

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18955

研究課題名（和文）WntアンタゴニストSfrp5の骨量増加機構の解明

研究課題名（英文）The role of the WNT antagonist Sfrp5 on bone formation

研究代表者

村上 康平（Murakami, Kohei）

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：60791837

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：WntアンタゴニストであるSecreted frizzled-related protein 5(Sfrp5)が骨芽細胞の分化を促進することを発見した。本課題では、その機序を解明し、骨粗鬆症治療に応用するための基盤を築くことを目的とした。

Sfrp5を添加した初代培養骨芽細胞でRNAシーケンス解析を実施し、Sfrp5によって変動するシグナル経路Aを同定し、シグナル経路Aの阻害薬によってSfrp5の作用が解消されることを確かめた。さらに、共免疫沈降法でSfrp5と相互作用する候補蛋白質を同定した。

本課題によって、「Wntアンタゴニストが骨形成を促進する」という全く新しい機序の一部が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨は新たに作られること（骨形成）と破壊されること（骨吸収）のバランスで維持される。このバランスの乱れは、骨粗鬆症に結び付く。現在、日本には1280万人の骨粗鬆症患者がいると推定されており、健康寿命の主要なボトルネックの一つである。そのため、骨粗鬆症に対するより良い治療法の開発は喫緊の課題である。

Wntシグナルは、骨形成を促進するシグナルとして知られている。一方、申請者が着目するSfrp5はWntアンタゴニストであるにもかかわらず、骨形成を促進する。これは、今までの既成概念を覆す発見であり、この機序を明らかにした本課題の成果は、骨粗鬆症に対する新たな治療標的の発見に発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：I have discovered that the Wnt antagonist Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) promotes osteoblast differentiation. In this project, I aimed to elucidate its mechanism. First, I performed RNA-seq on primary osteoblasts with Sfrp5 treatment and identified the signaling pathway A that was activated by Sfrp5 treatment. Subsequently, I confirmed that its inhibitor eliminates the effect of Sfrp5 on primary osteoblasts. Further, we identified candidate proteins that interact with Sfrp5 by co-immunoprecipitation experiments. This study has revealed a new mechanism by which a Wnt antagonist promote bone formation.

研究分野：骨代謝

キーワード：骨代謝 WNTシグナル 骨芽細胞 Sfrp5 骨形成

1. 研究開始当初の背景

骨は新たに作られること(骨形成)と壊されること(骨吸収)で維持される。このバランスが乱れると、骨粗鬆症になる。現在日本には1280万人の骨粗鬆症患者がいると推定されており、健康寿命の主要なボトルネックになっている(骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2015年版)。さらに、骨粗鬆症は骨折を引き起こすことで生活の質を低下させるだけでなく、長期的には骨折の有無に関わらず、死亡リスクをも上昇させる(*J Bone Miner Res*, 2007)。したがって、骨粗鬆症の分子機序の解明とより良い治療法の開発は喫緊の課題である。

Wntシグナルは、骨の発生や恒常性に関わるシグナルである。骨形成を担う骨芽細胞でWntシグナルが活性化すると、分化や石灰化が促進する。逆に、Wntアンタゴニストは、骨芽細胞の分化や石灰化を抑制することで、骨形成を抑制する。そのため、骨粗鬆症の治療標的としてスクレロスタチンなどWntアンタゴニストに関する研究が盛んに進められている。

予備実験を経て、申請者はSecreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5)に着目した。Sfrp5は脂肪細胞が分泌するアディポカインであり、Wntリガンドと結合してWntシグナルのアンタゴニストとして働く(*J Clin Invest*, 2012)。特に炎症促進作用のあるWnt5aと拮抗するため、抗炎症作用をもつ(*Science*, 2010)。申請者はSfrp5欠損マウスの骨組織を解析し、骨量が減少することを発見した。このとき、骨形成を担う骨芽細胞が減少していた。さらに、*in vitro*でもSfrp5は、骨芽細胞の分化を促進した。10種類以上知られているWntアンタゴニストの中で、骨芽細胞の分化を促進するものは一つも報告されていなかった。

2. 研究の目的

Wntシグナルは、骨量を増加させるシグナルとして知られている。そのため、WntアンタゴニストであるSclerostinやDkk1を欠損したマウスではWntシグナルが亢進し、骨量が増加する(*J Bone Miner Res*, 2008; *J Bone Miner Res*, 2009)。一方、申請者が着目するSfrp5はWntアンタゴニストであるにもかかわらず、Sfrp5欠損マウスの骨量は減少する。これは、今までの既成概念を覆す発見であり、この機序を明らかにすることができれば、骨粗鬆症に対する未知の治療標的を明らかにできる可能性がある。本課題の目的は、WntアンタゴニストであるSfrp5が、骨芽細胞の分化を促進する機序を解明することとした。

また、Sfrp5欠損マウスでは骨吸収を担う破骨細胞の数が有意に増加することを確かめている。この結果と一致して、マウス骨髄マクロファージを破骨細胞に分化誘導する培養系にSfrp5を添加すると破骨細胞形成が低下する。つまり、Sfrp5は骨芽細胞を分化させて骨形成を促進するとともに、破骨細胞の分化を抑制して骨吸収を負に制御する世界初の薬剤になる可能性がある。本課題では、Sfrp5の過剰発現モデルマウスを用いて生体での作用を確かめて、骨粗鬆症治療薬としての可能性を探索した。

3. 研究の方法

(1) Sfrp5によって活性化する骨芽細胞のシグナル経路の同定

マウス頭頂骨由来の初代培養骨芽細胞を①分化誘導しないもの、②分化誘導したもの、③分化誘導して、Sfrp5を添加したもの、の3条件で培養した。5日間培養後、total RNAを精製し、RNAシーケンス解析を行った。さらに、パスウェイ解析を行って、Sfrp5の添加によって有意に変動するシグナル経路を探索した。また、同定したシグナル経路に対する阻害薬が、Sfrp5の骨芽細胞分化促進作用に与える影響を調べた。同定したシグナル経路で必須の転写因子に対するshRNAを発現する組換えアデノウイルスを構築し、転写因子のノックダウンがSfrp5の骨芽細胞分化促進作用に与える影響を検討した。

(2) Sfrp5と相互作用する因子の同定

Sfrp5のN末端側に分泌シグナルとHalo-Tag配列を挿入したHalo-Sfrp5を発現する組換えアデノウイルスを構築した。対照として、Sfrp5のみ、Halo-Tagのみを発現する組換えアデノウイルスも構築した。これらの組換えアデノウイルスを初代培養骨芽細胞に感染させて、BMP-2で分化誘導を行った。培養上清を採取し、Halo-Tagに対するプルダウンアッセイを行った。集めた蛋白質をSDS-PAGEに供し、銀染色でHalo-Sfrp5でのみ検出されるバンドを切り出した。切り出したバンドは消化した後、LC-MS/MS解析を実施し、MASCOT解析で蛋白質を同定した。

(3) 古典的Wnt経路に対するSfrp5の機能解析

Sfrp5はWntアンタゴニストであるため、Wntシグナルに対するSfrp5の影響を確認する必要がある。Axin2は古典的Wnt経路の標的遺伝子で、Wnt経路が活性化した細胞で発現が増加する。Axin2^{cre/ERT2}マウスをレポーターマウス(CAG-tdTomato)、さらにSfrp5^{cre}マウスと交配させ、

Axin2^{cre/ERT2}; tdTomato; Sfrp5^{-/-}マウスを作製した。このマウスにタモキシフェンを投与すると、Axin2 発現細胞は cre リコンビナーゼを発現し、赤色蛍光を呈する。8 週齢のマウスにタモキシフェンを投与後、大腿骨の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

(4) Sfrp5 の骨量増加効果の検討

CAG プロモーター下で Sfrp5 を過剰発現するトランスジェニックマウス(Sfrp5-Tg)を作製した。このマウスの大腿骨をマイクロ CT で撮影し、骨量を解析した。

4. 研究成果

(1) Sfrp5 によって活性化する骨芽細胞のシグナル経路の同定

初代培養骨芽細胞の RNA シーケンス解析の結果、Sfrp5 は骨芽細胞の分化マーカー遺伝子の発現を有意に上げることがわかった。つまり、Sfrp5 は、遺伝子レベルでも骨芽細胞の分化を促進することが確かめられた。さらに、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析を行ったところ、Sfrp5 の添加によって活性化するシグナルを同定した(図 1; 現在も実験中で未報告あるため“シグナル経路 A”とする)。シグナル経路 A は、骨代謝に関連する重要なシグナルではあるが、Wnt シグナルではない。実際に、Sfrp5 の添加によって、骨芽細胞においてシグナル A の標的遺伝子の発現を上げることを定量的 RT-PCR で確かめた。一方、古典的 Wnt シグナルの標的遺伝子である Axin2、Dkk1、Lef1 の発現は、Sfrp5 の添加によって有意な変動はみられなかった。

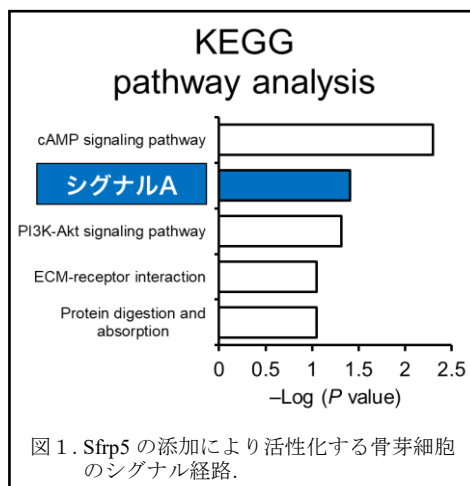


図 1. Sfrp5 の添加により活性化する骨芽細胞のシグナル経路。

続いて、Sfrp5 がシグナル A 依存的に骨芽細胞の分化を促進していることを確かめるために、シグナル経路 A の転写因子に対する shRNA を発現する組換えアデノウイルスを構築した。LacZ に対する shRNA を発現させた初代培養骨芽細胞では、組換え Sfrp5 の添加によって骨芽細胞の分化が促進した。一方、シグナル A の転写因子に対する shRNA を感染させた初代培養骨芽細胞では、Sfrp5 による骨芽細胞の分化促進作用が消失した(図 2)。さらに阻害薬を使った実験も行った。溶媒 DMSO を処置した骨芽細胞では、Sfrp5 によって骨芽細胞の分化が促進したが、一方、シグナル A に対する阻害薬を処置した初代培養骨芽細胞では Sfrp5 による分化促進作用が消失した。これらの結果から、Sfrp5 はシグナル A 依存的に骨芽細胞の分化を促進すると考えられた。

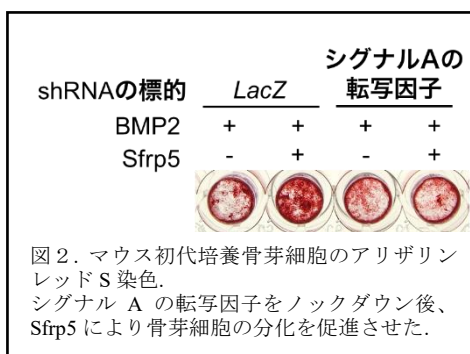


図 2. マウス初代培養骨芽細胞のアリザリンレッド S 染色。シグナル A の転写因子をノックダウン後、Sfrp5 により骨芽細胞の分化を促進させた。

ただし、Sfrp5 がどのようにシグナル A を活性化させるのかは、不明なままである。そのため、この課題を継続して、Sfrp5 とシグナル A との関連性の探索を続ける予定である。

(2) Sfrp5 と相互作用する因子の同定

プルダウンアッセイを行い、Halo-Sfrp5 と結合する蛋白質を SDS-PAGE に供した。その結果、Halo-Tag のみ、または Sfrp5 のみを発現する組換えアデノウイルスでは検出されず、Halo-Sfrp5 のレーンでのみ検出されるバンドが複数確認された(図 3; SDS-PAGE 後に銀染色を行った結果)。これらを切り出し、LC-MS/MS 解析に供した。得られたペプチド配列から MASCOT 解析を実施したところ、120 個のマウスの蛋白質がヒットした。

この中で細胞外の蛋白質は 36 種類あり、Identification probability が 100%の蛋白質に絞ったところ、残りは 21 個となった。この中には、Sfrp5 と相互作用することが知られており、骨芽細胞が大量に発現する Wnt5a が含まれており、本実験がワークしていることが確かめられた。一方で、この中に(1)で同定したシグナル A のリガンドは含まれていなかった。そのため、細胞外で Sfrp5 と相互作用する因子が、細胞内でどのようにシグナル A を活性化するのかは不明なままである。この課題については、継続して研究を行っている。

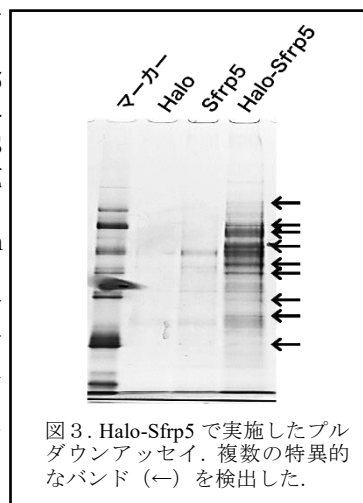


図 3. Halo-Sfrp5 で実施したプルダウンアッセイ。複数の特異的なバンド(←)を検出した。

(3) 古典的 Wnt 経路に対する Sfrp5 の機能解析

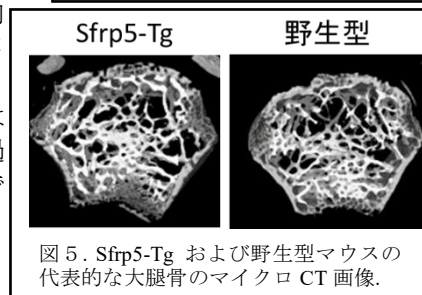
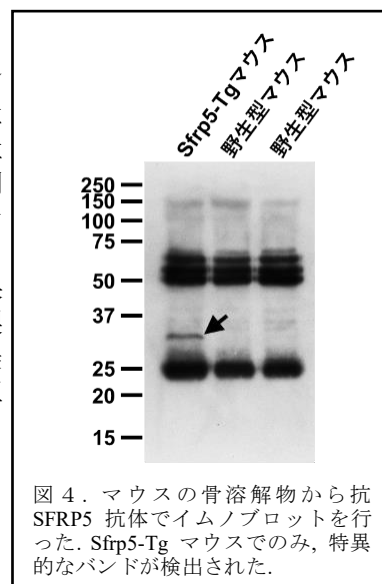
古典的 Wnt シグナルは、骨形成の促進に重要なシグナルである。全身的な Sfrp5 欠損が、骨における古典的 Wnt シグナルに与える影響を調べるために、Sfrp5 欠損マウスの骨における古典的 Wnt シグナル標的遺伝子 Axin2 の発現を解析した。対照マウス (Axin2^{cre/ERT2}; tdTomato; Sfrp5^{+/+}) と比較して、Axin2^{cre/ERT2}; tdTomato; Sfrp5^{-/-}では、顕著に Axin2 陽性骨芽細胞の数が減少していた。Sfrp5 は脂肪に発現するが、骨組織ではほとんど発現しない。したがって、脂肪組織が Sfrp5 を介して骨の Wnt シグナルを制御していることが示唆された。

(4) Sfrp5 の骨量増加効果の検討

Sfrp5-Tg マウスの骨組織のライセートを調整し、ウェスタンブロット法で Sfrp5 の発現を調べたところ、野生型マウスでは骨に Sfrp5 は発現していなかったが、Sfrp5-Tg では骨組織では Sfrp5 が発現していることを確かめた (図 4)。この Sfrp5 過剰発現マウスの大腿骨をマイクロ CT で調べたところ、野生型マウスと比較して海綿骨量に有意差はつかなかった (図 5)。

ここまでの *in vivo* および *ex vivo* の実験結果と矛盾する結果となったが、この原因としては以下のことが考えられた。作製したトランスジェニックマウスでは胎仔期から継続して高濃度の Sfrp5 に暴露していることになる。Sfrp5 は Wnt5a と相互作用し、Wnt5a のアンタゴニストとして機能することが報告されている (Science, 2010)。Wnt5a は、骨芽細胞の分化に必要な因子であり (Sci Rep, 2014)、Wnt5a のヘテロ欠損マウスでは、野生型マウスよりも骨量が減少することがわかっている (Nat Med, 2012)。おそらく、Sfrp5-Tg マウスでは、高濃度の Sfrp5 によって Wnt5a の機能が阻害されて骨量が減少傾向にあり、Sfrp5 の骨量増加作用が打ち消されたものと推測された。

そこで、次の実験では、組換えアデノウイルス、または組換えアデノ随伴ウイルスを用いて、後天的に Sfrp5 を過剰発現させて、骨量の変動が見られるかを確かめる予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kohei Murakami, He Zhifeng, Takako Suzuki, Yasuhiro Kobayashi, Yukio Nakamura	4. 巻 37
2. 論文標題 The Shisa3 knockout mouse exhibits normal bone phenotype	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 967-975
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-019-01014-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mengyu Yang, Atsushi Arai, Nobuyuki Udagawa, Lijuan Zhao, Daisuke Nishida, Kohei Murakami, Toru Hiraga, Ryoko Takao Kawabata, Koichi Matsuo, Toshihisa Komori, Yasuhiro Kobayashi, Naoyuki Takahashi, Yukihiko Isogai, Toshinori Ishizuya, Akira Yamaguchi, Toshihide Mizoguchi	4. 巻 34
2. 論文標題 Parathyroid Hormone Shifts Cell Fate of a Leptin Receptor Marked Stromal Population from Adipogenic to Osteoblastic Lineage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Research	6. 最初と最後の頁 1952-1963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbmr.3811	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shingo Maeda, Kohei Murakami, Akiko Inoue, Tomohiro Yonezawa, Naoaki Matsuki	4. 巻 7
2. 論文標題 CCR4 Blockade Depletes Regulatory T Cells and Prolongs Survival in a Canine Model of Bladder Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer immunology research	6. 最初と最後の頁 1175-1187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2326-6066.CIR-18-0751	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masanori Koide, Teruhito Yamashita, Kohei Murakami, Shunsuke Uehara, Keigo Nakamura, Midori Nakamura, Mai Matsushita, Toshiaki Ara, Hisataka Yasuda, Josef M Penninger, Naoyuki Takahashi, Nobuyuki Udagawa, Yasuhiro Kobayashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Sclerostin expression in trabecular bone is downregulated by osteoclasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13751
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70817-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kohei Murakami, Shingo Kikugawa, Shoji Seki, Hidetomi Terai, Takako Suzuki, Masaki Nakano, Jun Takahashi, Yukio Nakamura	4. 巻 in press
2. 論文標題 Exome Sequencing Reveals De Novo Variants in Congenital Scoliosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Genetics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0041-1726282	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 村上 康平, 宇田川 信之, 上原 俊介, 小出 雅則, 山下 照仁, 小林 泰浩
2. 発表標題 WntアンタゴニストSfrp5は破骨細胞の分化を抑制し、骨芽細胞の分化を促進する
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 村上康平	4. 発行年 2019年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 17-23
3. 書名 リウマチ科	

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------