 10.1002/jbmr.555.
- ⑩Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N: Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. *J Immunol* 188:1772-1781, 2012. doi: 10.4049/jimmunol.1101174.
- ⑪Nakayama T, Mizoguchi T, Uehara S, Yamashita T, Kawahara I, Kobayashi Y, Moriyama Y, Kurihara S, Sahara N, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N: Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices -A simple method for identifying polarized osteoclasts-. *Bone* 49(6):1331-1339, 2011. doi: 10.1016/j.bone.2011.09.045.
- ⑫Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, Arai A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N: Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Mineral Res*, 26:2978-2990, 2011. doi: 10.1002/jbmr.490.
- ⑬Udagawa N, Yamashita T, Kobayashi Y, Takahashi N: Identification of osteoclasts in culture. *Methods Mol Biol* 690:273-284, 2011. doi: 10.1007/978-1-60761-962-8_18.
- ⑭Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y: Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. *Front Biosci*, 16:21-30, 2011.
- ⑮Koide M, Kinugawa S, Takahashi N, Udagawa N. Osteoclastic bone resorption induced by innate immune responses. *Periodontol* 2000: 54:235-46, 2010. doi: 10.1111/j.1600-0757.2010.00355.x.
- ⑯Takahashi N, Muto A, Arai A, Mizoguchi T: Identification of cell cycle-arrested quiescent osteoclast precursors in vivo. *Adv Exp Med Biol* 658:21-30, 2010. doi: 10.1007/978-1-4419-1050-9_3.

[学会発表] (計 17 件)

①高橋直之 チタンインプラント埋入における生体側のイベント II (招待講演) *Dentistry Quo Vadis?* 東京 2012 年 12 月 8 日

②高橋直之: 破骨細胞の分化を調節する骨芽細胞の新しい役割 (招待講演)、創価大学セミナー 東京 2012 年 11 月 16 日

③高橋直之:破骨細胞の分化と機能の調節機構(招待講演)、九州大学大学院セミナー 福岡 2012年10月25日

④高橋直之 破骨細胞はどのように骨を認識し極性化するか日本歯科理工学会・中部支部夏季セミナー、妙高高原 2012年8月23日

⑤Naoyuki Takahashi Mechanism of inhibitory action of eldcalcitol, an active vitamin D analog, on bone resorption in vivo. Invited lecture, 5th Workshop on Vitamin D, Huston 2012年6月22日

⑥Naoyuki Takahashi Osteoclast precursors in vivo 東京医科歯科大学 GCOE 2012年1月24日

⑦高橋直之:骨吸収の調節機構:鹿児島大学歯学部セミナー, 鹿児島 2012年1月16日

⑧高橋直之:分子メカニズムを知る意味とは(招待講演) Dentistry Quo Vadis? 東京 2011年12月11日

⑨高橋直之:チタンインプラント埋入における生体側のイベント(招待講演)Dentistry Quo Vadis? 東京 2011年12月10日

⑩高橋直之 骨吸収を調節する骨芽細胞の新しい役割 第26回長崎骨粗鬆症研究会 2011年11月30日

⑪Naoyuki Takahashi: Quiescent Osteoclast Precursors. Invited lecture 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting 2011年9月7日

⑫高橋直之 破骨細胞を制御する骨芽細胞の新しい役割 九州大学大学院講義 福岡 2011年5月12日

⑬高橋直之 破骨細胞形成を調節する骨芽細胞の新しい役割. 第10回徳島 Bone Forum, 徳島、2010年12月2日

⑭Naoyuki Takahashi: Noncanonical Wnt signaling and osteoclastogenesis. Invited lecture, Satellite Symposium) 22nd Meeting of Korean Society of Bone Metabolism, Seoul, Korea, November 13, 2010

⑮Naoyuki Takahashi: Characteristics of osteoclast precursors in vivo. (Invited Lecture) 7th Meeting of Bone Biology Forum, Susono, Japan, August, 20, 2010.

⑯高橋直之 破骨細胞前駆細胞の起源と動態. 第31回日本炎症・再生学会ミニシンポジウム、東京、2010年8月6日

⑰高橋直之 骨吸収を調節する RANKL-RANK 系. (招待講演) ランチョンセミナー、第28回日本骨代謝学会学術集会、東京、2010年7月21日

[その他]
ホームページ等
<http://www.mdu.ac.jp/graduate/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 直之 (TAKAHASHI NAOYUKI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号: 90119222

(2)研究分担者

小林 泰浩 (KOBOYASHI YASUHIRO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授
研究者番号: 20264252

溝口 利英 (MIZOGUCHI TOSHIHIDE)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 90329475

二宮 禎 (NINOMIYA TADASHI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・講師
研究者番号: 00360222

(3)連携研究者

宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

中村 浩彰 (NAKAMURA HIROAKI)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 50227930