

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890261

研究課題名（和文）Wnt 非古典経路を阻害する新規骨代謝改善薬の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）To clarify the molecular mechanism of novel therapeutic agent which suppresses bone resorption through inhibits noncanonical Wnt signaling.

研究代表者

前田 和洋 (MAEDA KAZUHIRO)

東京慈恵会医科大学 医学部 助教

研究者番号：50548849

研究成果の概要（和文）：我々は Wnt 非古典経路が骨吸収を活性化することを発見し、それを阻害する事で新規骨代謝改善薬の可能性を報告してきた。本研究では、破骨細胞系譜特異的に Wnt 非古典経路の受容体を欠損したマウスを作出し、Wnt 非古典経路の骨吸収における生理的役割を解析した。その結果、破骨細胞前駆細胞において Wnt 非古典経路は、破骨細胞分化因子の受容体である RANK の発現を増強する事で破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：We have previously reported that noncanonical Wnt signaling enhanced osteoclastogenesis. To clarify the role of noncanonical Wnt signaling in osteoclastogenesis, we generated osteoclast precursor-specific Ror2, one of the noncanonical Wnt receptor,-deficient mice. These mice exhibited impaired osteoclastogenesis due to suppression of RANK expression in osteoclast precursors, indicating that noncanonical Wnt signaling enhances osteoclastogenesis through RANK expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,030,000	309,000	1,339,000
2010 年度	920,000	276,000	1,196,000
総計	1,950,000	585,000	2,535,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科学

キーワード：破骨細胞, Wnt

1. 研究開始当初の背景

骨組織は生涯を通して形成と吸収が行われ、そのバランスを保つことで骨量が維持される。骨吸収を担う破骨細胞はマクロファージ由来の細胞である。骨形成を担う骨芽細胞に、骨吸収促進因子が作用すると破骨細胞分化因子 RANKL が発現する。マクロファージには受容体 RANK が発現しており、骨芽細胞膜上の RANKL と結合する事で、破骨細胞へと分化する。一方、骨芽細胞は破骨細胞分化抑制因子であるオステオプロテゲリン (OPG) も発現し、骨量維持の恒常性を保って

いる。本申請者は、骨芽細胞の産生する Wnt5a が破骨細胞前駆細胞の Wnt 非古典経路を活性化し、骨吸収を促進することを発見した。更に、それを阻害する事で新規骨代謝改善薬の可能性を報告してきた (Maeda K. et al: J Bone Miner Res 22 (suppl.1): S43, 2007)。そこで、本研究は、遺伝子欠損マウスを解析する事で、Wnt 非古典経路を阻害する新規骨代謝改善薬の分子メカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

Wnt は、胎生期の器官形成から発癌に至るまで、組織の改造が盛んな時期に機能するサイトカインである。Wnt のシグナル経路は、 β -カテニンを介する古典経路と介さない非古典経路に大別される。Wnt 古典経路は、骨芽細胞分化を促進することが明らかにされた。また、成熟骨芽細胞において、Wnt 古典経路は、OPG の発現を誘導し、骨吸収を抑制することが報告されている。一方、 β -カテニンを介さない非古典経路が骨形成を促進するという報告も最近散見されるようになった。このように、古典経路が関与する骨形成および骨吸収のメカニズム、非古典経路の関与する骨形成のメカニズムは明らかになってきている。しかしながら、Wnt 非古典経路が関与する骨吸収制御機構はいまだ明らかでなかった。本研究は、破骨細胞系譜特異的に Wnt 非古典経路の受容体を欠損したマウスを作出し、Wnt 非古典経路の骨吸収における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Ror2 は受容体型のチロシンキナーゼで Wnt 非古典経路の共受容体として知られている。in vivo における破骨細胞系譜での Ror2 の役割を明らかにするために、破骨細胞特異的 Ror2 遺伝子欠損マウスを作出した。Ror2 遺伝子欠損マウスは胎生 18.5 日で、心肺の形成不全のため胎生致死である。胎生致死を回避し、成獣の破骨細胞分化における Ror2 役割を検討するため、Ror2 flox マウス (神戸大学南康博教授よりご提供) を用いた。このマウスは、Ror2 の DNA 配列を LoxP と呼ばれる配列ではさんだ遺伝子変異マウスである。LoxP ではさんだ配列は、Cre recombinase (Cre) という酵素の作用により欠失する。本研究では、RANK (破骨細胞に特異的に発現する遺伝子) プロモーターの下流に Cre を挿入したマウスと交配させる。それにより、LoxP 配列にはさんだ Ror2 遺伝子と Cre 遺伝子の双方を受け継いだ仔マウスにおいて、RANK を発現している細胞 (破骨細胞前駆細胞) でのみ Cre が発現し、Ror2 が欠失する。

このマウスを用い次に示す実験を行った (図 1)。

① 8 週齢のマウスより脛骨を採取し、マイクロ CT 撮影、組織切片を作成し組織学的検討および骨形態計測を行った。

② 8 週齢のマウスより骨髄を採取し、破骨細胞分化に必要な受容体の発現をリアルタイム PCR 法を用いて検討した。

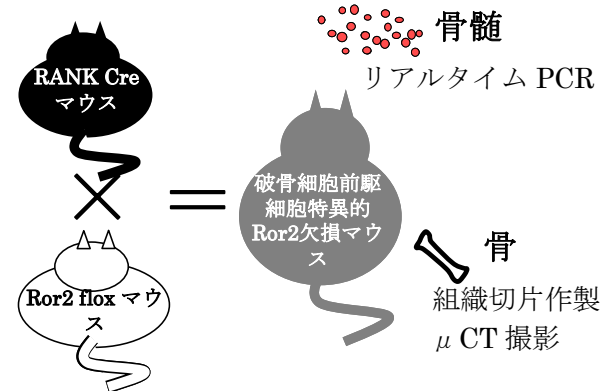


図 1: 破骨細胞前駆細胞特異的遺伝子欠損マウス作出の戦略

(2) 次に RANK 陽性細胞が、可視化できるマウス (RANK^{Cre/+}; CAG floxed Neo EGFP) を作出し、Wnt 非古典経路が RANK の発現を促進するかどうかを ex vivo で検討した。本実験では、CAG プロモーターの下流で、LoxP 配列にはさんだストップコドンと、さらにその下流で EGFP が発現するマウス (大阪大学岡部勝教授よりご提供) を用いた。このマウスでは、全ての細胞で LoxP-STOP-LoxP-EGFP という DNA 配列が発現する。この状態では、ストップコドンの影響で、EGFP は発現しない。このマウスと RANK プロモーターの下流に Cre を挿入したマウスと交配させる。Cre の作用により LoxP 配列にはさんだストップコドンは欠失し、RANK 陽性細胞が EGFP を発現ようになる (図 2)。このマウスを用い以下の実験を行った。

① 8 週齢のマウスより骨髄を採取し、Wnt 非古典経路を活性化させる Wnt5a を添加する事で、RANK の発現が増強するかどうか検討した。

② ①の実験に各種阻害剤を添加し、RANK の発現にどのシグナル経路が重要であるかを検討した。

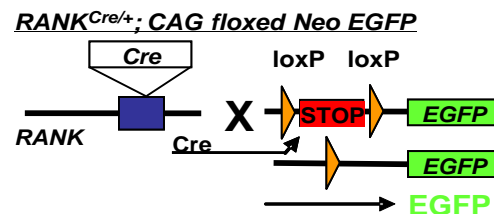


図 2: RANK 陽性細胞可視化マウス作出の戦略

4. 研究成果

(1) 破骨細胞特異的に Ror2 遺伝子を欠損したマウス (cKO) の解析

① cKO の脛骨を摘出し、マイクロ CT 撮影を行ったところ、野生型マウス (WT) と比較して骨量が増加した。次に、組織切片を作成し TRAP 染色に供したところ、cKO では TRAP 陽性細胞の顕著な減少を認めた。以上の結果より、破骨細胞前駆細胞に発現する Ror2 は、破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。

② cKO の骨髄を採取し、破骨細胞分化に必要な受容体の発現をリアルタイム PCR 法を用いて検討した。その結果、cKO では、破骨細胞分化因子 RANKL の受容体である RANK の発現が低下する事が明らかとなった。以上より、cKO で破骨細胞分化が障害される原因として、破骨細胞前駆細胞において RANK の発現が低下する事により、破骨細胞分化が抑制されることが考えられた。

(2) RANK 陽性細胞が、可視化できるマウス (RANK^{Cre/+}; CAG floxed Neo EGFP) の解析

① RANK^{Cre/+}; CAG floxed Neo EGFP の骨髄より破骨細胞前駆細胞を調製した。この細胞に、Wnt 非古典経路を活性化させる Wnt5a を添加する事で、EGFP 陽性細胞が増えるかどうかを検討した。その結果、Wnt5a 添加によって EGFP 陽性細胞 (RANK 陽性細胞) は、増加した。以上より、破骨細胞前駆細胞において、Wnt 非古典経路が活性化すると RANK の発現が増強することが明らかとなった。

② ①の実験系に各種阻害剤を添加し、RANK の発現にどのシグナル経路が重要であるかを検討した。その結果、Wnt5a の RANK 発現増強効果は、JNK の阻害剤で用量依存性に抑制された。以上より、Wnt5a の RANK 発現増強効果は、JNK を介するということが明らかとなった。

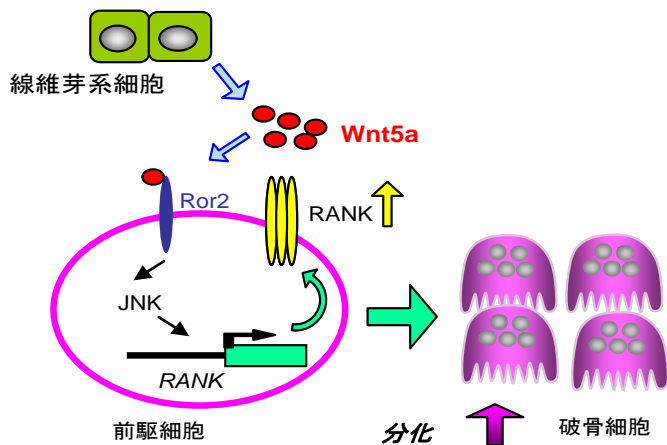


図 3: Wnt 非古典経路が破骨細胞分化を促進するメカニズム

以上の実験結果とこれまでに得られている我々の知見をまとめると、骨芽細胞や滑膜細胞が産生する Wnt5a は、破骨細胞前駆細胞に作用し、Ror2-JNK を介して RANK の発現を制御し、破骨細胞分化を促進することが明らかとなった (図 3)。

Wnt 非古典経路を阻害する新規骨代謝改善薬は、Ror2-JNK 経路を阻害する事により、破骨細胞前駆細胞における RANK の発現を抑制し、骨吸収を低下させる可能性が示唆された。

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)

[総説] (計 2 件)

(1). N. Takahashi, K. Maeda, A. Ishihara, S. Uehara, Y. Kobayashi: Regulatory Mechanism of Osteoclastogenesis by Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand (RANKL) and Wnt Signals. *Front Biosci.* 16: 21-30, 2011 (査読有)

(2). 前田和洋: Vocabulary 『Wnt5a』. *整形外科* 60: 1100, 2009 (査読無)

[学会発表] (計 3 件)

(1). 小林泰浩、前田和洋、上原俊介、高田伊知郎、加藤茂明、丸毛啓史、宇田川信之、高橋直之; Wnt5a による破骨細胞の分化促進効果 (第 28 回日本骨代謝学会 2010. 7. 21 東京)

(2). Y. Kobayashi, K. Maeda, A. Ishihara, S. Uehara, Takada, S. Kato, M. Nishita, Y. Minami, K. Marumo, N. Udagawa, N. Takahashi; Ror2-mediated noncanonical Wnt signaling enhances RANKL-induced osteoclast formation in physiological and pathological conditions. (第 3 回国際骨免疫学会議 2010. 6. 22 Santorini, Greece)

(3). Y. Kobayashi, K. Maeda, A. Ishihara, I. Takada, S. Kato, M. Nishita, Y. Minami, K.

Marumo, N. Udagawa, N. Takahashi:
Ror2-mediated noncanonical Wnt signaling
enhances RANKL-induced osteoclast formation
in physiological and pathological conditions.
(The 26th Naito conference on osteobiology
2009. 11. 4 Hyogo, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 和洋 (MAEDA KAZUHIRO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：50548849