

## 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6月4日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790510

研究課題名（和文） Wnt シグナル経路の制御による骨形成促進薬の可能性検証

研究課題名（英文） Feasibility study of developing bone formative drugs with regulating Wnt signaling.

研究代表者

三浦 将吾（MIURA SHOGO）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90529182

研究成果の概要（和文）： Wnt/Fzd シグナルは、骨芽細胞分化における中心的な役割を担うことが示唆されていたが、その詳細は必ずしも明瞭ではなかった。本研究において、過去に報告されていた  $\beta$ -catenin 経路活性化のみならず、同時に JNK 経路阻害が相俟って、骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。さらに、 $\beta$ -catenin 経路および JNK 経路の活性化のバランスは、Wnt リガンドを受容可能な LRP 分子の量により統一的に制御されている可能性が示唆された。また、LRP 分子の細胞内動態は、Wnt 分子により制御されている可能性が想定された。今後、Wnt シグナル伝達と LRP 局在制御の関連の解明が、骨芽細胞分化における Wnt シグナル全容解明につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）： Wnt/Fzd signaling has been believed to play a critical role in osteoblast differentiation although the detailed manner was not obviously clarified. In this study, it has been revealed that not only the activation of  $\beta$ -catenin pathway, an already known critical pathway, but also the suppression of JNK pathway contributes to osteoblast differentiation. The balance of the activation of these two pathways is likely to be regulated by the quantity of LRP molecules available to form a complex with Wnt ligands. It is also suggested that Wnt molecules regulate subcellular localization of LRP. The relationship between Wnt signaling and LRP subcellular behavior may be a promising clue to elucidate the mystery of Wnt signaling in osteoblast differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：シグナル伝達、発現制御、生体分子、骨粗鬆症、骨芽細胞、骨形成、Wnt、LRP5/6

## 1. 研究開始当初の背景

近年の高齢化社会の急速な進展に伴い、日本国内における骨粗鬆症患者数は、増加の一途を辿っている。骨は、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収を介して常に新生・破壊

を繰り返すことで、骨量・強度が保たれており、この骨代謝回転のバランスが崩れることで骨粗鬆症が発症する。このため、骨粗鬆症の治療標的としては、「骨吸収の抑制」および「骨形成の促進」が想定される。臨床において頻用される薬

剤として、ビスホスホネート系薬剤があるが、その作用機序は骨吸収抑制である。一方、老年性骨粗鬆症のように骨代謝回転が全体的に低下しているケースでは、骨吸収の抑制に加え、骨形成の促進がより効果的・根本的な治療法と考えられるが、有効性の高い骨形成促進薬は上市されていない。

骨芽細胞は、破骨細胞の分化・活性化支持能および造骨能を有し、生体における骨量調節に中心的な役割を果たしている。近年、Wnt/b-catenin シグナルによって造骨能が制御されていることが明らかとされてきた。Wnt/b-catenin 経路は、骨芽細胞に発現する受容分子 Frizzled (Fzd)および共受容体 LRP5/6への、リガンド分子 Wntの結合が起点であり、最終的に造骨関連遺伝子群の発現量が上昇する(Hall et al. 2006 J Cell Biochem.)。LRP5の遺伝的機能欠損に伴い骨粗鬆症様症状を呈することが知られている(Boyden et al. 2002 N Engl J Med.)。また、骨芽細胞に発現するDickkopf-1/2(Dkk-1/2)および骨細胞に発現する Sclerostin (SOST)は、LRP5/6 に結合することで Wntの結合を阻害し、内因性のシグナル伝達遮断物質として機能することが知られているが、Dkk-1/2 または SOST の遺伝的機能欠損に伴い骨硬化が生じること(Balemans et al. 2002 J Med Genet.)も知られており、創薬標的となる可能性が想定された。

## 2. 研究の目的

上記背景のもと、骨芽細胞における Wnt/b-catenin 経路へのシグナル入力強度を調節することによる創薬の可能性を検証することを目的とした。考えられる創薬の作用点として、① Fzd-LRP のアゴニスト分子、②内因性阻害分子の中和、③受容体の感受性修飾などが想定される。②に関しては、SOSTあるいはDKK1に対する中和抗体を用いた治療法が考案されており、動物実験レベルでは骨量増加効果が明らかになっている。一方、①に関しては、Wnt/Fzdのファミリー分子が多岐にわたり、生体において多様な生理活性を有する(Logan et al. 2004 Annu Rev Cell Dev Biol)ことが示唆されているが、骨での効果は必ずしも解析が十分ではない。さらに、③に関する具体的な研究成果や提案は、これまでに全く無い。

そこで、本研究では、Wnt/b-catenin 経路の受容体 Fzd、LRP5/6 の局在を制御することで、受容体の感受性を増強させる可能性を想定し、その受容体局在制御機構の解析、および、多種多様な Wnt/Fzd ファミリー分子が骨代謝に与える影響の解析を行うこととした。

## 3. 研究の方法

### ① 細胞培養

MC3T3-E1 細胞は理研細胞バンクより購入し、10% fetal bovine serum (FBS, BioWest)および

Penicillin-Streptomycin (PCSM, Invitrogen)を添加した  $\alpha$  MEM 培地 (SIGMA)にて培養した。293A 細胞は Invitrogen より購入し、10% FBS、PCSM および Nonessential amino acids (NEAA, Invitrogen)を添加した DMEM 培地(ナカライテスク)にて培養した。293FT 細胞は Invitrogen より購入し、10% FBS、PCSM および G-418(ナカライテスク)を添加した DMEM 培地にて培養した。

② マウス初代培養骨芽細胞の単離および培養  
マウス初代培養骨芽細胞(POB)は過去の報告を参考にし、以下の要領で単離した(--)。1-4日齢の雄の C57/BL6 マウスより頭蓋骨を単離し、破碎した小片をコラーゲンゲル(cell matrix type-1A, 新田ゼラチン)中にて3-4日間培養した。培養ゲル中で増殖した細胞をコラゲナーゼ(Collagenase S-I, 新田ゼラチン)処理した後に回収し、新しいシャーレに撒き、 $\alpha$  MEM 培地中で定着した細胞をPOBとして用いた。

### ③ ベクターの構築

MC3T3-E1 細胞およびPOB由来のcDNAを鋳型としたPCR法にてマウス Wnt2 (mWnt2)、mWnt3a、mWnt4、mWnt5a、mWnt5b、mWnt6、mWnt7b、mWnt9a、mWnt9b、mWnt10a、mWnt10b、mWnt11、mWnt16、mFzd1、mFzd2、mFzd3、mFzd4、mFzd5、mFzd6、mFzd7、mFzd8、mFzd9、mLRP5、mLRP6 および mDkk1 を増幅し、クローニングを行った。mWnt、mDkk1 は Gateway テクノロジー (Invitrogen) にて pAd/CMV/V5-DEST に、Fzd はオーバーラップPCR法でC末端に3×flag-tagを付加した後に Gateway テクノロジー にて pAd/CMV/V5-DEST にサブクローニングした。また、mLRP5、mLRP6 はC末端にEGFP-tagを付加した発現ベクターを構築した後(LRP5-GFP および LRP6-GFP)、Gateway テクノロジーにて pAd/CMV/V5-DEST にサブクローニングした。

### ④ ベクターの細胞への導入

構築した発現ベクターおよびウイルスベクターは、Lipofectamine™2000 (Invitrogen)を用いて推奨プロトコールに従い各細胞に一過性導入した。

### ⑤ アデノウイルスの作製

ViraPower™ Adenoviral Expression System (Invitrogen)の推奨プロトコールに従い、構築したアデノウイルスベクターを293A細胞に一過性導入し、アデノウイルスを作製した。得られたアデノウイルスは AdenoPACK20 (Sartorius stedim)を用いて精製・濃縮を行った。アデノウイルスの力価は、アデノウイルスベクターのCMVプロモーター部を定量リアルタイムPCRにて定量し、力価既知のウイルスのそれと比較して算出した。

### ⑥ 共焦点顕微鏡による観察

組み換えタンパク質 Wnt3s による MC3T3-E1 細胞刺激後の LRP5-GFP、LRP6-GFP の細胞内局在は、共焦点顕微鏡 FV-1000 (Olympus)にて、適切なフィルターセットにて観察した。

### ⑦ 細胞表面タンパク質量定量

細胞表面タンパク質を EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin (PIERCE)を用いてメーカー推奨プロトコルに従いビオチン化した。その後、細胞を回収・可溶化し、MagnaBind™ Streptavidin magnetic beads (PIERCE)を用いてメーカー推奨プロトコルに従いビオチン化タンパク質を回収し、細胞表面タンパク質分画を得た。可溶化液および細胞表面タンパク質を各種抗体(Cell Signaling Technology, Invitrogen, GE healthcare)を用い免疫ブロットングを行った。

#### ⑧ 各転写因子レポーター配列のレンチウイルスの作製

TCF, NFAT, AP-1, CRE のレポーター配列の 3'末端に luc2CP (Promega)を付加し、Gateway テクノロジーにて、pLenti 6.3 (Invitrogen)の CMV プロモーターを除去したベクター(pLenti 6.3-ΔCMV)にサブクローニングした。各レポーター配列のレンチウイルスは、ViraPower Lentiviral Expression Systems (Invitrogen) の推奨プロトコルに従って産生した。

#### ⑨ 各転写因子レポーター配列の安定導入細胞の構築

作製したレンチウイルスを MC3T3-E1 細胞に感染させ、blastocidin 含有培養培地にて 5-6 日培養し、定着していた細胞をレポーター配列安定導入細胞として用いた。樹立した安定発現細胞は 10% FBS, blastocidin および PCSM を添加した α MEM 培地にて培養した。

#### ⑩ 定量的リアルタイム PCR

mRNA の定量は、ReverTra Ace® (TOYOBO)を用いた逆転写反応および SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal (Invitrogen)によるリアルタイム PCR 反応を CHROMO4 (BioRad)にて検討し、添付のソフトウェアを用いて解析した。各々の mRNA 量は β-actin 量により規格化した。

#### ⑪ ルシフェラーゼアッセイ

各レポーターの安定発現 MC3T3-E1 細胞を撒き(384 well-plate に  $3 \times 10^3$  cells/well、または 96 well-plate に  $1 \times 10^4$  cells/well)、24 時間後に各種アデノウイルスを合計 90 MOI で感染させた。さらに 42 時間後に FBS 不含有 α-MEM 培地に交換し、30 時間後に ONE-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)を用いてルシフェラーゼレポーター発現量を評価した。

#### ⑫ ALP 酵素活性の測定

アデノウイルス感染 5 日後、または siRNA 導入 72 時間後に、ALP assay kit (TAKARA)のプロトコルに従い、比色法にて p-Nitrophenyl phosphate の分解を定量し、ALP 酵素活性の指標とした。

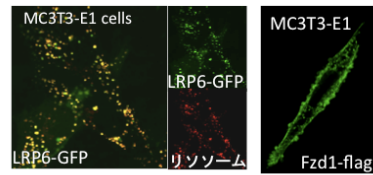
### 4. 研究成果

#### ① Wnt/b-catenin 経路の受容体 Fzd、LRP5/6 の局在を制御解析

##### ①-1. 骨芽細胞において Fzd1 は細胞膜に、LRP6 はリソソームに主として発現する

Wnt 受容体である Fzdファミリー分子のうち、骨

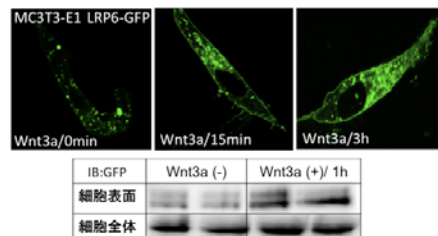
形成において中心的に解析されている Fzd1 および、共受容体 LRP5/6 の骨芽細胞モデル細胞株 MC3T3-E1 細胞における局在を検討した。Flag タグを付与した Fzd1 または、LRP5-GFP および LRP6-GFP を一過性に導入し、その後、免疫染色あるいはライブ細胞観察を行った。その結果、Fzd1 は、主として、細胞表面に発現が認められた一方、LRP6 はリソソーム局在が観察された。LRP5 に関しては、発現効率が極めて悪く、明確な観察が不能であった。また、非骨芽細胞系細胞である HEK293 細胞においては、LRP6 は細胞表面に観察され、LRP6 の局在制御は骨芽細胞に特徴的である可能性が想定された。



MC3T3-E1におけるLRP6およびFzd1の局在

##### ①-2. Wnt3a 刺激に伴って、細胞表面での LRP6 発現が上昇する

LRP6 は受容体であるため、刺激受容時には、細胞表面発現する必要がある、何らかの刺激依存的に細胞表面へ移行する可能性を想定した。そこで、LRP6 がリガンドである Wnt 接触時に局在変化する可能性を検討した。種々ある Wnt 分子のうち、骨形成能上昇が報告されている Wnt3a に関し、その組み換えタンパク質を培地中に添加し、共焦点顕微鏡にて局在変化を観察した。その結果、添加後 15 分後から徐々に細胞表面での発現上昇傾向が観察された。また、この局在変化は、ビオチン化法による巨視的・半定量的解析においても確認された。



Wnt3a刺激によるLRP6の細胞表面発現量の上昇

##### ①-3. LRP6 局在変動を惹起する因子探索

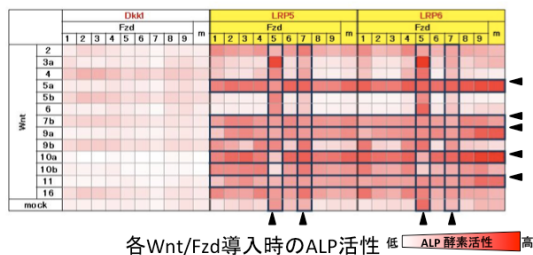
続いて、骨芽細胞においては、Wnts3a 以外にも多種多様な Wnt 分子の発現し、LRP6 の局在変化に影響する可能性が想定された。そこで、生理的に骨芽細胞分化に寄与し得る Wnt/Fzd を同定するため、まず骨芽細胞系に発現する Wnt/Fzd の確認を行った。マウス初代培養骨芽細胞 (POB) およびマウス骨芽前駆細胞株 MC3T3-E1 細胞をモデル細胞として用いた。また、骨芽細胞系の分化段階による Wnt/Fzd の発現様式の変化も考慮して、各細胞の分化を誘導するために 5mM β-glycerophosphate を添加した ascorbic acid 含有 α-MEM 培地にて 0、8、15 日間培養した細胞より作製した cDNA を用い

た。発現する Wnt/Fzd を RT-PCR 法により網羅的に確認したところ、その結果、Wnt は、Wnt2, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7b, 9a, 9b, 10a, 10b, 11 の計 13 種類、Fzd 分子は Fzd1 から Fzd9 までの 9 種類に関して発現が認められた。発現が認められた Wnt 分子に関して、組み換えタンパク質を作成し、LRP6 の局在変動を観察することを計画した。しかし、Wnt3a など、一部を除き、タグを付与することにより活性を喪失するなど、一般に Wnt 分子は精製が極めて困難であり、入手不能であった。そこで、Wnt/Fzd が骨形成に与える影響をシグナル伝達経路の網羅的解析という別の角度からアプローチすることとした。

## ② Wnt/Fzd シグナル伝達の網羅的解析

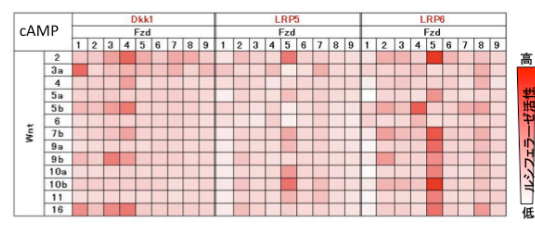
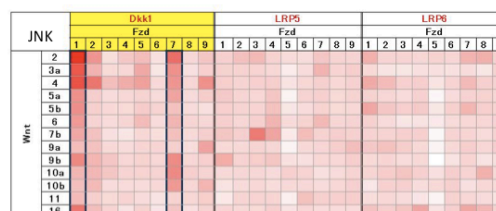
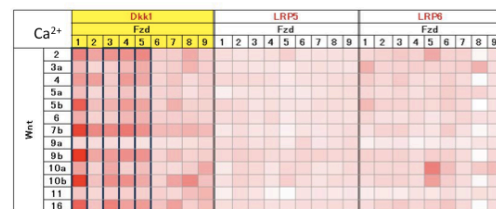
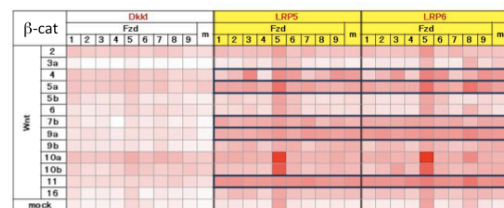
### ②-1. Wnt/Fzd の骨芽細胞分化能の検討

骨芽細胞系において発現が認められた Wnt/Fzd の各組み合わせの下流において、Wnt シグナル経路として報告されている古典的経路 ( $\beta$ -catenin 経路)・非古典的経路 ( $Ca^{2+}$  経路・JNK 経路・cAMP 経路)の活性が適切に制御されることで骨芽細胞分化が亢進すると想定された。そこで、各分子を発現するアデノウイルスを MC3T3-E1 細胞に感染させ、MC3T3-E1 細胞に各組み合わせで一過性導入した際の骨芽細胞分化・成熟マーカーである Alkaline phosphatase (ALP)の酵素活性を評価することで、骨芽細胞分化を促進する Wnt/Fzd の組み合わせを網羅的に解析することとした。またこの際、LRP5/LRP6 または LRP に結合する阻害タンパク質 Dkk1 のアデノウイルスを用いた強制導入も同時に行った。これは、古典的経路は共受容体 LRP の導入により、非古典的経路は内在性に発現する LRP の効果を抑制する Dkk1 導入により検出感度が向上する可能性を想定し、結果の多様化を狙ったためである。アッセイの結果、Dkk1 導入時はいずれの組み合わせによっても活性化度が増大しなかった一方で、LRP 導入時には Wnt/Fzd の組み合わせによって活性化度が増大したことから、骨芽細胞分化に対する古典的経路の重要性が示唆された。また、ALP 活性は LRP 導入時における Wnt5a, Wnt10a のように Wnt 選択的な活性化度の増大を示す一方で、Fzd5, Fzd7 のように特定の Fzd に対しても指向性があり、古典的経路の特徴と非古典的経路の特徴が混在する傾向が認められた。また、LRP5/LRP6 の間に骨芽細胞分化能の差はほとんど見られないことが示された(下図)。



### ②-2. Wnt/Fzd の下流で活性化するシグナル経路の同定

骨芽細胞系において発現が認められた Wnt/Fzd の各組み合わせの下流で活性化するシグナル経路の同定を行った。古典的経路 ( $\beta$ -catenin 経路)・非古典的経路 ( $Ca^{2+}$  経路・JNK 経路・cAMP 経路)の活性化度を評価した。活性評価は、各々の下流で活性化することが報告されている転写因子 TCF・NFAT・AP-1・CRE に、それぞれ応答するレポーターをレンチウイルスにより安定導入した MC3T3-E1 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより行った。これら全ての樹立細胞は陽性コントロール刺激に鋭敏に応答条件下で網羅解析を行い、強制導入した Wnt/Fzd による活性化度を解析した(下図)。この網羅的解析から、①例えば Wnt4 は、Dkk1 導入時に比して LRP 導入時において  $\beta$ -catenin 経路を強く活性化させるのに対し、逆に  $Ca^{2+}$  経路・JNK 経路に関しては LRP 導入時に比して Dkk1 導入時において強く活性化させているように、全体として LRP 導入時には古典的経路が、Dkk1 導入時には非古典的経路が活性化する傾向が認められること、② Wnt11 による



$\beta$ -catenin 経路活性化様式に見られるように、 $\beta$ -catenin 経路の活性化パターンは、比較的 Wnt に対する選択性を増やす傾向が認められる一方で、Fzd1 による  $\text{Ca}^{2+}$  経路活性化様式や Fzd7 による JNK 経路活性化様式のように、 $\text{Ca}^{2+}$  経路・JNK 経路に関しては、Fzd に対する選択性を増やす傾向が認められること、③ Wnt2/Fzd5 のように、cAMP 経路には LRP 導入時でも強く活性化させる Wnt/Fzd が存在すること、④ Wnt10a/Fzd5 は  $\beta$ -catenin 経路を特に強く活性化させるように、各シグナル経路が特定の Wnt/Fzd により特に強く活性化され得ること、⑤ LRP5/LRP6 の間に  $\beta$ -catenin 経路活性化能の差はほとんど認められないことが示された。

### ②-3. 骨芽細胞分化に対する各シグナル経路の寄与の解析

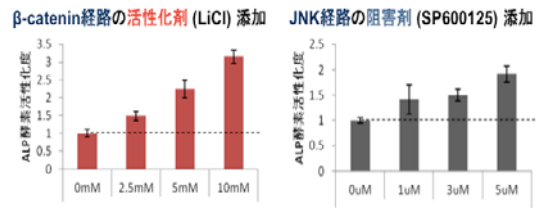
骨芽細胞分化に対する各シグナル経路の寄与を検討するため、Wnt/Fzd/Dkk1 および Wnt/Fzd/LRP の各組み合わせのシグナル経路の活性化度と ALP の酵素活性化度に関して、各シグナル経路の活性化度の対数線形和による多重回帰分析を行った。この際、各シグナル経路中で得られた最大の活性化度を 1 として各活性化度の比を取ることでそれぞれのシグナル経路同士の規格化を行い、さらに ALP 酵素活性の高い組み合わせに重み付けした解析を行うことで、骨芽細胞分化度が高いほど正確にフィットする様式にて解析した。その結果、非古典的経路の寄与も想定した ALP の酵素活性化度は、 $\ln(\text{ALP}) = 0.88 \cdot \ln(\beta\text{-cat.}) + (-0.25) \cdot \ln(\text{JNK}) + 0.07 \cdot \ln(\text{Ca}^{2+}) + (-0.21) \cdot \ln(\text{cAMP})$  ( $\beta\text{-cat.}: p < 0.001, \text{JNK}: p < 0.1, \text{Ca}^{2+}: \text{N.S.}, \text{cAMP}: p < 0.05$ )

という回帰式で表された。実際 Wnt3a/Fzd5 を含む多くの Wnt/Fzd において、Dkk1 導入時に比して LRP 導入時に ALP の酵素活性化度が増大することからも示されるように、 $\beta$ -catenin 経路が骨芽細胞分化に最も中心的に寄与すること、および非古典的経路、特に JNK 経路活性化と cAMP 経路活性化が骨芽細胞分化に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。一方で、Wnt3a/Fzd5 のように  $\beta$ -catenin 経路を活性化させていない組み合わせであっても ALP の酵素活性化度を大きく増大させる組み合わせも存在した。

### ②-4. 各シグナル経路の活性化剤・阻害剤による回帰式の妥当性検証

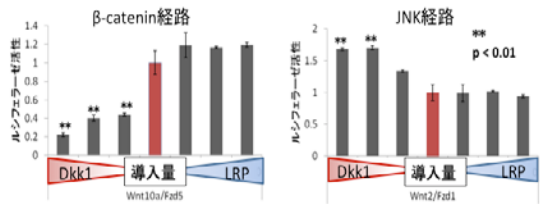
回帰式では、骨芽細胞分化を古典経路が正に制御し、非古典的経路の特に JNK 経路が負に制御することが想定された。そこで、 $\beta$ -catenin 経路の活性化剤として LiCl を、JNK 経路の阻害剤として JNK の阻害剤 SP600125 を用い、MC3T3-E1 細胞を各阻害剤含有の骨化促進用培地で 5 日間培養し、ALP の酵素活性化度を検討した。その結果、 $\beta$ -catenin 経路活

性化および JNK 経路阻害は、いずれも ALP 酵素活性化度を増大させることが確認された。これまで不明確であった非古典的経路である JNK 経路が骨芽細胞分化に対して抑制的に働いていることが明らかとなった。



### ②-5. 複合体形成可能な LRP 分子数が骨芽細胞分化を統一的に制御する

これまでの解析から、Wnt/Fzd シグナルの全体的挙動として、Dkk1 処理時に  $\beta$ -catenin 経路が抑制傾向である一方、JNK 経路が活性化傾向であった。逆に、LRP 分子が過剰に存在する条件では、逆の傾向となった。加えて、骨芽細胞分化において、 $\beta$ -catenin 経路活性化、JNK 経路の抑制が重要であった。これらのことから、Wnt/Fzd シグナル伝達は、LRP が多量にある場合に、そのこと自体が  $\beta$ -catenin 経路活性化だけでなく、積極的に JNK 経路を抑制し、逆に、Dkk1 が多量に存在し、複合体形成可能な LRP 分子数が少ない場合、 $\beta$ -catenin 経路の抑制のみならず、積極的な JNK 経路活性化が生じる可能性が示唆された。この点を、検証するため、Wnt10a/Fzd5、または Wnt2/Fzd1 導入時に、Dkk1 および LRP を段階的に導入量を変動させ、 $\beta$ -catenin 経路活性化度および JNK 経路活性化度を検討した。その結果、想定されたとおり、Dkk1 による LRP 阻害時に JNK 経路の活性化が観察された。



### ③結論

本研究において、骨芽細胞分化を制御する中心的シグナル伝達経路でありながらその詳細が不明瞭であった Wnt/Fzd シグナル伝達に関して、 $\beta$ -catenin 経路活性化および JNK 経路阻害が相俟って骨芽細胞分化を促進することが明らかとなった。さらに、 $\beta$ -catenin 経路および JNK 経路の活性化のバランスは、Wnt リガンドを受容可能な LRP 分子の量により統一的に制御されている可能性が示唆された。また、LRP 分子の細胞内動態、特に細胞表面上発現量は、Wnt 分子により制御されている可能性が想定された。今後、Wnt/Fzd のシグナル伝達と LRP の局在制御の連関を解明することで、更なる Wnt シグナ

ル経路の全体像が解明でき、創薬標的の発見が期待できる。

#### 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0件)

本研究成果は、更なる解析を追加した上で、学術雑誌にて発表する予定である。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三浦 将吾 (MIURA SHOGO)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：90529182

##### (2) 研究分担者

該当なし

##### (3) 連携研究者

該当なし