

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 5 月 24 日現在

機関番号：33602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659339

研究課題名（和文）破骨細胞の波状縁形成を誘導する Wnt-Ror2 シグナル

研究課題名（英文）Role of Wnt-Ror2 signals in ruffled border formation in osteoclasts

研究代表者 高橋直之

高橋直之（TAKAHASHI NAOYUKI）

松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授

研究者番号：90119222

研究成果の概要（和文）：

破骨細胞の機能における Wnt5a-Ror2 系の役割を解析した。(1) Wnt5a 欠損マウスと Ror2 欠損マウスに由来する破骨細胞の骨吸収能は低下していた。(2) Wnt5a は野生型破骨細胞の低分子量 G タンパク質 Rho を活性化したが、Ror2 欠損破骨細胞では Rho を活性化しなかった。(3) Ror2 欠損破骨細胞に恒常的活性型 Rho を過剰発現したところ、骨吸収能は回復した。以上より、Wnt5a-Ror2 系は Rho を介して破骨細胞の機能を誘導する。

研究成果の概要（英文）：

The role of Wnt5a-Ror2 signals in osteoclast function was studied. (1) Bone-resorbing activities of osteoclasts derived from Wnt5a-deficient mice and from Ror2 deficient mice were lower than that of wild-type (WT) osteoclasts. (2) Wnt5a activated Rho, a small G protein, in WT osteoclasts but not in Ror2-deficient osteoclasts. (3) When active Rho was transfected into Ror2-deficient osteoclasts, the bone-resorbing activity was recovered. Thus, Wnt5a-Ror2 signals play important roles in osteoclast function through a Rho-dependent mechanism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	0	1,500,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：口腔生化学

1. 研究開始当初の背景

破骨細胞は、明帯（アクチンリング）を介して骨に密着する。明帯に囲まれた領域には、波状縁が形成される。これらの構造は酸による骨ミネラルの溶解と骨基質タンパク質の分

解に必須である。明帯は、アクチンを中心とするタンパク質複合体であるポドソームの再配置により形成される。また、タンパク質分解酵素を含んだ小胞が一方方向に輸送され、明帯で囲まれた領域に融合することで、波状縁が

形成される。破骨細胞がこれらの機能構造を構築するためには、細胞膜や細胞内小器官が偏りをもって存在する細胞極性が重要である。インテグリンからの接着シグナルは極性化の開始シグナルであると考えられるが、破骨細胞の極性構築の分子基盤は明らかではない。

我々は、骨芽細胞から分泌されるWnt5aは、破骨細胞前駆細胞のRor2受容体に作用し、RANKの発現を上昇させること、これにより、Wnt5aはRANKLによる破骨細胞形成を亢進することを明らかにした。また我々は、発生過程において平板内細胞極性を司るWnt5aとその受容体Ror2が破骨細胞の機能発現に必要であることを示す以下の知見を得ている。(1)破骨細胞は、Wnt5aとその受容体であるRor2を発現している。(2)Wnt5a 遺伝子欠損(Knockout, KO)マウスまたはRor2 KOマウスから調製した破骨細胞は、アクチンリング形成に障害があり、骨吸収活性が著しく低下している。以上の知見は、Wnt5aによるRor2を介した細胞内シグナルは、破骨細胞の骨吸収活性(極性化)にも必須なシグナルであることを示す。本研究では、破骨細胞においてWnt5a-Ror2シグナルがどのような分子機構で細胞極性化を制御し、骨吸収を調節するか分子メカニズムを解明する。

2. 研究の目的

破骨細胞は、細胞骨格の再編成と細胞膜構造の変化を伴う極性化(明帯と波状縁形成)により、骨吸収機能を発揮する。しかし、この破骨細胞極性化がどのように誘導されるか不明である。我々は、(1)サイトカインWnt5aとその受容体であるRor2が成熟破骨細胞に発現していること、(2)Ror2シグナルが阻害されると、破骨細胞の骨吸収機能が障害されることを見いだした。従来、Wnt5a-Ror2シグナルは平板内細胞極性(Planar cell polarity、

PCP)経路に関わることが知られる。本研究は、PCP経路による破骨細胞極性化制御機構の解明を目的とした。本研究では、(1)Wnt5a-Ror2シグナルにより活性化される新規タンパク質の同定、(2)Wnt5a-Ror2シグナルによる波状縁形成制御機構、の2点の解明を通して、Wnt5a-Ror2シグナルがどのような分子機構で細胞極性化を制御し、骨吸収を調節するかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞の調製方法

野生型(WT)マウス、Wnt5a欠損マウス、およびRor2欠損マウスの肝臓よりマクロファージを調製した。これらのマクロファージをRANKL(receptor activator of NF- κ B ligand)とM-CSF(macrophage colony-stimulating factor)の存在下で培養し、破骨細胞に分化させた。いくつかの実験においては、Ror2^{f1/f1} x Cat K Creマウス(破骨細胞特異的Ror2欠損マウス)の脛骨よりマクロファージを調製し、破骨細胞へと分化させた。

(2) 破骨細胞の機能解析

E18.5の胎児の肝臓または脛骨の骨髄から調製したマクロファージを象牙切片上に撒き、RANKL及びM-CSF存在下、破骨細胞へと分化させた。象牙切片上の破骨細胞が形成するアクチンリングと吸収窩を観察した。

(3) 低分子量Gタンパク質の活性測定

低分子量Gタンパク質であるRhoおよびRacの活性測定は、Cytoskeleton社のG-LISA activation assay kitを用いて測定した。細胞を回収し、添付のLysis bufferにて可溶化し、遠心後の上清をサンプルとした。

(4) 恒常活性型Rho及びRacの破骨細胞への

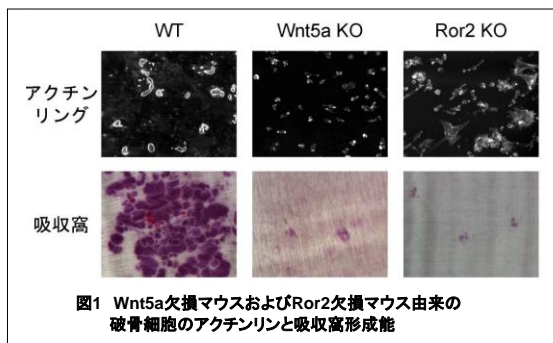
導入

恒常的活性型の Rho (Q63L) 及び Rac (Q61L) を発現させるためのアデノウイルスとコントロール GFP 発現用アデノウイルスは、Cell Biolabs 社より購入した。破骨細胞特異的 Ror2 欠損マウス及びその同腹仔であるコントロールマウス (Ror2 fl/+ x Cat K Cre) の脛骨髄から調製したマクロファージを象牙切片上に播種し、M-CSF 及び RANKL 存在下で破骨細胞へと分化させた。培養 5.5 日目には少数の多核破骨細胞が形成されていることを確認し、各種アデノウイルスを添加し、アクチンリングを観察した。更に細胞を除去し、吸収窩を染色した。

4. 研究成果

(1) 破骨細胞の骨吸収能

Wnt5a 欠損胎児マウスの肝臓から調製した破骨細胞は、吸収窩を形成しなかった。アクチン染色により、この破骨細胞は、アクチンリングを形成していないことが明らかになった。この知見は、破骨細胞が産生する Wnt5a が自らの活性化に重要であることを示す。Ror2 欠損胎児マウスの肝臓から調製した破骨細胞も、吸収窩を形成せず、アクチンリングも形成していなかった (図 1)。成熟破骨細胞特異的 Ror2 欠損マウスの脛骨髄から調製した破骨細胞も吸収窩及びアクチンリングを形成しなかった。



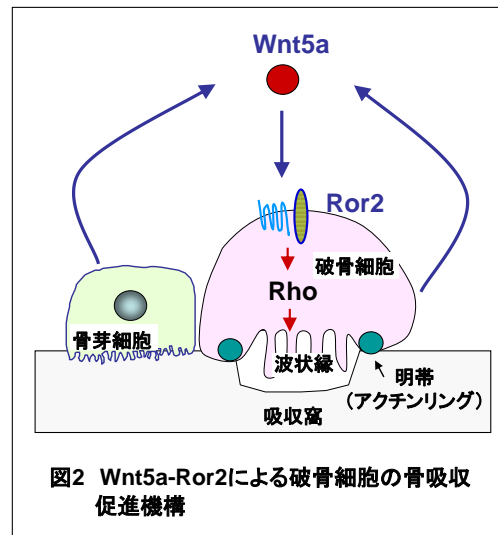
(2) 低分子量 G タンパク質の活性

WTの破骨細胞において、Wnt5a 刺激により Rho および Rac の活性は亢進した。Ror2 欠損破骨細胞では、Wnt5a 刺激による Rho 及び Rac の活性化は認められなかった。

(3) 恒常活性型 Rho 及び Rac の発現による破骨細胞機能への影響

Ror2 欠損破骨細胞に恒常的活性型 Rho を発現することで、アクチンリング形成が回復し、吸収窩も形成された。GFP や恒常活性型 Rac を発現しても、アクチンリング形成は回復せず、吸収窩も形成されなかった。ウエスタンブロット法により、Rho 及び Rac が過剰発現されていることを確認した。

以上より、骨芽細胞及び破骨細胞の産生する Wnt5a が破骨細胞の Ror2 に作用し、Rho を介してアクチンリング形成と波状縁形成を促進することが明らかとなった (図 2)。



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 15 件)

- ① Nakamichi Y, Mizoguchi T, Arai A, Kobayashi Y, Sato M, Penninger JM,

- Yasuda H, Kato S, DeLuca HF, Suda T, Udagawa N, Takahashi N: Spleen serves as a reservoir of osteoclast precursors through vitamin D-induced IL-34 expression in CSF-1^{op/op} mice. **Proc Natl Acad Sci UAS** 査読有 In press
- ② Kobayashi Y, Maeda K, Uehara S, Yamashita T, Takahashi N: Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by Wnt signaling. **Inflammation and Regeneration** 査読有 In press.
- ③ Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, Penninger JM, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N: c-Fos plays an essential role in the up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. **J Cell Science** 査読有 In press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22454522>
- ④ Suda T, Takahashi F, Takahashi N Bone Effects of vitamin D -Discrepancies between *in vivo* and *in vitro* studies -. **Arch Biochem Biophys** 査読有 In press. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22107950>
- ⑤ Nakamura I, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Suda T: Regulation of Osteoclast Function. **Mod Rheumatol** 査読有 22(2):167-177, 2012. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21953286>
- ⑥ Shimizu M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Nakamura H, Kawahara I, Narita N, Usui Y, Aoki K, Hara K, Haniu H, Ogihara N, Ishigaki N, Nakamura K, Kato H, Kawakubo M, Dohi Y, Taruta S, Kim YA, Endo M, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N, Saito N: Carbon nanotubes induce bone calcification by bidirectional interaction with osteoblasts. **Advanced Materials** 査読有 24(16):2176-2185, 2012. DOI: 10.1002/adma.201103832.
- ⑦ Maeda K, Kobayashi Y, Udagawa N, Uehara S, Ishihara A, Mizoguchi T, Kikuchi Y, Takada I, Kato S, Kani S, Nishita M, Marumo K, Martin TJ, Minami Y, Takahashi N: Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblast-lineage cells and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nature Med** 査読有 18(3):405-412. 2012. DOI: 10.1038/nm.2653
- ⑧ Kinugawa S, Koide M, Kobayashi Y, Mizoguchi T, Ninomiya T, Muto A, Kawahara I, Nakamura M, Yasuda H, Takahashi N, Udagawa N: Tetracyclines convert the osteoclastic-differentiation pathway of progenitor cells to produce dendritic cell-like cells. **J Immunol** 査読有 188(4):1772-1781, 2012. DOI: 10.4049/jimmunol.1101174
- ⑨ Harada S, Mizoguchi T, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Takeda S, Sakai S, Takahashi F, Saito H, Yasuda H, Udagawa N, Suda T, Takahashi N: Daily administration of Eldecalcitol (ED-71), an active vitamin D analog, increases bone mineral density by suppressing RANKL expression in mouse trabecular bone. **J Bone Mineral Res** 査読有 27(2):461-473, 2012.

DOI:10.1002/jbmr.555

- ⑩ Furuya Y, Mori K, Ninomiya T, Tomimori Y, Tanaka S, Takahashi N, Udagawa N, Uchida K, Yasuda H: Increased bone mass in mice after single injection of anti-receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-neutralizing antibody: evidence for bone anabolic effect of parathyroid hormone in mice with few osteoclasts. **J Biol Chem** 査読有 286(42) 37023-37031, 2011.
DOI: 10.1074/jbc.M111.246280
- ⑪ Ikawa T, Kawaguchi A, Okabe T, Ninomiya T, Nakamichi Y, Nakamura M, Uehara S, Nakamura H, Udagawa N, Takahashi N, Nakamura H, Wakitani S: Hypergravity suppresses bone resorption in ovariectomized rats. **Adv Space Res** 査読有 47:1214-1224, 2011.
DOI:10.1016/j.asr.2010.12.004
- ⑫ Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, Arai A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T, Takahashi N: Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. **J Bone Mineral Res** 査読有 26(12):2978-2990, 2011.
DOI: 10.1002/jbmr.490
- ⑬ Nakayama T, Mizoguchi T, Uehara S, Yamashita T, Kawahara I, Kobayashi Y, Moriyama Y, Kurihara S, Sahara N, Ozawa H, Udagawa N, Takahashi N: Polarized osteoclasts put marks of tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices -A simple method for identifying polarized osteoclasts-.

Bone 査読有 49(6):1331-1339, 2011.

DOI: 1016/j.bbr.2011.03.031

- ⑭ Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, Uehara S, Kobayashi Y: Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals. **Front Biosci** 査読有 16:21-30, 2011.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21196156>
- ⑮ Udagawa N, Yamashita T, Kobayashi Y, Takahashi N: Identification of osteoclasts in culture. **Methods Mol Biol** 査読有 690:273-284, 2011.
DOI: 10.1007/978-1-60761-962-8_18

[学会発表](計7件)

1. Naoyuki Takahashi: Osteoclast precursors in vivo 東京医科歯科大学 GCOE 2012年1月24日
2. 高橋直之: 骨吸収の調節機構: 鹿児島大学歯学部セミナー 2011年1月16日
3. 高橋直之: 分子メカニズムを知る意味とは(招待講演) Dentistry Quo Vadis? 東京 2011年12月11日
4. 高橋直之: チタンインプラント埋入における生体側のイベント(招待講演) Dentistry Quo Vadis? 東京 2011年12月10日
5. 高橋直之 骨吸収を調節する骨芽細胞の新しい役割(招待講演) 第26回長崎骨粗鬆症研究会 2011年11月30日
6. Naoyuki Takahashi: Quiescent Osteoclast Precursors. Invited lecture 2nd Asia-Pacific Osteoporosis and Bone Meeting 2011年9月7日
7. 高橋直之 破骨細胞を制御する骨芽細胞の新しい役割(招待講演) 九州大学大学院講義 福岡 2011年5月12日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 直之 (TAKAHASHI NAOYUKI)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・教授
研究者番号：90119222

(2) 研究分担者

小林 泰浩 (KOBAYASHI YASUHIRO)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・準教授
研究者番号：20264252
上原 俊介 (UEHARA SHUNSUKE)
松本歯科大・歯学部・助教
研究者番号：90434480

(3) 連携研究者

宇田川 信之 (UDAGAWA NOBUYUKI)
松本歯科大・歯学部・教授
研究者番号：70245801