

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：33602
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23792134
研究課題名（和文） Wnt5a-Ror2 シグナルによる破骨細胞のアクチンリング形成制御機構の解明
研究課題名（英文） Regulatory mechanism of actin-ring formation through Wnt5a-Ror2 signaling pathway in osteoclasts
研究代表者
上原 俊介（UEHARA SHUNSUKE）
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：90434480

研究成果の概要（和文）：破骨細胞が骨を吸収する際に、アクチン細胞骨格の再編成によりアクチンリングと呼ばれる構造が形成される。サイトカイン Wnt5a の受容体である Ror2 を欠損した破骨細胞では、アクチンリングが形成されず、骨吸収活性も低下していることを見出した。さらに、Ror2 の下流でアクチンリング形成に関与するシグナル伝達経路を探索し、Daam2 による低分子量 G タンパク質 Rho の活性化が重要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Reorganization of actin cytoskeleton and formation of actin rings in osteoclasts are necessary for bone-resorbing activity. Ror2, a receptor of Wnt5a, was expressed in osteoclasts. Ror2 deficient osteoclasts failed to form actin rings. Furthermore, we revealed that activation of Rho via Daam2 was required for actin ring formation downstream of Ror2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔生化学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：破骨細胞、骨吸収、極性化、Wnt5a、Ror2

1. 研究開始当初の背景

(1) 破骨細胞が骨に密着する際、アクチン骨格の再編成が起こり、明帯（アクチンリング）が形成される。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、すなわち骨吸収に必須である。アクチンリングの形成には、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が必要である。アクチンリングの形成には、インテグリンを介する接着シグナル、Rho や Rac、cdc42 といった低分子量 G タンパク質が関与するという報告があるが、詳細な分子メカニズムは不明であった。

(2) 近年、骨代謝における、サイトカイン Wnt の役割が注目されている。Wnt のシグナル伝達は、 β -カテニンを介する、古典経路と介さない非古典経路に分けられる。骨芽細胞において Wnt 古典経路、非古典経路はともに骨形成を促進する役割を持つことが明らかにされていた。骨吸収に関しては、Wnt 古典経路が、骨芽細胞における osteoprotegerin (OPG; RANKL に対するデオイ受容体) の発現を亢進させることで負に制御することが示されていたが、Wnt 非古典経路がどのような役割を果たすかは不明であった。我々は、Wnt 非古典経路の受容体として機能する Ror2 が破骨細胞前駆細胞と成

成熟破骨細胞の双方に発現していることを見出していた。さらに、破骨細胞前駆細胞において、Wnt5a が Ror2 を介して JNK を活性化し、最終的に RANK の発現を上昇させることで破骨細胞への分化を正に制御していることを見出していたが、成熟破骨細胞における Ror2 を介したシグナルの役割は未解明であった。

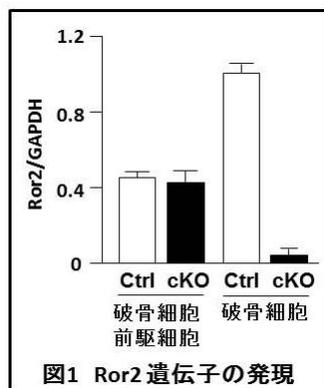
2. 研究の目的

研究の背景 (2) で記したように、成熟破骨細胞に Ror2 が発現している。我々は、Ror2 欠損破骨細胞が、アクチンリングを形成できず、骨吸収活性も非常に低いことを見出した。本研究の目的は、成熟破骨細胞のアクチンリング形成における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割を明らかにすることである。そのために、Ror2 の下流で働く分子の同定とその分子がアクチンリング形成に関与するメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 破骨細胞特異的 Ror2 欠損マウスの作製

Cre-Lox P システムを用いた conditional knock-out (cKO) マウスを作製した。Cathepsin K Cre マウスは、東京大学分子生物学研究所の加藤茂明先生より供与いただいた。Ror2 floxed マウスは当研究室で作製した。これらのマウスを掛け合わせ、Ror2 cKO マウスを得た。このマウスの破骨細胞前駆細胞においては Ror2 発現が正常であること、成熟破骨細胞において Ror2 の発現が顕著に低下していることを RT-PCR 法により確認した(図 1)。



(2) マイクロ CT による骨量の計測

8 週齢のマウス大腿骨の遠位骨幹端部をマイクロ CT により撮影し、3 次元像を構築した

のち、海綿骨量を計測した。

(3) 骨髄マクロファージからの破骨細胞形成

6~10 週齢マウス脛骨から骨髄を採取し、M-CSF 存在下 16 時間培養した。浮遊細胞を回収し、プレート又は象牙切片上に播種した。M-CSF 含有培地で 72 時間培養後、M-CSF と RANKL を含む培地で 72 時間培養した。

(4) アクチンリング染色及び吸収窩染色

象牙切片上で形成した破骨細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、ローダミン-ファロイジンにてアクチンを染色し、蛍光顕微鏡にて観察した。その後、綿棒を用いて細胞を除去し、吸収窩をマイヤーのヘマトキシリン液で染色した。

(5) Rac 及び Rho の活性測定

骨髄マクロファージより形成した破骨細胞を、サイトカインを含まない培地 (FBS 濃度を 2% に下げたもの) で 8 時間培養した (Starvation)。Wnt5a を 100 ng/mL で添加し、5 分後に cell lysate を回収した。Rac 及び Rho の活性測定は、Cytoskeleton 社の G-LISA キットを用い、添付の説明書に従い、行った。繊維芽細胞を用いた Rac 及び Rho の活性化測定においては、Starvation 時間を 16 時間とするのが通法である。しかし、破骨細胞において 16 時間の Starvation を行ったところ、生存している細胞が皆無であったため、4, 8, 12 時間の Starvation を検討したところ、8 時間で最も再現性良く測定できることが分かった。

(6) アデノウイルスの感染による遺伝子発現

恒常的活性型 (CA) の RhoA、Rac1 及びコントロールとして用いる GFP 発現用のアデノウイルスは市販のものを購入した。HEK293 細胞に感染させて増殖させ、ウイルス液を回収した。ウイルス精製キットを用いてウイルス液を濃縮・精製した後、力価を測定した。得られたウイルス液の力価は 1×10^9 pfu/mL 程度であった。骨髄マクロファージから破骨細胞を形成する系において、M-CSF と RANKL を添加してから 60 時間後にウイルス液を multiplicity of infection (MOI) 100 になるように希釈して添加し、36 時間後に各種の実験に供した。発現効率は 70~80% 程度であった。ウイルスを感染させるタイミングを決定

するため、種々の検討を行った。M-CSF と RANKL を添加してから 48 時間後に感染させると、破骨細胞分化に対する影響が大きいことが分かった。また、M-CSF と RANKL を添加してから 72 時間後に感染させると、発現効率は 50% 程度であった。

(7) shRNA 発現用アデノウイルスの作成

Daam2 ノックダウンのための shRNA は、クロンテック社のウェブサイトにて提供されているソフトウェアを使用し、設計した。設計した shRNA を含むオリゴ DNA をプラスミド (pSIREN) につないだ。制限酵素処理により切り出した目的の断片を Adeno X ベクターにつなぎ、アデノウイルスベクターを得た。得られたベクターを HEK293 にトランスフェクションし、14 日後に感染細胞を回収し、一次ウイルス液を得た。その後の増幅、濃縮、精製は、(6) に記したのと同様である。

4. 研究成果

(1) Ror2 cKO マウスの形質

マイクロ CT を用いた解析により、Ror2 cKO マウスの骨量が、コントロールマウスと比較して、有意に増加していた。骨形成マーカーである血清中のアルカリホスファターゼを測定したところ、両群間に有意な差は認められなかった。また、骨組織を詳細に解析したところ、破骨細胞数においても、Ror2 cKO とコントロールとで有意な差は認められなかった。これらの結果から、Ror2 cKO マウスの破骨細胞は骨吸収活性が低下している可能性が考えられた。

(2) Ror2 cKO 破骨細胞の in vitro での形質

骨髄マクロファージから破骨細胞を形成した。F-アクチン染色により、Ror2 cKO 破骨細胞では、アクチンリングが形成されていないことが明らかになった。この結果と一致して、骨吸収活性も、Ror2 cKO 破骨細胞ではほとんど認められなかった。すなわち、Wnt5a-Ror2 シグナルは、成熟破骨細胞におけるアクチンリングの形成に関与することが示唆された。

(3) Rac、Rho の活性化に対する Ror2 の役割

コントロールマウス由来の破骨細胞においては、Wnt5a 刺激により、5 分で Rac、Rho ともに活性化された。Ror2 cKO 破骨細胞では、

Wnt5a を添加しても、どちらも活性化されなかった。Ror2 cKO 破骨細胞においても、M-CSF で誘導される Rac、Rho の活性化はコントロールと同程度に認められたことから、Ror2 は Wnt5a 誘導性の Rac、Rho 活性化に特異的に関わると考えられる。

(4) CA-Rac1 及び CA-RhoA の破骨細胞への導入

コントロール及び Ror2 cKO 破骨細胞に、CA-Rac1 及び CA-RhoA を発現させた。どちらのタンパク質も発現が上昇していることをウエスタンブロット法により確認した。CA-RhoA を発現させた場合のみ、Ror2 cKO 破骨細胞のアクチンリングが形成され、骨吸収活性も回復した。

(5) 破骨細胞における Daam の発現

これまでの報告で、Dishevelled-associated activator of morphogenesis (Daam)1 が Wnt 非古典経路における Rho の活性化に関与することが報告されている。Daam には、Daam2 というアイソフォームも存在する。そこで、Daam1 及び 2 の発現を RT-PCR 法を用いて検討した。Daam1 の発現は、破骨細胞前駆細胞、成熟破骨細胞共に認められなかった。Daam2 は、破骨細胞前駆細胞には発現していなかったが、成熟破骨細胞には高発現していることが明らかとなった。

(6) Daam2 のノックダウンによる破骨細胞機能への影響

破骨細胞における Daam2 の重要性を明らかにするため、shRNA による Daam2 のノックダウンを行った。タンパク質レベルでの発現低下をウエスタンブロット法により確認した。Daam2 ノックダウンにより、Wnt5a 誘導性の Rho 活性化は完全に抑制された。Rac の活性化は抑制されなかった。アクチンリング形成及び骨吸収活性は、Daam2 ノックダウンにより有意に減少した。この減少は、CA-RhoA を発現させることで回復した。

(7) まとめと考察

破骨細胞において Wnt5a-Ror2 シグナルは、Daam2 を介して Rho を活性化することで、アクチンリング形成及び骨吸収活性を調節していることが明らかとなった (図 2)。今後は、Rho がどのようにアクチンリング形成を制御

するかについて検討していく必要がある。

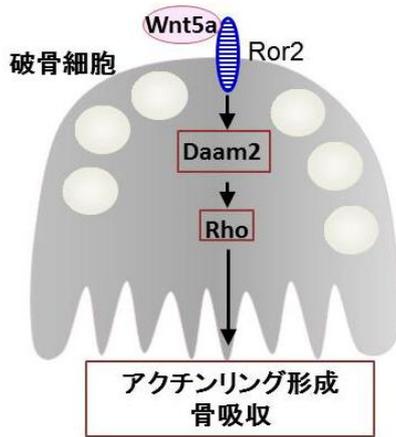


図2 研究成果の概念図

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3件)

(1) Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, Matsuo K. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J. Cell Biol.* Vol. 197: 553-568, 2012. 査読有
DOI : 10.1083/jcb.201111116

(2) 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. *Nat. Med.* Vol. 18: 405-412, 2012. 査読有
DOI : 10.1038/nm.2653

(3) 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 tartrate-resistant acid phosphatase on dentin slices; A simple method for identifying polarized osteoclasts. *Bone* Vol. 49: 1331-1339, 2011. 査読有
DOI : 10.1016/j.bone.2011.09.045

[学会発表] (計5件)

(1) Uehara S, Nakayama T, Mizoguchi T, Yamashita T, Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N: Dynasore rapidly disrupts podosomes belts in polarized osteoclasts 34th American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Annual Meeting (2012年10月15日) ミネアポリスコンベンションセンター (アメリカ ミネアポリス)

(2) Uehara S, Nakayama T, Mizoguchi T, Yamashita T, Kobayashi Y, Udagawa N, Takahashi N: Inhibitor of dynamin rapidly disrupts actin rings of osteoclasts 1st Asia-pacific bone and mineral research meeting, 22nd Annual scientific meeting Austrian & New Zealand bone & mineral Society (2012年9月4日) パンパシフィックパース (オーストラリア パース)

(3) 上原俊介, 中山貴裕, 溝口利英, 山下照仁, 小林泰浩, 小澤英浩, 宇田川信之, 高橋直之: ダイナミン阻害剤ダイナソアはアクチンリング形成を阻害する 第30回日本骨代謝学会学術集会 (2012年7月20日) 京王プラザホテル(新宿区)

(4) 上原俊介, 中山貴裕, 溝口利英, 山下照仁, 小林泰浩, 小澤英浩, 宇田川信之, 高橋直之: ダイナミン阻害剤は破骨細胞のアクチンリング形成を抑制する 第74回松本歯科大学学会例会 (2012年7月14日) 松本歯科大学(塩尻市)

(5) 山下照仁, 上原俊介, 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之: アルクチゲニン¹はNFATc1の核移行を促進するが転写活性を抑制する 第29回日本骨代謝学会学術集会 (2011年7月30日) 大阪国際会議場(大阪市)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 俊介 (UEHARA SHUNSUKE)
松本歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 90434480