

令和 2 年 4 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16615

研究課題名（和文）骨肉腫におけるWnt経路の役割および古典的経路と非古典的経路の相互作用の解明

研究課題名（英文）The role of Wnt5a and the interaction of canonical and noncanonical Wnt pathway in osteosarcoma

研究代表者

佐々木 純（Sasaki, Jun）

信州大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20814122

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：Wntは、カテニンを介する古典経路と、それを介さない非古典経路によって骨形成を調節する。非古典経路のリガンドであるWnt5aは様々な細胞において古典経路に対して抑制的に働く。しかし骨芽細胞分化においては、古典経路と非古典経路は互いに協調しあい、非古典経路のリガンドであるWnt5aは、古典経路の共受容体であるLrp5/6の発現を調節することで古典経路を促進し、骨形成に対しても促進的に働くことが報告されている。本研究の結果、骨芽細胞系の悪性腫瘍である骨肉腫においても、Wnt5aは同様の作用を持つことが示唆された。さらにWnt5aの作用が骨肉腫の臨床成績と相関していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、小児に好発する悪性骨腫瘍である骨肉腫における、Wnt5aの新たな作用の存在を検証した。非古典経路のWnt5aは、古典経路に受容な共受容体であるLRP5/6の発現を調節していることが示唆された。そして臨床検体におけるLRP5/6やさらに下流のカテニンの発現と臨床成績とは関連が認められた。この経路は骨肉腫の新たな治療標的となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Wnt ligands regulate bone formation through beta-catenin-dependent canonical and -independent noncanonical Wnt signaling pathways. The two signaling pathways cooperate with each other during osteoblastogenesis, although noncanonical Wnt5a antagonizes the canonical Wnt pathway in various types of cells. Wnt5a-induced noncanonical signals enhance the canonical Wnt pathway through up-regulation of Lrp5/6 to achieve proper bone formation. This study suggested that Wnt5a has the similar function in the human osteosarcoma cell (malignant bone tumor). Furthermore, this study suggested that the function of Wnt5a correlates with clinical outcome of osteosarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：骨肉腫 Wnt経路 Wnt5a LRP5 LRP6

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

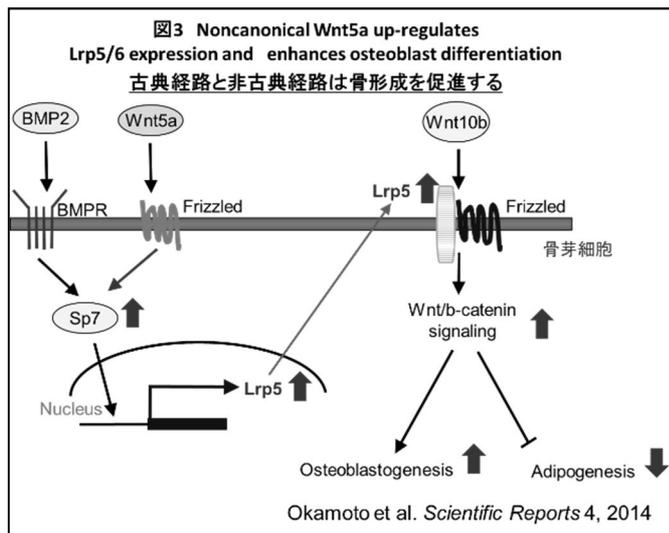
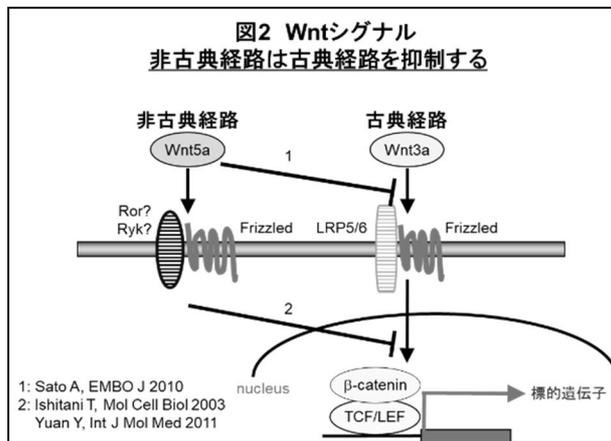
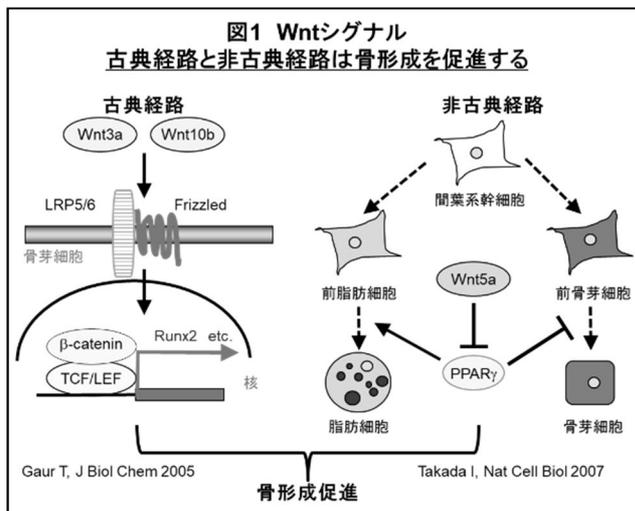
原発性悪性骨腫瘍の中で最も頻度の高い骨肉腫は、異常な類骨および骨形成を特徴とする。骨肉腫は病因・病態の多様性が知られ、新規治療薬の開発が困難な理由とされている。しかし骨芽細胞系細胞由来の悪性腫瘍であることは、全ての骨肉腫に共通する (Carcinogenesis, 2009)。

Wnt シグナルは発生、幹細胞の維持、および成体における恒常性の維持など多様な生命現象に関与し、その破綻は様々な病態をもたらす。Wnt は約 350~400 アミノ酸からなる分泌性糖蛋白質で、ヒトではこれまでに 19 種類が同定されている。その受容体として 7 回膜貫通型受容体である Frizzled が 10 種類、共受容体として 1 回膜貫通型の LRP5(Low-density lipoprotein receptor-related protein 5)、LRP6、Ror1、Ror2、Ryk などが存在する。Wnt シグナルには β カテニンを介する古典的 Wnt 経路と、 β カテニンを介さない非古典的 Wnt 経路とが存在する。

古典的 Wnt 経路のリガンドである Wnt3a や Wnt10b は、受容体である Frizzled と共受容体である LRP5/6 を介して細胞内にシグナルを伝達し、細胞質内の β カテニンの蓄積を促す。蓄積した β カテニンは核内へ移行し、転写因子 TCF/LEF と伴に標的遺伝子の発現を誘導する。骨組織において、Wnt3a や Wnt10b は Runx2 の発現を増加させる。これにより骨芽細胞分化を促進し、骨形成を正に調節する (J Biol Chem, 2005)(図 1 左)。

典型的な非古典的 Wnt 経路のリガンドである Wnt5a は、Frizzled と共受容体 Ror や Ryk を介して細胞内にシグナルを伝達し、間葉系幹細胞の脂肪細胞への分化を促進する PPAR γ の機能を抑制することにより、結果として骨形成を促進する (Nat Cell Biol, 2007)(図 1 右)。様々な臓器、細胞において非古典経路を活性化する Wnt5a は、Wnt3a と受容体との結合に競合的に作用し、古典経路を抑制する (EMBO J, 2010)。また TCF/LEF の転写活性を阻害し、古典経路を抑制する (Mol Cell Biol, 2003) ことも報告されている (図 2)。

しかし研究協力者らは、少なくとも骨芽細胞分化において、非古典的 Wnt5a が Lrp5/6 の発現を調節し、古典的 Wnt 経路に促進的に働くことを見出した (Sci Rep, 2014)(図 3)。骨芽細胞で明らかになった Wnt5a の持つこの作用は、骨芽細胞系細胞由来の悪性腫瘍である骨肉腫においても存在すると推測される。しかし骨肉腫における古典的 Wnt 経路と非古典的 Wnt 経路の相互作用に関する報告は皆無である。



2. 研究の目的

骨肉腫における Wnt 経路の役割と、非古典的経路と古典的経路との相互作用を解明する。骨肉腫臨床検体における Wnt 経路活性と臨床成績との関連を明らかにする。骨肉腫の病態解析を通じて、Wnt 経路が新規治療標的となりうるかを検証する。

3. 研究の方法

骨肉腫における Wnt 経路の役割と、非古典的経路と古典的経路との相互作用
レンチウイルスおよびアデノウイルスを用いて WNT5A をノックダウンすることで、LRP5
や LRP6 の発現がどう変化するかを検証する。

レンチウイルスパーティクルは、SIGMA-ALDRICH 社の MISSION shRNA Library から購入
して使用した。アデノウイルスは Clontech 社の RNAi Target Sequence Selector を用いて shRNA
の配列を決定し、Adeno-X Adenoviral System 3 を用いて作成した。

上記ウイルスを用いてヒト骨肉腫細胞株の WNT5A をノックダウンし、リアルタイム PCR
にて LRP5 および LRP6 の発現の変化を評価した。

骨肉腫臨床検体における Wnt 経路活性と臨床成績との関連

骨肉腫の臨床検体

これまでに当科にて治療を行った骨肉腫症例の臨床検体 28 検体を、mRNA はリアルタイム
PCT で、タンパク WNT5A、LRP5、LRP6 の mRNA の発現を、免疫染色で Wnt5a、Lrp5、
Lrp6、 β カテニンのタンパク発現量を評価した。さらにそれぞれの発現と臨床成績との関連
を評価した。

4. 研究成果

骨肉腫における Wnt 経路の役割と、非古典的経路と古典的経路との相互作用

- レンチウイルスを用いた WNT5A のノックダウン
ヒト骨肉腫細胞株 HOS において、非古典経路のリガンドである WNT5A をノックダ
ウンすると、古典経路に重要な共受容体である LRP5 および LRP6 の発現が抑制された。
- アデノウイルスを用いた WNT5A のノックダウン
ヒト骨肉腫細胞株 HOS、143B において、非古典経路のリガンドである WNT5A をノッ
クダウンすると、古典経路に重要な共受容体である LRP5 および LRP6 の発現が抑制さ
れた。

以上の結果から、過去に報告された骨芽細胞における Wnt5a による Lrp5 および Lrp6 の発
現調節が、骨肉腫細胞株でも同様に起きている可能性が示唆された。

骨肉腫臨床検体における Wnt 経路活性と臨床成績との関連

当科で治療を行った骨肉腫症例の臨床検体 28 検体と、control として正常腸骨海綿骨 1 検体
を使用した。

- リアルタイム PCR による mRNA の評価
リアルタイム PCR により臨床検体における WNT5A、LRP5、LRP6 の発現を評価した。
WNT5A と LRP5、WNT5A と LRP6 の発現にはそれぞれ有意に正の強い相関を認めた。
- 免疫染色によるタンパク発現の評価
臨床検体の Wnt5a、Lrp5、Lrp6、カテニンの免疫染色を行い、組織切片定量解析シス
テム Vectra3 を用いてその発現を定量化した。Wnt5a と Lrp5、Wnt5a と Lrp6 の発現に
は有意な性の相関を認めた。さらに Lrp5 と Lrp6、Lrp5 と カテニン、Lrp6 と カテ
ニンの発現にも有意な正の相関を認めた。臨床成績との関連では、Lrp5 と カテニ
ンの発現が高いと、早期に遠隔転移を起こし、転帰がより悪化することが明らかになっ
た。

以上の結果から、過去に報告された骨芽細胞における Wnt5a による Lrp5 および Lrp6 の発
現調節が、骨肉腫細胞株でも同様に起きている可能性が示唆された。さらに臨床成績との関
連が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----