

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09216

研究課題名(和文) WNTアンタゴニストSFRP5によるWNT非依存的な骨代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) SFRP5 regulates bone metabolisms independent of WNT signaling

研究代表者

村上 康平 (Murakami, Kohei)

岡山理科大学・獣医学部・講師

研究者番号：60791837

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)：Sfrp5と相互作用する120種類の蛋白質を同定した。このうち7つについて、ノックダウンを行ったが、Sfrp5の作用を打ち消す作用は認めず、Sfrp5が骨芽細胞に作用する上で相互作用する因子は同定できなかった。微量転写開始点解析技術を行い、Sfrp5が活性化する転写因子としてEgr1を同定した。Egr1をノックダウンしたところ、Sfrp5の作用が消失したことから、Sfrp5はEgr1を活性化し、骨芽細胞の分化を促進することが示唆された。生体に対する作用を確かめるため、Sfrp5を過剰発現するアデノ随伴ウイルスをマウスに投与したところ、破骨細胞の形成は抑制されたが、骨量の増加が観察されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題はWNTアンタゴニストとして知られているSFRP5が、WNT非依存的に骨芽細胞に作用するという仮説に基づいて実験を行った。その結果、転写因子Egr1を活性化することで骨芽細胞に作用していることがわかった。Egr1はERK経路などのMAPKシグナル伝達経路の下流に位置する。今後、SFRP5がどのようにEgr1を活性化するのかを解明できれば、骨代謝や発生において中心的な役割を果たすWNTシグナルの新たな一面を明らかにし、様々な分野への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：I identified 120 proteins that interact with Sfrp5. We performed knockdown of seven of these proteins, but found no effect of counteracting the action of Sfrp5, and could not identify factors that interact with Sfrp5 in its effect on osteoblasts. Using CAGE-seq, we identified Egr1 as a transcription factor activated by Sfrp5. When Egr1 was knocked down, the action of Sfrp5 disappeared, suggesting that Sfrp5 activates Egr1 and promotes osteoblast differentiation.

To confirm the effect in vivo, we administered an adeno-associated virus that overexpresses Sfrp5 to mice. Although osteoclast formation was suppressed, no increase in bone mass was observed.

研究分野：骨代謝

キーワード：WNTシグナル 骨代謝 骨芽細胞 破骨細胞

1. 研究開始当初の背景

骨は、作られること(骨形成)と壊されること(骨吸収)で骨量と骨質が維持される。このバランスが乱れることで骨粗鬆症は引き起こされる。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の一つである。

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。

Secreted frizzled-related protein (Sfrp)はWNTアンタゴニストの一つである。Sfrpの骨形成に対する作用を調べるために、Sfrpファミリー全5種類をマウス初代培養骨芽細胞に発現させた。驚いたことに、Sfrp5によって骨芽細胞分化が促進した。一方、他のSfrpにはその作用はなかった。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いため、作用機序の解明に取り掛かった。

Sfrp5は白色脂肪が発現・分泌するアディポカインであり、特にWnt5aと拮抗する(Science, 2010; J Clin Invest, 2012)。Wnt5aは骨芽細胞が発現し、骨芽細胞の分化に必須であることを我々のグループは報告した(Nat Med, 2012; Sci Rep, 2014)。そこで、Wnt5a欠損マウスの初代培養骨芽細胞に組換えSfrp5を添加したところ、Sfrp5は骨芽細胞の分化を促進した。つまり、Sfrp5はWnt5a以外の因子を介して作用すると考えられた。

Sfrp5と相互作用する因子を同定するために、Sfrp5を標識し、マウス骨芽細胞の培養上清と共免疫沈降し、プロテオーム解析を行ったところ、Sfrp5はWnt5aを含む120個の蛋白質と相互作用することがわかった。しかし、その中にWnt5a以外のWNTリガンドは含まれていなかった。Sfrp5を処置した初代培養骨芽細胞を用いてRNAシーケンス解析も実施したが、WNT標的遺伝子はSfrp5によって変動しないことが確かめられた。これらの結果は、WNTアンタゴニストSfrp5は、WNT非依存的に骨代謝を調節することを示唆する。

これまでの研究で得られた「WNTアンタゴニストの骨形成促進作用」「アディポカインによる骨代謝調節」「SfrpのWNT非依存的な作用」といった知見は、WNTシグナルや骨代謝における既存概念を覆す発見である。

2. 研究の目的

代表者はSfrp5欠損マウスの骨量が、同腹野生型マウスよりも減少することを見出した。この時、骨吸収を司る破骨細胞は増加し、骨形成を担う骨芽細胞が減少した。つまり、Sfrp5は破骨細胞形成を抑制しつつ、骨芽細胞の分化を促進することを発見した。Sfrp5が破骨細胞の形成を抑制する作用は、Wnt5a依存的であることを解明し、学会報告した。続いて、骨芽細胞の分化促進作用の解析も進め、破骨細胞とは異なり、Sfrp5はWNT非依存的に作用することを確かめた。本課題は、Sfrp5のWNT非依存的な骨代謝調節機序を完全に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Sfrp5と相互作用する因子の同定；Sfrp5をHalo-Tagで標識し、骨芽細胞の培養上清と共免疫沈降し、質量分析を行うことでSfrp5と相互作用する蛋白質120種を同定した(図1)。この中で骨芽細胞が発現する細胞外蛋白質として、7種を絞り込み、候補蛋白質に対するshRNAを発現する組換えアデノウイルスを作製し、初代培養骨芽細胞でノックダウンすることで、Sfrp5の分化促進作用が消失する因子の同定を試みた。

(2) Sfrp5によって活性化する骨芽細胞のシグナル経路の同定；骨芽細胞培養系に組換えSfrp5を添加し、微量転写開始点解析技術(CAGE)を行うことで活性化するプロモーターを網羅的に調べた。モチーフ解析を行って、Sfrp5が活性化する転写因子の同定を試みた。同定した転写因子に対するshRNAを作製し、Sfrp5の作用が解消されることを確かめることで、Sfrp5が活性化する分化促進シグナル経路を確認した。

(3) 骨粗鬆症モデルマウスに対するSfrp5の治療効果の検討；アデノ随伴ウイルス血清型9(AAV9)をマウスに静脈内投与することで、骨細胞・骨芽細胞に遺伝子導入を行うことができる。この系でマウスの骨組織にSfrp5を過剰発現させる。蛍光顕微鏡で遺伝子導入を確認するとともに、マイクロCTを撮影し、骨量に与える影響を観察した。また骨芽細胞マーカーおよび破骨細胞マーカーの遺伝子発現をリアルタイムPCRで検討した。

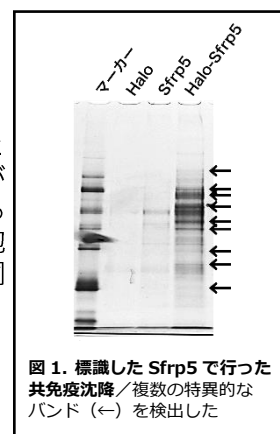


図1. 標識したSfrp5で行った共免疫沈降/複数の特異的なバンド(←)を検出した

4. 研究成果

(1) プルダウンアッセイにより同定された蛋白質の中から、骨芽細胞が発現する細胞外蛋白質に絞り込んだ。その結果、Sfrp5 と相互作用する候補蛋白質として、7 因子 (Sulf2 / Gsn / Plod3 / Lgals3bp / Prss23 / Anxa2 / Sfrp1) があげられた。そこで、これら7つに対するshRNAを発現する組換えアデノウイルスを作製した。これら7因子をノックダウンした骨芽細胞は、組換えSfrp5に反応して分化が促進した。このことから、Sfrp5はこれら7因子非依存的に骨芽細胞の分化を促進することがわかった。

(2) CAGE解析を行い、モチーフ解析を行ったところ、遺伝子発現量の違いに関与している可能性のある転写因子として、5つの転写因子 (EGR1, TCF7L2, SPI1, SP2, ZNF263) がヒットした。この中で、CAGE上で骨芽細胞が発現していたのはEgr1とTcf7l2と2つであった。特にEgr1は、組換えSfrp5の添加によりmRNAおよび蛋白質レベルで発現が上昇することがわかった。そこで、Egr1に対するshRNAを発現する組換えアデノウイルスを作製し、骨芽細胞に感染させたところ、Sfrp5による分化促進作用は消失した (図2)。したがって、Sfrp5は骨芽細胞において転写因子Egr1を活性化し、その分化を促進していることが示唆された。

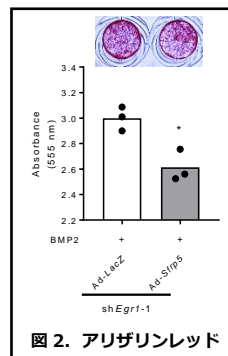


図2. アリザリンレッド

(3) マウス Sfrp5 またはレポーター (ZsGreen) を発現する AAV9 を構築した。これをマウスの静脈に投与したところ 2 週間後には肝臓で蛍光蛋白質の発現、および肝臓のライセートで Sfrp5 の発現が確認された。さらに、大腿骨および第 2 腰椎において、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞にレポーター発現が確認された。AAV9 による遺伝子導入がワークしていると考え、本条件で Sfrp5 過剰発現が骨量に与える影響を調べた。静脈内投与から 4 週間後、大腿骨の骨量は増加しなかった。リアルタイム PCR を行うと、Sfrp5 の過剰発現により、骨芽細胞マーカー (Bglap1, Sp7) および破骨細胞マーカー (Tnfrsf11a, Ctsk) のいずれもが減少していることがわかった。おそらく、過剰な Sfrp5 により Wnt5a の機能が抑制されて破骨細胞が減少し、カップリング因子が減少して、骨芽細胞も減少してしまったためと考えられた。

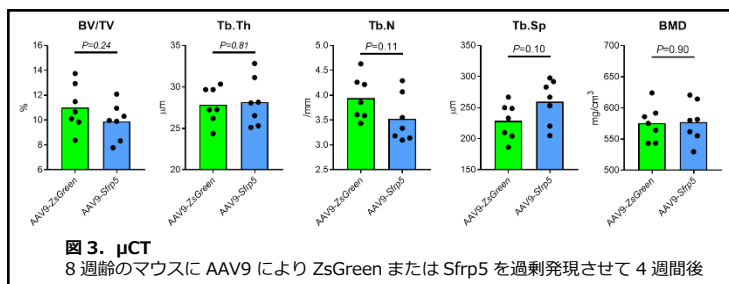


図3. μCT
8週齢のマウスに AAV9 により ZsGreen または Sfrp5 を過剰発現させて 4 週間後

以上の結果から、Sfrp5 の骨芽細胞に対する作用機序の一端を明らかにしたと共に、動物に Sfrp5 を使用する際、過剰な Sfrp5 は、目的とは反対に骨代謝を抑制してしまう可能性があることが明らかとなった。

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 1件）

1. 著者名 Murakami Kohei, Miyatake Saki, Miyamae Jiro, Saeki Kanna, Shinya Mizutani, Akashi Natsuki, Mitsui Ikki, Kobayashi Kosuke, Saeki Kohei, Maeta Noritaka, Kanda Teppei, Okamura Yasuhiko, Hemmi Hiroaki	4. 巻 253
2. 論文標題 Expression profile of immunoregulatory factors in canine tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Immunology and Immunopathology	6. 最初と最後の頁 110505 ~ 110505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.vetimm.2022.110505	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 Takashi Kato, Masaki Yamamoto, Yoshitaka Honda, Takashi Orimo, Izumi Sasaki, Kohei Murakami, Hiroaki Hemmi, Yuri Fukuda-Ohta, Kyoichi Isono, Saki Takayama, Hidenori Nakamura, Yoshiro Otsuki, Toshiaki Miyamoto, Junko Takita, Takahiro Yasumi, Ryuta Nishikomori, Tadashi Matsubayashi, Kazushi Izawa, Tsuneyasu Kaisho	4. 巻 73
2. 論文標題 Augmentation of Stimulator of Interferon Genes-Induced Type I Interferon Production in COPA Syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis & Rheumatology	6. 最初と最後の頁 2105-2115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/art.41790	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 Shunsuke Uehara, Hideyuki Mukai, Teruhito Yamashita, Masanori Koide, Kohei Murakami, Nobuyuki Udagawa, Yasuhiro Kobayashi	4. 巻 40
2. 論文標題 Inhibitor of protein kinase N3 suppresses excessive bone resorption in ovariectomized mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 251-261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01296-1	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 Kobayashi Kosuke, Takemura Reika Deja, Miyamae Jiro, Mitsui Ikki, Murakami Kohei, Kutara Kenji, Saeki Kohei, Kanda Teppei, Okamura Yasuhiko, Sugiyama Akihiko	4. 巻 13
2. 論文標題 Phenotypic and molecular characterization of novel pulmonary adenocarcinoma cell lines established from a dog	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-44062-1	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 Murakami Kohei, Kikugawa Shingo, Seki Shoji, Terai Hidetomi, Suzuki Takako, Nakano Masaki, Takahashi Jun, Nakamura Yukio	4. 巻 11
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 287 ~ 291
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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林宏祐, 村上康平, 佐伯亘平, 杉山晶彦
2. 発表標題 イヌ肺腺癌より樹立した上皮系および間葉系様細胞株の性状解析
3. 学会等名 第165回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi Kato, Ryota Yamasaki, Naoko Wakaki-Nishiyama, Izumi Sasaki, Shiori Kaji, Kohei Murakami, Hiroaki Hemmi, Yoshitaka Honda, Kazushi Izawa, Yoshiro Otsuki, Tadashi Matsubayashi, Ryuta Nishikomori, Tsuneyasu Kaisho
2. 発表標題 Activation of type I Interferon signaling and T cell abnormalities in the mouse model of COPA syndrome
3. 学会等名 第29回日本免疫毒性学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宮武咲妃, 宮前二郎, 邊見弘明, 村上康平
2. 発表標題 犬の腫瘍における免疫制御分子の発現プロファイル
3. 学会等名 第19回日本獣医内科学アカデミー学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kohei Murakami, Daichi Hanai, Ryusei Kimura, Ikki Mitsui, Jiro Miyamae, Akira Matsuda, Hiroaki Hemmi
2. 発表標題 Down-regulation of PD-L2 is a poor prognostic marker in dogs with high-grade mast cell tumor
3. 学会等名 The 10th ASVP and 10th JSVPJoint Conference
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水谷真也, 朱夏希, 村上康平, 神田鉄平, 岡村泰彦, 浅沼武敏
2. 発表標題 術中突然の高血圧を呈した肺原発性パラガングリオーマの犬の1例
3. 学会等名 日本獣医麻酔外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小林宏祐, 村上康平, 馬場健司
2. 発表標題 イヌ血管肉腫細胞株に対するスタチンの抗腫瘍および抗凝固作用の解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 酒井治, 小林宏祐, 村上康平, 三河翔馬, 望月庸平, 三井一鬼, 久楽賢治, 岡村泰彦
2. 発表標題 臨床的に中皮腫が疑われた犬2症例より樹立した中皮細胞株の性状解析
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 イヌの扁平上皮癌はグレードが高いほどGalectin-9の発現が低い
2. 発表標題 宮武咲妃, 三井一鬼, 宮前二郎, 邊見弘明, 村上康平
3. 学会等名 第166回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮前二郎, 村上康平, 邊見弘明
2. 発表標題 イヌMHCクラス 分子結合ペプチドの解析
3. 学会等名 第31回日本組織適合性学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上康平, 花井大地, 木村竜盛, 三井一鬼, 宮前二郎, 松田彬, 邊見弘明
2. 発表標題 PD-L2発現は犬の高悪性度肥満細胞腫における予後マーカーである
3. 学会等名 第21回四国免疫フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 村上康平, 花井大地, 木村竜盛, 三井一鬼, 宮前二郎, 松田彬, 邊見弘明
2. 発表標題 犬の高悪性度肥満細胞腫におけるPD-L2発現低下は予後不良マーカーである
3. 学会等名 第10回アジア獣医病理学会学術集会・第10回日本獣医病理学会学術集会
4. 発表年 2023年

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

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
---------	---------