

## 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 24 年 4 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791799

研究課題名（和文）Wnt シグナルによる間葉系幹細胞の細胞運命決定機構の解析

研究課題名（英文）The roles of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling on differentiation of mesenchymal progenitor cells.

研究代表者

内藤 昌子 (NAITO MASAKO)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：40436803

研究成果の概要（和文）：本研究では、間葉系前駆細胞の初期分化における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性変動とその役割について解析をした。Dexamethasone (Dex) による脂肪細胞分化誘導時 Wnt アンタゴニストである Dkk1 の発現を誘導し、 $\beta$ -catenin タンパク質の発現を抑制した。 $\beta$ -catenin shRNA を用いて機能を阻害すると、脂肪細胞分化が促進された。これらの結果から、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは間葉系前駆細胞の脂肪細胞分化抑制作用を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined the expression and activity of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway molecules in mesenchymal progenitor cells (ROB-C26). Immunocytochemical analysis and gene-silencing experiments revealed that the inhibition of  $\beta$ -catenin expression by Dex promotes the differentiation of mesenchymal progenitor cells into adipocytes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：間葉系前駆細胞 脂肪細胞 骨芽細胞 分化

## 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞など間葉系組織を形成する細胞への分化を遂げる。その分化制御機構に関して、それぞれの細胞系譜への分化に必要な転写因子が数多く同定されてきた。たとえば、脂肪細胞分化に関与する転写因子として、PPAR $\gamma$ ,

CEBPs など、骨芽細胞分化に必要な転写因子群として Runx2, Dlx5, Osterix などが挙げられる。これらの転写因子の発現は様々な局所性液性因子(TGF $\beta$ , BMPs, Wnt など)や全身性液性因子(Glucocorticoid, Insulin など)により発現や活性制御を受ける。

Glucocorticoid (GCs)は骨芽細胞と脂肪細胞分化を制御することが知られている。GC は、細胞の種類や、GC の濃度あるいは投与期間などにより、骨芽細胞分化に促進的な作用と抑制的な作用を示すことが報告されている。ヒトまたはげっ歯類の細胞株において、GC は骨芽細胞特異的のマーカ―遺伝子の発現を増加させ、骨芽細胞分化や石灰化を促進することが報告されている。一方、生体において長期的な GC 投与により、骨粗鬆症を引き起こすことが報告されている。GC による骨形成に抑制的な作用として、骨芽細胞の増殖抑制と間葉系前駆細胞が骨芽細胞の代わりに脂肪細胞へ分化することが考えられている。

Wnt- $\beta$ -catenin 経路は、リガンドとレセプターの結合により、細胞内シグナル伝達分子である  $\beta$ -catenin のリン酸化が抑制され、核内に移行する。核内に移行した  $\beta$ -catenin は、転写因子 TCF/LEF と結合し標的遺伝子の発現を制御する。一方で、Wnt リガンド非存在下またはアンタゴニスト存在下では、細胞質内の  $\beta$ -catenin は GSK3 $\beta$  によりリン酸化を受け、その後分解されるため、この経路が遮断される。

近年、常染色体劣性遺伝の骨粗鬆症をともなう偽神経膠腫症の原因遺伝子として、LRP5 の機能喪失型突然変異が同定された。Wnt10b のトランスジェニックマウスにおいて、脂肪細胞の分化抑制と骨芽細胞の分化促進がもたらされることが報告された。このような報告から Wnt シグナルは、間葉系幹細胞の分化運命決定機構に重要な役割を果たしていることが推察される。しかしながら、いかにして Wnt シグナルの活性制御がなされるのか、また骨芽細胞と脂肪細胞分化の際にどのように機能するのか多くのことは明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、間葉系前駆細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin の活性制御機構と機能を明らかにすることを目的とし、ラット頭蓋冠由来間葉系前駆細胞 (ROB-C26(C26)) を用いて Wnt リガンド刺激を与え、骨芽細胞分化と脂肪細胞分化に及ぼす影響を解析した。また BMP 刺激による骨芽細胞分化 Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路の活性変動を解析した。

次に、GC による間葉系前駆細胞分化制御における Wnt/ $\beta$ -catenin の役割を明らかにすることを目的とし、C26 細胞を GC アナログである Dexamethasone (Dex)による刺激を与え Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル分子の発現と活性変動を観察した。C26 細胞は Dex 刺激に応じて初

期の骨芽細胞分化と脂肪細胞分化が誘導されることが報告されている。そこで、Dex 誘導性の脂肪細胞分化と初期の骨芽細胞分化における  $\beta$ -catenin の機能を明らかにすることを目的とし  $\beta$ -catenin の機能阻害実験を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 骨芽細胞分化過程の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの発現および活性変動

① Wnt リガンドによる骨芽細胞分化制御機構を明らかにするため、Wnt3a(100ng/ml)存在下または非存在下で C26 細胞を培養し初期の骨芽細胞マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)染色を行った。また *p*-nitrophenyl-phosphate 基質を用いて ALP 活性変化を解析した。RT-PCR 法により骨芽細胞分化に関与する転写因子 (Runx2, Msx2, Osterix, Dlx5)と脂肪細胞分化に関与する転写因子 (C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , PPAR $\gamma$ ) の mRNA 発現レベルの変化を解析した。

② 骨芽細胞分化過程の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナル経路の変動を解析するため、C26 細胞を BMP-6 (100ng/ml)存在下あるいは非存在下で 18日間培養を行った。骨芽細胞分化の評価は、初期の骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ(ALP)染色を行った。免疫染色により、 $\beta$ -catenin の発現および局在変化を解析した。TCF/LEF 転写活性の変化を解析するため、TCF/LEF 配列制御下でレポーター遺伝子 (GFP) が発現するシステム (TOPGFP レポータープラスミドベクター) を C26 細胞に導入した。これらの細胞を BMP-6 存在下または非存在下で培養し GFP の発現を免疫染色により解析することで、TCF/LEF 転写活性の変化を評価した。

(2) 脂肪細胞分化過程の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの発現および活性変動

① C26 細胞を Dexamethasone (Dex) ( $10^{-7}$ M) 存在下あるいは非存在下で 18日間培養を行った。解析は RT-PCR 法により Wnt アンタゴニスト(Dkk1, WIF1),  $\beta$ -catenin, Axin2, Wnt リガンド(Wnt3a, Wnt10b) の mRNA の発現変化を解析した。Cycloheximide (CHX)の前処理を行い、Dex 刺激を 24 時間与え RT-PCR 法により Dkk1 遺伝子の発現を解析した。Dex 刺激を 24 時間与え DNA を回収し、GC Receptor (GR)抗体を用いて ChIP 解析を行った。次に、Western blotting 法により GSK3 $\beta$  と  $\beta$ -catenin のリン酸化と発現量を解析した。免疫染色により、脂肪細胞特異的転写因子 PPAR gamma の発現と  $\beta$ -catenin の発現および局在変化を

解析した。

② TCF/LEF 転写活性を調べるため、TOPGFP プラスミドベクターを C26 細胞に導入し、GFP 抗体を用いた免疫染色を行い解析した。また GSK3 $\beta$  による制御機構を検討するため、Dex ( $10^{-7}$ M) に GSK3 $\beta$  阻害剤(LiCl 10mM)を培地に添加し 18 日間培養した。脂肪細胞分化の評価は Oil Red O による脂肪染色と、PPAR $\gamma$  抗体を用いた免疫染色を行った。

③  $\beta$ -catenin と Axin2 の short hairpin RNA(shRNA)を C26 細胞に導入し、Dex ( $10^{-7}$ M)存在下あるいは非存在下で 18 日間培養を行った。初期の骨芽細胞分化の指標として ALP 染色を、脂肪細胞分化の指標として Oil Red O 脂肪染色を行った。次に、RT-PCR 法による脂肪細胞マーカーの遺伝子発現解析と免疫染色によるタンパク発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 骨芽細胞分化過程の Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの発現および活性変動

Wnt リガンドによる間葉系前駆細胞の分化制御機構を解析するため、C26 細胞を Wnt3a(100ng/ml)存在下または非存在下で 3 日間培養した。その結果 ALP 陽性細胞および活性に有意な増加が認められた。また GSK3 $\beta$  阻害剤(LiCl 10mM)を用いて同様に解析したところ、ALP 活性に有意な増加が認められた。RT-PCR 解析により、Wnt3a は骨芽細胞分化に関与する転写因子(Runx2, Dlx5, Msx2, Osterix)の発現に変化は認められなかった。また、脂肪細胞分化に関与する転写因子(C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ )の発現は、C26 細胞で低いレベルで確認されたが、Wnt3a による発現変化は認められなかった。PPAR $\gamma$  の発現はいずれも検出できなかった。これらの結果から、上記転写因子の発現変化をともなわず ALP の発現を誘導することが考えられた。また、Wnt3a(100ng/ml)存在下または非存在下で C26 細胞を 18 日間培養しても ALP 染色性の増加は認められるが石灰化など骨芽細胞の最終分化を示す特徴は観察されなかったことから、初期の骨芽細胞分化に関与することが考えられた。

一方、BMP-6 刺激を C26 細胞に与えると、ALP 陽性骨芽細胞分化と、 $\beta$ -catenin の染色性を亢進させた。TOP-GFP レポーターシステムによって、BMP-6 は TCF/LEF 転写活性を促進することが観察された。これらのことから、BMP シグナルによる骨芽細胞分化過程において、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化され分化に関与していることが示唆された。

##### (2) Dex 誘導性脂肪細胞分化における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの発現および活性変動

Dex は Wnt アンタゴニストである Dkk1 と WIF1 の発現を誘導することが観察された。細胞内シグナル分子である Axin2 mRNA の発現は Dex 刺激後初期に発現が誘導される。一方 Wnt リガンドや  $\beta$ -catenin mRNA の発現レベルに変化は認められなかった。CHX 処理を行うことで新規におけるタンパク質合成を阻害しても Dex により Dkk1 の発現誘導が維持されていることから、Dex は新規のタンパク質合成をともなわずに Dkk1 の発現を誘導することが考えられた。ChIP アッセイの結果、GR は、Dex 刺激依存的に Dkk1 のプロモーターに結合することが明らかになり、直接発現を誘導していることが示唆された。

Western blotting と免疫染色による解析により、Dex 刺激による GSK3 $\beta$ (Ser9)のリン酸化の抑制と、核内と細胞質内の  $\beta$ -catenin タンパク質の発現量の低下が観察された。TOP-GFP レポーターアッセイにより、Dex は脂肪細胞分化にともない TCF/LEF 転写活性を抑制した。PPAR $\gamma$  と GFP 抗体を用いて二重染色を行ったところ、Dex 未処理の細胞では、GFP 強陽性細胞が観察され、PPAR $\gamma$  の発現は認められなかった。一方、Dex 処理細胞では GFP 陰性または弱陽性細胞が多く観察され、それらの細胞で PPAR $\gamma$  を発現していた。また、Dex に GSK3 $\beta$  阻害剤を加えることで、Dex による  $\beta$ -catenin タンパクの発現抑制と TCF/LEF 転写活性の抑制は回復し、PPAR $\gamma$  陽性細胞の出現や脂肪細胞分化が抑制された。このことから、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルと PPAR $\gamma$  の発現に負の相関があることが観察された。

$\beta$ -catenin shRNA により機能阻害実験を行ったところ、ALP 活性が有意に減少した。しかしながらこれらの細胞で骨芽細胞転写因子の発現に変動が認められなかったことから、上記の研究同様に骨芽細胞転写因子の発現変動をともなわずに ALP の発現を制御することが考えられた。また、 $\beta$ -catenin shRNA を導入した細胞では Dex により誘導される脂肪細胞分化が亢進した。これらの細胞では PPAR $\gamma$  や aP2 など脂肪細胞マーカー遺伝子の発現が亢進していた。 $\beta$ -catenin shRNA を導入した細胞では、PPAR $\gamma$  陽性細胞の数が多く観察された(論文投稿中)。逆に、Dex に刺激により分化の初期に発現が誘導され、 $\beta$ -catenin の分解に関与する Axin2 shRNA を導入し機能を阻害したところ、ALP 染色性と活性が増加し、骨芽細胞分化が促進することが観察された。これらの細胞では Dex 誘導性脂肪細胞分化が有意に減少することが観察された。

総括：間葉系前駆細胞分化において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは骨芽細胞分化に促進

的な作用を有する。また BMP 刺激により、 $\beta$ -catenin タンパク発現レベルの増加や TCF/LEF 転写活性を促進されたことから、BMP シグナルの下流で間葉系前駆細胞の分化を制御していることが示唆された。GC シグナルによる間葉系前駆細胞の脂肪細胞と初期の骨芽細胞分化が誘導される際、Wnt アンタゴニストの発現を亢進し、GSK3 $\beta$  依存的に  $\beta$ -catenin のタンパク発現レベルを抑制し、TCF/LEF 転写活性を抑制する。 $\beta$ -catenin の発現量の減少は ALP 陽性細胞を減少させ、脂肪細胞分化を促進することから GC シグナルによる  $\beta$ -catenin タンパク質の発現調節が間葉系前駆細胞分化に重要な役割を果たすことが推察され、GC 誘導性の骨粗鬆症の病態機構の解明の一役を担うことが期待された。

## 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 1 件)

- ① Naito M, Omoteyama K, Mikami Y, Takagi M, Takahashi T. Suppression of lamin A/C by short hairpin RNAs promotes adipocyte lineage commitment in mesenchymal progenitor cell line, ROB-C26. *Histochem Cell Biol.* 137:235-247.2012 査読あり

[学会発表] (計 3 件)

- ① 内藤昌子、三上剛和、高橋富久 脂肪細胞分化における lamin A/C の役割 第 117 回日本解剖学会、山梨大学甲府キャンパス、山梨県、2012 年 3 月 27 日
- ② 内藤昌子、高橋富久 脂肪細胞分化における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの役割 第 99 回日本解剖学会関東支部会、日本大学松戸歯学部、千葉県、2011 年 10 月 15 日
- ③ 内藤昌子、高城 稔 Dexamethasone (Dex) 誘導性脂肪細胞分化における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの役割 第 52 回歯科基礎医学会、タワーホール船堀、東京都、2010 年 9 月 22 日

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 昌子 (NAITO MASAKO)  
日本大学・歯学部・助教  
研究者番号：40436803

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：