

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791340  
 研究課題名（和文） Wnt/ $\beta$ カテニンとNotchシグナルのクロストークによる骨芽細胞の分化調節機構  
 研究課題名（英文） Regulation of osteoblast differentiation by interaction between Notch and Wnt/beta-catenin signal  
 研究代表者  
 玉村 禎宏（TAMAMURA YOSHIHIRO）  
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教  
 研究者番号：70431963

研究成果の概要：骨髄由来細胞株を用いた実験から、Notchシグナルは、Notch細胞内ドメインが $\beta$ cateninと複合体を形成し、Wnt/ $\beta$ cateninシグナル標的遺伝子の転写を抑制することにより骨芽細胞分化を抑制することが明らかとなった。さらに骨芽細胞特異的にNotchシグナルを活性化したマウスでは、骨形成が低下し、Wnt/ $\beta$ cateninシグナル標的遺伝子の発現が減少していた。以上の結果より、Notchシグナルは、Wnt/ $\beta$ cateninシグナルを抑制することにより、骨芽細胞分化を調節する役割を持つことが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：骨芽細胞、Notch、Wnt、 $\beta$ catenin

## 1. 研究開始当初の背景

Notchシグナルは、器官発生や細胞運命決定に重要であるが、骨芽細胞分化における役割については不明な点が多い。一方、Wnt/ $\beta$ cateninシグナルは、遺伝子改変マウスを用いた研究により、骨形成における重要性が明らかとなっている。以前よりこれら2つのシグナル伝達経路の相互作用が体節形成や表皮基底細胞癌発生において指摘されている

が、骨芽細胞分化における関連性についての報告はない。

## 2. 研究の目的

本研究では、Notchシグナルの骨芽細胞分化に対する役割をWnt/ $\beta$ cateninシグナルとの相互作用から明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

Tet-off システムにより Notch 細胞内ドメイン(NICD)を発現する骨髄由来細胞株 ST-2 細胞に Wnt3a conditioned medium(W3a)を添加し、Notch シグナルおよび Wnt/ $\beta$  catenin シグナルを過剰発現させた。この細胞培養系において、ALP 染色を行い、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を Real-time PCR により検討した。

次に、上述した細胞培養系において、免疫沈降を行い、NICD と  $\beta$  catenin の複合体形成について検討した。また、 $\beta$  catenin の deletion mutant を作成し、 $\beta$  catenin 分子内の NICD 結合部位を決定した。さらに、作成した deletion mutant をアデノウイルスを用いて過剰発現し、Notch シグナルと Wnt/ $\beta$  catenin シグナルの相互作用による骨芽細胞分化調節機構について検討した。

最後に、2.3kb の I 型コラーゲンプロモーターの制御下に NICD を発現するトランスジェニックマウスを作成し、in vivo における Notch シグナルの骨芽細胞分化に対する役割について検討した。

### 4. 研究成果

(1)骨髄由来細胞株の骨芽細胞分化に対する Notch シグナルの作用について

Tet-off システムで NICD を過剰発現できる ST2 細胞に W3a を添加し、6 日後に ALP 染色を行なった。W3a 添加により ALP 染色が亢進したが、NICD を共発現させると ALP 染色の亢進が抑制された (図 1A)。またこの時の骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を real-time PCR で調べると、W3a 添加により ALP, Osteocalcin(Osc), Runx2 遺伝子の発現が上昇したが、NICD の共発現によりこれらの遺伝子発現が抑制された (図 1B)。以上の結果より Notch シグナルは Wnt/ $\beta$  catenin シグナルの骨芽細胞分化促進作用を抑制することが判明した。

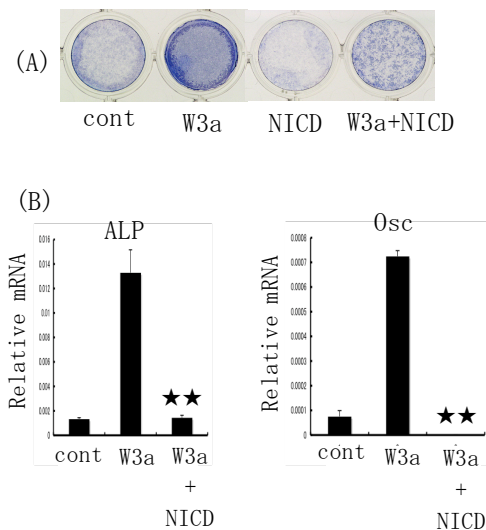


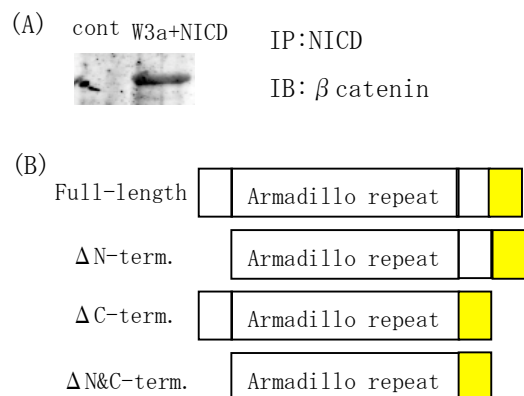
図 1、Notch および Wnt/ $\beta$  catenin シグナルの骨芽細胞分化に対する作用

(2)Notchシグナルと Wnt/ $\beta$  cateninシグナルの相互作用による骨芽細胞分化調節機構について

①NICD と  $\beta$  catenin の複合体形成について

培養 3 日目の ST-2 細胞内の  $\beta$  catenin タンパク量を Western blotting により検討した。W3a 添加群では  $\beta$  catenin 量がやや増大したが、NICD を共発現させても W3a 添加群とほとんど差は認められなかった。さらに抗  $\beta$  catenin 抗体により免疫細胞染色を行ったところ、コントロール群では細胞内にユビキタスに  $\beta$  catenin 発現が認められ、W3a 添加により  $\beta$  catenin の核内への集積がみられたが、NICD を共発現させても  $\beta$  catenin の核内の局在に変化は認められなかった。以上の結果より、Notch シグナルは  $\beta$  catenin の分解および核内への局在に影響を与えないことが示唆された。

次に、ショウジョウバエでは、Wnt/ $\beta$  catenin シグナルの調節機構の一つとして  $\beta$  catenin と NICD の複合体形成が報告されているので、ST-2 細胞でも同様の検討を行なった。ST-2 細胞に W3a 添加と NICD を過剰発現し免疫沈降を行ったところ、複合体形成が認められた (図 2A)。さらに  $\beta$  catenin のどの部位に結合するか検討した。 $\beta$  catenin は、リン酸化およびユビキチン化を受ける N 末端、LEF/TCF やカドヘリンと結合する armadillo repeat,  $\beta$  catenin の転写活性に関与する C 末端から成る。これらの部位を欠損した  $\beta$  catenin mutant に HAtag (■) を付与した DNA construct を作製し、Flag-NICD と免疫沈降を行なったところ、full-length および N 末端が欠如した  $\beta$  catenin との複合体形成が認められた (図 2B)。以上の結果より NICD はの C 末端部を介して複合体を形成することが示唆された。



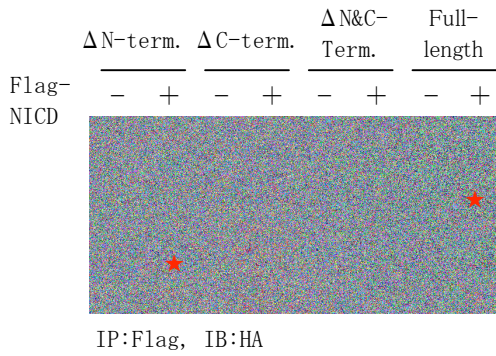


図2、NICDとβcateninの結合について

②骨芽細胞分化におけるNICDとβcateninの複合体形成の重要性について

次にβcateninのC末端部への結合がNICDによるWnt/βcateninシグナルの骨芽細胞分化作用の調節に必要であるか検討した。N末端またはNC両末端を欠如するβcatenin mutantを発現するアデノウイルスをST-2細胞に感染させ、ALP遺伝子の発現をreal-time PCRによって検討した。NICDと共発現させると、N末端欠如したβcateninによるALP遺伝子発現の上昇は抑制されたが、NC両末端を欠如したβcateninによるALP遺伝子発現の上昇は抑制されなかった(図3)。以上の結果より、NICDによるWnt/βcateninシグナルの骨芽細胞分化作用の抑制には、βcateninのC末端部への相互作用が必要であることが解った。

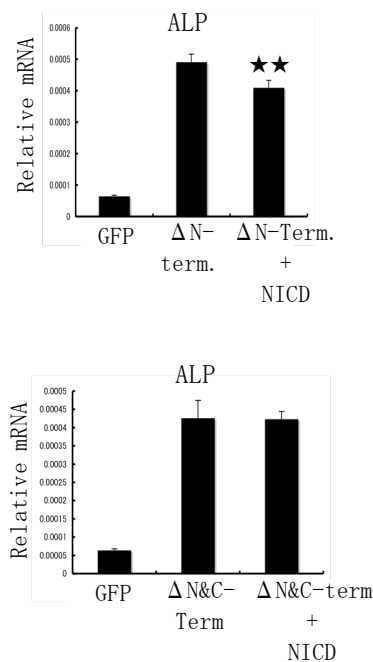


図3、NotchおよびWnt/βcateninシグナルの相互作用による骨芽細胞分化

③Wnt/βcateninシグナル標的遺伝子発現に対するNotchシグナルの作用について

NICD/βcatenin複合体が、Wnt/βcateninシグナルもしくはNotchシグナルの標的遺伝子のプロモーター上に移行しているか調べるためにRe-ChIP assayを行なった。W3a添加とNICDを過剰発現させた群において、Wnt/βcateninシグナルの標的遺伝子であるAxin2プロモーター上にNICD/b-cat複合体が移行していることが示唆された。Notchシグナルの標的遺伝子であるHey1, Hes1プロモーター上にNICD/βcatenin複合体は存在しなかった(図4A)。さらにそれぞれの標的遺伝子の発現を調べたところ、NICDの共発現によりAxin2発現は抑制されたが、Hey1発現に差は認められなかった。以上の結果より、NotchシグナルによるWnt/βcateninシグナルの抑制は、NICD/βcatenin複合体がWnt/βcateninシグナルの標的遺伝子のプロモーター上に移行し、何らかの機構によって転写を抑制することによって調節されることが示唆された。

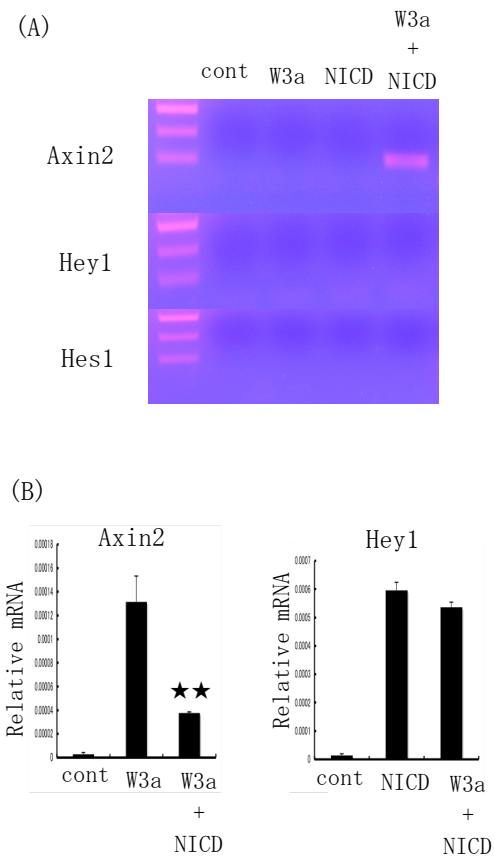


図4、NotchシグナルのWnt/βcateninシグナル標的遺伝子に対する作用

### (3)骨形成に対する Notch シグナルの作用について

骨芽細胞特異的に Notch シグナルを活性化させたトランスジェニックマウス(TG)は、野生型マウス(WT)と比較して、低身長、低体重であった。軟 X 線像や組織像および pQCT による骨形態計測から、TG マウスでは海綿骨と皮質骨の骨形成の低下が認められた。頭蓋骨や長管骨での骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を real-time PCR により調べると、ALP, Osteopontin, Osteocalcin の発現が低下していた(図5)。さらに興味深いことに Wnt/ $\beta$  catenin シグナルの標的遺伝子である Dickkopf1(Dkk1)や TCF7 の発現低下も認められた(図5)。また in situ hybridization 法による解析の結果、TG マウス長管骨では Type I collagen, Osteopontin の発現は認められたが、Osteocalcin の発現は認められなかった。以上の結果から、in vivo においても Notch シグナルは Wnt/ $\beta$  catenin シグナルを抑制することにより骨芽細胞分化を抑制する作用を持つことが示唆された。現在トランスジェニックマウスは詳細に解析中である。

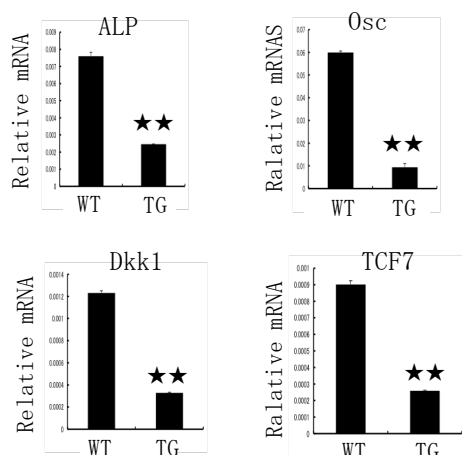


図5、Col1-NICD TG マウス骨組織における遺伝子発現

本研究により Notch シグナルは、Wnt/ $\beta$  catenin シグナルによる骨芽細胞分化促進作用を抑制することが明らかとなった。この抑制作用は、NICD と  $\beta$  catenin の複合体形成を介して標的遺伝子の転写レベルで行われることが示唆され、現在盛んに研究されている  $\beta$  catenin のユビキチン化や核移行の抑制と違ったユニークな Wnt/ $\beta$  catenin シグナルの調節機構であると考えられる。

### 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3件)

- ① 勝部憲一、坂本啓、玉村禎宏 (他1名)、Role of CCN3, a vertebrate specific gene family, in development, *Development, growth and differentiation*, 51, 55-67, 2009、査読有
- ② 坂本啓、玉村禎宏、勝部憲一 (他1名)、Zfp64 participates in Notch signaling and regulates differentiation in mesenchymal cells, *Journal of cell science*, 121, 1613-23, 2008、査読有
- ③ Nagayama M., Iwamoto M., Hargett A., (他8名、5番目)、Wnt/beta-catenin signaling regulates cranial basedevelopment and growth, *Journal of dental research*, 87, 244-9, 2008、査読有

[学会発表] (計1件)

- ① 玉村 禎宏、Notch シグナルと Wnt/ $\beta$  カテニンシグナルの相互作用による骨芽細胞分化調節機構、第25回日本骨代謝学会、2007年7月19日、大阪国際会議場

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

玉村 禎宏 (TAMAMURA YOSHIHIRO)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教  
研究者番号：70431963

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書